

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

TOM 25 NR-2'98
(153–340)

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.

Quarterly of the Polish Anatomical Society, the Polish Society of Cell Biology, the Polish UNESCO Net, and the Foundation for Cell Biology and Molecular Biology, partially supported by the Committee for Scientific Research (KBN)

Redaguje Kolegium – Editors:

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*),

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

JACEK KUŹNICKI (biochemia, biologia molekularna – *Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, 02-097 Warszawa, ul. Pasteura 3*).

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. Chałubińskiego 6a*)

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

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

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

© Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej – Foundation for Cell Biology and Molecular Biology

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

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced in any form or by any means without the prior written permission of the publisher. Requests to the publisher for permission should be addressed to the Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

W tym Zeszycie

- Receptory limfocytów $T\gamma\delta$ ($TCR\gamma\delta$) są kodowane przez stosunkowo nieliczne geny $V\gamma J\gamma$ oraz $V\delta D\delta J\delta$ podlegające somatycznej rearanżacji. U ssaków liczba limfocytów $TCR\gamma\delta$ jest gatunkowo swoista. Na przykład jest ich dużo u krów i owiec, ale niewiele u człowieka i myszy. U myszy limfocyty $TCR\gamma\delta$ spotyka się głównie w skórze i nabłonku jelita. Funkcje tych komórek są szczegółowo omówione w artykule na stronie 155.
- Ekspresja podjednostek proteasomów może być indukowana interferonem γ , co z kolei wpływa na spektrum peptydów powstających podczas proteolizy białek komórkowych w tej organelli. Artykuł na stronie 171 jest kontynuacją tego tematu omawianego już w „Postęпах” (PBK 1995, 22: 295–315).
- Prezentacja peptydów wirusa na powierzchni komórki w związku z cząsteczkami MHC klasy I warunkuje rozpoznanie przez limfocyty T zakażonej komórki i jej zabicie. Niektóre wirusy potrafią jednak uniknąć wykrycia i eliminacji zakażonych przez siebie komórek, co może sprzyjać rozwojowi patogenu. Przedstawiono (str. 211) przykłady i mechanizmy blokowania przez wirusy prezentacji peptydów.
- Na stronie 283 przedstawiono obecne poglądy na patogenezę i mechanizmy zakażenia wirusem HIV. Omówiono też perspektywy nowych strategii terapeutycznych opartych na ingerencji w mechanizmy wnikańia wirusa do komórek.
- Dwa artykuły są poświęcone cytoszkieletowi. Jeden na stronie 251 dotyczy roli γ -tubuliny w nukleacji i dynamice mikrotubuli, a w drugim na stronie 263 omówiono rolę cytoszkieletu w rozmieszczeniu produktów genów w oocytach *Drosophila*. W tym drugim artykule również scharakteryzowano gen *oscar*.

W następnym zeszycie „Postępów” będzie o:

- cytotoksycznych rybonukleazach o szczególnym działaniu biologicznym (rysbazach);
- apoptozie;
- septynach – nowej rodzinie białek cytoszkieletowych.

LIMFOCYTY O RECEPTORACH GAMMA/DELTA ($\gamma\delta$ T)

LYMPHOCYTES WITH GAMMA/DELTA RECEPTORS ($\gamma\delta$ T)

Marian SZCZEPANIK¹ i Barbara PŁYTYCZ²

¹ Katedra Immunologii, Collegium Medicum UJ,

² Zakład Immunobiologii Ewolucyjnej Instytutu Zoologii UJ, Kraków

Streszczenie: Receptory dla antygeny limfocytów $\gamma\delta$ T są heterodimerami łańcuchów γ i δ , kodowanymi przez stosunkowo niewielką liczbę genów $V\gamma J\gamma$ i $V\delta D\delta J\delta$ podlegających procesowi somatycznej rearanżacji. Geny te są obecne u wszystkich współczesnych kręgowców zuchwowych. U ssaków liczba, rozmieszczenie i różnicowanie receptorów komórek $\gamma\delta$ T są gatunkowo-specyficzne. Jest ich dużo u przeżuwaczy (u krów i owiec), a niewiele u człowieka i u myszy. U myszy lokalizują się głównie w skórze i w nabłonku jelita. Część komórek $\gamma\delta$ T rozpoznaje kompleksy peptyd-MHC i reaguje na nie w sposób podobny do limfocytów $\alpha\beta$ T, natomiast inne rozpoznają preferencyjnie pewne antygeny białkowe (np. HSP) lub cząsteczki nie będące peptydami (lipidy, węglowodany, ufosforylowane metabolity) prezentowane przez niekonwencjonalne białka MHC albo nawet rozpoznają je wprost. Uważa się, że niektóre komórki $\gamma\delta$ T mogą odgrywać rolę pośrednią między odpornością wrodzoną a odpornością adaptacyjną z udziałem limfocytów $\alpha\beta$ T.

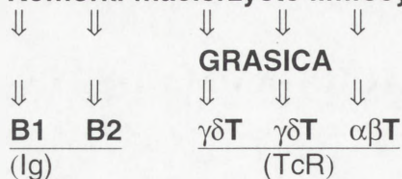
Słowa kluczowe: receptory antygenów, rozpoznawanie antygenów, dojrzewanie limfocytów

Abstract: The antigen receptors of $\gamma\delta$ T lymphocytes are heterodimers of γ and δ chains encoded by the relatively low number of somatically rearranged $V\gamma J\gamma$ and $V\delta D\delta J\delta$ genes. $V\gamma$ and $V\delta$ genes are present in all contemporary jawed vertebrates. The number, distribution and receptor variability of the mammalian $\gamma\delta$ T cells are species-specific; $\gamma\delta$ T cells are very common in ruminants (cows, sheep) but relatively rare in human and mice. In mice they are preferentially located in the skin and intestinal epithelium. Some $\gamma\delta$ T cells recognize peptide-MHC complexes and react to them in a conventional ($\alpha\beta$ T-like) way while others preferentially recognize HSP proteins or nonpeptide molecules (lipids, carbohydrates, phosphorylated metabolites) presented by nonconventional MHC molecules or even recognize them directly. It seems that some $\gamma\delta$ cells may play an intermediate role between the innate and the adaptive $\alpha\beta$ T-mediated immunity.

Key words: antigen receptors, antigen recognition, lymphocyte maturation

Limfocyty są komórkami występującymi wyłącznie u zwierząt kręgowych (ryb, płazów, gadów, ptaków i ssaków), a więc u niespełna 4% współczesnych gatunków zwierząt [65]. Aby komórkę nazwać limfocytym, trzeba udowodnić, że posiada ona receptory dla antygeny kodowane przez geny V(D)JC, ulegające unikatowemu

Komórki macierzyste limfocytów



Rys. 1. Populacje limfocytów

procesowi rearanżacji somatycznych warunkujących ogromne bogactwo miejsc wiążących antygen [64]. Ze względu na strukturę tych receptorów wyróżnia się limfocyty B (o receptorach Ig niemal identycznych z krążącymi immunoglobulinami) oraz limfocyty T o prościej zbudowanych receptorach TcR (*T cell receptors*), dojrzewające z reguły w grasicy (*thymus*) (rys. 1).

Ostatnio obraz ten znacznie się skomplikował. Wśród limfocytów produkujących immunoglobuliny wyróżniono konwencjonalne komórki B2 i nowo odkryte komórki B1, natomiast wśród limfocytów T, obok konwencjonalnych limfocytów $\alpha\beta$ T o receptorach będących heterodimerami łańcuchów α i β ($\alpha\beta$, TcR2) wykryto limfocyty $\gamma\delta$ T (o receptorach $\gamma\delta$, TcR1) [34]. Niniejszy artykuł ukazuje obecny stan wiedzy na temat limfocytów $\gamma\delta$ T, z których część dojrzewa poza grasicą (rys. 1), lokuje się w specyficznych miejscach ustroju i rozpoznaje antygeny bez udziału klasycznych białek MHC.

1. GENY DLA RECEPTORÓW $\gamma\delta$

W każdej komórce istnieją geny dla wszystkich czterech łańcuchów TcR: α , β , γ i δ . Domeny zmienne (wiążące antygen) łańcuchów α i γ kodowane są przez geny V i J, natomiast łańcuchów β i δ przez geny V, D i J [64]. U myszy kompleks genów kodujących część zmienną łańcucha γ TCR obejmuje tylko siedem obszarów V γ oraz cztery J γ . W przypadku genów kodujących domenę zmienną łańcucha δ TCR wyróżnia się 10 obszarów V δ , dwa D δ oraz dwa J δ [82]. U człowieka domena zmienna łańcucha γ jest kodowana przez 12 genów V γ i 2 obszary J γ składające się z 3 i 2 genów. Łańcuch δ kodowany jest natomiast przez co najmniej 4 geny V δ (mieszczące się pomiędzy segmentami V α) oraz 3 segmenty D δ i 3 J δ , ułożone między zespołem 70–80 genów V α a 61 genów J α [34].

Geny β , γ i δ ulegają rekombinacjom somatycznym w grasicy prawie rów-

nocześnie. Udana rearanzacja łańcucha β hamuje rearanzację w genach γ i δ oraz umożliwia rearanzację w genach α , komórka staje się więc limfocytom $\alpha\beta$ T. Natomiast limfocytom $\gamma\delta$ stanie się ta komórka, w której wcześniej dokona się funkcjonalna rearanzacja genów dla łańcuchów γ i δ [34].

Dzięki technice PCR, geny dla wszystkich czterech typów łańcuchów budujących TCR (α , β , γ i δ) wykryto nawet u najstarszych filogenetycznie kręgowców żuchwowych, a mianowicie u ryb chrzęstnoszkieletowych. Przypuszcza się więc, że podział limfocytów T na komórki $\alpha\beta$ i $\gamma\delta$ istnieje u wszystkich kręgowców [14, 69]. Aby się o tym przekonać, trzeba wykazać ekspresję białek kodowanych przez te geny na powierzchni komórek, do czego należy się posłużyć odpowiednimi przeciwciałami monoklonalnymi.

W okresie pisania tego artykułu brak jest dowodów wprost na obecność komórek $\gamma\delta$ u kręgowców zmiennocieplnych. Za ich obecnością u ryb przemawia wykrycie licznych komórek T w jelicie, skórze i skrzelach mających inne białka powierzchniowe niż limfocyty z grasicy [71]. O ich obecności u płazów świadczy natomiast obecność licznych limfocytów T w jelicie i śledzionie płatajny, *Xenopus laevis*, poddanej wczesnej tymektomii [31].

Wśród ssaków zanotowano duże międzygatunkowe różnice zarówno w strukturze, jak i w ekspresji genów kodujących łańcuchy γ i δ . Porównanie sekwencji nukleotydów łańcuchów gamma i delta wykazało, że geny te u człowieka są bardziej zbliżone do odpowiednich łańcuchów u myszy (przedstawiciela gryzoni) niż do wzajemnie podobnych genów u krowy, owcy i świni (przedstawicieli ssaków parzystokopytnych). Jest to sprzeczne z wszelkimi innymi danymi dotyczącymi ewolucji tych jednostek systematycznych dowodzącymi, że gryzoni są filogenetycznie bardziej odległe od naczelnych niż ssaki kopytne. Odmienny przebieg ewolucji genów dla receptorów limfocytów jest prawdopodobnie związany z innym udziałem komórek $\gamma\delta$ w tych jednostkach systematycznych. Człowiek i mysz należą do gatunków o stosunkowo niewielkiej liczbie limfocytów $\gamma\delta$ T, natomiast przeżuwacze mają ich bardzo dużo [15].

2. DOJRZEWANIE I ROZMIESZCZENIE LIMFOCYTÓW $\gamma\delta$ W USTROJU

Głównym źródłem komórek rozwijających się w limfocyty $\gamma\delta$ jest płodowa wątroba, gdyż jej komórki hemopoetyczne są w stanie w pełni zrekonstruować repertuar limfocytów $\gamma\delta$ u myszy SCID. Repertuar nie jest pełny przy użyciu do rekonstrukcji komórek śledziony noworodków lub szpiku myszy dorosłych [40].

Przeważająca liczba limfocytów $\gamma\delta$ dojrzewa w grasicy. Wywodzą się one ze wspólnych prekursorów z limfocytami $\alpha\beta$. Przemawia za tym fakt, że w dojrzałych

limfocytach $\gamma\delta$ są geny dla łańcucha β po procesie rearanzacji, i *vice versa*, limfocyty $\alpha\beta$ zawierają „sklejane” geny dla łańcuchów γ lub δ [34].

Limfocyty $\gamma\delta$, podobnie jak komórki $\alpha\beta$, ulegają podczas dojrzewania w grasicy procesowi selekcji pozytywnej oraz negatywnej, polegającej na usunięciu komórek nieprzydatnych oraz potencjalnie niebezpiecznych (autoreaktywnych). W procesach tych, w przypadku komórek $\alpha\beta$, uczestniczą antygeny głównego kompleksu zgodności tkankowej (MHC) komórek nabłonkowych i fagocytyujących. Wiele badań wskazuje natomiast na to, iż antygeny zgodności tkankowej MHC nie pełnią kluczowej roli w procesie dojrzewania limfocytów $\gamma\delta$. Wykazano między innymi, iż myszy z defektywnych szczepów nie mających antygenów MHC-I lub MHC-II wykazują prawidłowy poziom limfocytów $\gamma\delta$ przy jednoczesnym występowaniu drastycznych zmian w repertuarze komórek $\alpha\beta$ [7]. Zatem wydaje się, że co najmniej znaczna część populacji komórek $\gamma\delta$ nie wymaga obecności antygenów MHC-I/MHC-II w trakcie dojrzewania. Zatem proces selekcji odbywa się inną drogą, aniżeli ma to miejsce w przypadku komórek $\alpha\beta$.

Komórki $\gamma\delta$ pojawiają się jako pierwsze w ontogenezie myszy. W początkowym okresie życia osobniczego, limfocyty $\gamma\delta$ kolonizują kolejno różne tkanki organizmu. Pierwsza fala komórek $\gamma\delta$ wykorzystujących obszar $V\gamma 5$ zasiedla skórę, gdzie opisuje się je jako dendrytyczne komórki naskórkowe (*dendritic epidermal cells*), a druga fala (z funkcjonującym obszarem $V\gamma 6$) zasiedla nabłonek dróg rozrodczych. Co ciekawe, w każdej z tych fal komórek praktycznie te same geny $V\gamma$ i $V\delta$ są sklejone z tymi samymi genami J, nie ma zmienności wynikającej z niedokładności łączenia genów i nie są wklejane nowe (N) fragmenty DNA. To wszystko sprawia, że wczesne komórki $\gamma\delta$ są praktycznie homogenne pod względem receptorów.

W późniejszym okresie życia komórki T są produkowane w sposób ciągły z przewagą limfocytów $\alpha\beta$. Komórki $\gamma\delta$ z tego okresu trafiają do różnych narządów limfatycznych i mają większą różnorodność receptorów z powodu użycia większej liczby genów V ($V\gamma 1,2,4,7$) i wstawiania licznych fragmentów N [34].

Wyniki badań u myszy świadczą o znacznej predylekcji komórek $\gamma\delta$ wykorzystujących odmienne segmenty zmienne $V\gamma$ do różnych tkanek. W skórze występują komórki $V\gamma 5$, a w jelicie $V\gamma 7$. Komórki wykorzystujące obszar zmienny $V\gamma 4$ kolonizują śledzionę, węzły chłonne, ale również można je znaleźć we krwi obwodowej, płucach i gruczole mlecznym. Z kolei region zmienny $V\gamma 6$ jest wykorzystywany przez limfocyty $\gamma\delta$ znajdujące się w macicy, pochwie i języku, natomiast obecność segmentu $V\gamma 1$ można stwierdzić na limfocytach $\gamma\delta$ kolonizujących wątrobę oraz śledzionę [25,29]. Przypuszcza się, że za tą uporządkowaną wędrówkę komórek $\gamma\delta$ do określonych narządów odpowiedzialne są swoiste, lecz dotychczas bliżej nieznanne receptory [18].

U myszy, wyłączając grasicę, prawie połowa limfocytów T znajduje się w jelicie. Śródnabłonkowe limfocyty jelitowe (limfocyty intraepitelialne, IEL) obejmują 30–60% komórek $\gamma\delta T$. Wiele danych wskazuje na to, że śródnabłonkowe limfocyty

$\gamma\delta$ T dojrzewają lokalnie w jelicie [24,46,70,79]. O użyciu przez nie segmentów V γ 1 lub V γ 7 w formowaniu domeny zmiennej łańcucha γ decydują geny blisko sprzężone z TcR γ , TcR δ i MHC [61].

O pozagrasicyzm dojrzewaniu limfocytów $\gamma\delta$ T świadczy ich obecność u myszy bezgrasicznych (*nude*) [5,70]. Badania przeprowadzone na myszach tymektomizowanych 24 do 72 godziny przed urodzeniem wykazały jednak istotny spadek liczby limfocytów śród nabłonkowych IEL. Fakt ten może sugerować, że część prekursorów komórek IEL wywodzi się z grasicy, względnie grasicca jest źródłem czynników hormonalnych niezbędnych dla ich prawidłowego dojrzewania [45].

Lokalne węzły chłonne nie są konieczne do rozwoju populacji komórek IEL, gdyż limfocyty jelitowe śród nabłonkowe są obecne u myszy z mutacją *aly/aly*, pozbawionych węzłów chłonnych i kępek Peyera [55].

Ciekawego porównania jelitowych limfocytów $\alpha\beta$ i $\gamma\delta$ u myszy dokonał Kawaguchi-Miyashita i wsp. [39]. Badacze ci wykazali, że pula limfocytów $\alpha\beta$ w nabłonku jelitowym jest najliczniejsza u myszy konwencjonalnych, zmniejszona do połowy u gnotobiontów, czyli okazów hodowanych w warunkach sterylnych (*germ-free*, pozbawionych żywych zarazków), a znowu zmniejszona prawie o połowę u myszy *germ-free* hodowanych przez 12–14 tygodni na diecie o zminimalizowanej zawartości antygenów, lecz zawierającej pełny zestaw aminokwasów i witamin. W tych samych grupach myszy liczba limfocytów $\gamma\delta$ nie zmieniała się w sposób istotny, choć była nieco zmniejszona u myszy na diecie bez antygenów. Wynika z tego, że proliferacja limfocytów $\alpha\beta$ wymaga stymulacji przez żywe drobnoustroje, natomiast aktywacja limfocytów $\gamma\delta$ wymaga antygenów innych niż żywe mikroorganizmy. Nie wiadomo jeszcze, czy są to egzogenne antygeny pochodzące wprost z pokarmu, czy też antygeny pokarmowe indukują w komórkach nabłonkowych ekspresję jakichś cząsteczek własnych stymulujących limfocyty $\gamma\delta$. Za tą hipotezą przemawia fakt, że limfocyty $\gamma\delta$ proliferują najintensywniej w dwunastnicy, gdzie jest najintensywniejszy przepływ antygenów pokarmowych [60].

Nie znamy szczegółów ontogenezy limfocytów $\gamma\delta$ u człowieka. Człowiek nie ma odpowiedników skórnych dendrytycznych komórek $\gamma\delta$ T [34], ma natomiast limfocyty T $\gamma\delta$ w przewodzie pokarmowym i w drogach rozrodczych oraz limfocyty $\gamma\delta$ T towarzyszą komórkom $\alpha\beta$ T we wszystkich tkankach i narządach [17].

Jak już wspomniano, ogólna pula limfocytów $\gamma\delta$ T myszy i człowieka jest niewielka; w krwi obwodowej stanowią one tylko 5% limfocytów. Przeciwnieństwem są przeżuwacze, u których mogą one stanowić ponad 50% limfocytów [15]. U bydła zaobserwowano zwiększoną liczbę komórek $\gamma\delta$ T krwi obwodowej pod wpływem stresu cieplnego [54]. Komórki $\gamma\delta$ T stanowią aż 44% limfocytów występujących w skórze krowy. W przeciwieństwie do myszy, ich receptory antygenowe są bardzo zróżnicowane [28]. Liczba komórek $\gamma\delta$ T jest znikoma w śródbłonku jelita cieląt-noworodków, lecz szybko zwiększa się z wiekiem [99]. Specjalna populacja limfocytów $\gamma\delta$ T występuje w gruczole mlecznym kóz i poziom tych komórek

podlega fluktuacjom u samic ciężarnych, w okresie laktacji i spoczynku [33]. Komórki $\gamma\delta$ T są częste w endometrium macicy owcy. Uważa się, że ich aktywacja sprzyja wzrostowi łożyska i podtrzymaniu ciąży [47,96]. Komórki $\gamma\delta$ T są też liczne i dobrze scharakteryzowane u świń [88].

3. ROZPOZNANIE ANTYGENU

Podobnie do limfocytów $\alpha\beta$, limfocyty $\gamma\delta$ rozpoznają antygen przy pomocy receptora antygenowego TCR połączonego z kompleksem CD3.

Konwencjonalne limfocyty $\alpha\beta$ rozpoznają z reguły peptydy antygenowe prezentowane przez wyspecjalizowane białka kodowane w obrębie głównego regionu zgodności tkankowej MHC (*major histocompatibility complex*). Peptydy te muszą być uprzednio odpowiednio przygotowane przez komórki prezentujące antygen. Innymi słowy, regułą jest ścisła interakcja trzech odpowiednio dobranych cząsteczek: TcR2-peptyd-MHC. Część limfocytów $\alpha\beta$ ulega aktywacji przez tzw. superantygeny bakteryjne wiążące odpowiedni fragment receptora TCR niezależnie od domeny zmiennej. Regułą jest, że aktywacja limfocytów $\alpha\beta$ wymaga nie tylko rozpoznania antygeny, lecz również dostarczenia komórce dodatkowych sygnałów w postaci związania z odpowiednim ligandem również innych receptorów danej komórki.

Są dowody na to, że część limfocytów $\gamma\delta$ rozpoznaje antygeny i superantygeny białkowe podobnie do komórek $\alpha\beta$, natomiast część limfocytów $\gamma\delta$ rozpoznaje antygeny nie będące peptydami, bez uprzedniego przygotowania ich przez komórki prezentujące antygen i bez udziału konwencjonalnych białek MHC [2,38,94].

Większość prób zmierzających do generacji komórek $\gamma\delta$ swoistych dla antygenów wirusowych i białkowych kończy się fiaskiem. Wyjątek stanowią antygeny związane z *Mycobacterium* (*M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. bovis*) oraz sama tuberkulina (PPD). Początkowo przypuszczano, iż limfocyty $\gamma\delta$ swoiste dla *Mycobacterium* rozpoznają białka szoku termicznego HSP65. Jednak dalsze badania wykazały, że tylko niewielki procent PPD-reaktywnych limfocytów $\gamma\delta$ rozpoznaje HSP65 [36,49,63] i okazało się, że są to komórki o receptorach V γ 1.1/V δ 6. Obecnie istnieją sugestie, iż HSP mogą stanowić rodzaj superantygeny reagującego z receptorem TCR γ lub δ , co z kolei może prowadzić do ekspansji klonu komórek mających na swej powierzchni receptory z segmentami zmiennymi V γ 1.1 oraz V δ 6 [8].

Niektóre limfocyty $\gamma\delta$, podobnie do komórek $\alpha\beta$, mają zdolność rozpoznawania klasycznych superantygenów pochodzenia bakteryjnego [81]. Przykładem może być subpopulacja ludzkich limfocytów V γ 9 rozpoznająca enterotoksynę gronkowcową (SEA) [48].

Limfocyty $\gamma\delta$ człowieka o receptorach V γ 9/V δ 2 rozpoznają niebiałkowe metabolity bogate w reszty fosforanowe (*phosphorylated metabolites*). Liczba tych

komórek wzrasta z wiekiem, prawdopodobnie pod wpływem stymulacji przez powszechnie występujące ufosforylowane metabolity bakteryjne [17].

Dalsze badania prowadzone nad charakterem antygeny rozpoznawanego przez komórki $\gamma\delta$ wykazały, iż mogą one rozpoznawać antygeny lipidowe (kwasy tłuszczowe), nukleotydy, jak również antygeny o charakterze cukrów i peptydów [37,44]. Według Janeway'a i Traversa istnieje też możliwość, iż komórki $\gamma\delta$ rozpoznają nie sam antygen, lecz zmiany ekspresji białek powierzchniowych komórek np. nabłonka jelita, które mogą być wynikiem działania na komórkę rozmaitych czynników endogennych lub egzogennych, np. pochodzenia bakteryjnego [34].

Kolejnym zagadnieniem dotyczącym rozpoznania antygeny przez limfocyty $\gamma\delta$ jest sposób prezentacji antygeny tej grupie limfocytów. Limfocyty $\alpha\beta$ rozpoznają antygen konwencjonalny łącznie z antygenami zgodności tkankowej MHC-I lub MHC-II [93]. W przypadku komórek $\gamma\delta$ np. toksyna tężcowa może być rozpoznawana w kontekście antygenów MHC-II [43]. Niemniej jednak istnieje szereg doniesień mówiących o istnieniu odrębnej grupy molekuł zaangażowanych w prezentacji antygeny limfocytom $\gamma\delta$ T. Jest to tzw. klasa antygenów Ib zbliżonych pod względem budowy do antygenów MHC I, a która obejmuje u myszy molekuły Qa, TL oraz CD1 [10,11,92]. Według niektórych autorów limfocyty $\gamma\delta$ rozpoznają peptydy oraz inne substancje niskocząsteczkowe, takie jak węglowodany, kwasy tłuszczowe, właśnie w połączeniu z antygenami Ib [38].

Dość enigmatyczny pozostaje również problem przygotowania antygeny dla komórek $\gamma\delta$. Szereg badań wykazało, iż limfocyty $\gamma\delta$ mogą rozpoznawać antygeny, które nie uległy uprzedniemu przetworzeniu przez komórki prezentujące antygen (APC), a funkcję komórek prezentujących antygen mogą niekiedy pełnić również limfocyty $T\alpha\beta$ [52,77,87,97].

Dla pełnej aktywacji limfocytów $T\gamma\delta$, poza rozpoznaniem antygeny, niezbędne jest również uzyskanie drugiego sygnału pochodzącego z komórek APC, które odbywa się w drodze bezpośredniego kontaktu lub uwalnianych cytokin. Limfocyty $\gamma\delta$ mogą jednak rozpoznawać nie tylko antygen znajdujący się na powierzchni profesjonalnych komórek APC, ale również antygen zlokalizowany bezpośrednio na powierzchni patogenu. Sugeruje to, iż sygnały kostymulacyjne nie pełnią kluczowej roli w aktywacji tej populacji komórek. Niektóre badania dowodzą, że istotną rolę w aktywacji komórek $\gamma\delta$ w obwodowych narządach chłonnych pełni interakcja cząsteczek CD28 limfocytu i B7 komórki prezentującej antygen [78]. Z kolei inne badania wykazały aktywację limfocytów $\gamma\delta$ T u myszy z usuniętym genem kodującym molekułę CD28 (*CD28-knock out mice*) [75], co świadczy, że także inne cząsteczki mogą dostarczać drugiego sygnału omawianej populacji komórek. Zalicza się do nich między innymi molekuły CD43 oraz Thy-1 [8].

4. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA LIMFOCYTÓW $\gamma\delta$

Limfocyty $\alpha\beta$ pełnią rozmaite funkcje w zależności od posiadanych koreceptorów wiążących cząsteczki MHC-I (koreceptor CD8) lub MHC-II (koreceptor CD4). Limfocyty $\alpha\beta$ CD8⁺ są cytotoksyczne lub supresyjne w stosunku do komórek, na powierzchni których rozpoznały peptyd w kontekście białek MHC-I, natomiast limfocyty CD4⁺ pełnią funkcje pomocnicze w stosunku do komórek, na powierzchni których rozpoznały peptydy w kontekście białek MHC-II.

Limfocyty $\gamma\delta$ stanowią bardzo heterogenną grupę komórek. Większość z nich to limfocyty podwójnie negatywne (CD4⁻ CD8⁻), a niewielki odsetek stanowią komórki $\gamma\delta$ CD4⁺ lub CD8⁺. Istnieją doniesienia, iż limfocyty $\gamma\delta$ CD4⁺ mają zdolność do produkcji cytokin i pełnią funkcję komórek pomocniczych przy bardzo niskiej aktywności cytotoksycznej [53]. Limfocyty $\gamma\delta$ mogą wykazywać aktywność pomocniczą w odpowiedzi humoralnej [21,30,95].

W przypadku komórek $\gamma\delta$ CD8⁺ oraz CD4⁻CD8⁻ obserwowano stosunkowo niską produkcję cytokin przy wysokiej aktywności cytotoksycznej [53]. Komórki z receptorem $\gamma\delta$ wykazują także aktywność cytotoksyczną, która ulega nasileniu w obecności IL-2 [16]. Ponadto niektóre komórki $\gamma\delta$ mają zdolność do mediowania mechanizmu cytotoksyczności zależnej od przeciwciał (ADCC) [73].

Limfocyty $\gamma\delta$ mają zdolność do produkcji i uwalniania licznych cytokin (między innymi IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF- α , TNF- β , TGF- β , IFN- γ oraz GM-CSF) [32,53,80], a niektóre populacje limfocytów $\gamma\delta$ produkują też chemokiny. Komórki $\gamma\delta$ IEL uwalniają limfotaktynę, która jest silnym chemoatraktantem dla populacji limfocytów T $\alpha\beta$. Ponadto dendrytyczne limfocyty $\gamma\delta$ w skórze myszy, oprócz limfotaktyny, wytwarzają takie chemokiny, jak: MIP-1 α , MIP-1 β oraz RANTES [9].

Limfocyty $\gamma\delta$ wykazują też aktywność immunoregulacyjną – supresyjną oraz kontrasupresyjną. Wykazano, że komórki $\gamma\delta$ wywierają działanie immunoregulacyjne na limfocyty T $\alpha\beta$, limfocyty B, makrofagi, komórki NK, jak również granulocyty [37]. Wyniki badań przeprowadzonych w licznych ośrodkach wykazują, iż limfocyty $\gamma\delta$ mają zdolność do hamowania różnego typu odpowiedzi immunologicznej. Działanie supresyjne limfocytów $\gamma\delta$ obserwowano zarówno w przypadku odpowiedzi humoralnej, jak i komórkowej [50,51,84,85]. Limfocyty te poza swym działaniem supresyjnym mogą również pełnić rolę komórek kontrasupresyjnych zarówno w odpowiedzi humoralnej (M. Szczepanik, w przygotowaniu), jak i komórkowej [1,2,22,66,67,86].

Dokładny mechanizm działania immunoregulacyjnego komórek $\gamma\delta$ pozostaje nadal niejasny. Wyniki własnych badań (M. Szczepanik) wskazują, iż obserwowane zjawisko supresji reakcji nadwrażliwości kontaktowej przez limfocyty $\gamma\delta$ może być choć po części wynikiem uwalniania IL-4 przez komórki T $\gamma\delta$. Istnieją także doniesienia wskazujące na to, że limfocyty $\gamma\delta$ mogą wywierać swe działanie immu-

noregulacyjne za pośrednictwem makrofagów [56]. Cytowane obserwacje o interakcji limfocytów $\gamma\delta$ i makrofagów są zgodne z wynikami badań, które wskazują na udział komórek $\gamma\delta$ T w regulacji syntezy cytokin przez makrofagi (Szczepanik i wsp. w przygotowaniu).

5. FUNKCJA LIMFOCYTÓW $\gamma\delta$ W USTROJU

Funkcja limfocytów $\gamma\delta$ w ustroju jest jeszcze słabo poznana. Ze względu na charakterystyczną lokalizację w skórze i błonach śluzowych, komórkom tym przypisuje się pełnienie funkcji ochronnej na granicy ustroju ze środowiskiem zewnętrznym.

Dowodem na to, że komórki $\gamma\delta$ pełnią istotną rolę w różnego rodzaju infekcjach, jest zwiększona liczba tych limfocytów w tkankach objętych procesem chorobowym. Zaobserwowano między innymi wzrost liczby komórek $\gamma\delta$ we krwi obwodowej pacjentów zakażonych *Plasmodium falciparum* [10]. Obserwowano również silną ekspansję limfocytów $\gamma\delta$ (dochodzącą do 45% wszystkich limfocytów T krwi obwodowej) u ludzi zakażonych *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhi*, *Brucella melitensis* oraz *Francisella tularensis* [3,6,26,83].

Wzrost liczby limfocytów $\gamma\delta$ zaobserwowano też w zakażeniach wirusowych, takich jak AIDS, mononukleozą zakaźną oraz w modelu doświadczalnym zakażenia wirusem grypy [12,58,59,94]. Naciek komórkowy w skórze, obfitujący w limfocyty $\gamma\delta$, obserwowano w przebiegu zakażenia *Mycobacterium leprae* oraz *Leishmania* [10,91].

Komórkom $\gamma\delta$ przypisuje się między innymi funkcję obronną w początkowej fazie zakażenia (pierwsze 3–4 dni infekcji), zanim dojdzie do rekrutacji antygenowo swoistych limfocytów $T\alpha\beta$. Ponadto Ferric i wsp. [20] wykazali, iż komórki $\gamma\delta$ mogą być stymulowane do produkcji różnych cytokin, w zależności od rodzaju patogenu. I tak na przykład *Listeria monocytogenes*, będąca patogenem wewnątrzkomórkowym, stymuluje limfocyty $\gamma\delta$ do produkcji IFN- γ . Odmienne natomiast zachowują się komórki $\gamma\delta$ eksponowane na działanie pasożyta zewnątrzkomórkowego, jakim jest nicieniec *Nippostrongylus brasiliensis*, co przejawia się produkcją IL-4. Nasuwa się więc wniosek, że cytokiny produkowane przez limfocyty $\gamma\delta$ nie tylko ułatwiają eliminację patogenu, lecz także wytwarzają odpowiednie środowisko cytokinowe w początkowej fazie reakcji, partycypując w różnicowaniu naiwnych antygenowo-swoistych komórek $CD4^+$ w limfocyty populacji TH1 lub TH2 [20]. Nie jest jeszcze rozstrzygnięte, czy ta sama subpopulacja limfocytów $\gamma\delta$ produkuje różne typy cytokin w zależności od rodzaju stymulacji antygenowej, czy też różne subpopulacje komórek $\gamma\delta$ w odmienny sposób reagują na różne rodzaje antygenów.

Przypuszcza się również, że komórki $\gamma\delta$ pełnią funkcję nadzoru immunologicznego nad dynamicznie proliferującymi komórkami nabłonka eliminując w razie potrzeby komórki transformowane nowotworowo. Istnieje szereg doniesień klinicznych na temat udziału komórek $\gamma\delta$ w chorobach nowotworowych. I tak między innymi w wątrobie pacjentów z nowotworami żołądka, jelit oraz płuc obserwowano nacieki komórkowe, w których limfocyty $\gamma\delta$ stanowiły około 30% wszystkich komórek jądrzastych [57]. Jak dotąd dokładna rola komórek $\gamma\delta$ w procesie nowotworowym nie jest znana. Badania przeprowadzone na komórkach naciekających guz nowotworowy (TIL – *tumor infiltrating lymphocytes*) wykazały natomiast, iż obecne tam limfocyty $\gamma\delta$ mają aktywność cytotoksyczną w stosunku do komórek nowotworu [41,100]. Inne badania przeprowadzone na zwierzętach wykazały iż limfocyty $\gamma\delta$ wywierają działanie supresyjne w stosunku do limfocytów cytotoksycznych zaangażowanych w odporności przeciwnowotworowej, co sprzyjało ucieczce komórek nowotworu przed atakiem układu odpornościowego [74]. Zatem limfocyty $\gamma\delta$ mogą pełnić zarówno pozytywną (przeciwnowotworową), jak również negatywną (sprzyjającą rozwojowi nowotworu) funkcję w procesie nowotworowym.

Wzrasta też zainteresowanie rolą komórek $\gamma\delta$ w chorobach z autoagresji. Podczas licznych badań klinicznych stwierdzono obecność limfocytów $\gamma\delta$ w płynie maziowym stawów pacjentów chorych na reumatoidalne zapalenie stawów [35,76]. Wyniki wielu badań sugerują również zaangażowanie limfocytów $\gamma\delta$ w procesie zapalnym toczącym się w trakcie stwardnienia rozsianego [4,19]. Ponadto obserwowano obecność autoreaktywnych limfocytów $\gamma\delta$ o aktywności cytotoksycznej w tarczycy pacjentów z chorobą Graves'a [13]. Inne badania przeprowadzone na limfocytach $\gamma\delta$ pacjentów z zespołem Sjögren'a oraz cierpiących na toczeń układowy wykazały, że mogą one pełnić funkcję komórek pomocniczych dla limfocytów B w procesie tworzenia autoprzeciwciał [23,68].

Również badania na zwierzętach dowodzą zaangażowania komórek $\gamma\delta$ w zakażeniach pasożytniczych [72,89]. Odnotowano ich rolę w odpowiedzi na zakażenie wirusem białaczki [90] i w reakcji na eksperymentalnego brodawczaka (*papilloma*) bydła [42]. U świń zaobserwowano ich akumulację w miejscu eksperymentalnego odczynu zapalnego skóry [98].

6. PODSUMOWANIE

Limfocyty T o receptorach $\gamma\delta$ pojawiły się wraz z limfocytami T o receptorach $\alpha\beta$ i limfocytami B dopiero u zwierząt kręgowych. U ssaków dojrzewają w ontogenezie wcześniej niż komórki $\alpha\beta$ T i zasiedlają rozmaite narządy, co jest uważane za gatunkowe. Szczególnie dużo komórek T występuje u przeżuwaczy, a u człowieka i gryzoni jest ich stosunkowo niewiele. Część limfocytów $\gamma\delta$ rozpoznaje

antygeny podobnie do komórek $\alpha\beta$ i prawdopodobnie wspomaga ich funkcję, natomiast część rozpoznaje antygeny nie będące peptydami (np. tłuszcze, wielocukry i ufosforylowane metabolity bakteryjne) nie przetworzone przez komórki prezentujące antygen i prezentowane przez niekonwencjonalne antygeny zgodności tkankowej. Być może część komórek $\gamma\delta$ rozpoznaje antygeny wprost (np. wielocukry lub fragmenty białek HSP), a część reaguje na zmiany antygenów własnych komórek indukowane obecnością drobnoustrojów lub pod wpływem innych szkodliwych bodźców. Limfocyty $\gamma\delta$ są zdolne do uwalniania rozmaitych cytokin i chemokin. Przynajmniej część z nich, strategicznie rozlokowana w skórze lub nabłonku jelita (na granicy środowiska zewnętrznego) i wyposażona w receptory dla najczęściej pojawiających się antygenów, wspomaga odporność nieswoistą oraz, wytwarzając odpowiednie środowisko cytokinowe, uczestniczy w inicjowaniu odporności adaptacyjnej z udziałem limfocytów $\alpha\beta$.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ASKENASE PW, PTAK W, SZCZEPANIK M. $\gamma\delta$ T cells in normal murine spleen assist immunized $\alpha\beta$ T cells in the adoptive cell transfer of contact sensitivity: effects of *Bordetella pertussis*, Cyclophosphamide, and antisuppressor T cell monoclonal antibodies. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; **107**: 363.
- [2] ASKENASE PW, SZCZEPANIK M, PTAK M, PALIVAL V, PTAK W. Gamma/delta T cells in normal spleen assist immunized alpha beta T cells in the adoptive cell transfer of contact sensitivity. Effect of *Bordetella pertussis*, cyclophosphamide, and antibodies to determinants on suppressor cells. *J Immunol* 1995; **154**: 3644–3653.
- [3] BALBI B, VALLE MT, ODDERA S, GIUNTI D, MANCA F, ROSSI GA, ALLEGRA L. T-lymphocytes with $\gamma\delta^+$ V $\delta 2^+$ antigen receptors are present in increased proportions in a fraction of patients with tuberculosis or with sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 1994; **148**: 1685–1690.
- [4] BATTISTINI L, SALVETTI M, RISTORI G, FALCONE M, RAINE CS, BROSANAN CF. $\gamma\delta$ T cell receptor analysis supports a role for HSP 70 selection of lymphocytes in multiple sclerosis lesions. *Mol Med* 1995; **1**: 554–562.
- [5] BEL EB. Thymus derived and non-thymus derived T-like cells: the origin and function of cells bearing γ , δ receptors. *Thymus* 1989; **14**: 3–17.
- [6] BERTOTTO A, GERLI R, SPINOZZI F, MUSCAT C, SCALISE F, CASTELLUCCI G, SPOSITO M. Lymphocytes bearing the $\gamma\delta$ T cell receptor in acute *Brucella melitensis* infection. *Eur J Immunol* 1993; **23**: 1177–1180.
- [7] BIGSBY M, MARKOWITZ JS, BLEICHER PA, GRUSBY MJ, SIMHA S, et al. Most $\gamma\delta$ T cells develop normally in the absence of MHC class II molecules. *J Immunol* 1993; **151**: 4465–4475.
- [8] BLUESTONE JA, SCIAMMAS KR, SPERLING AI. TCR $\gamma\delta$ cells: a specialized T-cell subset in the immune system. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; **11**: 307–53.
- [9] BOISMENU R, FENG L, XIA YY, CHANG JCC, HAVRAN WL. Chemokine expression by intraepithelial $\gamma\delta$ T cells. *J Immunol* 1996; **157**: 985–992.
- [10] BORN WK, HARSHAN K, MODLIN RL, OBRIEN RL. The role of δ T lymphocytes in infection. *Curr Opin Immunol* 1991; **3**: 455–459.

- [11] BORN WK, OBRIEN RL, MODLIN RL. Antigen specificity of $\gamma\delta$ T lymphocytes. *FASEB J* 1991; **5**: 2699–2703.
- [12] CARDING SR, ALLAN W, KYES S et al. Late dominance of the inflammatory process in murine influenza by $\gamma\delta$ T cells. *J Exp Med* 1990; **172**: 1225–1231.
- [13] CATALFAMO M, ROURA-MIR C, SOSPEDRA M, APARICIO P, COSTAGLIOLA S, LUDGATE M, PUJOL-BORELL R, JARAQUEMADA D. Self reactive cytotoxic $\gamma\delta$ T lymphocytes in Grave's disease specifically recognize thyroid epithelial cells. *J Immunol* 1996; **156**: 804–811.
- [14] CHARLEMAGNE J. Phylogeny of the T-cell receptor. *Dev Comp Immunol* 1997; **21**: 85–86.
- [15] CICCARESE S, LANAVE C, SACCONI C. Evolution of T-cell receptor gamma and delta constant region and other T-cell-related proteins in the human-rodent-artiodactyl triplet. *Genetics* 1997; **145**: 409–419.
- [16] CRON RQ, GAJEWSKI TF, SHARROW SO, FITCH FW, MATIS LA, BLUESTONE JA. Phenotypic and functional analysis of murine CD3⁺, CD4⁻, CD8⁻ TCR- $\gamma\delta$ -expressing peripheral T cells. *J Immunol* 1989; **142**: 3754–3762.
- [17] DE LIBERO G. Sentinel function of broadly reactive human $\gamma\delta$ T cells. *Immunol Today* 1997, **18**: 22–26.
- [18] DENINGER J, WOLLACE VA, KISHIHARA K et al. Molecular organization, ontogeny and expression of murine $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cell receptors. *Exp Clin Immunogenet* 1991; **8**: 57–74.
- [19] DROOGAN AG, CROCKARD AD, HAWKINS SA, McNEILL TA. $\gamma\delta$ T cell distribution in cerebrospinal fluid and peripheral blood patients with multiple sclerosis. *J Neurol Science* 1994, **126**: 172–177.
- [20] FERRIC DA, SCHRENZEL MD, MULVANIA T, HSIEH B, FERLIN WG, LEPPER H. Differential production of interferon- γ and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by $\gamma\delta$ T cells *in vivo*. *Nature* 1995; **373**: 255–257.
- [21] FUJIHASHI K, McGHEE JR, KWEON M, COOPER MD, TONEGAWA S, TAKAHASHI I, HIROI T, MESTECKY J, KIYONO H. $\gamma\delta$ T cell-deficient mice have impaired mucosal immunoglobulin A responses. *J Exp Med* 1996; **183**: 1929–1935.
- [22] FUJIHASHI K, TAGUCHI T, AICHER WK, McGHEE JR, BLUESTONE JA, ELDRIDGE JH, KIYONO H. Immunoregulatory functions for murine intraepithelial lymphocytes: $\gamma\delta$ T cell receptor-positive (TCR⁺) T cells abrogate oral tolerance, while $\alpha\beta$ TCR⁺ T cells provide B cell help. *J Exp Med* 1992; **175**: 695–707.
- [23] GERLI R, AGEA E, MUSCAT C, BERTOTTO A, ERCOLANI R, BISTONI R, BINI P, SPINOZZI F, VENANZI F. Functional characterization of $\gamma\delta$ T cells bearing the $\gamma\delta$ T-cell receptor in patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1993; **11**: 295–299.
- [24] GUY-GRAND D, CERF-BENUSSAN N, MALISSEN M et al. Two gut intraepithelial CD8 lymphocyte populations with different T cell receptors: A role for the gut epithelium in T cell differentiation. *J Exp Med* 1991; **173**: 471–481.
- [25] HAAS W, PEREIRA P, TONEGAWA S. Gamma/Delta cells. *Annu Rev Immunol* 1993; **11**: 637–685.
- [26] HARA T, MIZUNO Y, TAKAKI K, TAKADA H, AKEDA H, AOKI T, NAGATA M, UEDA K, MATSUZAKI G, YOSHIKAI Y, NOMOTO K. Predominant activation and expansion of V γ 9-bearing $\gamma\delta$ T cells *in vivo* as well as *in vitro* in *Salmonella* infection. *J Clin Invest* 1992; **90**: 204–210.
- [27] HAVRAN WL, BOISMENU R. Activation and function of $\gamma\delta$ T cells. *Curr Opin Immunol* 1994; **6**: 442–446.
- [28] HEIN WRI, DUDLER L. TCR $\gamma\delta$ + cells are prominent in normal bovine skin and express a diverse repertoire of antigen receptors. *Immunology* 1997; **91**: 58–64.
- [29] HEYBORNE KD, CRANFILL RL, CARDING SR, BORN WK, OBRIEN RL. Characterization of $\gamma\delta$ T lymphocytes at the maternal-fetal interface. *J Immunol* 1992; **149**: 2872–2878.
- [30] HORNER AA, JABARA H, RAMESHN, GEHARS. $\gamma\delta$ T lymphocytes express CD40 ligand

- and induce isotype switching in B lymphocytes. *J Exp Med* 1995; **181**: 1239–1244.
- [31] HORTON TL, GRAVENOR I, RITCHIE P, MINTER R, WATSON MD, HORTON JD. Use of thymectomized *Xenopus* to study extra-thymic T cell and NK cell evolution. *Dev Comp Immunol* 1997; **21**: 237.
- [32] HUBER H, DESCOSSY P, REGIER E, VAN BRANDWIJK R, KNOP J. Activation of phenotypically heterogeneous murine T cell receptor $\gamma\delta^+$ dendritic epidermal T cells by self-antigen(s). *Int Arch Allergy Immunol* 1995; **107**: 498–507.
- [33] ISMAIL HI, HASHIMOTO Y, KON Y, OKADA K, DAVIS WC, IWANAGA T. Lymphocyte subpopulations in the mammary gland of the goat. *Vet Immunol Immunopathol* 1996; **52**: 201–212.
- [34] JANEWAY CA Jr, TRAVERS P. Immunobiology. The immune system in health and disease. Third Edition. Current Biology Ltd.: London, San Francisco, New York; Churchill Livingstone: Edinburgh, London, New York; Garland Publishing Inc.: New York, London; 1997.
- [35] KABELITZ D. Function and specificity of human $\gamma\delta$ -positive T cells. *Crit Rev Immunol* 1992; **11**: 281–303.
- [36] KAUFMANN SHE. Heat shock proteins and the immune response. *Immunol Today* 1990; **11**: 129–135.
- [37] KAUFMANN SHE. Immunity to intracellular bacteria and protozoa. *The Immunologist* 1995; **3**: 221–225.
- [38] KAUFMANN SHE. $\gamma\delta$ and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do? *Proc Natl Acad Sci* 1996; **93**: 2272–2297.
- [39] KAWAGUCHI-MIYASHITA M, SHIMIZU K, NANNO M, SHIMADA S, WATANABE T, KOGA Y, MATSUOKA Y, ISHIKAWA H, HASHIMOTO K, OHWAKI M. Development and cytolytic function of intestinal intraepithelial T lymphocytes in antigen-minimized mice. *Immunology* 1996; **89**: 268–273.
- [40] KELLY KA, OBRIEN R, BORN W. Reconstitution of SCID mice with haemopoietic precursors: a detailed analysis of $\gamma\delta$ T-cell reconstitution. *Immunology* 1997; **91**: 65–72.
- [41] KITAYAMA J, ATOMI Y, NAGAVA H, KURODA A, MUTOH T, MINAMI M, JUJI T. Functional analysis of TCR $\gamma\delta^+$ T cells in tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) of human pancreatic cancer. *Clin Exp Immunol* 1993; **93**: 442–447.
- [42] KNOWLES G, ONEIL BW, CAMPO MS. Phenotypical characterization of lymphocytes infiltrating regressing papillomas. *J Virol* 1996; **70**: 8451–8458.
- [43] KOZBOR D, TRINCHIERI G, MONOS DS, ISOBE M, RUSSO G, ET AL. Human TCR- $\gamma^+\delta^+$, CD8⁺ T lymphocytes recognize tetanus toxoid in an MHC-restricted fashion. *J Exp Med* 1989; **169**: 1847–1851.
- [44] LANIER LL. Unusual lymphocytes – $\gamma\delta$ T cells and NK cells. *The Immunologist* 1995; **3**: 182–185.
- [45] LEFRANCOIS L, OLSON S. A novel pathway of thymus-directed T lymphocyte maturation. *J Immunol* 1994; **153**: 987–995.
- [46] LEFRANCOIS L. Extrathymic differentiation of intraepithelial lymphocytes: generation of a separate and unequal T-cell repertoire? *Immunol Today* 1991; **12**: 436–438.
- [47] LIU W-J, GOTTSCHALL SL, HANSEN PJ. Increased expression of cell surface markers on endometrial $\gamma\delta$ T-cell receptor+ intraepithelial lymphocytes induced by the local presence of the sheep conceptus. *AJRI* 1997; **37**: 199–205.
- [48] LOH EY, WANG M, BARTKOWIAK J, WIADERKIEWICZ R, HYJEK E, et al. Gene transfer studies of T cell receptor-gamma delta recognition. Specificity for staphylococcal enterotoxin A is conveyed by V gamma 9 alone. *J Immunol* 1994; **152**: 3324–3332.
- [49] LYDYARD PM, VAN EDEN W. Heat shock proteins: Immunity and immunopathology. *Immunol Today* 1990; **11**: 228–230.
- [50] McMENAMIN C, McKERSEY M, KUHNLEIN P, HUNIG T, HOLT PG. $\gamma\delta$ T cells down-regulate primary IgE responses in rats to inhaled soluble protein antigens. *J Immunol*

- 1995; **154**: 4390–4394.
- [51] MENGEL J, CARDILLO F, AROEIRA LS, WILLIAMS O, RUSSO M, VAZ NM. Anti- $\gamma\delta$ T cell antibody blocks the induction and maintenance of oral tolerance to ovalbumin in mice. *Immunol Letters* 1995; **48**: 97–102.
- [52] MORITA CT, BECKMAN EM, BUKOWSKI JF, TANAKA Y, BAND H, BLOOM BR, GOLAN DE, BRENNER MB. Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human $\gamma\delta$ T cells. *Immunity* 1995; **3**: 495–507.
- [53] MORITA CT, VERMA S, APARICIO P, MARTINEZ C, SPITS H, BRENNER M. Functionally distinct subsets of human $\gamma\delta$ T cells. *Eur J Immunol* 1991; **21**: 2999–3007.
- [54] MORROW-TESEH J, WOOLLEN N, HAHN L. Response of gamma delta T-lymphocytes to heat stress in *Bos taurus* and *Bos indicus* crossbred cattle. *J Therm Biol* 1996; **21**: 101–108.
- [55] NANNO M, MATSUMOTO S, KOIKE R, MIYASAKA M, KAWAGUCHI M, MASUDA T, MIYAWAKI S, CAI Z, SHIMAMURA T, FUJIURA Y, ISHIKAWA H. Development of intestinal intraepithelial T lymphocytes is independent of Peyer's patches and lymph nodes in *aly* mutant mice. *J Immunol* 1994; **153**: 2014–2020.
- [56] NISHIMURA H, EMOTO M, HIROMATSU K, YAMAMOTO S, MATSURA K, GOMI H, IKEDA T, ITOHARA S, YOSHIKAI Y. The role of $\gamma\delta$ T cells in priming macrophages to produce tumor necrosis factor- α . *Eur J Immunol* 1995; **25**: 1465–1468.
- [57] OBRIEN RL, BORN WK. Direct evidence for an immunological role of lymphocytes bearing T cell receptor $\gamma\delta$. *The Year in Immunol* 1990; **6**: 51–68.
- [58] ORSINI DLM, RES PCM, LAAR VAN JM, ET AL. A subset of $\gamma\delta 1$ T cells proliferates in response to Epstein-Barr virus-transformed B cell lines *in vitro*. *Scand J Immunol* 1993; **38**: 335–340.
- [59] PAOLI PD, GENNARI D, MARTELLI P, BASAGLIA G, CROVATTO M, BATTISTIN S, SANTINI G. A subset of $\gamma\delta$ lymphocytes is increased during HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol* 1991; **83**: 187–191.
- [60] PENNEY L, KILSHAW PJ, MACDONALD TT/. Regional variation in the proliferative rate and lifespan of $\alpha\beta$ TcR+ and $\gamma\delta$ TcR+ intraepithelial lymphocytes in the murine small intestine. *Immunology* 1995; **86**: 212–218.
- [61] PEREIRA P, LAFAILLE JJ, GERBER D, TONEGAWA S. The T cell receptor repertoire of intestinal intraepithelial $\gamma\delta$ T lymphocytes is influenced by genes linked to the major histocompatibility complex and to the T cell receptor loci. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 5761–5766.
- [62] PFEFFER K, SCHOEL B, GULLE H, ET AL. Primary responses of human T cells to mycobacteria: a frequent set of $\gamma\delta$ T cells are stimulated by proteinase-resistant ligands. *Eur J Immunol* 1990; **20**: 1175–1179.
- [63] PFEFFER K, SCHOEL B, PLESNILA N, et al. A lectin-binding, proteinase-resistant mycobacterial ligand specifically activates V $\gamma 9$ human $\gamma\delta$ T cells. *J Immunol* 1992; **148**: 575–583.
- [64] PLYTYCZ B. Modelowanie DNA w jądrach limfocytów. *Post Biol Kom* 1997, w druku.
- [65] PLYTYCZ B, SELJELID R. Evolution of phagocyte- and lymphocyte-mediated immunity. *Central Eur J Immunol* 1996; **21**: 3–11.
- [66] PTAK W, ASKENASE PW. $\gamma\delta$ T cells assist $\alpha\beta$ T cells in adoptive transfer of contact sensitivity. *J Immunol* 1992; **149**: 3503–3508.
- [67] PTAK W, SZCZEPANIK M, RAMABHADRAN R, ASKENASE PW. Immune or normal $\gamma\delta$ T cells that assist $\alpha\beta$ T cells in elicitation of contact sensitivity preferentially use V $\gamma 5$ and V $\delta 4$ variable region gene segments. *J Immunol* 1996; **165**: 976–986.
- [68] RAJAGOPALAN S, ZORDAN T, TSOKOS GC, DATTA S. Pathogenic anti-DNA autoantibody-inducing T helper cell lines from patients with active lupus nephritis: isolation of CD4⁺ T helper cell lines that express the $\gamma\delta$ T-cell antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 7020–7024.
- [69] RAST JP, ANDERSON MK, STRONG SJ, LUER C, LITMAN RT, LITMAN GW. α , β , γ

- and δ T cell antigen receptor genes arose early in vertebrate phylogeny. *Immunity* 1997; **6**: 1–11.
- [70] ROCHA B, VASSALI P, GUY-GRAND D. The extrathymic T-cell development pathway. *Immunol Today* 1992; **13**: 449–454.
- [71] ROMBOUT JHWM, ENGELSM MY, JOOSTEN EHM, TAVERNE N, TAVERNE-TIELE A. A distinct T cell population in mucosal tissue of carp. *Dev Comp Immunol* 1997; **21**: 244.
- [72] ROSAT JP, CONCEICAO-SILVA F, WAANDERS GA, BEERMANN F, WILLSON A, OWEN MJ, HAYDAY AC, HUANG S, AGUET M, MACDONALDS HR, LOUIS JA. Expansion of $\gamma\delta^+$ T cells in BALB/c mice infected with *Leishmania major* is dependent upon Th2-type CD4⁺ T cells. *Infect Immun* 1995; **63**: 3000–3004.
- [73] SANDOR M, HOULDEN B, BLUESTONE J, HEDRICK SM, WEINSTOCK J, LYNCH RG. *In vitro* and *in vivo* activation of murine $\gamma\delta$ T cells induces the expression of IgA, IgM and IgG Fc receptors. *J Immunol* 1992; **148**: 2363–2369.
- [74] SEO N, EGAWA K. Suppression of cytotoxic T lymphocyte activity by $\gamma\delta$ T cells in tumor-bearing mice. *Cancer Immunol Immunother* 1995; **40**: 355–366.
- [75] SHAHINIAN A, PFEFFER K, LEE KP, KUNDIG TM, KISHIHARA K, et al. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 1993; **261**: 609–612.
- [76] SIOUD M, FOREE O, NATVIG JB. T cell receptor δ diversity of freshly isolated T lymphocytes in rheumatoid synovitis. *Eur J Immunol* 1991; **21**: 239–241.
- [77] SPANER D, COHEN BL, MILLER RG, PHILIPS RA. Antigen-presenting cells for naive transgenic $\gamma\delta$ T cells. Potent activation by $\alpha\beta$ T cells. *J Immunol* 1995; **155**: 3866–3876.
- [78] SPERLING AI, LINSLEY PS, BARRETT TA, BLUESTONE JA. CD28-mediated costimulation is necessary for the activation of T cell receptor- $\gamma\delta^+$ T lymphocytes. *J Immunol* 1993; **151**: 6043–6050.
- [79] SPIESS S, KUCHROBER A, SCHIRMBECK R, ET AL. Diversity of functional T-cell receptor δ -chain transcripts from bone marrow cells of athymic nude mice. *Immunology* 1993; **78**: 252–259.
- [80] SPITS H, PALIARD X, ENGELHARD VH, DE VRIES JE. Cytotoxic activity and lymphokine production of T cell receptor (TCR)- $\alpha\beta^+$ and (TCR)- $\gamma\delta^+$ cytotoxic T lymphocyte (CTL) clones recognizing HLA-A2 and HLA-A2 mutants. Recognition of TCR- $\gamma\delta$ CTL is affected by mutations at positions 152 and 156. *J Immunol* 1990; **144**: 4156–4162.
- [81] STINISSEN P, VANDEVYVER C, RAUS J, ZHANG J. Superantigen reactivity of $\gamma\delta$ T cell clones isolated from patients with multiple sclerosis and controls. *Cellular Immunol* 1995; **66**: 227–235.
- [82] STROMINGER JL, FARBER D. The $\gamma\delta$ T cell receptor and class Ib MHC-related proteins: Enigmatic molecules of immune recognition. *Cell* 1989; **57**: 895–898.
- [83] SUMIDA T, MAEDA T, TAKAHASHI H, YOSHIDA S, YONAHARA F, SAKAMOTO A, TOMIOKA H, KOIKET, YOSHIDA S. Predominant expansion of V γ 9/V δ 2 T cells in tularemia patient. *Infect Immun* 1992; **60**: 2554–2558.
- [84] SZCZEPANIK M, ANDERSON LR, USHIO H, PTAK W, OWEN MJ, HAYDAY AC. $\gamma\delta$ T cells from tolerized $\alpha\beta$ T cell receptor (TCR)-deficient mice inhibit contact sensitivity-effector T cells *in vivo*, and their interferon- γ production *in vivo*. *J Exp Med* 1996; **184**: 2129–2139.
- [85] SZCZEPANIK M, ANDERSON LR, USHIO H, PTAK W, OWEN MJ, HAYDAY AC. Gamma/Delta T cells from tolerized alpha/beta-TCR-deficient mice antigen specifically inhibit contact sensitivity *in vivo* and IFN- γ production *in vitro*. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; **113**: 373–375.
- [86] SZCZEPANIK M, LEWIS J, GEBBA GP, PTAK W, ASKENASE PW. Positive regulatory $\gamma\delta$ T cells in contact sensitivity: augmented responses by *in vivo* treatment with anti- $\gamma\delta$ monoclonal antibody, or anti-V γ 5 or V δ 4. *Immunol Invest* 1997; w druku
- [87] THOMAS WR, COOPER D, HOLT PG. Immunity at body surfaces. *The Immunologist* 1995; **3**: 201–203.
- [88] THOME M, HIRT W, PFAFF E, REDDEHASE MJ, SAALMULLER A. Porcine T-cell

- receptors: molecular and biochemical characterization. *Vet Immunol Immunopathol* 1994; **43**: 13–18.
- [89] TSUJI M, EYSTER CL, OBRIEN RL, BORN WK, BAPNA M, REICHEL M, NUSSENZ-WEIGRS, ZAVALA F. Phenotypic and functional properties of murine $\gamma\delta$ T cell clones derived from malaria immunized, $\alpha\beta$ T cell- deficient mice. *International Immunol* 1996; **8**: 359–366.
- [90] UNGAR-WARON H, BRENNER J, PAZ R, MOALEM U, TRAININ Z. $\gamma\delta$ T-lymphocytes and anti-heat shock protei reactivity in bovine leukemia virus infected cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 1996; **51**: 79–87.
- [91] UYEMURA K, HOS CT, OHMEN JD, ET AL. Selective expansion of V δ 1 T cells from leprosy skin lesions. *J Invest Dermatol* 1992; **99**: 848–52.
- [92] VAN KAER L, WU M, ICHIKAWA Y, ITO K, BONNAVILLE M, OSTRAND-ROSENBERG S, MURPHY DB, TONEGAWA S. Recognition of MHC TL gene products by $\gamma\delta$ T cells. *Immunol Rev* 1991; **120**: 89–115.
- [93] WADE WF, DAVOUST J, SALAMERO J, ANDRE P, ET AL. Structural compartmentalization of MHC class II signaling function. *Immunol Today* 1993, **11**: 539–546.
- [94] WALLACE M, MALKOVSKY M, CARDING SR. Gamma/delta T lymphocytes in viral infections. *J Leukocyte Biol* 1995; **58**: 277–283.
- [95] WEN L, PAO W, WONG FS, PENG Q, CRAFT J, ZHENG B, KELSOE G, DIANDA L, OWEN MJ, HAYDAY AC. Germinal center formation, immunoglobulin class switching, and autoantibody production driven by „non $\alpha\beta$ ” T cells. *J Exp Med* 1996; **183**: 2271–2282.
- [96] WEN-JUN L, GOTTSALL SL, HANSEN PJ. Increased expression of cell surface markers on endometrial $\gamma\delta$ T-cell receptor⁺ intraepithelial lymphocytes induced by the local presence of the sheep conceptus. *AJRI* 1997; **37**: 199–205.
- [97] WESCH D, MARX S, KABELITZ D. Comparative analysis of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cell activation by *Mycobacterium tuberculosis* and isopentenyl pyrophosphate. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 952–956.
- [98] WHYTE A, LICENCE ST, ROBINSON MK, VAN DER LIENDEN K. Lymphocyte subsets and adhesion molecules in cutaneous inflammation induced by inflammatory agonists: correlation between E-selectin and $\gamma\delta$ TcR⁺ lymphocytes. *Lab Invest* 1996; **75**: 439–449.
- [99] WYATT CR, BRACKETT EJ, PERRYMAN LE, DAVIS WC. Identification of $\gamma\delta$ T lymphocyte subsets that populate calf ileal mucosa after birt. *Vet Immunol Immunopathol* 1996; **52**: 91–103.
- [100] ZOCCHI MR, FERRARINI M, MIGONE N, CASORATI G. T cell receptor V δ gene usage by tumor reactive $\gamma\delta$ T lymphocytes infiltrating human lung cancer. *Immunology* 1994; **81**: 234–239.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 01.10.1997 r.

Przyjęto: 12.11.1997 r.

Adres autora: Czysa 18, 31-121 Kraków

ZNACZENIE PROTEASOMÓW W PREZENTACJI ANTYGENÓW

THE ROLE OF PROTEASOMES IN ANTIGEN PRESENTATION

Cezary WÓJCIK

Zakład Histologii i Embriologii, Instytut Biostruktury, Akademia Medyczna w
Warszawie

Streszczenie: Proteasomy 20 S są występującymi na terenie jądra komórkowego i cytoplazmy organelami odpowiedzialnymi za proteolizę większości białek komórkowych. Ekspresja trzech podjednostek proteasomów (LMP2, LMP7 i MECL1) ulega indukcji zależnej od interferonu γ , co wpływa na spektrum peptydów generowanych przez zawierające je proteasomy (tzw. immunoproteasomy). Interferon γ indukuje również ekspresję podjednostek α i β aktywatora PA28 proteasomu, który przyłączając się do niego stymuluje proteolizę peptydów. Badania z użyciem specyficznych inhibitorów proteasomów doprowadziły do wniosku, że są one odpowiedzialne za wytwarzanie większości peptydów ulegających następnie transportowi do światła siateczki śródplazmatycznej przez układ transporterów TAP, gdzie łączą się z łańcuchem ciężkim MHC klasy I i β_2 -mikroglobuliną.

Słowa kluczowe: proteasomy, prezentacja antygenów, wytwarzanie epitopów, transporter TAP, cząsteczki MHC klasy I, aktywator PA28

Summary: 20 S proteasomes are ubiquitous organelles, responsible for the degradation of the overwhelming majority of intracellular proteins. The expression of three proteasome subunits (LMP2, LMP7 and MECL1) is induced by γ -interferon. Incorporation of those subunits into proteasomes (i.e. the formation of immunoproteasomes) affects the spectrum of peptides generated by proteolytic degradation. γ -interferon also induces the expression of the subunits α and β of the PA28 proteasome activator. PA28 binding to the 20 S proteasome stimulates its proteolytic activities towards polypeptides. The use of specific proteasome inhibitors allowed to conclude, that the vast majority of the antigenic peptides produced in the cytoplasm is generated by the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. Originated in the cytoplasm, the antigenic peptides are bound to and transported to the endoplasmic reticulum lumen by a set of TAP transporters. Once in the lumen, antigenic peptides associate with MHC class I heavy chain and β_2 -microglobulin.

Key words: proteasomes, antigen presentation, epitope generation, TAP transporter, MHC class I, PA28 activator

WPROWADZENIE

Organizmy kręgowców wykształciły skomplikowane mechanizmy swoistej obrony immunologicznej. Układ odpornościowy rozpoznaje za pomocą cząsteczek efektorowych unoszących się w płynach ustrojowych (odporność humoralna) lub znajdujących się na powierzchni wyspecjalizowanych komórek (odporność komórkowa) epitopy (determinanty antygenowe) swoistych antygenów. Większość antygenów jest cząsteczkami różnorodnych białek (choć mogą to być kwasy nukleinowe, lipidy, polisacharydy itp.), które muszą zostać zaprezentowane komórkom układu odpornościowego przez komórki prezentujące antygen. W przypadku antygenów pozakomórkowych, takich jak: antygeny bakteryjne, komórki prezentujące antygen, stanowią wyspecjalizowaną grupę komórek, zdolnych do pobierania antygeny, jego trawienia w świetle struktur błoniastych i prezentacji w powiązaniu z cząsteczkami MHC klasy II [80]. Odmiennie niż antygeny zewnątrzkomórkowe, antygeny wewnątrzkomórkowe, takie jak: antygeny wirusowe lub nowotworowe, są prezentowane przez praktycznie wszystkie komórki organizmu w powiązaniu z cząsteczkami MHC klasy I [54].

Znajdujące się w organizmie człowieka białka ulegają ciągłym przemianom, syntezie i degradacji. Degradacja białek pobranych przez komórki z środowiska zewnętrznego drogą fagocytozy odbywa się z udziałem bogatego zestawu enzymów proteolitycznych w przedziale endosomalnym i lizosomalnym. Jest to przedział, w którym generowane są peptydy ulegające następnie prezentacji w kontekście cząsteczek MHC klasy II. Mogą tam trafiać także białka cytoplazmatyczne w drodze autofagii lub transportu w poprzek błon z udziałem specyficznych białek opiekuńczych, jednak znakomita większość białek cytoplazmatycznych, a także białka błonowe (np. w obrębie siateczki śródplazmatycznej) degradowane są przede wszystkim z udziałem proteasomu 20 S [56,113].

Obecnie uważa się, iż proteasomy odpowiedzialne są za generowanie znakomitej większości peptydów antygenowych, które następnie ulegają transportowi do światła siateczki śródplazmatycznej z udziałem transporterów TAP. W jej obrębie ulegają połączeniu z łańcuchem ciężkim MHC klasy I oraz β_2 -mikroglobuliną tworząc dojrzałą cząsteczkę MHC klasy I, ulegającą następnie transportowi na powierzchnię komórki. W takiej postaci peptydy antygenowe w kontekście MHC klasy I są rozpoznawane przez receptory limfocytów T [40,98].

UKŁAD PROTEOLIZY ZALEŻNEJ OD UBIKWITYNY I PROTEASOMÓW

Białka wewnątrzkomórkowe ulegają ograniczonej proteolizie w obrębie cytoplazmy, zanim ich fragmenty przedostaną się poprzez układ transporterów TAP

do światła siateczki śródplazmatycznej, gdzie ostatecznie wiążą się z cząsteczkami MHC klasy I i są eksportowane na powierzchnię komórki. Główny układ proteolityczny w obrębie cytozolu tworzy system ubikwityny/proteasomów, poza tym występują tam niektóre inne proteazy, przede wszystkim zależne od jonów Ca^{2+} kalpajny. Inhibitory kalpajny nie blokują jednak prezentacji antygenów zależnej od MHC klasy I, podczas gdy inhibitory proteasomów prowadzą do takiego efektu [86].

Białka, które ulegają degradacji z udziałem proteasomów, muszą wpierw zostać rozpoznane przez kaskadę enzymów układu ubikwitynującego białka (E1, E2, E3) i ulec ubikwitynacji. Oznacza to, iż do reszt ϵ -aminowych lizyny danego białka zostaje przyłączona ubikwityna wiązaniem izopeptydowym. Ubikwityna jest niewielkim białkiem o masie cząsteczkowej 8 kDa. Do reszty ϵ -aminowej lizyny już przyłączonej ubikwityny przyłączają się następne jej cząsteczki, tworząc łańcuch poliubikwityny. Łańcuch taki jest rozpoznawany przez elementy czapki 19 S proteasomu 26 S, który dokonywa degradacji wyznakowanego białka, uwalniając przy tym wolną ubikwitynę [17,47,110,113].

Proteasom 20 S jest organelłą komórkową określaną przez biochemików także jako wielokatalityczny kompleks proteinaz (MPC – *multicatalytic proteinase complex*) występującą u wszystkich poznanych organizmów eukariotycznych, a także u *Archeobacteria*, o masie cząsteczkowej ok. 700 kDa. Jest on zbudowany z czterech równoległych pierścieni, dwóch zewnętrznych α i dwóch wewnętrznych β . Każdy z pierścieni składa się z siedmiu różnych podjednostek o masie cząsteczkowej od 21 do 32 kDa. U archeobakterii występuje tylko jeden rodzaj podjednostki α i jeden β , podczas gdy u ssaków znamy siedem genów dla podjednostek α i dziesięć genów dla podjednostek β [7,14].

Rodziny α i β podjednostek proteasomów pojawiły się bardzo dawno w ewolucji, przed rozdzieleniem się drzewa rodowego eukariontów i archeobakterii. Proteazy o sekwencji zbliżonej do sekwencji podjednostek α spotyka się także u niektórych eubakterii [49], co świadczy o archaicznym pochodzeniu proteasomów. W przebiegu wczesnej ewolucji eukariontów nastąpił szereg duplikacji genów dla podjednostek proteasomów, z czego co najmniej dziewięć nastąpiło przed rozdzieleniem się zwierząt i grzybów [51].

Proteasom 20 S wykazuje trzy główne aktywności enzymatyczne, mianowicie chymotrypsynopodobną, trypsynopodobną i hydrolizującą wiązania peptydyłglutamylpeptydowe oraz dwie słabiej scharakteryzowane, hydrolizującą wiązania po małych obojętnych i rozgałęzionych resztach aminoacylowych. W odróżnieniu od pozostałych proteaz, które degradują białka do szeregu półproduktów, które ulegają dalszej degradacji w czasie trwania reakcji enzymatycznej, proteasomy charakteryzują się procesywnością, czyli generują z jednego białka substratowego ściśle określony zestaw peptydów, praktycznie nie ulegający już dalszej degradacji mimo przedłużania inkubacji [35].

Proteasom 20 S może wiązać się z różnymi rodzajami białek modyfikującymi jego funkcje tworząc większe kompleksy. W powiązaniu z grupą białek o masach cząsteczkowych 25–112 kDa zwanymi czapką 19 S lub PA700 proteasom 20 S przekształca się w proteasom 26 S, który jest odpowiedzialny za przebiegającą ze zużyciem ATP degradację białek powiązanych z ubikwityną [15,60,85,123]. W powiązaniu z aktywatorem PA28 proteasom 20 S tworzy kompleks, który wydajnie degraduje niewielkie polipeptydy [22,60,62].

Proteasomy degradują zarówno większość białek komórkowych o długim okresie półtrwania, jak i uczestniczą w regulacji szeregu procesów komórkowych przez szybką, kontrolowaną degradację odpowiednich białek, np. cyklin [115], inhibitorów kinaz zależnych od cyklin [116], produktów niektórych onkogenów czy też czynników transkrypcyjnych lub ich regulatorów [113]. Uważa się obecnie, iż proteasomy są odpowiedzialne za generowanie peptydów ulegających prezentacji w kontekście antygenów MHC klasy I [67,100,121]. Ich znaczenie dla układu odpornościowego jest jednak daleko większe, gdyż uczestniczą one w regulacji takich procesów, jak: cykl komórkowy [117,118], apoptoza [114] czy aktywacja transkrypcji zależnej od NFκB [105].

Pierwsza wzmianka o możliwości udziału układu proteasomy/ubikwityna w prezentacji antygenów pochodziła z badań nad ekspresją białek wirusa krowianki z „dobudowaną” ubikwityną. Komórki produkujące te białka prezentowały je efektywniej cytotoksycznym limfocytom T niż komórki produkujące białka pozbawione ubikwityny [104].

Badania Rocka i współpracowników [63] wykazały, że komórki ze zmutowanym enzymem aktywującym ubikwitynę E1 mają upośledzoną prezentację epitopów antygenowych pochodzących z wstrzykniętej do nich owalbuminy w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Co więcej, w przypadku wstrzykniętej do komórek β-galaktozydazy, prezentacja pochodzących z niej epitopów antygenowych uległa wzmożeniu, gdy użyto białka o końcu aminowym zawierającym tzw. destabilizujące aminokwasy, powodujące szybkie rozpoznanie białka i jego degradację przez układ ubikwityny/proteasomów [36].

W ostatnich latach dokonano syntezy specyficznych inhibitorów proteasomów będących aldehydami peptydów [111] oraz wyizolowano antybiotyk laktacystynę, która specyficznie wiąże się z aktywnym miejscem podjednostek β proteasomu [29]. Aldehydy peptydów inhibują jednak w niewielkim stopniu także inne proteazy, głównie kalpainę [111], podczas gdy laktacystyna inhibuje lizosomalną katepsynę A [78]. Inhibitory te blokują produkcję peptydów antygenowych pochodzących z różnych antygenów, co interpretuje się jako wynik zablokowania aktywności proteolitycznej proteasomów [6,44,50,86,91,122]. Ostatnio jednak ukazała się praca dowodząca, że blok ten dotyczy tylko niektórych peptydów antygenowych i jest jedynie częściowy [109].

Okazało się, że γ -interferon po zadziałaniu na komórki hodowane *in vitro* zmienia spektrum aktywności proteolitycznej proteasomów 20 S, wzmagając aktywność chymotrypsynopodobną i trypsynopodobną, a osłabiając aktywność hydrolizującą wiązania peptydylglutamylpeptydowe [3,21,34]. Prowadzi to do powstawania większej ilości peptydów z końcami karboksylowymi hydrofobowymi lub zasadowymi, a więc takimi, jakie są zazwyczaj znajduwane w powiązaniu z MHC klasy I i jakie wybiórczo są wiązane przez układ transporterów TAP [45,65,83,103]. Oznaczenia aktywności proteolitycznej wykonywane są w stosunku do krótkich substratów, a produkty reakcji oznaczane są metodą diazotyzacji. Gdy jednak użyje się układu bardziej odpowiadającego sytuacji *in vivo*, to okazuje się, że γ -interferon nie wpływa zupełnie na proteolizę białek zależną od ubikwityny i proteasomów 26 S [3,21,34], powoduje jednak indukcję aktywatora PA28 [48,84]. Pojawiły się też prace donoszące o zmniejszeniu się aktywności chymotrypsynopodobnej proteasomów po zadziałaniu γ -interferonem [10,107].

PODJEDNOSTKI PROTEASOMÓW REGULOWANE PRZEZ γ -INTERFERON

W obrębie pierścieni α i β wchodzących w skład proteasomów znajduje się po siedem podjednostek, które są jednakowe u archeobakterii, podczas gdy u eukariontów doszło drogą wielokrotnej duplikacji genów do ich dywersyfikacji. U drożdży występuje siedem genów podrodziny α i siedem genów podrodziny β , tak że każda podjednostka w danym pierścieniu α lub β jest inna. Dalsze różnicowanie nastąpiło u kręgowców, które mają aż dziesięć genów dla podjednostek β , co jak okazało się, ściśle wiąże się z ewolucją układu odpornościowego [51].

W 1982 roku opisano duże kompleksy białkowe zawierające drobnocząsteczkowe białka (LMP – *low molecular weight proteins*), kodowane w obrębie grupy genów MHC klasy II, których ekspresja ulega indukcji zależnej od γ -interferonu [68]. Po sklonowaniu genów LMP2 i LMP7 okazało się, że są one bardzo podobne do genów kodujących podjednostki β proteasomów. Podobnie jak wiele genów uczestniczących w funkcjach układu odpornościowego wykazują one duży polimorfizm w populacji [66].

γ -interferon powoduje indukcję ekspresji trzech podjednostek proteasomów zwanych LMP7, LMP2 i MECL1 (LMP10), które zastępują konstytutywne podjednostki X (MB1, ϵ , β_5), Y (δ , β_1) i Z (MC14, β_2). Powoduje to prawdopodobnie opisaną wcześniej zmianę aktywności proteolitycznych proteasomów 20 S. Wymiana podjednostek odbywa się na poziomie indukcji i represji transkrypcji i nie dotyczy proteasomów zsintetyzowanych przed zadziałaniem γ -interferonu. Różne podjednostki są ponadto indukowane przez nieco inne stężenia interferonu γ . Co ciekawe,

α -interferon nie wywiera wpływu na ekspresję LMP7, LMP2 i MECL1, podczas gdy β -interferon powoduje jedynie synergistyczny efekt wraz z γ -interferonem na ekspresję LMP2 i LMP7 nie zmieniając ekspresji MECL1 [3,4,8,10,12,-39,46,71,94,96,120]. Należy tu wspomnieć, iż próbowano działać na komórki linii RMA (limfoblasty T myszy) interleukiną 2 poszukując jej ewentualnego wpływu na skład podjednostkowy proteasomów. Interleukina 2 nie powodowała wymiany podjednostek zależnych od interferonu γ , ale wyraźnie wpływała na podjednostkę C8 powodując zmianę jej ruchliwości na żelach [94]. Wydaje się, że również inne cytokiny i limfokiny mogą oddziaływać na funkcję proteasomów, gdyż opisano aktywację proteasomów w miotubach pod wpływem interleukiny 6 [23].

Geny *LMP2* i *LMP7* pojawiły się u kręgowców ok. 600 milionów lat temu, choć zdania są podzielone, czy nastąpiło to jeszcze przed rozdzieleniem się drzewa rodowego szczękowców od bezszczękowców, czy po tym ważnym wydarzeniu ewolucyjnym [51,53,76]. Lokalizacja tych genów w obrębie zespołu genów MHC klasy II (6p21) wskazuje na ich udział w układzie odpornościowym kręgowców. U człowieka i u myszy występują dwa alternatywne pierwsze egzony w genie *LMP7*, które powstały wskutek wewnętrznej duplikacji przed rozdzieleniem się naczelnych i gryzoni, a więc co najmniej 100 milionów lat temu [51]. Stwierdzono u myszy po trzy różne allele *LMP2* i *LMP7*, przy czym regiony polimorficzne występują na końcu karboksylowym tych białek [72]. Gen *MECL1* nie występuje w obrębie MHC, lecz w grupie pięciu genów położonych na chromosomie 16q22.1 [57]. Geny dla podjednostek X, Y i Z rozproszone są w różnych miejscach genomu ludzkiego (X- 14q11.2, Y 17p13, Z- 9q34.11/12)[8,46]. Za powstaniem podjednostek regulowanych przez γ -interferon drogą późniejszej duplikacji przemawia fakt, iż są one zdecydowanie podobne do swoich odpowiedników (X do LMP7 68%, Y do LMP2 57%, a Z do MECL1 63%), podczas gdy podobieństwo do innych podjednostek β jest o wiele mniejsze (15%) [100]

Wszystkie trzy podjednostki proteasomów, ulegające indukcji przez γ -interferon oraz podjednostki, które są przez nie zastępowane (X, Y i Z) mają aminoterminalną treoninę, która jest najprawdopodobniej miejscem aktywnym, jak wnosi się z badań mutagenezy u drożdży oraz badań nad wiązaniem się inhibitorów z proteasomami [29]. Podjednostki te powstają w formie niedojrzałej z dodatkową prosekwencją N-końcową, która następnie ulega odcięciu w procesie budowy proteasomu [89]. Pozostałe cztery podjednostki β ludzkiego proteasomu HC5, HC7, HC10 i HN3 nie mają wolnej treoniny na końcu aminowym i są prawdopodobnie nieaktywne [29,119]. Zwraca się uwagę, iż konformacja prosekwencji podjednostek β_6 i β_7 przypomina konformację kieszeni wiążącej antygen MHC klasy I [11].

Transfekcja komórek HeLa wektorem zawierającym gen *LMP7*¹ powoduje wzrost zawartości LMP7 oraz równocześnie wzrost aktywności chymotrypsynopodobnej

¹Zgodnie z szeroko przyjętą konwencją nazwy białek pisane są normalną czcionką, a nazwy odpowiednich genów kursywą.

i trypsynopodobnej izolowanych proteasomów. Co więcej kotransfekcja *LMP2* powodowała obniżenie aktywności hydrolizującej wiązania peptydylglutamylpeptydowe [33]. Z kolei transfekcja tychże komórek *X* powodowała obniżenie aktywności chymotrypsynopodobnej i trypsynopodobnej, a transfekcja *Y* wzrost aktywności hydrolizującej wiązania peptydylglutamylpeptydowe [32]. Odmienne wyniki dostarczyła grupa Kloetzela, transfekując komórki T2 pozbawione własnych kopii *LMP* i *TAP*. Komórki transfekowane *LMP2/7* wykazywały spadek aktywności chymotrypsynopodobnej proteasomów przy zmianie profilu produktów powstających z danego substratu [55]. Nie wiadomo natomiast nic jeszcze o wpływie wymiany podjednostki *Z* na *MECL1* na właściwości enzymatyczne proteasomów. Co więcej, okazało się, że poprzednio uzyskane wyniki dotyczące *LMP2* należy ponownie rozpatrzyć, gdyż wbudowywanie podjednostki *MECL1* do proteasomów jest uzależnione od wbudowywania *LMP2* i *vice versa*. Komórki pozbawione *LMP2* i transfekowane *MECL1* wykazują ekspresję dużej ilości mRNA *MECL1*, ale białko *MECL1* nie ulega wbudowywaniu do proteasomów. Wzajemne powiązanie ekspresji *MECL1* i *LMP2* tłumaczy też częściowo fakt, że gen *MECL1* występuje poza kompleksem genów MHC klasy II [42].

Znaczenie podjednostek *LMP2* i *LMP7* dla prezentacji antygenów zostało zakwestionowane, gdy komórki pozbawione dużego segmentu genów regionu MHC klasy II, w tym *TAP* i *LMP*, transfekowano *TAP1/2*. Transfekcja ta wystarczała do przywrócenia pełnej zdolności do prezentacji antygenów w kontekście MHC klasy I [5,64,121,124]. Z kolei utworzenie myszy transgenicznych ze znokautowanym genem *LMP2* i *LMP7* wykazało, iż pochodzące od nich komórki mają obniżoną ekspresję MHC klasy I oraz upośledzoną prezentację antygenów wirusowych. Defekt był o wiele silniejszy w przypadku dysrupcji genu *LMP7* niż w przypadku *LMP2*. Proteasomy uzyskane z transgenicznych myszy miały zmienione właściwości proteolityczne. Pomimo tych różnic w stosunku do myszy dzikich ilość limfocytów T i B we krwi obwodowej, rozmnażanie się i stan zdrowia transgenicznych myszy nie odbiegał od normy [28,95,108].

Stwierdzono, iż pewna linia chłoniaka T-komórkowego z defektywną prezentacją zależną od MHC klasy I antygenów wirusa grypy ma obniżone poziomy *LMP2*. Stymulacja γ -interferonem powoduje wzrost ekspresji *LMP2* i przywrócenie prawidłowej prezentacji antygenów [90]. Podobnie, niektóre epitopy wirusowe wymagają do swojej obecności *LMP7* [13]. Wydaje się więc, że choć proteasomy pozbawione *LMP2* i *LMP7* są w stanie generować część, a może nawet większość peptydów ulegających prezentacji w powiązaniu z MHC klasy I, to przynajmniej do produkcji niektórych z nich lub do efektywnej produkcji pozostałych wymagana jest obecność podjednostek *LMP2* i *LMP7*. W związku z tym proteasomy zawierające podjednostki *LMP2* i *LMP7* przywykło się nazywać dla odróżnienia immunoproteasomami [99].

Podjednostki proteasomów indukowane w tkankach przez γ -interferon mają konstytutywnie wysoką ekspresję w grasicy oraz w węzłach chłonnych i śledzionie [26,96]. Być może występowanie immunoproteasomów w grasicy umożliwia negatywną selekcję tych limfocytów T, które rozpoznają peptydy generowane przez immunoproteasomy z własnych białek komórki. Zaburzenia ekspresji zależnych od γ -interferonu podjednostek proteasomów mogłyby prowadzić do chorób autoimmunologicznych. Co ciekawe, zidentyfikowano allele *LMP2*, których występowanie sprzyja zapadnięciu na młodocianą postać zeszytniającego zapalenia stawów kręgosłupa oraz reumatoidalnego zapalenia stawów [81,82]. Istnieją również doniesienia o powiązaniu niektórych alleli *LMP2* i *LMP7* z cukrzycą insulinozależną [16].

Niektóre białka wirusowe oddziaływać mogą z elementami układu produkującego i dostarczającego peptydy antygenowe. Komórki zainfekowane adenowirusem 12 (Ad12) mają bardzo niską ekspresję antygenów związanych z MHC klasy I, co wiąże się z *in vivo* onkogennością tego wirusa. Embrionalne fibroblasty mysie zainfekowane Ad12 wykazują obniżoną ekspresję genów dla transporterów peptydów TAP oraz podjednostek proteasomów *LMP2* i *LMP7* [88]. Ponadto, adenowirus wytwarza białko E19 o masie 19 kDa, które po wbudowaniu w błonę siateczki śródplazmatycznej oddziałuje odcinkiem luminalnym z łańcuchem ciężkim MHC klasy I, podczas gdy odcinek cytoplazmatyczny jest rozpoznawany przez białka koatomerowe warunkujące transport wsteczny z sieci *cis*-Golgiego do siateczki śródplazmatycznej, a co za tym idzie, uniemożliwia to eksport cząsteczek MHC klasy I na powierzchni zainfekowanych komórek [30]. Wirus Epsteina-Barr w okresie latencji wytwarza białko EBNA-1, które zawiera sekwencje zapobiegające prezentacji antygenów, którym przypisuje się zdolność blokowania aktywności proteolitycznej proteasomów [58]. Ludzki cytomegalowirus wytwarza szereg białek kodowanych przez region US (*unique short*), które zapobiegają ekspresji MHC klasy I, prawdopodobnie przez łączenie się z łańcuchem ciężkim MHC klasy I i ukierunkowanie tego kompleksu na szlak degradacji zależny od ubiquityny i proteasomów [30].

AKTYWATOR PA28

PA28 zwany też aktywatorem 11 S został wyizolowany niezależnie przez grupę Rechsteiner [22] oraz grupę De Martino [62] jako heksamer o natywnej masie cząsteczkowej 180–200 kDa. Każda z podjednostek na SDS-PAGE miała masę 28 kDa. Heksameryczne pierścienie PA28 wiążą się z obydwojma końcami proteasomu 20 S tworząc kompleks o kształcie piłki do futbolu amerykańskiego [37,60]. Proteasom 20 S z przyłączonym aktywatorem PA28 wykazuje zmienione właściwości katalityczne, mianowicie degraduje on znacznie szybciej niewielkie peptydy, choć nie jest w stanie degradować długich polipeptydów i białek, nawet jeśli są one zdenaturowane lub związane z poliubiquityną. Ponieważ wiązanie się PA28 z

proteasomem 20 S powoduje zarówno wzrost V_{max} , jak i zmniejszenie się stałej Michaelisa, jest on pozytywnym efektem allosterycznym proteasomu 20 S [22,62].

Dokładna analiza PA28 wykazała, że nie składa się on z sześciu jednakowych podjednostek, jak pierwotnie przypuszczano [62], lecz z dwóch różnych białek o podobnej budowie (47% homologii) i masie cząsteczkowej 28 kDa każde [22,69]. Podjednostki te zostały odpowiednio nazwane PA28 α i PA28 β [1]. Układają się one naprzemiennie tworząc heteropolimer PA28(α)₃(β)₃ w kształcie pierścienia [2,92]. Wiąże się on z pierścieniami α proteasomu 20S przez C-końcowe domeny białek PA28 [62,92]. Białka PA28 α i PA28 β myszy i człowieka są odpowiednio w 92% i 91% identyczne [52].

Komputerowa analiza sekwencji PA28 α i β oraz jej porównanie z bazami danych wykazało, iż są one wysoce homologiczne (40%) z opisanym wcześniej białkiem o nazwie antygen Ki [1,75]. Antygen Ki opisano po raz pierwszy jako jądrowy antygen, przeciwko któremu występują przeciwciała w surowicy 12% pacjentów z toczniem rumieniowatym układowym [101]. PA28 α zawiera sekwencję bogatą w lizynę i kwas glutaminowy zwaną motywem KEKE. Sekwencja ta jest obecna także w niektórych podjednostkach proteasomu 20 S i czapki 19 S. Jest ona bardzo hydrofilowa i prawdopodobnie uczestniczy w oddziaływaniach między białkami [1,84]. Gen *PA28a* został wcześniej sklonowany i nazwany IGUP I-5111, jako główny gen, którego ekspresja ulega indukcji przez γ -interferon w ludzkich keratynocytach [48].

Immunoprecypitacja proteasomów z użyciem przeciwciał antyproteasomalnych wykazała, iż w immunoprecypitacie znajduje się również antygen Ki. Świadczy to o tym, iż najprawdopodobniej antygen Ki asocjuje z proteasomami *in vivo*. Białko to o M_R 31 kDa ulega oczyszczaniu na kolumnie z Q-sefarozy wraz z PA28 α i β . W związku z powyższym Tanaka i wsp. zaproponowali, aby nazywać antygen Ki PA28 γ [98].

Immunoprecypitacja z użyciem anti-PA28 β koprecypitowała wraz z PA28 α także PA28 β i *vice versa*, natomiast immunoprecypitacja z użyciem anti-PA28 γ nie koprecypitowała ani PA28 α , ani β , co sugeruje, że PA28 γ prawdopodobnie tworzy homopolimer PA28(γ)₆, który następnie może asocjować z proteasomem 20S [92,98].

Rekombinowany PA28 α stymuluje *in vitro* aktywność chymotrypsynopodobną proteasomu względem chromogennego peptydu Suc-LLVY-MCA, podczas gdy PA28 β nie wywiera żadnego wpływu. Jeżeli jednak użyć mieszaniny PA28 α i β , to aktywacja proteasomu następuje już przy niewielkich stężeniach PA28 α , choć maksymalny zakres aktywacji nie ulega zmianie, co sugeruje, iż PA28 β w jakiś sposób oddziałuje z proteasomem i PA28 α zwiększając ich powinowactwo. Rekombinowany PA28 γ nie wywiera wpływu na aktywność proteolityczną proteasomu ani sam, ani w obecności PA28 α i/lub β [92,98].

Badania genomu myszy metodą *Southern blotting* sugerują, że geny *PA28a* i *PA28b* występują prawdopodobnie w wielu kopiach, podczas gdy *Ki* pod postacią

pojedynczego genu. Z kolei *Northern blotting* wykazał, że w odróżnieniu od PA28 α i PA28 β , Ki (PA28 γ) występuje pod postacią dwóch transkryptów. PA28 α , PA28 β i Ki ulegają ekspresji we wszystkich badanych tkankach, przy czym jest ona najwyższa w płucach, śledzionie, grasicy i jądrze, a najniższa w mózgu, ale ekspresja poszczególnych białek z tej grupy nie jest dokładnie na jednakowym poziomie [52]. U człowieka geny PA28 α i PA28 β występują w pobliżu siebie na chromosomie 14q11.2. Ulegają transkrypcji pod postacią pojedynczego mRNA o wielkości 0,9 kb każde. Gen Ki (PA28 γ) jest z kolei zlokalizowany w regionie 17q21.32-33 i ulega transkrypcji pod postacią jednego rodzaju mRNA o długości 2,5 kb, z długim niekodującym regionem 3' [98].

γ -Interferon powoduje wzrost ekspresji PA28 α i β w hodowanych *in vitro* komórkach różnych linii [1,48,52,84]. Ekspresja PA28 γ również ulega stymulacji jednak mniejszej i efekt interferonu γ jest jedynie czasowy [1,52]. Zaproponowano to możliwy udział PA28 w prezentacji antygenów. PA28 nie wiąże się wybiórczo z proteasomami zawierającymi LMP7/LMP2, ale powiązaniu się z proteasomami zdecydowanie zmienia profil peptydów będących produktem degradacji danego białka. Być może więc, prowadzi on do zwiększenia spektrum peptydów generowanych z danego białka przez komórki prezentujące antygen [38,41].

Proteasom 20 S generuje głównie peptydy, które uległy pojedynczemu rozszczepieniu, podczas gdy w połączeniu z PA28 generuje głównie peptydy, które powstały wskutek dwóch rozszczepień proteolitycznych oryginalnego polipeptydu. Degradacja *in vitro* białka pp89 cytomegalowirusa oraz kinazy JAK1 w obecności PA28 prowadzi do produkcji głównych ligandów MHC oraz ich prekursorów. Dowodzi to, iż PA28 zmienia mechanizm proteolizy w proteasomach prowadząc do powstawania dominujących epitopów dla komórek T [18].

Powyższe wnioski zostały potwierdzone badaniami *in vivo* na fibroblastach mysich transfekowanych PA28 α , które znacznie lepiej prezentowały antygen pp89 CMV cytotoksycznym limfocytom T, podobnie jak po stymulacji γ -interferonem. Również uległa zwiększeniu prezentacja nukleoproteiny wirusa grypy [39]

PRODUKCJA PEPTYDÓW ANTYGENOWYCH

Jak już wspomniano na początku tego artykułu, proteasomy wykazują co najmniej pięć aktywności proteolitycznych i są w związku z tym zdolne do generowania szerokiego spektrum peptydów z pojedynczego białka ulegającego degradacji. Wśród peptydów powstających z danego białka będącego antygenem, znajdują się również takie, które są wybiórczo transportowane przez układ TAP1/2 do światła siateczki śródplazmatycznej i tam są wiązane z łańcuchem ciężkim MHC klasy I oraz β_2 -mikroglobuliną stabilizując dojrzałą cząsteczkę MHC klasy I, ulegającą eksportowi

na powierzchni komórki, gdzie prezentuje ona dany epitop antygenowy komórkom immunologicznie kompetentnym [54].

W układzie *in vitro* oczyszczony proteasom 20 S jest w stanie wytworzyć peptydy antygenowe z białek, takich jak: β -galaktozydaza i owalbumina [19]. Co więcej, w przypadku owalbuminy proteasom generował wybiórczo peptyd będący głównym ligandem MHC klasy I, mianowicie Ova 257-264, podczas gdy epitop subdominujący Ova 55-62 ulegał w większości rozkładowi [73,74]. Z białka jądrowego wirusa grypy typu A, proteasomy 20 S produkują peptyd immunodominujący NP 383-391 specyficznie wiążący się z cząsteczkami HLA-B27 [97]. O wytwarzaniu peptydów antygenowych w przypadku danego białka wirusowego może decydować różnica jednego aminokwasu w sekwencji [77].

W przypadku użycia jako substratu syntetycznego 25-aminokwasowego polipeptydu zawierającego sekwencję białka IE pp89 mysiego cytomegalowirusa okazało się, że główny peptyd antygenowy stanowił jedynie niewielką frakcję produktów powstających z rozkładu tego polipeptydu. Użycie zamiast zwykłych proteasomów immunoproteasomów dawało odmienne spektrum peptydów końcowych, a peptyd immunodominujący był produkowany z nieco lepszą wydajnością [10]. Podobny obraz uzyskano w przypadku antygenowego peptydu pochodzącego z produktu onkogenu *Akt*. Ilość specyficznego immunodominującego peptydu zwiększyła się, gdy do mieszaniny inkubacyjnej dodano oczyszczonego aktywatora PA28 [100]. Inne badania zdają się jednak zaprzeczać różnicy pomiędzy immunoproteasomami a proteasomami bez LMP2 i LMP7. Gdy jako substratu użyto łańcucha B insuliny i porównano spektrum peptydów produkowanych przez proteasomy i immunoproteasomy, okazało się, że brak było pomiędzy nimi różnic, choć użyte do badań proteasomy pochodzące z dzikiej i zmutowanej (delecja *LMP2/7*) linii T-limfocytarnej różniły się aktywnością w stosunku do prostych substratów fluorogenicznych [24].

Z powodów technicznych trudno jest oznaczać produkty generowane przez proteasom 26 S odgrywający *in vivo* główną rolę w degradacji substratów skoniugowanych z ubikwityną. Analiza produktów degradacji dekarboksylazy ornitynowej, białka, które jest degradowane przez proteasom 26 S bez potrzeby koniugacji z ubikwityną (uczestniczy w tym inne białko, tzw. antyzym [70]), wykazała produkcję szerokiego spektrum peptydów, w tym takich, które odpowiadają kryteriom ligandów dla MHC klasy I [102]. Utlenioną i zdenaturowaną mocznikiem owalbuminę inkubowano w lizacie limfocytów, co prowadziło do degradacji antygeny i powstawania epitopu SIINFEKL rozpoznawanego w kontekście H-2K^b przez cytotoksyczne limfocyty T. Degradacji antygeny i powstawaniu tego epitopu można było zapobiec usunięciem ATP lub dodaniem metylowanej ubikwityny do mieszaniny inkubacyjnej, co świadczy o roli układu ubikwitynowania białek i proteasomu 26 S w generacji peptydów antygenowych [9].

Obecnie wydaje się, że proteasomy (zarówno te bez podjednostek indukowanych przez γ -interferon, jak i te, które je zawierają, czyli immunoproteasomy) generują większość peptydów ulegających następnie translokacji do siateczki śródplazmatycznej i łączeniu z cząsteczkami MHC klasy I. Ukazał się jednak ostatnio artykuł podważający tę teorię. Badano mianowicie produkcję różnorodnych peptydów antygenowych w komórkach L929 poddanych działaniu inhibitorów proteasomów zarówno laktacystyny, jak i z grupy peptydyl aldehydów. Wpływ tych inhibitorów okazał się bardzo zróżnicowany, prezentacja niektórych peptydów uległa ograniczeniu, podczas gdy innych nie uległa zmianie. Pod ich wpływem ekspresja β_2 -mikroglobuliny oraz łańcuchów α cząsteczek MHC klasy I produkowanych z odpowiednich plazmidów uległa obniżeniu, ale nie miały one wpływu na ekspresję endogennych cząsteczek K^k i D^k . Te wyniki można częściowo tłumaczyć zaburzeniem recyrkulacji cząsteczek MHC [109].

W warunkach patologicznych, kiedy w obrębie komórek pojawia się dużo antygenów (infekcja wirusowa, transformacja nowotworowa), funkcję proteasomów przejmują wyspecjalizowane immunoproteasomy (proteasomy z podjednostkami indukowanymi przez γ -interferon). Aktywowane limfocyty T i/lub NK wydzielają γ -interferon, który indukuje w komórkach ekspresję podjednostek LMP2, LMP7 i MECL1 proteasomów oraz podjednostek α i β aktywatora PA28. Immunoproteasomy są najprawdopodobniej w jakiś sposób bardziej zdolne do produkcji odpowiednich peptydów antygenowych niż zwykle proteasomy, np. przez zmianę specyficzności hydrolizowanych wiązań lub/i przyspieszenie szybkości generowania peptydów antygenowych. Dodatkowo, indukowany przez γ -interferon aktywator PA28 również zmienia spektrum peptydów generowanych przez proteasomy, przystosowując je bardziej do potrzeb układu transporterów i cząsteczek MHC klasy I. Ponieważ jednak proteasom powiązany z PA28 nie jest w stanie degradować białek i dużych polipeptydów, odgrywa on zapewne rolę w końcowej obróbce polipeptydów generowanych przez proteasom 26 S. Nic jednak nie wiadomo, jak do tej pory o ewentualnym wpływie γ -interferonu na ekspresję białek kompleksu czapki 19 S, która w powiązaniu z proteasomem 20 S wytwarza proteasom 26 S. Generowane przez proteasomy peptydy antygenowe muszą dostać się do transportera TAP1/2 bez narażenia na działanie obecnych na terenie cytoplazmy egzopeptydaz i oligopeptydaz. Nie są dokładnie znane mechanizmy, jakie temu zapobiegają, ale w grę może wchodzić albo asocjacja proteasomów z transporterami TAP, albo udział pośredniczących białek opiekuńczych hsp70/90 [83,93]. Peptydy, które dostają się do światła siateczki śródplazmatycznej i wiążą się z cząsteczkami MHC klasy I, mogą ulegać dodatkowym modyfikacjom polegającym na ograniczonej proteolizie reszt aminoacylowych końca aminowego. Proteoliza ta może zachodzić bezpośrednio w świetle siateczki śródplazmatycznej [27] albo w obrębie uformowanych pęcherzyków wydzielniczych lub na powierzchni komórek [25,59].

UKŁAD TRANSPORTERÓW TAP

Badania nad liniami komórek o upośledzonej prezentacji antygenów w kontekście MHC klasy I doprowadziły do izolacji dwóch genów określanych obecnie jako *TAP1* i *2* (*Transporter Associated with Peptide processing*), znanych wcześniej pod nazwami *PSF1* i *2* (*Peptide Supply Factor*), *Ham 1* i *2* (*Histocompatibility Antigen Modifier*) oraz *RING4* i *11* (*Really Interesting New Gene*). Geny *TAP 1* i *2* są polimorficzne, kodowane w regionie MHC klasy II i wykazują do siebie duże podobieństwo. Białka TAP mają kasetę łączącą ATP oraz kilka odcinków przezbłonowych. Koprecypitacja z użyciem specyficznych przeciwciał wskazuje na to, iż asocjują one ze sobą, tworząc heterodimer, choć ich dokładna topologia nie jest jeszcze poznana. W komórce transportery TAP 1/2 lokalizują się w obrębie błon siateczki śródplazmatycznej i sieci *cis* Golgi [45,79].

Myszy transgeniczne ze znokautowanym genem *TAP1* mają upośledzoną prezentację antygenów w kontekście MHC klasy I, a w ich krwi obwodowej brak jest limfocytów T CD4⁺ [108]. Odpowiednikiem tego fenotypu u ludzi są mutacje genu *TAP1* występujące u niektórych pacjentów z wrodzonym upośledzeniem odporności. Badania *in vitro* z użyciem pęcherzyków mikrosomalnych wykazały, że białka TAP łączą peptydy, zwłaszcza mające reszty hydrofobowe na końcach karboksylowych, a następnie katalizują ich translokację w poprzek błon z udziałem hydrolizy ATP. Większość peptydów transportowanych przez TAP ma od 8 do 14 reszt aminoacylowych, choć niektóre mogą mieć nawet 24 reszty [45,65,100].

Peptydy antygenowe przyczepiają się zapewne do cząsteczek TAP w dwóch miejscach, na końcu karboksylowym (stąd wymóg reszty hydrofobowej, ewentualnie naładowanej dodatnio) oraz trzema ostatnimi resztami na końcu aminowym (prolina w pozycji przedostatniej destabilizuje wiązanie z TAP, choć jest faworyzowana przez większość alleli HLA-B). Pomiedzy tymi dwoma grupami wiążącymi z cząsteczką TAP mogą znajdować się dowolne aminokwasy, stąd pochodzi sztywny dolny limit długości peptydów antygenowych, warunkowany odległością pomiędzy miejscami wiążącymi, podczas gdy górny limit długości peptydu antygenowego jest mniej wyraźny, gdyż łańcuch polipeptydowy może się odpowiednio wygiąć, by przystosować się do wiązania z TAP [106]. Wyniki badań oraz dane kliniczne wskazują więc, że generowane w cytoplazmie peptydy dostają się w obręb siateczki śródplazmatycznej z udziałem transporterów TAP, by następnie łączyć się z łańcuchem ciężkim MHC klasy I oraz β_2 -mikroglobuliną w dojrzałą cząsteczkę.

Podobnie jak w przypadku innych genów kodowanych w regionie MHC klasy II, ekspresja *TAP1* i *TAP2* ulega silnej indukcji przez γ -interferon. W sześć godzin po zadziałaniu tej cytokiny na komórki śród błonka dochodzi do dwudziestokrotnego wzrostu zawartości mRNA *TAP1* i dziesięciokrotnego wzrostu zawartości mRNA *TAP2*. Wzrostowi ekspresji genów transporterów dla peptydów towarzyszy wzrost

efektywnej zdolności transportowania peptydów antygenowych w poprzek błon siateczki śródplazmatycznej [61].

Ekspresja antygenów związanych z MHC klasy I może ulec zablokowaniu przez interakcję specyficznego białka wirusowego z transporterem TAP. Białko ICP47 wirusa opryszczki ludzkiej (HSV) typu 1 i 2 zapobiega w ten sposób prezentacji antygenów wirusowych, jednak blok ten można obejść przez zwiększoną ekspresję TAP w komórce [31].

ZAKOŃCZENIE I PERSPEKTYWY NA PRZYSZŁOŚĆ

Zależna od γ -interferonu indukcja nowych podjednostek proteasomów (LMP2, LMP7 i MECL1) powoduje pojawienie się w komórkach immunoproteasomów o zmienionym składzie podjednostkowym i zmienionych aktywnościach proteolitycznych. Immunoproteasomy są w stanie generować ze zwiększoną efektywnością peptydy wybiórczo przenoszone przez transportery TAP i wiązane przez MHC klasy I. Choć indukcja nowych podjednostek proteasomów przez γ -interferon jest szybka, to immunoproteasomy stanowią jedynie część całkowitej populacji proteasomów komórki poddanej działaniu tej cytokiny ze względu na długi półokres trwania już istniejących proteasomów. Końcowym efektem jest więc znaczna dywersyfikacja peptydów produkowanych z endogennych antygenów, gdyż czynią to zarówno immunoproteasomy, jak i proteasomy pozbawione indukowanych przez γ -interferon podjednostek [20,40,100]. Możliwe też jest, że istnieją także proteasomy o pośredniej budowie, zawierające tylko niektóre z trzech jednostek indukowanych przez γ -interferon. Takie proteasomy prowadziłyby do dalszego zróżnicowania produkowanych przez nie peptydów [12]. Różnorodność form proteasomów prowadząca do zwiększenia różnorodności produkowanych przez nie peptydów w zależności od potrzeb fizjologicznych nazwano ich adaptacją molekularną [99,100]. *In vivo*, w komórkach poszczególnych tkanek organizmu występują zarówno immunoproteasomy, jak i proteasomy pozbawione podjednostek indukowanych przez γ -interferon. Praktycznie czystą populację immunoproteasomów można otrzymać ze śledziona, a populację pozbawioną LMP2, LMP7 i MECL1 z przysadki [26]. Obecnie poznano już budowę proteasomów na poziomie molekularnym z rozdzielczością 2,4 Å, co niewątpliwie ułatwi dokładniejsze poznanie ich funkcji [43]. Dysponujemy także specyficznymi inhibitorami proteasomów [29,112] oraz ich aktywatorami [113]. Te ostatnie mogą okazać się środkami wybiórczo wzmagającymi ekspresję antygenów związanych z MHC klasy II o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym. Również inhibitory proteasomów mogą być użyte do celów klinicznych, prowadzone są badania nad ich użyciem jako leków przeciwzapalnych i przeciwnowotworowych [87]. W najbliższych latach będziemy zapewne świadkami dalszych odkryć zwią-

zanych z tymi niedawno poznanymi organellami, jakimi są proteasomy i ich rolę w prezentacji antygenów.

Podziękowania

Napisanie tej pracy było w dużej mierze możliwe dzięki pobytowi w laboratorium kierowanym przez prof. dr Sherwina Wilka w Zakładzie Farmakologii, Mount Sinai School of Medicine w Nowym Jorku.

LITERATURA

- [1] AHN JY, TANAHASHI N, AKIYAMA K, HISAMATSU H, NODA C, TANAKA K, CHUNG CH, SHIMBARA N, WILLY PJ, MOTT JD et al. Primary structures of two homologous subunits of PA28, a γ -interferon inducible protein activator of the 20S proteasome. *FEBS Lett* 1995; **366**: 37–42.
- [2] AHN K, ERLANDER M, LETURCQ D, PETERSON PA, FRUH K, YANG Y. *In vivo* characterization of the proteasome regulator PA28. *J Biol Chem* 1996; **271**: 18237–18242.
- [3] AKI M, SHIMBARA N, TAKASHINA M, AKIYAMA K, KAGAWA S, TAMURA T, TANAHASHI M, YOSHIMURA T, TANAKA K, ICHIHARA A. Interferon- γ induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J Biochem* 1993; **115**: 257–269.
- [4] AKIYAMA K, YOKOTA K, KAGAWA S, SHIMBARA N, TAMURA T, AKIOKA H, NOTHWANG HG, NODA C, TANAKA K, ICHIHARA A. cDNA cloning and interferon- γ down-regulation of proteasomal subunits X and Y. *Science* 1994; **265**: 1231–1234.
- [5] ARNOLD DJ, DRISCOLL J, ANDROLEWICZ M, HUGHES E, CRESSWELL P, SPIES T. Proteasome subunits encoded in the MHC are not generally required for the processing of peptides bound by MHC class I molecules. *Nature* 1992; **360**: 171–174.
- [6] BALDEON MÈ, NEECE DJ, NANDI D, MONACO JJ, GASKINS HR. Interferon- γ independently activates the MHC class I antigen processing pathway and diminishes glucose responsiveness in pancreatic β -cell lines. *Diabetes* 1997; **46**: 770–778.
- [7] BAUMEISTER W, LUPAS A. The proteasome. *Curr Op Struct Biol* 1997; **7**: 273–278.
- [8] BELICH MP, GLYNNE RJ, SENGER G, SHEER D, TROWSDALE J. Proteasome components with reciprocal expression to that of the MHC-encoded LMP proteins. *Curr Biol* 1994; **4**: 769–776.
- [9] BEN-SHAHAR S, CASSOUTO B, NOVAK L, PORGADOR A, REISS Y. Production of a specific major histocompatibility complex class I restricted epitope by ubiquitin-dependent degradation of modified ovalbumin in lymphocyte lysate. *J Biol Chem*. 1997; **272**: 21060–21066.
- [10] BOES B, HENGEL H, RUPPERT T, MULTHAUP G, KOSZINOWSKI UH, KLOETZEL PM. Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20 S proteasomes. *J Exp Med* 1994; **179**: 901–909.
- [11] BRANNINGAN JA, DODSON GG. A short cut for the immune system. *Nature Struct Biol* 1997; **4**: 334–338.

- [12] BROWN MG, DRISCOLL J, MONACO JJ. MHC-linked low-molecular mass polypeptide subunits define distinct subsets of proteasomes. Implication for divergent function among proteasome subsets. *J Immunol* 1993; **151**: 1193–1204.
- [13] CERUNDOLO V, KELLY A, ELLIOT T, TROWSDALE J, TOWNSEND A. Genes encoded in the major histocompatibility complex affecting the generation of peptides for TAP transport. *Eur J Immunol* 1995; **25**: 554–562.
- [14] COUX O, TANAKA K, GOLDBERG AL. Structure and functions of the 20 S and 26 S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 1996; **65**: 801–847.
- [15] DEMARTINO GN, SLAUGHTER C. Regulatory proteins of the proteasome. *Enzyme Protein* 1993; **47**: 314–324.
- [16] DENG GY, MUIR A, MACLAREN NK, SHE JX. Association of LMP2 and LMP7 genes within the major histocompatibility complex with insulin-dependent diabetes mellitus: population and family studies. *Am J Hum Genet* 1995; **56**: 528–534.
- [17] DEVERAUX Q, USTRELL V, PICKART C, RECHSTEINER M. A 26S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J Biol Chem* 1994; **152**: 3884–3894.
- [18] DICK TP, RUPPERT T, GROETTRUP M, KOLETZEL PM, KUEHN L, KOSZINOWSKI UH, STEVANOVIC S, SCHILD H, RAMMENSEE HG. Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell* 1996; **86**: 253–262.
- [19] DICK LR, ALDRICH C, JAMESON S, MOOMAW CR, PRAMANIK BC, DOYLE CK, DEMARTINO GN, BEVAN MJ, FORMAN JM, SLAUGHTER CA. Proteolytic processing of ovalbumin and β -galactosidase by the proteasome to yield antigenic peptides. *J Immunol* 1994; **152**: 3884–3894.
- [20] DJABALLAH H. Antigen processing by proteasomes: insights into the molecular basis of crypticity. *Molec Biol Rep* 1997; **24**: 63–67.
- [21] DRISCOLL J, BROWN MG, FINLEY D, MONACO JJ. MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome. *Nature* 1993; **365**: 262–264.
- [22] DUBIEL W, PRATT G, FERRELL K, RECHSTEINER M. Purification of an 11S regulator of the multicatalytic protease. *J Biol Chem* 1992; **267**: 22369–22377.
- [23] EBISUI C, TSUJINAKA T, MORIMOTO T, KAN K, IJIMA S, YANO M, KOMINAMI E, TANAKA K, MONDEN M. Interleukin-6 induces proteolysis by activating intracellular proteases (cathepsins B and L, proteasome) in C2C12 myotubes. *Clin Sci* 1995; **87**: 431–439.
- [24] EHRING B, MEYER TH, ECKERSKORN C, LOTTSPEICH F, TAMPE R. Effects of major-histocompatibility-complex-encoded subunits on the peptidase and proteolytic activities of human 20 S proteasome. *Eur J Biochem* 1996; **235**: 404–415.
- [25] EISENLOHR LC, BACIK I, BENNINK JR, BERNSTEIN K, YEWDELL JW. Expression of a membrane protease enhances presentation of endogenous antigen in MHC class I-restricted T lymphocytes. *Cell* 1992; **71**: 963–972.
- [26] ELEUTERI AM, KOHANSKI RA, CARDOZO C, ORLOWSKI M. Bovine spleen multicatalytic proteinase complex (proteasome). *J Biol Chem* 1997; **272**: 11824–11831.
- [27] ELLIOT T, WILLIS A, CERUNDOLO V, TOWNSEND A. processing of major histocompatibility class I-restricted antigens in the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* 1995; **181**: 1481–1491.
- [28] FEHLING HJ, SWAT W, LAPLACE C, KUHN R, RAJEWSKY K, MULLER U, VON BOEHMER H. MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7. *Science* 1994; **265**: 1234–1237.
- [29] FENTEANY G, STANDAERT RF, LANE WS, CHOI S, COREY EJ, SCHREIBER SL. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* 1995; **268**: 726–731.
- [30] FRGH K, AHN K, PETERSON PA. Inhibition of MHC class I antigen presentation by viral proteins. *J Mol Med* 1997; **75**: 18–27.

- [31] FRgH K, ANH K, DJABALLAH H, SEMPE P, VAN ENDERT PM, TAMPE R, PETERSON PA, YANG Y. A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation. *Nature* 1995; **375**: 415–418.
- [32] GACZYNSKA M, GOLDBERG AL, TANAKA K, HENDIL KB, ROCK R. Proteasome subunits X and Y alter peptidase activities in opposite way to the interferon- γ -induced subunits LMP2 and LMP7. *J Biol Chem* 1996; **271**: 17275–17280.
- [33] GACZYNSKA M, ROCK KL, SPIES T, GOLDBERG AL. Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 9213–9217.
- [34] GACZYNSKA M, ROCK KL, GOLDBERG AL. Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature* 1993; **365**: 264–267.
- [35] GOLDBERG AL, AKOPIAN TN, KISSELEV AF, LEE DH, ROHRWILD M. New insights into the mechanisms and importance of the proteasome in intracellular protein degradation. *Biol Chem* 1997; **378**: 131–140.
- [36] GRANT EP, MICHALEK MT, GOLDBERG AL, ROCK KL. Rate of antigen degradation by the ubiquitin-proteasome pathway influences MHC class I presentation. *J Immunol* 1995; **155**: 3750–3758.
- [37] GRAY CW, SLAUGHTER CA, DEMARTINO GN. PA28 activator protein forms regulatory caps on proteasome stacked rings. *J Mol Biol* 1994; **236**: 7–15.
- [38] GROETTRUP M, RUPPERT T, KUEHN L, SEEGER L, STANDERA S, KOSZINOWSKI U, KOLETZEL PM. The interferon- γ -inducible 11S regulator (PA28) and the LMP2/LMP7 subunits govern the peptide production by the 20S proteasome *in vitro*. *J Biol Chem* 1995; **270**: 23808–23815.
- [39] GROETTRUP M, KRAFT R, KOSTKA S, STANDERA S, STOHWASSER R, KLOETZEL PM. A third interferon- γ -induced subunit exchange in the 20S proteasome. *Eur J Immunol* 1996; **26**: 863–869.
- [40] GROETTRUP M, SOZA A, KUCKELKORN U, KLOETZEL PM. Peptide antigen production by the proteasome: complexity provides efficiency. *Immunology Today* 1996; **17**: 429–434.
- [41] GROETTRUP M, SOZA A, EGGERS M, KUEHN L, DICK TP, SCHILD H, RAMMENSEE HG, KOSZINOWSKI UH, KLOETZEL PM. A role for the proteasome regulator PA28 α in antigen presentation. *Nature* 1996; **381**: 166–168.
- [42] GROETTRUP M, STANDERA S, STOHWASSER R, KLOETZEL PM. The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 8970–8975.
- [43] GROLL M, DITZEL L, LWE J, STOCK D, BOCHTLER M, BARTUNIK HD, HUBER R. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 1997; **386**: 463–471.
- [44] HARDING CV, FRANCE J, SONG R, FARAH JM, CHATTERJEE S, IQBAL M, SIMON R. Novel dipeptide aldehydes are proteasome inhibitors and block the MHC-I antigen processing pathway. *J Immunol* 1995; **155**: 1767–1775.
- [45] HILL A, PLOEGH H. Getting the inside-out: The transporter associated with antigen processing (TAP) and the presentation of viral antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 341–343.
- [46] HISAMATSU H, SHIMBARA N, SAITO Y, KRISTENSEN P, HENDIL KB, FUJIWARA T, TAKAHASHI E, TANAHASHI N, TAMURA T, ICHIHARA A, TANAKA K. Newly identified pair of proteasomal subunits regulated reciprocally by γ -interferon. *J Exp Med* 1996; **183**: 1807–1816.
- [47] HOCHSTRASSER M. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* 1997; **30**: 405–439.
- [48] HONORE B, LEFFERS H, MADSEN P, CELIS JE. Interferon- γ up-regulates a unique set of proteins in human keratinocytes: molecular cloning and expression of the cDNA encoding the RGD-sequence-containing protein IGUP I-5111. *Eur J Biochem* 1993; **218**: 421–430.

- [49] HUANG HC, GOLDBERG AL. Proteolytic activity of the ATP-dependent protease HslIVU can be uncoupled from ATP hydrolysis. *J Biol Chem* 1997; **272**: 21364–21372.
- [50] HUGHES EA, ORTMANN B, SURMAN M, CRESSWELL P. The protease inhibitor, N-acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norleucinal, decreases the pool of major histocompatibility complex class I-binding peptides and inhibits peptide trimming in the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* 1996; **183**: 1569–1578.
- [51] HUGHES AL. Evolution of proteasome components. *Immunogenetics* 1997; **46**: 82–92.
- [52] JIANG H, MONACO JJ. Sequence and expression of mouse proteasome activator PA28 and the related autoantigen Ki. *Immunogenetics* 1997; **46**: 93–98.
- [53] KASAHARA M, HAYASHI M, TANAKA K, INOKO H, SUGAYA K, IKEMURA T, ISHIBASHI T. Chromosomal localization of the proteasome Z subunit gene reveals an ancient chromosomal duplication involving the major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 9096–9101.
- [54] KOOPMANN JO, HÄMMERLING GJ, MOMBURG F. Generation, intracellular transport and loading of peptides associated with MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* 1997; **9**: 80–88.
- [55] KUCKELKORN U, FRENTZEL S, KRAFT R, KOSTKA S, GROETTRUP M, KLOETZEL PM. Incorporation of major histocompatibility complex-encoded subunits LMP2 and LMP7 changes the quality of the 20 S proteasome polypeptide processing products independent of interferon- γ . *Eur J Immunol*. 1995; **25**: 2605–2611.
- [56] LAMPRECHT J, WÓJCIK C. Dynamika powstawania, współdziałania i degradacji struktur komórkowych. [W:] Histologia. K. Ostrowski (red) PZWL, Warszawa, 1995; str. 111–168.
- [57] LARSEN F, SOLHEIM J, KRISTENSEN T, KOLSTO AB, PRYDZ H. A tight cluster of five unrelated human genes on chromosome 16q22.1. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 1589–1595.
- [58] LEVITSKAYA J, CORAM M, LEVITSKY V, IMREH S, STEIGERWALD-MULLEN PM, KLEIN G, KURILLA MG, MASUCCI MG. Inhibition of antigen processing by the integral repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* 1995; **375**: 685–688.
- [59] LINK H, YEWDELL JW, BENNINK JR. Trimming of antigenic peptides in an early secretory compartment. *J Exp Med* 1994; **180**: 2389–2394.
- [60] LUPAS A, KOSTER AJ, BAUMEISTER W. Structural features of 26S and 20 S proteasomes. *Enzyme Protein* 1993; **47**: 252–273.
- [61] MA W, LEHNER PJ, CRESSWELL P, POBER JS, JOHNSON DR. Interferon- γ rapidly increases peptide transporter (TAP) subunit expression and peptide transport capacity in endothelial cells. *J Biol Chem* 1997; **272**: 16585–16590.
- [62] MA CP, SLAUGHTER CA, DEMARTINO GN. Identification, purification and characterization of a protein activator (PA28) of the 20S proteasome (macropain). *J Biol Chem* 1992; **267**: 10515–10523.
- [63] MICHALEK MT, GRANT EP, GRAMM C, GOLDBERG AL, ROCK KL. A role for the ubiquitin-dependent proteolytic pathway in MHC class I-restricted antigen presentation. *Nature* 1993; **363**: 552–554.
- [64] MOMBURG FV, ORTIZ-NAVARETTE V, NEEFJES J, GOULMY E, VAN DER WAL Y, SPITS H, POWIS SJ, BUTCHER GW, HOWARD JC, WALDEN P, HAMMERLING GJ. Proteasome subunits encoded by the major histocompatibility complex are not essential for antigen presentation. *Nature* 1992; **360**: 174–177.
- [65] MOMBURG FV, HAMMERLING GJ, NEEFJES JJ. Peptide-selection by MHC-encoded TAP transporter. *Curr Op Immunol* 1994; **6**: 32–37.
- [66] MONACO JJ. A molecular model of MHC class-I-restricted antigen processing. *Immunology Today* 1992; **13**: 173–179.
- [67] MONACO JJ, NANDI D. The genetics of proteasomes and antigen processing. *Annu Rev Genet* 1995; **29**: 729–754.

- [68] MONACO JJ, MCDEVITT HO. Identification of a fourth class of proteins linked to the murine major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79**: 3001–3005.
- [69] MOTT JD, PRAMANIK BC, MOOMAW CR, AFENDIS SJ, DEMARTINO GN, SLAUGHTER CA. PAS28, an activator of the 20S proteasome is composed of two nonidentical but homologous subunits. *J Biol Chem* 1994; **269**: 31466–31471.
- [70] MURAKAMI Y, MATSUFUJI S, KAMEJI T, HAYASHI S, IGARASHI K, TAMURA T, TANAKA K, ICHIHARA A. Ornithine decarboxylase is degraded by the 26 S proteasome without ubiquitination. *Nature* 1992; **360**: 597–599.
- [71] NANDI D, JIANG H, MONACO JJ. Identification of MECL-1 (LMP-10) as the third INF- γ -inducible proteasome subunit. *J Immunol* 1996; **156**: 2361–2364.
- [72] NANDI D, IYER MN, MONACO JJ. Molecular and serological analysis of polymorphisms in the murine major histocompatibility complex encoded proteasome subunits LMP-2 and LMP-7. *Exp Clin Immunogenet* 1996; **13**: 20–29.
- [73] NIEDERMANN G, KING G, BUTZ S, BIRSNER U, GRIMM R, SHABANOWITZ J, HUNTD, EICHMANN K. The proteolytic fragments generated by vertebrate proteasomes: structural relationships to major histocompatibility complex class I binding peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 8572–8577.
- [74] NIEDERMANN G, BUTZ S, INHLENFELDT HG, GRIMM R, LUCCHIARL M, HOSCHUTZKY H, JUNG G, MAIER B, EICHMANN K. Contribution of proteasome-mediated proteolysis to the hierarchy of epitopes presented by major histocompatibility complex class I molecules. *Immunity* 1995; **2**: 289–299.
- [75] NIKAIDO T, SHIMADA K, SHIBATA M. ET AL Cloning and nucleotide sequence of cDNA for Ki antigen, a highly conserved nuclear protein detected with sera from patients with systemic lupus erthematosus. *Clin Exp Immunol* 1990; **79**: 209–214.
- [76] NONAKA M, NAMIKAWA-YAMADA C, SASAKI M, SALTER-CID L, FLAJNIK MF. Evolution of proteasome subunits δ and LMP2. Complementary DNA cloning and linkage analysis with MHC in lower vertebrates. *J Immunol* 1995; **159**: 734–740.
- [77] OSSENDORP F, EGGERS M, NEISIG A, RUPPERT T, GROETTRUP M, SIJTS A, MENGEDE E, KLOETZEL PM, NEEFJES J, KOSZINOWSKI U, MELLIEF C. A single residue exchange within a viral CTL epitope alters proteasome-mediated degradation resulting in lack of antigen presentation. *Immunity* 1996; **5**: 115–124.
- [78] OSTROWSKA H, WOJCIK C, OMURA S, WOROWSKI K. Lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome, inhibits human platelet lysosomal cathepsin A-like enzyme. *Biochem Biophys Res Comm* 1997; **234**: 729–732.
- [79] PARHAM P. Transporters of delight. *Nature* 1990; **348**: 674–676.
- [80] PIETERS J. MHC class II restricted antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 1997; **9**: 89–96.
- [81] POSKIR, FLATOB, VINJEO, MAKSYMOWYCH W, FORREO, THORSBYE. Association to HLA-DRB1*08, HLA-DPB*0301 and homozygosity for an HLA-linked proteasome gene in juvenile ankylosing spondylitis. *Hum Immunol* 1995; **44**: 88–96.
- [82] PRYHUBER KG, MURRAY KJ, DONNELLY P, PASSO MH, MAKSYMOWYCH WP, GLASS DN, GIANNINI EH, COLBERT RA. Polymorphism in the LMP2 gene influences disease susceptibility and severity in HLA-B27 associated juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1996; **23**: 747–752.
- [83] RAMMENSEE HG, FRIEDE T, STEFANOVIC S. MHC ligands and peptide motifs: First listing. *Immunogenetics* 1995; **41**: 178–228.
- [84] REALINI C, DUBIEL W, PRATT G, FERRELL K, RECHSTEINER M. Molecular cloning and expression of a γ -interferon inducible activator of the multicatalytic protease. *J Biol Chem* 1994; **269**: 20727–20732.
- [85] RECHSTEINER M, HOFFMAN L, DUBIEL W. The multicatalytic and 26S proteases. *J Biol Chem* 1993; **268**: 6065–6068.

- [86] ROCK KL, GRAMM C, ROTHSTEIN L, CLARK K, STEIN R, DICK L, HWANG D, GOLDBERG AL. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 1994; **78**: 761–771.
- [87] ROLFE M, CHIU MI, PAGANO M. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway as a therapeutic area. *J Molec Med* 1997; **75**: 5–17.
- [88] ROTEM-YEHUDAR R, GROETTRUP M, SOZA A, KLOETZEL PM, EHRlich R. LMP-associated proteolytic activities and TAP-dependent peptide transport for class I MHC molecules are suppressed in cell lines transformed by the highly oncogenic adenovirus 12. *J Exp Med* 1996; **183**: 499–514.
- [89] SCHMIDTKE G, SCHMIDT M, KLOETZEL PM. Maturation of mammalian 20 S proteasome: purification and characterization of 13 S and 16 S proteasome precursor complexes. *J Molec Biol* 1997; **268**: 95–106.
- [90] SIBILLE C, GOULD KG, WILLARD-GALLO K, THOMSON S, RIVETT AJ, POWIS S, BUTCHER GW, BAETSELIER PD. LMP2+ proteasomes are required for the presentation of specific antigens to cytotoxic T lymphocytes. *Curr Biol* 1995; **5**: 923–930.
- [91] SIJTS AJAM, VILLANUEVA MS, PAMER EG. CTL epitope generation is tightly linked to cellular proteolysis of a *Listeria monocytogenes* antigen. *J Immunol* 1996; **156**: 1497–1503.
- [92] SONG X, MOTT JD, VON KAMPEN J, PRAMANIK B, TANAKA K, SLAUGHTER CA, DEMARTINO GN. A model for the quaternary structure of the proteasome activator PA28. *J Biol Chem* 1996; **271**: 26410–26417.
- [93] SRIVASTAVA PK, UDONO H, BLACHERE NE, LI Z. Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming. *Immunogenetics* 1994; **39**: 93–98.
- [94] STOHWASSER R, KLOETZEL PM. Cytokine induced changes in proteasome subunit composition are concentration dependent. *Biol Chem* 1996; **377**: 571–577.
- [95] STOHWASSER R, KUCKELKORN U, KRAFT R, KOSTKA S, KLOETZEL PM. 20 S proteasome from LMP2 knock out mice reveals altered proteolytic activities and cleavage site preferences. *FEBS Lett* 1996; **383**: 109–113.
- [96] STOHWASSER R, STANDERA S, PETERS I, KLOETZEL PM, GROETTRUP M. Molecular cloning of the mouse proteasome subunits MC14 and MECL-1: reciprocally regulated tissue expression of interferon- γ -modulated proteasome subunits. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 1182–1187.
- [97] SVENSSON K, LEVY F, SUNDBERG U, BOMAN HG. Proteasomes generate *in vitro* a natural peptide of influenza-A nucleoprotein functional in HLA-B27 antigen assembly. *Int J Immunol* 1996; **8**: 467–478.
- [98] TANAHASHI N, YOKOTA KY, AHN JY, CHUNG CH, FUJIWARA T, TAKAHASHI EI, DEMARTINO GN, SLAUGHTER CA, TOYONAGA T, YAMAMURA KI, SHIMBARA N, TANAKA K. Molecular properties of the proteasome activator PA28 family proteins and γ -interferon regulation. *Genes Cells* 1997; **2**: 195–211.
- [99] TANAKA K. Role of proteasomes modified by γ interferon in antigen processing. *J Leukocyte Biol* 1994; **56**: 571–575.
- [100] TANAKA K, TANAHASHI N, TSURUMI C, YOKOTA KY, SHIMBARA N. Proteasomes and antigen processing. *Adv Immunol* 1997; **64**: 1–38.
- [101] TOJO T, KABURAKI J, HAYAKAWA M, OKAMOTO T, TOMII M, HOMMA M. Precipitating antibody to a soluble nuclear antigen Ki with specificity for systemic lupus erythematosus. *Ryumachi* 1981; **21 (Suppl)**: 129–134.
- [102] TOKUNAGA F, GOTO T, KOIDE T, MURAKAMI Y, HAYASHI S, TAMURA T, TANAKA K, ICHIHARA A. ATP- and antizyme-dependent endoproteolysis of ornithine decarboxylase to oligopeptides by the 26 S proteasome. *J Biol Chem* 1994; **269**: 17382–17385.
- [103] TOWNSEND A, TROWSDALE J. Transporter associated with antigen processing. *Sem Cell Biol* 1993; **4**: 53–61.

- [104] TOWNSEND A, BASTIN J, GOULD K, BROWNLEE G, ANDREW M, COUPAR B, BOYLE D, CHAN S, SNITH G. Defective presentation to class I-restricted cytotoxic T lymphocytes in vaccinia-infected cells is overcome by enhanced degradation of antigen. *J Exp Med* 1988; **168**: 1211–1224.
- [105] TRAENCKNER EBM, WILK S, BAUERLE PA. A proteasome inhibitor prevents activation of NF κ B and stabilizes a newly phosphorylated form of I κ B β that is still bound to NF κ B. *EMBO J* 1994; **13**: 5433–5441.
- [106] UEBEL S, KRAAS W, KIENLE S, WIESMULLER KH, JUNG G, TAMPER R. Recognition principle of the TAP transporter disclosed by combinatorial peptide libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 8976–8981.
- [107] USTRELL V, PRATT G, RECHSTEINER M. Effects of interferon gamma and major histocompatibility complex-encoded subunits on peptidase activities of human multicatalytic proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 584–588.
- [108] VAN KAER L, ASHTON-RICHARDT PG, EICHELBERGER M, GACZYNSKA M, NAGASHIMA K, ROCK KL, GOLDBERG AL, DOHERTY PC, TONEGAWA S. Altered peptidase and viral-specific T cell response in LMP2 mutant mice. *Immunity* 1994; **1**: 533–541.
- [109] VINITSKY A, ANTON LC, SNYDER HL, ORLOWSKI M, BENNINK JR, YEWEDELL JW. The generation of MHC class I-associated peptides is only partially inhibited by proteasome inhibitors. *J Immunol* 1997; **159**: 554–564.
- [110] WEISSMAN AM. Regulating protein degradation by ubiquitination. *Immunology Today* 1997; **18**: 189–197.
- [111] WILK S, FIGUEIREDO-PEREIRA M. Synthetic inhibitors of the multicatalytic proteinase complex (proteasome). *Enzyme Protein* 1993; **47**: 306–313.
- [112] WILK S, CHEN WE. Synthetic peptide-based activators of the proteasome. *Mol Biol Reports* 1997; **24**: 119–124.
- [113] WÓJCIK C. Proteasomy i szlak degradacji białek zależny od ubikwityny. *Post Biol Kom* 1995; **22**: 295–315.
- [114] WÓJCIK C, STOKŁOSA T, GIERMASZ A, GOŁĄB J, ZAGOŹDŻON R, KAWIAK J, WILK S, KOMAR A, KACA A, MALEJCZYK J, JAKÓBISIAK M. Apoptosis induced in L1210 leukemia cells by an inhibitor of the chymotrypsin-like activity of the proteasome. *Apoptosis* 1997; **2**: in press.
- [115] WÓJCIK C. Mechanizmy regulacji cyklu komórkowego. *Post Biol Kom* 1993; **20**: 331–352.
- [116] WÓJCIK C. Inhibitory kinaz zależnych od cyklin – nowe geny przeciwnowotworowe. *Post Biol Kom* 1995; **21**: 243–248.
- [117] WÓJCIK C, STOEHR M, SCHROETER D, WILK S, PAWELETZ N. An inhibitor of the chymotrypsin-like activity of the multicatalytic proteinase complex (20 S proteasome) induces arrest in G2-phase and metaphase in HeLa cells. *Eur J Cell Biol* 1996; **70**: 172–178.
- [118] WÓJCIK C, PAWELETZ N, SCHROETER D. Localization of proteasomal antigens during different phases of the cell cycle in HeLa cells. *Eur J Cell Biol* 1995; **68**: 191–198.
- [119] YANG Y, FRGH K, AHN K, PETERSON PA. *In vivo* assembly of the proteasomal complexes, implications for antigen processing. *J Biol Chem* 1995; **270**: 27687–27694.
- [120] YANG Y, WATERS JB, FRUH K, PETERSON PA. Proteasomes are regulated by interferon- γ . Implications for antigen processing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 4928–4932.
- [121] YEWEDELL J, LAPHAM C, BACIK I, SPIES T, BENNINK J. MHC-encoded proteasome subunits LMP2 and LMP7 are not required for efficient antigen presentation. *J Immunol* 1994; **152**: 1163–1167.
- [122] YORK IA, ROCK KL. Antigen processing and presentation by class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 1996; **14**: 369–397.
- [123] YOSHIMURA T, KAMEYAMA K, TAKAGI T, IKAI A, TOKUNAGA F, KOIDE T, TANAHASHI N, TAMURA T, CEJKA Z, BAUMEISTER W et al. Molecular characterization of the '26S' proteasome complex from rat liver. *J Struct Biol* 1993; **111**: 200–211.

- [124] ZHOU X, MOMBURG F, LIU T, ABDEI-MOTAL UM, JONDAL M, HAMMERLING GJ, LJUNGGREN HG. Presentation of viral antigens restricted by H-2Kb, Db or Kd in proteasome subunit LMP2- and LMP7-deficient cells. *Eur J Immunol* 1994; **24**: 1863–1868.

Redaktor prowadzący – M. Zabel

Otrzymano: 17.10.1997 r.

Przyjęto: 05.12.1997 r.

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

JAK MIERZYĆ, ABY MIERZYĆ DOBRZE ZASADY STEREOLOGICZNE W BADANIACH MORFOMETRYCZNYCH*

HOW TO MEASURE CORRECTLY. BASIC STEREOLOGY IN MORPHOLOGICAL EXPERIMENTS

Jerzy DZIEWIĄTKOWSKI, Przemysław KOWIAŃSKI, Janusz MORYŚ

Zakład Anatomii i Neurobiologii, Katedra Anatomii, Akademia Medyczna, Gdańsk

Streszczenie: Konieczność ustalenia biologicznych prawidłowości, oraz zrozumienia patomechanizmów zaburzeń chorobowych wymógł zastosowanie coraz dokładniejszych badań ilościowych zjawisk biologicznych. Badania morfometryczne, szczególnie w ośrodkowym układzie nerwowym, dzięki wprowadzeniu metod gwarantujących otrzymanie prawidłowych wyników z niewielkim, znanym i akceptowalnym błędem dają podstawę do lepszego poznania budowy i funkcjonowania tej struktury. Niniejsze opracowanie stanowi krótki przegląd niektórych metod stereologicznych, które powinny być zastosowane do badań morfologicznych.

Słowa kluczowe: stereologia, morfometria, metody

Abstract: Since 1984 new stereological techniques have been widely used for measuring and counting objects, especially in central nervous system. New quantitative studies consist of design-based approach, uniform (systematic) random sampling, unbiased measure in reality (3-D space), and estimation of the coefficient of error. The aim of the new stereological design is to obtain the enough amount of unbiased information at a given effort. Methods of counting the object's, and measuring of their volume include: fractionator, optical disector and Cavalieri's estimation of the objects volume. Using of above mentioned methods can give an unbiased, comparable results independent on the researchers' group. This work is designed for those who want to obtain in easy way true results by means of modern stereological techniques.

Key words: stereology, morphometry, methods

*Praca finansowana w ramach funduszy statutowych ST-11

Zastosowanie analizy ilościowej w nowoczesnych metodach badawczych nakłada obowiązek wprowadzenia określonych zasad, które pozwalają na otrzymanie wyników obciążonych jak najmniejszym błędem. Zasady te obowiązują na wszystkich etapach pracy badawczej – począwszy od postawienia celu pracy, właściwego zaplanowania eksperymentu, wykonania badań pilotowych, oceny błędów uzyskanych wyników, przeprowadzenia eksperymentu oraz analizę wyników i wyciągnięcie wniosków. Przeprowadzając badania ilościowe musimy pamiętać, że celem jest uzyskanie wyniku opisującego obiekt (narząd) przestrzenny, trójwymiarowy, podczas gdy wykorzystujemy jedynie dwuwymiarowe próbki badanego narządu (np. preparaty histologiczne, obrazy otrzymane z tomografii komputerowej lub magnetycznego rezonansu jądrowego). Przekształcenie danych ilościowych opartych na dwuwymiarowym obrazie w rzeczywiste dane opisujące badany obiekt trójwymiarowy jest przedmiotem dziedziny badawczej określanej jako stereologia. W piśmiennictwie polskim brak jest podręczników opisujących teoretyczne założenia, jak i praktyczne użycie nowoczesnych metod stereologicznych. Użycie ich, w świetle wytycznych dla autorów zamieszczanych przez renomowane periodyki, stało się koniecznością [2, 11].

Planując eksperyment powinniśmy wziąć pod uwagę dwa podstawowe założenia: osiągnięcie jak najmniejszego błędu wyniku oraz zmniejszenie pracochłonności zastosowanej metody. Na błąd estymacji (oceny), jaki możemy popełnić, składa się: błąd wynikający z precyzji pomiaru (zależny od dokładności urządzenia, jakie stosujemy) oraz błąd związany z samą metodą badawczą (sposobem pomiaru). Estymacja wartości średniej na podstawie nawet nieskończenie wielkiej próby estymatorem obciążonym nieznanym dla nas błędem doprowadzi do nieprawidłowego wyniku, podczas gdy metoda oparta na znacznie mniejszej próbie, ale obciążona znanym i możliwym do określenia błędem przybliży nas do rzeczywistego wyniku, a wyliczalny błąd tego przybliżenia osiągnąć może wartości mniejsze od 5%.

Jest rzeczą oczywistą, że nie jest możliwe zbadanie całych struktur. Zmusza nas to do zastosowania próbkowania, które powinno być przeprowadzone we właściwy sposób. Podstawowym warunkiem, który powinien być spełniony przy wybieraniu próbki z przestrzeni trójwymiarowej, jest, aby każdy element badanej struktury, zawierający interesujące nas obiekty, miał jednakowe szanse na stanie się elementem próby. Aby to osiągnąć, możemy zastosować dwa sposoby próbkowania – podwójne losowe (ang. *random random sampling*) i systematycznie losowe (ang. *systematic random sampling*) [2; 6]. W badaniach biologicznych bardziej korzystnym sposobem próbkowania ze względu na fakt osiągnięcia stosunkowo niewielkiej wariancji [16, 18] jest systematycznie losowe próbkowanie. Jego istotą jest stwierdzenie, że próbę naszą stanowiąc będzie ustalona część populacji ($1/m$). Z tabeli liczb losowych wybieramy dowolną liczbę r w zakresie od 1 do

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

RYSUNEK 1. Systematyczne losowe próbkowanie

m , a następnie rozpoczynając od elementu r odrzucamy kolejne m elementów, tak że osiągamy próbkę składającą się z elementów: r , $r + m$, $r + 2m$,

Zasadę próbkowania systematycznie losowego wyjaśnia poniższy przykład (rys. 1). Aby wybrać szóstą część populacji ($1/m$) składającej się z 20 elementów, wybieramy losowo (najlepiej z tablicy liczb losowych) taką liczbę r , aby była ona mniejsza od 6 (m), na przykład 4 (jest to nasz pierwszy element) i wybieramy kolejne elementy: $4+6$, $4+12$.

Powyższą zasadę próbkowania systematycznie losowego możemy stosować na każdym szczeblu próbkowania począwszy od wybrania bloków tkankowych, przez wybór skrawków histologicznych, a skończywszy na doborze pól testowych. Otrzymujemy hierarchiczny układ próbek (wybranie określonej próbki z wyższego poziomu próbkowania niejako determinuje wybór z poziomu niższego). Zastosowany jednak sposób próbkowania, przez zależność kolejnych elementów próby od wyboru pierwszego elementu, wymaga od nas modyfikacji wzoru na obliczenie błędu szacowania wartości średniej. Wartość średnia danego parametru, jaką otrzymujemy z próby losowej, obciążona jest ściśle określonym błędem. Aby ocenić jego wielkość, należy posłużyć się tzw. współczynnikiem błędu (CE; ang. *coefficient of error*) określającego „dokładność” wyznaczenia wartości średniej. Dla niezależnych od siebie obserwacji (próbkowanie podwójnie losowe ang. *random random sampling*), kiedy pobranie kolejnego elementu próby **nie zależy** w żaden sposób od pobrania poprzedniego lub kiedy mamy do czynienia tylko z jednym próbkowaniem, współczynnik błędu oblicza się w następujący sposób [5]:

$$(1) \quad CE = \frac{CV}{\sqrt{n}} = \frac{\frac{SD}{\bar{x}}}{\sqrt{n}} = \frac{SD}{\bar{x} \cdot \sqrt{n}} = \frac{SE}{\bar{x}}$$

gdzie: SD – odchylenie standardowe z próby, SE – błąd standardowy średniej, CV – współczynnik zmienności, \bar{x} – średnia z próby, n – liczebność próby.

Przy takim sposobie próbkowania wariancja (kwadrat odchylenia standardowego) będąca miarą rozproszenia wartości wokół wartości średniej zależy jedynie od liczebności próby.

Dla próbkowania systematycznie losowego (ang. *systematic random sampling*),

kiedy pobranie kolejnego elementu próby na kolejnym poziomie próbkowania **zależy** od pobrania poprzedniego (wybranie skrawków histologicznych z uprzednio wybranych „plastrów”) sposób obliczenia wariancji, jak również i współczynnika błędu jest nieco bardziej skomplikowany. Należy się tu posłużyć uogólnionym wzorem zaproponowanym przez Gundersena i Osterby’ego [7]:

$$(2) OS_j^2 = S_j^2 + \frac{1}{n_{j-1}} OS_{j-1}^2$$

gdzie: OS_j^2 – obserwowana wariancja na j -tym poziomie próbkowania, S_j^2 – rzeczywista wariancja biologiczna (określająca zmienność biologiczną) na j -tym poziomie próbkowania, OS_{j-1}^2 – obserwowana wariancja na $j-1$ poziomie próbkowania (poprzednim).

Biorąc pod uwagę indywidualne wyniki należy więc tak przeprowadzać badanie, aby wyliczalny współczynnik błędu estymacji parametru w indywidualnym przypadku (CE_{j-1}^2) był minimalny [16], gdyż wtedy tzw. średni błąd estymacji

($\frac{1}{n_{j-1}} CE_{j-1}^2$) będzie również najmniejszy. Składnik ten nie powinien osiągnąć połowy

wartości obserwowanego współczynnika błędu CE_j^2 [17]. Pozwoli to bowiem na osiągnięcie sytuacji, w której znaczną część obserwowanej wariancji (współczynnika błędu) stanowić będzie rzeczywista wariancja biologiczna. Ma to podstawowe znaczenie dla stwierdzenia istotności różnicy między badanymi grupami. Dla struktur, które badane są po raz pierwszy i co do których nie znamy biologicznej zmienności badanego parametru ($S^2 = ?$), zaplanowanie próbkowania zależne jest jedynie od OS_j^2 .

Celem naszym jest w związku z tym takie postępowanie, by wartość ta była jak najmniejsza. Konsekwentne zastosowanie hierarchicznego sposobu próbkowania w eksperymentach stereologicznych (począwszy od całego narządu, skończywszy na przekrojach) doprowadza nas do następującego określenia składowych wpływających na wielkość obserwowanej wariancji OS^2 opisaney zmodyfikowanym wzorem matematycznym podanym przez Gundersena i Osterby’ego [7], wynikającym z zastosowania tzw. próbkowania zagnieżdżonego [12]:

$$(3) OS_{\text{przypadek}}^2 = S_{\text{przypadek}}^2 + \frac{OS_{\text{bloki}}^2}{n_{\text{bloki}}} + \frac{OS_{\text{przekroje}}^2}{n_{\text{bloki}} n_{\text{przekroje}}} + \frac{OS_{\text{polat.}}^2 + OS_{\text{pomiar}}^2}{n_{\text{polat.}} n_{\text{bloki}} n_{\text{przekroje}}}$$

gdzie odpowiednio n_{bloki} – liczba bloków tkankowych przypadających na jeden przypadek, $n_{\text{przekroje}}$ – liczba przekrojów histologicznych przypadająca na 1 blok, $n_{\text{polat.}}$ – liczba pól testowych przypadająca na jeden przekrój, OS_{pomiar} – wariancja pojedynczego pomiaru.

Z porównania mianowników kolejnych ułamków występujących w powyższym równaniu wynika, że wariancje (lub kwadraty współczynników błędu) na kolejnych poziomach próbkowania mają coraz mniejszy wpływ na obserwowaną wariancję (współczynnik błędu) między przypadkami. W największym stopniu ma na nią wpływ wariancja biologiczna występująca w populacji, która w miarach względnych stanowi około 70% obserwowanej wariancji; w znacznie mniejszym stopniu wariancja między blokami tkankowymi [20%], kolejno między przekrojami histologicznymi [8%], a w najmniejszym stopniu między polami testowymi (2%) [7]. Oznacza to, że zastosowanie dokładniejszej metody pomiarowej (czyniące doświadczenie znacznie bardziej pracochłonnym – np. przez mierzenie większej liczby komórek na pojedynczym skrawku) może „poprawić” wynik (zmniejszyć wariancję) jedynie o 1–2%. W związku z tym właściwe zaplanowanie eksperymentu powinno być oparte na zasadzie „zróbmy więcej, ale mniej dokładnie”. Problem ten szerzej opisany został przez Gundersena i Osterby’ego [7].

Planując ilościową analizę interesujących nas obiektów nie powinniśmy na początku przyjmować żadnych założeń dotyczących przestrzennego ich rozkładu czy kształtu. Na tym polega podstawowa różnica między metodami badawczymi opartymi na z góry przyjętych założeniach dotyczących charakterystyki badanych obiektów (ang. *model-based approach*, *assumption-based methods*, większość dotychczas stosowanych metod stereologicznych) a metodami polegającymi na właściwym zaplanowaniu doświadczenia (ang. *design-based approach*), dla których właściwości badanych obiektów są bez znaczenia [2].

Do połowy lat osiemdziesiątych stereologia opierała się jedynie na podejściu modelowym [8]. Za podstawę tego podejścia przyjęto założenia przedstawione przez Floedeursa [3] oraz Abercrombiego [8], które pozwalały na przekształcenie wyników uzyskanych na płaszczyźnie dwuwymiarowej, jaką jest pole testowe, na wartości charakteryzujące faktycznie narząd – przy zastosowaniu często bardzo skomplikowanych formuł matematycznych. Konwersja taka była jednak obciążona trudnym do oceny błędem wynikającym z przyjęcia określonych założeń dotyczących badanych obiektów oraz ich kształtu [1,19]. Wiązało się to z opracowaniem szeregu współczynników korekcyjnych zależnych od rodzaju tkanki, sposobu utrwalenia, właściwości badanej struktury (współczynnik kształtu mierzonego obiektu), czy też rozkładu wielkości obiektów [15]. Utrudniało to w zasadniczy sposób przeprowadzanie obliczeń i, co najważniejsze, opierało się na pewnych z góry przyjętych założeniach. Modelowe podejście do badań powodowało, że otrzymane wyniki obarczone były błędem, którego w żaden sposób nie można było ocenić. Zmusiło to badaczy do poszukiwania metod, które z jednej strony umożliwiłyby ocenę popełnianego błędu, a z drugiej – nie wymagały określania założeń wstępnych dotyczących właściwości badanego obiektu.

W 1984 roku opisano obiecującą metodę liczenia obiektów w przestrzeni trójwymiarowej [14] określając ją mianem metody fizycznego „podwójnego cięcia”

(ang. *di-sector*). Metoda ta polegała na policzeniu obiektów znajdujących się jedynie na wybranym skrawku histologicznym (lub w polu testowym), przez porównanie obrazu określonego przekroju z kolejnym, odległym o stałą – d . W ten sposób uzyskać można było liczbę obiektów zawartych między dwoma przekrojami. Metoda ta wymagała jednak zastosowania dosyć skomplikowanego układu dwóch mikroskopów sprzężonych ze sobą wspólnym stolikiem, który przesuwalby się równocześnie w płaszczyźnie (x, y) w obu mikroskopach.

Kolejnym krokiem naprzód było sięgnięcie po optyczne „podwójne cięcie” (ang. *optical disector*), które w chwili obecnej jest najprostszą i, jak się uważa, nieobciążoną błędem, metodą oceny liczby obiektów w przestrzeni trójwymiarowej [4;10]. Zasada estymacji jest prosta. „Optyczny nóż” tnie skrawek kolejno na „optyczne plastry”, w których badane obiekty pojawiają się i znikają w kolejnych warstwach w miarę przesuwania się ogniskowej obiektywu przy regulacji śrubą mikrometryczną (rys. 2). Pomiar polega na liczeniu obiektów, które pojawiają się w kolejnych warstwach [17]. Przy liczeniu jakichkolwiek obiektów należy posługiwać się znaną zasadą stereologiczną opartą na tym, że używając ramki do liczenia obiektów zaliczamy jedynie te, które nie mają ani jednego punktu przecięcia z liniami wykluczającymi.

Zastosowanie „optycznego plastra” dla uproszczenia nazwanego „disektorem” niesie za sobą konieczność spełnienia następujących warunków:

- posiadanie przyrządu mierzącego przesuw stolika w górę i w dół z dokładnością co najmniej 0,001 mm (ang. *microcator*);
- wyposażenie mikroskopu w obiektyw, który pod odpowiednio dużym powiększeniem (100×) przy użyciu immersji zapewni minimalną szerokość warstwy ostrej (apertura obiektywu powinna wynosić 1,4).

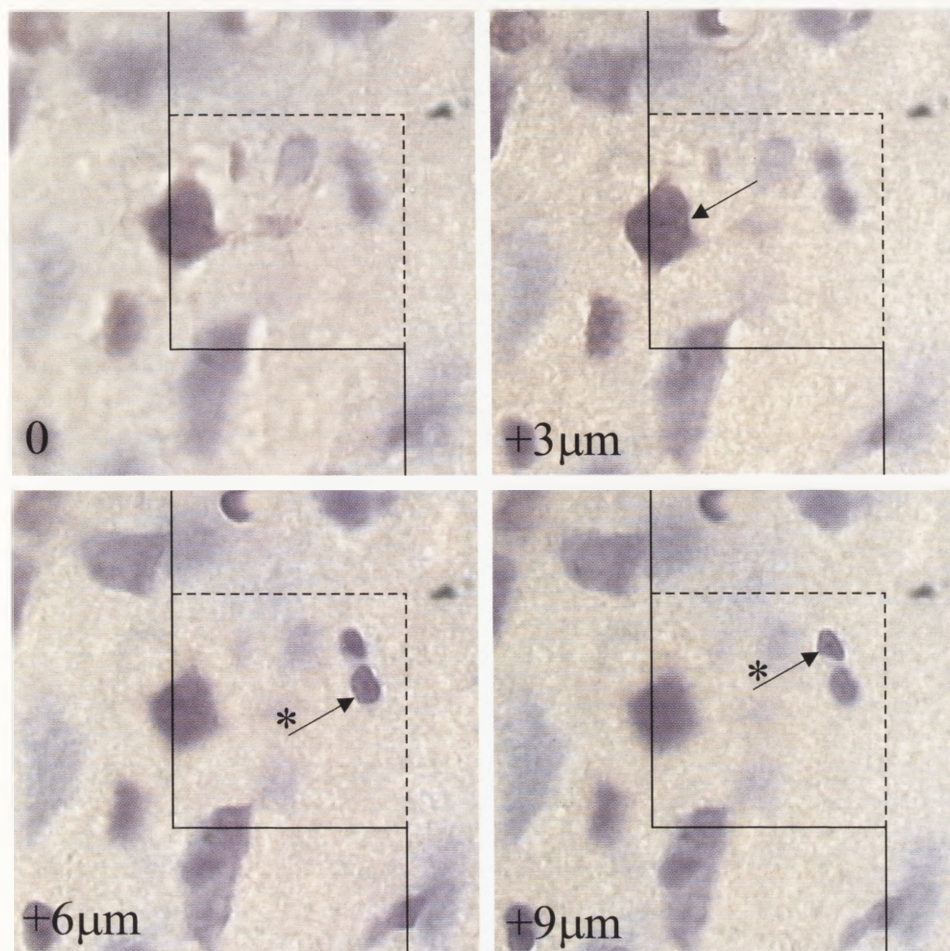
W metodzie disektorowej zliczamy rzeczywiste obiekty (a nie ich profile) bez względu na ich kształty, rozmiary i położenie w bryle o znanej objętości, która obliczona jest przy zastosowaniu wzoru:

$$(4) \quad V_T = a_T \cdot d$$

gdzie a_T – pole ramki testowej, d – przesuw stolika w płaszczyźnie pionowej (głębokość disektora)

Wprowadzenie metody disektorowej do oceny rzeczywistej liczby obiektów w jednostce objętości stworzyło podstawę do szacowania (z obliczalnym błędem) całkowitej liczby obiektów w badanej strukturze. Ponieważ ubytkom (lub przyrostom) liczby komórek towarzyszą zmiany wielkości struktury, w której się znajdują, parametr ten ma najistotniejsze znaczenie nie tylko w ocenie patologii narządu, ale i w ocenie jego rozwoju.

Istnieją zasadniczo dwa sposoby obliczenia całkowitej liczby komórek w badanej



RYSUNEK 2. Metoda disektorowa: kolejne zdjęcia otrzymano dokonując przesuwu śrubą mikrometryczną mikroskopu o $3 \mu\text{m}$ ($0 \mu\text{m}$, $+3 \mu\text{m}$, $+6 \mu\text{m}$, $+9 \mu\text{m}$); przesuw w osi pionowej mierzony był za pomocą cyfrowego urządzenia pomiarowego, kolejne obiekty pola testowego pojawiają się, a następnie znikają z ogniska ostrości (strzałki), gwiazdką oznaczono obiekty „liczone” w danym polu testowym, fiolet kryzy łowy, powiększenie mikroskopu $1000\times$, immersja

strukturze: bezpośrednia – przy użyciu tzw. frakcjonatora lub pośrednia – w wyniku zastosowania matematycznego wzoru:

$$(5) \quad N_T = V \cdot N_V$$

gdzie: N_V – gęstość numeryczna obiektów w jednostce objętości (wyznaczona np. metodą disektorową), V – objętość struktury.

FRAKCJONATOR

Aby obliczyć całkowitą liczbę obiektów w badanej strukturze, wystarczy, że policzymy je w pewnej znanej części (frakcji) badanej struktury. Jest to podstawowe założenie metody tzw. frakcjonatora [4; 18], w której całkowitą liczbę obiektów obliczamy na podstawie ich liczby w próbce i znanego, zaplanowanego wcześniej schematu próbkowania. Zaletą tej metody jest uniezależnienie się od skutków zastosowanych procedur histologicznych, a tym samym wyeliminowanie wpływu obkurczania tkanki na ostateczny wynik badania. Co więcej, nie musimy również znać objętości struktury ani grubości skrawków, na które ta struktura została pocięta. Zastosowanie tej metody wymaga jednakże dokładnej znajomości granic obszaru zawierającego badane obiekty, tak aby precyzyjnie ocenić ostatnią frakcję (pół testowych). Metoda frakcjonatora powinna być w ostatnim etapie poszerzona o metodę disektorową, aby liczba obiektów była obciążona minimalnym i dającym się wyliczyć błędem. W metodzie frakcjonatora całkowitą liczbę obiektów obliczamy według wzoru:

$$(6) \quad N = \sum N_n \cdot f_1 \cdot f_2 \cdots f_n$$

gdzie: $\sum N_n$ jest liczbą obiektów we frakcji n , a $\frac{1}{f_n}$ jest n -tą frakcją

Dla wyliczenia błędu oceny całkowitej liczby obiektów przy zastosowaniu frakcjonatora należy powtórzyć badanie na losowo wybranej innej próbce – jednak takiej, aby w jednakowy sposób próbkując dojść do frakcji objętości, w której było przeprowadzane wyjściowe badanie, oraz zastosować wzór podany przez Gundersena [4]:

$$(7) \quad CE(N) = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (Est1_i - Est2_i)^2}}{2 \sum_{i=1}^n EST_i}$$

gdzie Est_1 i Est_2 – szacowane całkowite liczby obiektów odpowiednio w pierwszym i drugim próbkowaniu u tego samego osobnika i , EST_i – końcowa całkowita liczba obiektów uzyskana z połączenia obu próbek.

Zasadę frakcjonatora wyjaśni poniższy przykład:

Przykład 1. Chcąc obliczyć liczbę komórek w pewnej strukturze wykonujemy dowolne przekroje przez tę strukturę. Załóżmy, że struktura ta pojawiła się na 12 blokach tkankowych. W pierwszym etapie próbkowania wybierzmy np. czwartą część

badanej struktury (jest to nasza pierwsza frakcja: $\frac{1}{f_1} = \frac{1}{4}$, $f_1 = 4$), wybierając w sposób losowy pierwszy blok (np. nr 2), a następne – korzystając z zasady systematycznie losowego próbkowania ($2+4=6$, $6+4=10$ blok). Każdy z tych bloków tkankowych potnijmy na skrawki układając je kolejno. Wybierzmy teraz np. pięćdziesiąt część skrawków (jest to nasza druga frakcja: $\frac{1}{f_2} = \frac{1}{50}$, $f_2 = 50$): w

sposób losowy (z tabeli liczb losowych) wybieramy pierwszy skrawek (np. 17), a kolejne według następującego schematu: ($17+50=67$, $67+50=117$, $117+50=167$). Kolejne skrawki mogą znajdować się w następnych blokach. W otrzymanej w ten sposób serii skrawków należy dokonać wyboru pól testowych, w których będą zliczone komórki. Dalsze postępowanie będzie zależało od posiadanego przez nas wyposażenia. Jeżeli dysponujemy systemem automatycznie regulującym przesuw stolika we wszystkich kierunkach, możemy dokonywać stałego przesuwu w osiach (x, y) w powiększeniu 100 \times , i w ten sposób wybierać pola testowe. Kolejna frakcja będzie ustalona w sposób następujący: dokonujemy przesunięcia np. o $x = 0,5$ mm i $y = 0,4$ mm (wielkość dużego pola testowego wynosi więc $0,2$ mm²; w siatce okularowej widzimy pole testowe o wielkości np. $0,02 \times 0,02$ mm, wobec czego będziemy liczyli komórki w polu testowym „małym” o wielkości $0,0004$ mm²; pole to będzie stanowiło $0,0004$ mm²/ $0,2$ mm² = $1/500$ część „dużego” pola testowego; a więc $1/500$ powierzchni przekrojów badanej struktury będzie zbadana (jest to nasza trzecia frakcja: $\frac{1}{f_3} = \frac{1}{500}$, $f_3 = 500$). Jeżeli nie dysponujemy systemem

automatycznie dokonującym przesuwu stolika mikroskopowego, musimy podzielić wybrane przekroje zawierające badaną strukturę na pola testowe w powiększeniu np. 10 \times (tak aby było widać granice cytoarchitektoniczne struktury). Należy teraz ustalić, jaka część pól testowych w powiększeniu 10 \times zostanie zbadana. Załóżmy, że $\frac{1}{5} \left(\frac{1}{f_{3'}} = \frac{1}{5}, f_{3'} = 5 \right)$. Wybieramy losowo pierwsze pole i następne (co piąte)

według znanego już schematu. Następnie, zakładając, że w jednym polu testowym w powiększeniu 10 \times dokonamy jednego wejścia „małym” polem testowym w powiększeniu 100 \times obliczymy stosunek pól testowych „dużego” i „małego”. Niech wielkość dużego pola testowego w siatce okularowej wynosi $0,2 \times 0,2$ mm = $0,04$ mm²; a wielkość „małego” pola testowego $0,0004$ mm², pole to będzie stanowiło $0,0004$ mm²/ $0,04$ mm² = $4/400 = 1/100$ część „dużego” pola testowego. Jest to nasza kolejna zbadana frakcja $\left(\frac{1}{f_{3''}} = \frac{1}{100}, f_{3''} = 100 \right)$. Pozostała jeszcze do usta-

lenia czwarta, ostatnia frakcja. Ponieważ liczenia komórek dokonujemy metodą disektorową, a więc w „objętości testowej”, wobec czego konieczne jest jeszcze ustalenie, przy danej grubości preparatu (np. 50 μ m), głębokości disektora. Należy założyć, czy zbadamy $1/2$, $1/3$, $1/4$ czy dowolnie inną część grubości preparatu. Przyjmując głębokość disektora, np. 10 μ m, zbadamy $1/5$ grubości skrawka (jest

to nasza czwarta frakcja: $\frac{1}{f_4} = \frac{1}{5}$, $f_4 = 5$). Wiedząc, w jakiej części badanego jądra liczone będą komórki, możemy przystąpić do liczenia komórek w kolejnych disektorach. Obliczmy następnie sumę wszystkich komórek w zbadanych przez nas disektorach. Niech wynosi ona 100 ($\sum N_4 = 100$). Całkowita liczba komórek w badanej strukturze będzie więc równa:

$$N = \sum N_4 \cdot f_1 \cdot f_2 \cdot f_3 \cdot f_4$$

$$N = 100 \cdot 4 \cdot 50 \cdot 500 \cdot 5 = 5\,000\,000$$

lub też

$$N = \sum N_4 \cdot f_1 \cdot f_2 \cdot f_3' \cdot f_3'' \cdot f_4$$

$$N = 100 \cdot 4 \cdot 50 \cdot 500 \cdot 5 = 5\,000\,000$$

WYZNACZANIE OBJĘTOŚCI STRUKTURY WEDŁUG REGUŁY CAVALIERIEGO

W celu obliczenia całkowitej liczby obiektów w badanej strukturze metodą pośrednią (przy zastosowaniu matematycznego wzoru) musimy w pierwszym etapie ocenić objętość struktury. Do obliczenia objętości struktury należy zastosować tzw. wzór Cavalieriego [6, 9]

$$(8) \quad V = t \cdot \sum_1^n A_i$$

gdzie: V – objętość struktury, t – odległość między przekrojami, A_i – pole przekroju struktury na i -tym skrawku.

Przy zastosowaniu siatki punktowej do pomiaru pola struktury w miejsce A_i podstawiamy:

$$(9) \quad A_i = A_p \cdot P_i$$

gdzie: A_p – pole przypadające na jeden punkt siatki, P_i – liczba punktów siatki na i -tym przekroju

Aby jednak zastosować powyższy wzór, należy [9]:

- pokroić badany obiekt na równoległe skrawki jednakowej grubości, a następnie w sposób systematycznie losowy dokonać wyboru kolejnych skrawków,

- obliczyć pole każdego przekroju używając zwykłej siatki z punktami lub tablitu magnetycznego.

Dla obliczonej w ten sposób objętości struktury z łatwością można ocenić błąd przeprowadzonego pomiaru przy zastosowaniu następującego wzoru [6]:

$$(10) CE = \frac{\sqrt{3 \sum_{i=1}^n (A_i \cdot A_i) - 4 \sum_{i=1}^{n-1} (A_i \cdot A_{i+1}) + \sum_{i=1}^{n-2} (A_i \cdot A_{i+2})}}{\sqrt{12} \sum_{i=1}^n A_i}$$

gdzie: A_i – pole przekroju struktury na i -tym poziomie wyznaczone metodą punktową lub przy pomocy tablitu magnetycznego.

W rzeczywistości, przy stosowaniu siatki punktowej do oceny pola przekroju struktury, powinno się zastosować zmodyfikowany wzór uwzględniający kształt przekroju bryły oraz rodzaj zastosowanej siatki [6].

Przykład 2. Zastosowanie wzorów do obliczenia współczynnika błędu przy metodzie Cavalieriego

Powróćmy do naszej badanej struktury, której objętość chcemy obliczyć. Załóżmy, że podzieliliśmy strukturę na plastry o grubości 0,5 cm. Poszukajmy w nich badanego fragmentu; załóżmy, że wystąpił on na 10 plastrach. W pierwszym etapie, wybierzmy co drugi plaster (odległość między nimi wynosi więc 1,0 cm). Pola przekrojów kolejnych plastrów (A_i) zamieszcza tabela 1. Suma pól przekrojów wynosi 19 cm. Przyjmując odległość między plastrami za 1,0 cm objętość badanego fragmentu struktury wynosi

$$V = 19 \text{ cm}^2 \times 1,0 \text{ cm} = 19 \text{ cm}^3$$

Tabela 1 przedstawia sposób wyliczenia odpowiednich składników wzoru na obliczenie błędu (tab. 1).

$$CE = \frac{\sqrt{3 \cdot 85 - 4 \cdot 66 + 46}}{\sqrt{12} \cdot 19} = 0,092$$

Otrzymaliśmy wynik $CE=9,2\%$. Oznacza to, że w ocenie objętości tego fragmentu struktury, postępując się jedynie 5 przekrojami, popełniliśmy 9% błąd. Zadaniem naszym, będzie takie zwiększenie próby (liczby plastrów), aby błąd ten nie był większy od 5%.

Weźmy więc wszystkie dostępne plastry (jest ich 10). Zauważmy, że objętość badanego jądra wynosi:

$$V = 37 \text{ cm}^2 \cdot 0,5 \text{ cm} = 18,5 \text{ cm}^3, \text{ a więc różnica w stosunku do poprzedniego wyniku jest niewielka. W analogiczny sposób obliczmy błąd oceny objętości (tab. 2):}$$

$$CE = \frac{\sqrt{3 \cdot 161 - 4 \cdot 150 + 130}}{\sqrt{12} \cdot 37} = 0,028$$

Zwróćmy jednak uwagę, jak bardzo uległ zmniejszeniu popełniany błąd. Wynosi on przy zastosowaniu 2 x większej liczby plastrów jedynie 2,8%:

TABELA 1. Obliczenia cząstkowe pomocne dla wyznaczenia objętości struktury i błędu jej oszacowania [do wzoru (10)]

N	A_i	$A_i * A_i$	$A_i * A_{i+1}$	$A_i * A_{i+2}$
1	2	4	12	8
2	6	36	24	30
3	4	16	20	8
4	5	25	10	
5	2	4		
Suma	=19	=85	=66	=46

TABELA 2. Obliczenia cząstkowe pomocne dla wyznaczenia objętości struktury i błędu jej oszacowania [do wzoru (10)]

N	A_i	$A_i * A_i$	$A_i * A_{i+1}$	$A_i * A_{i+2}$
1	1	1	2	4
2	2	4	8	12
3	4	16	24	20
4	6	36	30	24
5	5	25	20	25
6	4	16	20	20
7	5	25	25	15
8	5	25	15	10
9	3	9	6	
10	2	4		
Suma	=37	=161	=150	=130

Wykonując badanie pilotowe na początku eksperymentu, widzimy więc, że użycie 5 plasterów daje błąd około 10%, podczas gdy podwojenie wysiłku daje błąd wynoszący niecałe 3%. W ten sposób, biorąc pod uwagę wielkość błędu, możemy w jak najbardziej ekonomiczny sposób zaprojektować nasze doświadczenie; musimy jednak pamiętać, że przy dużej wariancji biologicznej błąd 10% może być akceptowalny, podczas gdy przy niewielkiej – jest zbyt duży i należy pracować z podwójną liczbą plasterów.

WYZNACZENIE GĘSTOŚCI NUMERYCZNEJ OBIEKTÓW W JEDNOSTCE OBJĘTOŚCI

Kolejnym krokiem w celu uzyskania całkowitej liczby obiektów metodą pośrednią jest wyznaczenie gęstości numerycznej obiektów w jednostce objętości. Posługujemy się wzorem podanym przez Sterio [14].

$$(11) N_V = \frac{\frac{\sum_{i=1}^n Q_i^-}{n}}{\frac{\sum_{i=1}^n V_i}{n}} = \frac{\sum_{i=1}^n Q_i^-}{\sum_{i=1}^n a_{T_i} d_i}$$

gdzie Q_i^- – liczba obiektów policzonych przy użyciu metody optycznego cięcia w objętości

testowej V_i , a_T – wielkość pola testowego, d_i – głębokość disektora w polu testowym i .

Aby jednak liczona gęstość była wiarygodnym parametrem, muszą być spełnione następujące warunki:

- szerokość pojedynczego optycznego cięcia musi stanowić od 1/3 do 1/4 wymiaru najmniejszego obiektu badań w płaszczyźnie do niego stycznej oraz
- w disektorze, składającym się z kilku (kilkunastu) takich pojedynczych optycznych cięć, muszą znaleźć się całe obiekty, a nie ich fragmenty.

Współczynnik błędu, jaki popełniamy w ocenie gęstości numerycznej obiektów w jednostce objętości, można obliczyć według zmodyfikowanego wzoru podanego przez Gundersena [4] w sposób następujący:

$$(12) CE(N_V) = \sqrt{CE^2(\sum Q) + CE^2(\sum F) - \frac{2 \cdot \text{Cov}(\sum Q, \sum F)}{\sum Q \cdot \sum F}}$$

gdzie:

$$(12a) CE(\sum Q) = \frac{\sqrt{3 \sum_1^n Q_i Q_{i-4} + 4 \sum_1^{n-1} Q_i Q_{i+1} + \sum_1^{n-2} Q_i Q_{i+2}}}{\sqrt{12 \sum_1^n Q_i}}$$

i

$$(12b) CE(\sum F) = \frac{\sqrt{3 \sum_1^n F_i F_{i-4} + 4 \sum_1^{n-1} F_i F_{i+1} + \sum_1^{n-2} F_i F_{i+2}}}{\sqrt{12 \sum_1^n F_i}}$$

i

(12c)

$$\text{Cov}(\sum Q, \sum F) = \frac{1}{12} \cdot \left(3 \sum_{i=1}^n Q_i F_i + \sum_{i=1}^{n-2} \frac{F_i Q_{i+2} + F_{i+2} Q_i}{2} - 4 \sum_{i=1}^{n-1} \frac{F_i Q_{i+1} + F_{i+1} Q_i}{2} \right)$$

Q_i – liczba obiektów policzonych metodą disektora na skrawku i ,
 F_i – liczba disektorów na skrawku i ,

n – liczba skrawków użyta w danym przypadku.

Przykład 3. Użycie wzoru umożliwiającego obliczenie błędu oceny gęstości numerycznej w jednym przypadku wyjaśnia następujący przykład. Chcąc obliczyć gęstość znakowanych komórek w badanej strukturze w sposób systematycznie losowy wybrano 5 skrawków. Na wybranych 5 skrawkach metodą systematycznie losową wybrano 42 określonej wielkości disektory, w których w sumie znaleziono 19 znakowanych komórek.

Parametry disektora: a_{T_i} – wielkość pola testowego = 0,01 mm², d_i – głębokość disektora w polu testowym i – 0,010 mm; objętość disektora = 1×10^{-4} mm³. Podstawiając uzyskane wartości do wzoru na N_V uzyskujemy:

$$N_V = \frac{\frac{1}{5} \sum_{i=1}^5 Q_i^-}{\frac{1}{5} \sum_{i=1}^5 V_i} = \frac{\frac{1}{5} \sum_{i=1}^5 Q_i^-}{\frac{1}{5} \sum_{i=1}^5 a_{T_i} d_i} = \frac{2+6+4+5+2}{10^{-4} \cdot (10+10+5+12+5)} = \frac{19}{42 \cdot 10^{-4}} = 0,4523 \cdot 10^4 = 4523$$

W jednym milimetrze sześciennym będą więc 4523 znakowane komórki. Obliczenie popełnionego błędu jest jednak znacznie bardziej skomplikowane (tab. 3):

TABELA 3. Obliczenia cząstkowe pomocne dla wyznaczenia gęstości numerycznej obiektów w jednostce objętości oraz błędu jej oszacowania

n	F_i	Q_i	$F_i F_i$	$F_i F_{i+1}$	$F_i F_{i+2}$	$Q_i Q_i$	$Q_i Q_{i+1}$	$Q_i Q_{i+2}$	$F_i Q_i$	$F_i Q_{i+1}$	$F_{i+1} Q_i$	$F_i Q_{i+2}$	$F_{i+2} Q_i$
1	10	2	100	100	50	4	12	8	20	60	20	40	10
2	10	6	100	50	120	36	24	30	60	40	30	50	72
3	5	4	25	60	25	16	20	8	20	25	48	10	20
4	12	5	144	60		25	10		60	24	25		
5	5	2	25			4			10				
Suma	42	19	394	270	195	85	66	46	170	272		202	

$$\text{Cov}(\sum Q, \sum F) = \frac{1}{12} \cdot (3 \cdot 170 + 101 - 4 \cdot 136) = 5,5833$$

$$CE(\sum Q) = \frac{\sqrt{3 \cdot 85 - 4 \cdot 66 + 46}}{\sqrt{12} \cdot 19} = \frac{6,082}{3,464 \cdot 19} = 0,092$$

$$CE(\sum F) = \frac{\sqrt{3 \cdot 394 - 4 \cdot 270 + 195}}{\sqrt{12} \cdot 42} = \frac{17,234}{145,49} = 0,118$$

$$CE(N_V) = \sqrt{0,092^2 + 0,118^2 - 2 \frac{5,5833}{42 \cdot 19}} = \sqrt{0,0048} = 0,091$$

Otrzymaliśmy stosunkowo wysoki błąd. Aby go zmniejszyć w istotny sposób, należałoby zgodnie ze wzorem (3) wziąć do obliczeń jeszcze kilka skrawków, gdyż jedynie uzupełnienie o dodatkowe skrawki (a nie dorobienie disektorów na skrawkach już liczonych) zapewni zmniejszenie błędu.

WYZNACZANIE CAŁKOWITEJ LICZBY OBIEKTÓW METODĄ POŚREDNIĄ

W ostatnim etapie obliczenia całkowitej liczby obiektów posługujemy się matematycznym wzorem:

$$(13) \quad N_T = V \cdot N_V$$

gdzie: N_V – gęstość numeryczna obiektów w jednostce objętości, V – objętość struktury.

Popełniony błąd można obliczyć według wzoru [6, 13, 17]:

$$(14) \quad CE(N_T) = \sqrt{\sum CE^2(V) + \sum CE^2(N_V)}$$

Przykład 4. W celu obliczenia całkowitej liczby komórek znakowanych w pewnej strukturze posłużmy się podanymi wyżej przykładami. Obliczona objętość struktury wynosiła $18,5 \text{ cm}^3 = 185\,000 \text{ mm}^3$. Współczynnik błędu wyniósł 0,028. Gęstość numeryczna znakowanych komórek w jednostce objętości (1 mm^3) wynosi 4523. Współczynnik błędu = 0,092.

Wstawiając powyższe wartości do odpowiednich wzorów otrzymujemy:

$$N_T = V \cdot N_V = 185\,000 \text{ mm}^3 \cdot 4523 \text{ mm}^{-3} = 836\,755\,000$$

$$CE(N_T) = \sqrt{0,028^2 + 0,092^2} = 0,096$$

Całkowita liczba znakowanych komórek w badanej strukturze wynosi więc około 837 milionów. Błąd oceny wynosi 9,6%.

ANALIZA DANYCH OTRZYMANYCH DLA GRUPY PRZYPADKÓW

Celem naszych badań jest zwykle znalezienie wielkości parametru charakteryzującego badaną grupę (populację) dla ewentualnego porównania go z wartością otrzymaną w grupie kontrolnej. Należy przy tym pamiętać, że na wariancję (lub też współczynnik zmienności) danego parametru w badanej grupie przypadków ma wpływ nie tylko rzeczywista wariancja biologiczna (biologiczny współczynnik zmienności) badanego parametru dla grupy przypadków (najczęściej nieznaną), ale

i wariancja (lub też współczynnik błędu oceny średniej) tego parametru w indywidualnym przypadku.

Przy założeniu losowości wyboru przypadków do grupy oraz występującego rozkładu normalnego badanej populacji (próbki) można obliczyć średnią oraz współczynnik zmienności danego parametru, który po odpowiednim przekształceniu wzoru (2) będzie sumą zwykle nieznanego biologicznego współczynnika zmienności oraz średniego współczynnika błędu, którego sposób obliczenia przedstawiamy poniżej [6]:

$$(15) \overline{CE}(N) = \sqrt{\frac{1}{m} \cdot \sum_{i=1}^m CE^2(N)}$$

Po odpowiednim przekształceniu wzoru (3), otrzymamy wzór, na podstawie którego możemy obliczyć biologiczny współczynnik zmienności (SB_j^2) danego parametru [17]:

$$(16) SB_j^2 = CV_j^2 - \overline{CE}^2(N)$$

gdzie: CV_j^2 – współczynnik zmienności obliczony dla grupy przypadków, $\overline{CE}^2(N)$ – kwadrat średniego współczynnika błędu

Przykład 5. W badanych 5 przypadkach otrzymano następujące wyniki całkowitej liczby neuronów w pewnej strukturze (tab. 4):

$$SB^2 = 0,00624 - 0,00062 = 0,00562$$

$$SB = \sqrt{0,00562} = 0,075 = 7,5\%$$

Współczynnik zmienności biologicznej całkowitej liczby neuronów w badanej strukturze wynosi jedynie 7,5%.

Zastosowanie się do opisanych powyżej wskazań pozwala na uzyskanie wyników obarczonych stosunkowo małym, znanym błędem. Zaletą tych wskazań jest prostota, powtarzalność uzyskanych wyników oraz możliwość takiego zaprojektowania doświadczenia w oparciu o współczynnik błędu w badaniach pilotowych, że wysiłek i czas (a więc koszty) włożone w osiągnięcie

TABELA 4. Obliczenie średniej wartości danego parametru oraz współczynnika błędu dla badanej grupy przypadków

Przypadek	$N \cdot 10^6$	$CE(N)$	$CE^2(N)$
1	1,0	0,04	0,0016
2	1,1	0,03	0,0009
3	0,9	0,02	0,0004
4	1,05	0,01	0,0001
5	0,95	0,01	0,0001
Średnia	1,0		0,00062
SD	0,079		
CV	0,079		
CV^2	0,00624	$CV^2 - CE^2(N) = 0,00562$	

dobrego wyniku mogą być sprowadzone do rozsądnego minimum. Jediną wadą w/w metod jest stosunkowo duży koszt aparatury optycznej (mikroskopy i obiektywy). Takie podejście jednak, w chwili obecnej, wymagane jest przez większość renomowanych czasopism naukowych i umożliwia uzyskanie wiarygodnych oraz w pełni powtarzalnych wyników.

LITERATURA

- [1] CLARKE PGH. How inaccurate is the Abercrombie correction factor for cell counts? *TINS* 1992; **15**, 211–212.
- [2] COGGESHALL RE, LEKAN HA. Methods for determining numbers of cells and synapses: A case for more uniform standards of review. *J Comp Neurol* 1996; **364**, 6–15.
- [3] FLODERUS S. Untersuchungen über den Bau der menschlichen Hypophyse mit besonderer Berücksichtigung der quantitativen mikromorphologischen Verhältnisse. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl* 1944; **53**, 1 (Abstract)
- [4] GUNDERSEN HJG. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. *J Microsc* 1986; **143**, 3–45.
- [5] GUNDERSEN HJG. Stereology: the fast lane between neuroanatomy and brain function – or still only a tightrope? *Acta Neurol Scand Suppl* 1992; **137**, 8–13.
- [6] GUNDERSEN HJG, JENSEN EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 1987; **147**, 229–263.
- [7] GUNDERSEN HJG, OSTERBY R. Optimising sampling efficiency of stereological studies in biology: Or 'Do more less well!'. *J Microsc* 1981; **121**, 65–73.
- [8] HAUG H. History of neuromorphometry. *J Neurosci Meth* 1986; **18**, 1–17.
- [9] MAYHEW TM. A review of recent advances in stereology for quantifying neural structure. *J Neurocytol* 1992; **21**, 313–328.
- [10] PAKKENBERG B, GUNDERSEN HJG. Solution to old problems in the quantitation of the central nervous system. *J Neurol Sci* 1995; **129**, 65–67.
- [11] SAPER CB. Any way you cut it: A new journal policy for the use of unbiased counting methods. *J Comp Neurol* 1996; **364**, 5.
- [12] SHAY J. Economy of effort in electron microscope morphometry. *Am J Pathol* 1975; **81**, 503–511.
- [13] SIMIC G, KOSTOVIC I, WINBLAD B, BOGDANOVIC N. Volume and number of neurons of the human hippocampal formation in normal aging and Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* 1997; **379**, 482–494.
- [14] STERIO DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* 1984; **134**, 127–136.
- [15] WEIBEL ER. *Stereological methods. Vol. 1. Practical methods for biological morphometry.* London: Academic Press 1979:
- [16] WEST MJ. New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol Aging* 1993; **14**, 275–285.
- [17] WEST MJ, GUNDERSEN HJG. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J Comp Neurol* 1990; **296**, 1–22.
- [18] WEST MJ, SLOMIANKA L, GUNDERSEN HJG. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 1991; **231**, 482–497.

- [19] WILLIAMS RW, RAKIC P. Three-dimensional counting: An accurate and direct method to estimate number of cells in sectioned material. *J Comp Neurol* 1988; **278**, 344–352.

Redaktor prowadzący – M. Zabel

Otrzymano: 20.10.1997 r.

Przyjęto: 08.12.1997 r.

Adres autora: ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

JAK WIRUSY UNIKAJĄ ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ? BLOKOWANIE CZĄSTECZEK MHC KLASY I

HOW DO VIRUSES EVADE IMMUNE RESPONSE? BLOCKING OF MHC CLASS I MOLECULES

Radosław WÓJTOWICZ

Zakład Cytologii Klinicznej CMKP w Warszawie

Streszczenie: W ciągu ostatnich kilku lat badań nad wirusami otrzymano interesujące wyniki. Okazało się, że niektóre wirusy potrafią w bardzo specyficzny sposób unikać wykrycia i eliminacji przez układ immunologiczny gospodarza. W tym artykule przedstawiono zachowanie pięciu wirusów: ludzkiego wirusa cytomegalii, mysiego wirusa cytomegalii, wirusa Epsteina-Barr, adenowirusa oraz wirusa opryszczki, z których każdy wykorzystuje swoisty dla siebie mechanizm blokowania prezentacji peptydów na powierzchni komórki przez cząsteczki MHC klasy I.

Słowa kluczowe: układ immunologiczny, wirus, gospodarz, cząsteczki MHC I, limfocyt T cytotoksyczny, prezentacja peptydów, proteasom

Summary. During last few years of the studies on viruses, interesting results have been obtained. It appeared that some viruses can evade detection and elimination by host immune system in a very specific way. In this article 5 viruses have been presented: human cytomegalovirus, mouse cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, adenovirus and herpes simplex virus. Each of them uses specific mechanism blocking in a different way antigen presentation on the cell surface by MHC class I molecules.

Key words: immune system, virus, host, MHC class I molecules, cytotoxic T lymphocyte, antigen presentation, proteasome

Wykaz skrótów : **Ad** (*Adenovirus*) – adenowirus, **β_2m** – β_2 mikroglobulina (łańcuch lekki cząsteczek MHC klasy I), **CTL** (*Cytotoxic T Lymphocyte*) – limfocyt T cytotoksyczny, **EBV** (*Epstein-Barr Virus*) – wirus Epsteina-Barr, **ER** – siateczka śródplazmatyczna, **HCMV** (*Human Cytomegalovirus*) – ludzki wirus cytomegalii, **HSV** (*Herpes Simplex Virus*) – wirus opryszczki, **MCMV** (*Murine Cytomegalovirus*) – myszy wirus cytomegalii, **MHC** (*Major Histocompatibility Complex*) – główny układ zgodności tkankowej, **NK** (*Natural Killer Cells*) – komórki NK, **TAP** (*Transporter Associated with Antigen Presentation*) – kompleks transportujący peptydy związany z prezentacją antygeny

1. WSTĘP

Układ odpornościowy kręgowców składa się z dwóch układów rozpoznających nieprawidłowe komórki. Za tzw. odpowiedź humoralną odpowiedzialne są przeciwciała (immunoglobuliny), a w odpowiedzi komórkowej główną rolę pełnią receptory na powierzchni limfocytów T. Immunoglobuliny służą do rozpoznawania patogenów pozakomórkowych, ale nie są skuteczne w stosunku do patogenów wewnątrzkomórkowych, takich jak wirusy. W takiej sytuacji niezbędna jest obecność limfocytów T, które stale kontrolują powierzchnię komórek. Prawie wszystkie komórki kręgowców prezentują na swej powierzchni próbki peptydów, które są fragmentami białek obecnych w cytoplazmie, pociętych w procesie ubikwityno-zależnej proteolizy. Limfocyty T zabijają te komórki, które prezentują obce peptydy.

2. UBIKWITYNO-ZALEŻNA PROTEOLIZA CYTOSOŁOWA

Wiele procesów regulacyjnych komórki, takich jak: cykl komórkowy, prezentacja antygenów klasy I, apoptoza, czy transdukcja sygnału jest związana z modyfikacją przez ubikwitynę. W większości przypadków modyfikacje takie prowadzą do degradacji białka w proteasomie 26S. Dla wielu białek o krótkim czasie półtrwania w komórce, związanie z ubikwityną jest niezbędnym etapem w ich degradacji. W komórkach eukariotycznych ubikwityna i proteasom są głównym, zależnym od ATP układem wieloenzymatycznej proteolizy degradującym wiele białek przede wszystkim regulacyjnych.

Proteasom 26S – kompleks proteolityczny ATP-zależny o masie ok. 2 000 kDa jest zbudowany z części centralnej (proteasom 20S), która jest częścią katalityczną, oraz dwóch symetrycznych elementów terminalnych o sedymentacji 19S składających się z wielu podjednostek o masie od 25 do 110 kDa pełniących rolę regulatorową.

Proteasom 20S (rdzeń proteasomu 26S) składa się z dwóch rodzajów podjednostek α i β , a każdą z nich można podzielić na jeszcze siedem grup. Siedem podgrup typu α i β tworzą pierścienie α i β ułożone według wzoru $\alpha\beta\beta\alpha$ w formę cylindryczną.

Część regulatorową tworzą podjednostki, które podzielono na 2 grupy: podjednostki mające aktywność ATPazy (*ATPase subunits*) i podjednostki takiej właściwości nie mające (*Non-ATPase subunits*). Podjednostki ATPazowe nadają proteasomowi 26S aktywność ATPazy, która pełni zasadniczą rolę w funkcjonowaniu proteasomu – pozwala wykorzystać energię do selektywnej degradacji białek komórkowych. Podjednostki o aktywności ATPazy należą do dużej rodziny białek tzw. białek AAA (*ATPase Associated with a variety of cellular Activities*), które

charakteryzują się 200-aminokwasową domeną wiążącą ATP. Oprócz dostarczania energii do proteolizy, podjednostki ATPazowe pełnią prawdopodobnie również inne funkcje. Możliwe, że przyczyniają się do rozpoznawania białek przeznaczonych do degradacji.

Drugą grupę tworzą podjednostki nie mające aktywności ATPazy. Dotychczas sklonowano 10 takich podjednostek ludzkiego proteasomu 26S, które strukturalnie nie wiążą się z podjednostkami ATPazowymi. Każda z podjednostek nie-ATPazowych jest zaangażowana w jakąś specyficzną dla siebie reakcję. Podjednostka p31 ma prawdopodobnie udział w rozkładzie kluczowych czynników cyklu komórkowego, takich jak: cykliny i inhibitory CDC. Szybka i nieodwracalna proteoliza przeprowadzana w proteasomie 26S może mieć więc kluczową rolę w przebiegu cyklu komórkowego. P112 jest największą podjednostką proteasomu 26S. Jest homologiczna do genu *SEN3* kodującego czynnik zaangażowany w obróbkę tRNA u *S. cerevisiae*. Proteasom 26S może być zaangażowany w obróbkę RNA bezpośrednio lub za pośrednictwem degradacji specyficznych białek. Podjednostka p97 może mieć udział w przekazywaniu sygnału od TNF, a podjednostka S5a jest receptorem dla poliubikwityny uczestnicząc w rozpoznawaniu białka przeznaczonego do proteolizy w proteasomie 26S. Funkcji pozostałych podjednostek jeszcze nie poznano. Znana jest tylko ich struktura pierwszorzędowa [11].

Ubikwityna jest wysoce konserwatywnym białkiem o masie 8,6 kDa. Do cząsteczki składającej się z wielu ubikwityn zostaje przyłączone białko przez terminalną glicynę ubikwityny i lizynę białka. Proces poliubikwityzacji jest katalizowany przez 3 różne enzymy (rys. 1):

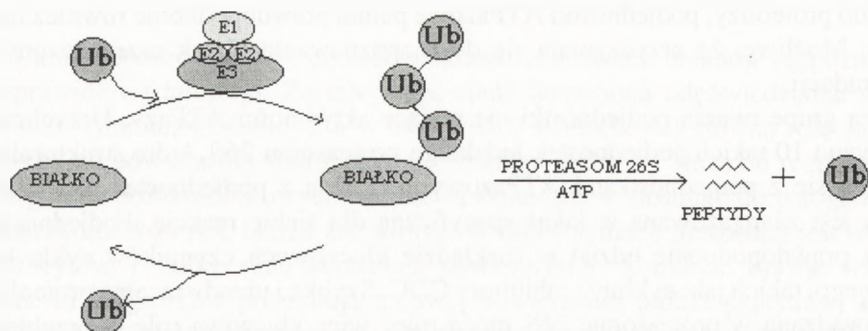
E1 – enzym aktywujący ubikwitynę. Niezbędnym krokiem w przyłączaniu białka do ubikwityny jest aktywacja wolnej grupy karboksylowej ubikwityny. W obecności ubikwityny i ATPE1 w dwuetapowej reakcji tworzy wiązania tioestrowe z ubikwityną z uwolnieniem AMP.

E2 – enzym koniugacyjny (białkowe nośniki ubikwityny). Istnieje przynajmniej 5 różnych nośników ubikwityny. Ubikwityna jest przenoszona z E1 na E2 w reakcji transestryfikacji. E2 po przejściu zaktywowanej ubikwityny przenosi ją na grupę aminową substratu białkowego.

E3 – ligaza ubikwityna-białko. Enzym ten jest bezpośrednio związany z rozpoznawaniem substratu przeznaczonego do proteolizy. E3 wiąże się z substratem i dopiero na kompleks E3-substrat może zostać przeniesiona ubikwityna z kompleksu E2-ubikwityna [7].

Oprócz proteolizy przebiegającej w proteasomach 26S ubikwityna uczestniczy w wielu innych procesach przebiegających w komórce często nie związanych z proteasomem. Przykładami tu mogą być zależna od ubikwityny endocytoza białek powierzchniowych oraz transdukcja sygnału czynnika transkrypcyjnego NFκB.

Wiele białek powierzchniowych jest szybko endocytowanych i jeśli nie wrócą one z powrotem do błony komórkowej, są przenoszone do lizosomu, gdzie są



RYSUNEK 1. Białko połączone z ubikwityną jest degradowane do peptydów w proteasomie

niszczone. Ubikwitynacja jest wykorzystywana jako sygnał dla endocytozy wielu białek błonowych. Prawdopodobnie łańcuch ubikwityny dostarcza miejsca wiążącego element maszyny odpowiedzialnej za endocytozę lub zmienia strukturę białka powierzchniowego, do którego się wiąże powodując powstanie tego miejsca w białku.

NFκB jest czynnikiem transkrypcyjnym w formie nieaktywnej zlokalizowanym w cytoplazmie w postaci heteromerów. Brak aktywności jest spowodowany albo połączeniem jednej z podjednostek NFκB do IκB, albo jedna z podjednostek NFκB występuje w postaci prekursora, który uniemożliwia przeniesienie czynnika do jądra komórkowego. Degradacja IκB, a tym samym uaktywnienie NFκB wymaga fosforylacji IκB, a fosforylacja wymaga ubikwitynacji specyficznej kinazy [5].

3. PREZENTACJA PEPTYDÓW NA POWIERZCHNI KOMÓRKI

W cytoplazmie większości komórek w sposób ciągły przebiega proces biosyntezy białka (rys. 2-1). W pewnych sytuacjach (np. po wniknięciu wirusa lub transformacji nowotworowej) proces ten może ulec zakłóceniu. W komórce pojawiają się białka, które mogą być niebezpieczne dla całego organizmu wielokomórkowego. Aby przeciwdziałać takim sytuacjom, istnieje mechanizm prezentowania peptydów powstających z białek obecnych wewnątrz komórki na jej powierzchni.

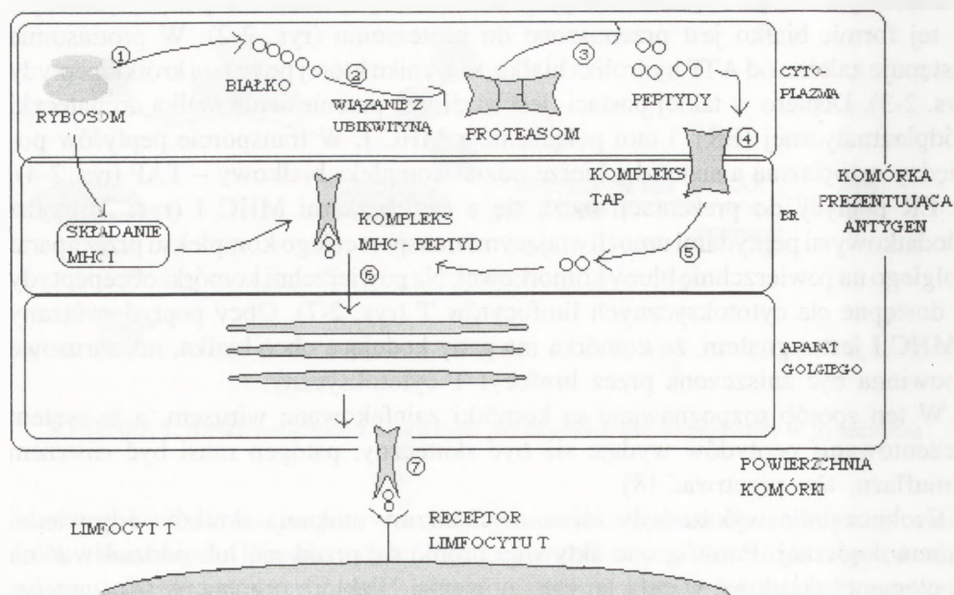
Próbki każdego białka są prezentowane na powierzchni komórki w połączeniu z cząsteczkami MHC I. Przed połączeniem z MHC I białka są cięte na fragmenty. Białko przeznaczone do proteolizy łączy się z ubikwityną. Koniec-C reszty glicyny

w ubikwitynie wiąże się kowalencyjnie z resztą lizyny łańcucha polipeptydowego. W tej formie białko jest przenoszone do proteasomu (rys. 2-2). W proteasomie następuje zależna od ATP hydroliza białka, w wyniku której powstają krótkie peptydy (rys. 2-3). Dopiero w takiej postaci jest możliwe przeniesienie białka do siateczki śródplazmatycznej (ER) i tam połączenie z MHC I. W transporcie peptydów pomiędzy cytoplazmą a siateczką bierze udział kompleks białkowy – TAP (rys. 2-4). W ER peptydy do prezentacji łączą się z cząsteczkami MHC I (rys. 2-6) oraz z dodatkowymi peptydami umożliwiającymi transport całego kompleksu przez aparat Golgiego na powierzchnię błony komórkowej. Na powierzchni komórki obce peptydy są dostępne dla cytotoksycznych limfocytów T (rys. 2-7). Obcy peptyd związany z MHC I jest sygnałem, że komórka ma geny kodujące obce białka, np. wirusowe i powinna być zniszczona przez limfocyt T cytotoksyczny.

W ten sposób rozpoznawane są komórki zainfekowane wirusem, a że system prezentowania peptydów wydaje się być skuteczny, patogen musi być mistrzem kamuflażu, aby przetrwać [8].

Drobnoustroje wykształciły różne mechanizmy unikania skutków odpowiedzi immunologicznej. Potrafią one aktywnie bronić się przed nią lub oddziaływać na jej elementy składowe w celu jej zahamowania. Niektóre organizmy (*Entamoeba*, *Trichinella*) tworzą cysty nie wrażliwe na działanie układu immunologicznego. Składniki biofilmu (bezpociągowa masa zbudowana z wielocukrów, lipidów i białek tworzona przez *Pseudomonas aeruginosa*) absorbują przeciwciała, wolne rodniki tlenowe i składniki dopełniacza. Zewnętrzna otoczka glikolipidowa prątków zapewnia im odporność na działanie enzymów proteolitycznych. Jeszcze inną metodę wykorzystują przywry *Schistosoma*. Przebywając w naczyniach krwionośnych mają one ciągły kontakt z układem immunologicznym gospodarza, są więc stale narażone na eliminację z jego strony, a mimo to potrafią przeżyć. *Schistosoma* otaczają się płaszczem złożonym z cząsteczek gospodarza, maskując tym samym własne antygeny. Sposób ten wykorzystują również niektóre paciorkowce i gronkowce. Wiele drobnoustrojów unika rozpoznania i zniszczenia przez układ immunologiczny wykorzystując zjawisko mimikry antygenowej. Polega to na tym, że patogenny drobnoustrój produkuje antygeny podobne do występujących naturalnie w organizmie gospodarza, tym samym skutecznie unika odpowiedzi immunologicznej. Zjawisko to niesie ryzyko autoimmunizacji – antygen drobnoustroju wywołuje odpowiedź immunologiczną skierowaną przeciwko antygenom gospodarza. Drobnoustroje mogą również uwalniać lub indukować w komórkach gospodarza czynniki immunosupresyjne, które działając na różne elementy układu immunologicznego hamują jego reakcję na obce antygeny [3].

W ostatnich latach, głównie za przyczyną epidemii AIDS, bardzo dynamicznie zaczęły się rozwijać badania nad wirusami. Zaowocowało to licznymi nowymi informacjami zarówno z wirusologii, jak i immunologii. Sposoby unikania odpo-



RYSUNEK 2. Schemat prezentacji na powierzchni komórki peptydów powstałych w proteosomach (objaśnienie cyfr 1-7 w tekście)

wiedzi immunologicznej przez wirusy są jednym z najciekawszych tematów z tego zakresu

Wirusy są najmniejszymi czynnikami zakaźnymi. Ich wielkość waha się od 20 do 300 nm. Wirusy są bezwzględnie pasożytami. Mogą replikować wyłącznie w obrębie żywych komórek. Komórka gospodarza musi dostarczyć energię, mechanizmy oraz małowzrostkowe prekursorów do syntezy wirusowych białek i kwasów nukleinowych [13]. Podczas cyklu replikacyjnego powstają liczne kopie wirusowych kwasów nukleinowych i białek osłonki. Są one syntetyzowane w ściśle określonej kolejności.

W środowisku pozakomórkowym wirusy nie wykazują aktywności.

4. LUDZKI WIRUS CYTOMEGALII (HCMV)

Wirusem cytomegalii jest zakażonych od 60 do 90% ludzi. U większości zakażonych nie ma żadnych objawów. Częściej i cięższe objawy występują u osób, które nie są w stanie wytworzyć specyficznej odpowiedzi immunologicznej przeciwko wirusowi cytomegalii. Są to przede wszystkim chorzy na AIDS i osoby po przeszczepieniu narządów.

Wirus cytomegalii jest najczęstszym patogenem wirusowym występującym u biorców przeszczepów (60–100% biorców jest zakażona HCMV). Z obecnością tego wirusa może się wiązać odrzucenie przeszczepu. Prawdopodobnie bezpośrednią przyczyną tego zjawiska jest spowodowana przez wirusa cytomegalii stymulacja CTL do reakcji autoimmunologicznej. Potwierdzeniem tej hipotezy było wyizolowanie klonów limfocytów T skierowanych przeciwko własnym komórkom [15].

Uważa się, że główną rolę w odpowiedzi immunologicznej przeciwko ludzkiemu wirusowi cytomegalii odgrywają komórki NK. Komórki te tworzą niespecyficzny mechanizm obrony przeciwko infekcji wirusowej. Rozpoznają one albo antygeny wirusowe, albo antygeny komórkowe zmienione przez infekcję wirusową, ponieważ liza zainfekowanych komórek powodowana przez komórki NK odbywa się równocześnie z ekspresją antygenów wirusowych. Udowodniono, że proces rozpoznawania i niszczenia komórek z wirusem cytomegalii jest zależny od cząsteczek MHC klasy I. Ludzkie komórki śródbłonna z żyły pępowinowej zainfekowane HCMV traktowano fragmentami $F(ab)_2$ mysiego przeciwciała przeciwko epitopowi na ludzkich cząsteczkach MHC I. Zabieg ten wyraźnie zmniejszał lizę zainfekowanych komórek przeprowadzaną przez komórki NK. Przekonano się również, że komórki NK potrzebują do przeprowadzenia lizy komórek zainfekowanych wirusem cytomegalii, cząsteczek MHC I zmodyfikowanych przez wirusa. Tak, więc wirusowe peptydy wiążą się z cząsteczkami MHC I i w ten sposób wpływają na cytotoxyczność komórek NK [9].

Infekcja HCMV powoduje szybkie obniżenie poziomu ekspresji powierzchniowej MHC I [11]. W wyniku tego ulega zaburzeniu proces prezentacji peptydów. Przyczyną tego są produkty dwóch genów wirusowych *US2* i *US11*. W obecności *US2* i *US11* nowo zsyntetyzowane łańcuchy ciężkie MHC I podlegają prawie natychmiastowej degradacji (połowiczny okres rozpadu wynosi ok. 1 min). Mechanizm tego procesu zbadano w komórkach z ekspresją genu *US11*. Okazało się, że produkt genu *US11* ma niezwykłą właściwość przenoszenia łańcuchów ciężkich MHC I z ER do cytoplazmy. W cytoplazmie łańcuchy ciężkie są wystawiane na działanie proteasomów, przez które są niszczone. *US11* jest białkiem występującym w ER. W obecności białka *US11* powstają produkty pośrednie rozkładu łańcuchów ciężkich o masie 40 kDa, które nie mogą połączyć się z normalnie powstającymi łańcuchami lekkimi (β_2m) i stworzyć kompletnej cząsteczki MHC I. *US11* czyni łańcuchy ciężkie mniej podatne na łączenie z β_2m albo przez zmianę konformacji łańcucha ciężkiego, albo przez przenoszenie produktów pośrednich rozkładu do przestrzeni komórkowych, gdzie połączenie nie może mieć miejsca [13].

W komórkach zainfekowanych HCMV pojawia się dodatkowa glikoproteina – *US3* wykazująca dużą homologię z *US2*. *US3* nie powoduje degradacji MHC I, ale ekspresja tego genu zatrzymuje MHC I w siateczce śródplazmatycznej. Ekspresja *US3* poprzedza lub pokrywa się z ekspresją *US2* i *US11*, stąd możliwe,

że wirus wykorzystuje różne glikoproteiny jednocześnie. Działają one synergistycznie w stosunku do siebie [14].

Wszystkie wymienione glikoproteiny powodują, że na powierzchni komórki nie pojawiają się cząsteczki MHC I. Istnieje jednak wiele komórek NK, które są zdolne do rozpoznania i niszczenia komórek gospodarza nie wykazujących ekspresji cząsteczek MHC I na powierzchni. Z tego powodu ludzki wirus cytomegalii powinien być łatwym celem dla układu immunologicznego gospodarza. Tak jednak nie jest, a to z powodu jeszcze jednej glikoproteiny produkowanej przez ludzkiego wirusa cytomegalii – UL18. UL18 wykazuje dużą homologię z łańcuchem ciężkim MHC I. Podczas składania cząsteczek MHC I, glikoproteina UL18 może łączyć się z β_2m zastępując łańcuch ciężki. Taki kompleks jest transportowany na powierzchnię komórki uniemożliwiając normalny przebieg prezentacji peptydów. Kompleks z UL18 potrafi pozornie zastąpić w działaniu MHC I i oszukać komórki NK [13]. Mechanizm działania glikoproteiny UL18 jest jeszcze mało poznany.

5. MYSI WIRUS CYTOMEGALII (MCMV)

Po infekcji, wirus cytomegalii pozostaje w komórkach myszy przez całe jej życie [14]. W kontrolowaniu infekcji decydującą rolę odgrywają cytotoksyczne limfocyty T oraz komórki NK.

Geny wirusowe po wnikięciu do komórki gospodarza podlegają kaskadowej ekspresji. Po 1 godzinie zachodzi ekspresja genów pojawiających się natychmiast (*immediate-early* (IE)), które kontrolują ekspresję genów wczesnych (*early* (E)) pojawiających się po następnych 8 godzinach infekcji. Najwyższy poziom ekspresji genów wczesnych zostaje osiągnięty, gdy ekspresji ulegają geny późne (*late* (L)) po 16 godzinach infekcji. Cytotoksyczne limfocyty T w pierwszej fazie infekcji rozpoznają wirusową nukleofosfoproteinę – pp89 oraz produkty genów IE [14]. Jednak po kilku następnych godzinach infekcji CTL przestają rozpoznawać epitopy wirusowych produktów. Proces prezentacji ulega zaburzeniu na skutek pojawienia się w komórce produktów genów wczesnych (E). Produkty MCMV genów *E* selektywnie zatrzymują MHC I w siateczce śródplazmatycznej.

W komórkach zainfekowanych wirusem MCMV wykryto również inne geny, których ekspresja może uniemożliwić wykrycie wirusa. Taką substancją jest prawdopodobnie glikoproteina gp-34, która wiąże się z cząsteczkami MHC I w siateczce śródplazmatycznej i razem z nimi zostaje przeniesiona na powierzchnię komórki [3]. Komórki zainfekowane wirusem z ekspresją gp-34 nie są wykrywane przez cytotoksyczne limfocyty T. W jaki sposób się to dzieje – nie wiadomo.

6. WIRUS EPSTEINA-BARR (EBV)

Wirus Epsteina-Barr jest ludzkim wirusem z rodziny herpeswirusów. Atakuje przede wszystkim limfocyty B i niektóre komórki nabłonkowe. Komórki zakażone wirusem będącym w stanie latencji wykazują ekspresję 8 genów wirusowych. Osiem białek kodowanych przez te geny (*EBNA2-6*, *LMP-1*, *LMP-2a*, *LMP-2b*) jest rozpoznawanych przez cytotoksyczne limfocyty T i komórki z tymi białkami zostają zniszczone.

Istnienie silnej odpowiedzi cytotoksycznych limfocytów T na antygeny EBV skłania do hipotezy o istnieniu tzw. rezerwuaru wirusowego, w którym wirus może istnieć nie będąc wykryty przez limfocyty gospodarza [14]. Wirus może być roznoszony z tego rezerwuaru przez limfocyty B po całym organizmie, gdzie jest już normalnie wykrywany i niszczone. Rezerwuar stanowi grupa zainfekowanych komórek, wykazujących ekspresję tylko jednego genu wirusowego – *EBNA-1* bez ekspresji pozostałych ośmiu genów. Komórki z białkiem EBNA-1 nie są rozpoznawane przez CTL, a to pozwala wirusowi stale przebywać w komórkach gospodarza.

Przeprowadzono doświadczenie, w którym próbowano wyjaśnić, w jaki sposób EBNA-1 blokuje proces prezentacji peptydów na powierzchni komórki. W tym celu w ramkę odczytu EBNA-1 wprowadzono gen kodujący naturalny epitop z białka EBNA-4 [14]. Po wprowadzeniu okazało się, że normalnie rozpoznawany epitop z EBNA-4 w połączeniu z EBNA-1 jest niewidoczny dla cytotoksycznych limfocytów T. Za te własności EBNA-1 odpowiada sekwencja „Gly-Ala repeat” znajdująca się na N-końcu białka EBNA-1. Delecja „Gly-Ala repeat” przywraca normalną prezentację EBNA-1, a przeniesienie tej sekwencji na inne rozpoznawane przez CTL antygeny powoduje zablokowanie prezentacji.

Mechanizm, którym sekwencja „Gly-Ala repeat” blokuje generowanie prezentacji antygenów nie jest znany. Prawdopodobnie obecność reszt Gly-Ala na N-końcu białka powoduje jego nieefektywną degradację przez proteasom, ponieważ EBNA-1 z „Gly-Ala repeat” ma niezwykle długi czas półtrwania [15]. Fragmenty EBNA-1, które mogłyby być prezentowane w połączeniu z MHC I pojawiają się w komórce w ilości niewystarczającej, aby mogły zostać wykryte.

7. ADENOWIRUSY (Ad)

Adenowirusy wykorzystują przynajmniej dwie strategie inaktywowania cząstek MHC I. Produkt genu *E1a* blokuje transkrypcję genów kodujących MHC I, a glikoproteina E3/19K uniemożliwia opuszczenie MHC I siateczki śródplazmatycznej [1]. Oba sposoby uniemożliwiają prezentację peptydów na powierzchni zainfekowanych komórek.

Gen *E1a* występuje w genomie adenowirusa 12. Ekspresja tego genu powoduje zmniejszenie ekspresji MHC I przez wpływ na transkrypcję genów MHC I. Produkt genu *E1a* inaktywuje prekursory białka NF κ B, który jest aktywatorem transkrypcji wiążącym się z promotorem genów MHC I. Gen *E1a* zmniejsza również ekspresję genów kodujących kompleks transportujący TAP [14].

E3/19K jest obficie syntetyzowanym wczesnym białkiem adenowirusa 2. Jest glikoproteiną transbłonową tworzącą trwałe kompleksy z cząsteczkami MHC I uniemożliwiając ich wyjście z ER [1]. To blokuje prezentację wirusowych antygenów na powierzchni komórki.

Przeprowadzono szereg doświadczeń z ekspresją białka E3/19K w komórkach myszy zakażonych wirusem vaccinia (VV). Testowano 2 rekombinanty VV. W VV-E19 białko E3/19K wiązało się z MHC I i blokowało liżę komórek prezentujących hemaglutyninę wirusa grypy i antygeny VV. W drugim rekombinancie VV- Δ E19 białko E3/19K wiąże się do MHC I, ale nie zapobiega dalszemu transportowi kompleksu na powierzchnię komórek i liżę komórki przez CTL [1]. Testy z oboma rekombinantami wszczepianymi do różnych linii komórkowych *in vitro* oraz komórkami różnych narządów *in vivo* pozwoliły na sformułowanie kilku prawdopodobnych wniosków.

W organizmie mogą istnieć specyficzne komórki lub stany metaboliczne, w których blok MHC I wywołany E3/19K jest sprawnie rozpoznawany i te komórki nie są celem infekcji. Przed rozpoczęciem produkcji E3/19K w wystarczającej ilości peptydy wirusowe są prezentowane przez MHC I (stąd niski poziom prezentacji antygenów VV). Prawdopodobnie, również inne białka jak *E1a* są potrzebne do zwiększenia efektu blokowania MHC I [1].

8. WIRUS OPRYSZCZKI – *Herpes Simplex Virus* (HSV)

Wirus opryszczki znalazł się także w tym zestawieniu z powodu niewielkiego białka (ok. 9 kDa) ICP47. Białko to jest przyczyną całkowitej odporności komórek zainfekowanych HSV na liżę ze strony specyficznych cytotoksycznych limfocytów T już po kilku godzinach infekcji.

ICP47 jest wczesnym białkiem wirusa opryszczki. W obecności tego białka odbywa się normalna synteza cząsteczek MHC I przy jednoczesnym spadku poziomu ekspresji kompleksu peptyd-MHC I na powierzchni komórki. Nie stwierdzono żadnych bezpośrednich reakcji między ICP47 a MHC I [2,4]. Stwierdzono natomiast silne hamowanie transportu peptydów do siateczki śródplazmatycznej. Okazało się, że ICP47 blokuje kompleks TAP, który transportuje peptydy z cytoplazmy do siateczki śródplazmatycznej. Ludzkie fibroblasty zainfekowane HSV I (linia F) z genem ICP47 wykazywały blokadę transportu peptydów, czego nie było w tych samych fibroblastach, ale zainfekowanych HSV I (linia R3631) – bez genu ICP47 [2,4].

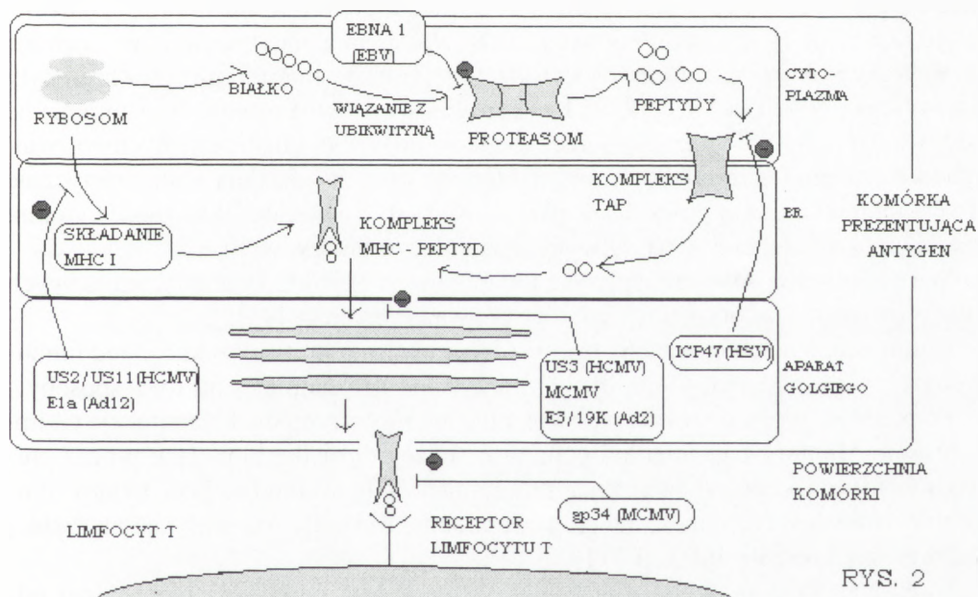
Koniecznym warunkiem prezentacji peptydu przez MHC I jest stabilne połączenie się β_2 -mikroglobuliny, łańcucha ciężkiego, dodatkowych peptydów (funkcje w transporcie) oraz prezentowanego peptydu transportowanego z TAP. Przy braku peptydu do prezentacji, taka „nie zapakowana” cząsteczka MHC I nie może przenieść się na powierzchnię komórki.

Kompleks TAP zawiera specyficzne miejsce wiążące peptyd (*single peptide-binding site*). ICP47 i peptydy konkurują o to miejsce. To uniemożliwia normalny transport peptydów i sprawia, że są one niedostępne dla MHC I w siateczce śródplazmatycznej, a tym samym niemożliwy staje się cały proces prezentacji.

9. PODSUMOWANIE

Wymienione wirusy wykorzystują różne strategie, aby osiągnąć to samo - stać się niewidocznymi dla układu immunologicznego gospodarza przez zaburzenie procesu prezentacji peptydów na powierzchni komórki. Istnieje kilka sposobów, aby to osiągnąć:

- blokowanie ubikwityny, białka niezbędnego do degradacji białek przez proteasom w cytoplazmie,



RYS. 2

RYSUNEK 3. Wirusy blokują proces prezentacji peptydów na różnych jego etapach; miejsce blokowania zaznaczono •, wpisano też w ramkę czynnik blokujący

- blokowanie kompleksu przenoszącego peptydy z cytoplazmy do siateczki śródplazmatycznej (HSV),
- blokowanie powstawania MHC I (HCMV, Ad12),
- blokowanie transportu kompleksu peptyd-MHC I na powierzchnię komórki (MCMV, HCMV, Ad2),
- wiązanie się bezpośrednio z cząsteczkami MHC I i zaburzenie procesu rozpoznawania kompleksu przez CTL (MCMV).

Mechanizm wybrany przez wirusa zależy od typu infekowanej komórki, szybkości przebiegu infekcji, cyklu życiowego wirusa [4].

Wirusy, oprócz wymienionych wyżej sposobów mogą w jeszcze inny sposób modulować odpowiedź immunologiczną. Wiele wirusów może regulować ekspresję cząsteczek MHC II. Produkt genu *BZLF2* wirusa Epsteina-Barr oddziałuje bezpośrednio z cząsteczkami MHC II. *BZLF2* w postaci rozpuszczalnego białka łączy się z łańcuchami β cząsteczek MHC II. Białko to może powodować zatrzymanie MHC II w ER i zakłócenie prezentacji peptydów przez cząsteczki MHC II.

Innym sposobem na system immunologiczny gospodarza wykorzystywanym przez wirusy jest produkcja wirusowych cytokin i czynników wzrostowych. Cytokiny pełnią kluczową rolę w rozpoczęciu i przebiegu odpowiedzi immunologicznej. Pewne wirusy potrafią wyprodukować cząsteczki o budowie bardzo zbliżonej do cytokin gospodarza. Na przykład produkt genu *BCRF1* wirusa Epsteina-Barr to białko o masie 17 kDa, które ma sekwencję w 78% analogiczną w stosunku do ludzkiej IL-10. Zarówno IL-10, jak i produkt genu *BCRF1* pełnią podobne funkcje – hamują produkcję cytokin przez monocyty i makrofagi, syntezę γ -interferonu przez limfocyty T i komórki NK. Tak więc *BCRF1* umożliwia wirusowi Epsteina-Barr uniknięcie odpowiedzi immunologicznej poprzez redukcję ilości cytokin niezbędnych do zwalczania zakażenia. Produkty genów niektórych wirusów działają antagonistycznie w stosunku do cytokin gospodarza. Wirusowe białka modulują aktywność cytokin, zanim połączą się one z właściwym receptorem komórkowym.

Wirusy potrafią również wpływać na apoptozę komórek. Produkty wirusowych genów chronią komórki przez zaprogramowaną śmiercią [15].

Informacje o mechanizmach, dzięki którym wirusy potrafią oszukać układ immunologiczny gospodarza, mogą być wykorzystane przynajmniej na dwa sposoby.

Po pierwsze mogą pozwolić na stworzenie leków i szczepionek na infekcje takimi wirusami. Mutanty z usuniętymi genami kodującymi białka blokujące proces prezentacji można użyć do tworzenia szczepionek. Nie wiadomo, jaka byłaby skuteczność takich szczepionek, ale prawdopodobnie mogłyby one wpłynąć na szybką i efektywną kontrolę infekcji [11].

Uzyskane wiadomości można wykorzystać w celu uniknięcia niechcianej odpowiedzi immunologicznej. Byłoby to szczególnie przydatne w chorobach autoimmunologicznych i przy przeszczepach. Wykorzystanie w tym celu ICP47 i US2/11 było już nawet badane w kilku laboratoriach [11].

LITERATURA

- [1] COX JH, BULLER RML, BENNINK JR, YEWDELL JW, KARUPIAH G. Expression of adenovirus E3/19K protein does not alter mouse MHC class I-restricted responses to vaccinia virus. *Virology* 1994; **204**: 558–562.
- [2] FRUH K, AHN K, DJABALLAH H, SEMPE P, van ENDERT PM, TAMPE R, PETERSON PA, YANG Y. A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation. *Nature* 1995; **375**: 415–418.
- [3] GACIONG Z. Oddziaływanie drobnoustrojów na układ immunologiczny. *Immunologia lekarska CMKP* 1993; tom I: 61–78.
- [4] HILL A, JUGOVIC P, YORK I, RUSS G, BENNINK J, YEWDELL J, PLOEGH H, JOHNSON D. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature* 1995; **375**: 411–415.
- [5] HOCHSTRASSER M. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* 1996; **30**: 405–439.
- [6] JAWETZ E, MELNICK IL, ADELBERG EA. Przegląd mikrobiologii lekarskiej. PZWL Warszawa 1991; 531–601.
- [7] KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ L. Cytobiochemia. PWN Warszawa 1995: 536–549.
- [8] REYBURN TH, MANDELBOIM O, VALES-GOMEZ M, DAVIS DM, PAZMANYB L, STROMINGER JL. The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. *Nature* 1997; **386**(3): 514–517.
- [9] SPRIGGS MK. One step ahead of the game: Viral immunomodulatory molecules. *Annual Review of Immunology* 1996; **14**: 101–130.
- [10] STRYER L. Biochemia. PWN Warszawa 1997; 385–413, 1001–1002.
- [11] TANAKA K, TSURUMI C. The 26S proteasome: subunits and functions. *Molecular Biology Reports* 1997; **24**: 3–11.
- [12] WEINBERG A, ZHANG L, TUDER RM. NK recognition of cytomegalovirus-infected endothelial cells depends on viral replication and MHC class I expression. *Viral Immunology* 1996; **2**: 131–140.
- [13] WIERTZ EJHJ. The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chain from the ER to the cytosol. *Cell* 1996; **84**: 769–779.
- [14] WIERTZ EJHJ, MUKHERJEE S, PLOEGH HL. Viruses use stealth technology to escape from the host immune system. *Molecular medicine today* 1997; **3**: 116–122.
- [15] WÓJCIK C. Proteasomy i szlak degradacji białek zależny od ubikwityny. *Postępy Biologii Komórki* 1995; **22**(3): 295–315.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak.

Otrzymano: 15.08.1997 r.

Przyjęto: 20.10. 1997 r.

Adres autora : 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99

MECHANIZM DZIAŁANIA FITOCHROMU*

MECHANISM OF PHYTOCHROME ACTION

Andrzej TRETYN^{1,2}, Justyna WIŚNIEWSKA¹, Krzysztof JAWORSKI¹

¹Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Zakład Fizjologii i Morfogenezy Roślin, Toruń; ²Akademia Rolniczo-Techniczna im. M. Oczapowskiego w Olsztynie, Zakład Biologii Komórki, Olsztyn

Streszczenie: Zależny od światła wzrost i rozwój roślin regulowany jest przez chromoproteiny zwane fitochromami. Biologicznie aktywny fitochrom występuje w dwóch różnych fotoodwracalnych formach: P_r – absorbującej światło czerwone i P_{fr} – pochłaniającej daleką czerwień. Białkowy składnik tego fotoreceptora kodowany jest przez małą rodzinę genów przynajmniej u roślin wyższych. U rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) wykryto pięć takich genów: *PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD* i *PHYE*. *PHYA* koduje tzw. labilną, a pozostałe geny stabilną pulę fitochromu. Analiza mutacji dotyczących genów *PHYA* i *PHYB* wykazała, że powstające na ich bazie produkty kontrolują różne procesy. W niniejszej pracy przedstawiamy obecny stan wiedzy na temat komórkowego mechanizmu działania fitochromów. Szczególną uwagę zwrócono na omówienie roli białek wiążących GTP, Ca²⁺/kalmoduliny i cGMP w indukowanych przez fitochrom labilny szlakach transdukcji sygnałów świetlnych.

Słowa kluczowe: fitochrom, mechanizm działania, transdukcja sygnału, wtórne przekaźniki

Summary: Light-dependent plant growth and development are regulated by chromoproteins called phytochromes. Biologically active phytochrome exists in two different photoconvertible: red- (P_r) and far-red (P_{fr}) light-absorbing forms. At least in higher plants the polypeptide of this photoreceptor is encoded by a family of divergent genes. In *Arabidopsis thaliana* five such genes, designated *PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD* and *PHYE* were found. It has been shown that *PHYA* encodes light-labile, whereas other genes encode light-stable pools of the photoreceptor. Analysis of *PHYA* and *PHYB* mutants suggests that the modes of action of these two phytochromes are different. In this paper recent advances toward our understanding of the phytochrome mechanism of action are reviewed. Particularly, evidence is

*Praca ta została zrealizowana podczas pobytu autorów w Instytucie Maxa Plancka w Kolonii, finansowanego przez Komitet Badań Naukowych (A.T. i J.W., grant nr 6 PO4C 046 10), Unię Europejską (A. T., European Community INCO-Copernicus Programme, Grant No IC 15-CT96-0920) oraz Uniwersytet M. Kopernika w Toruniu (K.J. i J. W., stypendium dla młodych pracowników nauki).

presented that G proteins, Ca^{2+} /calmodulin, and cGMP may be signalling intermediates in the photo-transduction regulated by the labile phytochrome.

Key words: mechanism of action, phytochrome, second messengers, signal transduction.

WSTĘP

Światło kontroluje wszystkie etapy cyklu życiowego roślin, od kiełkowania poprzez proces deetiolacji i rozwoju wegetatywnego, a na indukcji kwitnienia i starzeniu kończąc [19, 20]. W sposób niezależny od barwników fotosyntetycznych rośliny są w stanie rejestrować zarówno barwę światła, jak i jego natężenie i czas ekspozycji. Jest to możliwe dzięki występowaniu u roślin trzech typów barwników: fitochromów, receptorów światła niebieskiego i bliskiego ultrafioletu (UV-A) oraz dalekiego ultrafioletu (UV-B) [81, 83]. Natura ostatniego z wymienionych barwników nie została dotąd dokładnie poznana. Gen kodujący receptor światła niebieskiego i UV-A został zidentyfikowany dopiero kilka lat temu przez Ahmada i Cashmora [2, 17]. Wśród wszystkich wymienionych fotoreceptorów najlepiej poznanymi są fitochromy [36]. Dokładnie 55 lat temu Borthwick i współpracownicy odkryli, że kiełkowanie nasion sałaty i indukcja kwitnienia tytoniu mogą być regulowane przez barwnik, który wykazuje maksimum absorpcji w świetle czerwonym (ok. 660 nm) i dalekiej czerwieni (ok. 730 nm) [9]. Wspomniani badacze stwierdzili ponadto, że działanie czerwieni na badane procesy odwracane jest przez daleką czerwień. W kolejnych latach pojawiło się wiele prac potwierdzających to spostrzeżenie. Jednocześnie udało się wyizolować fitochrom i określić jego spektralne właściwości. Okazało się, że jest on zbudowany z części białkowej oraz grupy chromoforowej zbliżonej do fikobilin [81, 84]. Ponadto ustalono, że barwnik ten występuje w dwóch spektralnie różnych formach: P_r – absorbującej czerwień i P_{fr} – pochłaniającej daleką czerwień. Stosując odpowiednią długość światła można przekształcać jedną formę barwnika w drugą. Procesowi fototransformacji towarzyszy uruchomienie łańcucha transdukcji sygnału, co w końcowym efekcie wpływa na aktywność transkrypcyjną określonych genów, odpowiedzialnych za powstanie stosownej do bodźca odpowiedzi fotomorfogenetycznej. Zależności te ilustruje poniższy schemat [56]:



Do końca lat osiemdziesiątych dokładnie opisano biochemiczne właściwości fitochromu, natomiast na przełomie lat osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych roz-

poczęto badania na poziomie molekularnym [26, 27, 41, 55, 58]. Doprowadziły one do stwierdzenia, że fitochrom kodowany jest przez niewielką rodzinę genów. W rzodkiewniku (*Arabidopsis thaliana*), roślinie powszechnie używanej do badań molekularnych, funkcjonować może 5 odrębnych genów (oznaczanych jako *PHYA*, *B*, *C*, *D* i *E*), kodujących białkowe składniki fitochromów (określanych jako *PHYA*, *B*, *C*, *D* i *E*) [23, 46, 73]. Również u pomidora występować może co najmniej pięć odrębnych (zlokalizowanych w różnych chromosomach) genów fitochromowych [62,63]. U tytoniu natomiast wykryto obecność trzech genów [1].

Większość genów fitochromowych roślin wyższych wykazuje podobieństwo do *PHYA* lub *PHYB* rzodkiewnika [1, 59, 62, 84]. Dotyczy ono zarówno molekularnej budowy genów, produktów ich transkrypcji i translacji, a także fizjologicznych właściwości tychże fotoreceptorów. Bez względu na przynależność gatunkową naświetleniu etiolowanych roślin towarzyszy szybki ubytek formy P_{fr} fitochromu. Z drugiej strony, u roślin zielonych forma ta charakteryzuje się wysoką trwałością [24]. Na tej podstawie wyróżniono dwie niezależne pule P_{fr} : labilną oraz stabilną [28, 44, 76,77]. Badania spektrofotometryczne potwierdziły tę hipotezę. Fitochromy izolowane z roślin etiolowanych i zielonych różnią się zarówno właściwościami spektralnymi, jak i molekularnymi. Obie pule barwnika kodowane są przez odmienne zestawy genów [46]. U rzodkiewnika fitochrom labilny kodowany jest przez gen *PHYA*, natomiast na bazie czterech pozostałych genów powstaje białkowy składnik fitochromu stabilnego [59, 76, 81]. Podobnie jak u rzodkiewnika, także w innych roślinach fitochrom labilny kodowany jest przez gen o budowie podobnej do *PHYA*. U roślin tych stwierdzono również obecność od jednego do kilku genów odpowiadających za powstawanie fitochromu stabilnego [62,63]. Zaproponowano (patrz [28]), aby fizjologicznie aktywne produkty genów *PHYA* określać jako fitochrom typu I (P I), natomiast kodowany przez rodzinę genów fitochrom stabilny oznaczać jako typu II (P II) (patrz tabela 1).

Poza różną budową genów i powstających na ich bazie białek (grupa chromoforowa fitochromu labilnego i stabilnego jest przypuszczalnie identyczna [80]) podlegają one odmiennej kontroli na poziomie transkrypcji. Transkrypcja genów fitochromu labilnego hamowana jest (w przeciągu kilku minut) przez powstającą w wyniku naświetlenia rośliny formę P_{fr} tego fotoreceptora [29, 84]. Wydaje się również, że podobny wpływ na aktywność transkrypcyjną P I ma obecność w komórce formy P_{fr} P II. Z pracy opublikowanej ostatnio przez Sakamoto i Nagataniego [67] i Nagataniego [51] wynika również, że obydwie pule fitochromu mogą być odmiennie zlokalizowane w komórce. W etiolowanych komórkach fitochrom labilny ($PhyA_{fr}$) występuje wyłącznie na terenie cytoplazmy (patrz [51]). Po jego fotokonwersji następuje tzw. sekwestracja $PhyA_{fr}$, która poprzedza jego destrukcję [24]. Natomiast fitochrom stabilny ($PhyB$) poza cytoplazmą występować może również w jądrze [51, 67]. Trudno obecnie ocenić, czy różna wewnątrzkomórkowa lokalizacja może mieć istotny wpływ na mechanizm działania obu pul tego fotoreceptora

TABELA 1. Charakterystyka fitochromu labilnego (P I) i stabilnego (P II) (Na podstawie [29] zmodyfikowane) (EOD-FR, efekt końcowo-dniowego naświetlania światłem dalekiej czerwieni)

Właściwości	P I	P II
<i>Spektralne</i>		
Widmo absorpcyjne	Fotoodwracalne	Fotoodwracalne
Ubytek P _{fr} w ciemności	Szybki	Bardzo wolny
<i>Biochemiczne</i>		
Biosynteza apoproteiny	W ciemności	Ciągła
Budowa podjednostkowa	Homodimer	Heterodimer?
Grupa chromoforowa	Fitochromobilina	Fitochromobilina?
<i>Genetyczne</i>		
Rodzina genów	<i>PHYA</i>	<i>PHYB</i>
<i>Fizjologiczne</i>		
EOD-FR	Nie stwierdzono	Tak

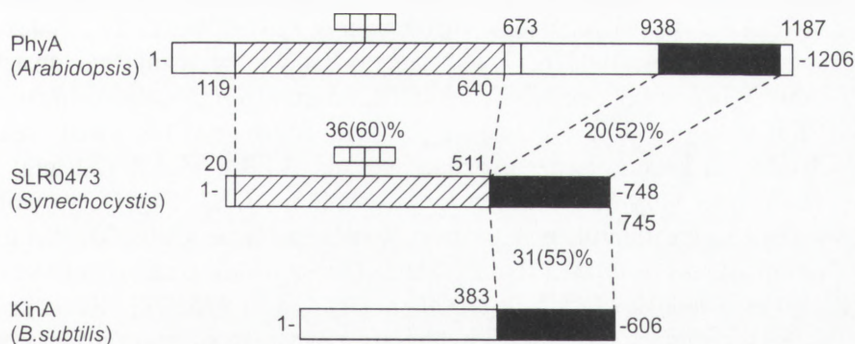
[51]. Nie można jednak wykluczyć, że ma ona wpływ na aktywację odmiennie zlokalizowanych szlaków transdukcji sygnałów kontrolowanych przez PhyA i PhyB [5, 7, 29]. Właściwości fitochromu labilnego i stabilnego roślin wyższych przedstawione zostały w tabeli 1.

Fitochrom roślin niższych może posiadać odmiennie właściwości od przedstawionych powyżej. Do tej pory sklonowano geny kodujące ten fotoreceptor u kilku sinic [34, 35], zielenic [98], mszaków [87, 88] i paprotników [92]. Na podstawie tych badań wnioskuje się, że u roślin niższych funkcjonuje jeden typ fitochromu. W dwóch roślinach: *Ceratodon* (mszak) i *Adiantum* (paprotnik) cząsteczki tego barwnika mają unikalne właściwości – regulowanej przez światło kinazy białkowej [87, 88, 92].

„NARODZINY FITOCHROMU”

W wyniku analizy kolejności nukleotydów (zwłaszcza wchodzących w skład kodujących sekwencji genów fitochromowych owsa i rzodkiewnika) ustalono, że najbardziej ewolucyjnie zachowawczy fragment występuje w odcinku kodującym aminokwasy bezpośrednio sąsiadujące z reszta cysteinową, do której przyłączana jest grupa chromoforowa (w przypadku owsa jest to 321 reszta aminokwasowa [81]). Na tej podstawie zsyntetyzowano sondy molekularne, które posłużyły do przeszukiwania genomów innych gatunków roślin, tak niższych, jak i nasiennych. Doprowadziło to do identyfikacji wielu kolejnych genów fitochromowych. Okazało

się, że oprócz grzybów funkcjonują one u wszystkich przebadanych roślin, a ich struktura, poza dwoma wyjątkami (patrz poniżej) jest bardzo do siebie podobna [57, 59]. Mimo iż wyniki tych badań pozwoliły ustalić przypuszczalną ewolucję tego fotoreceptora (patrz [62, 84]), do tej pory nie było wiadomo, w których roślinach barwnik ten pojawił się jako pierwszy. Przełomowe znaczenie w tej sprawie wnoszą wyniki prac Kaneko i in. [34] oraz Kehoe i Grossmana [35]. Pierwszej grupie badaczy udało się zsekwencjonować cały genom sinicy *Synechocystis sp.* [34]. Natomiast Kehoe i Grossman [35] zidentyfikowali gen odpowiedzialny za adaptację świetlną innej sinicy – *Fremyella diplosiphon*. Jeden z genów pierwszej z wymienionych sinic koduje białko, którego N-końcowa domena wykazuje duże podobieństwo do fitochromów (rys. 1). Koniec C zawiera natomiast aminokwasy o układzie podobnym do cząsteczek bakteryjnych kinaz histydynowych [34]. Pierwszy ze wspomnianych odcinków wykazuje 31–37% identyczności (56–60% podobieństwa) do N-końcowego, 500 aminokwasowego odcinka apoproteiny fitochromu typu E rzodkiewnika [34, 56, 57]. Największy stopień homologii dotyczył odcinka (Val246-Asp280), który u roślin wyższych sąsiaduje z resztą cysteinową, do której przyłączana jest grupa chromoforowa. Ostatnio Hughes i in. [32] otrzymali pierwszy prokariotyczny fitochrom. Potencjalny gen fitochromowy wyizolowany z sinicy *Synechocystis* wprowadzili przy pomocy wektora pQE12 do komórek *Escherichia coli* [32]. W wyniku tego zabiegu w komórkach bakterii doszło do akumulacji badanego białka, którego masa cząsteczkowa wynosi ok. 85 kDa (a owsa i rzodkiewnika ok. 120 kDa). Jego zawartość dochodziła do 50% wszystkich białek rozpuszczalnych *E. coli* [32]. Było to dużym zaskoczeniem, gdyż po wprowadzeniu do tych samych komórek genów fitochromowych roślin wyższych uzyskiwano tylko niewielkie ilości słabo rozpuszczalnego białka [42]. Ponadto, uzyskane białko miało właściwości autokatalityczne polipeptydowego składnika fitochromu roślin wyższych – było zdolne do przyłączania fikocyjanobilinowych grup chro-



RYSUNEK 1. Porównanie budowy cząsteczki fitochromu E (PhyE) *Arabidopsis* (górny panel), produktu genu SLR0473 sinicy *Synechocystis* (środkowy panel) oraz kinazy histydynowej (KinA) bakterii *Bacillus subtilis* (dolny panel) (dalszy opis w tekście, na podstawie [56], zmodyfikowane)

moforowych. Umieszczenie transformowanych bakterii w środowisku zawierającym fitochromobilinę prowadziło do uzyskania barwnika o właściwościach charakterystycznych dla fitochromu [32]. Po jego wyizolowaniu i oczyszczeniu stwierdzono, że ma on dwa maksima absorpcji, przy 658 i 702 nm [32] oraz podlega charakterystycznej dla fitochromu fotokonwersji. Opisane badania bezpośrednio dowodzą, że białko o właściwościach zbliżonych do fitochromu może funkcjonować również w komórkach organizmów prokariotycznych [32, 56, 57]. Jego niezwykle duża zawartość w komórkach transformowanych bakterii pozwala przypuszczać, że już w najbliższym czasie przeprowadzone zostaną badania rentgenograficzne, które ostatecznie rozstrzygną o przestrzennej budowie cząsteczek fitochromu [32].

Jak już wspomniano powyżej, również jeden z genów sinicy *Fremyella*, kontrolujących jej świetlną adaptację, koduje białko, którego N-koniec wykazuje budowę zbliżoną do tej samej domeny (zawierającej grupę chromoforowa) fitochromu. Natomiast jego C-końcowy fragment wykazuje duże podobieństwo do kinaz histydynowych [35]. Na podstawie wyżej przedstawionych wyników spekuluje się, że pierwszymi organizmami, u których mogły pojawić się fotoreceptory o właściwościach przypominających lub podobnych do fitochromu, były sinice [56, 57]. Ponadto, przedstawione badania wiele wnoszą do zrozumienia molekularnego mechanizmu działania barwników fotomorfogenetycznych. Podobnie jak w przypadku receptorów etylenu [8, 22] i cytokinin [33] mogłyby one funkcjonować jako kinazy histydynowe [56]. Problem ten zostanie szerzej omówiony poniżej.

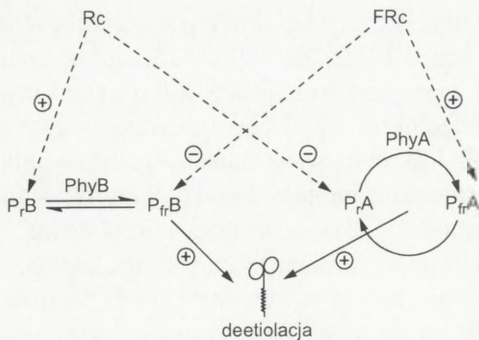
EKO-FIZJOLOGICZNE PODSTAWY DZIAŁANIA FITOCHROMU

Działające przez fitochrom światło może indukować wiele różnych reakcji fizjologicznych. Decydującą, regulatorową rolę odgrywa tu zarówno barwa, natężenie, jak i czas działania światła [76, 77]. Na tej podstawie wyróżnia się dwa typy reakcji: indukcyjne i wysokoenergetyczne (HIR, od ang. *High Irradiance Response*) [29, 44]. Ponadto, pierwszy typ reakcji podzielić można na: tak zwane reakcje nisko- i bardzo niskoenergetyczne, oznaczane jako LFR i VLFR (od ang. *Low Fluence Response* i *Very Low Fluence Response*) [45, 77, 83, 84]. Do wywołania VLFR wystarczają niezmiernie niskie dawki światła (w granicach $0,0001-0,1 \text{ mmol} \times \text{m}^{-2}$). Natomiast reakcje typu LFR inicjowane są przez światło o natężeniu wyższym o kilka rzędów wielkości (od 1 do $1000 \text{ mmol} \times \text{m}^{-2}$) [76, 77]. Reakcje HIR wyzwalane są w roślinach w wyniku ich długotrwałego naświetlania zarówno światłem czerwonym (HIR-R), jak i dalekiej czerwieni (HIR-FR). Reakcje niskoenergetyczne można określić mianem klasycznych, gdyż charakteryzują się foto odwracalnością, tj. efekt fizjologiczny bezpośrednio zależy od tego, która z długości

światła (R lub FR) zostanie użyta jako ostatnia. W przypadku VLFR i HIR nie obserwuje się tego typu zależności [29]. Jedynie milisekundowy puls światła słonecznego powoduje zainicjowanie reakcji typu VLFR [76, 77]. Do zaindukowania procesów kontrolowanych przez LFR wymagana jest co najmniej kilkusekundowa ekspozycja na światło słoneczne (w okresie letnim), a pod centymetrową warstwą gleby do pełnego jej wysycenia niezbędne jest kilkuminutowe działanie tegoż światła [76, 77]. Choć reakcje wysokoenergetyczne indukowane są w wyniku długotrwałego naświetlania roślin, najskuteczniejsze działanie wykazuje światło długofalowe – daleka czerwień, które niesie niższą energię niż promieniowanie krótkofalowe.

Aby wyjaśnić podstawy działania fitochromu, należy wprowadzić kolejny termin – stan fotostacjonarny, który określa ilościowy stosunek fitochromu w formie P_{fr} do całkowitego fitochromu (P_{tot}) [77, 78, 81, 84]. W wyniku naświetlania etiolowanych siewek (w których występuje jedynie fitochrom w formie P_r) światłem czerwonym dochodzi do przekształcania P_r w P_{fr} . W skrajnym przypadku 86% P_r może ulec fotokonwersji do P_{fr} . Z drugiej strony, światło dalekiej czerwieni, zastosowane bezpośrednio po czerwonym przekształca prawie cały P_{fr} (do 99%) do P_r [81]. W naturze nigdy nie mamy do czynienia z monochromatycznym światłem czerwonym i dalekiej czerwieni. Bezpośrednio padające na rośliny światło słoneczne wzbogacone jest o czerwony zakres widma, a jego przenikaniu przez tkanki liści (tzw. baldachim lub okap) towarzyszy pochłanianie przez występujące w nich barwniki fotosyntetyczne prawie całego zakresu widma słonecznego – poza światłem zielonym, a przede wszystkim daleką czerwiecią [29, 77, 78]. Stąd też, w zależności od warunków środowiskowych roślina poddawana jest działaniu bezpośredniego światła wzbogaconego w czerwień lub rozproszonego, w którego skład wchodzi głównie daleka czerwień. Do tej pory uważano, że jedynie światło czerwone zdolne jest do inicjowania u roślin tzw. odpowiedzi fotomorfogenetycznych. Pogląd ten należy uznać za przestarzały. Obecnie uważa się, że obydwie omawiane długości światła są fizjologicznie aktywne. Daleka czerwień inicjować może reakcje bardzo niskoenergetyczne, które zachodzą przy niezmiernie niskim stanie fotostacjonarnym fitochromu ($P_{fr}/P_{tot} < 1\%$). Również ta barwa światła odpowiada za powstawanie u roślin reakcji wysokoenergetycznych [55, 76]. W tym wypadku FR powoduje przekształcanie niewielkiej puli P_r w P_{fr} , która natychmiast po pochłonięciu kolejnej dawki dalekiej czerwieni wraca do formy P_r [29, 44]. Szybkie, cykliczne przemiany obu form fitochromu uniemożliwiają degradację podatnej na nią formy P_{fr} . Obok opisanych występują jeszcze „klasyyczne” reakcje fitochromowe, które wyzwalane są przez światło czerwone. W zależności od jego natężenia i czasu ekspozycji w tkankach roślinnych ustalać się mogą odmienne stany fotostacjonarne, co prowadzić może do inicjacji różnych reakcji biochemicznych lub morfogenetycznych [76, 77].

Obecnie uważa się, że obydwie długości światła mogą indukować przebieg odmiennych procesów. Za kontrolę VLFR i HIR odpowiada fitochrom labilny. Natomiast reakcje niskoenergetyczne regulowane są przez stabilną pulę tego

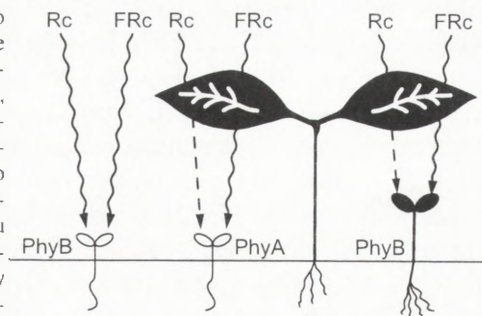


RYSUNEK 2. Wzajemne oddziaływania pomiędzy fitochromem labilnym (PhyA) i stabilnym (PhyB) w procesie kontroli deetioloacji siewek rzodkiewnika. Dominujące w widmie słonecznym ciągle światło czerwone (Rc) absorbowane przez PhyB indukuje deetioloację (+) w wyniku utrzymywania wysokiego poziomu Pfr_B. W tych warunkach świetlnych fotokonwersji Pr do Pfr towarzyszy szybka degradacja PhyA. Podczas naświetlania etiolowanych roślin ciągłym światłem dalekiej czerwieni (co obserwuje się po przejściu światła słonecznego przez liście okapu) deetioloacja indukowana jest przez fitochrom labilny (+). Znak minus wskazuje, że aktywacja jednej puli fitochromu prowadzi do wyłączenia drugiej z nich (na podstawie [58], zmodyfikowane)

fotoreceptora [55, 58]. W pewnych jednak przypadkach przebieg tego samego procesu może podlegać kontroli przez obydwie pule fitochromu. Ustalono, że światło czerwone absorbowane przez fitochrom typu B (PhyB) indukuje deetioloację roślin (rys. 2.). Z drugiej strony, również absorbowane przez fitochrom labilny (PhyA) światło dalekiej czerwieni reguluje ten sam proces (przez reakcje HIR). Działanie fitochromu stabilnego obserwuje się u roślin poddanych bezpośredniemu wpływowi światła słonecznego. Natomiast u roślin rosnących pod baldachimem liści aktywowany jest fitochrom labilny. Działanie jednego typu fitochromu wyklucza jednocześnie udział drugiej puli tego fotoreceptora (rys. 2)[58].

Jakie ekologiczne znaczenie mogą mieć opisane fizjologiczne właściwości fitochromu? Jak już wspomniano powyżej, światło słoneczne zawiera więcej czerwieni niż dalekiej czerwieni. Dlatego rozwijające się w glebie siewki, gdy dotrą do jej powierzchni, poddane są głównie bezpośredniemu wpływowi światła czerwonego, które działa przez fitochrom stabilny (rys. 3). Natomiast gdy natężenie światła jest bardzo niskie (np. podczas pełni) lub gdy rozwój siewki odbywa się pod osłoną (okapem) liści, nasiona lub kiełkujące siewki ekspozowane są na światło wzbogacone w daleką czerwień, która absorbowana jest przez fitochrom labilny (rys. 3). Stąd też bez względu na warunki świetlne otoczenia roślina może uzyskać sygnał niezbędny do zainicjowania procesu deetioloacji. Zazielenienie się siewki to kluczowy etap dalszego jej rozwoju. Gdy roślina rozwija się w warunkach pełnego dostępu światła, dominującą funkcję w jej dalszym rozwoju spełnia fitochrom stabilny [29, 55, 58, 76]. Jednakże, jeśli jest ona zacieniana przez liście innych roślin, a docierające do niej światło fotosyntetycznie aktywne ma zbyt niskie natężenie, roślina albo zginie z braku możliwości odnowy odpowiednich rezerw energetycznych lub też przyspieszy swój wzrost i wyrośnie ponad ocieniający ją baldachim w wyniku uruchomienia reakcji określanej mianem „unikanie zacienienia” (ang. *shade-avoidance*) [69, 78]. W tym wypadku decydującą rolę zacień pełnić fitochrom labilny [16](rys. 3).

RYSUNEK 3. Wpływ ciągłego światła czerwonego (Rc) i dalekiej czerwieni (FRc) na procesy kontrolowane przez fitochrom labilny (PhyA) lub stabilny (PhyB). Linia przerywana oznacza światło, które po przejściu przez tkanki roślinne (baldachim) zużożone jest w czerwień (pochłanianą przez chlorofil) i wzbogacone w daleką czerwień. Obydwa typy fitochromu, w zależności od warunków świetlnych otoczenia mogą kontrolować proces deetioloacji roślin (lewa i środkowa część rysunku). W wyniku pierwszego kontaktu rozwijającej się siewki ze światłem dochodzi do degradacji występującego w niej fitochromu labilnego, czemu towarzyszy deetioloacja i zahamowanie jej wzrostu wydłużeniowego. Dalsze etapy rozwojowe zielonej rośliny regulowane są przez fitochrom stabilny (prawa część rysunku). Dalszy opis w tekście (na podstawie [58], zmodyfikowane)



Różne typy fitochromu są aktywne w kolejnych stadiach rozwojowych rośliny. PhyB może kontrolować wszystkie etapy począwszy od kiełkowania nasion spoczynkowych, a na indukcji kwitnienia kończąc [19, 20, 48]. PhyA może natomiast funkcjonować głównie we wczesnych etapach rozwoju osobniczego rośliny. Obok nich pewne procesy mogą być również kontrolowane przez inne geny fitochromowe, kodujące fitochrom stabilny. Na przykład u mutantu *phyB* nie stwierdzono tzw. końcowodniowego efektu naświetlania R i FR na wzrost elongacyjny hypocotyli rzodkiewnika. Z drugiej zaś strony tego typu traktowanie w istotny sposób wpływało na fotoperiodyczną indukcję kwitnienia [29].

GENETYCZNE PODŁOŻE DZIAŁANIA FITOCHROMU

Dotychczas nie opracowano metody, która umożliwiałaby badanie specyficznych funkcji obu omawianych populacji fitochromu w układach *in vitro*. W związku z tym istnieje konieczność prowadzenia odpowiednich badań *in vivo*. Należy tu wiele problemów, ponieważ inaczej niż w roślinach etiolowanych w komórkach roślin zielonych ekspresji może podlegać jednocześnie kilka genów fitochromowych [59, 62]. Duży wkład w poznanie kontrolowanych przez fitochrom procesów przynoszą badania prowadzone na mutantach. Obecnie znanych jest szereg mutantów, u których obserwuje się zaburzenia w ekspresji genów lub prawidłowej budowie powstających na ich bazie polipeptydów [6, 54, 82, 94, 95, 97, 100]. Jako jeden z pierwszych zidentyfikowany został mutant *lh* (*long hypocotyl*) ogórka, który charakteryzuje się brakiem ekspresji *PHYB* [43]. Podobne właściwości wykazuje mutant *hy3* (*long hypocotyl*) rzodkiewnika [64] oraz *tri* (*temporarily red light-insensitive*)

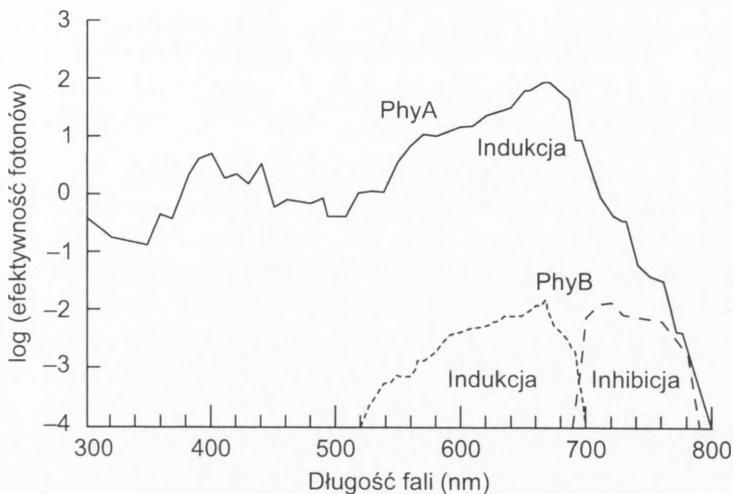
pomidora [91]. Wyzolowano również mutantą rzodkiewnika (*hy8*) pozbawionego labilnej puli fitochromu [25, 61]. Natomiast u pomidora zidentyfikowano trzy mutanty *phyA*, przy czym u *fri* (*far-red light-insensitive*) [37, 38] mutacja dotyczy białkowego składnika fotoreceptora. Dwa inne mutanty tej rośliny, a mianowicie *au* (*aurea*) i *yg-2* (*yellow green 2*) [90] oraz mutant *hyl* (*long hypocotyl*) rzodkiewnika [21] charakteryzują się zaburzeniami w szlaku biosyntezy grupy chromoforowej [80]. Oprócz wymienionych mutantów u pomidora i rzodkiewnika stwierdzono zaburzenia dotyczące funkcjonowania indukowanych przez światło łańcuchów transdukcji sygnału świetlnego [5, 54, 82]. U pomidora mutacja typu *hp* (*high pigment*), prowadzi do nadmiernej wrażliwości etiolowanych siewek na działanie światła [37, 38]. Ostatnio u rzodkiewnika opisano mutację, która prowadzi do zaburzeń szlaku transdukcji sygnału świetlnego kontrolowanego przez labilną [5, 6] lub stabilną [94] pulę fitochromu. Znanych jest również szereg genów, które w drodze negatywnego sprzężenia kontrolują proces fotomorfogenezy [18, 27, 40, 48, 96]. Mutacje powstające w obrębie tych genów prowadzą do tego, że fenotyp roślin etiolowanych przypomina pokrój roślin zielonych. Tego typu mutanty mają krótkie hypokotyle oraz częściowo lub w pełni rozwinięte chloroplasty. Ponieważ fotomorfogenetyczne mutanty szerzej opisane zostały w naszych poprzednich pracach [54, 82], stąd ich ponowne omawianie wykracza poza ramy prezentowanej publikacji.

KOMÓRKOWY MECHANIZM DZIAŁANIA

Dotychczas mało było wiadomo na temat pierwszych etapów reakcji wyzwalanych w wyniku absorpcji światła przez cząsteczki dwóch odmiennych pul fitochromu. Bardzo istotnych informacji na ten temat dostarczyły doświadczenia przeprowadzone nad kiełkowaniem światłoczułych nasion rzodkiewnika [74, 75]. Ustalono, że natychmiast po ich spęcznieniu jedynie forma P_{fr} fitochromu typu B indukuje ten proces, który wykazuje cechy klasycznej reakcji indukcyjnej (fotoodwracalność). Żaden z innych fitochromów (PhyA, C, D i E) nie był w stanie zainicjować kiełkowania [74]. Natomiast nasiona moczone przez 48 godz. w ciemności kiełkowały w obecności znacznie niższych dawek światła ($1-1000 \text{ mmol} \times \text{m}^{-2}$ w porównaniu do $10-1000 \text{ mmol} \times \text{m}^{-2}$). Nasiona mutantą pozbawionego fitochromu A nie reagowały na traktowanie światłem, podczas gdy nasiona mutantą *phyB* kiełkowały w podobny sposób jak rośliny typu dzikiego. Na tej podstawie można wnioskować, że opisywana reakcja ma charakter VLFR [74]. Następnie ustalono widmo czynnościowe dla kiełkowania nasion kontrolowanego przez fitochrom labilny i stabilny roślin typu dzikiego oraz obu stosowanych mutantów [75]. Okazało się, że indukowane przez VLFR, zależne od fitochromu A kiełkowanie ma bardzo szerokie widmo czynnościowe (rys. 4), obejmujące zakres od 300 do 700 nm [29, 75].

W tym wypadku reakcja nie miała charakteru odwracalnego. Użycie dowolnej barwy światła we wspomnianym zakresie prowadziło do indukcji kiełkowania. Z drugiej strony, kontrolowana przez PhyB fotoodwracalna indukcja kiełkowania miała wąski przedział widma czynnościowego, mieszczący się w granicach od 550 do 690 nm (rys. 4). Stymulacja kiełkowania odwracana była przez światło w granicach od 700 do 800 nm o podobnym natężeniu [75].

Jak widać, mimo że obydwa typy fitochromu wykazują podobne spektrofotometryczne właściwości w warunkach *in vitro*, widma czynnościowe dla PhyA i PhyB mogą być zupełnie odmienne. Ponadto sugeruje to, że w obu przypadkach P_{fr} jest aktywną formą fitochromu [29]. Jednocześnie nasuwa się pytanie, dlaczego reakcje kontrolowane przez PhyA mogą być indukowane przez światło o natężeniu o cztery rzędy wielkości niższym w porównaniu do PhyB (patrz rys. 4). Istnieje wiele możliwych interpretacji tego zjawiska. Po pierwsze może to być wynikiem różnej liczby cząsteczek obu form fitochromu. Na proces ten może mieć wpływ różne powinowactwo tychże fitochromów w stosunku do odpowiednich białek receptorowych, jak również może istnieć zasadnicza różnica w stopniu wzmocnienia sygnału indukowanego przez PhyA i PhyB [29]. By zrozumieć te zawiłości, zaproponowano model hetero-homodimerowej budowy fizjologicznie aktywnej formy fitochromów [89]. Jak ustalono, fitochrom *in vitro* i *in vivo* występuje w formie dimerycznej [84]. Wnioskuje się, że aktywna forma fitochromu labilnego funkcjonuje w formie heterodimeru ($PhyA_rPhyA_{fr}$), natomiast fitochromu stabilnego w postaci homodimeru ($PhyB_{fr}PhyB_{fr}$) [89]. W omawianym modelu zakłada się, że heterodimer PhyB byłby fizjologicznie nieaktywny (rys. 5). Biorąc pod uwagę, że w pojedynczej



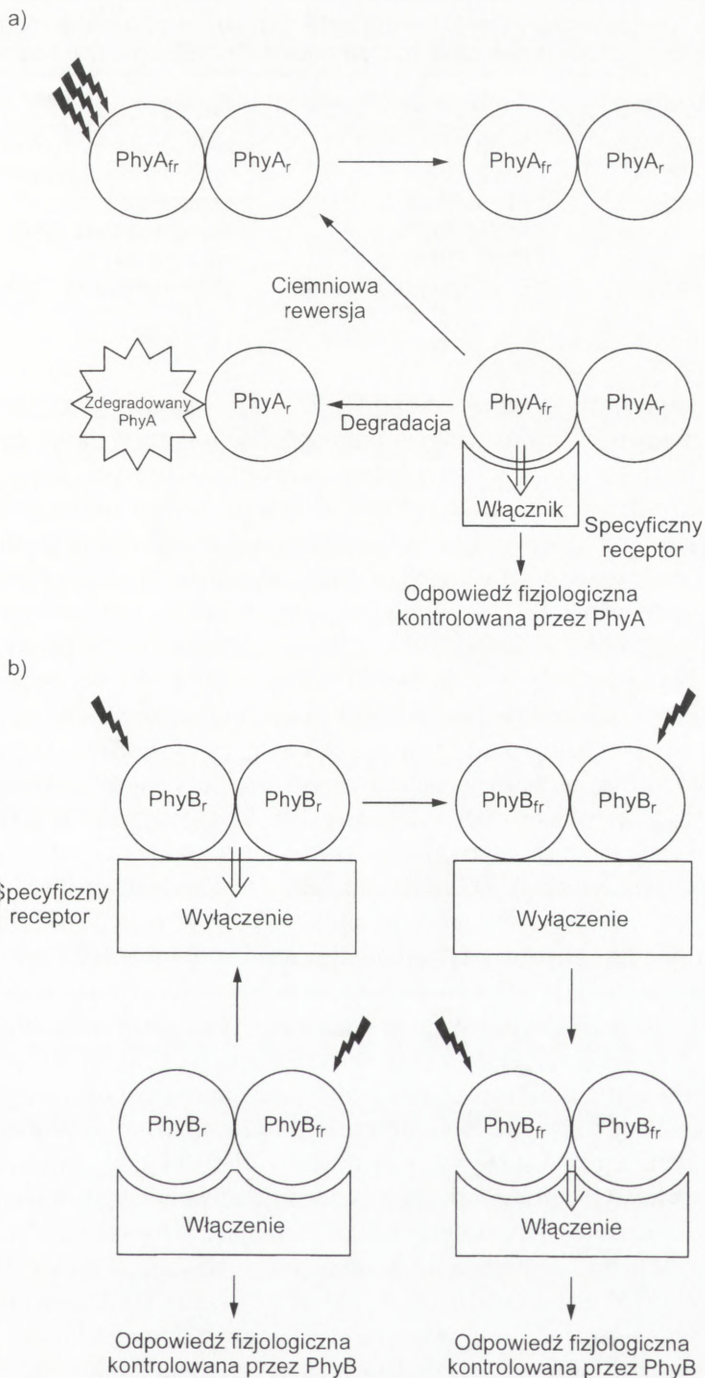
RYSUNEK 4. Widmo czynnościowe kiełkowania nasion rzodkiewnika, kontrolowanego przez PhyA i PhyB: na osi rzędnych zaznaczono natężenie światła dla określonych długości fal stymulujących bądź hamujących ten proces (dalszy opis w tekście, na podstawie [56 i 74], zmodyfikowane)

komórce występuje od stu tysięcy do miliona cząsteczek PhyA, do zaindukowania VLFR wystarczy od 1 do 10% całej populacji tej formy fitochromu (tj. od 10 do 100 tys. cząsteczek) w formie heterodimeru. Reszta cząsteczek występuje w formie fizjologicznie nieaktywnego homodimeru $\text{PhyA}_r\text{PhyA}_r$. Ponieważ w reakcjach kontrolowanych przez LFR w skrajnych przypadkach 86% fitochromu występuje w postaci P_{fr} , stąd można przypuszczać, że liczebność heterodimerów $\text{PhyA}_r\text{PhyA}_{fr}$ oraz homodimerów $\text{PhyB}_{fr}\text{PhyB}_{fr}$ jest podobna [29]. Czy w związku z tym dla obu form fitochromu istnieją podobne receptory, a jedynie ich mechanizm transdukcji sygnału ma odmienny charakter?

Należy pamiętać, że liczebność PhyA u wielu roślin (np. owsa i rzodkiewnika) 100-krotnie przewyższa liczebność PhyB. Różnica ta może sugerować, że w warunkach naturalnych pierwsze etapy fotomorfogenezy mogą być zdominowane przez fitochrom labilny. Aby tego typu reakcje mogły się dopełnić, PhyA ma jeszcze dwie inne cechy. Po pierwsze cząsteczki PhyA_{fr} ulegają bardzo szybkiej proteolizie [24]. Po drugie zaś, synteza nowych cząsteczek PhyA_r jest hamowana przez cząsteczki PhyA_{fr} oraz PhyB_{fr} [55, 58, 84]. Zapewnia to etiolowanej roślinie nadzwyczajną wrażliwość na pierwszy puls światła (bez względu na jego barwę). Natomiast w roślinach zielonych, poddanych reetiolacji lub rozwijających się w warunkach zacienienia umożliwia optymalizację aktywacji podstawowych genów związanych z procesem fotosyntezy. Jeden z tych genów (*CAB*) kodujący małą podjednostkę karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-bisfosforanowej (rubisko) jest w różnicowany sposób regulowany przez obydwie pule fitochromu [49]. W hypokotylach rzodkiewnika PhyA_{fr} działa jedynie w sposób indukcyjny (nieodwracalny), podczas gdy wpływ PhyB_{fr} ma charakter fotoodwracalny. Gen *CAB* może być również indukowany w sposób niezależny od fitochromu w wyniku aktywacji kryptochromu [4, 49]. Poza *CAB* również inny gen *Arabidopsis*; *ATHB* podlega bardzo złożonej regulacji przez różne typy fitochromu i fotoreceptor światła niebieskiego [79].

FITOCROM JAKO ENZYM

W cząsteczce fitochromu, podobnie jak w wielu białkach o charakterze regulatorowym, wyróżnia się dwie domeny strukturalno-funkcjonalne: N- i C-końcową. Większa, globularna domena N-końcowa odpowiada za wiązanie grupy chromoforowej, natomiast druga z nich bierze między innymi udział w procesie dimeryzacji cząsteczek tego fotoreceptora [84]. Stosując różne podejścia badawcze, między innymi ograniczoną proteolizę wyizolowanych cząsteczek fitochromowych lub ukierunkowaną mutagenizację kodujących je genów, ustalono, że w polipeptydzie omawianego barwnika istnieje kilka odcinków, które odpowiadać mogą za jego biologiczną aktywność (patrz [84, 93]). Pod koniec lat osiemdziesiątych stwierdzono, że pewne sekwencje aminokwasowe fitochromu mogą odpowiadać za jego funkcjonowanie jako kinazy białkowej. Wykazano, że izolowany fitochrom ma zdolność

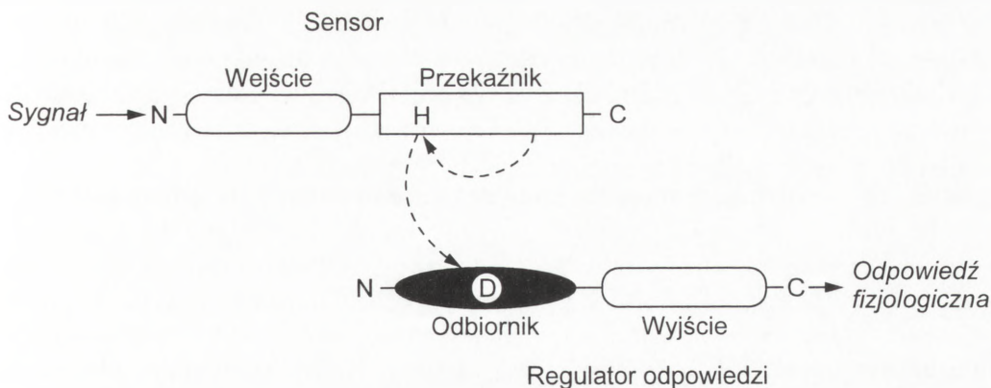


RYSUNEK 5. Model ilustrujący rolę homo-, i heterodimerów labilnej (a) i stabilnej (b) puli fitochromu w mechanizmie działania tych fotoreceptorów (na podstawie [29], zmodyfikowane)

TABELA 2. Udział labilnej (PhyA) i stabilnej (PhyB) puli fitochromu w regulacji niektórych procesów fizjologicznych (na podstawie [29], zmodyfikowane)

Stadium rozwojowe	Funkcjonalny fitochrom	Zjawisko
Nasiona spoczynkowe	PhyB	kiełkowanie w ciemności
Nasiona spęczniałe	PhyA, PhyB	fotoindukcja kiełkowania
Siewki etiolowane	PhyA, PhyB	deetiolacja
	PhyA, PhyB	ekspresja genu <i>CAB</i>
Siewki zielone	PhyB, PhyD	wzrost pędu
Rozwój generatywny	PhyB (przypuszczalnie)	fotoperiodyczna indukcja kwitnienia

do autofosforylacji reszt serynowych [47, 52, 98]. Również komputerowa analiza układu aminokwasów w omawianym polipeptydzie wskazywała na jego podobieństwo do eukariotycznych serynowo/treoninowo/tyrozynowych kinaz białkowych [87]. Jednakże, poza jednym wyjątkiem (o którym będzie mowa poniżej), żaden z przeanalizowanych polipeptydów fitochromowych nie miał wszystkich konserwatywnych motywów przypisywanych eukariotycznym kinazom białkowym [31]. Ponadto, zastosowanie dokładniejszej procedury izolacji i oczyszczania cząsteczek fitochromu pozwoliło stwierdzić, że wcześniej uzyskiwane preparaty zanieczyszczone były białkiem, które ma aktywność kinazową [30, 39]. Na początku lat dziewięćdziesiątych opublikowane zostały prace dotyczące budowy fitochromu funkcjonującego w komórkach jednego z mszaków – *Ceratodon purpureus* [3, 88]. Okazało się, że na bazie genu różniącego się budową od pozostałych genów fitochromowych powstaje białko, o masie 145 kDa, mające dwojakiego rodzaju właściwości molekularne. Jego domena N-końcowa odpowiada właściwościom fitochromu. Natomiast w końcu C występują sekwencje aminokwasowe homologiczne do eukariotycznych kinaz serynowo/treoninowo/tyrozynowych [88]. Jak dotąd, nie stwierdzono jednak, aby poza *Ceratodon* [3, 88] i *Adiantum* [92] inne fitochromy, również te funkcjonujące w komórkach roślin niższych [56], miały podobną budowę molekularną. Równoległe, pojawiła się seria prac wydanych przez grupę niemieckich badaczy kierowana przez H.A.W. Schneidera-Poetscha [70-72], którzy stwierdzili istnienie dużej homologii między pewnymi fragmentami C-końcowego odcinka fitochromu a funkcjonującymi w komórkach bakterii kinazami histydynowymi [70-72]. Tego typu kinazy stanowią podstawowy element tzw. dwuskładnikowego systemu transdukcyjnego bakterii [60]. W jego skład wchodzi dwa białka, pierwsze o charakterze sensorowym, drugie natomiast mające aktywność efektorową (rys. 6). Każde z nich ma dwie domeny o odmiennych funkcjach molekularno-biochemicznych. W skład białka sensorowego wchodzi N-końcowa domena uczestnicząca w odbiorze sygnałów środowiskowych oraz C-końcowa domena, która ma aktywność kinazy histydynowej. W wyniku oddziaływania czynnika środowiskowego na cząsteczkę sensora dochodzi do zmian jego konformacji przestrzennej, co pociąga



RYSUNEK 6. Schemat przedstawiający budowę bakteryjnego dwuskładnikowego systemu transdukcji sygnałów środowiskowych (na podstawie [60], zmodyfikowane)

za sobą aktywację kinazy histydynowej [60]. Ponieważ cząsteczki sensorowe funkcjonują w postaci dimerów, najpierw dochodzi do wzajemnej fosforylacji (autofosforylacji) poszczególnych monomerów, a następnie do przeniesienia reszty fosforanowej z histydyny na asparaginę drugiego składnika omawianego systemu transdukcijnego. Również i to białko składa się z dwóch odmiennych domen (rys. 6). W pierwszej (N-końcowej) znajduje się wspomniana reszta aminokwasowa. Natomiast druga uczestniczy w oddziaływaniu z innymi białkami szlaku transdukcji sygnału lub bezpośrednio łączy się z sekwencjami promotorowymi określonych genów [56, 57, 60].

Ustalono, że u 100 dotąd poznanych prokariotycznych kinaz histydynowych istnieje jedynie niewielki stopień identyczności składu aminokwasów. Również stopień identyczności fitochromów z kinazami histydynowymi jest niski (15–39%). Jednakże znacznie wyższy jest stopień podobieństwa tychże białek, który w skrajnych wypadkach dochodził do 55% [57]. Porównując odpowiednie odcinki cząsteczek fitochromów z podobnymi występującymi u omawianych kinaz okazało się, że stopień identyczności tych pierwszych, który wynosi 31–64% (a podobieństwa 54–81%), jest wyższy w porównaniu do drugiej klasy białek, dla których waha się on w granicach od 24 do 42% (a podobieństwa od 47 do 61%) [57]. Wyniki te wskazują na dużą zachowawczość ewolucyjną tych fragmentów fitochromu, które mogą być związane z jego funkcjonowaniem jako kinazy histydynowej. Stwierdzono, że przestrzenna organizacja tej domeny fitochromowej przypomina struktury, obserwowane w bakteryjnych białkach sensorowych. Zauważono również, że białka te występują w formie dimerycznej. Na tej podstawie Schneider-Poetsch zaproponował [70], że fitochrom może funkcjonować jako regulowana przez światło kinaza histydynowa. Niestety okazało się, że w cząsteczkach fitochromu brak jest pewnych silnie kon-

serwatycznych motywów obecnych w bakteryjnych kinazach. Nie udało się również stwierdzić autokatalitycznych właściwości w preparatach zawierających wysoce oczyszczone cząsteczki fitochromu. Również przeprowadzona w drodze ukierunkowanej mutagenazy wymiana określonych aminokwasów, które są niezbędne do funkcjonowania kinaz histydynowych, nie doprowadziła do spodziewanych efektów [15].

Jak już wspomniano wyżej, ostatnio zsekwencjonowano cały genom sinicy *Synechocystis sp.*, co pozwoliło między innymi stwierdzić, że jeden z występujących w nim genów może kodować białko o właściwościach zbliżonych do fitochromu [34]. Białko to, poza fitochromo-podobną domeną N-końcową zawiera fragment C-końcowy, który w 23–31 procentach jest identyczny (i w 50–58% podobny) do bakteryjnych kinaz histydynowych (patrz rys. 1). W białku sinicy obecne są wszystkie sekwencje aminokwasowe warunkujące jego funkcjonowanie jako wspomnianego enzymu. W związku z tym prawdopodobnie wydaje się, że może ono pełnić funkcje regulowanej przez światło kinazy histydynowej [56]. Można również spekulować, że układy transdukcji sygnałów u bakterii i sinic, to jest organizmów prokariotycznych są bardzo do siebie podobne. Ponadto, występowanie u *Synechocystis* i *Fremyella* genów kodujących białka o właściwościach zbliżonych do fitochromu (o czym była również mowa powyżej) wskazuje, że sinice były pierwszymi organizmami, które miały układ percepcji bodźców świetlnych podobnych do funkcjonującego u wszystkich (poza grzybami) roślinnych organizmów eukariotycznych. Układ ten, ewoluował w kierunku fitochromu występującego u roślin niższych, wykazującego pośrednie właściwości między fitochromem labilnym i stabilnym (patrz [62, 84]). Ostatecznie, doszło do powstania systemu fotoreceptorów charakterystycznych dla roślin wyższych, kodowanego przez geny odpowiedzialne za powstawanie fitochromu labilnego i stabilnego.

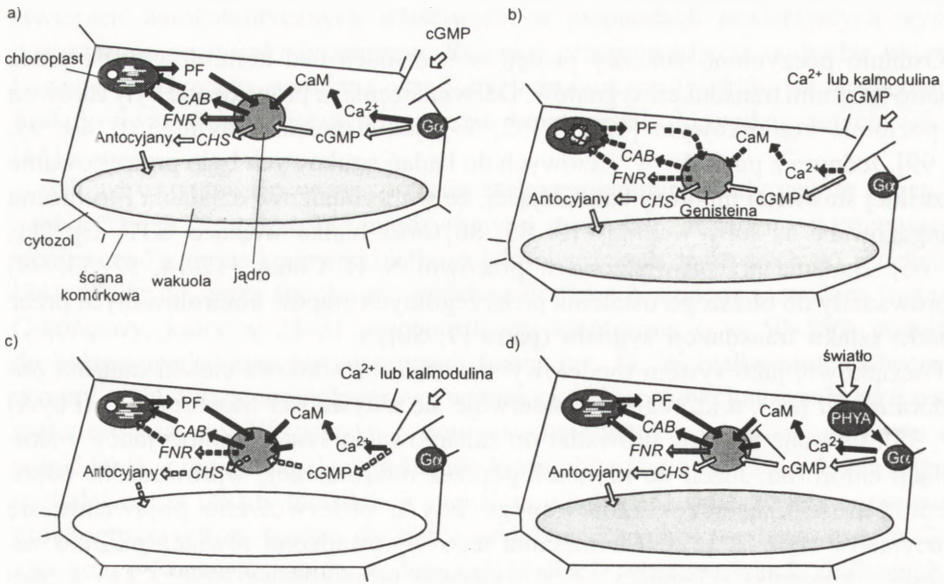
Czy wraz z ewolucją fitochromu zmianom ulegały enzymatyczne właściwości tego barwnika obserwowane u sinic? Być może w trakcie tego procesu doszło do utraty jego katalitycznych funkcji, choć pewne charakterystyczne właściwości dla układów sygnalizacyjnych, funkcjonujących u bakterii pozostały. Jedną z nich może być dimeryczna budowa tego fotoreceptora. Nie można również wykluczyć możliwości, że w wyniku ewolucji doszło do modyfikacji katalitycznych właściwości przypisywanych kinazom histydynowym. Przecież i u bakterii znane są przypadki, w których kinazy histydynowe mają zdolność do fosforylowania reszt serynowych. Czy zatem podobną sytuację obserwować można u fitochromu, któremu przypisywano rolę kinazy serynowej? A może podobnie jak białka sensorowe dwuskładnikowego układu transdukcji sygnału u bakterii cząsteczki fitochromu zachowały właściwości fosfataz białkowych? Istnieją pewne dowody potwierdzające tę hipotezę [56, 57]. Najbliższa przyszłość wykaże, czy ten nowy trop na drodze poszukiwań komórkowego mechanizmu działania fitochromu okaże się prawdziwy.

TRANSDUKCJA SYGNAŁÓW ŚWIETLNYCH

Ostatnio poczyniono znaczny postęp w badaniach nad kontrolowanymi przez światło szlakami transdukcji sygnałów. Doświadczenia te prowadzone były zarówno na poziomie komórkowym [12, 14, 52, 53], jak i molekularnym [5, 6, 40, 95, 98, 99]. Jednym z punktów wyjściowych do badań naukowych było przetestowanie wcześniej stawianej hipotezy zakładającej, że w mechanizmie działania fitochromu zaangażowane są jony wapnia [10, 85, 86] oraz białka wiążące GTP, Gp [11, 65, 66]. Badania przeprowadzone w pracowni N.-H. Chuay [12-14, 52, 53, 99] doprowadziły do bliższego ustalenia poszczególnych etapów kontrolowanych przez światło szlaku transdukcji sygnału (patrz [7, 50]).

Początkowo, jako system modelowy stosowano 10-dniowe siewki mutantu pomidora *aurea* (*au*), u którego nie obserwuje się aktywności fitochromu A (PhyA) [37, 38]. Opisana mutacja prowadzi do zahamowania syntezy antocyjanów i akumulacji chlorofilu. Jeżeli do komórek poprzez mikroiniekcję wprowadzono odpowiednią ilość cząsteczek izolowanego PhyA, obserwowano pojawianie się antocyjanów (rys. 7) [52]. Do mutantu tego wprowadzono również plazmid zawierający konstrukt składający się z sekwencji promotorowej genu *CAB* i gen reporterowy β -glukuronidazy (*CAB::GUS*). W tym przypadku wstrzyknięcie do transformowanych komórek PhyA prowadziło do uaktywnienia tego konstruktu (co uwidaczniało się w postaci pojawiania się produktu reakcji enzymatycznej) [52]. Stosując opisany system modelowy przystąpiono do badania wpływu różnych modulatorów zwierzęcych szlaków transdukcji sygnałów na procesy charakterystyczne dla komórek roślinnych – syntezę antocyjanów i białek wchodzących w skład obydwu fotosystemów. Okazało się, że wstrzyknięcie do komórek *au* agonisty białka G (GTP- γ -S) lub podjednostki toksyny cholery (które aktywują Gp) prowadziło do ujawnienia się wszystkich trzech reakcji (akumulacji chlorofilu i antocyjanów oraz aktywacji *CAB::GUS*). Z drugiej strony, równoczesna mikroiniekcja PhyA i antagonistów białka G (GDP- β -S lub toksyny krztuśca) blokowała wszystkie te trzy procesy indukowane przez fitochrom labilny [52]. Podobnie jak Romero i Lam [65] oraz Romero i in. [66] wykonawcy tych doświadczeń [52] wykazali, że jednym z pierwszych etapów szlaku transdukcji sygnału jest aktywacja białka G, a jego ostatecznym wynikiem pojawianie się określonych odpowiedzi komórkowych.

W transdukcji sygnałów świetlnych u mutantu *aurea* zaangażowane są jony wapnia oraz kalmodulina. Wstrzyknięcie odpowiedniej ilości Ca^{2+} lub określonej liczby cząsteczek kalmoduliny prowadziło do pojawiania się na terenie plastydów chlorofilu i do aktywacji *CAB::GUS* [5]. Ku dużemu zaskoczeniu takie traktowanie nie indukowało pojawiania się w wakuolach *au* antocyjanów (rys. 7b). W ten sposób ustalono, że działające przez fitochrom światło aktywuje białko G, co przez wzrost



RYSUNEK 7. Podsumowanie doświadczeń prowadzonych na mutancie *aurea* pomidora (podobne wyniki uzyskano również w badaniach wykonanych na zawiesinach komórkowych soi): a) wstrzyknięcie do komórki cząsteczek fitochromu (PhyA) lub agonistów białka wiążącego GTP powodowało aktywację trzech badanych genów (*CHS*, *FNR* i *CAB*) i pojawienie się funkcjonalnych plastydów (zawierających chlorofil) a wewnątrz wakuoli antocyjanów; b) wstrzyknięcie cGMP indukowało jedynie aktywację *CHS* i syntezę antocyjanów, a efekt ten hamowany był przez genisteinę; c) wprowadzenie do wnętrza komórki jonów wapnia lub cząsteczek kalmoduliny, poprzez aktywację genów *FNR* i *CAB* prowadziło do pojawiania się funkcjonalnych chloroplastów (przy braku syntezy antocyjanów); proces ten hamowany był w wyniku jednoczesnego podania Ca²⁺ (lub kalmoduliny) oraz nifedypiny lub trifluoroperazyny; d) przypuszczalny mechanizm działania PhyA. Różne strzałki przedstawiają odmienne szlaki transdukcji sygnału: wypełnione – zależne od jonów wapnia, puste – zależne od cGMP, a pośrednie – zależne od obu przekazników informacji. Strzałka przerywana wskazuje na brak aktywacji określonego szlaku transdukcji. Do pełnej biogenezy chloroplastów niezbędne jest uaktywnienie nieznanego czynnika

zawartości wolnego cytoplazmatycznego wapnia i aktywację kalmoduliny indukuje różnicowanie się proplastydów w chloroplasty [52]. Składniki drugiego szlaku transdukcji sygnału, prowadzące do syntezy antocyjanów zostały rozpoznane przez Bowlera i in. [12–14]. Jako pierwszy system modelowy posłużyły siewki mutantu *aurea*. Wstrzyknięcie do subepidermalnych komórek *au* PhyA stymulowało aktywność następujących genów: syntazy chalconowej (*CHS*, kluczowego enzymu uczestniczącego w syntezie antocyjanów), białka wiążącego chlorofil a i b (*CAB*), syntazy ATP (*ATPγ*), małej podjednostki karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-bisfosforanowej (*RBCS*), cytochromu b6f (*RIESKE*) i oksydoreduktazy NADP⁺/ferredoksyna

(*FNR*) [13]. Jednoczesne wstrzyknięcie do komórek mutantu cząsteczek fitochromu labilnego, GTP- γ -S, cząsteczek toksyny cholery i plazmidu zawierającego jeden z trzech konstruktów – *CAB::GUS*, *CHS::GUS* lub *FNR::GUS* prowadziło do pojawienia się aktywności genu reporterowego [13]. Ponadto, mikroiniekcja Ca^{2+} lub kalmoduliny aktywowała konstrukty *CAB::GUS*, a cGMP konstrukty *CHS::GUS*. Niestety, opisane doświadczenia były pracochłonne i tylko niewielki procent nastrzykiwanych komórek reagował na podawane substancje (w skrajnych przypadkach nie więcej niż 10%) [13, 52], dlatego do dalszych badań zastosowano fotomikso-troficzne zawiesiny komórkowe soi, które przez trzy dni poddawano ciemniowej adaptacji [13]. W komórkach tych badano aktywność transkrypcyjną trzech genów: *CAB*, *CHS* i *FNR* [14]. Traktowanie zawiesiny światłem powodowało natychmiastową indukcję *CHS*, którego szczyt aktywności transkrypcyjnej przypadał w drugiej godzinie naświetlania. W podobnych warunkach aktywność genu *CAB* pojawiała się w trzeciej godzinie doświadczenia, a zawartość powstającego na jego bazie mRNA podlegała okołodobowym fluktuacjom. Natomiast produkt genu *FNR* ujawniał się w piątej godzinie i ulegał stopniowej akumulacji przez cały czas działania światła [14]. Dodanie do pożywki nie hydrolizującego analogu cGMP (8-Br-cGMP) powodowało wybiórcze uaktywnienie genu *CHS*. Podobnie działał nitroprusydek sodu (który rozkładając się uwalnia NO – związek stymulujący aktywność cykazy guanylowej, enzymu uczestniczącego w syntezie cGMP). Jednakże indukcyjny efekt obu wymienionych związków znoszony był przez dodanie do pożywki genisteiny – inhibitora cykazy guanylanowej (rys. 7c) [14]. W kolejnym doświadczeniu zastosowano substancje blokujące różne etapy zależnej od jonów wapnia transdukcji sygnału. Była to nifedypina (bloker kanałów wapniowych), trifluoroperazyna (inhibitor kalmoduliny) i staurosporyna (potencjalny inhibitor kinazy białkowej C). Wszystkie te związki hamowały indukowaną przez światło ekspresję genów *CAB* i *FNR* (rys. 7d). Z drugiej zaś strony, większe ich stężenia podwyższały aktywność genu *CHS* [14]. Na tej podstawie można wnioskować, że aktywacji szlaku zależnego od jonów wapnia towarzyszy negatywna regulacja genów indukowanych przez cGMP i *vice versa*.

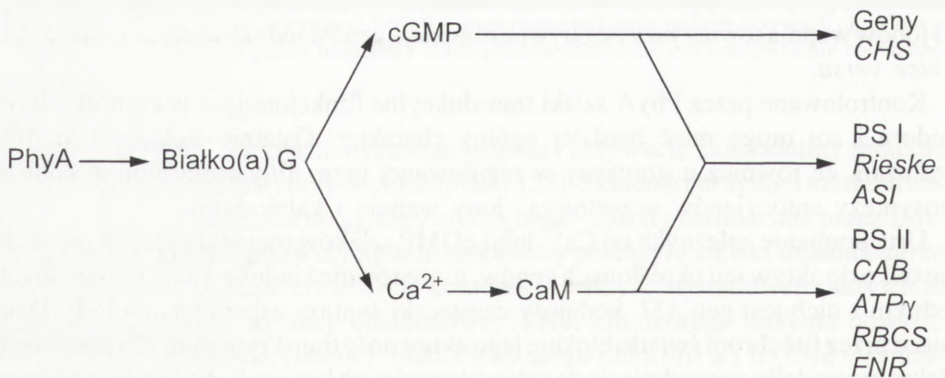
Kontrolowane przez PhyA szlaki transdukcyjne funkcjonujące w komórkach pomidora i soi mogą mieć bardziej ogólny charakter. Ostatnio Schäfer i in. [68] wykazali, że również u gorczycy w regulowanej przez fitochrom labilny kontroli biosyntezy antocyjanów uczestniczą jony wapnia i kalmodulina.

Uruchomienie zależnych od Ca^{2+} lub/i cGMP szlaków transdukcyjnych prowadzi nie tylko do aktywacji określonych genów, może również indukować represje innych. Jednym z nich jest gen *ASI* kodujący cząsteczki syntazy asparagianinu [53]. Działające przez fitochrom światło blokuje jego aktywność transkrypcyjną. Do podobnego efektu prowadziło wstrzyknięcie do subepidermalnych komórek etiolowanych siewek *aurea* izolowanego P_{fr}A. Jednakże, osobne podanie Ca^{2+} , kalmoduliny lub cGMP nie miało wpływu na ekspresję *ASI* w traktowanych światłem siewkach *au*. Na-

tomiast jednoczesne wstrzyknięcie Ca^{2+} i cGMP blokowało aktywność tego genu. Badania molekularne wykazały, że w promotorowym odcinku genu ASI zlokalizowany jest fragment DNA (17 bp), w którym leżą sekwencje odpowiedzialne za regulację jego aktywności – tak negatywnej, jak i pozytywnej. Badania porównawcze wykazały, że również inne geny, które podlegają represji świetlnej, zawierają podobny motyw, który charakteryzuje się obecnością czterech identycznych zasad: TGGG [53]. Sekwencja ta jest prawdopodobnie docelowym miejscem działania represora, który przed związaniem się ze wspomnianą sekwencją DNA aktywowany jest w wyniku uruchomienia przez światło szlaków transdukcyjnych zależnych zarówno od Ca^{2+} i cGMP [53].

Podsumowując można stwierdzić, że fitochrom A przypuszczalnie kontroluje trzy szlaki transdukcji sygnałów świetlnych [7, 12, 14, 52, 53, 68]. Pierwszy z nich jest bezpośrednio zależny od Ca^{2+} , a jego uruchomienie prowadzi do aktywacji genów kodujących białka II fotosystemu (rys. 8) i częściowego rozwoju chloroplastów. Drugi szlak, zależny od cyklicznego GMP, kontroluje aktywność transkrypcyjną syntazy chalkonowej, kluczowego enzymu katalizującego biosyntezę antocyjanów. Na przebieg trzeciego szlaku mają wpływ zarówno jony wapnia, jak i cząsteczki cGMP, a jego aktywacja niezbędna jest do ekspresji genów kodujących składniki fotosystemu I i hamowania aktywności genu syntazy asparaginianowej (rys. 8). Jedynie uporządkowana w czasie i przestrzeni aktywacja wszystkich trzech wymienionych szlaków transdukcyjnych prowadzić może do pojawiania się w odpowiednich komórkach antocyjanów oraz różnicowania się chloroplastów i uruchamiania procesu fotosyntezy [7, 12–14, 50–53].

Na przełomie 1996 i 1997 roku pojawiły się prace opisujące molekularny mechanizm działania cGMP i Ca^{2+} na ekspresję genów kontrolowanych przez fitochrom. Wu i in. [99] wykazali, że w odcinkach promotorowych genów *CAB* i *CHS* występują sekwencje, do których przyłączają się białka aktywowane bezpośrednio lub pośrednio



RYSUNEK 8. Model ilustrujący trzy możliwe szlaki transdukcji sygnałów świetlnych, indukowanych przez światło i kontrolowanych przez PhyA (dalszy opis w tekście, na podstawie [12], zmodyfikowane)

przez dwa wyżej wspomniane wtórne przekaźniki informacji. Fakt istnienia kilku różnych, kontrolowanych przez fitochrom A szlaków transdukcji sygnału został również potwierdzony przez Barnes i in. [6] w badaniach prowadzonych na mutancie *Arabidopsis*, u którego defekt dotyczył genu *FHY1*. Badacze ci, do listy genów kontrolowanych przez fitochrom labilny dołączyli kolejne, *CHI* (izomerazy chalconowej), *NR* (reduktazy azotanowej) oraz *PORA* (oksydoreduktazy NADPH^+ : protochlorofilid) [6].

Wszystkie wyżej opisane prace poświęcone były analizom składników szlaku transdukcji sygnałów świetlnych kontrolowanych przez labilną pulę fitochromu. Jak dotąd mało wiadomo o szlakach fototransdukcji indukowanych przez fitochrom stabilny. Pewnym wyjątkiem może być ostatnio opublikowana praca Wagnera i in. [94]. Badaczom tym udało się wyselekcjonować mutanta, u którego defekt dotyczy genu (*RED1*) uczestniczącego w zależnej od PhyB transdukcji sygnału [95]. Można przypuszczać, że w najbliższej przyszłości więcej uwagi poświęci się badaniom szlaków transdukcji sygnału kontrolowanych przez fitochrom stabilny.

PODSUMOWANIE

W ostatnich kilku latach rozwiązano wiele zagadek dotyczących struktury i mechanizmu działania fitochromu. Wydaje się, że rozstrzygnięta została kwestia pochodzenia i ewolucji tego fotoreceptora. Poznano budowę genów fitochromowych i mechanizmy kontrolujące ich aktywność transkrypcyjną. Wykazano, że w mechanizmie transdukcji sygnałów świetlnych uczestniczą wtórne przekaźniki informacji, które pełnią podobne funkcje w komórkach zwierzęcych i roślinnych. Ustalono, że aktywacji fitochromu labilnego i stabilnego towarzyszy modulacja aktywności tych samych lub innych zestawów genów. Oczywiście wiele problemów ciągle pozostaje nierozstrzygniętych. Na przykład nie wiadomo, w jaki sposób poszczególne produkty aktywności genów fitochromu stabilnego regulują różne procesy fizjologiczne. Jednakże jeśli weźmie się pod uwagę, że uzyskiwane są coraz to nowe typy mutantów, a techniki biologii molekularnej i genetyki szybko się rozwijają, można przypuszczać, że w najbliższych latach nadal będziemy obserwowali burzliwy rozwój badań nad mechanizmami działania fitochromu i fotomorfogenezą roślin. Pozwoli to na jeszcze lepsze zrozumienie fizjologicznej funkcji tej grupy fotoreceptorów roślinnych.

Podziękowania

Autorzy pragną serdecznie podziękować Profesorowi K. Palme i Dr M. Gooddie z Instytutu Maxa Plancka w Kolonii za wszelką pomoc, jaką okazali autorom w trakcie pisania niniejszej pracy.

LITERATURA

- [1] ADAM E, KOZMABOGNAR L, SCHÄFER E, NAGY F. Tobacco phytochromes – genes, structure and expression. *Plant Cell Environ* 1997; **20**: 678–684.
- [2] AHMAD M, CASHMORE AR. The *HY4* gene involved in blue light sensing in *Arabidopsis thaliana* encodes a protein with the characteristics of a blue light photoreceptor. *Nature* 1993; **366**: 162–166.
- [3] ALGARRA P, LINDER S, THUMMLER F. Biochemical evidence that phytochrome of the moss *Ceratodon purpureus* is a light-regulated protein kinase. *FEBS Lett* 1993; **315**: 69–73.
- [4] ANDERSON LA, KAY SA. Phototransduction and circadian clock pathways regulating gene transcription in higher plants. *Adv Genet* 1997; **35**: 1–34.
- [5] BARNES SA, QUAGGIO RB, CHUA N-H. Phytochrome signal transduction: Characterisation of pathways and isolation of mutants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1995; **350**: 67–74.
- [6] BARNES SA, QUAGGIO RB, WHITELAM GC, CHUA N-H. *fhy1* defines a branch point in phytochrome A signal transduction pathways for gene expression. *Plant J* 1996; **10**: 1155–1161.
- [7] BARBIER-BRYGOO H, JOYARD J, PUGIN A, RANJEVA R. Intracellular compartmentation and plant cell signalling. *TIPS* 1997; **2**: 214–222.
- [8] BLEECKER AR, SCHALLER GE. The mechanism of ethylene perception. *Plant Physiol* 1996; **111**: 653–660.
- [9] BORTHWICK HA, HENDRICKS SB, PARKER MW, TOOLE EH, TOOLE VK. A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1952; **38**: 662–666.
- [10] BOSSEN ME, DASSEN HHA, KENDRICK RE, VREDENBERG WJ. The role of calcium ions in phytochrome-controlled swelling of etiolated wheat (*Triticum aestivum* L.) protoplasts. *Planta* 1988; **174**: 94–100.
- [11] BOSSEN ME, TRETYN A, KENDRICK RE, VREDENBERG WJ. Comparison between swelling of etiolated wheat (*Triticum aestivum* L.) protoplast induced by phytochrome and α -naphthalenacetic acid, benzylaminopurine, gibberellic acid, abscisic acid and acetylcholine. *J Plant Physiol* 1991; **137**: 706–710.
- [12] BOWLER C. The transduction of light signals by phytochrome. w Aducci P red. *Signal Transduction in Plants*. Basal, Birkhäuser Verlag, 1997; 137–152.
- [13] BOWLER C, NEUHAUS G, YAMAGATA H, CHUA N-H. Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell* 1994; **77**: 73–81.
- [14] BOWLER C, YAMAGATA H, NEUHAUS G, CHUA N-H. Phytochrome signal transduction pathways are regulated by reciprocal control mechanisms. *Gen Develop* 1994; **8**: 2188–2202.
- [15] BOYAN MT, QUAIL PH. Are phytochromes protein kinases? *Protoplasma* 1996; **195**: 59–67.
- [16] CASEL JJ, SANCHEZ RA, YANOVSKY MJ. The function of phytochrome A. *Plant Cell Environ* 1997; **20**: 813–819.
- [17] CASHMORE AR. The cryptochrome family of photoreceptors. *Plant Cell Environ* 1997; **20**: 764–767.
- [18] CHAMAVITZ DA, DENG X-W. The COP9 complex – a link between photomorphogenesis and general developmental regulation. *Plant Cell Environ* 1997; **20**: 734–739.
- [19] CHORY J. Light modulation of vegetative development. *Plant Cell* 1997; **9**: 1225–1234
- [20] CHORY J, CHATTERJEE M, COOK RK, ELICH T, FANKHAUSER C, LI J, NAGPAL P, NEFF M, PEPPER A, POOLE D, REED J, VITART V. From seed germination to flowering,

- light controls plant development via the pigment phytochrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 12066–12071.
- [21] CHORY J, PETO CA, ASHBAUGH M, SAGANISH R, PRATT LH, AUSUBEL F. Different roles of phytochrome in etiolated and green plants deduced from characterisation of *Arabidopsis thaliana* mutants. *Plant Cell* 1989; **1**: 867–880.
- [22] CHANG C. The ethylene signal transduction pathway in *Arabidopsis*: an merging paradigm. *TIBS* 1996; **25**: 129–134.
- [23] CLACK T, MATHEWS S, SHARROCK RA. The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequence and expression of *PHYD* and *PHYE*. *Plant Mol Biol* 1994; **25**: 413–427.
- [24] CLOUGH RC, VIERSTRA RD. Phytochrome degradation. *Plant Cell Environ* 1997; **20**: 713–721.
- [25] DEHESH K, FRANCIC, PARKS BM, SEELY KA, SHORT TW, TEPPERMAN JM, QUAIL PH. *Arabidopsis PH8* locus encodes phytochrome A. *Plant Cell* 1993; **5**: 1081–1088.
- [26] DENG X-W. Fresh view of light signal transduction in plants. *Cell* 1994; **76**: 423–426.
- [27] DUCKETT CM, GRAY JC. Illuminating plant development. *BioEssays* 1995; **17**: 101–103.
- [28] FURUYA M. Phytochromes: their molecular species, gene family, and functions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1993; **44**: 617–645.
- [29] FURUYA M, SCHÄFER E. Photoperception and signalling of induction reactions by different phytochromes. *TIPS* 1996; **1**: 301–307.
- [30] GRIMM R, GAST D, RÜDIGER W. Characterization of a protein-kinase activity associated with phytochrome from etiolated oat (*Avena sativa* L.) seedlings. *Planta* 1989; **178**: 199–206.
- [31] HANKS SK, QUINN AM. Protein kinase catalytic domain sequences database: Identification of conserved features of primary structure and classification of family members. w Hunter T, Sefton BM red. *Protein Phosphorylation, Part A, Protein Kinases: Assays, Purification, Antibodies, Functional Analysis, Cloning and Expression*. San Diego, Academic Press 1991: 38–62.
- [32] HUGHENS J, LAMPARTER T, MITTMANN F, HARTMANN E, GÄRTNER W, WILDE A, BÖRNER T. A prokaryotic phytochrome. *Nature* 1997; **386**: 663.
- [33] KAKIMOTO T. CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science* 1996; **274**: 982–985.
- [34] KANEKO T, SATO S, KOTANI H, TANAKA A, ASAMIZU E, NAKAMURA Y, MIYAJIMA N, HIROSAWA M, SUGIURA M, SASAMOTO S, KIMURA T, HOSOUCHI T, MATSUNO A, MURAKI A, NAKAZAKI N, NARUO K, OKUMU-RA S, SHIMPO S, TAKEUCHI C, WADA T, WATANABE A, YAMADA M, YASUDA M, TABATA S. Sequence analysis of the genome of the unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res* 1996; **3**: 109–136.
- [35] KEHOE DM, GROSSMAN AR. Similarity of a chromatic adaptation sensor to phytochrome and ethylene receptors. *Science* 1996; **273**: 1049–1411.
- [36] KENDRICK RE, KRONENBERG GHM. red *Photomorphogenesis in Plants*. Dordrecht, Kluwer Press, 1994.
- [37] KENDRICK RE, KERCKHOFFS LHJ, PUNDSNES AS, VAN TUINEN A, KOORN-NEEF M, NAGATANI A., TERRY MJ, TRETYN A, CORDONNIER-PRATT M-M, HAUSER B, PRATT LH. Photomorphogenic mutants of tomato. *Euphytica* 1994; **79**: 227–234.
- [38] KENDRICK RE, KERCKHOFFS LHJ, VAN TUINEN A, KOORNNEEF M. Photomorphogenic mutants of tomato. *Plant Cell Environ* 1997; **20**: 746–751.
- [39] KIM I-S, BAI U, SONG P-S. A purified 124 kDa oat phytochrome does not possess a protein kinase activity. *Photochem Photobiol* 1989; **49**: 319–323.
- [40] KWOK SF, PIEKOS B, MISERA S, DENG X-W. A complement of ten essential and pleiotropic *Arabidopsis COP/DET/FUS* genes is necessary for repression of photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiol* 1996; **110**: 731–742.

- [41] LAGARIAS JC, WONG Y-S, BERKELMAN TR, KIDD DG, MCMICHAEL Jr RW. Structure-function studies on *Avena* phytochrome. w Furuya M red. *Phytochrome and Photoregulation in Plants*. Tokio, *Academic Press* 1987; 51–62.
- [42] LAMPARTER T, PODLEWSKI S, MITTMANN F, SCHNEIDER-POETSCH H, HARTMAN E, HUGHES J. Phytochrome from protonemal tissue of the moss *Ceratodon purpureus*. *J Plant Physiol* 1995, **147**: 426–434.
- [43] LOPEZ-JUEZ E, NAGATANI A, TOMIZAWA K, DEAK M, KERN R, KENDRICK RE, FURUYA M. The cucumber *long hypocotyl* mutant lacks a light-stable PHYB-like phytochrome. *Plant Cell* 1992; **4**: 241–251.
- [44] MANCINELLI AL. The physiology of phytochrome action. w Kendrick RE, Kronenberg GHM red. *Photomorphogenesis in Plants*. Dordrecht, *Kluwer Press* 1994; 211–269.
- [45] MANDOLI DF, BRIGGS WR. Phytochrome control of two low irradiance responses in etiolated oat seedlings. *Plant Physiol* 1981; **67**: 733–739.
- [46] MATHEWS S, SHARROCK RA. Phytochrome gene diversity. *Plant Cell Environ* 1997; **20**: 666–671.
- [47] McMICHAEL Jr RW, LAGARIAS JC. Phosphopeptide mapping of *Avena* phytochrome phosphorylated by protein kinase *in vitro*. *Biochem* 1990; **29**: 3872–3878.
- [48] McNELLIS TW, DENG X-W. Light control of seedling morphogenetic pattern. *Plant Cell* 1996, **7**: 1749–1761.
- [49] MILLAR AJ, KAY SA. The genetic of phototransduction and circadian rhythms in *Arabidopsis*. *BioEssays* 1997; **19**: 209–214.
- [50] MILLAR AJ, MCGRATH RB, CHUA N-H. Phytochrome phototransduction pathways. *Annu Rev Genet* 1994; **28**: 325–349.
- [51] NAGATANI A. Spatial distribution of phytochromes. *J Plant Res* 1997; **110**: 123–130.
- [52] NEUHAUS G, BOWLER C, KERN R, CHUA N-H. Calcium/calmodulin-dependent and -independent phytochrome signal transduction pathways. *Cell* 1993; **73**: 937–952.
- [53] NEUHAUS G, BOWLER C, HIRATSUKA K, YAMAGATA H, CHUA N-H. Phytochrome-regulated repression of gene expression requires calcium and cGMP. *EMBO J* 1997; **16**: 2554–2564.
- [54] NOWAKOWSKA A, TRETYN A. Fotomorfogenetyczne mutanty. *Wiadomości Botaniczne*, 1996, **40**: 37–51.
- [55] QUAIL PH. Photosensory perception and signal transduction in plants. *Curr Opin Gen Develop* 1994, **4**: 652–661.
- [56] QUAIL PH. The phytochromes: a biochemical mechanism of signaling in sight? *Bio-Essays* 1997; **19**: 571–579.
- [57] QUAIL PH. An emerging molecular map of the phytochrome. *Plant Cell Environ* 1997; **20**: 657–665.
- [58] QUAIL PH, BOYLAN MT, PARKS BM, SHORT TW, XU Y, WAGNER D. Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science* 1995; **268**: 675–680.
- [59] QUAIL PH, PARKS BM, SHORT TW. The phytochrome family: Approaches to dissecting photosensory specificity and regulatory activity. w Briggs WR, Heath RL, Tobin EM red. *Regulation of Plant Growth and Development by Light*. Rockville, *Am Soc Plant Physiol* 1996: 42–56.
- [60] PALME K, REDHEAD C, KRISTOFFERSEN P. Phytohormones and signal transduction in plants. [w] Conn PM, Melmed S[2] *Endocrinology: Basic and Clinical Principles*. New York, *Humana Press Inc* 1997: 153–164.
- [61] PARKS BM, QUAIL PH. *hy8*, a new class of *Arabidopsis* long hypocotyl mutants deficient in functional phytochrome A. *Plant Cell* 1993, **5**: 39–48.
- [62] PRATT LH. Phytochromes: differential properties, expression patterns and molecular evolution. *Photochem Photobiol* 1995; **61**: 10–21.

- [63] PRATT LH, CORDONNIER-PRATT M-M, KELMENSEN PM, LAZAROVA GI, KUBATA T, ALBA RM. The phytochrome gene family in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Cell Environ* 1997; **20**: 672–677.
- [64] READ JW, NAGPAL P, POOLE DS, FURUYA M, CHORY J. Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout *Arabidopsis* development. *Plant Cell* 1993; **5**: 147–157.
- [65] ROMERO LC, LAM E. Guanine nucleotide binding protein involvement in early steps of phytochrome-regulated gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 1465–1469.
- [66] ROMERO LC, SOMMER D, GOTOR C, SONG P-S. G-protein in etiolated *Avena* seedlings: Possible phytochrome regulation. *FESP Lett* 1991; **282**: 341–346.
- [67] SAKAMOTO K, NAGATANI A. Nuclear localisation activity of phytochrome B. *Plant J* 1996; **10**: 859–868.
- [68] SCHÄFER E, KUNKEL T, FRONHMEYER H. Signal transduction in the photocontrol of chalcone synthase gene expressions. *Plant Cell Environ* 1997; **20**: 722–727.
- [69] SCHMITT J. Is photomorphogenic shade avoidance adaptive - representatives from population biology? *Plant Cell Environ* 1997; **20**: 826–830.
- [70] SCHNEIDER-POETSCH HAW. Signal transduction by phytochrome: phytochromes have a module related to the transmitter modules of bacterial sensor protein. *Photochem Photobiol* 1992; **56**: 839–846.
- [71] SCHNEIDER-POETSCH HAW, BRAUN B. Proposal of the nature of phytochrome action based on the C-terminal sequences of phytochrome. *J Plant Physiol* 1991; **137**: 576–580.
- [72] SCHNEIDER-POETSCH HAW, BRAUN B, MARX S, SCHAUMBURG A. Phytochromes and bacterial sensor proteins are related by structural and functional homologies. *FESP Lett* 1992; **281**: 245–249.
- [73] SHARROCK RA, QUAIL PH. Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Dev* 1989; **3**: 1745–1757.
- [74] SHINOMURA T, NAGATANI A, CHORY J, FURUYA M. Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 8129–8133.
- [75] SHINOMURA T, NAGATANI A, CHORY J, FURUYA M. The induction of seed germination in *Arabidopsis thaliana* is regulated principally by phytochrome B and secondarily by phytochrome A. *Plant Physiol* 1994; **104**: 363–371.
- [76] SMITH H. Physiological and ecological function within the phytochrome family. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1995; **46**: 289–315.
- [77] SMITH H, WHITELAM GC. Phytochrome, a family of photoreceptors with multiple physiological roles. *Plant Cell Environ* 1990; **13**: 695–707.
- [78] SMITH H, WHITELAM GC. The shade avoidance syndrome – multiple responses mediated by multiple phytochromes. *Plant Cell Environ* 1997; **20**: 840–844.
- [79] STEINDLER C, CARABELLI M, BORELLO U, MORELLI G, RUBERTI I. Phytochrome A, phytochrome B and other phytochrome(s) regulate ATHB-2 expression in etiolated and green *Arabidopsis* plants. *Plant Cell Environ* 1997; **20**: 759–763.
- [80] TERRY MJ. Phytochrome chromophore-deficient mutants. *Plant Cell Environ* 1997; **20**: 740–745.
- [81] TRETYN A. Fitochrom. w Kopcewicz J, Tretyn A, Cymerski M. *Fitochrom i Morfogeneza Roślin*, Warszawa, PWN 1992: 58–107.
- [82] TRETYN A, KOPCEWICZ J. Mutanty fitochromowe w badaniu fotomorfogenezy roślin. *Post Biol Kom* 1993; **20**: 435–446.
- [83] TRETYN A, KOPCEWICZ J. Fitochrom i kryptochrom: receptory regulujące fotomorfogenezę roślin. *Zeszyty Naukowe Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Skierniewicach*, 1995; **2**: 91–99.

- [84] TRETYN A, WIŚNIEWSKA J. Fitochrom – struktura i właściwości. *Post Biochem* 1996; **42**: 57–64.
- [85] TRETYN A, BOSSEN ME, KENDRICK RE. The effect of calcium-channel antagonist, nifedypine, and agonist, Bay K-8644, on the phytochrome-controlled swelling of etiolated wheat protoplasts. *Physiol Plant* 1990; **78**: 230–235.
- [86] TRETYN A, KENDRICK RE, WAGNER G. The role(s) of calcium ions in phytochrome action. *Photochem Photobiol* 1991; **54**: 1135–1155.
- [87] THÜMMLER F, ALGARRA P, FOBO GM. Sequence similarities of phytochrome to protein kinase: implication for the structure, function and evolution of the phytochrome gene family. *FEBS Lett* 1994; **357**: 149–155.
- [88] THÜMMLER F, DUFNER M, KREISEL M, DITTRICH P. Molecular cloning of a novel phytochrome gene of the moss *Ceratodon prpureus* which encodes a putative light-regulated protein kinase. *Plant Mol Biol* 1992; **20**: 1003–1017.
- [89] VANDER WOUDE WJ. A dimeric mechanism for the action of phytochrome: evidences from photothermal interactions in lettuce seed germination. *Photochem Photobiol* 1985; **42**: 655–661.
- [90] VAN TUINEN A, HANHART CJ, KERCKHOFF LHJ, NAGATANI A, BOYLAN MT, QUAIL PH, KENDRICK RE, KOORNNEEF M. Analysis of phytochrome-deficient *yellow-green-2* and *aurea* mutants of tomato. *Plant J* 1996; **9**: 173–182.
- [91] VAN TUINEN A, KERCKHOFF LHJ, NAGATANI A, KENDRICK RE, KOORN-NEEF M. A temporarily red light-insensitive mutant of tomato lacks a light-stable, B-like phytochrome. *Plant Physiol* 1995; **108**: 939–947.
- [92] WADA M, KANEGAE T, NOZUE E, FUKUDA Y. Cryptogam phytochromes. *Plant Cell Environ* 1997; **20**: 685–690.
- [93] WAGNER D, QUAIL PH. Mutational analysis of phytochrome B identifies a small COOH-terminal domain region critical for regulatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 8596–8600.
- [94] WAGNER D, HOECKER U, QUAIL PH. *RED1* is necessary for phytochrome B-mediated red light-specific signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1997; **9**: 731–743
- [95] WAGNER D; KOLOSZVARI M, QUAIL PH. Two small spatially distinct regions of phytochrome B are required for efficient signaling rates. *Plant Cell* 1996; **8**: 859–871.
- [96] WEI N, DENG X-W. The role of the *COP/DET/FUS* genes in light control of *Arabidopsis* seedling development. *Plant Physiol* 1997; **112**: 871–878.
- [97] WHITELAM GC, JOHNSON E, PENG J, CAROL P, ANDERSON ML, COWL JS, HARVERD NP. Phytochrome A null mutants of *Arabidopsis* display a wild-type phenotype in white light. *Plant Cell* 1993; **5**: 757–768.
- [98] WONG Y-S, MICHAEL Jr RW, LAGARIAS JC. Properties of a polycation-stimulated protein kinase associated with purified *Avena* phytochrome. *Plant Physiol* 1996; **91**: 709–718.
- [99] WU SH, LAGARIAS JC. The phytochrome photoreceptor in the green alga *Mesotaenium caldariorum* – implication for a conserved mechanism of phytochrome action. *Plant Cell Environ* 1997; **20**: 691–699.
- [100] WU Y, HIRATSUKA K, NEUHAUS G, CHUA N-H. Calcium and cGMP target distinct phytochrome-responsive elements. *Plant J* 1996; **10**: 1149–1154.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 25.09.1997 r.

Przyjęto: 15.12.1997 r.

Adres autora: ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń

γ -TUBULINA I JEJ ROLA W NUKLEACJI I DYNAMICE MIKROTUBUL*

THE ROLE OF γ -TUBULIN IN NUCLEATION AND DYNAMICS OF MICROTUBULES

Urszula WOJSA-ŁUGOWSKA, Izabela STRZYŻEWSKA,
Maria JERKA-DZIADOSZ

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

Streszczenie: Odkrycie γ -tubuliny, trzeciego obok α i β , członka rodziny tubulin, charakterystyka bakteryjnego homologa tubulin (FtsZ), a także znaczny przyrost wiadomości dotyczących składu molekularnego centrosomu i innych centrów organizacji mikrotubul u grzybów, owadów i kręgowców doprowadziło do zaproponowania alternatywnych modeli składania mikrotubul z uwzględnieniem roli γ -tubuliny w tym procesie. Omawiamy dwa modele: Oakleya i Mitchisona oraz Ericksona i Stofflera, które w różny sposób przedstawiają rolę γ -tubuliny w sukcesywnym składaniu podjednostek tubulin w protofilamenty i mikrotubule [9,31,32,37].

Słowa kluczowe: mikrotubule, nukleacja, γ -tubulina, MTOC

Abstract: The discovery of γ -tubulin, the third member of the tubulin family beside α and β tubulins, characteristic of the bacterial homolog (FtsZ) of eukariotic tubulins as well as a significant increase of data concerning the molecular composition of centrosomes and other microtubule organizing centers in fungi, insects and vertebrates allowed construction of alternative models for the assembly of microtubules, based on the role of γ -tubulin in this process. We review here two models: one proposed by Oakley and Mitchison and the other by Erickson and Stoffler. The two models propose different role for γ -tubulin in successive assembly of tubulin subunits into protofilaments and then microtubules [9,31,32,37].

Key words γ -tubulin, microtubules, nucleation

*Finansowanie pracy z grantu statutowego KBN dla Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN.

WPROWADZENIE

Tworzenie *de novo* mikrotubul (MT) z heterodimerów α - i β -tubuliny określa się jako nukleację mikrotubul. *In vivo* rozpoczyna się ona w określonych, morfologicznie wyróżnionych miejscach w sąsiedztwie centrosomów, ciałek bazalnych, ciałek biegunowych wrzeciona drożdży – SPB (*spindle polar bodies*) oraz ciałek związanych z jądrem komórki (kinetochory). Dla wyżej wymienionych organelli Pickett-Heaps zaproponował nazwę „centra organizujące mikrotubule” (*microtubule organizing centers* – MTOC) [3].

Niedawno odkryto, że trzeci członek rodziny tubulin: γ -tubulina, jest powszechnym składnikiem MTOC biorącym udział w nukleacji mikrotubul, co może wskazywać na jednolity mechanizm tego procesu [25, 26, 28, 39, 42, 48, 49, 50, 56]. Porównanie sekwencji aminokwasów wykazało, że γ -tubulina jest prawie tak samo podobna do α - i β -tubuliny (homologia blisko 0,34), jak α - i β -tubulina względem siebie (homologia blisko 0,43) [7]. Jednakże w odróżnieniu od względnie dużej ilości w komórce α - i β -tubuliny, które są głównymi składnikami mikrotubul, ilość γ -tubuliny ocenia się na około 0,01 % całkowitego białka w ekstraktach z jaj *Xenopus*, zaś α - i β -tubuliny jest około 200 razy więcej [51].

Od czasu odkrycia Oakleya [39] geny kodujące γ -tubulinę zostały zidentyfikowane u wielu organizmów eukariotycznych, najpierw grzybów, owadów i komórek ssaków aż do roślin i pierwotniaków, takich jak: *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, *Euplotes octocarinatus* i *Paramecium* [23, 27, 42, 47, 50, 56]. Zaproponowane sekwencje aminokwasów sugerują, że większość produktów genów γ -tubulinowych jest wysoce konserwatywna, wykazując 57–67% podobieństwa. Konserwatyzm γ -tubuliny potwierdzono doświadczalnie przez komplementację funkcjonalną mutanta γ -tubuliny *Saccharomyces pombe* transformowanego przez cDNA γ -tubuliny komórek ludzkich HeLa [14].

Zlokalizowanie γ -tubuliny w MTOC wielu organizmów, gdzie wiąże się ona z końcem minus (–) MT, doprowadziło do hipotezy, iż γ -tubulina uczestniczy w nukleacji mikrotubul.

Ostatnio zaproponowano dwa modele [34, 41, 57] przedstawiające sposób, w jaki γ -tubulina mogłaby współdziałać w budowaniu mikrotubul. Modele te sugerują różną rolę dla γ -tubuliny i innych białek z kompleksu tworzącego MTOC [12, 43, 55].

ZADANIA MTOC

Tubulina jest heterodimerem złożonym z α - i β -tubuliny, które układają się w postać rureczek zwanych mikrotubulami. Wszystkie podjednostki tubuliny w

MT mają taką samą orientację, w wyniku czego powstaje struktura spolaryzowana, która przyłącza tubulinę szybciej na końcu (+) niż na końcu (-). *In vitro* wysoce oczyszczona i w pełni zdysocjowana tubulina polimeryzuje w mikrotubule, kiedy stężenie krytyczne monomerów zostanie przekroczone, co mogłoby sugerować, że MTOC nie są absolutnie niezbędne do samoskładania MT. Jednakże MTOC dostarczają nukleowanym MT załączka polimeryzacji, w którym jest możliwe rozpoczęcie budowania MT poniżej jej stężenia krytycznego. Dodawanie tubuliny do jądra polimeryzacji orientuje równocześnie wszystkie MT tak, że ich koniec (-) jest w kontakcie z MTOC. Miejsce nukleacji oddziałuje także na strukturę MT: mikrotubule kształtowane w MTOC zawierają 13 protofilamentów, zaś polimeryzowane *in vitro* mogą zawierać od 12 do 16 protofilamentów [3].

γ -TUBULINA W MTOC

Badania genetyczne, które umożliwiły odkrycie γ -tubuliny jako supresora wrażliwej na temperaturę mutacji w β -tubulinie grzyba *Aspergillus* [37, 39], umożliwiły także określenie funkcji γ -tubuliny w budowaniu MT przez analizę mutantów *A. nidulans*, *S. pombe* i *S. cerevisiae* [14, 37, 48]. Analiza fenotypów tych mutantów potwierdziła uczestnictwo γ -tubuliny w tworzeniu mikrotubul. Mikroiniekcja przeciwciał przeciwko γ -tubulinie do komórek ssaków powoduje zablokowanie nukleacji MT przez centrosom przez cały cykl komórkowy [17]. Charakterystyka trójwymiarowa izolowanych centrosomów z wczesnych zarodków *Drosophila* ujawniła w całym materiale pericentriolarnym liczne struktury pierścieniowe o średnicy podobnej do średnicy mikrotubul [33]. Ponieważ w pierścieniach tych wykryto γ -tubulinę [34], uznano, że to one prawdopodobnie odpowiadają miejscom nukleacji MT w centrosomach.

Badania *in vitro* potwierdziły, że oczyszczony kompleks pierścieniowy zawierający γ -tubulinę może nukleować mikrotubule [57], chociaż nie można do końca wykluczyć nukleacji MT niezależnej od γ -tubuliny [41]. Co więcej, wydaje się, że γ -tubulina może pełnić dodatkowe funkcje, na co wskazują doświadczenia na neuroblastach *Drosophila*, gdzie usunięcie γ -tubuliny nie tylko powoduje zmniejszenie liczby MT, ale także zmianę obrazu centrosomu, co autorzy [52] uznali za oznakę uczestnictwa γ -tubuliny w budowaniu samego MTOC.

W komórkach ssaków rolę MTOC pełni centrosom, składający się z pary centrioli otoczonych przez materiał pericentriolarny. Centriole, podobnie jak ciała bazalne, zawierają po 9 tripletów mikrotubul ułożonych w kształt cylindra. Sądzi się, że białkowy materiał otaczający centriole jest odpowiedzialny za nukleację MT i tam po raz pierwszy znaleziono γ -tubulinę [50]. Immunolokalizacja ultrastrukturalna potwierdziła występowanie γ -tubuliny w materiale pericentriolarnym, a także we

wnętrzu centrioli zarówno w komórkach ssaków [36], jak i w ciałkach bazalnych [24] i innych MTOC u pierwotniaków [47].

Badania nad centrosomami (zawierającymi centriole) izolowanymi z oocytów małża *Spisula solidissima* wykazały obecność pierścieni [54] podobnych do tych opisanych u *Drosophila*. W dodatku stwierdzono nadmiar β -tubuliny w stosunku do α -tubuliny, co zdaniem autorów sugeruje, że β -tubulina może odgrywać szczególną rolę w budowie centrosomu, a także nukleacji MT.

Ciałko biegunowe wrzeciona podziałowego (SPB) drożdży nie zawiera centrioli, natomiast zbudowane jest z trzech płytek, których rolę określono na podstawie badań ultrastrukturalnych [3]. Płytkę zewnętrzną i wewnętrzną organizują odpowiednio MT cytoplazmatyczne i jądrowe, zaś płytkę środkową kotwiczy SPB w błonie jądrowej. Zatem odpowiednik γ -tubuliny drożdży, białko *Tub4p* zostało zlokalizowane w płytkach: zewnętrznej i wewnętrznej [6, 49].

BIAŁKA TOWARZYSZĄCE γ -TUBULINIE

W celu dokładnego poznania roli γ -tubuliny bada się współwystępowanie tego białka z innymi, charakteryzuje się ich współdziałanie, a także uporządkowanie przestrzenne. Badania były prowadzone na oocytach *Xenopus* i *Spisula*, larwach *Drosophila* oraz grzybach *Aspergillus* i *Saccharomyces*.

Dzięki zastosowaniu metod immunocytochemicznych z użyciem licznych przeciwciał, opisano wiele białek związanych z centrosomami [3, 18], jednak znaczenie funkcjonalne nie wszystkich jest poznane.

Oocyty *Xenopus* nie mają centrosomu do momentu zapłodnienia, kiedy to centriola z plemnika przekształca się w centrosom. Badania Stearnsa i Kirschnera [51] wykazały, że w ekstrakcie z oocytów znajduje się niewielka ilość rozpuszczalnej γ -tubuliny, która sedymentuje w gradiencie sacharozy jako kompleks 25S. Badania *in vitro* wykazały, że do powstania centrosomu kompleks 25S jest niezbędny podobnie jak ATP i centriola z plemnika [51]. Dalsze badania nad oczyszczonym kompleksem γ -tubulinowym z *Xenopus* przeprowadzone przez Mitchisona wraz z współpracownikami [57] wykazały, że ten kompleks o masie cząsteczkowej około 2000 kDa zawiera około siedmiu białek razem z α -, β - i γ -tubuliną, a dodatkowe białka mają masę cząsteczkową 195, 133, 109 i 75 kDa [57]. W badaniach ultrastrukturalnych kompleks okazał się być otwartym pierścieniem o średnicy 25–28 nm i został przez autorów określony jako γ -TuRC (*γ -tubulin ring complex*) [57].

Centrosomy z oocytów małża *Spisula* także udało się wyizolować i oczyścić [54]. Centrosom zawiera jedną centriolę i wiele struktur pierścieniowych o średnicy około 25 nm i długości mniejszej niż 25 nm. W oczyszczonym centrosomie znaleziono

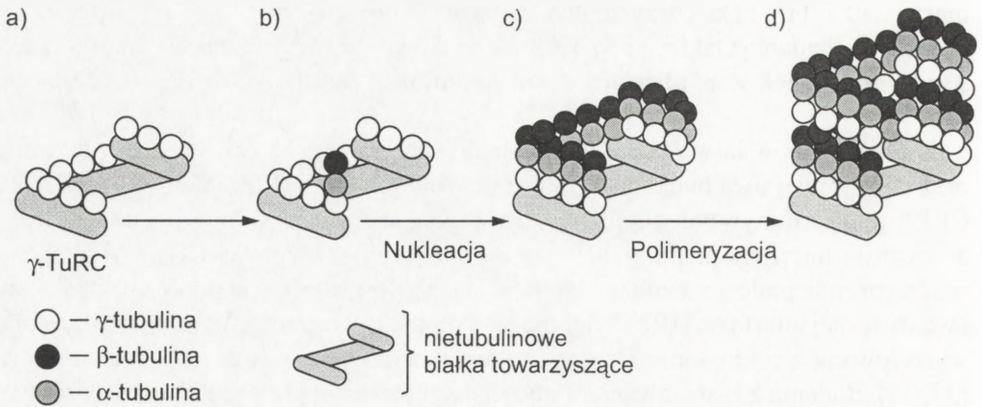
szereg białek: α -, β - i γ -tubuliny, aktyne oraz białka z fosfoepitopem MPM-2 o masie 230 i 115 kDa i trzy białka o masie około 20 kDa.

Ostatnie badania Oakleya i współpracowników wykazały obecność w komórkach *Aspergillus* białek współdziałających z γ -tubuliną o masie około: 105, 95 i 80 kDa [2].

Z centrosomów larw *Drosophila* wyizolowano kompleks zawierający γ -tubulinę oraz co najmniej dwa białka związane z mikrotubulami: CP190 i CP60 [43]. Białko CP190 mające motywy palca cynkowego jest związane z centrosomem podczas mitozy, a w czasie interfazy przemieszcza się do chromatyny [55], zaś CP60 znaleziono w centrosomie podczas anafazy i telofazy, a jego ilość obniża się pod koniec telofazy i we wczesnej interfazie [19]. Podobnie jak kompleks γ -tubuliny *Xenopus*, γ -tubulina wyizolowana z centrosomu *Drosophila* jest wbudowana w strukturę pierścieniową [33, 34]. Badania z zastosowaniem immunoelektronowej tomografii mikroskopowej potwierdziły, że zgrupowania białkowe zawierające γ -tubulinę są zlokalizowane w pobliżu końca minus (-) mikrotubul, nukleowanych przez oczyszczone centrosomy [17, 34]. Nasuwa się więc pytanie, czy w SPB drożdży również występuje podobne uporządkowanie. Wcześniejsze badania ultrastrukturalne [3] wykazały, że końce MT będące w kontakcie z SPB mają czapkę zamykającą cylinder mikrotubuli. Pereira i Schiebel [41] sugerują, że w skład tej czapki wchodzi kompleks *Tub4p/Spc98p*, który może uczestniczyć jako jednostka nukleująca mikrotubule w SPB [12]. *SPC98* został sklonowany jako zależny od dawki supresor mutantów termosensytywnych *tub4-1*. Koduje on składnik SPB o masie 90 kDa, poprzednio zidentyfikowany immunologicznie [45], a dalsze badania wykazały jego współdziałanie i współwystępowanie z *Tub4p* w miejscu kotwiczenia MT [12]. *Tub4p* tworzy kompleks 6s z *Spc97p* i *Spc98p* i uczestniczy w duplikacji SPB [21].

NUKLEACJA MIKROTUBUL PRZEZ KOMPLEKS γ -TUBULINOWY

Powszechność występowania γ -tubuliny w MTOC oraz jej udział w nukleacji mikrotubul, skłoniło Oakleya do stwierdzenia, że pierścień zbudowany z cząsteczek γ -tubuliny działa jako matryca do organizowania MT [37, 38]. Mitchison wraz ze współpracownikami [57] rozszerzyli hipotezę proponując model, w którym składniki nie-tubulinowe z kompleksu MTOC stanowią fundament, do którego wiąże się 13 cząsteczek γ -tubuliny tworząc pierścień γ -TuRC (*γ -tubulin ring complex*). Do tego kompleksu przyłącza się bezpośrednio podjednostka tubuliny umiejscowiona na końcu (-) MT (rys. 1A) [57]. Obecnie przeważa pogląd, że jest to α -tubulina [10, 13, 32], jakkolwiek bezpośredniego dowodu z badań *in vitro* nie ma. Przedstawia się również zastrzeżenia wywodzące się z obserwacji, że gen γ -tubulinowy został

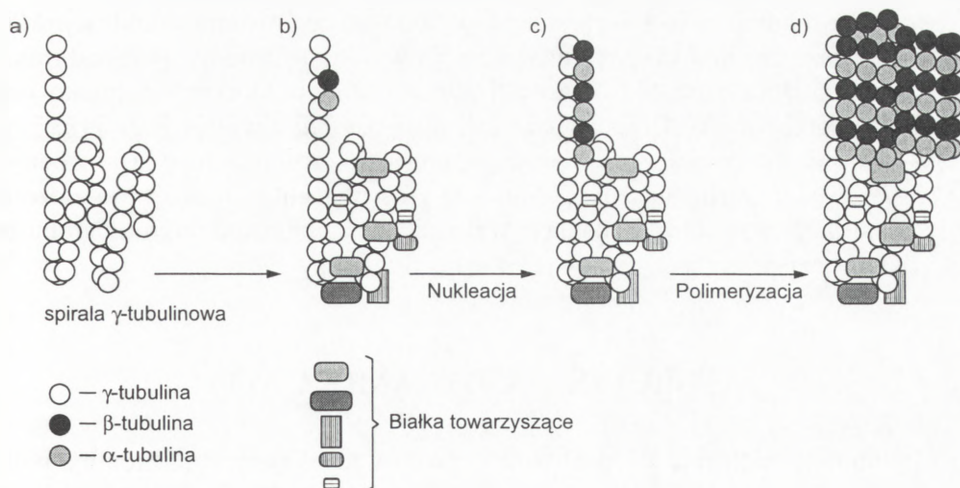


RYSUNEK 1. Model Oakleya i Mitchisona nukleacji MT przez kompleksy pierścieniowe γ -tubuliny: białka w kompleksie pierścieniowym z γ -tubuliną (γ -TuRC) dostarczają fundamentu (szara spirala), na której 13 podjednostek γ -tubuliny (białe koła) jest ustawionych w jednym szeregu (a), tworząc MTOC; dimer α/β -tubulinowy (b) łączy się bezpośrednio z γ -tubuliną, inicjując dołączanie kolejnych dimerów, a następnie tworzenie protofilamentów (c i d) [41, 42]

wyzolowany jako supresor mutanta β -tubuliny [37]. Dalej według tego modelu po nukleacji pierwszego protofilamentu następuje dalsza polimeryzacja mikrotubuli (rys. 1c i d).

Alternatywny model oddziaływania γ -tubuliny z innymi białkami w MTOC powstał na podstawie badań Ericksona i Stofflera [9] nad strukturą pierścieni formowanych przez białko FtsZ, prokariotycznego homologa tubuliny [8]. Badacze ci stwierdzili, że pierścienie FtsZ (rys. 2a) mają bardzo podobne średnice jak kompleksy γ -tubulinowe [57]. Interesujące jest to, że także α - i β -tubuliny są zdolne do tworzenia trwałych struktur pierścieniowych, które są połączone z filamentami ścian MT. Obserwacje te doprowadziły Ericksona i Stofflera [9] do wniosku, że pierścienie γ -tubulin mogą być skręconymi protofilamentami, zakończonymi od-cinkiem prostym, który dostarcza załączka do nukleacji ściany MT. Oznacza to, że γ -tubulina może współdziałać zarówno z α -, jak i β -tubuliną (rys. 2b). Stabilny protofilament γ -tubulinowy w dużym stopniu wzmacnia tworzenie „płachty” mikrotubularnej (rys. 2c), gdyż pierwszy protofilament α/β łatwo ulega rozpadowi, zanim utworzy się następny. Wydłużona „płachta” MT zamyka się w cylinder, gdy tylko osiągnie 13 protofilamentów. Rysunek 2d przedstawia interpretację Pereiry i Schiebela [41] modelu Ericksona i Stofflera [9] z uwzględnieniem białek towarzyszących.

Obok różnic strukturalnych we współdziałaniu γ -tubuliny z α - i β -tubulinami oraz nietubulinowymi białkami towarzyszącymi, oba modele w różny sposób wy-



RYSUNEK 2. Model Ericksona i Stofflera [9] nukleacji MT przez spiralę γ -tubuliny: γ -tubulina tworzy spiralny protofilament zakończony odcinkiem prostym a); polaryzacja kompleksu spiralnego γ -tubuliny może być określona przez białka towarzyszące, które mogą także dostarczać punktów kontaktowych z innymi białkami w MTOC (b); protofilament γ -tubulinowy funkcjonuje jako stały załączek, do którego dołączają dimery α/β (c); rozszerzająca się „płachta” protofilamentów α/β tubuliny zamyka się w cylinder po osiągnięciu liczby 13 protofilamentów (d)

jaśniają najważniejsze aspekty nukleacji MT. W modelu Oakleya i Mitchisona (rys. 1a) γ -tubulina spełnia rolę pośrednika do wiązania dimeru α/β . Białka nietubulinowe w kompleksie pełnią ważną rolę w zdefiniowaniu ściany mikrotubuli. Polaryzacja MT wynika z preferowanego współdziałania γ -tubuliny z α -tubuliną. Ostatecznie liczba protofilamentów przypadająca na MT jest zależna od pierścieniowego kompleksu γ -tubulinowego, zawierającego tę liczbę podjednostek γ -tubuliny (rys. 1a). W modelu Ericksona i Stofflera γ -tubulina tworzy trwały protofilament, który sprzyja budowaniu warstwy tubuliny. Polaryzacja mikrotubul jest bezpośrednim następstwem polaryzacji protofilamentu γ -tubulinowego, która może wynikać ze związania dodatkowych białek. Bardziej skomplikowane jest wyobrażenie sobie, jak w tym modelu określana jest liczba protofilamentów.

Jak wybrać model odzwierciedlający rzeczywistą sytuację *in vivo*?

W modelu Ericksona i Stofflera oś pierścieniowej struktury γ -tubuliny jest prostopadła do MT, a nie równoległa, jak sugerowali Oakley i Mitchison. Brak technicznych możliwości uwidocznienia kompleksu γ -tubulinowego w centrosomie [34] lub związanego z końcami MT [57] nie pozwala ocenić, który z dwóch modeli odpowiada sytuacji *in vivo*. Można się spodziewać, że przyszłe doświadczenia krzyżowe pomogą stwierdzić, czy γ -tubulina oddziałuje tylko z α -tubuliną, czy również z podjednostkami β -tubulinowymi. Ostatnie badania nad centrosomami izolowanymi z oocytów *Spisula* [54] wykazujące nadmiar β -tubuliny w stosunku do α -tubuliny

sugerują, iż β -tubulina współuczestniczy w budowie centrosomu i nukleacji MT. Na marginesie można dodać, że badania Raff i współpracowników [44] nad transgenicznym szczepem muszki owocowej (*Drosophila*), w którym zastąpiono gen tubuliny $\beta 2$ przez ortolog Hr β t pochodzący z motyla (*Heliothis virescens*) wykazały, że w sytuacji, kiedy oba geny ulegają ekspresji, to izoforma motyla powoduje, że MT *Drosophila* normalnie zbudowane z 13 protofilamentów formuje MT złożone z 16 protofilamentów [44]. Badania te wykazały, że architektura mikrotubuli może być dyktowana przez specyficzne sekwencje β -tubuliny.

γ -TUBULINA A DYNAMIKA MT

Mikrotubule podlegają szybkiej polimeryzacji i depolimeryzacji: tubulina polimeryzuje na końcu (+) i depolimeryzuje na końcu (-) [31, 46]. Ponieważ kompleks γ -tubulinowy stabilizuje ujemny koniec MT, można zadać pytanie, w jaki sposób zachodzi depolimeryzacja MT. Jest prawdopodobne, że kompleks γ -tubulinowy może się przebudować po nukleacji MT, co pozwoliłoby na depolimeryzację tubuliny. Dla przykładu: u *S. cerevisiae* mutant γ -tubulinowy *tub4-1* nie ma defektu w nukleacji MT, ale raczej w tworzeniu wrzeciona mitotycznego [49], co może wskazywać na brak w mutancie *tub4-1* zdolności do restrukturyzowania kompleksu γ -tubulinowego. Jednak jest również możliwe, iż kompleks białkowy *Tub4p* może być niezbywalny w przyłączeniu mikrotubul do SPB drożdży. Specyficzne dla mitozy siły ciągnące [16], w które zaangażowane są białka motoryczne mogą zatem spowodować odłączenie MT [4], jeżeli się przyjmie, że ich związanie z SPB w mutantach *tub4-1* jest osłabione. Kolejnym argumentem dotyczącym funkcjonowania γ -tubuliny w dynamice MT, przytaczanym przez Ericksona i Stofflera [9], jest fenotyp mutacji β -tubuliny w genie A33 u *Aspergillus*. MT tego mutantu są hiperstabilne, a defekt ten jest tłumiony zarówno przez środki depolimeryzujące MT, jak również przez mutacje w genie γ -tubuliny [37].

W wyjątkowym przypadku MT mogą być uwolnione z kompleksu nukleacyjnego, po czym następuje ich wyłapanie w innych miejscach w MTOC. Całkowite uwolnienie nukleowanych MT z centrosomów obserwuje się na przykład w komórkach neuronalnych [1], co sugeruje, że uwolnienie MT z centrosomów jest możliwe [15]. Spekuluje się, że białka motoryczne stowarzyszone z MTOC [5, 30, 40] lub też białka centrosomalne, zaangażowane w nukleację MT [35, 42] mogą odgrywać dużą rolę w wyłapywaniu i wiązaniu MT.

PODSUMOWANIE

Nukleacja MT jest jedną z podstawowych funkcji centrosomów. Przez wiele lat molekularny mechanizm tego procesu był nieznan. Ostatnio odkryty pierścieniowy kompleks γ -tubuliny, mogący funkcjonować jako jednostka nukleacji MT w centrosomie, obrazuje jego fundamentalne znaczenie, któremu do tej pory nie poświęcono zbyt wiele uwagi. Centrosom może mieć dodatkowe, istotne funkcje np. w regulacji cyklu komórkowego; i tak białka *Cdc16p* i *Cdc27p*, komponenty kompleksu umożliwiającego przejście do anafazy zostały zlokalizowane w centrosomach [20, 53]. Zgodnie z rolą w regulacji cyklu komórkowego, z centrosomami są związane także regulatory cyklu komórkowego, takie jak: cykliny i kinazy zależne od cyklin [11, 29]. Dalsze badania powinny zatem wyjaśnić, w jaki sposób regulowana jest aktywność centrosomu w czasie cyklu komórkowego.

LITERATURA

- [1] AHMAD FJ, BAAS PW. Microtubules released from the neuronal centrosome are transported into the axon. *J Cell Sci* 1995; **108**: 2761–2769.
- [2] AKASHI T, YOON Y, OAKLEY BR. Characterization of γ -tubulin complexes in *Aspergillus nidulans* and detection of putative γ -tubulin interacting proteins. *Cell Motil Cytoskel* 1997; **37**: 149–158.
- [3] BALCZON R. The centrosome in animal cells and its functional homologs in plant and yeast cells. *Int Rev Cyt* 1996; **169**: 25–85.
- [4] BARTON NR, GOLDSTEIN LS. Going mobile: Microtubules motors and chromosome segregation. *Proc Nat Acad Sci* 1996; **93**: 1735–1742.
- [5] BLANGY A, LANE HA, DHERIN P, HARPER M, KRESS M, NIGG EA. Phosphorylation by 34^{cdc2} regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation *in vivo*. *Cell* 1995; **83**: 1159–1169.
- [6] BULLITT E, ROUT MP, KILMARTIN JV, AKEY CHW. The yeast spindle pole body is assembled around a central crystal of Spc42p. *Cell* 1997; **89**: 1077–1086.
- [7] BURNS RG. Analysis of the γ -tubulin sequences: implications for the functional properties of γ -tubulin. *J Cell Sci* 1995a; **108**: 2123–2130.
- [8] ERICKSON HP. FtsZ, a prokaryotic homolog of tubulin? *Cell* 1995; **80**: 367–370.
- [9] ERICKSON HP, STOFFLER D. Protofilaments and rings, two conformations of the tubulin family conserved from bacterial FtsZ to $\alpha\beta$ and γ -tubulin. *J Cell Biol* 1996; **135**: 5–8.
- [10] FAN J, GRIFFITHS AD, LOCHART A, CROSS RA, AMOS LA. Microtubule minus ends can be labeled with a phage display antibody specific to α -tubulin. *J Mol Biol* 1996; **259**: 325–330.
- [11] GALLANT P, NIGG EA. Cyclin B2 undergoes cell cycle-dependent nuclear translocation and, when expressed as a non-destructible mutant, causes mitotic arrest in HeLa cells. *J Cell Biol* 1992; **117**: 213–224.
- [12] GESSLER S, PEREIRA G, SPANG A, KNOP M, SOUES S, KILMARTIN J, SCHIEBEL E. The spindle pole body component Spc98p interacts with the γ -tubulin-like Tub4p of *Saccharomyces cerevisiae* at the sites of microtubule attachment. *EMBO J* 1996; **73**: 601–615.

- [13] HIROSE K, FAN J, AMOS LA. Re-examination of the polarity of microtubules and sheets decorated with kinesin motor domain. *J Mol Biol* 1995; **251**: 329–333.
- [14] HORIO T, OAKLEY BR. Human γ -tubulin functions in fission yeast. *J Cell Biol* 1994; **126**: 1465–1473.
- [15] HYMAN AA, KARSENTI E. Morphogenetic properties of microtubules and mitotic spindle assembly. *Cell* 1996; **84**: 401–410.
- [16] INOUE S, SALMON ED. Force generation by microtubule assembly/disassembly in mitosis and related movements. *Mol Biol Cell* 1995; **6**: 1619–1640.
- [17] JOSHI H, PALACIOS CM, McNAMARA L, CLEVELAND DW. γ -Tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle-dependent microtubule nucleation. *Nature (Lond)* 1992; **356**: 80–83.
- [18] KALT A, SCHLIWA M. A novel structural component of the *Dictyostelium* centrosome. *J Cell Sci* 1996; **109**: 3103–3112.
- [19] KELLOGG DR, OEGEMA K, RAFF J, SCHNEIDER K, ALBERTS BM. CP60 A microtubule-associated protein that is localized to the centrosome in a cell cycle-specific manner. *Mol Biol Cell* 1995; **6**: 1673–1684.
- [20] KING RW, PETERS JM, TUGENDREICH S, ROLFE M, HIETER P, KIRSCHNER MW. A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation to cyclin B. *Cell* 1995; **81**: 279–288.
- [21] KNOOP M, PEREIRA G, GEISLER S, GREIN K, SCHIEBEL E. The spindle pole body component spc97p interacts with the γ -tubulin of *Saccharomyces cerevisiae* and functions in microtubule organization and spindle pole body duplication. *EMBO J* 1997; **16**: 1550–1564.
- [22] LI Q, JOSHI HC. γ -Tubulin is a minus end-specific microtubule binding protein. *J Cell Biol* 1995; **131**: 207–214.
- [23] LIANG A, HECKMAN K. The macronuclear γ -tubulin-encoding gene of *Euplotes octocarinatus* contains two introns and an in-frame TGA. *Gene* 1993; **136**: 319–322.
- [24] LIANG A, RUIZ F, HECKMAN K, KLOTZ C, TOLLON Y, BEISSON J, WRIGHT M. γ -Tubulin is permanently associated with basal bodies in ciliates. *Eur J Cell Biol* 1996; **70**: 331–338.
- [25] LIU B, JOSHI HC, WILSON TJ, SILFLOW CD, PALEVITZ BA, SNUSTAD DP. γ -Tubulin in *Arabidopsis*: Gene sequence, immunoblot, and immunofluorescence studies. *Plant Cell* 1994; **6**: 303–314.
- [26] LOPEZ I, KHAN S, SEVIK M, CANDE WZ, HUSSEY PJ. Isolation of a full-length cDNA encoding *Zea mays* γ -tubulin. *Plant Physiol* 1995; **107**: 309–310.
- [27] MAESSEN S, WESSELING JG, SMITS MA, KONINGS RNH, SCHOENMAKERS JGG. The γ -tubulin gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1993; **60**: 27–36.
- [28] MARSCHALL LG, JENG RL, MULLHOLAND J, STEARNS T. Analysis of Tub4p, a yeast γ -tubulin-like protein: implications for microtubule-organizing center function. *J Cell Biol* 1996; **134**: 443–445.
- [29] MARTIN-CASTELLANOS C, MORENO S. Recent advances on cyclins, CDKs and CDK inhibitors. *Trends Cell Biol* 1997; **7**: 95–98.
- [30] MELLUH PB, ROSE MD. KAR3, a kinesin-related gene required for yeast nuclear fusion. *Cell* 1990; **60**: 1029–1041.
- [31] MITCHISON TJ. Polewards microtubule flux in the mitotic spindle: Evidence from photoactivation of fluorescence. *J Cell Biol* 1989; **109**: 637–652.
- [32] MITCHISON TJ. Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science* 1993; **261**: 1044–1047.
- [33] MORITZ M, BRAUNFELD MB, FUNG JC, SEDAT JW, ALBERTS BM, AGARD DA. Three-dimensional structural characterization of centrosomes from early *Drosophila* embryos. *J Cell Biol* 1995a; **130**: 1149–1159.

- [34] MORITZ M, BRAUNFELD MB, SEDAT JW, ALBERTS B, AGARD DA. Microtubule nucleation by γ -tubulin-containing rings in the centrosome. *Nature (Lond)* 1995b; **378**: 638–640.
- [35] MOUDJOU M, PAINTRAND M, VIGUES B, BORNENS M. A human centrosomal protein is immunologically related to basal body-associated proteins from lower eucaryotes and is involved in the nucleation of microtubules. *J Cell Biol* 1991; **115**: 129–140.
- [36] MOUDJOU M, BORDES N, PAITRAND M, BORNENS M. γ -Tubulin in mammalian cells. *J Cell Sci* 1996; **109**: 875–845.
- [37] OAKLEY BR. γ -tubulin: The microtubule organizer? *Trends Cell Biol* 1992; **2**: 1–5.
- [38] OAKLEY BR. A nice ring to the centrosome. *Nature (Lond)* 1995; **378**: 555–556.
- [39] OAKLEY CE, OAKLEY BR. Identification of γ -tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by *mipA* gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature (Lond)* 1989; **338**: 662–664.
- [40] PAGE BD, SATTERWHITE LL, ROSE MD, SNYDER M. Localization of the KAR3 kinesin heavy chain - like protein requires the CIKI interacting protein. *J Cell Biol* 1994; **124**: 507–519.
- [41] PEREIRA G, SCHIEBEL E. Centrosome – microtubule nucleation. *J Cell Sci* 1997; **110**: 295–300.
- [42] RAFF JW. Centrosomes and microtubules: wedded with a ring. *Trend Cell Biol* 1996; **6**: 248–251.
- [43] RAFF JW, KELLOGG DR, ALBERTS BM. *Drosophila* γ -tubulin is part of a complex containing two previously identified centrosomal MAPs. *J Cell Biol* 1993; **121**: 823–835.
- [44] RAFF EC, FACKENTHAL JD, HUTCHENS JA, HOYLE HD, TURNER FR. Microtubule architecture specified by a β -tubulin isoform. *Science* 1997; **275**: 70–73.
- [45] ROUT M, KILMARTIN JV. Components of the yeast spindle and spindle pole body. *J Cell Biol* 1990; **111**: 1913–1927.
- [46] SAWIN KE, MITCHISON TJ. Microtubule flux in mitosis is independent of chromosomes, centrosomes, and antiparallel microtubules. *Mol Biol Cell* 1994; **5**: 217–226.
- [47] SCOTT V, SHERWIN T, GULL K. γ -Tubulin in *Trypanosomes*: molecular characterisation and localisation to multiple and diverse microtubule organising centres. *J Cell Sci* 1997; **110**: 157–168.
- [48] SOBEL SG, SNYDER M. A high divergent γ -tubulin gene is essential for cell growth and proper microtubule organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 1995; **131**: 1775–1788.
- [49] SPANG A, GEISLER S, GREIN K, SCHIEBEL E. γ -Tubulin - like Tub4p of *Saccharomyces cerevisiae* is associated with the spindle pole body substructures that organize microtubules and is required for mitotic spindle formation. *J Cell Biol* 1996; **134**: 429–441.
- [50] STEARNS T, EVANS L, KIRSCHNER M. γ -Tubulin is a highly conserved component of the centrosome. *Cell* 1991; **56**: 825–836.
- [51] STEARNS T, KIRSCHNER M. *In vitro* reconstitution of centrosome assembly and function. The central role of γ -tubulin. *Cell* 1994; **76**: 623–637.
- [52] SUNKEL CE, GOMES R, SAMPAIO P, PERDIGAO J, GONZALES C. γ -Tubulin is required for the structure and function of the microtubule organizing centre in *Drosophila* neuroblast. *EMBO J* 1995; **14**: 28–38.
- [53] TUGENDREICH S, TOMKIEL J, EARNSHAW W, HIETER P. CDC27Hs colocalizes with CDC16Hs to the centrosome and mitotic spindle and is essential for the metaphase to anaphase transition. *Cell* 1995; **81**: 261–268.
- [54] VOGEL JM, STEARNS T, RIEDER C I, PALAZZO RE. Centrosomes isolated from *Spisula solidissima* oocytes contain rings and an usual stoichiometric ratio of α/β tubulin. *J Cell Biol* 1997; **137**: 193–202.
- [55] WHITFIELD WG, CHAPLIN MA, OEGEMA K, PARRY H, GLOVER DM. The 190 kDa centrosome-associated protein of *Drosophila melanogaster* contains four zinc finger motifs and binds to specific sites on polytene chromosomes. *J Cell Sci* 1995; **108**: 3377–3387.
- [56] ZHENG Y, JUNG K, OAKLEY BR. γ -Tubulin is present in *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* and is associated with the centrosome. *Cell* 1991; **65**: 817–823.

- [57] ZHENG Y, WONG ML, ALBERTS B, MITCHISON T. Nucleation of microtubule assembly by a γ -tubulin containing ring complex. *Nature (Lond)* 1995; **378**: 578–583.

Redaktor prowadzący – W. Kilarski

Otrzymano: 01.11.1997 r.

Przyjęto: 29.12.1997 r.

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

MOLEKULARNE PODŁOŻE RÓŻNICOWANIA LINII PŁCIOWEJ I FORMOWANIE GONADY ZARODKOWEJ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

THE MOLECULAR ASPECT OF THE GERM LINE
DIFFERENTIATION AND THE EMBRYONIC GONAD
FORMATION IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Mariusz K. JAGLARZ

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

Streszczenie: W powstawaniu i rozwoju komórek prąpcyjnych *Drosophila melanogaster* uczestniczy kilkanaście genów, których produkty lokalizowane są w trakcie oogenezy w sposób uporządkowany na tylnym biegunie oocytu. Część z tych genów niezbędna jest także do prawidłowego wykształcenia tylnej części zarodka (odwłoka). Omówiono rolę cytoszkieletu w deponowaniu informacji rozwojowej oraz interakcje komórek somatycznych z komórkami linii płciowej. Szczegółowo scharakteryzowano gen *oskar*. Przedstawiono też procesy prowadzące do formowania gonady zarodkowej.

Słowa kluczowe: komórki prąpcyjne, linia płciowa, rozwój zarodkowy, *Drosophila*

Summary: The proper specification of the primordial germ cells in *Drosophila melanogaster* requires a number of genes, which products are localized during oogenesis in an orderly fashion at the posterior pole of the oocyte. Some of these genes are also necessary for the formation of the posterior part of the embryo. The role of the cytoskeleton in localization of the developmental information in the embryo is discussed as well as mutual interactions between somatic and germ line cells. A detail description of the gene *oskar* is presented. In addition, processes leading to the formation of the embryonic gonad are described.

Key words: primordial germ cells, germ line, embryogenesis, *Drosophila*

1. LINIA PŁCIOWA

Jednym z aspektów rozwoju embrionalnego jest różnicowanie komórkowe. Jego pierwszym przejawem w zarodkach wielu grup zwierząt jest oddzielenie komórek linii płciowej, zdolnych do przekazywania materiału genetycznego z pokolenia na

pokolenie, od komórek linii somatycznej [43]. Organizmem modelowym w badaniach nad różnicowaniem linii płciowej stała się muszka owocowa, *Drosophila melanogaster*, u której wyróżniono 4 fazy tego procesu:

1. formowanie komórek prapłciowych;
2. wędrówka komórek prapłciowych do somatycznej części gonady;
3. różnicowanie gonad w jądra lub jajniki;
4. gametogeneza [9,42,43].

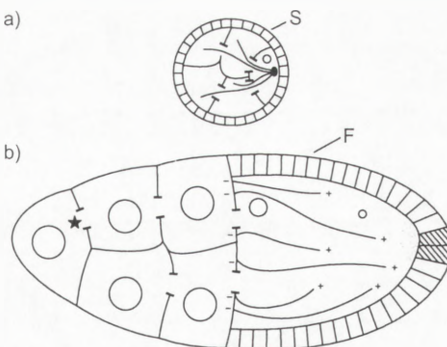
Ponadto wiadomo, że wyodrębnianie linii płciowej nowego organizmu rozpoczyna się już w trakcie oogenezy, tj. w jajniku matki.

Jajniki *Drosophila* zbudowane są z 15–20 wydłużonych elementów, zwanych owariolami. W owariolach wyróżnia się 2 rejony: szczytowo położone germarium i leżące niżej witelarium. W germarium komórki płciowe dzielą się mitotycznie, przy czym część z tych podziałów jest niekompletna, co prowadzi do powstawania zespołów składających się z 16 komórek. W obrębie zespołu komórki połączone są między sobą mostkami cytoplazmatycznymi. W kolejnej fazie oogenezy zespoły komórek płciowych otaczane są przez komórki somatyczne, a w każdym z nich tylko jedna komórka różnicuje się w oocyt. Pozostałe komórki płciowe przekształcają się w poliploidalne komórki odżywcze, których główną funkcją jest produkcja RNA i białek. Substancje te przekazywane są przez mostki cytoplazmatyczne do wrażliwego oocyty. Zespoły komórek przemieszczają się następnie do witelarium, gdzie ulegają spolaryzowaniu: komórki odżywcze gromadzą się na biegunie przednim oocyty. Jednocześnie komórki somatyczne otaczające oocyt zaczynają różnicować się w nabłonek foliokularny. Tak uformowane zespoły komórek płciowych i somatycznych zwane są komorami jajowymi (rys. 1).

Oogeneza *Drosophila* podzielona została na 14 morfologicznie odrębnych stadiów. W trakcie tego procesu komora jajowa znacznie powiększa swoje rozmiary; początkowo (stadia 1–6) wszystkie komórki płciowe rosną równomiernie; od stadium 7 oocyt wzrasta szybciej niż połączone z nim komórki odżywcze (rys. 1). W stadiach 10–12 komórki odżywcze przekazują swoją cytoplazmę do oocyty, a następnie degenerują. Oocyt, wypełniony informacją rozwojową [por. 4] i materiałami zapasowymi (żółtko), otoczony osłonami jajowymi, zatrzymany jest w rozwoju do czasu aktywacji przez plemnik. W pełni ukształtowane jajo jest wydłużone i można w nim wyróżnić bieguny przedni i tylny, a także strony brzusznej i grzbietowej. Jedyne morfologicznie zróżnicowanym obszarem cytoplazmy jaja (ooplazmy) jest występująca na tylnym biegunie, pozbawiona żółtka strefa, zwana plazmą biegunową. Szczegóły powyższych procesów przedstawione są w [3,4,82].

Po zapłodnieniu jądro zygotyczne ulega licznym podziałom mitotycznym, którym nie towarzyszą cytokinezy. Większość z powstających jąder potomnych migruje ku powierzchni zarodka (rys. 2 a,b). Te jądra, które znalazły się na terenie plazmy biegunowej, zostają otoczone błonami komórkowymi i tworzą komórki prapłciowe, zwane także komórkami biegunowymi (rys. 2b). Pozostałe jądra otaczane są błonami

RYSUNEK 1. Schemat przedstawiający zmiany organizacji mikrotubul w komorach jajowych w trakcie oogenezy: a) – w stadiach 1–6 mikrotubule wychodzące z centrum organizacyjnego w oocycie wnikają do komórek odżywczych przez mostki cytoplazmatyczne, b) – w stadiach 7–10 mikrotubule gromadzą się na przednim biegunie oocytu, a ich koniec plus skierowany jest w stronę bieguna tylnego; F – nabłonek foliularny, komórki foliularne bieguna tylnego zakreskowane, o – oocyt, S – komórki somatyczne, gwiazdka – mostek cytoplazmatyczny między komórkami odżywczymi; obszar wykropkowany w oocycie – rejon plazmy bieguno-

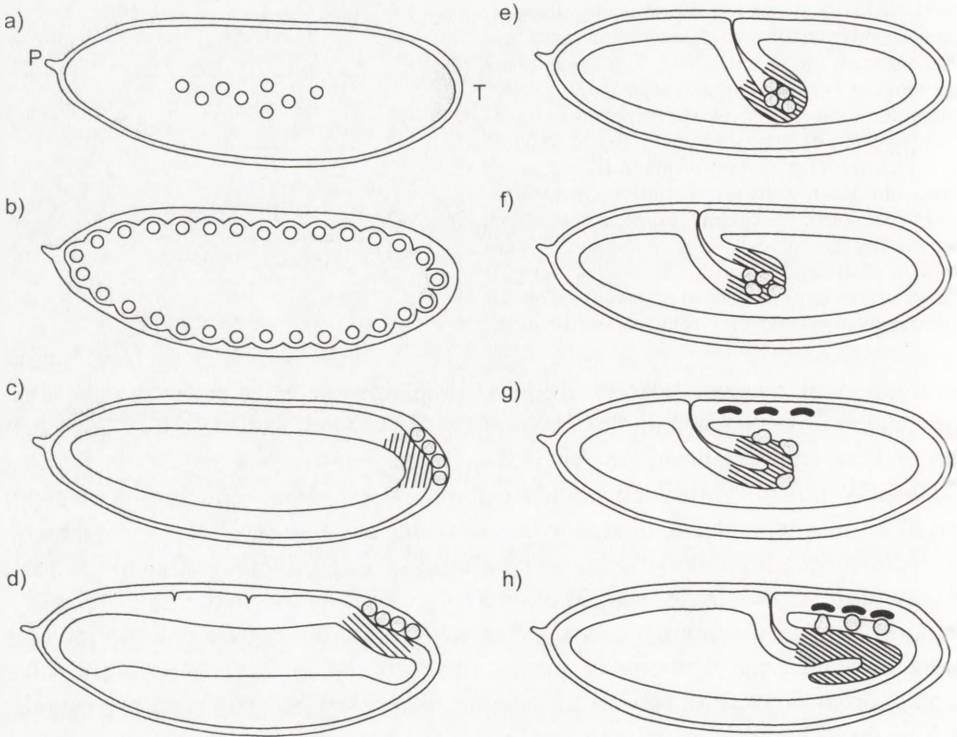


komórkowymi znacznie później. Komórki prapłciowe są więc pierwszymi komórkami, jakie powstają w zarodku *Drosophila*. Wykazano, śledząc dalsze losy tych komórek w embriogenezie, że ich jedyną funkcją jest utworzenie linii płciowej [90,94]. W trakcie gastrulacji komórki prapłciowe zostają wpukłone do wnętrza zarodka i leżą w zagłębieniu stanowiącym zawiązek jelita (rys. 2c,d). Zagłębienie to wydłuża się, a komórki prapłciowe gromadzą się na jego ślepym końcu, z którego w przyszłości rozwinie się jelito środkowe (rys. 2e). W pewnym momencie rozwoju komórki prapłciowe migrują przez ścianę zawiązka jelita, a następnie po jego powierzchni zmierzają w kierunku mezodermy gonadalnej, leżącej po grzbietowej stronie zarodka (rys. 2f,g; zob. 2.1). Następnie rozdzielają się na dwie grupy, wchodzą w kontakt z komórkami mezodermalnymi gonady i zostają przez nie otoczone (rys. 2h). Formowanie gonad następuje po obu stronach zarodka, na wysokości 5 segmentu odwłoka. Szczegóły wczesnego rozwoju zarodkowego *Drosophila* przedstawione są w [3,4,9].

Definiowanie głównych rejonów rozwijającego się zarodka (biegun przedni, tylny, oś grzbieto-brzusza oraz pierwszy i ostatni segment ciała) zależy od skomplikowanego systemu genów [3,4,85]. Geny te określa się jako matczyne, ponieważ ich transkrypcja odbywa się wyłącznie z genomu matki (tj. w trakcie oogenezy). Produkty genów matczynych gromadzone są w oocycie, a niektóre z nich zaczynają funkcjonować, zanim jeszcze nastąpi zapłodnienie. Geny zarodka (ulegające transkrypcji po zapłodnieniu) określa się jako zygotyczne [3,4,85]. Badania ostatnich kilkunastu lat wykazały, że produkty genów matczynych, deponowane w różnych rejonach oocytu, stanowią podłoże dla zróżnicowanej ekspresji genów zygotycznych, co w konsekwencji prowadzi do definiowania coraz to mniejszych obszarów zarodka [3,85].

1.1. W powstawaniu linii płciowej uczestniczą geny grupy tylnej

Zakrojone na szeroką skalę poszukiwania zmutowanych zarodków, w których nie tworzą się komórki biegunowe pozwoliły na identyfikację znacznej liczby genów



RYSUNEK 2. Schemat powstawania i migracji komórek prąpciovych w zarodkach *Drosophila melanogaster*: a) – podziały jądra zygotycznego w centrum zarodka; plazma biegunowa wykropkowana; P – biegun przedni, T – biegun tylny; b) – powstawanie komórek prąpciovych; c) – wczesna gastrulacja, komórki prąpciovie na tylnym biegunie zarodka; d) – przemieszczanie się komórek prąpciovych wraz z zawiązką jelita; e) – komórki prąpciovie zostają wpukłone do wnętrza zarodka; f) – migracja komórek prąpciovych przez tylny zawiązek jelita środkowego; g) – migracja komórek prąpciovych w kierunku komórek mezodermy gonadalnej (zaczernione); h) – łączenie się komórek prąpciovych z mezoderłą gonadalną i początek formowania gonady; b–h – komórki prąpciovie wykropkowane, zawiązek jelita środkowego zakreskowany; pominięto przedni zawiązek jelita środkowego

zaangażowanych w formowaniu linii płciowej *Drosophila*. Warto w tym miejscu dodać, że badania te zostały zapoczątkowane przez C. Nüsslein-Volhard i E. F. Wieschausa, którzy wspólnie z E. B. Lewistem otrzymali w 1995 r. Nagrodę Nobla za badania nad genetycznym podłożem różnicowania w rozwoju muszki owocowej. Wykazano, że za powstawanie komórek prąpciovych odpowiedzialne są geny tzw. grupy tylnej, z których część bierze również udział w determinacji odwłoka [83,85]. Są to: *cappuccino*, *spire*, *orb*, *D-elg*, *bullwinkle*, *homeless*, *mago nashi*, *aubergine*, *oskar*, *staufen*, *pipsqueak*, *vasa*, *fat facets*, *tudor*, *valois*, *germ cell-less*, *nancs* i *pumilio* (tab. 1) [29,74,83]. Należy dodać, że nazwy genów zaangażowanych w embriogenezie pochodzą od nazw mutacji wywołujących określone zaburzenia rozwojowe. Podobieństwo fenotypów powstałych wskutek mutacji genów grupy tylnej

(zarodki bez komórek biegunowych i/lub odwłoka) sugeruje, że geny te działają na wspólnym szlaku. Z genów tych jedynie 2: *nanos* i *pumilio* biorą bezpośredni udział w ustalaniu rejonu zarodka, z którego powstanie odwłok [54,74,83]. Pozostałe geny zaangażowane są wyłącznie w formowanie plazmy biegunowej oraz różnicowanie komórek prątkiowych [74].

1.2. Znaczenie plazmy biegunowej

Badania nad rozmieszczeniem produktów (mRNA, białek) genów grupy tylnej wykazały, że przedostają się one z komórek odżywczych do oocyty, gdzie gromadzone są na tylnym biegunie. Obserwacje cytologiczne ujawniły istnienie na tym biegunie obszaru cytoplazmy pozbawionego żółtka, barwiącego się silnie barwnikami zasadowymi [42,43]. Obszar ten nazwano plazmą biegunową lub oosomem. Jego specyficznym markerem są tzw. ziarna biegunowe. Struktury te mają średnicę 0,2–0,5 μm , nie są otoczone błoną i zawierają RNA oraz białka [59,60]. W plazmie biegunowej obserwuje się również duże nagromadzenie mitochondriów, występujących w kontakcie z ziarnami biegunowymi [59]. W trakcie rozwoju zarodkowego ziarna biegunowe włączane są do komórek prątkiowych. Tam rozpadają się na drobne skupienia, zwane materiałem chmurkowym (ang. *nuage material*), które występują po cytoplazmatycznej stronie osłonki jądrowej [13,59].

Eksperymenty z przeszczepianiem plazmy biegunowej dowiodły, że jest ona czynnikiem wystarczającym do powstania komórek prątkiowych na tylnym biegunie zarodka, a także w innych miejscach, np. na biegunie przednim [42,43,83]. Poznano szereg składników plazmy biegunowej. Tworzy się ona w trakcie oogenezy stopniowo, co dobrze koresponduje ze stopniowym deponowaniem na tylnym biegunie oocyty rozmaitych RNA i białek. Obowiązuje tu zasada, że produkty genów, które zostały zdeponowane wcześniej niezbędne są do lokalizowania produktów genów aktywnych później [74,83]. Istnieje więc swoista „hierarchia genów” (rys. 3).

1.3. Kaskada genów grupy tylnej

Badanie wpływu mutacji danego genu na gromadzenie produktów innych genów grupy tylnej oraz analiza zapotrzebowania na produkty tych genów w określonej fazie oogenezy pozwoliły na uszeregowanie genów według kolejności ich działania [74,83]. Jako pierwsze deponowane są produkty genów *oskar* i *staufen*. Tuż po wyróżnicowaniu się oocyty w jego cytoplazmie pojawiają się cząsteczki oskar mRNA i białka Staufen. Początkowo rozmieszczone są one w całej objętości ooplazmy (stadium 2), ale ostatecznie gromadzą się na biegunie tylnym (stadium 8) [18,40,84]. Wiadomo, że białko Staufen zawiera domenę wiążącą dwuniciowe RNA [84,85]. Prawdopodobnie białko to wiąże się bezpośrednio z oskar mRNA. Z kolei kompleks oskar mRNA-Staufen transportowany jest na tylny biegun zarodka, gdzie ulega

TABELA 1. Geny zaangażowane w powstawanie komórek prątciovych
Drosophila melanogaster

Gen	Charakterystyka białka*	Funkcja
cappuccino	formina [17,62]	deponowanie gurken, oskar mRNA
spire	nieznane [62]	deponowanie gurken, oskar mRNA
gurken	transformujący czynnik wzrostu α [67]	przekazywanie sygnału z oocyty do komórek somatycznych
torpedo-DER	receptor EGF [56]	receptor sygnału z oocyty
Notch	białko z powtórzeniami EGF [78]	białko błonowe, receptor
Delta	białko z powtórzeniami EGF [78]	białko błonowe, ligand białka Notch
białkowa kinaza A	podjednostka katalityczna białkowej kinazy A [50]	przekazywanie sygnału do oocyty
staufen	domena wiążąca 2-niciowe RNA [84]	transport i deponowanie oskar mRNA, aktywator translacji oskar mRNA
mago nashi	nowe białko [68]	deponowanie oskar mRNA, polaryzacja mikrotubul
tropomiozyna II	tropomiozyna mięśniowa [20]	deponowanie oskar mRNA, wiązanie z filamentami aktynowymi
chickadee	profilina [12,61]	deponowanie oskar mRNA, wiązanie z filamentami aktynowymi
orb	domena wiążąca RNA [51]	deponowanie gurken, oskar mRNA
D-elg	czynnik transkrypcyjny [25]	deponowanie gurken, oskar mRNA
Bicaudal-D	ciężki łańcuch miozyny, kinezyzna [88,89]	deponowanie oskar mRNA
fat facets	nowe białko [22]	nieznana
bullwinkle	nieznane [72]	deponowanie oskar mRNA
homeless	białko z grupy DE-H, RNA zależna ATPaza [26]	deponowanie oskar mRNA, organizacja sieci mikrotubul
oskar	nowe białko [18,40]	organizowanie plazmy biegunowej, deponowanie białka Vasa, nanos RNA
bruno	domena wiążąca RNA [39]	represor translacji oskar mRNA
aubergine	nieznane [100]	aktywator translacji oskar mRNA
vasa	białko z grupy DEAD, ATP zależna helikaza RNA [31,52]	regulacja ekspresji genów, deponowanie nanos RNA
pipsqueak	domena BTB (odpowiedzialna za interakcję między białkami) [33]	regulacja ekspresji genów?
tudor	nowe białko [5,27]	powstawanie ziaren biegunowych, transport mtr RNA?
valois	nieznane [32,53]	utrzymywanie lokalizacji białka Vasa?
germ cell-less	nowe białko [37,38]	determinacja komórek prątciovych?
cyklina B	cyklina [14]	kontrola cyklu komórkowego
Hsp 83	HSP 90 (białko szoku cieplnego) [15]	nieznana

* podobieństwo domen białkowych do wcześniej scharakteryzowanych białek; podano tylko funkcje związane z powstawaniem komórek prątciovych; EGF – nabłonkowy czynnik wzrostu, mtr RNA – mitochondrialny 16S RNA, ? – przypuszczalna funkcja; zob. też rys. 3.

„zakotwiczeniu” w plazmie biegunowej. Pewne dane wskazują także, że transport ten odbywa się wzdłuż mikrotubul oocytu (patrz niżej). Do deponowania oskar mRNA i białka Staufen konieczna jest także aktywność genów: *cappuccino*, *spire* i *magonashi* (rys. 3) [18,40,68,84]. Natomiast do utrzymania omawianego kompleksu w plazmie biegunowej niezbędne jest białko Oskar, które powstaje dopiero po zdeponowaniu oskar mRNA [19,73].

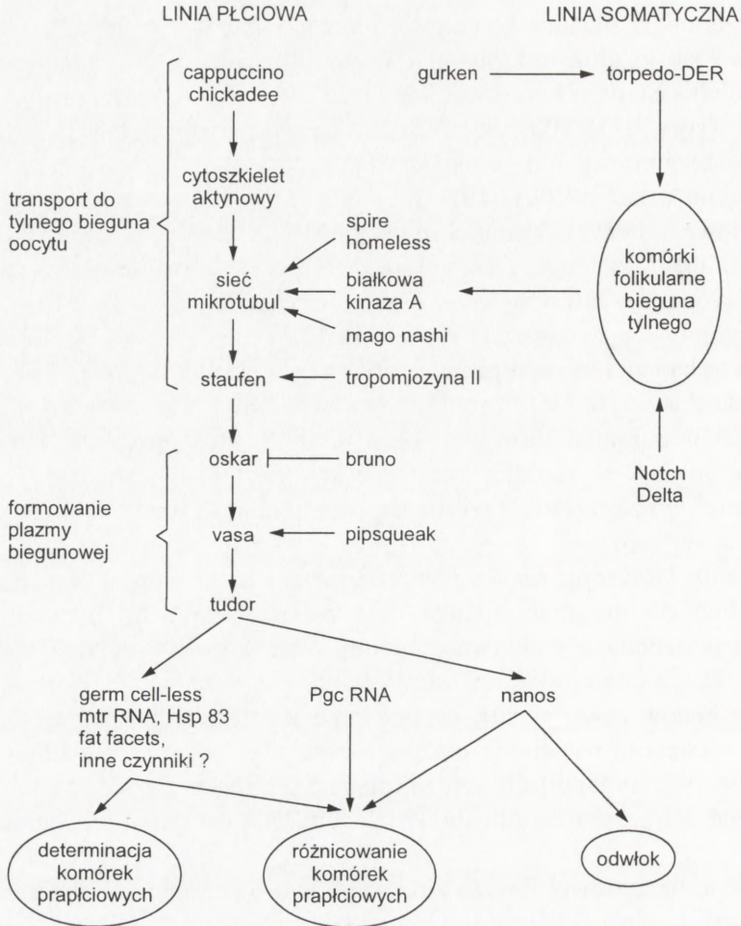
Prawidłowa depozycja kompleksu oskar mRNA–Staufen jest niezbędna do gromadzenia białka Vasa (stadia 8–10) [30,32,53]. Wydaje się, że białko Oskar bierze bezpośredni udział w zatrzymywaniu białka Vasa na tylnym biegunie i że formowanie ziaren biegunowych rozpoczyna się od interakcji między tymi białkami [40]. Potwierdzają to badania w systemach testowych u drożdży i *in vitro*, gdzie wykazano, że białko Oskar wiąże się bezpośrednio z białkami Vasa i Staufen [6]. Na ilość vasa mRNA oraz białka Vasa ma wpływ produkt genu *pipsqueak* [80]. Ponieważ ilość oskar mRNA w zarodkach *pipsqueak* * jest niezmieniona, uważa się, że produkt genu *pipsqueak* działa po zdeponowaniu białka Oskar, ale przed lokalizacją białka Vasa (rys. 3).

Geny *valois* i *tudor* nie mają wpływu na rozmieszczenie produktów genów *oskar* i *vasa*. Jednak do utrzymania białka Vasa w obszarze plazmy biegunowej po zapłodnieniu potrzebna jest aktywność genu *valois*. Stosując technikę hybrydyzacji *in situ* i reakcje z przeciwciałami udowodniono, że w ziarnach biegunowych, obok produktów genów *oskar* i *vasa* deponowane jest też białko Tudor [1,27,30,31]. Białko to występuje na terenie plazmy biegunowej także w mitochondriach, ale jego rola w tych organellach jest nieznana [1]. Spekuluje się, że białko Tudor bierze udział w transporcie mitochondrialnego RNA do ziaren biegunowych (patrz niżej).

W plazmie biegunowej świeżo złożonego jaja wykazano też obecność mRNA: *nanos*, *pumilio*, *germ cell-less* i cykliny B [14,55,57,85,96,98]. Czynniki te gromadzone są na biegunie tylnym pod koniec oogenezy, a ich deponowanie zależy od genów grupy tylnej działających wcześniej (rys. 3). Komponenty plazmy biegunowej kodują także geny: *orb*, *Hsp83* i *fat facets* [15,22,51]. Jednak funkcja tych genów w powstawaniu linii płciowej nie jest jeszcze dostatecznie wyjaśniona.

Warto dodać, że morfologicznie plazma biegunowa *Drosophila* przypomina tzw. plazmę płciową występującą w oocytach wielu grup zwierząt, w tym kręgowców [2,16]. W plazmie płciowej płazów i niciani wykryto struktury podobne do ziaren biegunowych, zwane odpowiednio ziarnami płciowymi i ziarnistościami P [86,99]. Co więcej, podobieństwa sięgają poziomu molekularnego. Wykazano, że u żaby szponiastej, *Xenopus laevis* związany z plazmą płciową gen *Xcat-2* jest homologiem genu *nanos* [23,65]. Poza tym u żaby szponiastej, myszy i ryby, *Brachydanio* wyizolowano geny, które kodują białka z grupy DEAD spokrewnione z białkiem Vasa

*Określenie „zarodek *pipsqueak*” (*nanos* itp.) oznacza, że zarodek ma zmutowany allel danego genu (np. genu *pipsqueak*, *nanos*).



RYSUNEK 3. Schemat współdziałania genów biorących udział w formowaniu plazmy biegunowej i determinacji komórek prątciovych oraz odwłoka; strzałki wskazują na oddziaływanie między genami, ale nie wszędzie oznaczają bezpośrednie biochemiczne interakcje między produktami genów; nie uwzględniono genów, których funkcja bądź kolejność działania budzi wątpliwości; szczegółowy opis niektórych procesów przedstawiono w tekście (zob. też tab. 1); mtr RNA – mitochondrialny RNA dużej podjednostki rybosomalnej (wg [74], zmienione)

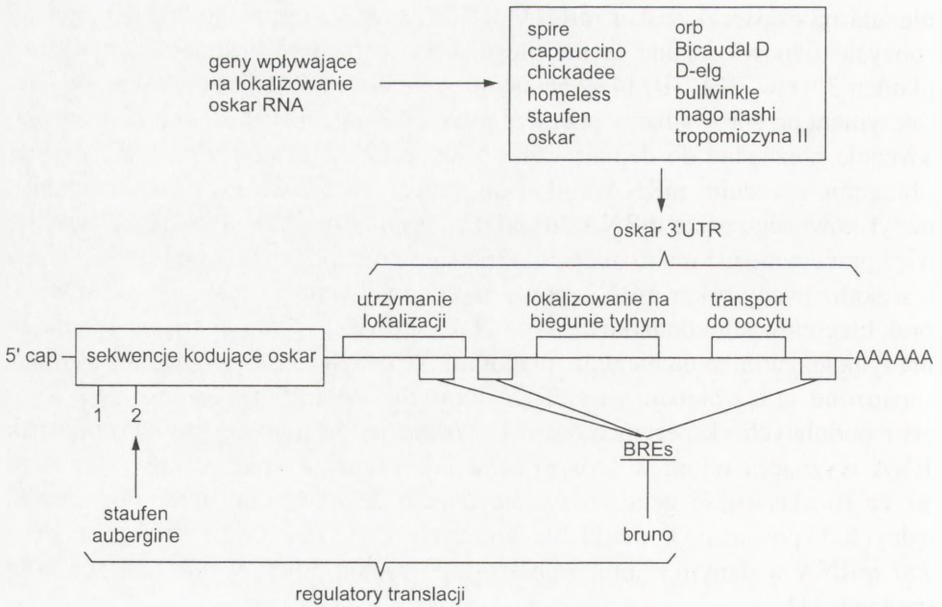
i ulegające ekspresji w komórkach linii płciowej [24,49,102]. Homolog białka *Vasa* występuje prawdopodobnie także u nicienia, *Caenorhabditis elegans* [76]. Tak więc gromadzenie czynników rozwojowych w określonym rejonie zarodka wydaje się być cechą konserwatywną.

1.4. Rola genu *oskar*

Gen *oskar* zajmuje kluczową pozycję w formowaniu plazmy biegunowej. Lokalizowaniu ulega zarówno jego mRNA, jak i kodowane przez niego białko. Analiza

molekularna cząsteczki oskar mRNA wykazała, że za jej transport i deponowanie w oocyty odpowiedzialne są nie ulegające translacji sekwencje występujące na jej końcu 3' (tzw. 3' UTR) [41]. Na istotną rolę końca 3' wskazuje także elegancki eksperyment przeprowadzony przez Ephrussi i Lehmann [19]. Badaczki te zastąpiły sekwencje niezbędne do deponowania oskar mRNA sekwencjami lokalizującymi na biegunie przednim mRNA kodowany przez gen *bicoid*. Po wprowadzeniu tak zmodyfikowanego oskar mRNA do zarodka, gromadzi się on na biegunie przednim, a więc przeciwnie niż ma to miejsce w trakcie normalnego rozwoju [19]. Co więcej, tak zlokalizowany oskar mRNA powoduje wytworzenie na biegunie przednim komórek biegunowych i dodatkowego odwłoka. Powstaje jakby lustrzane odbicie bieguna tylnego zarodka na biegunie przednim. W takich zarodkach na obu biegunach gromadzone są też białka: Vasa, Tudor oraz mRNA i białko Nanos [19]. Wyniki tego i podobnych eksperymentów [81] wskazują, że miejsce gromadzenia oskar mRNA wyznacza rejon, w którym następuje organizowanie plazmy biegunowej oraz że to aktywność genu *oskar* decyduje o deponowaniu determinantów niezbędnych do powstania komórek biegunowych. Wykazano także, że nagromadzenie oskar mRNA w danym rejonie ooplazmy powoduje powstawanie tam ziaren biegunowych [1].

Usuając fragmenty oskar mRNA w rejonie końca 3' udało się zidentyfikować sekwencje nukleotydów odpowiedzialnych za poszczególne etapy jego deponowania (rys. 4). I tak, za transport oskar mRNA z komórek odżywczych do oocyty odpowiada odcinek 260 par zasad. Inny fragment, złożony z 324 par zasad, potrzebny jest do jego lokalizowania na tylnym biegunie oocyty [41]. Jeszcze inny odcinek jest niezbędny do zatrzymania oskar mRNA w tym rejonie [73]. Początkowe deponowanie oskar mRNA jest nietrwałe. Do jego „zakotwiczenia” na tylnym biegunie niezbędne jest białko Oskar, przy czym translacji ulega jedynie zlokalizowany oskar mRNA [18,40,73]. Przyjęto więc model, który zakłada, że początkowe deponowanie oskar mRNA umożliwia jego translację, a powstające białko Oskar reguluje dalsze deponowanie własnego RNA na zasadzie sprzężenia zwrotnego [63,73]. Wykazano też, iż niezlokalizowany oskar mRNA ulega represji. Za proces ten odpowiedzialne są specyficzne sekwencje nukleotydów w obrębie 3' UTR, z którymi wiąże się białko Bruno (rys. 4) [39,73]. Jeśli sekwencje te, zwane BREs (ang. *Bruno Response Elements*) ulegną mutacji, to translacja oskar mRNA następuje przedwcześnie, co prowadzi do letalnych zaburzeń w rozwoju zarodka [39]. Okazuje się jednak, że samo odblokowanie represji nie wystarcza do uruchomienia translacji oskar mRNA i że do jej aktywacji konieczne są jeszcze inne czynniki, np. produkty genów *staufen* i *aubergine* (rys. 4) [39,101]. Gen *oskar* jest więc przykładem genu zaangażowanego w rozwoju, którego aktywność regulowana jest na poziomie translacji. Ostatnio stwierdzono, że deponowanie oskar mRNA zależy także od aktywności genów: *bullwinkle*, *homeless*, *D-elg*, *Bicaudal-D* [25,26,72,89]. Prawdopodobnie produkty tych genów wpływają na organizację cytoszkieletu oocyty (patrz niżej).



RYSUNEK 4. Schemat budowy molekularnej cząsteczki *oskar* mRNA: z lewej na prawą: czapka 5', koniec 5' nie ulegający translacji, sekwencja kodująca, 3' UTR – koniec 3' nie ulegający translacji wraz z sekwencjami (prostokąty) odpowiedzialnymi za kolejne etapy deponowania w oocyte, sekwencja poliA; BRES – sekwencje, z którymi wiąże się białko Bruno powodując represję translacji; cyfry 1,2 pod sekwencją kodującą oznaczają dwa kodony inicjujące translację; gen *oskar* koduje 2 izoformiczne białka, ale tylko jedno bierze udział w formowaniu plazmy biegunowej [63]; geny: *staufer* i *aubergine* aktywują translację, ale sekwencje, jakie w tym pośredniczą są nieznanne (wg [74], zmienione)

1.5. Podwójna funkcja genu *nanos*

W omawianym systemie hierarchicznym interesującą pozycję zajmuje gen *nanos*. Jego mRNA gromadzony jest na tylnym biegunie oocytu, przy czym do prawidłowego deponowania niezbędna jest aktywność genów grupy tylnej, w tym genu *oskar* (rys. 3). Do niedawna uważano, że gen *nanos* zaangażowany jest wyłącznie w wytworzenie odwłoka. Z badań Kobayashiego wynika jednak, że produkty tego genu pełnią także funkcje w komórkach prątkiowych [48]. *Nanos* mRNA wnika do powstających komórek biegunowych i utrzymuje się, aż do momentu formowania gonady [95]. Choć białko *Nanos* nie bierze udziału w powstawaniu komórek biegunowych, to jest potrzebne do prawidłowej migracji tych komórek do gonady zarodkowej [48]. W komórkach prątkiowych powstających w zarodkach *nanos* następuje przedwczesna ekspresja genów, które normalnie aktywowane są dopiero po utworzeniu zawiązka gonady [48].

1.6. Zaangażowanie cytoszkieletu w transport produktów genów

W trakcie oogenezy w ooplazmie dochodzi do zmian w rozmieszczeniu mikrotubul [11,58,91]. We wczesnych stadiach (od 1 do 6) centrum organizacyjne mikrotubul znajduje się na tylnym biegunie oocyty, a mikrotubule rozciągają się w kierunku komórek odżywczych przechodząc przez mostki cytoplazmatyczne (rys. 1a) [91]. Wyniki eksperymentów z użyciem czynników depolimeryzujących mikrotubule i bezpośrednie obserwacje cytoszkieletu komory jajowej wskazują na udział tak spolaryzowanego układu mikrotubul w transporcie oskar mRNA [10,70,92,93]. Uważa się, że białko Staufen pośredniczy w interakcji między oskar mRNA a białkami kroczącymi lub białkami cytoszkieletu.

W okresie formowania plazmy biegunowej układ mikrotubul ulega zmianie: centrum organizacyjne mikrotubul zanika, a mikrotubule gromadzą się na przednim biegunie oocyty (rys. 1b) [93]. W stadiach od 8 do 10 mikrotubule występują głównie w warstwie korowej i tworzą gradient gęstości z największą koncentracją na biegunie przednim. Koniec „+” mikrotubul znajduje się na tylnym biegunie oocyty (rys. 1b) [93]. W tym kontekście spekuluje się, że w transporcie kompleksu oskar mRNA-Staufen zaangażowana jest kinezyzna, białko przemieszczające się wzdłuż mikrotubul do ich końca „+”. Hipoteza ta znajduje poparcie w badaniach eksperymentalnych. Jeśli doprowadzi się do ekspresji w linii płciowej białka będącego hybrydą kinezyzny i B-galaktozydazy, to gromadzi się ono na tylnym biegunie oocyty, tak jak np. białko Oskar [10]. Ostatnio wykazano, że na organizację cytoszkieletu mikrotubularnego oocyty ma wpływ aktywność genu *mago nashi* (rys. 3) [64,69].

W powstawaniu plazmy biegunowej uczestniczą także inne białka cytoszkieletu. W zarodkach, w których mutacji uległ gen kodujący cytoplazmatyczną (niemięśniową) tropomiozynę II, deponowanie kompleksu oskar mRNA-Staufen jest zaburzone [20]. Przyjmuje się, że tropomiozyna, w powiązaniu z filamentami aktynowymi, działa niezależnie od sieci mikrotubul oocyty lub że uczestniczy w przekazywaniu oskar mRNA na mikrotubule [20].

1.7. Wpływ komórek somatycznych

Jak wcześniej wspomniano, w deponowaniu czynników rozwojowych w oocycie zaangażowana jest sieć mikrotubul. Formowanie tej sieci uzależnione jest od wzajemnego przekazywania sygnałów między oocytem a komórkami folikularnymi bieguna tylnego (rys. 1b, 3) [28,70,71,75,93]. Proces ten nie został jeszcze w pełni poznany. Wiadomo jednak, że za determinację komórek folikularnych bieguna tylnego odpowiedzialne są 2 pary genów: *gurken* i *torpedo-DER* oraz *Notch* i *Delta* (rys. 3), przy czym w oocycie działa jedynie produkt genu *gurken* [28,75,77,78,79].

Zaproponowano kilka modeli interakcji komórek somatycznych z oocytem. Najprostszy z nich zakłada, że sygnał przekazywany z komórek folikularnych bieguna tylnego do oocyty powoduje zmiany w organizacji sieci mikrotubul, co z kolei

pozwała na właściwe rozmieszczenie czynników rozwojowych w ooplazmie [50, 78]. Ciągłe nieznaną pozostaje receptor sygnału biegnącego od komórek folikularnych do oocytu. W dalszym przekazywaniu tego sygnału do sieci mikrotubul w ooplazmie uczestniczą co najmniej 2 czynniki: białkowa kinaza A poprzez fosforylację białek związanych z mikrotubulami oraz produkt genu *mago nashi* [50, 64,69].

1.8. Czynniki determinujące komórki prąpciove

Początkowo sądzono, że ziarna biegunowe zaangażowane są wyłącznie w wytworzenie komórek prąpciove. Obecnie przyjmuje się jednak, że nagromadzone w tych strukturach czynniki niezbędne są także do prawidłowego deponowania produktu genu *nanos* i determinacji odwłoka. Tak więc procesy te (determinacja komórek prąpciove i odwłoka) zależą od prawidłowej aktywności pewnej liczby wspólnych genów (rys. 3). Czy istnieją jednak geny odpowiedzialne wyłącznie za powstawanie komórek prąpciove? Produkty takich genów gromadzone byłyby pod koniec oogenezy, a ich mutacje powinny powodować całkowity brak komórek biegunowych przy jednoczesnym prawidłowym wykształceniu odwłoka. Postulaty te spełniałby gen *germ cell-less*, jednak z badań Jongens i wsp. wynika, że białko *Germ cell-less* występuje także w tkankach somatycznych zarodka, co wskazuje, że nie jest specyficzne dla linii pćiove [37,38].

Jak wcześniej wspomniano, ziarna biegunowe występują w kontakcie z mitochondriami. Jeśli do zarodka, który w wyniku naświetlania promieniami UV nie tworzy komórek biegunowych, zostanie wprowadzony mitochondrialny RNA budujący dużą podjednostkę rybosomalną (mtr RNA), to powstają komórki biegunowe, ale dojrzałe osobniki są sterylne [47]. Wykazano, że mtr RNA gromadzi się na powierzchni ziaren biegunowych, a więc pozamitochondrialnie [45,46]. Niewątpliwie, genom mitochondrialny pełni jakąś funkcję w determinacji komórek biegunowych, ale jest ona niedostatecznie poznana. Interesujące, że mtr RNA występuje pozamitochondrialnie także w plazmie pćiove *Xenopus* [46].

Wciąż odkrywane są nowe czynniki budujące ziarna biegunowe. Ostatnio wykazano występowanie w tych strukturach nie ulegającego translacji RNA, który kodowany jest przez gen *Polar granule component* [66]. Choć ten RNA nie bierze udziału w powstawaniu komórek prąpciove, to jest niezbędny do ich prawidłowej migracji i różnicowania [66].

Jak dotąd nie udało się jednoznacznie zidentyfikować pojedynczego czynnika odpowiedzialnego za determinację komórek prąpciove *Drosophila*. Coraz częściej rozpatrywana jest możliwość, że działa tu wiele czynników. Być może, jak uważają Kobayashi i wsp. [44], są nimi: *germ cell-less* mRNA i mtr RNA.

2. MIGRACJA KOMÓREK PRAPŁCIOWYCH I FORMOWANIE GONADY ZARODKOWEJ

Embrionalna gonada *Drosophila* zbudowana jest z 2 typów komórek: komórek prapłciowych, tworzących linię płciową i komórek somatycznych, pochodzenia mezodermalnego. Zanim dojdzie do utworzenia gonady, komórki prapłciowe początkowo leżące na zewnątrz zarodka muszą przedostać się do jego wnętrza i połączyć z komórkami mezodermy gonadalnej (zob. rozdział 1). Znane są kolejne fazy wędrówki komórek prapłciowych, ale niewiele wiadomo na temat molekularnego podłoża tej migracji czy czynników ją regulujących.

Przypuszczano, że o rozpoczęciu migracji komórek prapłciowych przez zawiązek jelita (zob. rozdział 1) decyduje ich autonomiczny mechanizm czasowy. Eksperymenty z przeszczepianiem komórek biegunowych między zarodkami w różnych stadiach rozwoju wykazały, że tak nie jest. Zarówno młodsze, jak i starsze komórki prapłciowe migrują zawsze zgodnie ze stadium rozwojowym biorcy [35]. Wskazuje to jednocześnie, że komórki prapłciowe zdolne są do migracji wkrótce po powstaniu. Sam proces penetracji zawiązka jelita jest specyficzną właściwością komórek prapłciowych, gdyż komórki somatyczne, eksperymentalnie umieszczone w tym zawiązku, nigdy go nie opuszczają [35]. W regulowaniu migracji komórek prapłciowych kluczową rolę odgrywają komórki zawiązka jelita środkowego. Wskazują na to następujące przesłanki: zawiązek jelita opuszczają jedynie komórki prapłciowe zgromadzone w jego ślepo zakończonej części, stanowiącej właśnie zawiązek jelita środkowego (rys. 2e,f); komórki prapłciowe ulokowane w innym rejonie zawiązka jelita nie migrują prawidłowo; w zarodkach *huckebein*, w których następuje zamiana zawiązka jelita środkowego na zawiązek jelita tylnego, komórki prapłciowe pozostają wewnątrz jelita i nie docierają do mezodermy gonadalnej [35]. Jednocześnie, nie wszystkie mutacje genów ulegających ekspresji w zawiązku jelita środkowego prowadzą do zaburzeń w migracji komórek prapłciowych [34,97]. Tak więc decydujące znaczenie dla translokacji komórek prapłciowych ma ta część zawiązka jelita, której prawidłowe różnicowanie zależy od aktywności genu *huckebein*. Wiadomo, że gen ten koduje czynnik transkrypcyjny regulujący ekspresję genów w zawiązku jelita środkowego [7].

Interesujące jest, że tkanka docelowa (mezoderma gonadalna) nie odgrywa roli ani w opuszczaniu zawiązka jelita przez komórki prapłciowe, ani w początkowym orientowaniu ich migracji w kierunku strony grzbietowej zarodka. W zmutowanych zarodkach całkowicie pozbawionych komórek mezodermalnych (podwójne mutanty *twist* i *snail*) oba te procesy przebiegają prawidłowo [35,97].

Badania ultrastrukturalne wykazały, że w trakcie przechodzenia komórek prapłciowych przez zawiązek jelita środkowego dochodzi do istotnych zmian w jego organizacji. Przede wszystkim następuje modyfikacja połączeń typu stref przylegania

między komórkami zawiązka jelita środkowego. Prowadzi to do powstawania szerokich przestrzeni międzykomórkowych, które są penetrowane przez komórki prapłciowe [8,36]. Zmiany te nie są jednak wywoływane aktywnością komórek prapłciowych, gdyż zachodzą także w zarodkach *oskar*³⁰¹ i *tudor*, w których komórki biegunowe się nie tworzą [8,36]. Podobnie w zarodkach myszy i żaby, *Rana pipiens* zaobserwowano, że migracja komórek prapłciowych zależy od zmian zachodzących w ich somatycznym otoczeniu [21,87].

Komórki prapłciowe migrują wysuwając pseudopodia w rozmaitych kierunkach. Towarzyszy temu reorganizacja cytoszkieletu aktynowego [36]. Prawdopodobnie stabilizacja niektórych pseudopodiów zapewnia ukierunkowanie ruchu. Aktywność migracyjna komórek prapłciowych ustaje po dotarciu do somatycznych komórek gonady [36].

Niewiele wiemy o mechanizmach regulujących migrację komórek prapłciowych z zawiązka jelita do mezodermy gonadalnej. Przypuszcza się, że sygnały ukierunkowujące zlokalizowane są w podłożu, po którym przemieszczają się te komórki. Wyniki eksperymentów *in vitro* wskazują, że komórki prapłciowe migrują z różną prędkością w zależności od rodzaju podłoża, np. czynnikiem stymulującym jest obecność w podłożu białka lamininy [36]. Najprawdopodobniej w regulację migracji zaangażowanych jest wiele różnorodnych czynników. Ostatnio odkryto gen *wunen*, który ulega ekspresji jedynie w tej części zawiązka jelita, przez którą komórki prapłciowe nie wędrują [104]. W zarodkach *wunen* komórki te nie kierują się w stronę mezodermy, tylko ulegają rozproszeniu na całej długości zawiązka jelita [103]. Sugeruje to, że produkt genu *wunen* bierze udział w ukierunkowywaniu migracji komórek prapłciowych przez ich „odpychanie” z niektórych rejonów zawiązka jelita. Gen *wunen* koduje białko błonowe o dużym podobieństwie do fosfatazy kwasu fosfatydowego, enzymu zaangażowanego w metabolizm lipidów [104]. Nie wiadomo jeszcze, jaki jest mechanizm oddziaływania produktu genu *wunen* na komórki linii płciowej.

PODSUMOWANIE

W ostatnich latach dokonano znaczącego postępu w charakteryzowaniu molekularnego podłoża różnicowania linii płciowej *Drosophila melanogaster*. Poznano kilkanaście genów biorących udział w tym procesie. Niestety nierozwiązany pozostał problem istnienia czynnika determinującego komórki prapłciowe. Brak jest również precyzyjnych informacji, w jaki sposób komórki te odnajdują tkankę docelową i jak dochodzi do formowania zawiązka gonady. Należy spodziewać się, że wykorzystanie metod genetyki molekularnej pozwoli i te problemy w niedługim czasie rozwikłać. Z badań nad *Drosophila* wynika, że prawidłowe funkcjonowanie komórek

linii płciowej wymaga ich ciągłej interakcji z różnorodnymi komórkami somatycznymi, zarówno w trakcie gametogenezy jak i rozwoju embrionalnego.

PODZIĘKOWANIA

Pragnę podziękować Panu Prof. S. Bilińskiemu za dyskusję i wyczerpujący komentarz do pierwotnej wersji tekstu oraz Panu Prof. J. Klagowi i Pani dr E. Rościszewskiej za uwagi dotyczące tego artykułu. Pani mgr A. Jankowskiej i Pani mgr E. Kisiel dziękuję za wykonanie rysunków.

LITERATURA

- [1] BARDSLEY A, MCDONALD K, BOSWELL RE. Distribution of *tudor* protein in the *Drosophila* embryo suggests separation of functions based on site of localization. *Development* 1993; **119**: 207–219.
- [2] BEAMS HW, KESSEL RG. The problem of germ cell determinants. *Int Rev Cytol* 1974; **139**: 413–479.
- [3] BILIŃSKI S. Powstawanie i depozycja matczynych czynników rozwojowych w oocytach bezkręgowców. *Post Biol Kom* 1992; **19**: 23–34.
- [4] BILIŃSKI S. Gromadzenie informacji rozwojowej w oocytach *Drosophila*. [w] Biliński S, Bielańska-Osuchowska Z, Kawiak J, Przełęcka A [red.] Ultrastruktura i funkcja komórki. Tom 6, Oogeneza. Warszawa: PWN 1994: 50–60.
- [5] BOSWELL RE, MAHOWALD AP. *Tudor*, a gen required for assembly of the germ plasm in *Drosophila melanogaster*. *Cell* 1985; **43**: 97–104.
- [6] BREITWIESER W, MARKUSSEN FH, HORSTMANN H, EPHRUSSI A. *Oskar* protein interaction with *Vasa* represents an essential step in polar granule assembly. *Genes Dev* 1996; **10**: 2179–2188.
- [7] BRÖNNER G, CHU-LAGRAFF Q, DOE CQ, COHEN B, WEIGEL D, TAUBERT H, JÄCKLE H. *Sp1/egr*-like zinc-finger protein required for endoderm specification and germ-layer formation in *Drosophila*. *Nature* 1994; **369**: 664–668.
- [8] CALLAINI G, RIPARBELLI MG, DALLAI R. Pole cell migration through the gut wall of the *Drosophila* embryo: Analysis of cell interactions. *Dev Biol* 1995; **170**: 365–375.
- [9] CAMPOS-ORTEGA JA, HARTENSTEIN V. The Embryonic Development of *Drosophila melanogaster*. Berlin: Springer-Verlag 1985.
- [10] CLARK I, GINIGER E, RUOHOLA-BAKER H, JAN LY, JAN YN. Transient posterior localization of a kinesis fusion protein reflects anteroposterior polarity of the *Drosophila* oocyte. *Curr Biol* 1994; **4**: 289–300.
- [11] COOLEY L, THEURKAUF WE. Cytoskeletal functions during *Drosophila* oogenesis. *Science* 1994; **266**: 590–596.
- [12] COOLEY L, VERHEYEN E, AYERS K. *chickadee* encodes a profilin required for intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis. *Cell* 1992; **69**: 173–184.
- [13] COUNCE SJ. Developmental morphology of polar granules in *Drosophila* including observations on pole cell behavior and distribution during embryogenesis. *J Morphol* 1963; **112**: 129–145.

- [14] DALBY B, GLOVER DM. 3' non-translated sequences in *Drosophila cyclin B* transcripts direct posterior pole accumulation late in oogenesis and peri-nuclear association in syncytial embryos. *Development* 1992; **115**: 989–997.
- [15] DING D, PARKHURST SM, HALSELL SR, LIPSHITZ HD. Dynamic *Hsp83* RNA localization during *Drosophila* oogenesis and embryogenesis. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 3773–3781.
- [16] EDDY EM. Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. *Int Rev Cytol* 1975; **43**: 229–280.
- [17] EMMONS S, PHAN H, CALLEY J, CHEN W, JAMES B, MANSEAU L. *cappuccino*, a *Drosophila* maternal effect gene required for polarity of the egg and embryo, is related to the vertebrate limb deformity locus. *Genes Dev* 1995; **9**: 2482–2494.
- [18] EPHRUSSI A, DICKINSON LK, LEHMANN R. *oskar* organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant *nanos*. *Cell* 1991; **66**: 37–50.
- [19] EPHRUSSI A, LEHMANN R. Induction of germ cell formation by *oskar*. *Nature* 1992; **358**: 387–392.
- [20] ERDELYI M, MICHON AM, GULCHET A, GLOTZER JB, EPHRUSSI A. Requirement for *Drosophila* cytoplasmic tropomyosin in *oskar* mRNA localization. *Nature* 1995; **377**: 524–527.
- [21] FFRENCH-CONSTANT C, HOLLINGSWORTH A, HEASMAN J, WYLIE CC. Response to fibronectin of mouse primordial germ cells before, during and after migration. *Development* 1992; **115**: 395–402.
- [22] FISCHER-VIZE JA, RUBIN GM, LEHMANN R. The *fat facets* gene is required for *Drosophila* eye and embryo development. *Development* 1992; **116**: 985–1000.
- [23] FORRISTALL C, PONDEL M, CHEN L, KING ML. Patterns of localization and cytoskeletal association of two vegetally localized RNAs, *Vgl* and *Xcat-2*. *Development* 1995; **121**: 201–208.
- [24] FUJIWARA Y, KOMIYA T, KAWABATA H, SATO M, FUJIMOTO H, FURUSAWA M, NOCE T. Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila vasa* and its specific expression in germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 12258–12262.
- [25] GAJEWSKI MK, SCHULZ RA. Requirement of the ETS domain transcription factor D-ELG for egg chamber patterning and development during *Drosophila* oogenesis. *Oncogene* 1995; **11**: 1033–1040.
- [26] GILLESPIE DE, BERG CA. *homeless* is required for RNA localization in *Drosophila* oogenesis and encodes a new member of the DE-H family of RNA-dependent ATPases. *Genes Dev* 1995; **9**: 2495–2508.
- [27] GOLUMBESKI GS, BARDSLEY A, TAX F, BOSWELL RE. *tudor*, a posterior-group gene of *Drosophila melanogaster*, encodes a novel protein and an mRNA localized during mid-oogenesis. *Genes Dev* 1991; **5**: 2060–2070.
- [28] GONZALEZ-REYES A, ELLIOTT H, ST JOHNSTON D. Polarization of both major body axes in *Drosophila* by *gurken-torpedo* signalling. *Nature* 1995; **375**: 654–658.
- [29] GRÜNERT S, ST JOHNSTON D. RNA localization and the development of asymmetry during *Drosophila* oogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 1996; **6**: 395–402.
- [30] HAY B, ACKERMAN L, BARBEL S, JAN L, JAN YN. Identification of a component of *Drosophila* polar granules. *Development* 1988; **103**: 625–640.
- [31] HAY B, JAN L, JAN YN. A protein component of *Drosophila* polar granules is encoded by *vasa* and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases. *Cell* 1988; **55**: 577–587.
- [32] HAY B, JAN L, JAN YN. Localization of *vasa*, a component of *Drosophila* polar granules, in maternal-effect mutants that alter embryonic anteroposterior polarity. *Development* 1990; **109**: 425–433.
- [33] HOROWITZ H, BERG CA. The *Drosophila pipsqueak* gene encodes a nuclear BTB-domain-containing protein required early in oogenesis. *Development* 1996; **122**: 1859–1871.

- [34] HOWARD K, JAGLARZ M, ZHANG N, SHAH J, WARRIOR R. Migration of *Drosophila* germ cells: analysis using enhancer trap lines. *Development* 1993; Suppl.: 213–218.
- [35] JAGLARZ MK, HOWARD KR. Primordial germ cell migration in *Drosophila melanogaster* is controlled by somatic tissue. *Development* 1994; **120**: 83–89.
- [36] JAGLARZ MK, HOWARD KR. The active migration of *Drosophila* primordial germ cells. *Development* 1995; **121**: 3495–3503.
- [37] JONGENS TA, ACKERMAN LD, SWEDLOW JR, JAN LY, JAN YN. *Germ cell-less* encodes a cell type-specific nuclear pore-associated protein and functions early in the germ-cell specification pathway of *Drosophila*. *Genes Dev* 1994; **8**: 2123–2136.
- [38] JONGENS TA, HAY B, JAN LY, JAN YN. The *germ cell-less* gene product: A posteriorly localized component necessary for germ cell development in *Drosophila*. *Cell* 1992; **70**: 569–584.
- [39] KIM-HA J, KERR K, MACDONALD PM. Translational regulation of *oskar* mRNA by *bruno*, an ovarian RNA-binding protein, is essential. *Cell* 1995; **81**: 403–412.
- [40] KIM-HA J, SMITH JL, MACDONALD PM. *oskar* mRNA is localized to the posterior pole of the *Drosophila* oocyte. *Cell* 1991; **66**: 23–35.
- [41] KIM-HA J, WEBSTER PJ, SMITH JL, MACDONALD PM. Multiple RNA regulatory elements mediate distinct steps in localization of *oskar* mRNA. *Development* 1993; **119**: 169–178.
- [42] KLAG J. Różnicowanie komórek prątkiowych w zarodkach owadów i płazów. *Zeszyty Naukowe UJ. Prace z biologii molekularnej* 1990; **18**: 163–170.
- [43] KLAG J. Pochodzenie komórek płciowych. [w] Biliński S, Bielańska-Osuchowska Z, Kawiak J, Przełęcka A [red.]. *Ultrastruktura i funkcja komórki. Tom 6, Oogeneza*. Warszawa: PWN 1994; 16–29.
- [44] KOBAYASHI S, AMIKURA R, NAKAMURA A, SAITO H, OKADA M. Mislocalization of *oskar* product in the anterior pole results in ectopic localization of mitochondrial large ribosomal RNA in *Drosophila* embryos. *Dev Biol* 1995; **169**: 384–386.
- [45] KOBAYASHI S, AMIKURA R, OKADA M. Presence of mitochondrial large ribosomal RNA outside mitochondria in germ plasm of *Drosophila melanogaster*. *Science* 1993; **260**: 1521–1524.
- [46] KOBAYASHI S, AMIKURA R, OKADA M. Localization of mitochondrial large rRNA in germinal granules and the consequent segregation of germ line. *Int J Dev Biol* 1994; **38**: 193–199.
- [47] KOBAYASHI S, OKADA M. Restoration of pole-cell-forming ability to u.v.-irradiated *Drosophila* embryos by injection of mitochondrial IrRNA. *Development* 1989; **107**: 733–742.
- [48] KOBAYASHI S, YAMADA M, ASAOKA M, KITAMURA T. Essential role of the posterior morphogen *nanos* for germline development in *Drosophila*. *Nature* 1996; **380**: 708–711.
- [49] KOMIYA T, ITOH K, IKENISHI K, FURUSAWA M. Isolation and characterization of a novel gene of the DEAD box protein family which is specifically expressed in germ cells of *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 1994; **162**: 354–363.
- [50] LANEME, KALDERON D. RNA localization along the anteroposterior axis of the *Drosophila* oocyte requires PKA-mediated signal transduction to direct normal microtubule organization. *Genes Dev* 1994; **8**: 2986–2995.
- [51] LANTZ V, AMBROSIO L, SCHEDL P. The *Drosophila orb* gene is predicted to encode sex-specific germline RNA-binding proteins and has localized transcripts in ovaries and early embryos. *Development* 1992; **115**: 75–88.
- [52] LASKO PF, ASHBURNER M. The product of the *Drosophila* gene *vasa* is very similar to eukaryotic initiation factor-4A. *Nature* 1988; **335**: 611–617.
- [53] LASKO PF, ASHBURNER M. Posterior localization of *vasa* protein correlates with, but is not sufficient for, pole cell development. *Genes Dev* 1990; **4**: 905–921.

- [54] LEHMANN R, NÜSSELEIN-VOLHARD C. The maternal gene *nanos* has central role in pattern formation of the *Drosophila* embryo. *Development* 1991; **112**: 679–691.
- [55] LEHNER C, O'FARRELL P. The roles of *Drosophila cyclins* A and B in mitotic control. *Cell* 1990; **61**: 535–547.
- [56] LIVNEH E, GLAZER L, SEGAL D, SCHLESSINGER J, SHILO BZ. The *Drosophila* EGF receptor gene homolog: Conservation of both hormone binding and kinase domains. *Cell* 1985; **40**: 599–607.
- [57] MACDONALD PM. The *Drosophila pumilio* gene: An unusually long transcription unit and an unusual protein. *Development* 1992; **114**: 221–232.
- [58] MAHAJAN-MIKLOS S, COOLEY L. Intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis. *Dev Biol* 1994; **165**: 336–351.
- [59] MAHOWALD AP. Polar granules of *Drosophila* II. Ultrastructural changes during early embryogenesis. *J Exp Zool* 1968; **167**: 237–262.
- [60] MAHOWALD AP. Polar granules of *Drosophila* IV. Cytochemical studies showing loss of RNA from polar granules during early embryogenesis. *J Exp Zool* 1971; **176**: 345–352.
- [61] MANSEAU L, CALLEY J, PHAN H. Profilin is required for posterior patterning of the *Drosophila* oocyte. *Development* 1996; **122**: 2109–2116.
- [62] MANSEAU LJ, SCHÜPBACH T. *cappuccino* and *spire*: two unique maternal-effect loci required for both the anterior-posterior and dorsoventral patterns of *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 1989; **3**: 1437–1452.
- [63] MARKUSSEN FH, MICHON AM, BREITWIESER W, EPHRUSSI A. Translational control of *oskar* generates Short OSK, the isoform that induces pole plasm assembly. *Development* 1995; **121**: 3723–3732.
- [64] MICKLEM DR, DASGUPTA R, ELLIOTT H, GERGELY F, DAVIDSON C, BRAND A, GONZALEZREYES A, ST JOHNSTON D. The *mago nashi* gene is required for the polarisation of the oocyte and the formation of perpendicular axes in *Drosophila*. *Curr Biol* 1997; **7**: 468–478.
- [65] MOSQUERA L, FORRISTALL C, ZHOU Y, KING ML. A mRNA localized to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes encodes a protein with a *nanos*-like zinc finger domain. *Development* 1993; **117**: 377–386.
- [66] NAKAMURA A, AMIKURA R, MUKAI M, KOBAYASHI S, LASKO PF. Requirement for a noncoding RNA in *Drosophila* polar granules for germ cell establishment. *Science* 1996; **274**: 2075–2079.
- [67] NEUMAN-SILBERBERG FS, SCHÜPBACH T. The *Drosophila* dorsoventral patterning gene *gurken* produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF α -like protein. *Cell* 1993; **75**: 165–174.
- [68] NEWMARK PA, BOSWELL RE. The *mago nashi* locus encodes an essential product required for germ plasm assembly in *Drosophila*. *Development* 1994; **120**: 1303–1313.
- [69] NEWMARK PA, MOHR SE, GONG L, BOSWELL RE. *mago nashi* mediates the posterior follicle cell-to-oocyte signal to organize axis formation in *Drosophila*. *Development* 1997; **124**: 3197–3207.
- [70] POKRYWKA NJ, STEPHENSON EC. Microtubules are a general component of mRNA localization systems in *Drosophila* oocytes. *Dev Biol* 1995; **167**: 363–370.
- [71] RAY RP, SCHÜPBACH T. Intercellular signaling and the polarization of body axes during *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev* 1996; **10**: 1711–1723.
- [72] RITTENHOUSE KR, BERG CA. Mutations in the *Drosophila* gene *bullwinkle* cause the formation of abnormal eggshell structures and bicaudal embryos. *Development* 1995; **121**: 3023–3033.
- [73] RONGO C, GAVIS ER, LEHMANN R. Localization of *oskar* RNA regulates *oskar* translation and requires Oskar protein. *Development* 1995; **121**: 2737–2746.

- [74] RONGO C, LEHMANN R. Regulated synthesis, transport and assembly of the *Drosophila* germ plasm. *Trends Genet* 1996; **12**: 102–109.
- [75] ROTH S, NEUMAN-SILBERBERG FS, BARCELO G, SCHÜPBACH T. *cornichon* and the EGF receptor signaling process are necessary for both anterior-posterior and dorsal-ventral pattern formation in *Drosophila*. *Cell* 1995; **81**: 967–978.
- [76] ROUSSELL DL, BENNETT KL. *glh-1*: a germline putative RNA helicase from *Caenorhabditis elegans* has four zinc fingers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 9300–9304.
- [77] RUOHOLA-BAKER H, JAN LY, JAN YN. The role of gene cassettes in axis formation during *Drosophila* oogenesis. *Trends Genet* 1994; **10**: 89–94.
- [78] RUOHOLA H, BREMER KA, BAKER D, SWEDLOW JR, JAN LY, JAN YN. Role of neurogenic genes in establishment of follicle cell fate and oocyte polarity during oogenesis in *Drosophila*. *Cell* 1991; **66**: 433–449.
- [79] SCHÜPBACH T. Germ line and soma cooperate during oogenesis to establish the dorsoventral pattern of egg shell and embryo in *Drosophila melanogaster*. *Cell* 1987; **49**: 699–707.
- [80] SIEGEL V, JONGENS TA, JAN LY, JAN YN. *pipsqueak*, an early acting member of the posterior group of genes, affects *vasa* level and germ cell-somatic cell interaction in the developing egg chamber. *Development* 1993; **119**: 1187–1202.
- [81] SMITH JL, WILSON JE, MACDONALD PM. Overexpression of *oskar* directs ectopic activation of *nanos* and presumptive pole cell formation in *Drosophila* embryos. *Cell* 1992; **70**: 849–859.
- [82] SPRADLING AC. Developmental genetics of oogenesis. [w] Bate M, Martinez-Arias A [red.] The Development of *Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1993: 1–70.
- [83] ST JOHNSTON D. Pole plasm and the posterior group genes. [w] Bate M, Martinez-Arias A [red.] The Development of *Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1993: 325–363.
- [84] ST JOHNSTON D, BEUCHLE D, NÜSSLEIN-VOLHARD C. *Staufen*, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* 1991; **66**: 51–63.
- [85] ST JOHNSTON D, NÜSSLEIN-VOLHARD C. The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* 1992; **68**: 201–219.
- [86] STROME S, WOOD WB. Immunofluorescence visualization of germ-line-specific cytoplasmic granules in embryos, larvae, and adults of *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79**: 1558–1562.
- [87] SUBTELNY S, PENKALA JE. Experimental evidence for a morphogenetic role in the emergence of primordial germ cells from the endoderm in *Rana pipiens*. *Differentiation* 1984; **26**: 211–219.
- [88] SUTER B, ROMBERG L, STEWARD R. *Bicaudal-D*, a *Drosophila* gene involved in developmental asymmetry: localized transcript accumulation in ovaries and sequence similarity to myosin heavy chain tail domains. *Genes Dev* 1989; **3**: 1957–1968.
- [89] SWAN A, SUTER B. Role of *Bicaudal-D* in patterning the *Drosophila* egg chamber in mid-oogenesis. *Development* 1996; **122**: 3577–3586.
- [90] TECHNAU GM, CAMPOS-ORTEGA JA. Lineage analysis of transplanted individual cells in embryos of *Drosophila melanogaster*. III. Commitment and proliferative capabilities of pole cells and midgut progenitors. *Roux's Arch Dev Biol* 1986; **195**: 489–498.
- [91] THEURKAUF WE. Microtubules and cytoplasm organization during *Drosophila* oogenesis. *Dev Biol* 1994; **165**: 352–360.
- [92] THEURKAUF WE, ALBERTS BM, JAN YN, JONGENS TA. A central role for microtubules in the differentiation of *Drosophila* oocytes. *Development* 1993; **118**: 1169–1180.
- [93] THEURKAUF WE, SMILEY S, WONG ML, ALBERTS BM. Reorganization of the cytoskeleton during *Drosophila* oogenesis: implications for axis specification and intercellular transport. *Development* 1992; **115**: 923–936.

- [94] UNDERWOOD EM, CAULTON JH, ALLIS CD, MAHOWALD AP. Developmental fate of pole cells in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 1980; **77**: 303–314.
- [95] WANG C, DICKINSON L, LEHMANN R. Genetics of *nanos* localization in *Drosophila*. *Dev Dyn* 1994; **199**: 103–115.
- [96] WANG C, LEHMANN R. *Nanos* is the localized posterior determinant in *Drosophila*. *Cell* 1991; **66**: 637–647.
- [97] WARRIOR R. Primordial germ cell migration and the assembly of the *Drosophila* embryonic gonad. *Dev Biol* 1994; **166**: 180–194.
- [98] WHITFIELD WGF, GONZALEZ C, SANCHEZ-HERRERO E, GLOVER DM. Transcripts of one of two *Drosophila cyclin* genes become localized in pole cells during embryogenesis. *Nature* 1989; **338**: 334–337.
- [99] WHITINGTON PM, DIXON KE. Quantitative studies of germ plasm and germ cells during early embryogenesis of *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol* 1975; **73**: 57–74.
- [100] WILLIAMSON A, LEHMANN R. Germ cell development in *Drosophila*. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996; **12**: 365–391.
- [101] WILSON JE, CONNELL JE, MACDONALD PM. *aubergine* enhances *oskar* translation in *Drosophila* ovary. *Development* 1996; **122**: 1631–1639.
- [102] YOON C, KAWAKAMI K, HOPKINS N. Zebrafish *vasa* homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development* 1997; **124**: 3157–3166.
- [103] ZHANG N, ZHANG J, CHENG Y, HOWARD K. Identification and genetic analysis of *wunen*, a gene guiding *Drosophila melanogaster* germ cell migration. *Genetics* 1996; **143**: 1231–1241.
- [104] ZHANG N, ZHANG J, PURCELL KJ, CHENG Y, HOWARD K. The *Drosophila* protein *Wunen* repels migrating germ cells. *Nature* 1997; **385**: 64–67.

Redaktor prowadzący – S. Biliński

Otrzymano: 20.12.1997 r.

Przyjęto: 13.01.1998 r.

Adres autora: Instytut Zoologii UJ, Kraków

UDZIAŁ CHEMOKIN ORAZ RECEPTORÓW CHEMOKINOWYCH W PATOGENEZIE ZAKAŻENIA WIRUSEM AIDS

INVOLVEMENT OF CHEMOKINES AND CHEMOKINE RECEPTORS IN HIV INFECTION, ITS PATHOGENESIS AND MECHANISMS

Marek HONCZARENKO, Bogusław MACHALIŃSKI

Zakład Patologii Komórki Pomorskiej Akademii Medycznej, Szczecin

Streszczenie: W pracy przedstawiono obecne poglądy na patogenezę i mechanizm zakażenia wirusem AIDS. Scharakteryzowano różne typy HIV w zależności od zakresu infekowanych komórek i zdolności patogennych oraz ich interakcję z receptorem CD4. Przedstawiono podział, biologię i funkcję receptorów chemokinowych, ich naturalne ligandy oraz mechanizm przekazywania sygnału wewnątrz komórki poprzez aktywację białka G. Szczególną uwagę poświęcono roli receptorów chemokinowych jako koreceptorów dla HIV niezbędnych do infekcji komórek. Podzielono poznane dotąd grupy receptorów chemokinowych, służące jako koreceptory dla infekcji HIV w zależności od wiązania z wirusem i wpływu tego procesu na przebieg zakażenia. Opisano mechanizm molekularny interakcji wirusa z receptorami chemokinowymi oraz mechanizm blokowania i modulowania infekcji przez chemokiny. Zwrócono uwagę na udział mutacji genów kodujących receptory chemokinowe w kształtowaniu naturalnej oporności na zakażenie HIV. Przedstawiono także obecne poglądy na wpływ HIV na uszkodzenie układu krwiotwórczego oraz perspektywy potencjalnych strategii terapeutycznych opartych na ingerencji w mechanizm wnikania wirusa do komórek.

Słowa kluczowe: HIV, receptory chemokinowe, hematopoeza

Summary: Current opinions on HIV infection, its pathogenesis and mechanisms that allow for virus entry to the cells are presented in the paper. Different strains of HIV, regarding types of infected cells, pathogenicity and their interactions with CD4 molecule have been described. Current division, biology and function of chemokine receptors have been described. The main focus concern on the involvement of chemokine receptors in HIV infection. Their role as coreceptors for HIV with the correlation between virus strains and coreceptive function of chemokine receptors is described. Molecular mechanism of HIV-chemokine receptors interaction as well as blockade and modulation of HIV entry into the cells by chemokines is presented. The role of mutation of genes coding for chemokine receptors in creating natural resistance for HIV infection is described. HIV involvement in lesions of hematopoietic system and new therapeutic approaches evolved from discovery of HIV-coreceptors are also presented.

Key words: HIV, chemokine receptors, hematopoietic system

Wykaz skrótów stosowanych w pracy: **AIDS** (ang. *Acquired Immune Deficiency Syndrome*) – nabyty zespół niedoborów odporności; **C3a** – trzeci czynnik dopełniacza; **C3aR** – receptor dla trzeciego czynnika dopełniacza; **C5a** – piąty czynnik dopełniacza; **C5aR** – receptor dla piątego czynnika dopełniacza; **CCR** – receptor dla chemokin; **CD4** (ang. *cluster of differentiation 4*) – antygen powierzchniowy limfocytów T, monocytów, makrofagów, koreceptor dla antygenów zgodności tkankowej drugiej klasy, receptor dla HIV; **CD45RA** – antygen występujący na będkach w spoczynku limfocytach T; **CD45RO** – antygen występujący na aktywowanych limfocytach T oraz limfocytach T pamięci immunologicznej; **CD8** (ang. *cluster of differentiation 8*) – antygen powierzchniowy limfocytów T cytotoksycznych, tymocytów, koreceptor dla antygenów zgodności tkankowej pierwszej klasy; **CMV** (ang. *Cytomegalovirus*) – wirus cytomegalii; **CXC** – receptor dla chemokin; **ENA-78** (ang. *a 78 residue epithelial cell-derived neutrophil activator*) – 78-aminokwasowy epitelialny czynnik aktywujący neutrofile; **GRO** (ang. *Growth Related Gene*) – czynnik stymulujący proliferację komórek; **HCC-1** (ang. *hemofiltrate C-C chemokine 1*) – chemokina zidentyfikowana w hemofiltracie pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek; **HIV** (ang. *Human Immunodeficiency Virus*) – ludzki wirus niedoborów odporności; **I-309** – ligand receptora chemokinowego CCR-8; **IL-1** – interleukina 1; **IL-2** – interleukina 2; **IL-3** – interleukina 3; **IL-4** – interleukina 4; **IL-6** – interleukina 6; **IL-10** – interleukina 10; **IL-12** – interleukina 12; **IP-10** (ang. *Inducible Protein-10*) – białko 10 indukowane przez interferon; **Lymphotactin/SCM-1** (ang. *single cysteine motif 1*) – cząsteczka z pojedynczą resztą cysteinową; **MCP-1** (ang. *Monocyte Chemoattractant Protein-1*) – białko chemotaktyczne monocytów-1; **MCP-3** (ang. *Monocyte Chemoattractant Protein-3*) – białko chemotaktyczne monocytów-3; **MCP-5** (ang. *Monocyte Chemoattractant Protein-5*) – białko chemotaktyczne monocytów-5; **MIG** (ang. *monokine inducible by interferon*) – monokina indukowana przez interferon; **MIP-1** (ang. *Macrophage Inflammatory Protein-1*) – makrofagowy czynnik zapalny -1; **NAP-2** (ang. *Neutrophil Activating Peptide-2*) – peptyd aktywujący neutrofile-2; **PAF** (ang. *platelet-activating factor*) – płytkowy czynnik aktywujący; **PAFR** (ang. *platelet-activating factor receptor*) – receptor dla płytkowego czynnika aktywującego; **RANTES** (ang. *regulated on activation normal T-cell expressed and secreted*) – czynnik produkowany przez limfocyty T podczas ich aktywacji; **SDF-1/PBSF** (ang. *stromal cell-derived factor-1/pre-B cells growth stimulating factor*) – czynnik produkowany przez komórki podścieliska szpiku kostnego-1/ stymulujący wzrost limfocytów pre-B; **SIV** (ang. *Simian Immunodeficiency Virus*) – wirus powodujący niedobór immunologiczny u małp; **STRL-33** – receptor serpentynowy, koreceptor dla M i T tropowych szczepów HIV; **TNF-** (ang. *Tumor Necrosis Factor*) – czynnik martwicy nowotworów; **V-28** – receptor serpentynowy, koreceptor dla M i T tropowych szczepów HIV.

WSTĘP

Pierwsze doniesienia o pacjentach z nabytym niedoborem odporności (AIDS) pochodzą z 1981 roku, kiedy to pojawiły się opisy przypadków zapalenia płuc u młodych homoseksualistów wywołane przez *Pneumocystis carinii* [15]. AIDS jako jednostkę chorobową opisano rok później, a wirus HIV wywołujący to schorzenie został zidentyfikowany po raz pierwszy 14 lat temu przez zespół Luca Montagniera z Instytutu Pasteura w Paryżu oraz Roberta Gallo z Narodowego Instytutu Zdrowia w Waszyngtonie [4,10,13,20,46]. Od tego czasu choroba przenoszona przez wirusa stała się pandemią. Ocenia się, że na świecie zakażonych jest obecnie 29 milionów ludzi, ponad 8 milionów cierpi na objawy AIDS, a zmarło dotąd z powodu

choroby 6,5 miliona pacjentów Liczba nowych przypadków zakażeń przekracza rocznie trzy miliony [15]. Znane są obecnie dwa typy wirusa powodujące AIDS. HIV-1 będący przyczyną zakażeń na całym świecie oraz HIV-2, zakażenia którym są jak na razie ograniczone do obszaru zachodniej Afryki i Indii [15].

Typowy przebieg zakażenia HIV charakteryzuje się kilkoma następującymi po sobie okresami. Wkrótce po wniknięciu do organizmu HIV efektywnie infekuje komórki wszystkich narządów limfatycznych. Infekcja HIV szybko wywołuje humoralną i komórkową odpowiedź immunologiczną ograniczającą replikację wirusa zwykle w ciągu kilku tygodni. Niestety nie eliminuje ona całkowicie z organizmu tego patogenu [15,47]. Klinicznie pierwotna infekcja charakteryzuje się niespecyficznymi objawami, takimi jak: gorączka, ogólne osłabienie, dreszcze, bóle mięśni i stawów, fotofobia, limfadenopatia i wysypka plamisto-grudkowa [15]. Mimo że objawy te występują u większości zakażonych (50 do 70%), ich nasilenie jest różne i hospitalizacja wymagana jest w mniej niż 15% przypadków. Objawy te są zwykle obecne jeszcze przed wystąpieniem wykrywalnych laboratoryjnie wskaźników specyficznej odpowiedzi humoralnej w stosunku do antygenów wirusowych. Następnie infekcja przechodzi w trwający średnio 10 lat okres utajenia.

W asymptomatycznym okresie choroby cały czas dochodzi do replikacji HIV. Dzienna produkcja wirusa dochodzi do 10 miliardów wirionów. Okres życiowy HIV-1 wynosi przeciętnie 1–2 doby. Połowa wszystkich krążących w zakażonym organizmie wirusów ginie co 6 godzin [48, 49, 81]. Ponad 99% wszystkich nowych wirionów jest produkowanych w nowo infekowanych limfocytach CD4+ [48, 49, 81]. Pomimo że u większości pacjentów nie występują żadne objawy kliniczne, czasami może dojść do przejściowego nasilenia się niespecyficzných objawów związanych z wiramią oraz mogą wystąpić infekcje oportunistyczne.

Końcowym stadium choroby jest pełnoobjawowy zespół niedoborów odporności charakteryzujący się spadkiem poziomu limfocytów T CD4+ do poziomu 50–200 komórek/mm³ krwi [15,47]. Pojawiają się zakażenia oportunistyczne, nowotwory układu limfatycznego, mięsak Kaposiego, zajęcie ośrodkowego układu nerwowego z postępującą demencją, ogólne wyniszczenie organizmu. Śmierć następuje w ciągu 3 lat od rozwoju pełnoobjawowego zespołu niedoborów odporności najczęściej z powodu trudnych do opanowania zakażeń lub nowotworów [15].

ANTYGEN CD4 JAKO PODSTAWOWY RECEPTOR UMOŻLIWIAJĄCY WNIKNIĘCIE WIRUSA AIDS DO KOMÓREK – ZMIENNOŚĆ FENOTYPOWA I TROPIZM KOMÓRKOWY WIRUSA

Stosunkowo wcześniej stwierdzono, że występujący na powierzchni limfocytów T, monocytów, makrofagów antygen CD4 jest receptorem, przez który HIV wnika

do wnętrza zakażanych komórek [60]. Ekspresja antygenu CD4 odpowiedzialna jest więc w dużym stopniu za tropizm wirusa i decyduje o tym, które komórki są infekowane, a które nie. HIV ma ponadto olbrzymie zdolności do mutacji i zmiany fenotypu. W czasie wieloletniej historii zakażenia u chorego pojawia się wiele różnych genetycznie i fenotypowo wariantów wirusa [17,108,115,116]. Stwierdzono, że poszczególne warianty HIV-1 różnią się znacznie pod względem tropizmu, czyli zdolności do infekowania i replikacji w różnych liniach komórkowych mających antygen CD4+. Ta właściwość doprowadziła do praktycznego podziału szczepów HIV-1 na trzy typy mające zdolność do infekcji i replikacji w różnych, odmiennych populacjach komórkowych:

1. Wirusy makrofagotropowe (ang. *macrophage tropic HIV*) (M-tropowe) infekują komórki linii monocyto/makrofagowych i komórki jednojądrowe krwi obwodowej. Nie mają one zdolności do replikacji w transformowanych liniach komórkowych limfocytów T mających antygen CD4+ [61,108,115,116].

2. Wirusy limfocytotropowe (ang. *lymphocyte tropic HIV*) (T-tropowe) infekujące transformowane limfocyty T CD4+ i namnażające się w komórkach jednojądrowych krwi obwodowej. Wirusy te nie infekują makrofagów [61,108,115,116].

3. Wirusy dualtropowe lub inaczej amfotropowe (ang. *amphotropic, dual tropic HIV*) mające zdolność do infekcji zarówno makrofagów/monocytów, jak i transformowanych limfocytów T [61,108,116].

M-tropowe HIV pod względem fenotypowym należą do grupy wirusów nie mających zdolności indukowania tworzenia się tzw. syncytiów komórkowych (ang. *NSI-non syncytium inducing*) [15,61,116]. Cechą wirusów T-tropowych i dual-tropowych jest z kolei tendencja do tworzenia syncytiów komórkowych, czyli skupisk wielojądrowych komórek olbrzymich. Z tego też powodu szczepy te określa się często jako wirusy indukujące syncytia (ang. *SI-syncytium inducing*) [15,53,61]. Syncytia tworzą się pomiędzy zainfekowanymi komórkami mającymi na swojej powierzchni antygeny otoczki wirusa i komórkami wykazującymi ekspresję antygenu CD4. Interakcja pomiędzy podjednostką otoczki wirusa gp120 i antygenem CD4 powoduje adhezję komórek, połączenie błon komórkowych i „zlanie się” ich cytoplazmy [15,111].

Zmiany biologicznych właściwości HIV korelują z postępowaniem zakażenia. Większość szczepów HIV uzyskanych od pacjentów wkrótce po serokonwersji lub w asymptotycznym okresie choroby ma M-tropowy fenotyp nie indukujący syncytiów [116]. Z upływem czasu u większości zakażonych zaczynają przeważać szczepy T-tropowe indukujące syncytia. Koreluje to wyraźnie z postępowaniem choroby, wystąpieniem pełnoobjawowego AIDS i zmniejszeniem liczby limfocytów CD4+ [15, 108, 116]. Wirusy „dual-tropowe” reprezentują prawdopodobnie ewolucyjny stopień pomiędzy M a T tropowymi HIV. Potrafią efektywnie replikować w makrofagach mając jednocześnie możliwość indukowania syncytiów komórkowych.

Zdolność do tworzenia syncytiów komórkowych i tropizm HIV-1 zależy od genu kodującego otoczkę wirusa (*env* – *envelope*). Jego produktem są dwie glikoproteiny otoczkowe: powierzchniowa (gp120) i przezłonowa (gp41). Sekwencja regionów zmiennych V1/V2, a szczególnie V3 otoczki wirusa okazała się kluczową determinantą fenotypu HIV [9,101,108,111]. Modyfikując i wymieniając region V3 pomiędzy różnymi szczepami HIV można zmieniać tropizm wirusa. Relatywnie subtelne zmiany w regionie V3, ograniczające się już do dwóch aminokwasów warunkują zdolności poszczególnych szczepów wirusa do indukowania powstawania syncytiów *in vitro* [9,101,111].

RECEPTORY CHEMOKINOWE – KORECEPTORY DLA INFEKCJI WIRUSEM AIDS

Przełomem w zrozumieniu patogenezy AIDS było odkrycie, że antygen CD4 nie jest jedynym receptorem wymaganym w procesie wnikania HIV do zakażanych komórek. Oprócz antygeny CD4 komórki muszą mieć na powierzchni inny – tzw. koreceptor. Role koreceptorów pełnią niektóre z tzw. receptorów chemokinowych [3,28,31,32]. Oznacza to, że chemokiny będące ligandami receptorów chemokinowych mogą konkurować z cząsteczkami wirusa AIDS w procesie przyłączania się do powierzchni komórki. Jak przedstawimy później, fakt ten ma bardzo ważne znaczenie praktyczne.

Biologia i funkcja chemokin oraz ich receptorów

Przed ponad dwudziestoma laty zaobserwowano, że nadsącze z hodowli stymulowanych leukocytów zawierają czynniki chemoatrakcyjne dla monocytów i granulocytów [1,51,71,74,75]. Wiele z tych chemoatraktantów zostało uzyskanych obecnie w czystej postaci oraz udało się sklonować geny kodujące ich receptory. Czynniki te tworzą ciągle powiększającą się rodzinę tzw. cytokin chemotaktycznych, czyli chemokin.

Nazwa chemokiny została po raz pierwszy wprowadzona na Trzecim Międzynarodowym Sympozjum Cytokin Chemotaktycznych w Baden w 1992 roku, jako połączenie terminów chemoatraktantu i cytokiny [74,75]. W odróżnieniu od „klasycznych” cytokin, chemokiny mają bardzo podobne do siebie sekwencje aminokwasowe, złożone są z 70 do 90 aminokwasów i tworzą rodzinę rozpuszczalnych białek o masie 8–16 kDa [71,74,75]. W zależności od lokalizacji kodującego je genu, homologii i dyspozycji dwóch pierwszych z czterech konserwatywnych aminokwasów cysteinowych można je podzielić na trzy grupy:

1. *Chemokiny C-X-C* charakteryzują się obecnością pojedynczego aminokwasu pomiędzy dwoma konserwatywnymi cysteinami. Chemokiny te kodowane są przez geny zgrupowane na ludzkim chromosomie 4 (4q12-q21), z wyjątkiem genu kodującego SDF-1, który znajduje się na chromosomie 10q. Ich sekwencje są homologiczne w 25 do 90%. W tej grupie możemy wyróżnić dwie podgrupy: chemokiny mające charakterystyczną sekwencję aminokwasową ELR (kwas glutaminowy-leucyna-arginina) poprzedzającą pierwszą konserwatywną cysteinę końca aminowego oraz grupę chemokin nie mającą motywu ELR [71,74,75].

2. *Chemokiny CC* mają dwa przylegające do siebie aminokwasy cysteinowe tworzące motyw CC. Kodowane są one przez geny obecne na chromosomie 17. Mają one sekwencję podobną w 25 do 70% [71,74,75].

3. *Chemokina C* charakteryzuje się brakiem dwóch (pierwszego i trzeciego) konserwatywnych aminokwasów cysteinowych. Znany jest obecnie jeden przedstawiciel tej grupy: limfotaktyna/SCM-1. Gen kodujący tę chemokinę znajduje się na chromosomie 1 [54,55,112,113].

4. *Chemokina CX₃C* ma trzy aminokwasy pomiędzy dwoma pierwszymi aminokwasami cysteinowymi. Gen kodujący chemokinę tej grupy: *neurotaktyna* (fraktalina) znajduje się na chromosomie 16.

Chemokiny są produkowane przez komórki krwi obwodowej: neutrofile, monocyty, limfocyty T, płytki krwi, ale także przez makrofagi, komórki śródbłonna, fibroblasty, keratynocyty i komórki mięśni gładkich [51,71,74,75]. Podstawowa rola ich polega na „kierowaniu” migracji monocytów i neutrofilów z łożyska naczyniowego do miejsca infekcji [88]. Chemokiny obecne na komórkach śródbłonna stabilizują pierwotny „rolujący” ruch leukocytów przez ich związanie z endotelium, następnie chemokiny związane z heparyną i glikozaminoglikanami proteoglikanów tzw. matriks zewnątrzkomórkowego kierują migracją leukocytów wzdłuż wzrastającego w kierunku ogniska zapalnego gradientu chemokinowego [71,74,89].

Chemokiny C-X-C mające domenę ELR (IL-8, GRO, ENA-78, GCP-2, NAP-2,) działają chemotaktycznie i aktywująco na neutrofile powodując ich degranulację, uwolnienie mieloperoksydazy oraz innych enzymów [1,71,74,75,104]. Chemokiny C-X-C pozbawione domeny ELR (IP-10, MIG, SDF-1, PF4) oraz chemokiny C-C (RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP1/2/3/4, Eotaxin) przyciągają i aktywują monocyty, komórki dendrytyczne, limfocyty T, komórki NK, limfocyty-B, bazofile i eozynofile [71,74,75]. Chemokina C (lymphotaktyna/SCM-1) działa wyłącznie na limfocyty T [54,55,112,113]. Chemokina CX₃C (neurotaktyna) jest białkiem związanym z błoną komórkową i działa głównie na jako molekula adhezyjna dla limfocytów T i monocytów. Oprócz roli chemoatraktantów niektóre chemokiny działają na progenitorowe komórki hematopoetyczne oraz na fibroblasty, komórki mięśni gładkich, keratynocyty i komórki czerniaka złośliwego [74,75]. Produkcja chemokin odbywa się w odpowiedzi na szereg antygenów bakteryjnych, wirusowych,

a także czynników powodujących uszkodzenie fizyczne tkanek, np. kryształy moczanów w dnie moczanowej [71,74,75,89].

Receptory dla chemokin należą do grupy receptorów serpentynowych. Mają one położony zewnątrzkomórkowo koniec aminowy (NH_2), wewnątrzkomórkowy koniec karboksylowy (COOH), siedem domen przez błonowych zorientowanych poprzecznie w stosunku do błony komórkowej (ang. *seven transmembrane receptors*), trzy wewnątrzkomórkowe (*internal* (i) 1–3) i trzy zewnątrzkomórkowe (*external* (e) 1–3) pętle złożone z aminokwasów hydrofilnych i mostek siarkowy łączący cysteiny pierwszej i drugiej pętli zewnątrzkomórkowej [75,89].

Receptory te sprzężone są z białkami G [8,75,98]. Miejscem wiążącym białko G są druga i trzecia pętla wewnątrzkomórkowa (i1, i2) [8,75,89]. Związanie chemokiny z receptorem aktywuje białko G, które z kolei aktywuje fosfolipazę C. Hydroliza fosfolipidu błony komórkowej 4,5-dwufosfo-fosfatydyloinozytolu przez fosfolipazę C dostarcza 1,4,5-trifosfoinozytolu i diacyloglicerolu [75]. Trifosfoinozytol dyfunduje do retikulum endoplazmatycznego i przez otwarcie kanałów wapniowych w retikulum stymuluje wzrost poziomu wapnia wewnątrzkomórkowego, aktywując w ten sposób Ca^{2+} zależne enzymy komórkowe [75]. Diacyloglicerol z kolei aktywuje obecne w błonie komórkowej kinazy białkowe C [75]. Do pełnej aktywności kinazy białkowej C niezbędny jest także wzrost poziomu wapnia, co pozwala na przejście z obecnej w cytozolu formy rozpuszczalnej kinazy C w postać związaną z błoną komórkową [75]. Kinaza białkowa C fosforyluje reszty aminokwasów seryny i treoniny w enzymach wewnątrzkomórkowych [75]. Końcowym efektem pobudzenia receptora jest aktywacja czynników transkrypcyjnych i inicjacja transkrypcji specyficznych genów [8,75].

Chemokiny hamują replikację HIV

Pierwsze doniesienia o istnieniu czynników hamujących replikację HIV pochodzą z 1986 roku [26,37,38,73]. Doniesiono wówczas, że limfocyty T CD8+ biorą udział w kontroli replikacji wirusa *in vivo* przez cytolizę zakażonych komórek lub wydzielanie czynników supresyjnych dla HIV [11,16,26,37,38,57,73]. Stwierdzono, że aktywność supresorowa limfocytów T CD8+ koreluje dodatnio z brakiem postępu zakażenia HIV-1. Wysoki poziom tych limfocytów występuje u seropozytywnych osób nie wykazujących postępu choroby przez 12 do 15 lat [26,37,69,80]. Obserwowano, że czynników hamujących replikację przez limfocyty T CD8+ zmniejsza się wraz z postępowaniem choroby i narastającym uszkodzeniem układu immunologicznego [15,26,37].

W końcu 1995 roku zidentyfikowano hipotetyczne substancje hamujące przebieg infekcji. Okazało się, że są to niektóre chemokiny (RANTES, MIP-1 α i MIP-1 β) [23]. Działają one chemotaktycznie i aktywująco na limfocyty T i neutrofile [67,71,89]. MIP-1 α powoduje także aktywację limfocytów B i komórek NK oraz

wg niektórych badaczy ma również działanie mielosupresyjne [66]. RANTES i MIP-1 α są ponadto najsilniejszymi czynnikami aktywującymi eozynofile i bazofile [16,71,89]. Największą produkcją tych chemokin charakteryzują się limfocyty T CD8+ od HIV pozytywnych pacjentów, [32,37] limfocyty T CD4+ pochodzące od osób nie zainfekowanych wirusem pomimo wysokiego ryzyka infekcji (homoseksualiści i heteroseksualiści potwierdzający stosunki seksualne z HIV pozytywnymi partnerami) [26,32,69,79] oraz pobudzone antygenami lipopolisacharydowymi makrofagi [101]. Związki te działając razem hamują infekcję limfocytów T, makrofagów, komórek dendrytycznych oraz komórek mikrogleju – przez M-tropowe szczepy HIV-1, HIV-2 i SIV. [53] Jednocześnie nie zaobserwowano ich wpływu na szczepy wirusa zaadoptowane do replikacji w laboratoryjnych liniach komórkowych limfocytów T (T-tropowe HIV). RANTES, MIP-1 α i MIP-1 β działają hamująco na infekcję wirusem już w nanogramowych stężeniach [3,23]. Opisano, że neutralizacja powyższych chemokin w hodowlach za pomocą swoistych przeciwciał znosi ich działanie protekcyjne przeciwko infekcji HIV [100,109].

Stosunkowo szybko stwierdzono, że obok chemokin na przebieg infekcji HIV wpływa szereg innych cytokin. Wiadomo bowiem, że HIV infekuje bezpośrednio komórki układu immunologicznego i jest czynnikiem wpływającym na ich ciągłą aktywację. Powoduje to wydzielanie szeregu tzw. cytokin stanów zapalnych. Stwierdzono, że kilkanaście z nich pobudza namnażanie HIV zarówno *in vivo* w zakażonym organizmie, jak i po dodaniu do zakażonych wirusem linii komórkowych. Do cytokin tych zaliczamy: IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-6, IL-12; TNF- α i TNF- β , a także czynniki stymulujące wzrost kolonii monocytarnych i granulocytowo-monocytarnych (M-CSF i GM-CSF) [41,44,45,56,57,58,83]. Z wymienionych powyżej cytokin TNF- α najsilniej stymuluje replikację HIV [14,57,58]. Zidentyfikowano również cytokiny stanów zapalnych hamujące z kolei replikację HIV. Do najsilniejszych inhibitorów zaliczamy: INF- α , INF- β [82] oraz IL-10 [83,105,106]. Wydaje się, że poziom replikacji HIV-1 w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej jest wynikiem delikatnej równowagi między wpływem tzw. cytokin stanów zapalnych oraz klasycznych chemokin [57,58,82,84]. Uważa się jednak, że o ile chemokiny działają głównie na proces wnikania wirusa do komórek, to cytokiny zapalne z kolei regulują wewnątrzkomórkową replikację cząsteczek HIV [82,83].

Receptory chemokinowe jako koreceptory dla HIV – tropizm komórkowy wirusa

CCR-5 koreceptor dla M-tropowych wariantów HIV

Poszukiwanie koreceptorów wirusa AIDS trwało 10 lat. Za ich istnieniem przemawiały wyniki badań, w których nie udało się infekować komórek mysich pomimo tego, że transfekowane były one genem kodującym ludzki antygen CD4 [15]. Opisano również linie komórkowe jak np. U87, które pomimo że wiązały cząsteczki wirusa,

nie ulegały infekcji [15]. Historycznie potencjalnymi kandydatami na koreceptor były: galactocerebrozydy błony komórkowej, niektóre molekuly adhezyjne, np. LFA-1 oraz w przypadku wirusów opłaszczonych przeciwciałami receptory dla fragmentu Fc immunoglobulin lub białek dopełniacza [68].

Obserwacja, że RANTES, MIP-1 α i MIP-1 β hamują wnikanie i replikację M-tropowych izolatów HIV sugerowała, że receptory chemokinowe mogą pełnić rolę koreceptorów. Postępując tym tokiem rozumowania rozpoczęto odpowiednie badania. W czerwcu 1996 roku pięć grup prawie jednocześnie określiło receptor CCR-5 wiążący: RANTES, MIP-1 α i MIP-1 [25,85], jako koreceptor dla M-tropowych izolatów HIV [3,19,22,28,31,32]. Łączna ekspresja CCR-5 i CD4 na komórkach mysich, kocich, chomika czy też komórkach ludzkich opornych na infekcje HIV, czyniła je podatnymi na zakażenie i replikację M-tropowymi, ale nie T-tropowymi wariantami HIV-1 [3,19,22,32]. Stwierdzono, że CCR-5 i CD4 obecne na powierzchni komórki umożliwiają zlanie się błony komórkowej i otoczki wirusa i wniknięcie wirusa do wnętrza komórki [22,28,31,32]. Podtrzymują także tworzenie syncytiów komórkowych (wielojądrowych komórek olbrzymich) pomiędzy komórkami wykazującymi na swojej powierzchni ekspresję CCR-5 i CD4 oraz komórkami mającymi na powierzchni antygeny wirusowe [31,32]. Podkreślić należy, że do wniknięcia HIV i tworzenia syncytiów potrzeba zarówno ekspresji antygeny CD4, jak i CCR5. Komórki wykazujące ekspresję tylko CCR-5 bez CD4 nie są podatne na infekcję HIV, co wskazuje na rolę CCR-5 jako koreceptora, a nie głównego receptora wirusowego [31]. Wysycenie CCR-5 chemokinami zapobiegało infekcji M-tropowymi izolatami HIV-1 [31]. Stwierdzono również, że oprócz CCR-5 także CCR-2b, pełni rolę koreceptora dla niektórych M-tropowych i dual-tropowych izolatów HIV-1 [31]. Ekspresja CCR-5 na pozostających w spoczynku limfocytach T CD4+ jest minimalna. Wzrasta jednak w trzy dni po zastymulowaniu tych komórek za pomocą fitohemaglutyniny lub IL-2 [58].

Badania czynnościowe utworzonych doświadczalnie chimer między receptorami β -chemokin pełniącymi rolę koreceptorów HIV oraz receptorami β -chemokinowymi nie mającymi tych właściwości, pozwoliły na określenie regionów receptora mających kluczowe znaczenie dla infekcji HIV. Podobne wyniki uzyskano przez ocenę chimer pomiędzy ludzkimi i mysimi receptorami β -chemokinowymi. Okazało się, że 20 pierwszych aminokwasów końca aminowego jest wystarczających dla określenia aktywności biologicznej koreceptora. Infekcja M-tropowymi HIV-1 jest zależna od aminokwasów zajmujących pozycje 6–9 końca aminowego, dual-tropowe HIV wykorzystują natomiast: 2-gi i 5-ty aminokwas końca aminowego [31,42,36,92]. Druga pętla zewnątrzkomórkowa (e2) wydaje się, że nie ma znaczenia w infekcji HIV [7,42,36,92]. Ma ona jednak kluczowe znaczenie dla funkcji CCR-5 jako receptora wiążącego RANTES, MIP-1 α i MIP-1 β [7,8,36,92]. Oznacza to, że funkcja CCR-5 jako koreceptora dla HIV i receptora dla β -chemokin jest niezależna. Oznacza to, że zmutowany receptor CCR-5 mający zdolność do odpowiedzi na związanie

naturalnego ligandu, nie musi służyć koniecznie jako koreceptor dla HIV, a cząsteczka wiążąca HIV nie musi przenosić sygnału indukowanego przez naturalny ligand [7,8,42,36]. Ma to bardzo ważne znaczenie dla przyszłych implikacji terapeutycznych. Ostatnio stwierdzono jednak, że połączenie białka otoczki wirusów M-tropowych z receptorem CCR-5 powoduje podobny efekt biologiczny jak połączenie naturalnego ligandu MIP-1 β , a więc przenoszenie sygnału, którego efektem jest wzrost poziomu wapnia wewnątrzkomórkowego. Do powstania tego efektu potrzebne jest uprzednie połączenie wirusa z molekułą CD4. Białka otoczki wirusa gp120 powodują także powstanie efektu chemotaktycznego kierowanego przez receptor CCR-5 [107].

CXC-4 koreceptor dla T-tropowych wariantów HIV-1, receptor dla HIV-2

Podobnie jak receptory β -chemokinowe pełnią rolę koreceptorów dla M-tropowych szczepów HIV-1, to receptor α -chemokinowy CXCR-4 jest koreceptorem dla T-tropowych HIV-1 [12, 31,61,70]. Pierwotnie CXCR-4 został określony jako fuzyna (ang. *fusin*), ponieważ umożliwiał zlewanie się i tworzenie syncytiów z komórek wykazujących ekspresję otoczki T-tropowych HIV [61,70]. Podobnie jak w przypadku CCR-5, ekspresja CXCR-4 razem z CD4 czyni komórki pierwotnie odporne na infekcję HIV, komórkami podatnymi na wniknięcie T-tropowego i dual-tropowego, ale nie M-tropowego HIV-1 [31]. Receptor CXCR-4 ulega ekspresji na komórkach wielu tkanek i narządów. Jego ekspresję stwierdza się na komórkach hematopoetycznych, komórkach mięśniowych serca, komórkach mózgu, płuc, nerek i wątroby [65]. Naturalnym ligandem dla CXCR-4 jest SDF-1. Został on pierwotnie opisany jako produkt komórek podścieliska szpiku kostnego [76]. SDF-1 jest bardzo silnym chemoatraktantem dla komórek CD34+, limfocytów T, B i monocytów [2,27,76]. Powoduje on także indukcję proliferacji limfocytów pre-B [76]. SDF-1 chroni pierwotnie podatne na infekcję komórki przed zakażeniem T-tropowymi szczepami HIV-1 [12]. Miejscem wiązania wirusa są pierwsza i druga pętla zewnątrzkomórkowa (e1, e2). Koniec aminowy i trzecia pętla zewnątrzkomórkowa (e3) nie mają natomiast aktywności koreceptorowej [12].

CXCR-4 jest obok antygeny CD4 głównym receptorem komórkowym dla niektórych izolatów HIV-2 [35,88]. Ekspresja CXCR-4 okazuje się wystarczająca do infekcji i tworzenia syncytiów przez HIV-2, nawet wtedy gdy infekowane komórki nie mają na powierzchni antygeny CD4 [35,88]. Działanie to jest całkowicie znoszone przez specyficzne przeciwciała anti CXCR-4. Receptor ten znika z powierzchni komórki wkrótce po jej zakażeniu HIV [5]. Zależne to jest od dwóch mechanizmów: 1) związania receptora w zainfekowanej komórce w obrębie retikulum endoplazmatycznego z nowo produkowanymi białkami otoczki wirusowej, co jest charakterystyczne dla większości pierwotnych receptorów retrowirusowych oraz 2) naturalnej odpowiedzi receptorów chemokinowych na związanie ligandu, która polega na internalizacji endosomalnej receptora i ligandu [5].

Dalszy rozwój badań nad koreceptorami HIV: CCR-8, CCR-3, STRL-33, V-28 receptory chemokinowe służące jako koreceptory dla T- i M-tropowych szczepów wirusa

Obserwacja, że zablokowanie CCR-5 i CXCR-4 nie chroni całkowicie przed infekcją niektórymi szczepami HIV, sugerowała, że istnieją także inne koreceptory dla wirusa AIDS.

Postępując powyższym tokiem rozumowania udało się sklonować geny kodujące receptory chemokinowe: CCR-8 i STRL-33. Receptor CCR-8 ma naturalny ligand I-309. Występuje on na powierzchni komórek jednojądrzastych krwi obwodowej i limfocytów T CD4+ i CD8+ oraz na stymulowanych lipopolisacharydem monocytach. Okazało się, że jest on ważnym koreceptorem dla infekcji HIV *in vivo* [50,90,91]. CCR-8 pełni funkcję koreceptora zarówno dla M, jak i T tropowych szczepów HIV-1 oraz HIV-2, a także dla niektórych szczepów SIV [50,90]. Zdolność do wiązania CCR-8 z T-tropowymi otoczkami wirusów dorównuje efektywnością funkcji CXCR-4 [91]. Receptor ten służy także jako koreceptor dla niektórych dual-tropowych HIV. Związanie naturalnego ligandu-I-309 z powierzchnią receptora blokuje infekcję wirusem, podobnie jak to ma miejsce w przypadku innych chemokin [91].

STRL-33, koreceptor o nie znanym jeszcze naturalnym ligandzie jest wykonywany przez M- i T-tropowe, szczepy HIV oraz przez SIV [29,63]. Jego dystrybucja tkankowa jest bardzo szeroka, występuje on na komórkach śledziony, węzłów chłonnych, grasicy [29,63]. Ekspresję tego receptora stwierdzono również w szpiku kostnym i krwi obwodowej. Podobnie jak w przypadku CCR-8 może to być jeden z ważniejszych receptorów zarówno w przypadku infekcji pierwotnej, jak i późniejszej replikacji wirusa.

CCR-3 okazał się być głównym (oprócz CCR-5) koreceptorem dla HIV na komórkach mikrogleju, co wskazuje na udział powyższego koreceptora w infekcji ośrodkowego układu nerwowego [22,31,59,91]. Jego naturalny ligand Eotaxin hamował bowiem infekcje i proliferacje wirusa w komórkach mikrogleju silniej niż RANTES, MIP-1 α i MIP-1 β , które są ligandami CCR-5. Funkcja CCR-3 jako koreceptora zależy od jego ekspresji na powierzchni komórki. W przypadku, gdy ekspresja jest wysoka, służy on jako koreceptor dla szerokiej gamy M-, T- i dual-tropowych szczepów HIV. Gdy na powierzchni komórki znajduje się niewiele cząsteczek receptora, wykorzystywany jest on głównie i najbardziej efektywnie przez M-tropowe wirusy [91].

Ostatni z tej grupy receptor V-28 występuje na powierzchni komórek tkanki nerwowej i limfatycznej. Jego budowa jest podobna jak innych receptorów chemokinowych, nie znana jest jednak funkcja oraz naturalny ligand. Służy on jako koreceptor dla T-tropowych i dual-tropowych szczepów HIV oraz jedyny receptor dla niektórych szczepów HIV-2 [88,91]. Jego obecność w ośrodkowym układzie

nerwowym może mieć ważne implikacje dla infekcji neurotropowymi szczepami wirusa [86,88].

Ostatnio stwierdzono również, że homolog receptorów chemokinowych kodowany przez cytomegalowirusy-*US28* może służyć jako koreceptor dla M-tropowych HIV. Wydajność infekcji jest jednak w tym przypadku znacznie niższa. Znaczenie tego receptora może wynikać z tego, że jest on kodowany przez inny wirus. Być może infekcja CMV czyni początkowo odporne na zakażenie komórki podatnymi na infekcję HIV [91].

Patogeneza infekcji HIV – udział koreceptorów

Szczepy HIV-1 występujące u pacjentów będących w początkowym okresie zakażenia używają jako koreceptora receptory dla beta-chemokin, przede wszystkim CCR-5, ale prawdopodobnie także CCR8, STRL-33 i V-28 [19,29,91]. Są to szczepy wirusów M-tropowych, które łatwo infekują makrofagi i nie indukują powstawania syncytiów komórkowych [53]. Powyższe szczepy wirusa przenoszą infekcje z pacjenta na pacjenta i infekcja wirusami M-tropowymi blokowana jest przez RANTES, MIP-1 α i MIP-1 β [3,53,77].

W miarę postępu choroby wirus podlega zmianom adaptacyjnym i zaczyna wykorzystywać oprócz CCR-5, STRL-33 i CCR-8 w większym stopniu receptory dla wirusów dual-tropowych: CCR-3, CCR-2b [22,31,63,95]. W tym okresie zakażenia oprócz M-tropowych wariantów występują także wirusy dual-tropowe. Wirusy te charakteryzują się zdolnością do infekcji zarówno makrofagów, jak i transformowanych linii komórkowych limfocytów T. Wirusy dualtropowe mają już zdolność do indukowania powstawania syncytiów komórkowych [31].

W zaawansowanym okresie choroby zaczynają dominować T-tropowe szczepy HIV, które infekują transformowane limfocyty T i powodują powstawanie syncytiów (SI) [95]. Używają one jako koreceptora głównie receptor dla alfa-chemokin CXCR-4, ale także CCR-8, STRL-33 i V-28 [29,63,91,95]. Infekcja wirusami T-tropowymi nie jest już blokowana przez RANTES, MIP-1 α i MIP-1 β , lecz przez SDF-1 i I-309 ligand dla receptora CCR8 [91,95]. Okres ten wiąże się z gwałtownym obniżeniem poziomu limfocytów CD4+, wzrostem poziomu krążących wirionów i pogorszeniem stanu klinicznego. Nie jest jednak jasne, czy spadek poziomu limfocytów CD4+ jest przyczyną czy też skutkiem zmiany tropizmu wirusa. Należy nadmienić, że u chorego nadal występują dual- i M-tropowe szczepy HIV, lecz nie są one już populacją dominującą [116]. Przyczyną zmiany fenotypu wirusa i typu używanego koreceptora jest prawdopodobnie selekcja wywierana przez specyficzne i niespecyficzne mechanizmy immunologiczne. Selekcja ta przez zmianę koreceptora faworyzuje warianty HIV mogące wciąż infekować i replikować w komórkach zakażonego organizmu pomimo wysokiego poziomu RANTES, MIP-1 α

i MIP-1 β . Jest to swoista „ucieczka” przed blokującym infekcję wpływem chemokin. U podłoża zmian fenotypu leżą mutacje genu kodującego otoczkę HIV [116].

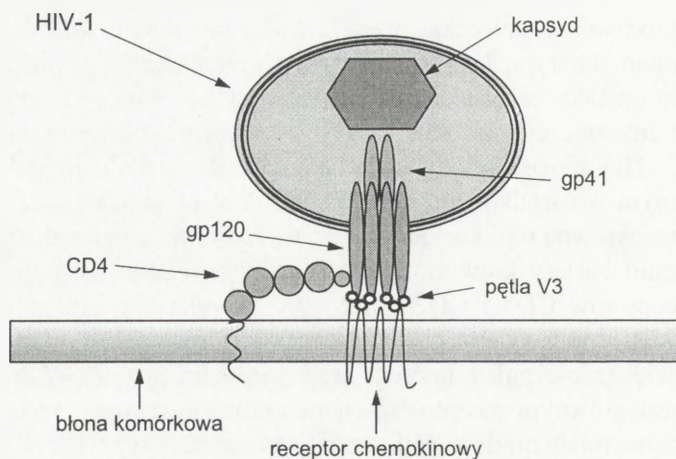
Ze względu na fakt, że w przeciwieństwie do CCR-5 dystrybucja komórkowa CXCR-4 jest znacznie szersza, zmiana użycia koreceptora otwiera dodatkowe „nisze”, w których HIV może replikować. Receptor CCR-3 jest głównym koreceptorem dla HIV obecnym w ośrodkowym układzie nerwowym na komórkach mikrogleju, co umożliwia efektywną replikację HIV wewnątrzośrodkowego układu nerwowego po przekroczeniu bariery krew-mózg. Ponadto stwierdzono, że pobudzone przez aktywację receptorów CD3 i CD28 limfocyty T wykazują zmianę ekspresji koreceptora z CCR-5 na CXCR-4 [18]. Przemawia to za tym, że infekcja wirusowa powoduje powiększanie puli komórek, które może infekować. Warto podkreślić, że CXCR-4 jest głównym receptorem chemokinowym na spoczynkowych limfocytach T, które nie miały nigdy kontaktu z antygenem (fenotyp CD26^{low}, CD45RA⁺, CD45RO⁻) [108], natomiast CCR-5 przeważa na aktywowanych limfocytach T pamięci immunologicznej (fenotyp CD26^{high}, CD45RA^{low}, CD45RO⁺) [110]. Limfocyty T CD45RA⁺ (mające receptor CXCR-4) są populacją przebywającą w obrębie węzłów chłonnych, natomiast limfocyty T CD45RO⁺ mające koreceptor CCR-5 mają zdolność szerokiej migracji pomiędzy wszystkimi narządami limfatycznymi [94,99]. Występują więc w miejscach potencjalnego wniknięcia wirusa do organizmu, np. w błonach śluzowych narządów płciowych [39,43,97]. Powoduje to, że HIV może zostać bardzo szybko przeniesiony do odległych narządów limfatycznych.

MOLEKULARNE PODSTAWY INTERAKCJI HIV Z RECEPTOREM I KORECEPTOREM

Wysoco swoista reakcja pomiędzy glikoproteiną otoczki wirusa a antygenem CD4 leży u podstawy patogenyzy AIDS. Powinowactwo białek otoczki wirusa do antygeny CD4 stanowi podstawę tropizmu HIV do komórek mających na swojej powierzchni ten antygen, a więc limfocytów T CD4⁺ i komórek linii monocytowo-makrofagowej [40,60].

Antygen CD4 należy do nadrodziny antygenów immunoglobulinowych. Ma on cztery zewnątrzkomórkowe domeny (D1-D4) odpowiadające domenom zmiennemu łańcucha lekkiego immunoglobulin (rys. 1) [40]. Region CDR-2 (aminokwasy 43-50) domeny D1 jest podstawowym dla związania gp120 wirusa, natomiast region CDR-3 (aminokwasy 80-100) bierze udział w fuzji błony komórkowej i otoczki wirusa (rys. 2) [21,40,62].

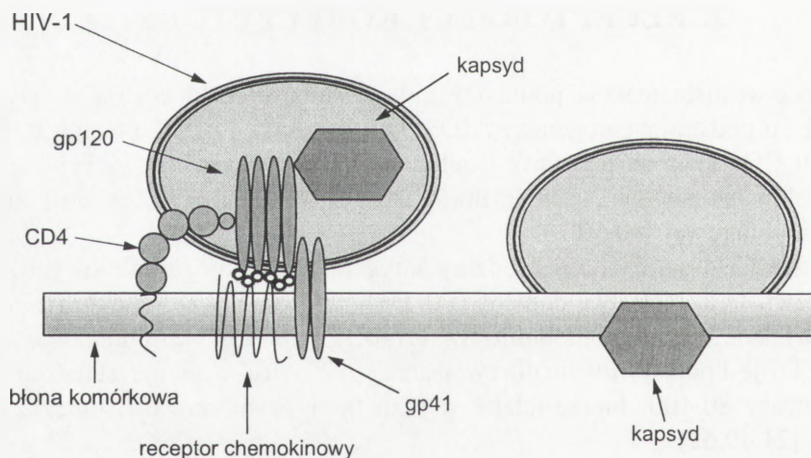
Białka otoczki wirusa syntetyzowane są w retikulum endoplazmatycznym zainfekowanej komórki jako glikozylowany prekursor gp160 [15]. W czasie transportu w aparacie Golgiego proteazy trawią gp160 na dwie glikoproteiny gp120 i gp41



RYSUNEK 1. Pierwsza faza infekcji – połączenie białka gp 120 otoczki wirusa z receptorem CD4 i koreceptorem chemokinowym

[15]. Gp120 ma miejsce wiążące z dużym powinowactwem antygen CD4 (domena C4), [15] natomiast gp41, glikoproteina błonowa stanowi element „umocowujący” wirusa na błonie komórkowej infekowanej komórki (rys. 2). Włączane do otoczki wirusa podczas tzw. pączkowania (ang. *budding*) fragmenty gp120/gp41 tworzą charakterystyczne kolce na powierzchni [15].

Związanie gp120 z CD4 powoduje zmiany struktury trójwymiarowej białek otoczki wirusa i ekspozycję hydrofobowego regionu gp41 odpowiedzialnego za zwią-



RYSUNEK 2. Wniknięcie domeny fuzogennej gp 41 do błony komórkowej poprzedzające zlanie się otoczki wirusa z błoną komórkową

zanie z błoną komórkową atakowanej komórki (rys. 2). Wniknięcie domeny hydrofobowej do błony komórkowej zapoczątkowuje zlanie się otoczki wirusa i błony komórkowej, co daje dostęp kapsydowi wirusowemu zawierającemu RNA do wnętrza komórki (rys. 2). CXCR-4 i CCR-5 biorą udział w ostatnim dopiero etapie infekcji powodując zlanie się błony komórkowej z otoczką wirusa (rys. 2)[24,100]. Komórki wykazujące na swojej powierzchni ekspresję tylko CD4 bez koreceptora mogą związać wirusa przez gp120, ale nie dochodzi do fuzji otoczki wirusa i błony komórkowej [24,104,111]. Dopiero związanie gp120 z koreceptorem powoduje dodatkowe zmiany konformacyjne otoczki wirusa pozwalające na pełne ujawnienie regionu hydrofobowego gp41 [100]. Regionem otoczki o kluczowym znaczeniu dla związania koreceptora jest trzecia domena nadzmienna (V3) gp120 (rys. 2) [24,111]. Przeciwciała skierowane przeciwko domenie V3 blokują interakcję wirusa z koreceptorem [9,72,68]. Siła wiązania gp120 z CCR-5 czy CXCR-4 jest determinowana przez stabilizujący wpływ interakcji gp120-CD4 [70,99,109]. Komórki mające tylko CCR-5 na powierzchni mogą związać gp120, ale jest to wiązanie bardzo słabe [61,109]. Procesy molekularne zachodzące podczas infekcji komórki przez HIV podsumowano na rysunkach 1 i 2.

Naturalne ligandy koreceptorów dla HIV RANTES, MIP-1 α i MIP-1 β mogą zapobiegać infekcji przez blokowanie związania regionu nadzmiennego białek otoczki wirusa z koreceptorem. Związanie otoczki wirusa z koreceptorem blokuje dostęp do niego naturalnych ligandów [3,61,109].

KORECEPTORY A OPORNOŚĆ NA INFEKcję – DELECJA CCR-5, MUTACJA CCR-2

Zidentyfikowanie koreceptorów dla HIV pozwoliło m.in. na zrozumienie molekularnych podstaw oporności na infekcję M-tropowym HIV u niektórych osób narażonych na częste kontakty seksualne z zakażonymi HIV. Limfocyty CD4+ i makrofagi tych osób wymagają około 1000 razy większej dawki M-tropowego HIV dla zainicjowania infekcji niż komórki pochodzące od nieekspozowanych na HIV dawców, ponadto produkują one około 10-krotnie więcej RANTES, MIP-1 α i MIP-1 β [17,22,30,79,80]. Pomimo że niewielka frakcja komórek zostaje zainfekowana nienaturalnie wysokim mianem wirusa, replikacja nie jest w nich podtrzymywana [69,79,80]. Jednocześnie infekcja T-tropowym HIV przebiega łatwo, już przy niskiej, podobnej jak w grupie kontrolnej dawce wirusa [69,79,80].

Oporność na infekcję okazała się mieć podstawy genetyczne. Stwierdzono, że u osób nie zakażonych pomimo częstych ekspozycji na HIV istnieje homozygotyczny defekt genu kodującego CCR-5. Zmutowane allele zawierają wewnętrzną delecję 32 zasad (nukleotydy 794-825) w regionie odpowiadającym drugiej pętli

zewnątrzkomórkowej [64,80,92]. Gen zawierający delecję koduje znacznie skrócony, zawierający tylko 215 aminokwasów (typ dziki składa się z 352 aminokwasów) polipeptyd [52,64,92]. Mutacja powoduje brak ekspresji receptora w cytoplazmie i na powierzchni komórki [64,80]. Defektywny gen kodujący CCR-5 ma autosomalną lokalizację i dziedziczenie delecji nie jest związane z płcią [52,64,92]. Jednojądrowe komórki krwi obwodowej osób mających defekt homozygotyczny nie wykazują odpowiedzi na stymulację CCR-5 przez RANTES, MIP-1 α i MIP-1 β , są jednak w pełni zdolne do odpowiedzi na stymulację innych receptorów chemokinowych [52,92]. Osoby mające ten defekt są zdrowe, bez żadnych objawów klinicznych. Brak szczególnego fenotypu związanego z brakiem CCR-5 wynika z natury systemu chemokin. Kilkanaście receptorów chemokinowych ma wspólne ligandy i szeroką dystrybucję tkankową. Dlatego u osób homozygotycznych wobec zmutowanego allelu, brak CCR-5 może być kompensowany przez inne receptory np. CCR-1, który ma podobny profil wiązania ligandów. Częstość występowania homozygotycznej delecji oceniana jest w populacji kaukaskiej zachodniej Europy na około 1% [52,80,92]. Jednocześnie w innych badanych populacjach z Wenezueli, zachodniej i środkowej Afryki i Japonii nie znaleziono homozygotycznej formy zmutowanego genu [80,92].

Stwierdzono, że pojedyncza delecja (defekt heterozygotyczny) nie chroni jednak przed zakażeniem HIV. W niektórych badanych grupach postęp choroby był wolniejszy, związane to jest z wolniejszym spadkiem poziomu limfocytów CD4+, co wynika ze zmniejszonej zdolności do replikacji HIV w komórkach heterozygot (około 4- do 10-krotnie mniejsza produkcja wirusa *in vitro*) [52,80,92]. Ocenia się, że osobnicy heterozygotyczni stanowią około 18% populacji kaukaskiej [52,92].

Nie wiadomo również, czy defekt homozygotyczny całkowicie chroni przed zakażeniem HIV-1. W populacji 1252 zakażonych homoseksualistów nie znaleziono żadnego będącego homozygotą pod względem delecji, podczas gdy heterozygotami było tylko 3,6% zakażonych [80]. Z badań *in vitro* wiadomo, że oprócz CCR-5 także CCR-3, CCR-2b, CCR-8, STRL33, V28 i CXC-4 są koreceptorami dla HIV-1 [91]. Jak często inne niż CCR-5 koreceptory są używane przy pierwotnej infekcji HIV-1 *in vivo*, nie zostało jeszcze określone. Wydaje się jednak, że CXC-4, CCR-8 i STRL33 raczej nie służą jako koreceptory podczas pierwotnego zakażenia wirusem. Prawdopodobnie pierwotna infekcja podtrzymywana jest tylko przez komórki wykazujące ekspresję CCR-5, ale nie CXC-4 czy innych koreceptorów chemokinowych. Wiadomo, że głównym obiektem ataku HIV podczas pierwotnego zakażenia są aktywowane limfocyty T o fenotypie CD26^{high}CD45RA^{low}CD45RO⁺, wykazujące wysoką ekspresję CCR-5 [99,110]. Infekcja T-tropowymi, indukującymi syncytia izolatami HIV-1 może nastąpić przejściowo po kontakcie seksualnym, ale niekoniecznie musi dojść do zakażenia systemowego, kiedy to dalsza replikacja wirusa wymaga infekcji makrofagów, które są odporne na zakażenie T-tropowymi wirusami [97,110]. Do podtrzymania infekcji potrzebna jest kooperacja między makrofagami,

komórkami dendrytycznymi i limfocytami T pamięci immunologicznej, a te ostatnie mogą podtrzymywać replikację tylko M-tropowych wariantów HIV [94,110]. U niektórych osób ważną rolę może też odgrywać silna cytotoksyczna odpowiedź na zakażenie warunkowana przez limfocyty CD8+[78]. Z drugiej strony istnieją doniesienia o zakażonych wirusem pacjentów, którzy są homozygotami wobec delecji genu CCR-5 [33,93]. Są to jak na razie tylko trzy izolowane przypadki, dwa z nich dotyczą chorych na hemofilię, którzy otrzymywali duże dawki preparatów krwiopochodnych. Doszło więc u nich prawdopodobnie do zakażenia T-tropowym szczepem HIV wykorzystującym koreceptory inne niż zmutowany CCR-5 [33,52].

Badając populacje chorych zainfekowanych HIV, nie wykazujących szybkiego rozwoju AIDS wykryto ostatnio mutację koreceptora CCR-2. Mutacja dotyczy pojedynczego aminokwasu pierwszego regionu przezbłonowego receptora i nie wpływa na ekspresję CCR-2 na powierzchni komórki [96]. Występuje ona z częstością 10–15% w populacji kaukaskiej i jest niezależna od obecności mutacji receptora CCR-5. Pomimo że mutacja ta nie ma żadnego wpływu na częstość zakażenia wirusem, osobnicy mający zmutowane allele wykazują wolniejszy przebieg choroby i wystąpienie pełnoobjawowego AIDS jest u nich późniejsze o około 2 do 4 lat [96]. Ciekawe jest, że około 25% zakażonych HIV, u których nie było postępu choroby przez co najmniej 16 lat, ma mutacje genu kodującego CCR-5 lub CCR-2 [96]. Można przyjąć, że wystąpienie mutacji receptora CCR-2 może wpływać bezpośrednio na stopień ekspresji CCR-5.

WIRUS AIDS A USZKODZENIE UKŁADU KRWIOTWÓRCZEGO

Przedłużające się zakażenie HIV prowadzi do wystąpienia cytopenii. Najczęstszą cytopenią u osób zakażonych HIV jest niedokrwistość. Około 10 do 20 procent pacjentów ma niedokrwistość już podczas rozpoznania zakażenia HIV, odsetek ten rośnie do 80% w miarę rozwoju pełnoobjawowego AIDS. Niedokrwistość związana z zakażeniem jest w większości niedokrwistością normochromiczną i normocytową z niskim poziomem retikulocytów. Drugą najczęstszą cytopenią jest leukopenia występująca u 35 do 70% pacjentów z AIDS, ze zmniejszoną liczbą neutrofilów, limfocytów, monocytów, a także obecnością nietypowych limfocytów i zwakuoalizowanych monocytów w rozmazie [15]. W 30 do 60% przypadków AIDS obserwuje się również trombocytopenię, której wystąpienie jest niezależne od obecności innych cytopenii i w odróżnieniu od nich nie wpływa na prognozę rozwoju choroby [15].

Niedokrwistość i leukopenia w przebiegu AIDS związana jest najczęściej z uszkodzoną erytropoezą i mielopoezą. Większość pacjentów z HIV ma morfologiczne

nieprawidłowości szpiku kostnego. Najczęściej występująca nadkomórkowość szpiku (50 do 60% przypadków) jest związana z hyperplazją jednej lub więcej nie-limfoidalnych linii komórkowych. Dysplazja przynajmniej jednej linii komórkowej szpiku zdarza się u około 70% pacjentów z HIV. Najczęstsze jest dysplastyczne dojrzewanie linii granulocytarnej z częstą wakuolizacją prekursorów granulopoezy. Rzadziej występuje dysplazja linii erytroidalnych (2/3 pacjentów) i megakariocytarnych (1/3 pacjentów) [15].

Niedawne odkrycie, że ludzkie komórki progenitorowe zarówno prymitywne, jak i bardziej dojrzałe wykazujące ekspresję antygenu CD34 mają na swojej powierzchni w dużym odsetku (50 do 65%) także antygen CD4 będący receptorem dla wirusa, ma znaczące implikacje dla zrozumienia patogeny cytopenii w przebiegu AIDS [2,27,112]. Ilość antygenu CD4 na powierzchni komórek progenitorowych jest porównywalna do ilości obserwowanej na powierzchni monocytów i około 20 razy niższa niż na limfocytach T [2,27]. Największa ekspresja CD4 występuje na powierzchni komórek progenitorowych linii mielo-monocytowej i jest wyższa niż linii erytroidalnej czy megakriocytarnej. Dzięki obecności receptora dla wirusa komórki progenitorowe mogą wiązać bezpośrednio antygen gp120 otoczki wirusa, ale nie wydaje się, aby były infekowane przez HIV. Nie udało się jak dotąd wykazać obecności DNA wirusowego w izolowanych komórkach progenitorowych, nawet przy użyciu metod pozwalających na detekcję 100 kopii wirusowego DNA wśród 10^4 komórek. Funkcjonalna zdolność wczesnych linii komórek progenitorowych do różnicowania się w komórki bardziej zróżnicowane jest jednak u chorych z HIV upośledzona; mniejsza niż u osób niezakażonych jest także bezwzględna liczba fenotypowo wczesnych ($CD34^+/CD38^-$) komórek progenitorowych [2]. Dyskutuje się kilka możliwych mechanizmów prowadzących do spadku liczby wczesnych progenitorów hematopoezy w przebiegu zakażenia HIV. Pierwszy dotyczy defektu tzw. mikrośrodowiska krwiotwórczego. Wiadomo bowiem, że limfocyty T, monocyty/makrofagi czy komórki retikularne i fibroblasty są bardzo ważnymi składnikami mikrośrodowiska szpiku. Wydzielają one szereg cytokin i czynników wzrostowych [15]. Infekcja tych komórek przez HIV i stymulacja wydzielania przez nie niektórych cytokin, szczególnie TNF- α , TGF- β , IL-2, IL-6, IL-1 i chemokin (MIP1- α) może w sposób specyficzny wpływać na hamowanie hematopoezy bezpośrednio lub przez modyfikację molekuł adhezyjnych na powierzchni komórek szpiku kostnego. Po drugie związanie antygenu gp120 otoczki wirusa na powierzchni komórek progenitorowych może powodować ich apoptozę. *In vitro* związanie antygenu gp120 powodowało znaczący wzrost procentu komórek progenitorowych ginących w skutek apoptozy i spadek liczby formowanych przez nie kolonii. Z innych czynników mogących powodować spadek ilości wczesnych komórek progenitorowych i cytopenię należy wymienić infekcje oportunistyczne (szczególnie wirusem cytomegalii i Parwowirusem P19) oraz powikłania po stosowaniu leków anti-wirusowych [15].

Ostatnio stwierdzono, że ludzkie komórki CD34+ mają ekspresję mRNA kodującego CXCR-4, a w mniejszym stopniu ekspresję mRNA kodującego CCR-5 [27]. Z badań naszego zespołu wynika natomiast, że komórki CD34+ mają ekspresję białka CXCR-4 na powierzchni, podczas gdy receptor CCR-5 jest niewykrywalny. Przemawia to za tym, że komórki CD34 mające ekspresję CD4 i CXCR-4 mogłyby być zakażane wirusem T-tropowym w zaawansowanym etapie choroby [87]. Możliwość tę sprawdzamy obecnie eksperymentalnie.

IMPLIKACJE TERAPEUTYCZNE ODKRYCIA KORECEPTORÓW INFEKCJI HIV

Jeszcze półtora roku temu infekcja HIV i postęp zakażenia wydawały się nieuchronnie prowadzić do śmierci. Zrozumienie roli receptorów chemokinowych w przebiegu tego schorzenia pozwala z umiarkowanym optymizmem podejść do nowych strategii leczenia i zapobiegania chorobie. Jedną z oczywistych strategii będzie blokowanie interakcji pomiędzy otoczką wirusa a receptorami chemokinowymi. Jest to tym bardziej uzasadnione, gdyż jak stwierdzono inne domeny czynnościowe receptora odpowiadają za interakcje z chemokinami, a inne za interakcje z antygenami wirusa. Stwierdzono również, że nawet całkowity wrodzony brak CCR-5 nie powoduje uchwytnych fenotypowo zmian u osobników wykazujących delecję tego receptora [52,64,93].

W projektowaniu leków działających na koreceptor panują obecnie cztery główne koncepcje.

Pierwsza z nich zakłada podawanie antagonistów peptydowych blokujących CCR-5. Związki te muszą mieć duże powinowactwo do receptora, być nietoksyczne i najlepiej podawane doustnie. Wydaje się, że toksyczność jest w tej chwili największym problemem w tej grupie leków.

Druga strategia zakłada użycie ago-antagonistów, które nie tylko blokują koreceptor przed dostępem dla HIV, ale przez działanie agonistyczne powodują zahamowanie ekspresji receptora na powierzchni komórki.

Trzecią strategią jest podawanie przeciwciał przeciwko CCR-5. Wyprodukowano i testuje się obecnie osiem różnych przeciwciał przeciwko CCR-5 [33]. Przeciwciała te, pomimo że są silniejsze niż małowcząsteczkowe peptydy blokerami koreceptorów, mają kilka wad: są drogie, muszą być podawane w iniekcjach i ich działanie trwa tylko przez kilka miesięcy do czasu powstania odpowiedzi immunologicznej przeciwko obcym przeciwciałom.

Wreszcie ostatnia z proponowanych strategii zakłada użycie modyfikowanych chemokin wiążących się z receptorem, które nie mają właściwości agonistycznych, a co ważniejsze nie będących chemoatraktantami dla komórek zapalnych. Pierwsze

badania nad modyfikowaną cząsteczką RANTES są bardzo obiecujące. Testowany obecnie analogon RANTES mający delecję ośmiu aminokwasów końca aminowego ma duże powinowactwo do CCR-5, hamuje skutecznie infekcję makrofagów przez HIV i nie ma jednocześnie właściwości chemotaktycznych i aktywujących leukocyty [6]. Podobnie dobre rezultaty uzyskano z modyfikowanym MIP-1 α [33].

Podobne prace trwają nad opracowaniem skutecznej strategii zablokowania funkcji koreceptorowej CXCR-4. Zablokowanie funkcji powyższego receptora pozwoliłoby na opóźnienie postępu choroby, szczególnie rozwoju pełnoobjawowego AIDS. Przewodzone są już pierwsze próby z przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko CXCR-4 [33,70]. Związanie przeciwciała z CXCR-4 ma blokować wnikanie T-tropowych wirusów do komórki. Strategia ta ma szansę powodzenia, ponieważ po związaniu ligandu CXCR-4 ulega przemieszczeniu do wnętrza komórki i ich ponowna ekspresja jest niepełna i opóźniona [5]. Tylko około 12% pierwotnie obecnych na powierzchni cząsteczek receptora dostaje się z powrotem z endosomów do błony komórkowej [5]. Okazało się jednak, że niektóre szczepy wirusowe potrafią infekować komórki pomimo zablokowania CXCR-4 [33]. Wykorzystują one prawdopodobnie inne receptory chemokinowe: CCR-8, STRL-33 lub V-28 [91]. Podstawy teoretyczne ma także zastosowanie terapii genowej, której efektem byłoby hamowanie ekspresji receptorów w komórkach np. za pomocą strategii oligomerów antysensowych. Jest to jednak jak na razie dalsza przyszłość. Rozważa się również opracowanie skutecznych szczepionek, które powodowałyby powstawanie specyficznych przeciwciał blokujących koreceptory.

Inna strategia zakłada stworzenie wektorów retrowirusowych mających geny kodujące receptor CD4 i receptor chemokinowy. Wektor taki infekuje selektywnie komórki zakażone HIV i mające na swojej powierzchni ekspresję białek otoczki wirusowej. Dzięki temu możliwe będzie transfekowanie genów przeciwko HIV tylko do komórek zakażonych wirusem [34].

Przyszłość pokaże, czy nowe leki okażą się skuteczne. Największym problemem będzie prawdopodobnie niezwykle dziwny fenomen związany z biologią HIV polegający na zdolności do szybkiego tworzenia i selekcji ochronnie działających mutacji. Wiąże się z tym pojawianie się oporności na leki i mechanizmy immunologiczne indukowane przeciwko wirusowi. Zgodnie z powyższym stwierdzono, np. że HIV może bardzo szybko mutować powodując powstawanie szczepów opornych na blokowanie np. jednej z części koreceptora CCR-5. Wirus może wtedy wykorzystywać inne domeny białka receptorowego. Odkrycie nowych koreceptorów, szczególnie szeroko wykorzystywanych przez M- i T-tropowe szczepy HIV CCR-8 i STRL-33 sugeruje, że wirus może łatwo zmieniać typ używanej do infekcji molekuly. Postępy biologii molekularnej i inżynierii genetycznej dają jednak badaczom do ręki coraz to nowe narzędzia do walki z wirusem w tym wyścigu i pozwalają bardziej optymistycznie niż kilka lat temu spojrzeć w przyszłość.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AHUJA SK, LEE JC, MURPHY PM. CXC chemokines bind to unique sets of selectivity determinants that can function independently and are broadly distributed on multiple domains of human interleukin-8 receptor B. Determinants of high affinity binding and receptor activation are distinct. *J Biol Chem* 1996; **271(1)**: 225–232.
- [2] AIUTI A, WEBB IJ, BLEUL C, SPRINGER T, GUTIERREZ-RAMOS JC. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med* 1997; **185(1)**: 111–120.
- [3] ALKHATIB G, COMBADIÈRE C, BRODER CC, FENG Y, KENNEDY PE, MURPHY PM, BERGER EA. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 1996; **272(5270)**: 1955–1958.
- [4] ALTER HJ, EICHBERG JW, MASUR H, SAXINGER WC, GALLO R, MACHER AM, LANE HC, FAUCI AS. Transmission of HTLV-III infection from human plasma to chimpanzees: an animal model for AIDS. *Science* 1984; **226(4674)**: 549–552.
- [5] AMARA A, GALL SL, SCHWARTZ O, SALAMERO J, MONTES M, LOETSCHER P, BAGGIOLINI M, VIRELIZIER JL, ARENZANA-SEISDEDOS F. HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1alpha-dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. *J Exp Med* 1997; **186(1)**: 139–146.
- [6] ARENZANA-SEISDEDOS F, VIRELIZIER JL, ROUSSET D, CLARK-LEWIS I, LOETSCHER P, MOSER B, BAGGIOLINI M. HIV blocked by chemokine antagonist. *Nature* 1996; **383(6599)**: 400.
- [7] ATCHISON RE, GOSLING J, MONTECLARO FS, FRANCI C, DIGILIO L, CHARO IF, GOLDSMITH MA. Multiple extracellular elements of CCR5 and HIV-1 entry: dissociation from response to chemokines. *Science* 1996; **274(5294)**: 1924–1926.
- [8] BAGGIOLINI M, DEWALD B, MOSER B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines – CXC and CC chemokines. *Advances in Immunology* 1994; **55**: 97–179.
- [9] BAGLEY J, DILLON PJ, ROSEN C, ROBINSON J, SODROSKI J, MARASCO WA. Structural characterization of broadly neutralizing human monoclonal antibodies against the CD4 binding site of HIV-1 gp120. *Mol Immunol* 1994; **31(15)**: 1149–1160.
- [10] BARRE-SINOUSSIF, CHERMANN JC, REY F, NUGEYRE MT, CHAMARET S, GRUEST J, DAUGUET C, AXLER-BLIN C, VEZINET-BRU F, ROUZIOUX C, ROZENBAUM W, MONTAGNIER L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; **220(4599)**: 868–871.
- [11] BERNASCONI S, CINQUE P, PERI G, SOZZANI S, CROCIATI A, TORRI W, VICENZI E, VAGO L, LAZZARIN A, POLI G, MANTOVANI A. Selective elevation of monocyte chemotactic protein-1 in the cerebrospinal fluid of AIDS patients with cytomegalovirus encephalitis. *J Inf Diseases* 1996; **174(5)**: 1098–10101.
- [12] BERSON JF, LONG D, DORANZ BJ, RUCKER J, JIRIK FR, DOMS RW. A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. *J Virology* 1996; **70(9)**: 6288–6295.
- [13] BIBERFELD G, BOTTIGER B, KARLSSON A, SANDSTROM E, MORFELDT-MANSSON L, BLOMBACK M, NILSSON IM, WIECHEL B, SAXINGER C, GALLO R. HTLV-III infection in homosexuals and hemophiliacs in Sweden. *Cancer Res* 1985; **45**: 4609–4611.
- [14] BISWAS P, POLI G, ORENSTEIN JM, FAUCI AS. Cytokine-mediated induction of human immunodeficiency virus (HIV) expression and cell death in chronically infected U1 cells: do tumor necrosis factor alpha and gamma interferon selectively kill HIV-infected cells? *J Virology* 1994; **68(4)**: 2598–2604.

- [15] BRODER S, MERIGAN, JR TC, BOLOGNESI D. Textbook of AIDS medicine. Baltimore 1994; Williams & Wilkins.
- [16] CANQUE B, ROSENZWAJG M, GEY A, TARTOUR E, FRIDMAN WH, GLUCKMAN JC. Macrophage inflammatory protein-1 α is induced by human immunodeficiency virus infection of monocyte-derived macrophages. *Blood* 1996; **87(5)**: 2011–2019.
- [17] CAO Y, QIN L, ZHANG L, SAFRIT J, HO DD. Characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Immunology Letters* 1996; **51(1-2)**: 7–13.
- [18] CARROLL RG, RILEY JL, LEVINE BL, FENG Y, KAUSHAL S, RITCHEY DW, BERNSTEIN W, WEISLOW OS, BROWN CR, BERGER EA, JUNE CH, ST LOUIS DC. Different regulation of HIV-1 fusion cofactor expression by CD28 costimulation of CD4+ T cells. *Science* 1997; **276**: 273–276.
- [19] CHENG-MAYER C, LIU R, LANDAU NR, STAMATATOS L. Macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1 and utilization of the CC-CKR5 coreceptor. *J Virology* 1997; **71(2)**: 1657–1661.
- [20] CHERMANN JC, BARRE-SINOUSSE F, DAUGUET C, BRUN-VEZINET F, ROUZIOUX C, ROZENBAUM W, MONTAGNIER L. Isolation of a new retrovirus in a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome. *Antibiotics & Chemotherapy* 1983; **32**: 48–53.
- [21] CHIN LT, DUENAS M, LEVI M, HINKULA J, WAHREN B, BORREBAECK CA. Molecular characterization of a human anti-HIV 1 monoclonal antibody revealed a CD26-related motif in CDR2. *Immunology Letters* 1995; **44(1)**: 25–30.
- [22] CHOE H, FARZAN M, SUN Y, SULLIVAN N, ROLLINS B, PONATH PD, WU L, MACKAY CR, LAROSA G, NEWMAN W, GERARD N, GERARD C, SODROSKI J. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 1996; **85(7)**: 1135–1148.
- [23] COCCHI F, DEVICO AL, GARZINO-DEMO A, ARYA SK, GALLO RC, LUSSO P. Identification of RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1995; **270(5243)**: 1811–1815.
- [24] COCCHI F, DEVICO AL, GARZINO-DEMO A, CARA A, GALLO RC, LUSSO P. The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nature Medicine* 1996; **2(11)**: 1244–1247.
- [25] COMBADIÈRE C, AHUJA SK, TIFFANY HL, MURPHY PM. Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1 α , MIP-1 β , and RANTES. *J Leukocyte Biology* 1996; **60(1)**: 147–152.
- [26] CONNOR RI, PAXTON WA, SHERIDAN KE, KOUP RA. Macrophages and CD4+ T lymphocytes from two multiply exposed, uninfected individuals resist infection with primary non-syncytium-inducing isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virology* 1996; **70(12)**: 8758–8764.
- [27] DEICHMANN M, KRONENWETT R, HAAS R. Expression of the human immunodeficiency virus type-1 coreceptors CXCR-4 (fusin, LESTR) and CKR-5 in CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1997; **89(10)**: 3522–3528.
- [28] DENG H, LIU R, ELLMEIER W, CHOE S, UNUTMAZ D, BURKHART M, DI MARZIO P, MARMON S, SUTTON RE, HILL CM, DAVIS CB, PEIPER SC, SCHALL TJ, LITTMAN DR, LANDAU NR. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996; **381(6584)**: 661–666.
- [29] DENG H, UNUTMAZ D, KEWALRAMANI VN, LITTMAN DR. Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature* 1997; **388**: 296–300.
- [30] DIEGEL ML, MORAN PA, GILLILAND LK, DAMLE NK, HAYDEN MS, ZARLING JM, LEDBETTER JA. Regulation of HIV production by blood mononuclear cells from HIV-infected donors: II. HIV-1 production depends on T cell-monocyte interaction. *AIDS Research & Human Retroviruses* 1993; **9(5)**: 465–473.

- [31] DORANZ BJ, RUCKER J, YI Y, SMYTH RJ, SAMSON M, PEIPER SC, PARMENTIER M, COLLMAN RG, DOMS RW. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 1996; **85**(7): 1149–1158.
- [32] DRAGIC T, LITWIN V, ALLAWAY GP, MARTIN SR, HUANG Y, NAGASHIMA KA, CAYANAN C, MADDON PJ, KOU PRA, MOORE JP, PAXTON WA. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996; **381**(6584): 667–673.
- [33] D'SOUZA MP, HARDEN VA. Chemokines and HIV-1 second receptors. Confluence of two fields generates optimism in AIDS research. *Nature Medicine* 1996; **2**(12): 1293–1300.
- [34] ENDERS MJ, JAFFER S, HAGGARTY B, TURNER JD, DORANZ BJ, O'BRIEN P, KOLSON DL, HOXIE JA. Targeting of HIV- and SIV-infected cells by CD4-chemokine receptor pseudotypes. *Science* 1997; **278**: 1462–1464.
- [35] ENDRES MJ, CLAPHAM PR, MARSH M, AHUJA M, TURNER JD, MCKNIGHT A, THOMAS JF, STOEIBENAU-HAGGARTY B, CHOE S, VANCE PJ, WELLS TN, POWER CA, SUTTERWALA SS, DOMS RW, LANDAU NR, HOXIE JA. CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4. *Cell* 1996; **87**(4): 745–756.
- [36] FARZAN M, CHOE H, MARTIN K, SUN Y, SIDELKO M, MACKAY CR, GERARD NP, SODROSKI J, GERARD C. HIV-1 entry and macrophage inflammatory protein-1 beta mediated signaling are independent functions of the chemokine receptor CCR-5. *J Biol Chem* 1997; **272**: 6854–6857.
- [37] FAUCI AS. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature* 1996; **384**(6609): 529–534.
- [38] FAUCI AS. Resistance to HIV-1 infection: it's in the genes. *Nature Medicine* 1996; **2**(9): 966–967.
- [39] FRANKEL SS, WENIG BM, BURKE AP, MANNAN P, THOMPSON LD, ABBONDANZO SL, NELSON AM, POPE M, STEINMAN RM. Replication of HIV-1 in dendritic cell-derived syncytia at the mucosal surface of the adenoid. *Science* 1996; **272**(5258): 115–117.
- [40] GAUBIN M, AUTIERO M, HOULGATTE R, BASMACIOGULLARI S, AUFRAY C, PIATIER-TONNEAU D. Molecular basis of T lymphocyte CD4 antigen functions. *Eur J of Clin Chem & Clin Biochem* 1996; **34**(9): 723–728.
- [41] GOLETTI D, KINTER AL, HARDY EC, POLI G, FAUCI AS. Modulation of endogenous IL-1 beta and IL-1 receptor antagonist results in opposing effects on HIV expression in chronically infected monocytic cells. *J Immunol* 1996; **156**(9): 3501–3508.
- [42] GOSLING J, MONTECARLO FS, ATCHINSON RE, ARAI H, TSOU CL, GOLDSMITH MA, CHARO IF. Molecular uncoupling of C-C chemokine receptor 5 induced chemotaxis and signal transduction from HIV-1 coreceptor activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**(9): 4386–4391.
- [43] GRANELLI-PIPERNO A, MOSER B, POPE M, CHEN D, WEI Y, ISDELL F, O'DOHERTY U, PAXTON W, KOU P R, MOJSOV S, BHARDWAJ N, CLARK-LEWIS I, BAGGIOLINI M, STEINMAN RM. Efficient interaction of HIV-1 with purified dendritic cells via multiple chemokine coreceptors. *J Exp Med* 1997; **94**: 5061–5066.
- [44] GRAZIOSI C, GANTT KR, VACCAREZZA M, DEMAREST JF, DAUCHER M, SAAG MS, SHAW GM, QUINN TC, COHEN OJ, WELBON CC, PANTALEO G, FAUCI AS. Kinetics of cytokine expression during primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**(9): 4386–4391.
- [45] GRAZIOSI C, PANTALEO G, FAUCI AS. Comparative analysis of constitutive cytokine expression in peripheral blood and lymph nodes of HIV-infected individuals. *Res in Immunol* 1994; **145**(8-9): 602–605.
- [46] GROOPMAN JE, HARTZBAND PI, SHULMAN L, SALAHUDDIN SZ, SARNGADHARAN MG, MCLANE MF, ESSEX M, GALLO R. Antibody seronegative human T-lymphotro-

- pic virus type III (HTLV-III)-infected patients with acquired immunodeficiency syndrome or related disorders. *Blood* 1985; **66**(3): 742–744.
- [47] HARRER T, HARRER E, KALAMS SA, ELBEIK T, STAPRANS SI, FEINBERG MB, CAO Y, HO DD, YILMA T, CALIENDO AM, JOHNSON RP, BUCHBINDER SP, WALKER BD. Strong cytotoxic T cell and weak neutralizing antibody responses in a subset of persons with stable nonprogressing HIV type 1 infection. *AIDS Research & Human Retroviruses* 1996; **12**(7): 585–592.
- [48] HO DD. HIV-1 dynamics *in vivo*. *J Biol Regulators & Homeostatic Agents* 1995; **9**(3): 76–77.
- [49] HO DD, NEUMANN AU, PERELSON AS, CHEN W, LEONARD JM, MARKOWITZ M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995; **373**(6510): 123–126.
- [50] HORUK R, HESSELGESSER J, ZHOU Y, FAULDS D, TAUB D, SAMSON M, PARMANTIER M, RUCKER J, DORANZ BJ, DOMS RW. The CC chemokine I-309 is a functional ligand for ChemR1/CCR-8 and inhibits ChemR1/CCR-8 dependent infection by diverse HIV-1 strains. *w druku*; 1997.
- [51] HORUK R. Molecular properties of the chemokine receptor family. *Trends in Pharmacological Sciences* 1994; **15**(5): 159–165.
- [52] HUANG Y, PAXTON WA, WOLINSKY SM, NEUMANN AU, ZHANG L, HE T, KANG S, CERADINI D, JIN Z, YAZDANBAKHS K, KUNSTMAN K, ERICKSON D, DRAGON E, LANDAU NR, PHAIR J, HO DD, KOUP RA. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nature Medicine* 1996; **2**(11): 1240–1243.
- [53] JANSSON M, POPOVIC M, KARLSSON A, COCCHI F, ROSSI P, ALBERT J, WIGZELL H. Sensitivity to inhibition by beta-chemokines correlates with biological phenotypes of primary HIV-1 isolates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**(26): 15382–15387.
- [54] KELNER GS, KENNEDY J, BACON KB, KLEYENSTEUBER S, LARGAESPADA DA, JENKINS NA, COPELAND NG, BAZAN JF, MOORE KW, SCHALL TJ. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 1994; **266**(5189): 1395–1399.
- [55] KENNEDY J, KELNER GS, KLEYENSTEUBER S, SCHALL TJ, WEISS MC, YSSEL H, SCHNEIDER PV, COCKS BG, BACON KB, ZLOTNIK A. Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. *J Immunol* 1995; **155**(1): 203–209.
- [56] KINTER AL, BENDE SM, HARDY EC, JACKSON R, FAUCI AS. Interleukin 2 induces CD8+ T cell-mediated suppression of human immunodeficiency virus replication in CD4+ T cells and this effect overrides its ability to stimulate virus expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**(24): 10985–10989.
- [57] KINTER AL, OSTROWSKI M, GOLETTI D, OLIVA A, WEISSMAN D, GANTT K, HARDY E, JACKSON R, EHLER L, FAUCI AS. HIV replication in CD4+ T cells of HIV-infected individuals is regulated by a balance between the viral suppressive effects of endogenous beta-chemokines and the viral inductive effects of other endogenous cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**(24): 14076–14081.
- [58] KINTER AL, POLI G, FOX L, HARDY E, FAUCI AS. HIV replication in IL-2-stimulated peripheral blood mononuclear cells is driven in an autocrine/paracrine manner by endogenous cytokines. *J Immunol* 1995; **154**(5): 2448–2459.
- [59] KITAURA M, NAKAJIMA T, IMAI T, HARADA S, COMBADIÈRE C, TIFFANY HL, MURPHY PM, YOSHIE O. Molecular cloning of human eotaxin, an eosinophil-selective CC chemokine, and identification of a specific eosinophil eotaxin receptor, CC chemokine receptor 3. *J Biol Chem* 1996; **271**(13): 7725–7730.
- [60] KLATZMANN D, CHAMPAGNE E, CHAMARET S, GRUEST J, GUETARD D, HERCEND T, GLUCKMAN JC, MONTAGNIER L. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 1985; **312**(5996): 767–768.

- [61] KOZAK SL, PLATTE EJ, MADANI N, FERRO FE JR, PEDEN K, KABAT D. CD4, CXCR-4, and CCR-5 dependencies for infections by primary patient and laboratory-adapted isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virology* 1997; **71**(2): 873–882.
- [62] LANGEDIJK JP, PUIJK WC, VAN HOORN WP, MELOEN RH. Location of CD4 dimerization site explains critical role of CDR3-like region in HIV-1 infection and T-cell activation and implies a model for complex of coreceptor-MHC. *J Biol Chem* 1993; **268**(23): 16875–16878.
- [63] LIAO F, ALKHATIB G, PEDEN KWC, SHARMA G, BERGER EA, FARBER JM. STRL33, a novel chemokine receptor-like protein, functions as a fusion cofactor for both macrophage-tropic and T cell line-tropic HIV-1. *The J Exp Med* 1997; **185**(11): 2015–2023.
- [64] LIU R, PAXTON WA, CHOE S, CERADINI D, MARTIN SR, HORUK R, MACDONALD ME, STUHLMANN H, KOUP RA, LANDAU NR. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996; **86**(3): 367–377.
- [65] LOETSCHER P, GEISER T, OREILLY T, ZWAHLEN R, BAGGIOLINI M, MOSER B. Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *J Biol Chem* 1994; **269** (1): 232–237.
- [66] LOETSCHER P, SEITZ M, CLARK-LEWIS I, BAGGIOLINI M, MOSER B. Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca²⁺ mobilization, and enzyme release. *J Immunol* 1996; **156**(1): 322–327.
- [67] LOETSCHER P, SEITZ M, CLARK-LEWIS I, BAGGIOLINI M, MOSER B. Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *FASEB J* 1994; **8**(13): 1055–1060.
- [68] LONG D, BERSON JF, COOK DG, DOMS RW. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 gp120 binding to liposomes containing galactosylceramide. *J Virology* 1994; **68**(9): 5890–5898.
- [69] MCKENZIE SW, DALLALIO G, NORTH M, FRAME P, MEANS RT JR. Serum chemokine levels in patients with non-progressing HIV infection. *AIDS* 1996; **10**(9): 29–33.
- [70] MCKNIGHT A, WILKINSON D, SIMMONS G, TALBOT S, PICARD L, AHUJA M, MARSH M, HOXIE JA, CLAPHAM L. Inhibition of human immunodeficiency virus fusion by a monoclonal antibody to a coreceptor (CXCR4) is both cell type and virus strain dependent. *J Virology* 1997; **71**: 1692–1696.
- [71] MILLER MD, KRANGEL MS. Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Critical Rev in Immunol* 1992; **12**(1–2): 17–46.
- [72] MOORE JP, TRKOLA A, KORBER B, BOOTS LJ, KESSLER JA 2ND, MCCUTCHAN FE, MASCOLA J, HO DD, ROBINSON J, CONLEY AJ. A human monoclonal antibody to a complex epitope in the V3 region of gp120 of human immunodeficiency virus type 1 has broad reactivity within and outside clade B. *J Virology* 1995; **69**(1): 122–130.
- [73] MORIUCHI H, MORIUCHI M, COMBADIERE C, MURPHY PM, FAUCI AS. CD8+ T-cell-derived soluble factor(s), but not beta-chemokines RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta, suppress HIV-1 replication in monocyte/macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**(26): 15341–15345.
- [74] MURPHY PM. Chemokine receptors: structure, function and role in microbial pathogenesis. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 1996; **7**(1): 47–64.
- [75] MURPHY PM. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Ann Rev of Immunol* 1994; **12**: 593–633.
- [76] NAGASAWA T, NAKAJIMA T, TACHIBANA K, IIZASA H, BLEUL CC, YOSHIE O, MATSUSHIMA K, YOSHIDA N, SPRINGER TA, KISHIMOTO T. Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**(25): 14726–14729.

- [77] ORAVECZ T, PALL M, NORCROSS MA. Beta-chemokine inhibition of monocytotropic HIV-1 infection. Interference with a postbinding fusion step. *J Immunol* 1996; **157**(4): 1329–1332.
- [78] PANTALEO G, DEMAREST JF, SCHACKER T, VACCAREZZA M, COHEN OJ, DAUCHER M, GRAZIOSI C, SCHNITTMAN SS, QUINN TC, SHAW GM, PERRIN L, TAMBUSI G, LAZZARIN A, SEKALY RP, SOUDEYNS H, COREY L, FAUCI AS. The qualitative nature of the primary immune response to HIV infection is a prognosticator of disease progression independent of the initial level of plasma viremia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**(1): 254–258.
- [79] PAXTON WA, DRAGIC T, KOUP RA, MOORE JP. The beta-chemokines, HIV type 1 second receptors, and exposed uninfected persons. *AIDS Res & Human Retroviruses* 1996; **12**(13): 1203–1207.
- [80] PAXTON WA, MARTIN SR, TSE D, O'BRIEN TR, SKURNICK J, VANDEVANTER NL, PADIAN N, BRAUN JF, KOTLER DP, WOLINSKY SM, KOUP RA. Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposure. *Nature Medicine* 1996; **2**(4): 412–417.
- [81] PERELSON AS, NEUMANN AU, MARKOWITZ M, LEONARD JM, HO DD. HIV-1 dynamics *in vivo*: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 1996; **271**(5255): 1582–1586.
- [82] POLI G, BISWAS P, FAUCI AS. Interferons in the pathogenesis and treatment of human immunodeficiency virus infection. *Antiviral Research* 1994; **24**(2-3): 221–233.
- [83] POLI G, FAUCI AS. Cytokine modulation of HIV expression. *Seminars in Immunol* 1993; **5**(3): 165–173.
- [84] POLI G, KINTER AL, FAUCI AS. Interleukin 1 induces expression of the human immunodeficiency virus alone and in synergy with interleukin 6 in chronically infected U1 cells: inhibition of inductive effects by the interleukin 1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**(1): 108–112.
- [85] RAPORT CJ, GOSLING J, SCHWEICKART VL, GRAY PW, CHARO IF. Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1beta, and MIP-1alpha. *J Biol Chem* 1996; **271**(29): 17161–17166.
- [86] RAPORT CJ, SCHWEICKART VL, EDDY RL JR, SHOWS TB, GRAY PW. The orphan G-protein-coupled receptor-encoding gene V28 is closely related to genes for chemokine receptors and is expressed in lymphoid and neural tissues. *Gene* 1995; **163**(2): 295–299.
- [87] RATAJCZAK MZ, LEE B, RATAJCZAK J, DOMS R, GEWIRTZ A. Characterization and biologic consequence of chemokine (CXCR-4, CCR-5 and CCR-3) receptor and CD4 antigen expression on normal and malignant human hematopoietic cells. *Blood* 1997; w druku
- [88] REEVES JD, MCKNIGHT A, POTEMPA S, SIMMONS G, GRAY PW, POWER C, WELLS T, WEISS RA, TALBOT SJ. CD4 independent infection by HIV-2 (ROD/B): use of the 7-transmembrane receptors CXCR-4, CCR-3 and V-28 for entry. *Virology* 1997; **231**: 130–134.
- [89] ROLLINS BJ. Chemokines. *Blood* 1997; **90** (3): 909–928.
- [90] ROOS RS, LOETSCHER M, LEGLER DF, CLARK-LEWIS I, BAGGIOLINI M, MOSER B. Identification of CCR8, the receptor for the human CC chemokine I-309. *J Biol Chem* 1997; **272**(28): 17251–17254.
- [91] RUCKER J, EDINGER AL, SHARRON M, SAMSON M, LEE B, BERSON JF, YI Y, COLLMAN RG, DORANZ BJ, PARMENTIER M, DOMS RW. Utilization of chemokine receptors, orphan receptors and herpesvirus encoded receptors by diverse human and simian immunodeficiency viruses. *J Virology* 1997; **71**(12): 8999–9007.
- [92] RUCKER J, SAMSON M, DORANZ BJ, LIBERT F, BERSON JF, YI Y, SMYTH RJ, COLLMAN RG, BRODER CC, VASSART G, DOMS RW, PARMENTIER M. Regions in beta-chemokine receptors CCR5 and CCR2b that determine HIV-1 cofactor specificity. *Cell* 1996; **87**(3): 437–446.

- [93] SAMSON M, LIBERT F, DORANZ BJ, RUCKER J, LIESNARD C, FARBER CM, SARAGOSTI S, LAPOUMEROULIE C, COGNAUX J, FORCEILLE C, MUYLDERMANS G, VERHOFSTEDÉ C, BURTONBOY G, GEORGES M, IMAI T, RANA S, YI Y, SMYTH RJ, COLLMAN RG, DOMS RW, VASSART G, PARMENTIER M. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996; **382(6593)**:722–725.
- [94] SCHMIDTMAYEROVA H, NOTTET HS, NUOVO G, RAABE T, FLANAGAN CR, DUBROVSKY L, GENDELMAN HE, CERAMI A, BUKRINSKY M, SHERRY B. Human immunodeficiency virus type 1 infection alters chemokine beta peptide expression in human monocytes: implications for recruitment of leukocytes into brain and lymph nodes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93(2)**:700–704.
- [95] SIMMONS G, WILKINSON D, REEVES JD, DITTMAR MT, BEDDOWS S, WEBER J, CARNEGIE G, DESSELBERGER U, GRAY PW, WEISS RA, CLAPHAM PR. Primary, syncytium-inducing human immunodeficiency virus type 1 isolates are dual-tropic and most can use either Lestr or CCR5 as coreceptors for virus entry. *J Virology* 1996; **70(12)**:8355–8360.
- [96] SMITH MW, DEAN M, CARRINGTON M, WINKLER CH, HUTTLEY GA, LOMB DA, GOEDERT JJ, OBRIEN TR, JACOBSON LP, KASLOW R, BUCHBINDER S, VITTINGHOFF E, VLAHOV D, HOOTS K, HILGARTNER MW, OBRIEN SJ. Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. *Science* 1997; **277**:959–965.
- [97] SPIRA AI, MARX PA, PATTERSON BK, MAHONEY J, KROUP RA, WOLINSKY SM, HO DD. Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques. *J Exp Med* 1996; **183(1)**:215–225.
- [98] SZABO MC, SOO KS, ZLOTNIK A, SCHALL TJ. Chemokine class differences in binding to the Duffy antigen-erythrocyte chemokine receptor. *J Biol Chem* 1995; **270(43)**:25348–25351.
- [99] TEDLA N, PALLADINETTI P, KELLY M, KUMAR RK, DIGIROLAMO N, CHATTOPHADHAY U, COOKE B, TRUSKETT P, DWYER J, WAKEFIELD D, LLOYD A. Chemokines and T lymphocyte recruitment to lymph nodes in HIV infection. *Am J Path* 1996; **148(5)**:1367–1373.
- [100] TRKOLA A, DRAGIC T, ARTHOS J, BINLEY JM, OLSON WC, ALLAWAY GP, CHENG-MAYER C, ROBINSON J, MADDON PJ, MOORE JP. CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* 1996; **384(6605)**:184–187.
- [101] VANCOTT TC, POLONIS VR, LOOMIS LD, MICHAEL NL, NARA PL, BIRX DL. Differential role of V3-specific antibodies in neutralization assays involving primary and laboratory-adapted isolates of HIV type 1. *AIDS Res & Human Retroviruses* 1995; **11(11)**:1379–1391.
- [102] VERANI A, SCARLATTI G, COMAR M, TRESOLDI E, POLO S, GIACCA M, LUSSO P, SICCARDI AG, VERCELLI D. C-C chemokines released by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated macrophages suppress HIV-1 infection in both macrophages and T cells. *J Exp Med* 1997; **185(5)**:805–816.
- [103] VILLARD J, DAYER-PASTORE F, HAMACHER J, AUBERT JD, SCHLEGEL-HAUETER S, NICOD LP. GRO alpha and interleukin-8 in *Pneumocystis carinii* or bacterial pneumonia and adult respiratory distress syndrome. *Am J of Resp & Critical Care Med* 1995; **152(5)**:1549–1554.
- [104] WEISSMAN D, DAUCHER J, BARKER T, ADELSBERGER J, BASELER M, FAUCI AS. Cytokine regulation of HIV replication induced by dendritic cell-CD4-positive T cell interactions. *AIDS Res & Human Retroviruses* 1996; **12(9)**:759–767.

- [105] WEISSMAN D, POLIG, FAUCI AS. IL-10 synergizes with multiple cytokines in enhancing HIV production in cells of monocytic lineage. *J Acquired Immune Deficiency Syndromes & Human Retrovirology* 1995; **9(5)**: 442–449.
- [106] WEISSMAN D, POLIG, FAUCI AS. Interleukin 10 blocks HIV replication in macrophages by inhibiting the autocrine loop of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 induction of virus. *AIDS Res & Human Retroviruses* 1994; **10(10)**: 1199–1206.
- [107] WEISSMAN D, RABIN RL, ARTHOS J, RUBBERT A, DYBUL M, SWOFFORD R, VENKATESAN S, FARBER JM, FAUCI AS. Macrophage-tropic HIV and SIV envelope proteins induce a signal through the CCR5 chemokine receptor. *Science* 1997; **389**: 981–985.
- [108] WOLINSKY SM, KORBER BT, NEUMANN AU, DANIELS M, KUNSTMAN KJ, WHETSELL AJ, FURTADO MR, CAO Y, HO DD, SAFRIT JT. Adaptive evolution of human immunodeficiency virus-type 1 during the natural course of infection. *Science* 1996; **272(5261)**: 537–542.
- [109] WU L, GERARD NP, WYATT R, CHOE H, PAROLIN C, RUFFING N, BORSETTI A, CARDOSO AA, DESJARDIN E, NEWMAN W, GERARD C, SODROSKI J. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* 1996; **384(6605)**: 179–183.
- [110] WU L, PAXTON WA, KASSAM N, RUFFING NR, ROTTMAN JB, SULIVAN N, CHOE H, SODROSKI J, NEWMAN W, KOUP RA, MACKAY CR. CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, *in vitro*. *J Exp Med* 1997; **185** (9): 1681–1691.
- [111] WYATT R, MOORE J, ACCOLA M, DESJARDIN E, ROBINSON J, SODROSKI J. Involvement of the V1/V2 variable loop structure in the exposure of human immunodeficiency virus type 1 gp120 epitopes induced by receptor binding. *J Virology* 1995; **69(9)**: 5723–5733.
- [112] YOSHIDA T, IMAI T, KAKIZAKI M, NISHIMURA M, YOSHIE O. Molecular cloning of a novel C or gamma type chemokine, SCM-1. *FEBS Letters* 1995; **360(2)**: 155–159.
- [113] YOSHIDA T, IMAI T, TAKAGI S, NISHIMURA M, ISHIKAWA I, YAOI T, YOSHIE O. Structure and expression of two highly related genes encoding SCM-1/human lymphotactin. *FEBS Letters* 1996; **395(1)**: 82–88.
- [114] ZAULI G, FURLINI G, VITALE M, RE CM, GIBELINI D, ZAMIA L, VISANI G, BORGATTI P, CAPITANI S, LAPLACA M. A subset of human CD34+ hematopoietic progenitors express low levels of CD4, the high-affinity receptor for human immunodeficiency virus 1. *Blood* 1994; **84**: 1896–1905.
- [115] ZHANG L, HUANG Y, HE T, CAO Y, HO DD. HIV-1 subtype and second-receptor use. *Nature* 1996; **383(6603)**: 768.
- [116] ZHU T, MO H, WANG N, NAMDS, CAO Y, KOUP RA, HO DD. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. *Science* 1993; **261(5125)**: 1179–1181.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 19.11.1997 r.

Przyjęto: 05.02. 1998 r.

Adres autora: 405 South 40th Street, Apt. 2R,
Philadelphia, PA 19104, USA

UDZIAŁ JONÓW WAPNIA W PRZEKAZYWANIU SYGNAŁÓW W JĄDRZE KOMÓRKOWYM*

CALCIUM SIGNALLING IN THE CELL NUCLEUS

Jacek KUŹNICKI

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Zakład Neurobiologii
Molekularnej i Komórkowej, Warszawa

W dniach 4–8 października 1997 roku odbyła się Pierwsza Europejska Konferencja na temat Sygnałów Wapniowych w Jądrze Komórkowym**. W czasie konferencji zorganizowano sześć sesji naukowych o następujących tytułach:

1. Pula wapnia w jądrze i w cytoplazmie – wymiana i regulacja,
2. Otoczka jądrowa i pory w otoczce jądrowej – struktura i przepuszczalność,
3. Systemy transportujące wapń w otoczce jądrowej,
4. Kalmodulina i jej białka docelowe w otoczce jądrowej,
5. Rola jonów wapnia w aktywacji transkrypcji,
6. Wapń w jądrze i białka wiążące wapń w patologii komórki.

Głównym tematem pierwszej sesji było znalezienie odpowiedzi na pytanie, czy stężenie jonów wapnia w jądrze komórkowym jest zależne od stężenia tych jonów w cytoplazmie i czy zmienia się, gdy stężenie wapnia w cytoplazmie wzrasta na skutek aktywacji komórki. Jeżeli poziom wapnia podnosi się identycznie w obu przedziałach komórki, to znaczy, że otoczka jądrowa nie stanowi żadnej bariery dla wapnia. Natomiast jeśli poziom jonów wapnia w jądrze jest inny niż w cytoplazmie, to w pewnych warunkach otoczka jądrowa stanowić może barierę dla tych jonów. W omawianych na sesji doświadczeniach stosowano różne metody

*Praca została przygotowana dzięki grantowi KBN nr 6P04A 012 11.

** Obszerny raport na temat tego sympozjum ukazał się w Cell Calcium 22 (5), 313-319, 1997; natomiast najnowsze informacje na temat ultrastruktury i funkcji jądra komórkowego można znaleźć w Postęпах Biologii Komórki 24, Supl. 9, 1997.

badania poziomu jonów wapnia w komórce oraz różne typy komórek. I tak, poziom ten oznaczano po podaniu estrowych pochodnych sond fluorescencyjnych wrażliwych na wapń, takich jak Fura 2, iniekcji tych sond, iniekcji białek wrażliwych na wapń (ekworyny), transfekcji komórek wektorami ekspresyjnymi kodującymi ekworynę. Okazało się, że w zależności od typu sondy i typu komórek uzyskiwano różne wyniki. Mason i wsp., Casteelis i wsp. oraz Cambel i wsp. obserwowali w pewnych warunkach i typach komórek różny poziom wapnia w jądrze i w cytoplazmie. Natomiast Rizzuto i wsp. oraz Bolsover przedstawili dane wskazujące na to, że nie ma niezależnej regulacji poziomu wapnia w jądrze i w cytoplazmie. Uważają oni, jak i niektórzy dyskutanci, że obserwacje, iż poziom wapnia w jądrze jest inny niż w cytoplazmie, mogą być artefaktami wynikającymi m.in. z tego, że powinowactwo sond fluorescencyjnych wobec wapnia może być inne w jądrze niż w cytoplazmie. To różne powinowactwo sond fluorescencyjnych względem wapnia wynikać może z wiązania się z różnymi białkami w jądrze i cytoplazmie. Innym potencjalnym problemem metodycznym jest to, że komórki mogą się różnić między sobą pod względem przepuszczalności otoczki jądrowej dla wapnia. Tak np. w aktywowanych komórkach PC12 wapń bez opóźnień dostaje się do jądra komórkowego w przeciwieństwie do komórek mięśni gładkich. Natomiast w osteoblastach, osiąga wyższe stężenie w jądrze niż w cytoplazmie. Ponadto, te same komórki w różnych stanach fizjologicznych wykazywać mogą różny gradient stężenia wapnia pomiędzy jądrem a cytoplazmą.

Santella i wsp. przedstawili dane wskazujące, że otoczka jądrowa oocytów stanowi barierę dla wapnia. Jej badania polegały na iniekcji sondy Fura 2 do jądra lub do cytoplazmy oocytów i obserwacji takich komórek. Stwierdzili oni, że sonda nie przenika przez otoczkę, a aktywacja hormonem oocytów wywołuje dwukrotnie wzrost stężenia wapnia w cytoplazmie, a tylko jeden raz w jądrze.

Druga i trzecia sesja Konferencji dotyczyły przepuszczalności por jądrowych i otoczki jądrowej jako magazynu wapnia. Transport przez otoczkę odbywa się przez pory – supramolekularne struktury o średnicy ok. 10 nm. Kanały te wydają się umożliwiać swobodny przepływ małych cząsteczek, ale większość białek i cząsteczek RNA jest przez nie transportowana w zależności od ATP, temperatury i odpowiedniego sygnału. Hormony, które działają za pośrednictwem jonów wapnia, zwiększają jego poziom w cytoplazmie i wpływają na strukturę por jądrowych. Przez pory te odbywa się również transport związany z ekspresją genów. I tak, zarówno import czynników transkrypcyjnych do jądra, jak i eksport odpowiednich mRNA zależą nie tylko od ATP, ale i od poziomu wapnia. Na przykład konformacja NPC, czyli jądrowych kompleksów porowych (*Nuclear Pore Complexes*), zmienia się pod wpływem jonów wapnia, co zaobserwowano przy użyciu mikroskopu nowej generacji, tzw. *Atomic Force Microscope* (AFM).

Przestrzeń wokółjądrowa zawiera zmagazynowane jony wapnia. Magazyn ten łąduje się dzięki pompie wapniowej (Ca^{2+} -ATPazie) znajdującej się w zewnętrznej

blonie jądrowej, która wpompowuje jony wapnia do przestrzeni wokółjądrowej. Na wewnętrznej blonie jądrowej znajdują się receptory dla IP_3 . Czynniki, które opróżniają ten magazyn, takie jak EGTA czy tapsygarina, powodują zahamowanie transportu przez pory otoczki jądrowej. Gdy pod wpływem IP_3 wapń jest uwalniany z przestrzeni wokółjądrowej do wnętrza jądra, to pory jądrowe zamykają się nawet dla małych cząsteczek, prawdopodobnie dzięki ruchowi tzw. centralnej zatyczki (*Central Plug*). Jednym z białek regulatorowych tworzących NPC jest białko wrażliwe na wapń zawierające jeden motyw *EF-hand*. Do utworzenia NPC jony wapnia nie są potrzebne, choć potrzebne są jony cynku. IP_3 powstaje w jądrze dzięki działaniu fosfolipazy C, która również jest obecna w otoczce jądrowej. I to ten IP_3 uwalnia wapń z otoczki jądrowej do wnętrza jądra. Pobieranie wapnia do przestrzeni wokółjądrowej jest aktywowane przez IP_4 . Na preparatach wyizolowanych jąder komórkowych pokazano, że jony wapnia mogą być uwalniane z przestrzeni wokółjądrowej do wnętrza jądra, a następnie, że mogą dyfundować na zewnątrz jądra przez pory jądrowe. Schwaller i wsp. zaobserwowali, że kalretinina – 22K ulega translokacji z cytoplazmy do jądra komórkowego w komórkach WiDr pod wpływem witaminy D_3 . Podobnie czynniki, takie jak maślan sodu, które indukują różnicowanie enterocytów, powodują również translokację kalretininy 22K do jądra. Tymczasem kalretinina 31K nie ulega translokacji.

Od lat wiadomo, że kalmodulina występuje w jądrze komórkowym, co sugerowało, że pełni rolę w regulacji funkcji jądrowych. Temu zagadnieniu była poświęcona czwarta sesja. W różnych jądrach komórkowych znajdują się różne białka wiążące się z kalmoduliną. Można wyróżnić co najmniej 9 grup białek:

- 1 – białka biorące udział w regulacji interakcji aktywnej z miozyną,
- 2 – kinazy białkowe,
- 3 – fosfatazy białkowe (kalcyneuryna),
- 4 – czynniki transkrypcyjne z grupy *helix-loop-helix*,
- 5 – białka biorące udział w procesie różnicowego wycinania genów,
- 6 – białka wiążące RNA,
- 7 – białka jądrowo-rybosomalne,
- 8 – białka opiekuńcze (HSP90) i inne.

Do pierwszej grupy należą: kinaza białkowa, kinaza lekkiego łańcucha miozyny, kaldesmon i α -spektryna. Do drugiej grupy należą m.in. CaMKII, CaMKIV oraz CaMK, która fosforyluje argininę w histonie H_3 .

Jaką funkcję może mieć kalmodulina w jądrze? Jedną z nich jest udział w cyklu komórkowym. Wiadomo, że kalmodulina jest potrzebna na kilku etapach cyklu komórkowego i prawdopodobnie oddziałuje z różnymi białkami. Stwierdzono np., że inhibitor kalmoduliny W13 powoduje, iż kinaza białkowa cdk4/cyclinD wydostaje się z jądra komórkowego, podczas gdy normalnie znajduje się w jądrze. Kalmodulina wiąże się z białkiem Spc110p, które jest składnikiem centrosomu. Inną rolą kalmoduliny jest aktywacja kalcyneuryny, która defosforyluje czynnik transkrypcyjny

NFAT. Defosforylacja NFAT powoduje translokację tego czynnika do jądra. Wykazano, że istnieją dwa rejony NFAT odpowiedzialne za jądrową lokalizację: NLS i NES. Zdefosforylowane NFAT łączy się z API i reguluje ekspresję odpowiednich genów.

Kalmodulina aktywuje CaMKIV, która fosforyluje CREtau. Ten czynnik transkrypcyjny indukuje jądrowo-specyficzny promotor znajdujący się wewnątrz intronu CaMKIV. Daje on transkrypcję innego białka, a mianowicie kalsperminy (będącej także białkiem jądrowym). Podobne zjawisko ma miejsce w limfocytach T, co odkryto dzięki analizie myszy transgenicznych, które miały katalitycznie nieaktywną formę CaMKIV w komórkach grasicy. W takich komórkach po aktywacji przeciwciałami nie ma fosforylacji CREB, przez co nie ma aktywacji takich genów jak *c-fos*. To uniemożliwia aktywację genu interleukiny 2.

Hannover i wsp. sugerują istnienie dwóch typów regulacji transportu do jądra. Pierwszy to dobrze poznany transport zależny od GTP. Drugi, opisany przez autorów, to transport niezależny od GTP, a zachodzący przy wysokim stężeniu jonów wapnia. W badaniach tych autorzy stosowali następujące białko reporterowe: białko *rev-GR-GFP*. Dodanie hormonu do transfekowanych tym wektorem komórek powodowało translokację białka *rev* do jądra (widocznego jako zielone białko fluorescencyjne – GFP). Odpłukanie hormonu inicjowało eksport białka fuzyjnego. Przy niskim stężeniu wapnia był on zależny od GTP, a po aktywacji komórki i wzroście stężenia wapnia był on niezależny od GTP, ale zależny od kalmoduliny (hamowany był przez inhibitor kalmoduliny). Przy tym receptor glukokortykoidów (GR) umożliwiał indukcję syntezy białka tymi hormonami.

Piąta sesja dotyczyła udziału jonów wapnia w regulacji transkrypcji, czyli głównego procesu związanego z regulacją ekspresji genów. Neuronalna aktywność reguluje siłę połączenia między synapsami w układzie nerwowym. Wapń w neuronach postsynaptycznych inicjuje przemiany, które doprowadzają do zmian synaptycznych wpływających na te połączenia. Wzrost stężenia wapnia w neuronach indukuje ekspresję nowych genów, które są odpowiedzialne za utrzymujące się długo zmiany w neuronach. Oprócz wpływu na transkrypcję wapń może oddziaływać na stabilność mRNA w cytoplazmie i wydłużanie łańcucha polipeptydowego. Wapń dostaje się do neuronów za pośrednictwem kanałów wapniowych zależnych od zmian potencjału (VSCC) lub kanału typu NMDA związanego z receptorem glutaminianowym. Wapń dostający się do komórki w wyniku depolaryzacji otoczki wywołuje inne efekty w komórce niż wapń, który dostaje się za pośrednictwem kanału NMDA. W wyniku depolaryzacji fosforylacja CREB utrzymuje się na wysokim poziomie, natomiast wapń z kanału NMDA wywołuje jedynie krótkotrwałą fosforylację CREB. W wyniku różnej fosforylacji CREB ekspresji ulegają różne geny. Sprzężenie aktywacji komórki z ekspresją genów zależną od wapnia dokonuje się według następującego schematu: wzrost stężenia jonów wapnia → zależny od wapnia element DNA → geny wczesnej odpowiedzi → elementy DNA genów późnej odpowiedzi → późne geny → zmiany

adaptacyjne. Podobnie może być w limfocytach B, w których wapń może aktywować ekspresję różnych genów w wyniku różnej aktywacji czynników transkrypcyjnych. Istnieją przynajmniej dwa szlaki, którymi wapń może aktywować transkrypcję. Jeden szlak to przemiany, które prowadzą do aktywacji CRE. Jest to jądrowa regulacja jonami wapnia. Drugi szlak polega na aktywacji elementu DNA zależnego od surowicy, tzw. SRE. A zatem, istnieją dwa elementy DNA, które są wrażliwe na zmiany poziomu wapnia: SRE i CRE. W wyniku wzrostu stężenia jonów wapnia przez kanały zależne od potencjału ma miejsce fosforylacja seryny 133 w białku wiążącym CRE (CREB). W wyniku tej fosforylacji dokonuje się aktywacja jednego z genów wczesnej odpowiedzi takiego jak c-fos. Utrzymująca się fosforylacja CREB powoduje aktywację wielu genów późnej odpowiedzi, których aktywność zależy od API (składnikiem którego jest c-fos). Do aktywacji SRE potrzebny jest wzrost stężenia wapnia w cytoplazmie, podczas gdy do fosforylacji CREB potrzebny jest wzrost stężenia wapnia w jądrze komórkowym. Z elementem SRE wiążą się dwa białka: TCF i SRF (*Serum Response Factor*).

Przykładem białka, którego ekspresja zależy również od CREB, jest czynnik troficzny BDNF. W wyniku wzrostu stężenia jonów wapnia dostającego się kanałem VSCC ma miejsce fosforylacja CREB i inicjacja transkrypcji jednego z promotorów genu BDNF. Gen BDNF zawiera pięć egzonów, z których tylko piąty zawiera informacje o sekwencji tego białka. Każdy z pozostałych czterech egzonów zawiera swój własny promotor i może łączyć się z piątym egzonem. Jeden z tych promotorów zawiera element CRE. Wapń prawdopodobnie może wpływać również bezpośrednio na aktywność czynników transkrypcyjnych. Czynniki z rodziny bHLH (np. MyoD) mogą bezpośrednio oddziaływać z wapniem i kalmoduliną lub z wapniem i białkami S100, co hamuje ich interakcję z DNA.

Tsien i wsp. twierdzą, że fosforylacja CREB w jądrze komórkowym jest aktywowana przez kalmodulinę związaną z wapniem, która tylko ze związanym wapniem przechodzi z cytoplazmy do jądra komórkowego. Tę zależną od jonów wapnia translokację kalmoduliny obserwowano stosując znakowaną fluorescencyjnie kalmodulinę. Natomiast nie obserwowano takich translokacji w przypadku parwalbuminy, kalbindyny D28K i S100a.

Szosta sesja dotyczyła związków między wapniem jądrowym a stanami patologicznymi. W trakcie wykładów mówiono o roli jonów wapnia w aktywacji proteaz i endonukleaz, które biorą udział w apoptozie. W szczególności opisywano właściwości kalpajny, która wydaje się wykazywać zależną od wapnia translokację między cytoplazmą a jądrem komórkowym. Cidlowski i wsp. opisali zmiany w składzie jonowym komórek, w których indukowano apoptozę. Te zmiany, między innymi wyższy poziom jonów wapnia, indukują kaspazę (proteazę) i nukleazę tnącą DNA na kawałki o wielkości około 50 kb. Melino i wsp. przedstawili wyniki badań dotyczące toksycznego wpływu glikoproteiny HIV białka gp120 i zapro-

ponowali hipotezę, iż tlenek azotu uczestniczy w przełączaniu apoptozy w szlak nekrozy.

Problem udziału jonów wapnia w przekazywaniu sygnałów w jądrze komórkowym jest tematem kontrowersyjnym i mimo tej konferencji, kontrowersje pozostały. Tym niemniej, sukcesem jest to, że taka konferencja się odbyła i że wzięło w niej udział wielu wybitnych specjalistów zajmujących się tą problematyką. Istotne jest również to, że sprecyzowano tematykę związaną z funkcjonowaniem jądra komórkowego w zależności od stężenia jonów wapnia pokazując wielopłaszczyznowość tego problemu. A mianowicie, że tematyka ta to takie zagadnienia, jak przepuszczalność porów jądrowych dla jonów wapnia i zakres zmian poziomu wapnia we wnętrzu jądra w zależności od poziomu jonów wapnia w cytoplazmie, rola tych jonów w mechanizmach regulujących transport innych związków przez pory, aktywny transport jonów wapnia do przestrzeni wokółjądrowej magazynującej te jony, mechanizmy uwalniania jonów wapnia do wnętrza jądra. Ponadto, ważną sprawą jest również obecność białek wiążących wapń w jądrze, identyfikacja enzymów i procesów zależnych od jonów wapnia, wyjaśnienie roli jonów wapnia w regulacji transkrypcji i dalszych etapach związanych z ekspresją genów (np. transport mRNA i jego stabilność), poznanie mechanizmów, w których wapń działa w procesach prawidłowych i mechanizmów, w których wapń włączony jest w procesy patologiczne (nowotworzenie, nekroza czy apoptoza). Można uznać, że dzięki tej konferencji powstaje zdefiniowana tematyka badawcza, która w znaczący sposób wpłynie na nasze rozumienie funkcjonowania jądra komórkowego u Eukariontów. Prawdopodobnie podobne konferencje będą się odbywały cyklicznie i być może w tym samym malowniczym kurorcie włoskim w Kalabrii.

Prof. dr hab. Jacek Kuźnicki
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

ABSTRACTS OF III CONFERENCE OF FLOW CYTOMETRY, WARSAW, JUNE 14–15 1997

organized by: Polish Society for Cytometry, International UNESCO/PAN Institute, Committee of Cell Pathology of Polish Academy of Sciences (PAN), Committee of Cytobiology PAN

1. SPERM CHROMATIN STRUCTURE ASSAY OF BULL SPERM

Michał Bochenek

Dept. of Animal Reproduction, National Institute of Animal Reproduction, 32-083 Balice/Kraków

Sperm chromatin structure was evaluated using metachromatic properties of Acridine Orange (AO). AO intercalated into double stranded DNA fluorescence green with max at 530 nm, but after interaction with single stranded nucleic acids luminescence in red with max. at 640 nm. In the current study sperm chromatin structure assay (SCSA) was performed on spermatozoa of 8 bulls with known fertility, derived from one of AR Centres. Each bull was represented by 3 ejaculates collected in at least 2 weeks interval. Fertility was estimated on the basis of non-return rates adjusted for environmental and female effects and expressed as an index, where value „100” indicated mean fertility of Centre’s bulls. The fertility of bulls used in the study ranged from 83 to 104.

Partial denaturation of chromatin was induced by decreasing of semen pH to 1.5. Chromatin susceptibility to denaturation was measured on the base of calculated parameter a_t [where $a_t = \text{red}/(\text{green} + \text{red})$ fluorescence]. The following statistics was computed: % of cells outside the main a_t population, (COMP a_t), standard deviation of a_t (SD a_t) and % of cells outside the main population at the red fluorescence histogram (red%). Negative correlations were obtained between fertility rates and: COMP a_t (-0.49, $p < 0.05$), SD a_t (-0.54, $p < 0.01$), Red% (-0.53, $p < 0.01$). The data suggest that SCSA can be of value for the identification of even small differences in fertility of bulls.

2. THE USE OF FLOW CYTOMETRY IN DIAGNOSIS OF PAROXYMAL NOCTURNAL HEMOGLOBINURIA

I. Bogdanik, H. Pyl, B. Żupańska

Institute of Hematology and Blood Transfusion, Warsaw

Paroxymal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is a rare disease characterised by the deficiency of proteins bound to cell membrane by glycosylphosphatidyl-inositol (GPI) anchor. Absolute or partial deficiency of CD59 (membrane inhibitor of reactive haemolysis – MIRL) and CD55 (decay accelerating factor – DAF) results in the abnormal sensitivity of red cells to the lytic action of complement, not only of erythrocytes but also of other peripheral cells. Clinical manifestations are not limited to anemia but also venous thrombosis or diminished hemopoiesis may be observed.

Red cells of 80 patients bearing hemolytic anaemia of unknown origin were investigated using monoclonal anti CD55 and anti CD59 Ab in the indirect immunofluorescence test with goat anti mouse Ig reagent. Results were evaluated in ORTHO Cytoron/Absolute apparatus and compared with the results obtained by routinely performed acid hemolysis test (Ham test) and sucrose lysis test. In most cases granulocytes were also investigated using anti-CD55, anti-CD59 and anti-CD67 Moabs.

In 11 patients PNH was diagnosed. Flow cytometry appeared to be more specific, more quantitative and more sensitive than the test based on complement dependent lysis in the diagnosis of PNH. The deficiency of GPU anchored proteins was more pronounced on granulocytes than on red cells.

3. APPLICATION OF FLOW CYTOMETRY TO QUANTITATIVE AND QUALITATIVE ASSESSMENT OF HEMOPOETIC CELLS PRESENT IN UMBILICAL CORD BLOOD

Ryszard Cesarz¹, Eugeniusz Machaj², Barbara Strumiłowska-Braun³,
Tomasz Oldak³, Ewa Krawczyk³, Andrzej Staszewski¹, Zygmunt Pojda^{2,3}

Dept. of Obstetrics & Gynecology, Military Medical School (CSK WAM)¹, Dept. of Radiation Hematology WIHiE², Dept. of Experimental Hematology, Centre of Oncology³, Warsaw

Percentage and absolute values of early hemopoetic cells (CD34⁺) were evaluated in randomly received samples of umbilical cord blood. Criteria qualifying blood sample to the examination were as follows: volume >60 ml, cell viability >95% and the time period from collection of blood not exceeding 5 hrs. Isolated mononuclear cells were cultured in a clonal system *in vitro* in semisolid media and a number of hemopoetic precursors was determined including GM-CSF, BFU-E and Mix CFC. A significant correlation was found between the number of CD34⁺ cells, total mononuclear cell count, number of GM-CSFs and a placental weight.

4. OPTIONS OF TRANSFER INTO IBM PC COMPATIBLES AND OF SOFTWARE ANALYSIS OF FILES CREATED IN EPICS®C COULTER FLOW CYTOMETER

Tomasz Chodnik

Dept. of Histology and Immunology, Medical University of Gdańsk

Flow cytometers EPICS C and EPICS CS, in spite of fact, that they were produced in the 1980ties, are still in use. They have many advantages, also as compared to contemporary flow cytometers. They make possible stable sorting. Their Autoclone® appliance makes possible sorting and deposition of 1–10 sorted cells into 24, 60 and 96-well trays. The Biohazard appliance makes possible an operation of cytometer without generating potentially infectious aerosol. The whole system is relatively cheap and easy to operate. Cytometers are connected with computers equipped with 16-bit processor Intel 8086, 512 kB RAM, 32 kB graphic memory, iRMX86™ operating system and application software package EPICS C. The basic magnetic memory storage provides 8", 1 MB floppy discs, supported by hard disc drive up to 40 MB. A major disadvantage of the system is the difficulty of data transfer to IBM PC or Apple compatible computers for off-line analysis on contemporary software, necessary in DNA ploidy analysis for example. The computers integrated in EPICS®C and EPICS®CS were supposed to cooperate with long forgotten Easy 88 Coulter off-line analysis computers via standard RCS232C-compatible serial port. The same port makes possible exporting some types of data files from EPICS C to IBM PC compatibles. To accomplish this:

1) The computers EPICS C and IBM PC were connected with non-standard cable (which also serves for the communication of flow system with Seikosha® printer.

2) The RSC232C port was formatted during start-up of the EPICS C

3) In the PC, a program for handling of serial port in the phone modem communication mode (BITCOM© Bit Software) was executed.

4) The command of sending of files from EPICS C was executed („Transmit”, an option of EPICS C software).

5) The files transferred to PC were given the name and extension proper for MS-DOS.

6) Optionally: the resulting ASCII files were transformed into format proper for the analysis software.

7) Analysis of data files.

We have successfully used this procedure for histogram file transfer from EPICS C to MultiCycle® (Phoenix Flow System, USA). In the case of MultiCycle the stage 6 is not necessary, as the program can read EPICS C ASCII output.

The examples of transferred and analysed files and descriptions of the necessary software were presented. The other potential ways of communicating the EPICS C with IBM PC compatibles were described.

5. COMPARISON OF RELATIVE RADIOSENSITIVITY OF SUBPOPULATIONS OF T MEMORY AND NAIVE LYMPHOCYTES IN CERVICAL CANCER PATIENTS DURING RADIOTHERAPY

Tomasz Chodnik¹, Rafał Dziaduszek², Jolanta Myśliwska¹, Andrzej Myśliwski¹

¹Department of Histology and Immunology, Medical University of Gdańsk,

²Oncology and Radiotherapy Clinic, Medical University of Gdańsk

The effects of local irradiation with high (over 10 Gy) doses of radiation resemble in quality the influence of general irradiation, but are less pronounced and do not deprive patients of important part of immune defense. The mature organisms of irradiated patients have populations of T lymphocytes in high degree independent from the thymus function, as they do not depend on thymocytes for T cell regeneration.

In order to measure the influence of radiotherapy on the peripheral blood populations, 58 patients in various stages of radiotherapy were examined, and compared with 13 healthy, not irradiated persons. The percentage, and absolute count of CD4⁺ CD45RA⁺ cells (TH naive lymphocytes), CD4⁺ CD45RO⁺ (TH memory lymphocytes), CD8⁺ CD45RA⁺ (Tc naive lymphocytes) CD8⁺ CD45RO⁺ (Tc memory lymphocytes) were measured by flow cytometry (EPICS CS or EPICS XL Coulter). Absolute count measurements were verified with standard hematological counter.

We found out that the decrease in absolute count of all measured subpopulations was seen from the beginning of radiotherapy. The decrease deepened with the continuation of the therapy, but reached its lowest values before the end of the therapy. Further irradiation did not cause statistically important changes of absolute counts of populations measured. The percentage of memory and naive cells within the T lymphocytes population behave differently, i.e. the percentages of T helper memory lymphocytes and to lesser degree, T cytotoxic memory cells increased with the progress of the therapy and with total dose received, whereas the percentage of T cytotoxic naive and to lesser degree, T helper naive cells decreased respectively. The changes, in context of differences of individual irradiation tolerance, were characterized by pronounced variability. They may be connected with different direct reaction of aforementioned cells to irradiation, and would reflect faster turnover of naive subpopulations than of memory cells. It is also possible that the differences reflect indirect cooperation with other cells *in vivo*.

6. UTILITY OF FLOW CYTOMETRY FOR THE EVALUATION OF BCL-2 EXPRESSION IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES AND BONE MARROW CELLS

Joanna Czuwara¹, Jolanta Rybczyńska², Lidia Rudnicka¹, Hanna Gazda³, Maria Błaszczyk¹, Maria Wąsik²

¹Dept. of Skin Diseases, ²Dept. of Laboratory Diagnostics and Clinical Immunology of Developmental Age, ³Chair and Dept. of Pediatrics Hematology and Oncology, Medical School, Warsaw

Bcl-2 is one of the major proteins responsible for the suppression of apoptosis. Increased expression of bcl-2 in leukemic cells delays programmed cell death and confers resistance to anticancer drugs. In autoimmune connective tissue diseases, such as scleroderma, bcl-2 seems to decrease apoptosis of abnormally activated lymphocytes. Thus, evaluation of bcl-2 expression in cells is thought to be of pathogenic and clinical significance.

The aim of the study was to assess the utility of flow cytometry for the evaluation of bcl-2 expression in peripheral blood lymphocytes and bone marrow cells.

The study was performed with the use of peripheral blood mononuclear cells from patients with scleroderma and healthy donors. A second set of experiments was performed with samples of bone marrow aspirated cells from children with freshly diagnosed acute lymphoblastic leukemia, during therapy and remission.

All samples were analysed on Coulter EPICS XL flow cytometer with the use of monoclonal antibodies against bcl-2 conjugated with FITC and anti-CD4 or anti-CD8 conjugated with RPE.

The results showed that in scleroderma the percentage of bcl-2 positive CD4⁺ cells ranged from 89 to 100 and bcl-2 positive CD8⁺ cells from 93 to 100. In healthy donors the numbers were 86 to 99 and 93 to 100, respectively. The expression of bcl-2, shown as a mean x channel revealed increased expression of bcl-2 in scleroderma cells. The values in scleroderma were 6.1 and 7.3 in CD4⁺ and CD8⁺ respectively in comparison with 5.02 and 5.08 in healthy controls.

There was no significant differences in percentage of bcl-2 positive cells between bone marrow aspirates from children with recently diagnosed cALL and cALL in remission. In bone marrow aspirates obtained from children with APL during treatment, bcl-2 positive cells were not detected.

Our results indicate that the evaluation of percentage of bcl-2-positive cells in peripheral blood lymphocytes is of limited value due to the fact that almost all CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes express bcl-2 in healthy individuals. The lack of significant differences in percentage of bcl-2-positive bone marrow cells between active and cALL during remission shows that this test is inadequate for monitoring of disease activity. It seems that the assessment of antigen expression with the use of the mean channel X might be of some practical value if adequate controls would be performed concurrently with the sample of interes.

7. UP-REGULATED EXPRESSION OF LFA-1 β (CD18) ADHESION MOLECULES ON PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES IN ACUTE STAGE OF ISCHEMIC BRAIN STROKE

U. Fiszer¹, G. Korczak-Kowalska², W. Palasik¹, A. Górski², A. Członkowska¹

¹Institute of Psychiatry and Neurology and ²Institute of Transplantology, Medical School, Warsaw

There is a growing interest in the role of leukocytes in brain ischemia with a particular attention to cell adhesion molecules (CAM) in pathophysiology of this phenomenon.

In the current study we examined the expression of ICAM-1 (CD54), LFA-1 α (CD11a), LFA-1 β (CD18) and Mac-1 (CD11b) adhesion molecules on peripheral blood leukocytes of 20 patients suffering from ischemic stroke and in the control group of patients of respective age but with other nonvascular diseases of the nervous system. The study was carried out by means of flow cytometry, using FACSort (Becton Dickinson) apparatus. Expression of CAM was determined as a mean fluorescence value of cells. Out of the CAM examined LFA-1 β (CD18) expression was found heightened on granulocytes and lymphocytes in the patients with acute stage of their disease as compared to control group, although at day 7 and day 30 after stroke there was no difference in the expression of examined molecules among two groups tested.

Results of this study confirm a possibility of the application of antiadhesive therapy in the treatment of acute episode of brain ischemia. It has been proven that activated leukocytes may play a role in the disturbances of vascular blood flow. It leads to the enlargement of necrosis zone and of the area of insufficient blood supply.

8. ESTIMATION OF DNA CONTENT IN PROSTATE CARCINOMA BY FLOW CYTOMETRY – PRELIMINARY STUDY

A. Galisz¹, R. Rutkowski², C. Ramlau¹

¹Dept. of Oncology, ²Div. of Cellular Immunology, University of Medical Sciences, Poznań

Measurement of DNA content by flow cytometry in prostate carcinoma may be regarded as a supplementary regimen to routine histology and may play a role as a sensitivity marker of conservative therapy.

Studies were performed on tissues sampled from tumors of patients ($n=25$) undergoing transurethral resection in the Dept. of Urology, Poznań University of Medical Sciences. Samples for flow cytometry were prepared using own modification of Hedley's method. Cytoron Absolute Ortho cytometer was used for the measurement of DNA content and ModFit software was applied for analysis of histograms.

Forty eight % of tumors were aneuploid. G1 cancers constituted 24%, G2 – 56% and G3 – 20% in analysed samples. The percentage of tumors with abnormal DNA content was in G1 – 50%, G2 – 56% and G3 – 20% (as G3 five cases were classified only). Further investigations are planned to enlarge the group under study.

9. MURINE SMALLPOX: PHENOTYPIC DETERMINATION OF IMMUNOLOGICALLY COMPETENT CELLS IN MOUSE CONJUNCTIVA

M. Gieryńska¹, J. Kawiak², I. Spohr¹, A. Popis¹, MG. Niemiattowski¹

¹Dept. of Immunology, Chair of Microbiology and Immunology, Veterinary Faculty SGGW, ²Dept. of Clinical Cytology CMKP, Warsaw

Viral diseases pose a severe problem for people and animals. Their pathomechanism is only partly understood. Murine smallpox induced by ectromelia virus (EV) constitutes an excellent model allowing for the cognition of mechanism of viral conjunctivitis in terms of natural infection.

The aim of our study was the determination of a profile of inflammatory cells [T lymphocytes (CD4⁺, CD8⁺, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$), makrophages (M ϕ) and dendritic cells (DC)] in the

conjunctiva of EV infected mice. In the current study 6–8 week old BALB/c (H-2^d) mice were used, infected by an injection into foot of Moscow EV strain and uninfected control animals. After 10, 14, 17 and 21 days after infection their conjunctivae were collected and single cell suspensions were prepared. Cell profile, following the reaction with fluorochrome labelled monoclonal antibodies (anti CD4: FITC, anti CD8:RPE, anti TCR $\alpha\beta$:FITC, anti TCR $\gamma\delta$:RPE, anti MAC-1:FITC, anti DC rhodamine) was evaluated by flow cytometry.

In a peak of the disease (14–17 days after infection) among conjunctival cells there were 11.41% T lymphocytes (4.81% of CD4⁺ and 6.6% of CD8⁺), 8.18% $\alpha\beta$ ⁺ and $\gamma\delta$ ⁺ (7.5% $\alpha\beta$ and 1.14% $\gamma\delta$), 6.37% macrophages and 2% of DC. Preliminary results indicate a dominance of CD4 $\alpha\beta$ ⁺ in a peak of the disease.

10. DNA PLOIDY, ACTIVATION AND PROLIFERATION OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH RECURRENT APHTAE

R. Górska¹, W. Gliński², J. Dwilewicz-Trojaczek³, J. Skierski⁴, U. Dybowska³

¹Dept. of Oral Mucosa and Periodontal Diseases, ²Dept. of Skin Diseases, ³Dept. of Internal Medicine and Hematology, Medical School, ⁴Laboratory of Flow Cytometry, Drug Institute, Warsaw

DNA ploidy, activation status and cell proliferation was examined in 17 patients with recurrent aphtae. Patients were in the age ranging from 4 to 62 yrs (mediana 26 yrs). In 9 patients the disease took severe course, in 8 – relatively mild. In the patients with severe disease the percentage of CD25⁺ cells was higher (75%) as compared to mild one (3.7%) p. < 0.05. One hundred % of lymphocytes of patients with recurrent aphtae were in G0/G1 of cell cycle (non-proliferating cells). Assessment of DNA ploidy of lymphocytes has shown normal DNA content in 16 patients and hyperploidy in one patient with diagnosed anemia.

11. PHENOTYPE OF BALF LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH NON-SMALL LUNG CANCER AND HEALTHY SMOKING PERSONS

G. Hoser¹, J. Domagala-Kulawik², D. Wasilewska¹, W. Drozdz², J. Kawiak¹

¹Dept. of Clinical Cytology, Medical Centre for Postgraduate Education, ²Dept. of Pulmonology, Medical School, Warsaw

Lung cancer is a leading cause of mortality in Poland, in both men and women. Monitoring of early signs of cancer in persons of high cancer risk may help in early diagnosis and in the improvement of treatment results. The first step to reach these goals may be a better knowledge of changes within immunological system of cancer patients.

We examined cells of bronchoalveolar lavage (BALF) of 14 smoking patients with non-small lung carcinoma and compared results to BALF cells of healthy smoking volunteers. Higherpercentage of neutrophils was noted in BALF's from unoccupied part of cancerous lung as compared with BALF of healthy persons. The higher percentage of CD8⁺ T lymphocytes, HLA-DR⁺T cells (activated) and NK cells was observed in BALF of cancer patients. CD4/CD8 ratio was lower than 1.0 in both, ill and healthy smoking persons.

12. INFLUENCE OF p53 GENE KNOCKOUT ON MOUSE LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN PERIPHERAL BLOOD AND LYMPHATIC ORGANS AFTER 5-FLUOROURACIL TREATMENT

G. Hoser¹, J. Kawiak¹, M. Kawalec¹, B. Miks¹, T. Skórski²

¹Dept. of Clinical Cytology, Medical Centre of Postgraduate Education, Warsaw and ²The Jefferson University, Philadelphia, USA

In response to DNA damage, p53 protein accumulates in the cell nucleus causing cells to undergo DNA repair or apoptosis. Survival of lymphoid cells is regulated by apoptosis as well. We compared lymphocyte phenotypes of cells from peripheral blood and from lymphatic organs in homozygotic and heterozygotic p53 knockout mice. The 5-fluorouracil treatment was aimed to induce apoptosis in mice. There were observed changes in thymocyte subsets in p53 gene knockout homozygotic animals. In the lymph nodes an increase of B cells was noted in knockout mice, however no evident lymphocyte phenotype differences were seen in the peripheral blood and in the spleen.

13. GLUTATHIONE MODULATIONS DO NOT INFLUENCE CURCUMIN INHIBITION OF APOPTOSIS

E. Jaruga¹, A. Żmijewska-Bielak², E. Sikora², J. Skierski³, E. Radziszewska², K. Piwocka² and G. Bartosz¹

¹Department of Molecular Biophysics, University of Łódź, ²Department of Cellular Biochemistry, Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, ³Flow Cytometry Laboratory, Drug Institute, Warsaw

Thiol antioxidants seem to play a key role in redox regulation of cell death. Apoptotic cells were reported to lose GSH independently of the inducing stimulus. On the other hand, preservation of intracellular glutathione level was found to be correlated with prevention of oxidative stress in thymocytes and with a reduction in apoptotic DNA fragmentation.

Since curcumin, a natural yellow dye of antioxidant and scavenging properties, was shown to block dexamethasone-induced apoptosis of rat thymocytes, this antiapoptotic effect has been studied in relation to glutathione content.

Curcumin was shown to prevent glutathione loss occurring in dexamethasone treated thymocytes, enhancing intracellular glutathione content at 8 hr to 192% of that of non-treated cells. A 60% increase of acid-soluble sulfhydryl groups was also observed.

In the presence of L-buthionine S,R-sulfoximine (inhibitor of glutathione synthesis) intracellular glutathione content of thymocytes treated with dexamethasone and curcumin fell to 31% and acid-soluble sulfhydryl groups level to 23% of control after 8 hr.

Unexpectedly, electrophoretic and flow cytometric studies of DNA fragmentation demonstrated that apoptosis did not occur even after 20 hrs of incubation, while control thymocytes and thymocytes treated with BSO showed apoptosis at a level corresponding to spontaneous apoptosis.

These results suggest that an increase of glutathione level caused by curcumin is not directly involved in the antiapoptotic action of curcumin.

14. EXPRESSION OF THE ADHESION MOLECULES IN PLASMA CELL LEUKEMIA

J. Kopeć-Szłęzak, M. Kraj, R. Pogód, A. Gajewska, U. Sokółowska

Institute of Hematology and Blood Transfusion, Warsaw

In this study the expression of cell adhesion molecules (CAM): CD11a/CD18, VLA-4 integrins, ICAM and CD44 on lymphoid cells in plasma cell leukemia was studied in comparison to that in multiple myeloma and B-CLL leukemia. The blood and bone marrow of 37 patients and 10 healthy donors (control group) were analysed by flow cytometry on Cyturon Absolute (Ortho) with monoclonal antibodies antisurface antigens: CD45, CD14, CD38, CD3, CD19, CD11a, CD18, CD49d, CD29, CD54 and CD44.

It has been found that the expression of CAM in plasma cell leukemia was different as compared to healthy donors as well as to analysed patients with multiple myeloma and B-CLL. In plasma cell leukemia a significant increase of the expression of CD54 and a decrease of LFA-1 molecule was noted, in contrast to that in multiple myeloma and healthy donors. The type of LFA-1 change (a low expression) was similar to that in B-CLL. The expression of CD44 (homing receptor) on blood lymphoid cells in plasma cell leukemia was lower than that in multiple myeloma and in control group. The VLA-4 molecule cell expression did not differ significantly within groups tested.

15. EXAMINATION OF GOAT LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS BY FLOW CYTOMETRY

Włodzimierz Kluciński¹, Anna Winnicka¹, Jerzy Kawiak², Grażyna Hoser², Barbara Miks², Zofia Ryniewicz³, Robert Bańkowski¹, Ewa Sitarska¹, Jacek Sikora¹

¹Department of Internal Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Agricultural University, Warsaw, ²Center for Postgraduate Medical Education, Warsaw, ³Institute of Genetics and Animal Growth, Polish Academy of Sciences, Jastrzębiec

Flow cytometry is one of the most modern methods of qualitative and quantitative evaluation of cells, eg. blood cells. Different cell populations are analysed separately by „leucogate” being distinguished by their scatter (forward and side) profiles.

The aim of this study was to establish reference values of lymphocyte subpopulations in goats by FACS analysis. Investigations were done on 11 goats aged one day to 3 months. Whole blood samples were analysed. Populations of leukocytes were determined with a set of specific monoclonal antibodies (produced by VMDR Inc. Pullman, USA) against GoCD45 (BAGB20A), Go CD14 (DH59B), GoCD2 (MUC2A), GoCD19 (BAQ44A), GoCD4 (GC50AI), GoCD8 (CACT80A), Go „null” WCI - N2 (BAQ4A) labelled with FITC and PE (Medac, Hamburg). Erythrocytes were lysed with FACS lysing solution (Becton Dickinson). Data acquisition and analysis were done with SimulSet in FACStrak (Becton Dickinson) and in addition, analysed with the PC-Lysis and WinMDI program.

Obtained results have been presented as a mean of percentage with standard deviation. Statistical differences between the results obtained in goats of different ages were observed. The presented study have shown that the above mentioned method can be useful in the phenotyping of animal cells.

16. PROPORTIONAL DIFFERENCES IN SUBPOPULATIONS OF LYMPHOCYTES IN GOATS AFTER EXPERIMENTAL IMMUNOMODULATION

Włodzimierz Kluciński¹, Anna Winnicka¹, Jerzy Kawiak², Grażyna Hoser², Barbara Miks², Zofia Ryniewicz³, Robert Bańkowski¹, Ewa Sitarska¹, Jacek Sikora¹

¹ Department of Internal Disease, Faculty of Veterinary Medicine, Agricultural University, Warsaw, ²Center for Postgraduate Medical Education, Warsaw,

³ Institute of Genetics and Animal Growth, Polish Academy of Sciences, Jastrzębiec

Among many factors causing immunosuppression in animals, glucocorticoids form a group of pharmacological agents that act as anti-inflammatory and at the same time suppress activity of the immune system. We determined the proportion of lymphocyte subpopulations in clinically healthy goats and later investigated the effect of a large corticosteroid dose on the same lymphocyte subpopulations. Immunostimulation was used as preventive regimen. Inve-

stigations were done on 4 goats aged 2 years. The proportion of lymphocyte subpopulations was determined in the first 5 days as well as on 10th day. Animals were immunosuppressed by Dexafort (3 ml / animal / day) over a period of two days and immunostimulated by Baypamun (1 ml/animal/day) over a period of two days before and two days after Dexafort. Lymphocyte subpopulations (GoCD2, GoCD4, GoCD8, GoCD19 and „null” WCI-N2) were analyzed by flow cytometry (FACStrak, Becton Dickinson) of lysed whole blood samples using monoclonal antibodies (MUC2A, GC50AI, CACT80C, BAQ44A, BAQ4A). Direct labelling with FITC and indirect labelling using the Avidin-Biotin system as well as conjugate monoclonal antibody with FITC or PE (Medac) were also used. Data acquisition and analysis were done with SimulSet nad PC-Lysis software.

Cytometric analysis with selected monoclonal antibodies revealed the proportions of lymphocyte subpopulations in healthy goats. Experimental administration of Dexafort and Baypamun for 2 consecutive days caused a significant alteration of the most lymphocyte subpopulations.

17. FLOW CYTOMETRY (FC) AND THREE-COLOR IMMUNOSTAINING IN ALVEOLAR LYMPHOCYTE PHENOTYPING. PROBLEM OF REFERENCE VALUES

P. Kopiński¹, B. Lackowska², J. Kawiak³, M. Pirożyński⁴

¹Dept. of Clinical Pathophysiology CM UJ, Cracow, ²Centre for Oncology Cracow,

³Dept. of Clinical Cytology CMKP, Warsaw, ⁴Institute for Tuberculosis and Lung Diseases, Warsaw

Bronchoalveolar lavage lymphocyte (L-BAL) phenotyping presents technical difficulties due to a high proportion of nonlymphoid cells, other contamination and – in some cases – low percentage of alveolar lymphocytes, resulting in non-established reference values for L-BAL.

We compared two- and three-color L-BAL direct immunostaining in flow cytometry (FC) analysis of bronchoalveolar lavage (BAL) performed in 23 healthy individuals (incl. 10 smokers) and 7 sarcoidosis patients with lymphocytic alveolitis.

The BAL reactive cell differential count in FC based on three-color staining (monoclonal antibodies: CD15 FITC/CD14 PE/CD45 PECy5). Alveolar lymphocytes in FC were defined by CD45/SSC gating. Quality control was performed using BD SimulTest IMK Plus criteria (for PBL) modified by the authors. Alkaline phosphatase staining served as a parallel method. The immunocytological procedure was supplemented by routine BAL cytology.

In both FC methods similar results were obtained, since BAL contained more than 5% of lymphocytes. L-BAL percentage was remarkably higher in FC than in routine cytology. Increased percentage of CD3+ cells with only a few L-BAL expressing NK (CD3+ CD16 or CD56+), T suppressor (CD8+ CD11b+) or B cell phenotype, as compared with PBL, was found in all examined subjects. No significant difference was found in L-BAL phenotypes as compared to the results obtained in FC and alkaline phosphatase method.

We conclude BAL two-color immunostaining to be sufficient for lymphocyte analysis, except of poor-lymphocyte samples (in healthy smokers three-color method should be considered). Three-color phenotyping seems to be useful in fast BAL reactive cell differential count. T cells (sensitized memory CD4+ or cytotoxic CD8+ cells) are in our results the dominating subset of BAL reactive lymphocytes. Our results may serve as L-BAL phenotype normal values in healthy subjects. We suggest that new reference values should be established for L-BAL subsets based on a large number of examined cases.

18. ANALYSIS OF THE CHANGES IN COMPOSITION OF LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN PERIPHERAL BLOOD AND BLOOD FROM SPLEEN VEIN IN PATIENTS UNDERGOING SPLENECTOMY

Artur Kostrzewa¹, Jerzy Skrobisz², Krzysztof Wiktorowicz¹

¹Div. of Clinical Immunology and Allergology, K. Marcinkowski University of Medical Sciences, ²Surgery Dept., Regional Hospital, Poznań

Spleen has the lymphopoietic abilities and it plays a role of lymphocytes storage place. A part of stored leukocytes belongs to circulating lymphocytes, which in the case of increased requirement can be sent off to circulation. In some stages an enlargement (hypersplenism) due to various reasons is observed and may lead to organ dysfunction, leading to excessive destruction of erythrocytes and platelets. In those cases the removal of spleen (splenectomy) is often advised. Spleen rupture due to an injury is also an indication for splenectomy. The latter causes transient changes of some immunological parameters in peripheral blood.

The aim of this study was to estimate the influence of splenectomy on quantitative and qualitative changes in lymphocytes' subpopulations in peripheral blood and blood from splenic vein.

The following material was used in the study:

- * peripheral blood cells from patients undergoing splenectomy,
- * blood cells from splenic vein, taken at the time of surgical intervention,
- * peripheral blood cells from the same patients, taken on day 7 after splenectomy.

The measurement of absolute and relative number of lymphocytes' subpopulations was performed on flow cytometer (Cytoron Absolute, Ortho), using Immuno Count 2 software and panel of antibodies (TRIO) allowing to measure T lymphocytes (CD3⁺), B lymphocytes (CD19⁺), T helper cells (CD4⁺), T cytotoxic/suppressor lymphocytes (CD8⁺) and NK cells (CD16⁺).

Samples of peripheral blood were incubated with monoclonal antibodies in the darkness at room temperature. After incubation samples were treated with Ortho-mune Lysing reagent and measured in 3-fluorescence color using flow cytometer.

As compared to peripheral blood, spleen blood showed:

- * considerable increase of the number of monocytes, granulocytes and relatively greatest increase of lymphocytes;
- * increase of absolute and relative number of B lymphocytes (CD19⁺) and NK cells (CD16⁺);
- * increase of absolute number of T lymphocytes (CD3⁺), T helper lymphocytes (CD4⁺), cytotoxic-suppressor T lymphocytes (CD8⁺);
- * decrease of relative number of T lymphocytes (CD3⁺), T helper lymphocytes (CD4⁺), cytotoxic-suppressor T lymphocytes (CD8⁺);
- * increase of CD4/CD8 ratio.

At the 7th day after splenectomy in peripheral blood as compared to peripheral blood before splenectomy following alterations were observed:

- * normalization in absolute and relative number of T lymphocytes (CD3⁺);
- * increase of absolute and relative number of cytotoxic-suppressor T lymphocytes (CD8⁺) and NK cells;
- * decrease of absolute and relative number of B lymphocytes;
- * decrease of CD4/CD8 ratio.

19. IDENTIFICATION OF APOPTOSIS IN CT6 AND U937 CELLS

L. Krasińska, J. Bigda

Department of Histology and Immunology, Medical University of Gdańsk

In the presented study two cell lines were used as a model for a study on regulation of apoptosis. CT6 cells represent an IL-2 dependent line of cytotoxic T cells. Interleukin 2 is the necessary factor for their proliferation and its removal from the medium results in cell death. U937 cells represent a human histiocytic lymphoma line sensitive to tumor necrosis factor (TNF). These cells in response to TNF added to the medium manifest apoptotic cell death. To estimate the rate of apoptosis in the cell lines we used both simple and nonspecific methods, based on light and fluorescent microscopy to evaluate morphology of the cells and MTT assay to estimate viability of the cell cultures. Degradation of genomic DNA was estimated after isolation of total DNA and electrophoresis on 2% agarose gel stained with ethidium bromide. Cell cycle distribution was estimated by flow cytometry after propidium iodide staining. Methods employed in this study enabled us to identify apoptosis in the two presented cell lines. It should allow us to start the studies on regulation of apoptosis in CT6 and U937 cells.

20. QUANTITATIVE AND QUALITATIVE ASSESSMENT OF HUMAN CORD BLOOD CELLS TRANSPLANTED TO MICE

Ewa Krawczyk¹, Tomasz Otdak¹, Eugeniusz Machaj², Barbara Strumiłowska-Braun¹, Zygmunt Pojda^{1,2}

¹Dept. of Radiation Hematology WIHiE, ²Dept. of Experimental Hematology, Centre of Oncology Warsaw

Isolated mononuclear cells or isolated CD34⁺ cells from human umbilical cord blood were transplanted to mice previously letally irradiated (9.5 G Co). After 2, 4, 6, 8, 10, and 24 days after transplant the number and phenotype of cells (CD34⁺, CD45⁺) was examined in hemopoetic organs and blood of treated mice. The relationship was tested between the tempo of elimination of cord blood cells and immunosuppression methods used. In addition the influence of other assisting agents (exogenous human cytokines) was studied on quantitative and qualitative alterations in the subsets of transplanted early human hemopoetic cells.

21. DECREASED MEMBRANE PHOSPHOLIPID PACKING AND DECREASED CELL SIZE IN APOPTOSIS OF NEUTROPHILS

Iwona Malinowska¹, Elżbieta Górka², Maria Wąsik², Roma Rokicka-Milewska¹

¹Dept. of Pediatrics, Hematology and Oncology, ²Dept. of Lab. Diagn & Clinical Immunology, Medical School, Warsaw

Apoptosis can involve various changes in the cell membrane. In particular models exposure of phosphatidylserine on the outer membrane leaflet can be detected by increasing binding of lipophilic dye merocyanine (MC540) and can be detected by flow cytometry. We examined *in vitro* membrane changes and size of neutrophils undergoing spontaneous and accelerated by cycloheximide (CHX) apoptosis.

After 24 hours of incubation we observed by flow cytometry appearance of second population of cells with increased binding of MC540 and decreased forward scatter.

Incubation of cells with CHX caused accelerated appearance of similar changes in neutrophils undergoing programmed cell death and those changes were regulated by CHX.

22. DETECTION OF PLATELET ANTIGENS AND ANTIBODIES USING FLOW CYTOMETRY

K. Maślanka, A. Gronkowska, M. Uhrynowska, E. Brojer, K. Drzewek, B. Żupańska
Institute of Haematology and Blood Transfusion, Warsaw

Platelet specific antibodies play an important role in the destruction of platelets in such diseases as neonatal alloimmune thrombocytopenia, posttransfusion purpura, refractoriness to platelet transfusion and autoimmune thrombocytopenia. Methods for the detection of platelet antigens and antibodies are therefore very important for proper diagnosis.

Platelet immunofluorescence test (PIFT) evaluated by routine light microscopy has been used by us for last 16 years, recently adjusted for the flow cytometry (PIFT-FC) and used for the detection of human platelet antigens (HPA) and antibodies. This test appeared to be a very useful for the detection of platelet allo- and autoantibodies mainly due to an easy, objective and semiquantitative evaluation of the results and a possibility of storing data for later comparison. The PIFT-FC was however only marginally more sensitive for the antibody detection than that read by microscopy.

Similarly like the PIFT, the PIFT-FC does not occasionally detect anti-HPA-S antibodies (due to a low density of appropriate antigen on the platelet) and does not distinguish between anti-HPA and HLA antibodies (the latter react very often also with platelets). The PIFT-FC appeared also to be useful for HPA phenotyping. It has however been shown that it cannot be used for distinguishing HPA-I homo- and heterozygous individuals using only anti-HPA-Ia serum (anti-HPA-Ib is a very rare one). Phenotyping results obtained by the PIFT-FC correlated very well with genotyping using PCR-Sequence Specific Primers (PCR-SSP) in all investigated persons except in the patient with Glanzmann's thrombasthenia (GT). In such patients in spite of the gene coding HPA-Ia, the lack of the product of this gene in PIFT-FC was observed, hence the phenotyping of platelets in patients with GT is of practical diagnostic value.

23. FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF APOPTOTIC BONE MARROW CELLS USING PROPIDIUM IODIDE

Lidia Mazur, Agnieszka Czyżewska, Michał Bochenek¹

Institute of Zoology, Jagiellonian University, ¹National Research Institute of Animal Reproduction, Cracow

DNA degradation is a biochemical hallmark of apoptotic cell death. Extensive DNA cleavage provides a basis for the development of the flow cytometric assays to identify apoptotic cells. One is based on extraction of low MW DNA prior to cell staining with propidium iodide. Fixation of cells in ethanol does not fully preserve the degraded DNA within apoptotic cells: this fraction of DNA leaks out during subsequent cell rinsing and staining. Extraction of the degraded DNA from apoptotic cells can be enhanced by addition of high molarity phosphate-citrate buffer to the rinsing solution. As a consequence, apoptotic cells contain reduced DNA content and can be recognized, following staining of cellular DNA, as cells with low DNA stainability („sub-G1” peak) less than that of G1 cells. The flow cytometric method can be used for a simultaneous determination of apoptosis and cell cycle analysis of non-apoptotic cells.

Apoptosis plays a fundamental regulatory role in homeostasis of the hemopoietic system. The modulation of the cell propensity to undergo apoptosis is dependent on different exogenous detrimental factors acting on normal cells e.g. ionizing radiation, chemotherapeutic

drugs. Using flow cytometric analysis of both, DNA degradation of apoptotic cells and cell cycle position of non-apoptotic ones, a possible modulatory effect of the aminothiols WR-2721 (S-2/3-aminopropylamino/ethyl phosphorothioic acid). Amifostine was assessed on the cytotoxicity of ionizing radiation and chemotherapeutic drugs in the mouse bone marrow.

24. FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN SELECTED VIRAL INFECTIONS

M. Pietruczuk, I. Kostecka, M. Dąbrowska

Dept. of Hematological Diagnostics, Medical School, Białystok

T lymphocytes are of primary importance in viral infections. T helper cells stimulate B cells to antibody production versus viral particles, while cytotoxic T cells destroy infected cells. Transformed T lymphocytes constitute cell population morphologically termed virocytes-mononuclears. Microscopical assessment of activated lymphocytes often rises doubts. This is particularly true in relation to infectious mononucleosis (IM) and mononucleosis-like syndromes belonging to self-resolving lymphoproliferations.

The aim of the current study was the cytometric evaluation of peripheral blood lymphocyte subsets in selected viral infections from the point of view of routine diagnostic utility. The study was carried out on lymphocytes from venous EDTA treated full blood, using Coulter procedure. Cytometric study was performed by direct immunofluorescence on EPICS XL (Coulter) flow cytometer, using anti - CD2, CD3, CD4, CD8, CD10/CD19, CD20, CD16, CD57 and CD25 monoclonal antibodies. Examined group consisted of 24 persons in the age 3–21 yrs. In 18 patients the diagnosis of IM, in 6 – of cytomegaly (CM) was established. The existence of viral infections was confirmed by serological tests.

In both groups of patients (IM and CM) the percentage of CD8⁺ T cells (52.5%, $p < 0.001$) was significantly higher, while the expression of CD4 antigen was decreased (23.8%, $p < 0.001$). CD2 and CD3 antigens were not altered (80% and 77% respectively). It was also true for CD16, CD57 and CD25 positive cells. In none examined cases CD10 antigen (CALLA) was found. There was also no differences in B cell antigen expression.

High CD8 antigen expression and the lack of CD10 antigen seem to be valuable markers in doubtful cases of infectious mononucleosis, particularly in children.

25. COMPARATIVE ANALYSIS OF UTILITY OF ROSETTE TEST, APAAP REACTION AND FLOW CYTOMETRY FOR DETERMINATION OF CD2 ANTIGEN

M. Pietruczuk, J. Osada, M. Dąbrowska

Dept. of Hematological Diagnostics, Medical School, Białystok

E rosette test with sheep RBC has been used for quantitation of T lymphocytes for years. It is known that mature T cells possess a receptor for these cells. Routine application of rosette test has many advocates (low cost, easy to perform) as well as adversaries (substantial reservations). The aim of undertaken study was a comparison of E rosette test to immunoenzymatic APAAP method and to flow cytometry for the evaluation of CD2 antigen. CD2, MW 50 kD is the receptor for SRBC and is responsible for cell adhesion.

The study was performed on isolated lymphocytes from venous EDTA treated blood of 40 healthy adult non-smokers in the age range 24–45 yrs. E rosette test, APAAP immunoenzymatic reaction (alkaline phosphatase-anti alkaline phosphatase complex) and flow cytometric determination (EPIC XL, Coulter) were carried out. Results were expressed in percent and

absolute values. At mean percentage of 30% lymphocytes, percentage of T cells was in E rosette test 56%, APAAP reaction 67%, flow cytometry 68%. At absolute lymphocyte count 1766 cells/ μ l absolute values for T lymphocytes were respectively 1059/ μ l, 1239/ μ l and 1241 cells/ μ l. Significantly higher percent values of CD2⁺ cells were found in APAAP and flow cytometric methods. There was no significant difference between APAAP and flow cytometry. Rosette test is apparently the least sensitive as compared to other methods used. This may lead to erroneous assessment of the immune system.

26. UV LIGHT AND CURCUMIN CAUSE DIFFERENT SYMPTOMS OF CELL DEATH IN HUMAN JURKAT CELLS

K. Piwocka, A. Bielak-Żniewska, J. Skierski, M. Jerka-Dziadosz, and E. Sikora*

Nencki Institute of Experimental Biology and *Flow Cytometry Laboratory, Drug Institute, Warsaw

UV has been shown to induce apoptosis in many cells. After UV irradiation of rat thymocytes and of Jurkat cells we observed typical symptoms of apoptosis such as internucleosomal DNA fragmentation, formation of subG1 fraction detected by flow cytometry analysis and morphological changes (shrinkage and formation of apoptotic bodies). When curcumin was added to the medium immediately after UV irradiation, inhibition of internucleosomal DNA fragmentation was observed. In Jurkat cells curcumin presented DNA fragmentation till six hours after cell exposure, in thymocytes even after 24 hours no DNA fragmentation was detected. Contrary to thymocytes, the prolongation of incubation of Jurkat cells with curcumin not only inhibited, but also induced cell death.

Nonetheless, manifestation in curcumin-treated Jurkat cells was different than in UV irradiated cells. Curcumin treated cells didn't show internucleosomal DNA fragmentation although the existence of a sub-G1 population was evidenced in these cells.

Morphology observed after Hoechst 33358 and PI staining of UV and curcumin treated cells, although changed in comparison with morphology of control cells, was not similar to each other. Contrary to fluorescence dyes, ultrastructural examination did not reveal any changes between curcumin and UV treated cells. We postulate therefore that curcumin inhibits cleaving DNA to internucleosomal fragments, but does not prevent cell death in Jurkat cells. Moreover, curcumin induces death of these cells with different symptoms than that due to UV light.

27. EXPRESSION OF INTRACELLULAR bcl-2 ONCOPROTEIN AND FAS (CD95) ANTIGEN ON PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES

Jacek Roliński¹, Paweł Krawczyk¹, Agata Surdacka¹, Anna Dmoszyńska², Ewa Wąsik², Piotr Pożarowski¹

¹Dept. of Clinical Immunology, and ²Dept. of Haematology, University School of Medicine, Lublin

Bcl-2 oncoprotein is widely expressed in peripheral blood B and T cells. The bcl-2 gene product has been shown to inhibit apoptosis. The recently identified Fas antigen, also known as APO-1 or Fas death factor is a cell surface molecule that can mediate apoptosis. Fas is mainly expressed in activated mature lymphocytes. Bcl-2 and Fas seem to be of particular significance in lymphocyte development and in the function of the immune system. They play a critical role in the regulation of apoptotic lymphocyte death in humans. We studied the expression of bcl-2 oncoprotein and Fas antigen in peripheral blood lymphocytes (PBLs) obtained from

healthy donors using flow cytometry. It helped us to better understand the molecular background of differences between the B and T lymphocyte subsets.

The cell surface CD3, CD4, CD8, CD19, CD45RO, CD56, CD95 antigens and the bcl-2 mitochondrial oncoprotein were determined on fresh isolated cells in each case.

They were fixed with paraformaldehyde and permeabilized with methanol for better immunodetection of the intracellular bcl-2 protein before incubation with FITC conjugated anti bcl-2 mouse monoclonal antibody. To determine the fluorescence intensity of bcl-2, the logarithmic fluorescence channel intensity was converted to arbitrary units based on the ImmunoCount 2.0 software. Wilcoxon's matched pairs test and MannWhitney U test were applied for statistical significance.

We found significant differences in bcl-2 expression between T and B and also between T and NK cells. T cells expressed a higher level of bcl-2 protein than B and NK cells. Expression of bcl-2 in CD4⁺ and in CD8⁺ cells was different - some donors have higher expression of CD4⁺ and some higher CD8⁺. Fas expression was weak on lymphocytes – only low detection of this antigen was possible on T cells. It was impossible to detect it on B and NK cells.

Our results show that bcl-2 expression depends on subpopulations of healthy donors PBL's. Various expression of these antigens could lead to differential elimination of these cells by apoptosis. It could be responsible for the inhibition of apoptosis or the accumulation of long lived lymphocytes.

28. DEVELOPMENTAL POTENTIAL AND KARYOTYPIC

CHARACTERIZATION OF BOVINE EMBRYOS DERIVED FROM IV M OOCYTES FERTILIZED WITH SPERMATOZOA STAINED FOR FLOW CYTOMETRY

Zdzisław Smorąg¹, Lucyna Kątska¹, Ewa Słota², Bożenna Ryńska²

¹Department of Animal Reproduction, ²Department of Immuno- and Cytogenetics, National Research Institute of Animal Production, Balice/Cracow

Spermatozoa for flow cytometry purposes are commonly stained with the vital dye Hoechst 33342. The aim of this study was to determine the effect of the fluorochrome Hoechst 33342 on the *in vitro* fertilization ability of frozen-thawed spermatozoa and developmental potential of embryos obtained. Moreover, the regularity of karyotype of the bovine blastocysts derived from IVM7IVF7IVC oocytes was analysed. In the experiment frozen semen of bulls was used. After thawing the sperm sample was analysed. In the experiment frozen semen of 4 bulls was used. After thawing the sperm sample was divided onto two portions of which one was stained with Hoechst 33342 (4 µg/ml) and the second served as a control. Then both samples were capacitated according to standard method and used for insemination of IVM bovine oocytes. After 20 to 22 h of fertilization zygotes were cultured *in vitro* for 8 to 10 days up to the hatched blastocyst stage. Some blastocysts derived from fertilization by both Hoechst-treated and control spermatozoa were investigated cytogenetically according to conventional techniques. The experiment showed differences in the ability to fertilization of stained, as compared to unstained control semen. These differences ($p < 0.01$) appeared only in the case of one bull and concerned the proportion of embryos developing up to blastocyst stage. It may reflect individual susceptibility of bull semen to staining procedure.

29. GRANULOCYTE ANTIGENS AND ANTIBODIES DETECTION USING FLOW CYTOMETRY

M. Uhrynowska, K. Maślanka, U. Podstawka, B. Żupańska

Institute of Haematology and Blood Transfusion, Warsaw

Antibodies reacting with granulocyte antigens can result in alloimmune neonatal granulocytopenia, transfusion-related lung injury and other posttransfusion non-haemolytic reactions, autoimmune granulocytopenia, drug-induced immune cytopenia.

The frequency of these disorders is probably underestimated due to the poor availability of human typing sera for granulocyte antigens and technical difficulties in obtaining non damaged cells for typing. The granulocyte immunofluorescence test (GIFT), which we have been using for the last 15 years, is still regarded as the best screening test for granulocyte antibodies and antigens. The GIFT does not, however, distinguish the granulocyte specific antibodies from anti-HLA antibodies and immune complexes without using other techniques which are also performed in our lab.

During last two years we have introduced flow cytometry (FC) for the evaluation of the results obtained in the GIFT. FC allows to be the GIFT less dependent on an observer experience, more objective and quantitative. However, false-positive fluorescence, mainly due to damaged cells (cytoplasmic fluorescence) is sometimes easier to distinguish in the microscope, which is usually not the case if we work with platelets. We shall present our experience in the diagnosis of alloimmune neonatal granulocytopenia using the GIFT-FC.

30. MIXED PHENOTYPE OF LYMPHOCYTES IN HYPERTROPHIC TONSILS

Maria Wąsik¹, Lidia Zawadzka-Głós², Jolanta Rybczyńska¹, Iwona Malinowska³, Mieczysław Chmielik²

¹Dept. of Lab. Diagnostic. & Clinical Immunology, ² Dept. of Pediatric Otorhinolaryngology and ³ Dept. of Pediatrics, Hematology and Oncology, School of Medicine, Warsaw

Waldeyer's ring, the lymphoid tissue localized at the entrance of the respiratory and gastrointestinal tracts is continuously exposed to stimulation and recurrent inflammatory reaction that may cause its hypertrophy and in consequence, create indications for tonsillotomy. In some cases after tonsillotomy the tonsils hypertrophy recurs. The aim of this study was to estimate a phenotype of lymphocytes isolated from tonsils tissue after the first and the secondary tonsillotomy.

Single cell suspensions were prepared from tonsils and cells were stained by dual color (FITC/RPE) monoclonal antibodies (DAKO) in the following combinations:

CD2/CD19, CD3/CD19, CD5/CD19, CD5/CD20 and CD4/CD8. The appropriate isotypic control was used. Cellular DNA was assessed by staining with propidium iodide. Data were collected and analyzed by a software on flow cytometer EPICS XL (Coulter). In 8 out of 10 analyzed tonsils the higher number of cells with expression of B than T antigens was found. In two cases, in tonsils from children after secondary tonsillotomy the percentage of CD3⁺ cells was higher than CD19⁺. In all cases the number of CD4⁺ cells was three times higher than CD8⁺. In 4 out of 10 tonsils the cells with the mixed phenotype as CD2⁺ /CD19⁺, CD3⁺ /CD19⁺ and CD4⁺ / CD8⁺ were found.

The percentage of these cells exceeded the percentage of cell doublets assessed by DNA

ploidy or by a microscope examination. This is a preliminary communication, the study is in progress. To make the final conclusions bigger population of patients should be tested.

31. LEVEL OF CD34⁺ CELLS IN PERIPHERAL BLOOD IN HEALTHY DONORS STIMULATED BY PHILGRASTIM (rhG-CSF)

J.M. Zaucha¹, W. Stanulewicz², W. Knopińska-Postuszny³, K. Hataburda¹, T.S. Chodnik², A. Myśliwski², A. Hellmann¹

¹Dept. of Hematology, ²Chair and Dept. of Histology and Immunology, ³Chair and Dept. of Clinical Biochemistry, Medical University of Gdańsk

The level of CD34⁺ cells in peripheral blood was monitored in 12 healthy donors stimulated by philgrastim in order to establish a day of the collection of hemopoetic cells from peripheral blood for allogeneic transplantation (PBSCT). RhG-CSF was administered every day in the evening, in the dose 10 µg/kg/day subcutaneously over 5 days. The level of CD34⁺ cells was evaluated every morning by flow cytometry. Peripheral EDTA blood was allowed to react with anti CD34 PE (Becton Dickinson). Normal mouse IgG PE (also BD) served as an isotype control. After 30 min incubation at 4⁰C erythrocytes were lysed by Q-prep® Coulter and afterwards samples were analysed in EPICS CS cytometer: the content of scattergram with gated lymphocytes FLS/L90⁰LS was forwarded to the scattergram L90⁰LS/LRFL (red fluorescence, logarithmic scale). Percentage of CD34⁺ cells was calculated as a difference of content of quadrant of positive cells and apparently positive from the analysis of the control sample.

At the same time total leukocytosis (WBC) in peripheral blood was monitored as well as the level of mononuclears (MNC) by means of Technicon 1 apparatus. It has been found that in all donors initial level of CD34⁺ cells was very low: mediana 0.32 × 10⁶/l (0.1–1.49). Marked rise of CD34⁺ cells up to mediana 22.6 × 10⁶/l (1.57–99.6) was observed almost in all donors starting from day 3 (60 hrs after first dose of rhG-CSF). Maximal values of CD34⁺: mediana 115.8 × 10⁶/l (13–328.2) was obtained in 8 donors at day 5, in others at day 4. In one donor maximal CD34⁺ level was low (13 × 10⁶/l) what was insufficient to perform transplantation. The rise of WBC in all donors was seen from day 1, while MNC from day 3. Maximal WBC values: mediana 53.5 × 10⁹/l (46.5–72.1) were found in 8 donors at day 5 and in 4 at day 4, while in one at day 6 (this donor received G-CSF over 6 days). Maximal MNC level – mediana 8.9 × 10⁹/l (4.7–11.43) was noted in 8 donors at day 4, in remaining at day 5. There was no correlation between values of WBC, MNC and CD34⁺ cells at the days of maximal increase of monitored parameters. The rise of WBC, MNC and CD34⁺ cells of donors stimulated the same dose of G-CSF varied, reaching maximal values at day 4 and 5. Low CD34⁺ level at day 3 may indicate ineffective cell mobilization and calls for an increase of rhG-CSF.

32. ELEVATED Bcl-2 ONCOPROTEIN IN L1210 LEUKEMIC CELLS EXPOSED TO OXIDATIVE STRESS

Wioletta Zimowska, T. Motyl, J. Skierski, Bożena Bałasińska, T. Płoszaj*

Dept. of Animal Physiology, Veterinary Faculty, Warsaw Agricultural University,

*Flow Cytometry Laboratory, Drug Institute, Warsaw

Bcl-2 is a 26 kD integral membrane protein that has been localized to intracellular sites of oxygen free radicals (OFR) generation such as mitochondria, endoplasmic reticulum and perinuclear membranes. Bcl-2 is the best known regulatory protein which inhibits apoptotic cell death induced by many diverse agents, including OFR.

The aim of this study was to explore the dose-, and time-dependent effects of hydrophilic peroxy radical initiator- 2,2' azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH) on apoptosis and expression of Bcl-2 in L1210 leukemic cells. A simultaneous flow cytometric analysis of Bcl-2 level (FITC-conjugated monoclonal anti-Bcl-2 antibodies, DAKO), apoptotic cell number and cell cycle phases (DAPI labeled DNA) was performed. To investigate the intensity of OFR generation in AAPH-treated cultures, flow cytometry with 6-carboxy-2'7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, di(acetoxymethyl ester)(CDCDHF-DA) as an oxidation-sensitive fluorescent probe was performed.

The progressive increase of intracellular OFR concentration, manifested by the rise of C-DCDHF-DA oxidation, was observed during 24 hrs cells exposure to AAPH. Analysis of cell viability by the use of trypan blue exclusion method revealed that AAPH reduced the ability of L1210 cells to multiply or to survive. AAPH increased the number of leukemic cells with typical features of apoptosis like: condensation of chromatin, pyknosis and fragmentation of nucleus, followed by secondary necrosis (H033342 and PI staining). A characteristic internucleosomal DNA cleavage, visualised as a DNA „ladder” consisting fragments, that are multiples of 180–200 bp, was also observed. The intensity of apoptosis was dependent on AAPH concentration, time of exposure, and the availability of growth factors and nutrients in extracellular environment (FCS concentration).

The novel observation was the increase of Bcl-2 level in L1210 leukemic cells surviving an oxidative stress. The expression of Bcl-2 protein significantly rised with increasing AAPH concentration, and a time of cell exposition to this oxidant. This phenomenon could be the result of: 1) negative selection of cells with the lowest expression of Bcl-2, being more susceptible to oxidative stress, 2) increased synthesis and/or decreased degradation of Bcl-2 protein as an adaptation to continuous OFR loading. In contrast to growth-promoting medium (10% FCS/RPMI), the maintenance medium (2% FCS/RPMI) did not cover cell requirements for progressive Bcl-2 increase at the highest AAPH concentration (2 mM), applied in this study. Several observations indicate that the increased Bcl-2 level in surviving L1210 leukemic cells exposed to oxidative stress is a symptom of their natural defence against cellular peroxidation of lipids and apoptosis.

33. LYMPHOCYTE ADHESION MOLECULES IN THE PROCESS OF RENAL ALLOGRAFT REJECTION

G. Korczak-Kowalska, P. Wierzbiicki, M. Durlik, J. Wygzał, D. Kłosowska, A. Górski
Transplantation Institute, Medical School, Warsaw

Graft infiltration involves several steps, including the attachment of leukocytes to the vascular endothelium, their migration within the graft, and their selective activation and local proliferation. The binding of lymphocytes to endothelial cells and, via subsequent transendothelial migration, to components of the ECM (extracellular matrix) leads to the engagement of several adhesion molecules including L-selectin, LFA-1, VLA2Z, VLA-3, VLA-4, VLA-5, VLA-6 and CD44.

In this study, we investigated the expression of VLA-2, VLA-3, VLA-4 and VLA-5 on T cells from peripheral blood from renal allograft recipients and VLA-2, VLA-3 on graft infiltrating T cells. Renal allograft recipients included patients with uneventful stable course as well as those with biopsy-proven acute and chronic rejection. Controls included healthy donors.

Immunofluorescence phenotyping was performed using a FACSort (Becton Dickinson) and data was analyzed using Lysis II software.

Acute and chronic rejection are associated with significantly diminished levels of circulating T cells bearing VLA-2, VLA-4 and VLA-5. The intensity of expression (mean channel number) of VLA-2, VLA-3, VLA-4 and VLA-5 on circulating T cells was increased in patients with acute rejection and slightly in patients with chronic rejection. Percent and intensity of expression of VLA-2 and VLA-3 on T cells obtained from removed kidney allografts were higher than in peripheral blood.

T cells expressing VLA-2, VLA-3, VLA-4 and VLA-5 are actively engaged in the interactions with endothelium and the extracellular matrix. Our data may be interpreted as an evidence for rejection-associated migration of those cells to allograft.

PLENARY LECTURES

APPLICATION OF FLOW CYTOMETRY TO TRANSFUSION MEDICINE AND IMMUNOHEMATOLOGY

Barbara Żupańska

Institute of Hematology and Blood Transfusion, Warsaw

Flow cytometry can be applied to several aspects of transfusion medicine and immunohematology (apart from immunophenotyping in hematological neoplasia) such as:

1. detection and quantitation of Ig bound to peripheral blood cells *in vivo*;
2. detection and quantitation of minor cell population (eg. fetomaternal hemorrhage, transfused red cells, red cells chimerism and mosaicism, residual leucocytes in leucocyte-depleted blood products;
3. detection and quantitation of cellular antigens;
4. detection of platelet and leucocyte antibodies;
5. demonstration of platelet activation;
6. evaluation of monocyte interaction with IgG-sensitized red cells.

In this presentation some of these aspects, based on our own experience, will be underlined. They will concern: 1) platelet alloantibodies and autoantibodies detection and identification, 2) identification of platelet specific antigens (HPA), 3) granulocyte alloantibodies and autoantibodies detection and identification, 4) identification of granulocyte specific antigens, 5) detection of FcRIII defect on granulocytes and antiFcRIII antibodies, 6) evaluation of red cell subpopulations and granulocytes defective in complement inhibitors (DAF and MIRL).

All these results will be discussed with regard to their clinical importance (nonhemolytic posttransfusion reactions, fetomaternal incompatibility, autoimmune cytopenias, immune and non-immune red cell destruction).

SHORT REPORT ON THE ACTIVITY OF THE EUROPEAN WORKING GROUP ON CLINICAL CELL ANALYSIS (EWGCCA)

Barbara Żupańska

Institute of Hematology and Blood Transfusion, Warsaw

The goal of the EWGCCA is the further development and standardization of new analytical techniques in clinical cell analysis. The current group focuses on flow cytometry and image analysis, while a second section will focus on molecular biology.

This initiative started in Germany by Prof. Schmitz 5 years ago and reached an international

level in 1996 when the „Consensus Protocol on the Immunophenotyping in Hematological Neoplasia” was published in *Leukemia*. G. Schmitz invited scientists from 13 European countries, including Hungary and Poland, and industrial members for the 1st Meeting of the EWGCCA (Antwerp, 4 July 96) – the statutes and working plans were discussed. In practice the EWGCCA will:

- 1) promote the transfer of methodology from basic science to clinical practice by providing standardized „consensus protocols”.
- 2) organize European Summer Schools for the training;
- 3) promote scientific conferences;
- 4) promote the European collaboration of various disciplines and societies without intention to constitute the EWGCCA as a formal scientific society.

Activities of the group started independent of the joint BIOMED 2 application of its members which should allow much more effective exchange in the near future. The 2nd Meeting was held in Regensburg on February 1, 1997. G. Schmitz was elected as the speaker of the group, J.W. Gratama as the treasurer and further plans were discussed. Between these two meetings the „Consensus Protocol for the Flow Cytometric Characterization of Platelet Function” has been written and will be published soon.

APPLICATION OF FLOW CYTOMETRY FOR THE DETECTION AND CHARACTERISTICS OF PRIMARY IMMUNODEFICIENCIES

Kazimierz Madaliński, Jacek Michalkiewicz, Ewa Kostecka

Dept. of Clinical Immunology, Childrens Memorial Health Institute, Warsaw

Primary immunodeficiencies may affect different parts of the immune system at variable age, but mainly during infancy and childhood. We describe an application of flow cytometry to characterize deficiencies, mainly of cellular branch of immunity.

Nijmegen breakage syndrome (NBS) is an inherited syndrome resembling **ataxia telangiectasia (AT)** [immunological defects, chromosomal instability], but without basic clinical symptoms of AT such as cerebellar ataxia, oculocutaneous telangiectasia.

The patients have microcephaly and retarded physical development as common features. This type of disorder was first described by Weemaes, who named it after the place of discovery. Cytogenetic features of NBS are similar to those described in AT, with rearrangements involving four fragile sites: two on chromosome 7 (7p13 and 7q34) plus two on chromosome 14 (14q11 and 14q32). We compared lymphocyte surface markers in a group of 29 children with NBS (quite a big number, as for world registry!) with those in a group of 10 children with AT.

Results: Flow cytometry analysis of peripheral blood mononuclear cells CPBMC showed that patients with NBS and AT shared some changes in the expression of lymphocyte surface markers: 1) decrease in the proportion of CD3⁺ and CD4⁺ cells, with normal proportion of CD8⁺ cells, 2) low CD4/CD8 ratio, 3) selective decrease in the proportion of CD4⁺ T cells with the expression of CD45RA molecule ('virgin' phenotype), 4) elevated proportion of T cells carrying CD45RO molecule ('memory' phenotype), 5) decrease in the expression of CD28 molecules on CD8⁺ T cells, 6) high number of CD56⁺ cells (NK phenotype) and elevated number of TcR γ/δ positive cells. In patients with NBS, but not in those with AT the defect in the expression of CD45RA molecule was noted also on CD8⁺ T cells.

Conclusion 1: Patients with NBS and AT have a severe deficiency of virgin T helper cells. In patients with NBS the deficiency of CD45RA expression concerned also CD8⁺ cells. Defect

in the expression of CD45RA may reflect a decline in the capacity for production of new CD4⁺ and / or CD8⁺ T cells, since the high expression of CD45RA molecule is typical for T cells which left the thymus (early thymic emigrants).

We have also found several abnormalities of lymphocyte surface markers in a group of 17 children with **chronic granulomatous disease (CGD)**. This is an inherited disorder of phagocyte function that results in elevated susceptibility to pyogenic infections mediated by catalase-positive bacteria. Most important changes concerning lymphocytes were the following: 1) decrease in the number of circulating CD3⁺ and CD4⁺ T cells, 2) increase in the amount of CD8⁺ and CD56⁺ as well as B lymphocytes, 3) deficiency of CD4⁺ population, due to reduction of the number of 'virgin' and 'memory' cells. In contrast, an increase in CD8⁺ population was due to an elevated number of 'memory' subset of CD8⁺ T cells. The population of 'virgin' CD8⁺ T cells remained unchanged.

Conclusion II: In patients with CGD there is a defect concerning CD4⁺ T cells (of virgin and memory phenotype) and elevated component of immune response with engagement of CD8⁺ cells.

Additionally, we describe defects in the expression of lymphocyte surface markers in two patients suspected of **severe combined immunodeficiency (SCID)** (very low number of T cells, lack of B lymphocytes and very high number of CD56 positive cells), as well as the presence of elevated proportion of TcR γ/δ positive cells.

Finally, we want to show quite severe T cell defect [proportions: CD3 33%; CD4 11%; CD4/CD8 ratio 0.4], diagnosed as the complete unresponsiveness to hepatitis B vaccine (among many children vaccinated in 10 academic hospitals in Poland).

CYTOMETRIC ASSAY FOR IL3

J. Kawiak, E. Głowacka

Department of Clinical Cytometry, Medical Centre of Postgraduate Education, Warsaw

Assay of biological activity of cytokines seems to be more informative than the assay for presence of cytokine protein (ELISA). Biological activity of cytokine may be tested on sensitive cell line. The mouse BaF3 cell line is dependent on mouse IL3. The cells start an apoptosis program, when IL3 is not present in the culture medium or is present in too low concentration. This observation may be used for IL3 assay.

Apoptotic BaF3 cells were recognized by:

- DNA cytometry of fixed cells with extracted low MW DNA (Z. Darzynkiewicz, X. Li, J. Gong 1994),
- annexin V binding as a measure of phosphatidylserine translocation to the surface of apoptotic cells,
- propidium iodide diffusion into the apoptotic cells (Zamai L, Falcieri E at al. 1996).

Annexin V binding and propidium iodide diffusion into cells appear to be early and correlated events of apoptosis. Propidium iodide diffusion test in a controlled conditions was used for tests with the recombinant IL3 for construction of the calibration curve.

Opracował prof. dr hab. J. Żeromski

KOMUNIKATY

KOMUNIKAT FUNDACJI BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ

Zarząd Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej przyznaje doroczną nagrodę naukową, w tym również w roku 1997 i 1998, 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 bądź Medline.

Zgłoszenia wraz z dwoma odbitkami należy kierować do dnia 15 listopada każdego roku pod adresem Fundacji. Regulamin dorocznej nagrody można znaleźć w każdym zeszycie rocznika 1997 PBK.

Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa
tel. 34-03-44, fax 3404470

VII OGÓLNOPOLSKA KONFERENCJA BIOLOGII KOMÓRKI THE VIIITH POLISH CONFERENCE ON CELL BIOLOGY

Uprzejmie informujemy, że VII Ogólnopolska Konferencja Biologii Komórki zostanie zorganizowana w 1999 roku, w dniach 9 (środa) do 12 (sobota) września, w Krakowie.

Za organizację Konferencji z upoważnienia Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki odpowiedzialni będą profesorowie: Tadeusz Cichocki, Włodzimierz Korohoda i Stanisław Przystalski.

Zainteresowanych prosimy o śledzenie dalszych komunikatów.

First Announcement. The VIIth Polish Conference on Cell Biology will be organized in Cracow, on 9 (Wednesday) to 12 (Saturday) September 1999.

For the organization of Conference the professors: Tadeusz Cichocki, Włodzimierz Korohoda and Stanisław Przystalski have been chosen by the Polish Cell Biology Society.

Please keep attention to the forthcoming communicates.

IV KONFERENCJA POLSKIEGO TOWARZYSTWA CYTOMETRII PRZEPLYWOWEJ

Konferencja nt. „Cytometria przepływowa w badaniach naukowych i diagnostyce” odbędzie się w Gdańsku w dniu 18 października 1998 roku. W programie przewidujemy wystąpienia zaproszonych gości oraz sesję plakatową. Wykładowcami będą: **Zbigniew Darzynkiewicz** (*Nowy Jork, USA*), **Jim Watson** (*Cambridge, W. Brytania*), **Carleton Stewart** (*Buffalo, USA*), **Paul Robinson** (*West Lafayette, USA*), **David Hedley** (*Toronto, Kanada*), **Jan Kapuściński** (*Gdańsk, Polska*).

Bezpośrednio po Konferencji w dniach 18–21 października zostaną zorganizowane warsztaty metodyczne z udziałem zaproszonych wykładowców. Konferencja oraz warsztaty będą prowadzone w języku angielskim. Liczba uczestników warsztatów jest ograniczona, prosimy zatem o oddzielne zaznaczenie zamiaru udziału w tej części Konferencji. Osoby zainteresowane udziałem prosimy o nadsyłanie zgłoszeń uczestnictwa w terminie do 30 kwietnia 1998 roku na adres Komitetu Organizacyjnego:

Dr hab. **Jacek Bigda**
Sekretarz Komitetu Organizacyjnego
Katedra Histologii i Immunologii AM Gdańsk
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk
tel/fax 058-3023673
e-mail: jbbigd@amed01.amg.gda.pl

Prof. dr hab. **Andrzej Myśliwski**
Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego
E-mail: anmys@amed01.amg.gda.pl

Poniższy formularz proszę odciąć i przesać na adres Komitetu Organizacyjnego

Zgłoszenie uczestnictwa
w IV Konferencji Polskiego Towarzystwa Cytometrii Przepływowej

Imię i nazwisko

Adres

Telefon Fax
E-mail

Jestem zainteresowana/y/ udziałem w warsztatach metodycznych (właściwe zakreślić):

tak / nie

podpis

XXXIII KONFERENCJA NAUKOWA POLSKIEGO TOWARZYSTWA HISTOCHEMIKÓW I CYTOCHEMIKÓW

Uprzejmie informujemy, że w dniach 3–5 września 1998 r. odbędzie się w Kazimierzu Dolnym nad Wisłą XXXIII Konferencja Naukowa PTHiC.

Zgłoszenie uczestnictwa prosimy przysyłać na adres Sekretariatu Konferencji

Katedra Histologii i Embriologii Akademii Medycznej w Lublinie
ul. Radziwiłłowska 11, 20-080 Lublin, tel. (081) 53-216-36
e-mail: jodla@eskulap.am.lublin.pl

Komitet Organizacyjny XXXIII Konferencji Naukowej PTHiC

LISTY DO REDAKCJI

Prof. dr Mieczysław Chorąży (*Zakład Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii, Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, 44-100 Gliwice*) nadesłał list z następującą informacją o poprawnym zapisie genów i białek. Podstawowe reguły:

- * geny wirusów, bakterii, roślin, zwierząt (oprócz człowieka) powinny być pisane małymi literami i kursywą, np. *bcl-2*, *agrB*, *env*;
- * geny ludzkie zapisujemy dużymi literami i kursywą, np. *N-MYC*, *BCL-2*, *RAS*;
- * białka zwierząt – pierwsza litera symbolu duża, pismo proste, np. Myc, Fos, Ras;
- * białka ludzkie – symbol dużymi literami, pismo proste, np. RAS, TNF, IL-1.

Redakcja „Postępów” uprzejmie prosi Autorów o przestrzeganie reguł proponowanych przez Autora listu.

Wskazówki przygotowania rysunków do publikacji w PBK

Dostarczane na dyskietkach teksty powinny być napisane w Wordzie, wersja 6,0 lub wcześniejsza. Jeśli w tekst zostały wstawione rysunki, powinny one zostać umieszczone osobno na dyskietce. Powinny to być albo mapy bitowe (.TIF, .PCX), albo pliki z Corela, wersja 5,0 lub wcześniejsza. Każda wersja Worda lub Corela pozwala na zachowanie pracy w formacie wersji wcześniejszej.

Cennik odbitek prac dla Autorów w 1997 r.

Liczba odbitek	50	100	200	400
Cena zł	40,00	60,00	80,00	100,00

Zamówienie na odbitki **musi** być złożone wraz z przesłaną korektą pracy.

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 (adresy na 2 str. okładki), a do Redakcji w Warszawie tylko te 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 przesyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 z podwójną interlinią i marginesem 4 cm po lewej stronie. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki na s. 340) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona dla redakcji winna 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, informację 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 podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy 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 doby. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzonymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą oraz mogą zamówić odbitki odpłatnie odsyłając korektę, cennik na s.150.

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, tabel i rycin.

Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę.	tak	nie	Dołączono kopię pracy na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM	tak	nie
Jest zgoda osób, których informacje niepublikowane są zamieszczone w tekście artykułu	tak	nie	Odpowiadam za całość pracy opisaną w zał. maszyn.	tak	nie
Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w "Postęпах Biologii Komórki" przechodzi na własność redakcji i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji.					podpis

TREŚĆ

W tym Zeszyście	153
SZCZEPANIK M., PLYTYCZ B. Limfocyty o receptorach gamma/delta ($\gamma\delta$ T)	155
WÓJCIK C. Znaczenie proteasomów w prezentacji antygenów	171
DZIEWIĄTKOWSKI J., KOWIAŃSKI P., MORYŚ J. Jak mierzyć, aby mierzyć dobrze – Zasady stereologiczne w badaniach morfometrycznych	193
WÓJTOWICZ R. Jak wirusy unikają odpowiedzi immunologicznej? Blokowanie cząsteczek MHC klasy I	211
TRETYN A., WIŚNIEWSKA J., JAWORSKI K. Mechanizm działania fitochromu	225
WOJSA-ŁUGOWSKA U., STRZYŻEWSKA I., JERKA-DZIADOSZ M. γ -Tubulina i jej rola w nukleacji i dynamice mikrotubul	251
JAGLARZ M. K. Molekularne podłoże różnicowania linii płciowej i formowanie gonady zarodkowej <i>Drosophila melanogaster</i>	263
HONCZARENKO M., MACHALIŃSKI B. Udział chemokin oraz receptorów chemokinowych w patogenezie zakażenia wirusem AIDS	283
KUŹNICKI J. Udział jonów wapnia w przekazywaniu sygnałów w jądrze komórkowym	311
Abstracts of III Conference of Flow Cytometry, Warsaw, June 14–15 1997	317
Komunikaty	338
Listy do Redakcji	340
Wskazówki przygotowania rysunków	340

Warunki prenumeraty kwartalnika POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI
Prenumerata na rok 1998

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1998 na konto:
FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A.,
IV O/Warszawa 12401053-40006576-2700-401112-001.

Cena prenumeraty rocznika na rok 1998:
dla instytucji (bibliotek) wynosi 60 zł,
a dla odbiorców indywidualnych 20 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 1998 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 12401053-40006576-2700-401112-001.

Price per year 20 dollars USA.

Indeks 369705