

ab
PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

VOL. 27, ISSUE 2/2000
(153-292)

Postępy
Biologii
Komórki

Advances
in Cell
Biology

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 BILINSKI – biologia rozwoju, embriologia, cytoszkielet, połączenia międzykomórkowe – developmental biology, embryology, cytoskeleton, cell junctions – *Inst. Zoologii UJ, 30-060 Kraków, Ingardena 6*), Lilla HRYNIEWIECKA – energetyka komórki, mitochondria – cell energetics, mitochondria – *Zakład Bioenergetyki, Uniwersytetu im. A. Mickiewicza, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*

Bożena KAMIŃSKA – neurobiologia, biologia molekularna – neurobiology, molecular biology – *Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego 02-097 Warszawa, ul. Pasteura 3*

Jerzy KAWIAK – immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów – immunology, cytometry, hematology, cancer biology – *Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*

Wincenty KILARSKI – mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek – muscles, muscle contraction, cell movements – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*

Maria OLSZEWSKA – komórki roślinne, informacja genetyczna w komórkach roślinnych i zwierzęcych – plant cells, genetic information in plant and animal cells – *Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin Instytutu Fizjologii i Cytologii UŁ, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*

Barbara PŁYTYCZ – immunologia – immunology – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*

Maciej ZABEL – histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek – histology, endocrinology, histochemistry, immunocytochemistry, hybrydocytochemistry, cell ultrastructure – *Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chatubińskiego 6a*

Jan ŻEROMSKI – patologia, immunologia, cytometria – pathology, immunology, cytometry – *Katedra i Zakład Immunologii AM 60-355 Poznań, ul. Przybyszewskiego 49*

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. 8340 344, fax 8340470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl.

Recenzenci z tomu 26 PBK z 1999 r. zostali umieszczeni na s. 290

Referees of the volume 26, 1999 – on page 290.

© 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 Postępów Biologii Komórki

- Śródkomórkowe drogi przekazywania sygnałów omówiono w dwóch artykułach zamieszczonych w tym zeszycie:
 - a) sygnału auksynowego z miejsca percepcji fitohormonu do miejsca, gdzie następuje odpowiedź komórkowa; analiza funkcjonalna promotorów niektórych genów auksynowych umożliwia poznanie elementów i domen odpowiedzi auksynowych (s. 155);
 - b) wybranych cytokin, których wiązanie prowadzi do aktywacji kinaz tyrozynowych, a następnie aktywacji różnych szlaków, w których uczestniczą STAT, fosfatazy SHP-2 i kinazy rodziny Src oraz białka (s. 213).
- Markery limfocytów człowieka są dość dobrze poznane i wykorzystywane w diagnostyce. Opisane w artykule na stronie 229 markery limfocytów przezwycięzają poszerzają możliwości diagnostyki schorzeń zwierząt domowych.
- Śródbłonek naczyniowy nie jest strukturą jednolitą. Znajomość cech fenotypowych i czynnościowych może przyczynić się do lepszej diagnostyki schorzeń naczyń krwionośnych i limfatycznych (s. 247).
- Kohezja chromatyd siostrzanych jest niezbędna do zachowania dokładnej segregacji chromosomów w cyklu komórkowym. Opis kohezyny, kompleksu białek odpowiedzialnych za utrzymanie kohezji mitotycznej zamieszczono na stronie 261.

PERCEPCJA I TRANSDUKCJA SYGNAŁU AUKSYNOWEGO*

PERCEPTION AND TRANSDUCTION OF AUXIN SIGNAL

Elżbieta ZIELIŃSKA, Stanisław KOWALCZYK

Zakład Biochemii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

Streszczenie: Szlak transdukcji sygnału auksynowego z miejsca percepcji fitohormonu do miejsca, gdzie następuje odpowiedź komórki, nie został jeszcze ostatecznie poznany. Szereg wyników sugeruje, że białko wiążące auksyny – ABP1, związane z błonowym białkiem dokującym, jest receptorem współdziałającym z białkiem G. Szlak transdukcji sygnału obejmuje aktywację fosfolipazy A₂, która uwalnia wtórne przekaźniki pochodzenia lipidowego aktywujące kinazę białkową regulującą w drodze fosforylacji plazmatyczną H⁺-ATPazę. W coraz liczniejszych doniesieniach wiąże się łańcuch transdukcji sygnału auksynowego z funkcjonowaniem kaskady kinaz MAP. Badania mutantów auksynowych (*axr1*, *tirl*, *sur1*) *Arabidopsis thaliana* zwróciły uwagę badaczy na zależną od systemu ubikwitynowego regulację cyklu komórkowego jako biochemiczną odpowiedź na auksynę. Zmiany w ekspresji niektórych genów należą do najwcześniejszych odpowiedzi auksynowych. Geny z rodziny *Aux/IAA* są obecnie najlepiej poznаныmi genami wczesnych odpowiedzi auksynowych. Szereg wyników wskazuje, że niektóre białka z tej rodziny są związane z kontrolą transkrypcji. Analiza funkcjonalna promotorów niektórych genów auksynowych umożliwiła poznanie kilku elementów odpowiedzi auksynowych (Aux RE) i domen odpowiedzi auksynowych (Aux RD). Poznanie Aux RE umożliwiło klonowanie i zsekwencjonowanie szeregu czynników transkrypcyjnych (ARF).

(*Postępy Biologii Komórki* 2000; 27: 155–183)

Słowa kluczowe: auksyny, białka wiążące auksyny, łańcuch transdukcji sygnału auksynowego, geny odpowiedzi auksynowej, czynniki odpowiedzi auksynowych

Summary: A pathway of auxin action, from perception to response, has not been completely defined, as yet. However, there are now good evidences that auxin-binding protein ABP1, which is associated with a membrane docking protein is a G-protein-coupled receptor. The signal transduction pathway appear to involve activation of phospholipase A₂ leading to the production of lipid second messengers which

*Praca finansowana w ramach grantu KBN nr 6P04C 056 16 i grantu wewnętrznego Uniwersytetu Mikołaja Kopernika nr 410 B

activate the plasma membrane H^+ -ATPase by a protein kinase-dependent mechanism. Increasing evidences now suggest that MAP kinase pathway is involved in mediating auxin responses. Studies of the auxin mutants (*axr1*, *tir1*, *sur1*) of *Arabidopsis thaliana* have focused attention on the role of ubiquitin-mediated cell cycle regulation in auxin response. Changes in the transcription of specific auxin-responsive genes are among the earliest responses to applied auxin. The *Aux/IAA* genes are the best-studied family of early auxin-response genes. Several results suggest that at least some of the *Aux/IAA* proteins are involved in controlling transcription. Functional analysis of several auxin-specific promoters identified a number of functionally defined auxin response elements (AuxREs) and auxin response domains (Aux RDs). A family of transcription factors, referred to as auxin-response factors (ARFs), has been identified and shown to bind to auxin-response elements. (*Advances of Cell Biology 2000; 27: 155–183*)

Key words: auxin, auxin binding proteins, auxin transduction pathway, auxin responsive genes, auxin response factors

WSTĘP

Molekularny mechanizm działania auksyn jest ciągle nieznan, aczkolwiek od wielu lat wiązany jest z procesami zachodzącymi w obrębie błon oraz zmianami w ekspresji genów. Stosunkowo prosta budowa chemiczna auksyn, a w konsekwencji ich niewielka pojemność jako nośników informacji staje się podstawą do przypuszczeń, że o prawidłowości i skuteczności generowanego sygnału decydują składniki układu percepcji, przetwarzania i przenoszenia informacji. Współtworzone w ten sposób informacje uruchamiają skomplikowane procesy związane ze wzrostem wydłużeniowym, podziałami bądź różnicowaniem komórek. Tak wielka różnorodność odpowiedzi auksynowych może wynikać z heterogenności molekularnej białka receptorowego, jego lokalizacji lub stopnia wysycenia hormonem. Podobnego różnicowania można również oczekiwać w odniesieniu do poszczególnych ogniw szlaku sygnalizacyjnego, a także ich powiązań z ogniwami innych łańcuchów sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. W kontekście tych, jak się wydaje, dosyć oczywistych sugestii, staje się zrozumiała potrzeba całościowego poznania szlaku transdukcji sygnału auksynowego. To, że osiągnięcie tego celu nie jest łatwe, można się przekonać śledząc prawie trzydziestoletni okres poszukiwań receptora auksyn i tylko niewiele krótszy okres badań poświęcony identyfikowaniu potencjalnych ogniw łańcucha transdukcji sygnału. Mimo że dotychczasowe usiłowania w dosyć ograniczonym stopniu przybliżyły nas do celu, to nie można nie zauważać postępu, jaki się zaznaczył na tym polu w ostatnim dziesięcioleciu.

Celem obecnej pracy jest próba podsumowania najważniejszych osiągnięć ostatniego okresu, ze szczególnym zwróceniem uwagi na dokonania w poszukiwaniu receptorów auksyn. Pod tym względem praca nawiązuje do wcześniejszych artykułów opublikowanych w polskich czasopismach monograficznych [7,45,50]. Autorzy pragną również zwrócić uwagę Czytelnika na najnowsze kierunki badań, szczególnie

zaś te, które przy wykorzystaniu techniki biologii molekularnej prowadzą do poznawania poszczególnych ogniw łańcucha transdukcji sygnału auksynowego.

BIĄŁKA WIĄŻĄCE AUKSYNINY

Zainteresowanie białkami wiążącymi auksyniny bierze swój początek od eksperymentów poświęconych wiązaniu znakowanych izotopowo auksyn do białek zawartych w homogenacie otrzymany z etiolowanych koleoptyli kukurydzy [32]. Na podstawie analizy specyficzności, powinowactwa oraz lokalizacji „miejsc wiążących” auksyniny w różnych frakcjach subkomórkowych, zaczęto je nazywać jako tzw. miejsca I, II i III [22]. Obserwowana przez wielu badaczy heterogenność „miejsc wiążących” omawiana jest szerzej w pracach przeglądowych [41,69,99,100]. Próby oczyszczania białek wiążących auksyniny z kukurydzy, podejmowane w kilku laboratoriach, zakończyły się ostatecznie sukcesem w drugiej połowie lat osiemdziesiątych [40,57,58,68]. Od tego czasu główny nurt badań skupił się na rozpuszczalnym białku określanym mianem ABP1 (*auxin binding protein*), w przypadku którego wiązanie auksyn może mieć charakter oddziaływań typu ligand-receptor i które jako jedyne spośród licznych białek wiążących auksyniny wydaje się pełnić funkcję białka receptorowego.

Mimo że niemal od początku badań było wiadomo, że ABP1 nie jest jedynym białkiem wiążącym auksyniny, to zainteresowanie badaczy kierowało się głównie na białka zlokalizowane w plazmolemie, bowiem zgodnie z powszechnymi oczekiwaniami tutaj powinien brać początek szlak transdukcji sygnału auksynowego. Białka o zróżnicowanej masie cząsteczkowej pochodzące z błon plazmatycznych hipokotyli cukinii i pomidora, a także koleoptyli kukurydzy identyfikowano na podstawie wiązania znakowanego analogu IAA zawierającego przy 5 węglu grupę azydową (5-N₃-IAA), bądź wiązania znakowanych izotopowo auksyn [41]. Brak jednoznacznych wyników mogących potwierdzać receptorową rolę tych białek sprawia, że funkcja niektórych z nich jest wiązana z transportem auksyn przez błonę. Jednak zdecydowane potwierdzenie tych sugestii jest również obecnie niemożliwe. Brak szczegółowych badań biochemicznych uniemożliwia porównanie ich sekwencji aminokwasowej z poznanymi już transporterami auksyn. W tym miejscu warto zwrócić uwagę, że przełom w poznawaniu białek nośnikowych, zaznaczający się w ostatnim czasie, stał się możliwy dzięki wyselekcjonowaniu odpowiednich mutantów *A. thaliana* i sklonowaniu zmutowanych genów [11,53,54,61].

Oprócz błonowych białek wiążących auksyniny, zidentyfikowano też kilka rozpuszczalnych białek, które charakteryzuje wysokie powinowactwo względem auksyn. Ogólna charakterystyka tych białek omówiona jest w pracach przeglądowych [41,99,100]. Funkcja rozpuszczalnych białek jest nieznaną z wyjątkiem kilku, których

charakter udało się ustalić i zidentyfikować jako enzymy bądź białka o sekwencji aminokwasowej homologicznej z sekwencją znanych enzymów. Okazało się więc, że IAA wiąże transferaza glutationowa, endo-1,3- β -glukanaza, reduktaza indolo-3-acetylaldehydu i β -glukozydaza [41].

Pobieżny przegląd białek wiążących auksyny skłania do krytycznej oceny wyników poszukiwań receptora w drodze biochemicznej identyfikacji białek wiążących fitohormon. Dzisiaj już wiadomo, że badania te prowadzą do licznych artefaktów i muszą być poparte poszukiwaniami funkcjonalnych powiązań między zidentyfikowanymi białkami a efektami biochemicznymi bądź fizjologicznymi wywoływanymi przez hormon.

BUDOWA I LOKALIZACJA ABP1

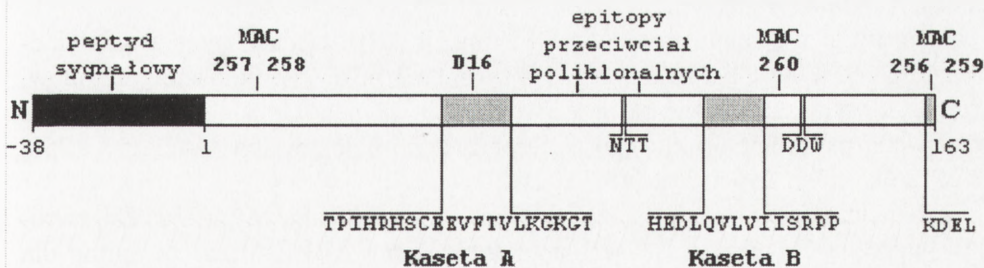
ABP1, jako potencjalne białko receptorowe bądź jako składnik kompleksu białkowego pełniącego rolę receptora auksyn, budzi od wielu lat zainteresowanie badaczy zajmujących się auksynami. Zainteresowanemu Czytelnikowi polecamy szereg wyczerpujących prac monograficznych opublikowanych w literaturze światowej w ostatnim pięcioleciu [10,41,60,63,69,72,99,100].

W latach osiemdziesiątych ABP1 oczyszczono po raz pierwszy do stopnia homogenności z koleoptyli kukurydzy [57,58,68]. Analiza biblioteki cDNA, w której wykorzystano poliklonalne przeciwciała przeciw oczyszczonemu ABP1, doprowadziła do zidentyfikowania i ustalenia sekwencji nukleotydowej klonu [96]. W tym samym czasie wyselekcjonowano i zidentyfikowano klon, a później także gen *ABP1*, wykorzystując do tego celu sondy oligonukleotydowe syntetyzowane na podstawie poznanej sekwencji aminokwasowej fragmentów ABP1 [33,36]. Gen *ABP1* tworzą 4 introny i 5 eksonów kodujących białko zbudowane z 201 reszt aminokwasowych. Po odcięciu 38 aminokwasowego fragmentu stanowiącego sekwencję skierowującą białko do siateczki śródplazmatycznej, dojrzałe białko tworzą 163 reszty aminokwasowe (rys. 1). Wyliczona masa takiego białka wynosi 18 352 Da i jest nieco niższa od wartości wyznaczonej eksperymentalnie metodą elektroforezy w warunkach denaturujących. Dojrzałe białko jest hydrofilowe i nie posiada wystarczająco długich fragmentów hydrofobowych, które mogły by tworzyć domeny transbłonowe. Metodami pomiarów dichroizmu kołowego wykazano, że strukturę drugorzędową ABP1 tworzą głównie konformacje β z β -skrętami, bez udziału struktury α helisy [41]. ABP1 zawiera trzy reszty cysteinowe oraz pojedyncze miejsce glikozylacji (sekwencja Asp-Thr-Thr) (NTT na rys. 1). Do reszty asparaginy jest przyłączony glikan oligomannozowy zbudowany z reszt N-acetylo-glukozyaminy i mannozy, występujących w stosunku 2:9 [33]. Masę glikanu określono na około 2 kDa, bowiem o tyle zmniejsza się masa cząsteczkowa oczyszczonego ABP1 w wyniku hydro-

litycznego odszczepienia glikanu przez endoglikozydazę H [68]. Za pomocą układu bakulowirusa gen *ABP1* wprowadzono do hodowanych *in vitro* komórek owada *Spodoptera frugiperda*. Lizat takich komórek zawierał ABP1 o masie cząsteczkowej 22 kDa, a w warunkach, gdy komórki traktowane były tunikamycyną (inhibitor glikozylacji), masa cząsteczkowa ABP1 wynosiła tylko 19 kDa [29,59]. W tym miejscu warto również odnotować fakt, iż zrekombinowane białko ma wysyceniowe miejsce wiązania o wysokim powinowactwie względem syntetycznej auksyny – kwasu naftylo-1-octowego (1-NAA).

Wykorzystując sklonowany cDNA ustalono metodą hybrydyzacji, że genom kukurydzy zawiera rodzinę genów *ABP* liczącą co najmniej 5 genów (*Zm-ERabp1* do *Zm-ERabp5*) [34,90]. Spośród zsekwencjonowanych dotychczas trzech genów rodziny *Zm-ERabp*, geny *Zm-ERabp4* i *Zm-ERabp5* są bardzo podobne, natomiast *Zm-ERabp1* różni się pod względem wielkości i sekwencji promotora oraz sekwencji peptydu sygnałowego (40% identyczności). Gen *ABP1* podlega silniej ekspresji w tkankach kwiatowych, szczególnie w słupekowiu, ale także w koleoptylu i w mniejszym stopniu w korzeniu. Podobną sytuację obserwowano w przypadku genu *ABP4*, którego mRNA identyfikowano w pręcikowiu i liściach. Produkt genu *ABP5* lokalizowano w śladowych ilościach we wszystkich badanych tkankach.

Oprócz rodziny genów *Zm-ERabp* kukurydzy, zidentyfikowano i zsekwencjonowano geny *ERabp* z rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) [76,91], truskawki [47], pieprzowca (*Capsicum annum*) [16], brzoskwini [74] oraz dwa geny z tytoniu [49,102]. Wszystkie białka kodowane przez rodzinę genów *ERabp* roślin jedno- i dwuliściennych są homologiczne i zawierają dwa wysoce konserwatywne fragmenty [4]. ABP roślin dwuliściennych ma jedno lub dwa dodatkowe miejsca glikozylacji, co sprawia, że masa cząsteczkowa tych białek jest nieco wyższa od ABP1 kukurydzy [47,102].



RYSUNEK 1. Schemat budowy białka wiążącego auksynę (ABP1) z zaznaczonymi konserwatywnymi fragmentami (kasetą A, kasetą B, C-końcowy fragment KDEL), peptydem sygnałowym, sekwencją zawierającą resztę glikozylowanej asparaginy (NTT) i sekwencją DDW uczestniczącą w wiązaniu fitohormonu. Na schemacie zaznaczono również położenie epitopów dla przeciwciał poli- i monoklonalnych (MAC) (na podstawie danych [13,33,70,71,90,96,])

Wspólną cechą wszystkich ABP jest występowanie w części C-końcowej cztereaminokwasowej sekwencji KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) (rys. 1) [16,33,47,49,-76,96,102], która u zwierząt zatrzymuje białka w świetle siateczki śródplazmatycznej (sygnał retencji). W tym miejscu warto podkreślić, że sekwencja KDEL, a u drożdży HDEL nie blokuje wyjścia białka z siateczki, ale służy jako „znacznik powrotny”. Białko mające sekwencję KDEL może opuścić siateczkę śródplazmatyczną, ale po dotarciu do aparatu Golgiego jest wiązane do białka receptorowego rozpoznającego sekwencję KDEL i w formie kompleksu z receptorem błonowym powraca tzw. transportem wstecznym do siateczki. Powinowactwo receptora do sekwencji KDEL znacząco rośnie przy obniżeniu pH i dlatego jest silne w aparacie Golgiego i słabe w siateczce śródplazmatycznej. Białko mające sekwencję KDEL występuje w siateczce śródplazmatycznej jako białko rozpuszczalne, natomiast w aparacie Golgiego jako związane z błoną.

Poznanie sekwencji nukleotydowej i odpowiadającej jej sekwencji aminokwasowej ABP1 kukurydzy, a później także z innych roślin zwróciło uwagę na wysoce konserwatywny fragment położony w pozycjach od 54 do 73 (numeracja reszt aminokwasowych nie obejmuje peptydu sygnałowego) określanej jako kasety A (rys. 1). Niemal 100% identyczność sekwencji tego fragmentu we wszystkich poznanych genach *ABP* [4] sugeruje, że kasety A stanowią funkcjonalnie istotny fragment białka mogący uczestniczyć w wiązaniu hormonu. Wyniki badań biochemicznych wskazują jednak na inny fragment polipeptydu jako miejsce wiążące auksynę. Brown i Jones [13] wiązali znakowany trytem azydo-IAA do oczyszczonego ABP, a następnie białko poddawali trawieniu trypsyną. Okazało się, że wyznakowana i zmodyfikowana auksyna była wiązana przez fragment polipeptydu rozpoczynający się od Ile¹³⁰, a kończący na Leu¹⁴⁵, czyli fragment położony poza kasetą A. Zgodnie z aktualnymi poglądami, w wiązaniu fitohormonu współuczestniczą reszty His-Arg⁵⁸-His (HRH na rys. 1) położone w obrębie konserwatywnej kasety A z resztami Asp¹³⁴ Asp¹³⁵ i Trp¹³⁶ (DDW na rys. 1) tworzącymi hydrofobową platformę wiążącą pierścień indolowy auksyn.

Duże usługi w badaniach lokalizacji i funkcji ABP1 oddały przeciwciała skierowane przeciw ABP1 z kukurydzy. Na rysunku 1 pokazano położenie epitopów, przeciw którym skierowane są przeciwciała poli- i monoklonalne. W przypadku przeciwciał monoklonalnych miejsca te oznaczono kolejno jako MAC 257 i 258, MAC 260, MAC 256 i 259 [68,70,71].

Doświadczenia wykorzystujące przeciwciała monoklonalne MAC 256 i 259 zwróciły uwagę na C-końcową determinantę antygenową ABP1. Mimo że epitop dla tych przeciwciał położony jest poza domenami wiążącymi auksynę i znaczącą jego część tworzy końcowy fragment KDEL, to wiązanie przeciwciał do natywnego białka hamowane jest przez auksyny [71]. Te nieoczekiwane wyniki można interpretować dwojako. Mogą one sugerować, że wiązanie hormonu do ABP1 indukuje zmiany konformacyjne białka uniemożliwiające dostęp przeciwciał do C-końcowego

epitopu bądź że niektóre reszty aminokwasowe tego epitopu uczestniczą w wiązaniu auksyny.

W związku z proponowaną receptorową funkcją ABP powstaje pytanie o jego lokalizację tkankową. Löbler i Klämbt wykorzystując metodę immunofluorescencji zlokalizowali około 90% ABP1 w komórkach epidermalnych koleoptyli kukurydzy [58]. Epidermalną lokalizację ABP1 potwierdzono również w ostatnich badaniach immunocytochemicznych, aczkolwiek obecność jego wykazano także w komórkach subepidermalnego mezofilu i komórkach towarzyszących wiązce sitowej [12]. Najwyższy poziom ABP1 obserwuje się w strefach, które najszybciej rosną, a więc w części apikalnej mezokotyli i części bazalnej koleoptyli kukurydzy. Nie stwierdzono obecności ABP1 w endospermie i wierzchołku pierwotnego korzenia [28].

CZY ABP1 JEST BIAŁKIEM RECEPTOROWYM?

Badania elektrofizjologiczne, szczególnie badania prowadzone na protoplastach, dostarczyły pierwszych i dotychczas najpoważniejszych danych wskazujących na receptorową rolę ABP1. Zmiany w transporcie jonów przez błonę plazmatyczną pod wpływem egzogennie podanej auksyny należą do najszybszych odpowiedzi komórkowych na ten hormon. Już wstępne wyniki badań prowadzonych na fragmentach międzywęzła grochu, koleoptylach kukurydzy i owsa sugerowały, że ten kierunek poszukiwań może okazać się bardzo owocny szczególnie w doświadczeniach wykorzystujących izolowane protoplasty [10]. Protoplasty tytoniu mają stałą i stosunkowo niski potencjał błonowy, który ulega zmianom pod wpływem dodanego 1-NAA. Hiperpolaryzacja błony komórkowej w tym przypadku jest reakcją znacznie szybszą niż obserwowana w zawiesinie komórkowej [8,9]. Zmiany potencjału błonowego hamują poliklonalne przeciwciała skierowane przeciw ABP1 oraz przeciw H^+ -ATPazie z drożdży. Hiperpolaryzację błony obserwuje się również wówczas, gdy 1-NAA jest związany z białkiem (albumina surowicy wołu, hemocyjanina) tworząc koniugat, który nie penetruje przez błonę do wnętrza komórki [101]. Hiperpolaryzację protoplastów można również indukować dodaniem do ich zawiesiny przeciwciał poliklonalnych skierowanych przeciw syntetycznemu peptydowi D16 o sekwencji identycznej z kasetą A [98], a także peptydu o sekwencji odpowiadającej C-końcowemu fragmentowi ABP1 [48].

Wyniki doświadczeń wykorzystujących techniki mikroelektrodowe potwierdzono również w badaniach prowadzonych na protoplastach kukurydzy techniką *patch-clamp* w układzie całokomórkowym [83]. Również w tych doświadczeniach przeciwciała względem peptydu D16 wywierają podobny efekt jak auksyny, a przeciwciała skierowane przeciwko ABP1 zapobiegają hiperpolaryzacji.

Oprócz badań prowadzonych na protoplastach, receptorową funkcję ABP1 potwierdzają również wyniki eksperymentów prowadzonych na komórkach przysparkowych [94]. Wpływ auksyn na ruchy aparatu szparkowego jest stosunkowo złożony

i ściśle zależy od stężenia fitohormonu. Auksyny w niskich stężeniach mogą indukować otwieranie szparek, natomiast w wyższych stężeniach zamykają szparki. W badaniach wykorzystano 6 syntetycznych oligopeptydów, których sekwencje odpowiadają sekwencjom sześciu różnych fragmentów ABP1, w tym również fragmentowi kasety A [94]. Okazało się, że jedynie peptyd o sekwencji identycznej z C-kończącym fragmentem (od pozycji 151 do 163) wykazuje aktywność biologiczną zmieniając czynność kanałów K^+ i wywołując wzrost pH cytoplazmy. Do podobnych wniosków skłaniają również badania prowadzone na skrawkach epidermy z orchidei (*Paphiopedilum tonsum* L.) dotyczące wpływu przeciwciał i syntetycznych peptydów na ruchy aparatów szparkowych i zmiany cytoplazmatycznego pH [24]. Stwierdzono, że fragment Fab przeciwciał skierowanych przeciwko peptydowi D16, podobnie jak całe przeciwciała, indukował otwieranie szparek przez obniżenie stężenia jonów wodorowych w komórkach szparkowych. Interesujące wyniki obserwowano w przypadku dwunastoaminokwasowego C-końcowego peptydu ABP1, który jak się okazało powoduje alkalizację komórek szparkowych i zamykanie szparek. Pominięcie końcowej sekwencji KDEL w peptydzie powoduje całkowity brak reakcji, ale sam peptyd KDEL także nie wywołuje obserwowanego efektu. Fragment Fab przeciwciał monoklonalnych MAC 256 skierowanych przeciwko C-terminalnej sekwencji ABP1 powoduje alkalizację cytoplazmy i zamykanie szparek podobnie jak 12-aminokwasowy fragment [24].

Koncepcja wiążąca funkcjonowanie ABP1 z percepcją sygnału auksynowego zyskała ostatnio poparcie w badaniach prowadzonych na transgenicznym tytoniu z włączonym genem *ABP1* z *A. thaliana* [39,92]. Dzięki zastosowaniu specjalnego układu promotora udało się otrzymać rośliny, u których wystąpiła wyraźna nadekspresja genu (analizowana na poziomie mRNA oraz metodą immunoblotingu). W przeprowadzonych doświadczeniach zaobserwowano, że analizowany wzrost epinastyczny jest znacznie intensywniejszy w obecności 1-NAA w przypadku skrawków liści rośliny z nadekspresją *ABP1* w porównaniu z układami kontrolnymi. Młode liście transgenicznego tytoniu rosną u nasady ogonka, a nie tylko w części szczytowej liścia. Analizując przekrój poprzeczny liścia stwierdzono, że transgeniczna roślina ma zdecydowanie większe komórki miększu palisadowego. Większe są również rozmiary komórek i protoplastów otrzymanych z dojrzałych liści, chociaż pokrój całej rośliny transgenicznej nie odbiega od roślin kontrolnych. W kolejnych doświadczeniach autorzy transformowali genem *ABP1* komórki bielma kukurydzy, które zwykle nie zawierają immunochemicznie wykrywalnej ilości ABP1. Również w tym przypadku syntetyczna auksyna znacząco wpływała na wielkość transgenicznych komórek hodowanych *in vitro*, które wyróżniały się większymi rozmiarami w porównaniu z komórkami linii kontrolnych. Wyniki tych doświadczeń potwierdzają receptorową rolę ABP1, jeżeli nie we wszystkich odpowiedziach auksynowych, to przynajmniej w reakcjach związanych ze wzrostem wielkości komórki.

Badania elektrofizjologiczne wykorzystujące przeciwciała, syntetyczne peptydy czy auksyny związane z białkiem dowodzą obecności ABP1 po zewnętrznej stronie plazmolemy. Taką lokalizację ABP1 potwierdzają również wyniki doświadczeń, w których do immunologicznej identyfikacji ABP1 użyto wtórnych przeciwciał zawierających koloidalne złoto [21]. Autorzy w tym przypadku nie tylko potwierdzili obecność ABP1 na powierzchni protoplastów, ale zaobserwowali zmiany w jego rozmieszczeniu w obecności 10 μM IAA bądź 1-NAA. Charakterystyczne grupowanie się ABP1 w obecności hormonu przypomina zmiany, które w przypadku wielu białek receptorowych hormonów zwierzęcych poprzedzają powstawanie pęcherzyków klatrynowych i endocytozę.

W badaniach wiązania oczyszczonego ABP1 do pęcherzyków plazmatycznych wykazano, iż wiązanie do błon ma charakter wysyceniowy oraz że auksyna nie wpływa na samo wiązanie białka do błony [89]. Wyniki tych obserwacji, podobnie jak niektóre wyniki badań elektrofizjologicznych, sugerują obecność w błonie białka „dokującego” tworzącego z ABP1 właściwy kompleks receptorowy (rys. 6). Wyniki doświadczeń elektrofizjologicznych, w których wykorzystywano przeciwciała MAC 256, 259 lub syntetyczne peptydy odpowiadające temu fragmentowi sugerują, że ABP jest „zakotwiczone” w białku „dokującym” fragmentem C-końcowym.

Przedstawione dotychczas wyniki i proponowane sugestie kłócą się jednak z wielokrotnie obserwowaną subkomórkową lokalizacją ABP1. Frakcjonowanie błon w drodze wirowania różnicowego w pełni potwierdza obecność zasadniczej puli miejsc wiążących auksyny we frakcji błon pochodzących z siateczki śródplazmatycznej. W większości badań tylko bardzo mała część ABP była znajdowana we frakcji wzbogaconej w błony plazmolemy [22,40,67]. Również szereg obserwacji immunocytochemicznych potwierdza lokalizację zasadniczej puli ABP1 w siateczce śródplazmatycznej stwierdzając obecność tylko małej ilości białka w cytoplazmie, mitochondriach, plastydach, diktiosomach, błonie komórkowej i tylko śladowej ilości w jądrze komórkowym i wakuoli [12]. Jak już wcześniej wspomniano, lokalizacja subkomórkowa ABP jest zdeterminowana obecnością u wszystkich poznanych izoform sekwencji KDEL.

W świetle proponowanej funkcji ABP1 wydaje się mało prawdopodobne, by białko receptorowe mogło się przemieszczać z siateczki śródplazmatycznej na powierzchnię plazmolemy na zasadzie biernego „wycieku”. W kontekście tych rozważań zasadne wydaje się pytanie o to, czy sekwencja KDEL może ulegać w jakiś sposób maskowaniu? Z obserwacji zmian konformacyjnych ABP1 po związaniu auksyny można założyć, że może to mieć miejsce w sytuacji, gdy wiązanie auksyny przez ABP wewnątrz komórki będzie indukować zmiany, które uczynią sekwencję KDEL niedostępną dla jej receptorów. Nie można również wykluczyć proteolitycznego odcinania C-końcowego fragmentu ABP1 bądź tworzenia kompleksu ABP1 z innym białkiem.

Niektóre z proponowanych sugestii sprawdzono eksperymentalnie metodami immunofluorescencji, znakowania pulsowego, analizy białek w zawieszynie komórkowej oraz badań w układach ekspresyjnych [30,38,75,92,95]. W badaniach tych nie potwierdzono proteolitycznego odcinania fragmentu C-końcowego ABP, a co ważniejsze nie zaobserwowano wiązania auksyny przez ABP w warunkach *in vivo* [95]. W świetle powyższych obserwacji zrozumiałe wydają się wyniki wskazujące, że niezależnie od obecności lub braku auksyny około 15% ABP1 ulega przemieszczeniu z siateczki śródplazmatycznej, a z tego tylko niewielka część (poniżej 2%) dociera poprzez aparat Golgiego na powierzchnię komórki [30]. Na bardzo ograniczoną sekrecję ABP1 wskazują również wyniki uzyskane przez innych autorów, aczkolwiek ich prace nie zawierają danych na temat szacunkowej ilości ABP1 docierającego na zewnątrz komórki [17,38,75,92]. Na obecnym etapie badań można więc ogólnie stwierdzić, że subkomórkowy rozkład ABP1 jest nadal niejasny. W oczach wielu badaczy stawia to pod znakiem zapytania przypisywaną mu receptorową funkcję. Oprócz wątpliwości związanych z subkomórkową lokalizacją ABP1 należy również zwrócić uwagę na inne fakty, które poddają w wątpliwość bądź wręcz podważają proponowaną rolę. Niektórzy badacze zwracają uwagę na wielkość zmian potencjału błonowego mierzonego w badaniach elektrofizjologicznych. Do niedawna poważne wątpliwości wiązano z wynikami badań wskazujących na niskie powinowactwo „miejsca wiążącego” względem kwasu 4-chloro-indoliloctowego. W przeprowadzonych ostatnio doświadczeniach wykorzystujących oczyszczone ABP1 wykazano jednak, że ta najbardziej aktywna auksyna współzawodniczy z NAA o miejsce wiążące w podobnym stopniu jak IAA [80]. Do zastanowienia może również skłaniać zdecydowanie mniejsza ilość „miejsc wiążących” auksyny w pędach grochu w porównaniu z koleoptylami kukurydzy, mimo że w testach biologicznych efekty wywierane przez fitohormon są w obu przypadkach podobne. Naszym zdaniem, wątpliwość ta wydaje się być bezzasadna, ponieważ niezależnie od różnic w całkowitej ilości ABP jego ilość na powierzchni błony komórkowej grochu może być podobna bądź nawet wyższa niż u kukurydzy.

FOSFOLIPAZA A_2 I KASKADA KINAZ MAP OGNIWAMI W ŁAŃCUCHU TRANSDUKCJI SYGNAŁU AUKSYNOWEGO?

Od prawie dziesięciu lat w pracowni Scherera prowadzone są doświadczenia na hodowlach komórkowych soi, fragmentach hipokotyli cukinii i słonecznika [84,88], a także na błonach mikrosomalnych [5,85], których wyniki skierowują uwagę na fosfolipazę A_2 jako jeden z potencjalnych enzymów efektorowych aktywowanych przez sygnał auksynowy [15,65]. Fosfolipaza A_2 (PLA₂) hydrolizuje wiązanie *sn*-2-estrowe fosfolipidów glicerolowych uwalniając kwas tłuszczowy i

lizofosfolipid. Efektorową rolę fosfolipazy A_2 potwierdzono w doświadczeniach, w których wykazano, iż inhibitory zwierzęcej PLA_2 wybiórczo hamują zależny od auksyn wzrost fragmentów hipokotyli kukurzy [86] oraz indukowane przez auksyny zakwaszenie apoplastu i wzrost wydłużeniowy koleoptyli kukurydzy [103]. W innych doświadczeniach prowadzonych *in vitro* wykazano, że przeciwciała skierowane przeciwko ABP1 znoszą stymulujący wpływ auksyn na aktywność fosfolipazy A_2 [5,85]. W aktywacji fosfolipazy pośredniczą przypuszczalnie białka G, ponieważ mastoparan stymuluje PLA_2 w warunkach braku auksyny oraz wpływa aktywująco na wzrost hipokotyli słonecznika [88]. Produkty hydrolizy fosfolipidów katalizowanej przez PLA_2 stymulują aktywność plazmatycznej H^+ -ATPazy. Aktywujący wpływ lizofosfolipidów na pompowanie protonów i aktywność H^+ -ATPazy obserwowano w pęcherzykach błonowych uzyskiwanych z owsa [77]. Z drugiej strony wyniki doświadczeń prowadzonych na pęcherzykach błon plazmatycznych korzeni owsa prowadzą do wniosku, że również wolne kwasy tłuszczowe wpływają stymulująco na aktywność H^+ -ATPazy. Poziom aktywacji enzymu w tym przypadku zależy od długości łańcucha węglowodorowego i liczby wiązań nienasyconych [77]. Dzisiaj już wiadomo, że aktywacja H^+ -ATPazy związana jest z jej fosforylacją za pośrednictwem kinaz białkowych [77,87,103]. Wiadomo także, że szereg białek błonowych jest specyficznie fosforylowanych przez kinazy białkowe zależne od jonów wapnia i lizofosfolipidów. Badania molekularnych mechanizmów regulujących plazmatyczną H^+ -ATPazę napotykać jednak na poważne trudności wynikające z faktu, iż roślinny enzym jest kodowany przez stosunkowo liczną rodzinę genów. Na przykład u *A. thaliana* zidentyfikowano aż 10 genów kodujących H^+ -ATPazę, spośród których cztery ulegają wybiórczej ekspresji w zależności od rodzaju komórki bądź tkanki [77].

Nie zyskują potwierdzenia doniesienia o aktywującym wpływie auksyn na fosfolipazę C. Szereg wątpliwości budzą również wyniki doświadczeń wskazujących na udział jonów wapnia i cGMP w łańcuchu transdukcji sygnału auksynowego [18,69]. Znacznie bardziej przekonujące pod względem metodycznym, chociaż nieliczne jeszcze wyniki dowodzą udziału białek G w przekazywaniu sygnału auksynowego [60,62,69,99].

W ostatnich latach coraz więcej danych wskazuje na kaskadę kinaz MAP jako przypuszczalne ogniwo szlaku transdukcji sygnału auksynowego. Doniesienia te zasługują na szczególne podkreślenie, bowiem dzisiaj przyjmuje się już niemal powszechnie, że kinazy MAP funkcjonują w szlakach przekazywania sygnałów związanych ze stresem abiotycznym, zranieniem i obecnością elitorów [37]. Dobrze udokumentowany jest udział kaskady kinaz MAP w łańcuchu transdukcji sygnału etylenowego [45], a pojedyncze doniesienia sugerują, że również w przypadku giberelin i kwasu absycynowego kinazy MAP pełnią podobną funkcję [37].

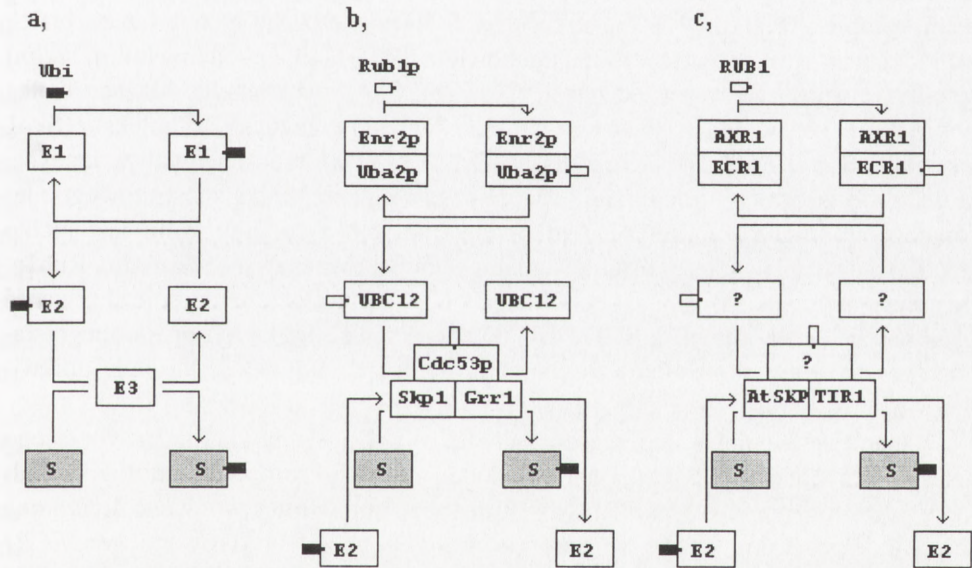
Pierwsze doniesienia wskazujące na udział kaskady kinaz MAP w łańcuchu sygnalizacji auksynowej opublikowano przed pięciu laty [64]. Autorzy wykazali,

że syntetyczna auksyna (2,4-D) wprowadzana do hodowli komórkowej tytoniu aktywuje kinazę białkową, której masa cząsteczkowa (46 kDa) jest zbliżona do masy sklonowanych przez autorów kinaz ATMPK z *A. thaliana*. Ponadto ekstrakt otrzymany z komórek tytoniu traktowanych 2,4-D fosforylował zrekombinowane białko ATMPK2, które wykazuje znaczącą homologię (49% identyczności) z kinazą MAP *Xenopus*. W innych badaniach obserwowano zależną od auksyn indukcję genu *NPK1* kodującego białko homologiczne z kinazą kinazy aktywującej kinazę MAP (MAPKKK). Indukcja *NPK1* w skrawkach dojrzałych liści wydaje się być ściśle skorelowana z podziałami komórek [66]. W ostatnim czasie opublikowano interesujące wyniki, które zdecydowanie potwierdzają udział kaskady kinaz MAP w przekazywaniu sygnału auksynowego [44]. W doświadczeniach użyto komórek mezofilu kukurydzy transformowanych genem *GFP* (*green fluorescent protein*) poprzedzonym promotorem genu *GH3* (gen wczesnej odpowiedzi auksynowej). Okazało się, że aktywna kinaza *NPK1* blokowała indukowaną przez auksynę aktywację promotora *GH3* i ekspresję genu *GFP*. Aktywacja *GH3* była na poziomie kontroli w warunkach, gdy protoplasty były transformowane zmutowanym genem *npk1*. Nie obserwowano również represji badanych genów w protoplastach, które obok genu *NPK1* zawierały dodatkowo gen *MPK1* myszy kodujący specyficzną fosfatazę kinazy MAP. Na podstawie tych wyników można wysnuć wniosek, że aktywacja kinazy MAP za pośrednictwem kaskady kinaz aktywowanej przez *NPK1* prowadzi do represji genu *GH3*. Innymi słowy, *NPK1* funkcjonuje jako negatywny regulator w szlaku prowadzącym do ekspresji tzw. wczesnych genów auksynowych. W tym miejscu warto przypomnieć, że również *CTR1*, białko homologiczne z MAPKKK, funkcjonuje jako negatywny regulator w szlaku transdukcji sygnału etylenowego [45].

KASKADA UBIKWITYNOWA A SZLAK TRANSDUKCJI SYGNAŁU AUKSYNOWEGO

Wyselekcjonowanie mutantów *A. thaliana* o zmienionej odpowiedzi na auksyny wyznaczyło nowy kierunek poszukiwań w badaniach szlaku transdukcji sygnału auksynowego. Mutanty interesujące z punktu widzenia omawianych zagadnień zidentyfikowano na podstawie wzrostu wydłużeniowego korzeni przy odpowiednio wysokim stężeniu auksyn, które już zwykle hamuje wzrost. W ten sposób wyodrębniono linie, u których mutacje dotyczą co najmniej 9 loci. Są to mutanty: *aux1*, *axr1*, 2, 3, 4, 5 i 6, *dwf*, *tir1*. Po sklonowaniu 4 zmutowanych genów (*aux1*, *axr1*, *axr3*, *tir1*) okazało się, że nie wszystkie kodują białka związane z funkcjonowaniem łańcucha transdukcji sygnału [10,35,53,69]. Takim wyjątkiem wydaje się być produkt genu *aux1* (białko homologiczne z permeazami transportującymi aminokwasy) funkcjonujący jako nośnik transportujący auksyny do wnętrza komórki [11,61]. Po-

czątkowo zaskakująca była również homologia produktu genu *axr1* (*auxin-resistant*). Mutant *axr1* jest typowym mutanem auksynowym charakteryzującym się zredukowaną dominacją wierzchołkową, ograniczonym grawitropizmem korzeni oraz zmniejszoną płodnością. Gen *AXR1*, sklonowany w laboratorium kierowanym przez Estelle [51], koduje białko homologiczne z enzymem E₁ funkcjonującym w aktywacji ubikwityny. Homologia między *AXR1* a enzymami E₁ z drożdży, owsa i enzymem ludzkim jest szczególnie wysoka w części N-końcowej. Polipeptyd *AXR1* o masie cząsteczkowej 60 kDa jest jednak znacznie krótszy od typowego enzymu E₁ i nie zawiera konserwatywnej cysteiny położonej w części C-końcowej E₁. Reszta cysteiny położona w tym regionie uczestniczy w tworzeniu wiązania tioestrowego z końcową grupą karboksylową ubikwityny. Zaktywowana w ten sposób ubikwityna jest następnie przekazywana na grupę hydrosulfidową enzymu E₂, z którego zostaje ostatecznie przeniesiona przez ligazę E₃ na docelowe białko substratowe (rys. 2a).



RYSunEK 2. Kaskady enzymów aktywujących ubikwitynę (Ubi) i białka ubikwitynopodobne (Rub1p i RUB1): a – ogólny schemat przedstawiający przyłączenie ubikwityny (Ubi) do substratu białkowego (S) przeznaczanego do degradacji, symbolami E₁, E₂ i E₃ oznaczono enzymy biorące udział kolejno w aktywacji, koniugacji i ligacji ubikwityny; b – kaskada drożdżowych odpowiedników enzymów E₁, E₂ i E₃ funkcjonujących w aktywacji białka ubikwitynopodobnego Rub1p i utworzeniu kowalencyjnego wiązania Rub1p z białkiem Cdc53p. Przeniesienie Rub1p na białko kulinowe reguluje aktywność kompleksu ligazowego SCF funkcjonującego w ubikwitynacji białka substratowego (S); c – zidentyfikowane u *Arabidopsis thaliana* składniki kaskady ubikwitynowej homologiczne z drożdżowymi enzymami. Białko ubikwitynopodobne RUB1 aktywowane jest przez białko dimeryczne AXR1/ECR1 odpowiadające enzymowi E₁. Zaktywowane RUB1 przenoszone jest kolejno na niezidentyfikowane jeszcze białko E₂, a następnie na białko z rodziny kulin, które wraz z białkami AtSKP i TIR1 tworzą kompleks SCF, odpowiednik ligazy E₃. Przyłączenie białka ubikwitynopodobnego RUB1 do SCF reguluje aktywność tego kompleksu. Białko TIR1 zawierające kasetę F jest składnikiem kompleksu ligazy odpowiedzialnym za rozpoznanie substratu (S) przeznaczanego do ubikwitynacji (na podstawie danych [20,31,52,79,82])

Kaskada enzymów związanych z aktywacją ubikwityny i wybiórczym „wyznaczeniem” białek substratowych przeznaczonych do degradacji bądź modyfikacji jest obecnie przedmiotem intensywnych badań biologii molekularnej. Przegląd najnowszych osiągnięć na tym szczególnie interesującym polu badań zawiera praca przeglądowa [31].

Efektom żmudnych badań prowadzonych głównie na drożdżach było wyjaśnienie roli systemu ubikwitynowego w regulacji cyklu komórkowego, szczególnie zaś regulacji przejścia z fazy G1 do fazy S. Rezultatem tych badań było między innymi poznanie białek ubikwitynopodobnych oraz enzymów funkcjonujących w ich aktywacji. Jednym z białek ubikwitynopodobnych wykazującym wysoki stopień homologii z ubikwityną (53% identyczności) jest białko Rub1p (*related to ubiquitin*). Rub1p wymaga do aktywacji heterodimerskiego enzymu zbudowanego z polipeptydów Enr2p i Uba2p [56] (rys. 2b). Drożdżowym odpowiednikiem enzymu E₂ funkcjonującym w koniugacji Rub1p jest białko UBC12, a funkcję ligazy E₃ pełni kompleks białkowy SCF. Określenie SCF pochodzi od nazwy trzech białek wchodzących w skład kompleksu, a mianowicie Skp1, białka z rodziny kulin (*cullin*) i białka zawierającego tzw. kasetę F (rys. 2b). Skp1 ma domenę wiążącą białka zawierające kasetę F [6]. Jednym z takich białek tworzącym kompleks z Skp1 jest białko Grr1. Białko to oprócz kasety F ma 12 powtórzeń bogatych w leucynę, które przypuszczalnie umożliwiają specyficzne wiązanie białka substratowego ulegającego ubikwitynacji [55]. Drożdżowym białkiem z rodziny kulin jest białko Cdc53p, które jak wykazały ostatnie badania tworzy kowalencyjne wiązanie z Rub1p. Przeniesienie białka ubikwitynopodobnego z UBC12 na Cdc53p reguluje aktywność ligacyjną całego kompleksu SCF [46]. Wiązanie białka ubikwitynopodobnego stanowi zatem nowy interesujący mechanizm regulujący aktywność kaskady ubikwitynowej.

Poznanie sekwencji aminokwasowej drożdżowego polipeptydu Enr2p tworzącego heterodimerskie białko E₁ ujawniło zaskakująco wysoki stopień homologii z białkiem AXR1 poznanym wcześniej u wspomnianego mutantu auksynowego *A. thaliana* [51,53]. W ostatnim czasie w genomie *A. thaliana* zidentyfikowano gen *ECR1* kodujący białko homologiczne z drożdżowym Uba2p. Białko ECR1 wykazuje wysoki stopień homologii z C-końcowym fragmentem enzymu E₁ i ma konserwatywną cysteinę w pozycji 215, która zwykle tworzy wiązanie tioestrowe z ubikwityną [20]. Niezależnie od tego w genomie *A. thaliana* stwierdzono obecność 3 genów kodujących białka ubikwitynopodobne RUB. Wszystkie trzy białka charakteryzują się wysokim stopniem homologii z Rub1p drożdży (57% identyczności) i ubikwityną (62% identyczności) [79]. Wykazano też eksperymentalnie, że RUB1 może tworzyć wiązanie tioestrowe z ECR1, ale tylko w warunkach, gdy są obecne obydwie polipeptydy AXR1 i ECR1 [20] (rys. 2c).

Dotychczas nie udało się zidentyfikować roślinnego białka odpowiadającego enzymowi E₂. Nieznane jest również białko z rodziny kulin (odpowiednik Cdc53p),

na które jest przypuszczalnie przenoszone białko ubikwitynopodobne RUB1. Zidentyfikowano i sklonowano pozostałe dwa składniki kompleksu białkowego SCF odpowiadającego ligazie E₃. W genomie *A. thaliana* zidentyfikowano gen kodujący białko SKP1 podlegający ekspresji we wszystkich tkankach merystematycznych [78]. Udało się też znaleźć inny potencjalny składnik kompleksu SCF, a mianowicie białko zawierające kasetę F. Białko to jest kodowane przez gen *TIR1* (*transport inhibitor response*) sklonowany u mutantu *A. thaliana* charakteryzującego się zmienioną odpowiedzią na działanie kwasu naftyloftalamowego (inhibitor transportu auksyn). Mutacja w genie *TIR1* prowadzi do defektów we wzroście wydłużeniowym hipokotyli i tworzeniu korzeni bocznych [82]. Białko TIR1 oprócz charakterystycznej kasety F zawiera 16 powtórzeń fragmentu bogatego w leucynę, czym przypomina białko Grr1 drożdży. Obecnie uważa się, że obydwa charakterystyczne elementy tych białek określają specyficzność interakcji w obrębie białek tworzących kompleks ligazy E₃ oraz determinują specyficzność względem docelowego białka substratowego mającego ulec proteolitycznej degradacji bądź modyfikacji [19].

Na obecnym etapie badań nie jest jasny związek kaskady enzymów aktywujących białko RUB1 ze szlakiem transdukcji sygnału auksynowego. Szukając analogii z poznawanym obecnie układem drożdżowym można jedynie przypuszczać, że kaskada enzymów aktywujących białko ubikwitynopodobne RUB1 reguluje aktywność kompleksu ligazy SCF. Białko TIR1 tworzące ten kompleks, podobnie jak Grr1 u drożdży, może funkcjonować w proteolitycznej degradacji inhibitora hamującego aktywność kinaz białkowych zależnych od cyklin, a w konsekwencji może uczestniczyć w regulowaniu cyklu komórkowego [52]. Drożdżowym inhibitorem kinaz białkowych jest białko Sic1, które ulega ubikwitynacji jedynie w formie ufosforylowanej. Ufosforylowanie inhibitora Sic1 prowadzi do jego ubikwitynacji przez kompleks SCF i degradacji w proteosomach [23,55,93]. Innym roślinnym białkiem, które może być ubikwitynowane przez opisaną kaskadę ubikwitynową, jest produkt genu *SAR1* [14,19,52]. Mutacja *sar1* (*suppressor of auxin resistance*) u *A. thaliana* jest epistatyczna w stosunku do *axr1* i znosi szereg zmian fenotypowych towarzyszących mutacji *axr1*. Poznany układ ubikwitynacji może także uczestniczyć w proteolitycznej degradacji produktów tzw. wczesnych genów auksynowych, które jak wiadomo są białkami o wyjątkowo krótkim czasie półtrwania.

GENY PIERWOTNYCH ODPOWIEDZI AUKSYNOWYCH

Jedną z dróg poznawania mechanizmu działania auksyn jest identyfikowanie i charakteryzowanie transkryptów mRNA oraz klonowanie odpowiadających im genów indukowanych przez egzogennie podaną auksynę. Badania tego typu, prowadzone od niemal dwóch dziesięcioleci, zaczynają w ostatnim czasie przynosić bardzo interesujące rezultaty. Efektem tych badań było między innymi poznanie elementów sekwencji promotorowych istotnych dla odpowiedzi auksynowych oraz

zidentyfikowanie niektórych czynników transkrypcyjnych regulowanych przez auksyny. Czytelnikowi zainteresowanemu tym pasjonującym kierunkiem poszukiwań polecamy prace przeglądowe opublikowane przez badaczy mogących się poszczycić niezaprzeczalnymi osiągnięciami w tym zakresie [1,3,25,26,27].

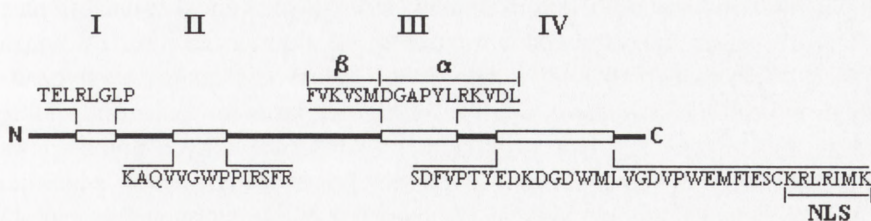
Spośród genów regulowanych przez auksyny specjalne zainteresowanie budzą tzw. wczesne geny, określane również jako geny pierwotnych odpowiedzi auksynowych. Auksyna podana zewnętrznie zmienia specyficznie i w bardzo krótkim czasie ekspresję niektórych genów. Określenie „wczesne geny” pochodzi stąd, że ich transkryptowe mRNA pojawiają się niemal natychmiast po wprowadzenia auksyny, a ich indukcja jest niezależna od syntezy białek *de novo*. Cykloheksimid, znany inhibitor syntezy białek, nie hamuje transkrypcji większości wczesnych genów, a w niektórych przypadkach nawet indukuje ich ekspresję bez udziału egzogennie podanej auksyny. Obserwacje te dowodzą, że czynniki konieczne do transkrypcji większości wczesnych genów są już obecne w komórce i w związku z tym sygnał auksynowy jest przekazywany do jądra bez konieczności syntezy nowych czynników białkowych.

Wczesne geny auksynowe zidentyfikowano w kiełkach roślin motylkowatych jako transkrypty mRNA poprzedzające lub towarzyszące indukowanemu przez auksyny wzrostowi wydłużeniowemu komórek. Geny te zidentyfikowano również w komórkach tytoniu hodowanych *in vitro*, których podziały są indukowane przez auksynę. Interesującym układem eksperymentalnym są też komórki mezofilowe cynii, które pod wpływem auksyn ulegają różnicowaniu i przeobrażają się w komórki naczyniowe [3,25,26,27].

Wczesne geny auksynowe, zidentyfikowane w komórkach rosnących bądź dzielących się, zostały podzielone na kilka rodzin na podstawie stopnia homologii sekwencji nukleotydowej. Liczba genów w poszczególnych klasach ciągle rośnie, ponieważ na podstawie poznanych już sekwencji klonowane są nowe geny. W ten sposób zidentyfikowano szereg wczesnych genów u *A. thaliana*. Wyczerpujący przegląd poznanych dotychczas genów wczesnych odpowiedzi auksynowych podaje Guilfoyle [27].

Pierwszą klasę wczesnych genów tworzą geny określane jako *Aux/IAA*. Poziom ich mRNA rośnie specyficznie pod wpływem auksyn w czasie od 5 do 60 min. Oprócz auksyn tylko cykloheksimid indukuje akumulację transkryptów *Aux/IAA*, co jak się okazało jest rezultatem ich stabilizacji i derepresji transkrypcji [43]. Geny *Aux/IAA* kodują hydrofilowe białka o masie cząsteczkowej od 19 do 36 kDa. Mimo dużego zróżnicowania sekwencji (35–85% identyczności) wszystkie białka zawierają 4 konserwatywne fragmenty określane jako domeny I, II, III i IV, utworzone z 7 do 40 reszt aminokwasowych (rys. 3).

Geny tworzące rodzinę *SAUR* (*small auxin up RNA*) zidentyfikowano w soi, fasoli i rzodkiewniku. Transkrypty mRNA *SAUR* pojawiają się już po 2–5 min



RYSUNEK 3. Schemat budowy białka Aux/IAA z zaznaczonymi czterema domenami (I, II, III i IV) i ich sekwencjami aminokwasowymi. Domena III zawiera sekwencję tworzącą strukturę typu βαα mogącą uczestniczyć w dimeryzacji bądź wiązać się z DNA. Domena IV ma sekwencję NLS określaną jako sygnał lokalizacji jądrowej (na podstawie danych [42,73])

od podania auksyny. Geny *SAUR* kodują polipeptydy o masie cząsteczkowej 9–10 kDa charakteryzujące się bardzo krótkim czasem półtrwania.

Geny należące do pozostałych trzech klas są stosunkowo słabo poznane. Obecnie wiadomo, że tylko niektóre geny należące do tych rodzin są specyficznie indukowane przez auksyny, inne natomiast mogą być indukowane przez inne fitohormony, a także różne czynniki stresowe. Najliczniejszą klasę tworzą geny z rodziny transferazy glutationowej (GST) katalizującej koniugację glutationu z różnymi substratami. Odrębną klasę tworzą geny kodujące syntazę kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyowego (ACC), enzymu uczestniczącego w przemianach metioniny do etylenu. Nieliczną rodzinę tworzą geny *GH₃*, których cDNA sklonowano z hipokotyli soi, a homologiczne sekwencje znaleziono również w genomie rzodkiewnika [27].

W badaniach wczesnych genów auksynowych najwięcej uwagi poświęcono genom należącym do klas *Aux/IAA* i *SAUR*. Niemal od początku zaczęto zakładać, że produkty genów odpowiedzi pierwotnych są elementami mechanizmów regulujących ekspresję „późnych” genów auksynowych, a także że produkty niektórych genów mogą być ogniwami szlaku transdukcji sygnału auksynowego. W kontekście tych sugestii interesujące wydają się być badania ekspresji wczesnych genów u mutantów auksynowych. Mutanty *axr1* i *axr2* rzodkiewnika i *dgt* pomidora o zmienionej wrażliwości na auksyny charakteryzują się istotnym obniżeniem poziomu mRNA genów *SAUR* i *Aux/IAA* w odpowiedzi na podaną auksynę [27]. W przypadku mutantu *axr1* wyniki te mogą wskazywać na udział układu ubikwitynowego w regulowaniu transkrypcji co najmniej niektórych genów wczesnych odpowiedzi auksynowych.

Geny *PS-IAA4/5* i *PS-IAA6* grochu, *Aux22* i *Aux28* soi, *ARG3* i *ARG4* fasoli oraz *AtAux2-11* i *AtAux2-27* rzodkiewnika należące do klasy *Aux/IAA* mają szereg podobieństw strukturalnych [26,27]. Masa cząsteczkowa ich produktów mieści się w zakresie od 19 do 36 kDa. Stopień identyczności jest zróżnicowany, ale na ogół mieści się w przedziale od 36 do 87%. Wszystkie wymienione białka mają 4 charakterystyczne domeny (rys. 3). Domeny I i II są stosunkowo krótkie, natomiast

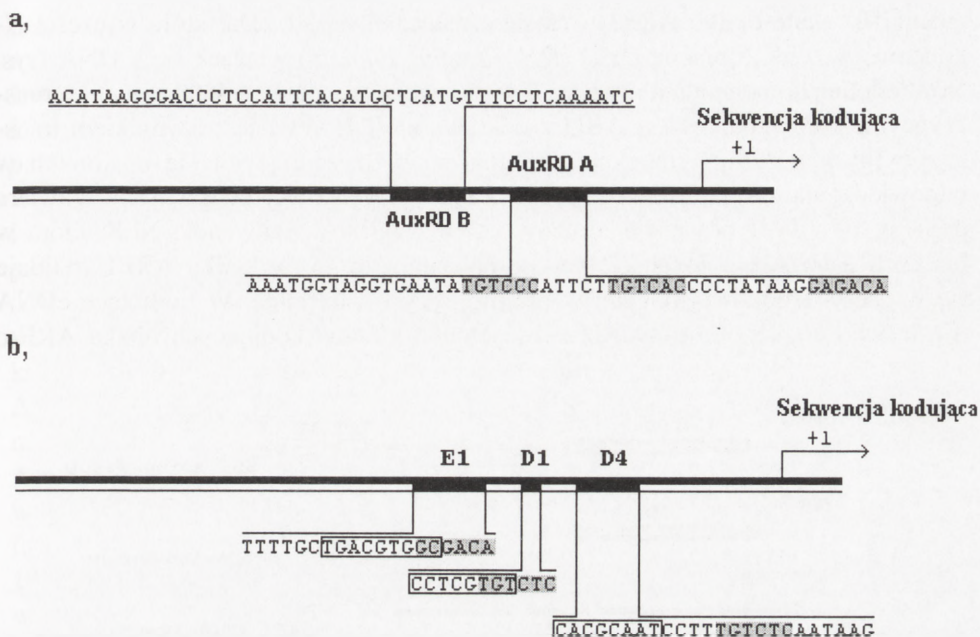
domenę III stanowi nieco dłuższy fragment, którego sekwencja wskazuje na możliwość tworzenia struktury typu $\beta\alpha\alpha$ biorącej udział w dimeryzacji bądź w wiązaniu DNA [42]. Wszystkie białka tej rodziny mają sekwencję charakterystyczną dla białek jądrowych (NLS) (*nuclear localization signal*), która jest położona w obrębie najdłuższej IV domeny [2]. Obecność czterech konserwatywnych domen u wszystkich przedstawicieli rodziny *Aux/IAA* liczącej już około 25 genów sugeruje, że ich produkty pełnią podobną funkcję. W ostatnim czasie sklonowano gen *AXR3* u znanego wcześniej mutantu auksynowego *A. thaliana*. Mutant *axr3* wykazuje szereg fenotypowych cech świadczących o zmienionej wrażliwości, w tym częściowej nadwrażliwości w stosunku do auksyn [53]. Dopiero niedawno okazało się, że gen *AXR3* należy do rodziny wczesnych genów auksynowych *Aux/IAA* i jest identyczny ze sklonowanym wcześniej genem *IAA17*. Wykazano ponadto, że białko *AXR3/IAA17* pełni rolę czynnika transkrypcyjnego kontrolującego ekspresję genu *SAUR-AC1* [81].

SEKWENCJE PROMOTOROWE I CZYNNIKI ODPOWIEDZI AUKSYNOWYCH

Porównanie sekwencji promotorowych wczesnych genów auksynowych pozwoliło na wyodrębnienie dwóch rodzajów elementów odpowiedzi auksynowych *Aux RE* (*auxin responsive element*). Pierwszy typ występuje w genach indukowanych nie tylko przez auksyny, ale także przez inne fitohormony i niektóre czynniki zewnątrzkomórkowe. Ze względu na brak wyraźnej specyficzności względem auksyn, ten rodzaj sekwencji budzi obecnie mniejsze zainteresowanie badaczy. Drugi typ *Aux RE* występuje w genach aktywowanych jedynie przez auksyny i badany jest głównie w genach wczesnych odpowiedzi auksynowych. Pierwszym zidentyfikowanym *cis*-elementem zawierającym charakterystyczną sekwencję jest *Aux RE* genów *PS-IAA4/5* i *PS-IAA6* [73]. Podobne sekwencje znaleziono również w obrębie promotorów genów *GH3* i *SAUR 15A* soi oraz genu *SAUR AC1* z *A. thaliana* [1,26,27]. Promotory tych genów zawierają jedną bądź kilka kopii konserwatywnego motywu TGTCTC lub pewne jego odmiany (TGTCCC lub TGTCAC).

Gen *PS-IAA4/5* grochu należący do klasy *Aux/IAA* ma w części promotorowej sekwencję utworzoną przez 164 par zasad, w obrębie której położone są dwie domeny funkcjonujące kooperatywnie w odpowiedzi auksynowej (rys. 4a). Domena A (*Aux RD A*) zbudowana z 48 par zasad działa jako włącznik, natomiast domena B (*Aux RD B*) zawierająca 44 par zasad funkcjonuje jako sekwencja wzmacniająca i to niezależnie od orientacji.

Gen *GH3* soi zawiera 3 elementy (*Aux RE*) oznaczone jako D1, D4 i E1 (rys. 4b). Domeny D1 i D4 zawierają sekwencję TGTCTC, która jest konieczna, ale niewystarczająca do funkcjonowania *Aux RE*. W aktywacji uczestniczą sekwencje

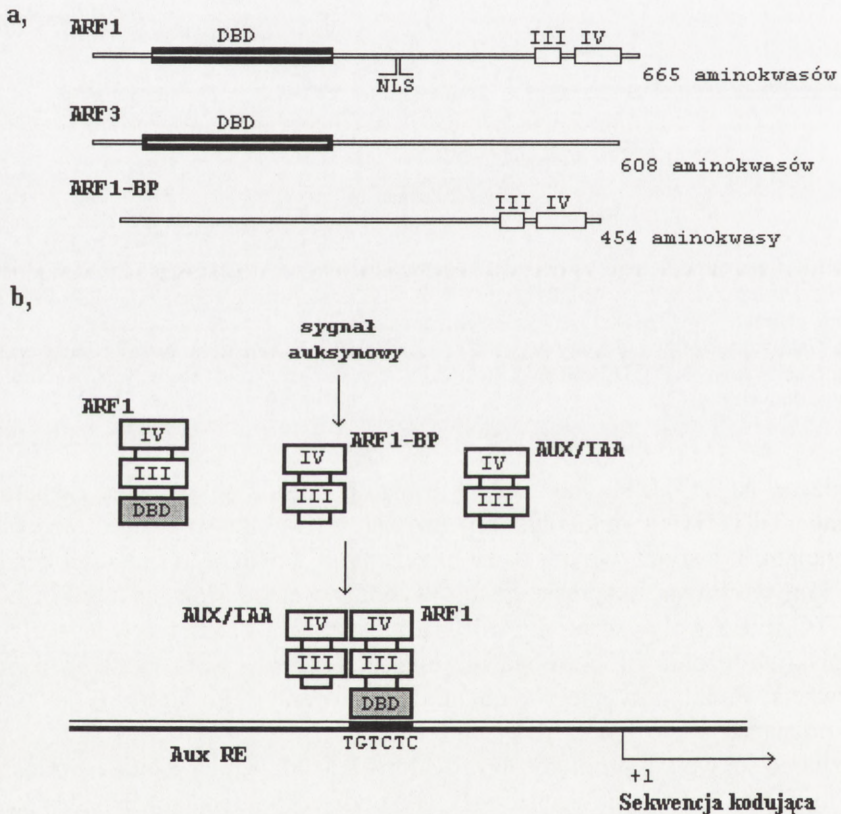


RYSUNEK 4. Schemat elementów odpowiedzi auksynowych (Aux RE) występujących w promotorach genów *PS-IAA4/5* i *GH3*: a – Aux RE genu *PS-IAA4/5* zawiera dwie domeny AuxRD A i AuxRD B. Położenie charakterystycznej sekwencji nukleotydowej TGTCTC zaznaczono ciemnymi prostokątami; b – gen *GH3* zawiera trzy elementy Aux RE oznaczone jako E1, D1 i D4. Na schemacie zaznaczono położenie sekwencji TGTCTC (ciemne prostokąty) i sekwencji konstytutywnych (w ramkach) (na podstawie danych [26,73])

zachodzące na TGTCTC, tak jak to jest w D1, bądź sekwencje oddzielone od elementu TGTCTC 4 nukleotydami, tak jak w D4. Sekwencje te nazywane są sekwencjami konstytutywnymi bądź sprzężonymi, bowiem to one odpowiedzialne są za konstytutywną ekspresję genu. W zależności od stężenia auksyn element TGTCTC może wpływać na represję bądź aktywację konstytutywnego elementu. Przy niskim stężeniu fitohormonu ma miejsce represja, przy wyższym derepresja i aktywacja. Funkcja trzeciego elementu E1 zawierającego kasetę G jest na razie słabo poznana.

Poznanie sekwencji promotorowych odpowiedzialnych za regulację transkrypcji wczesnych genów auksynowych umożliwiło podjęcie interesujących badań nad identyfikacją i klonowaniem czynników transkrypcyjnych. W badaniach wykorzystano palindromowo powtórzony element TGTCTC, który swoiście wiąże białka. Sekwencja aminokwasowa izolowanych białek umożliwiła znalezienie w bibliotece cDNA *A. thaliana* szereg klonów, których produkty są specyficznie wiązane przez elementy zawierające charakterystyczną sekwencję [97]. Białka te nazwano czynnikami odpowiedzi auksynowej ARF (*auxin response factor*). Jako pierwsze zostało

zidentyfikowane białko ARF1 o masie cząsteczkowej 74 kDa, które w części N-końcowej zawiera domenę DBD (*DNA binding domain*) wiążącą się z DNA (rys. 5a). Podobną domenę mają w części C-końcowej poznane wcześniej czynniki transkrypcyjne VP1 kukurydzy i ABI3 rzodkiewnika [27]. VP1 jest czynnikiem transkrypcyjnym regulującym ekspresję genów w rozwijających się nasionach w odpowiedzi na kwas abscysynowy. W części C-końcowej białko ARF1 zawiera domeny III i IV typowe dla rodziny białek Aux/IAA. Sekwencja NLS, która w białkach Aux/IAA położona jest w obrębie domeny IV w białku ARF1 znajduje się w części środkowej bogatej w prolinę, serynę i treoninę. W bibliotece cDNA *A. thaliana* znaleziono dotychczas 10 pełnych klonów kodujących białka ARF o



RYSUNEK 5. Schemat budowy i proponowany mechanizm działania czynników transkrypcyjnych: a – schemat pokazuje budowę trzech czynników odpowiedzi auksynowych (ARF1, ARF3 i ARF1-BP); zaznaczono położenie domen wiążących DNA (DBD), domen III i IV homologicznych z odpowiednimi domenami białek z rodziny Aux/IAA i sekwencji lokalizacji jądrowej (NLS); b – czynniki transkrypcyjne ARF, ARF1-BP i Aux/IAA mogą tworzyć homo- lub heterodimery dzięki obecności domen III i IV. Regulowana przez sygnał auksynowy dimeryzacja czynników transkrypcyjnych zmienia ich wiązanie do Aux RE, prowadząc do ekspresji bądź represji genu (na podstawie [26,97])

zróżnicowanej masie cząsteczkowej [26]. Niektóre z tych sekwencji kodują nieco mniejsze białka, takie jak np. ARF3, które nie mają w części C-końcowej domeny III i IV (rys. 5a). Produkt innego genu nie zawiera typowej domeny wiążącej DNA, a ma jedynie domeny III i IV. Białko to nazwano ARF1-BP (*ARF1-binding protein*) [97].

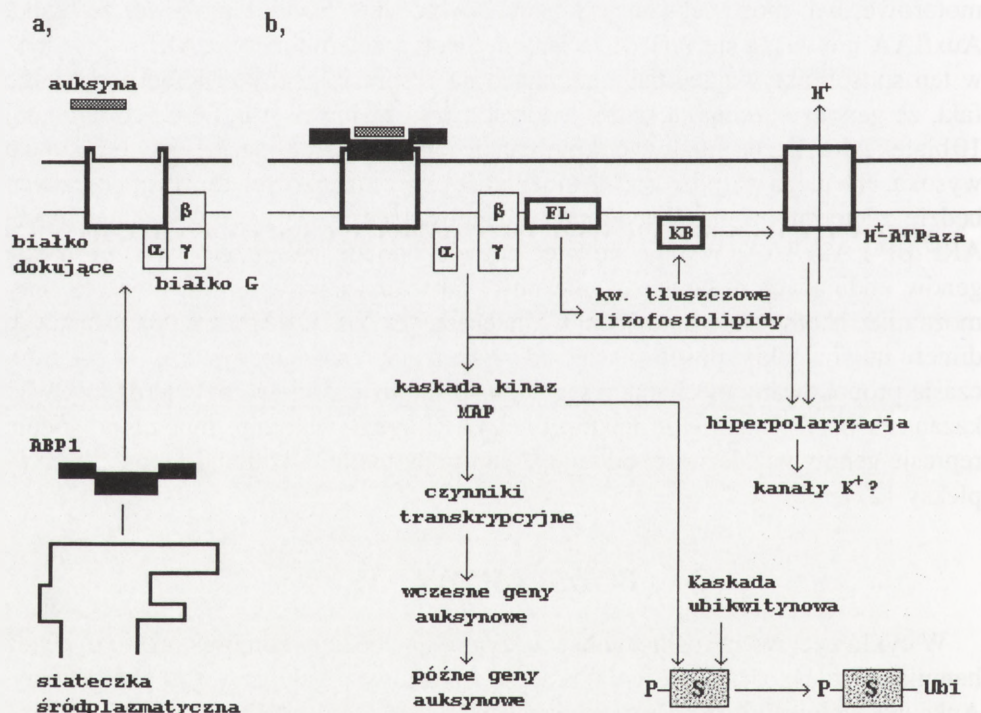
Na obecnym etapie badań mechanizm funkcjonowania czynników ARF, ARF-BP i białek Aux/IAA nie jest do końca jasny. Zakłada się, że niemal wszystkie wymienione białka z uwagi na posiadaną strukturę $\beta\alpha$ w obrębie domeny III mogą tworzyć homo- i heterodimery. Białka Aux/IAA występują w śladowych ilościach w jądrze i jak wykazały badania mutantu *axr3* pełnią funkcję czynników transkrypcyjnych. Wiadomo też, że białka Aux/IAA nie wiążą się z elementem TGTCTC Aux ER, co może sugerować, że elementami wiążącymi są inne sekwencje promotorowe, być może sekwencje konstytutywne. Jest również możliwe, że białka Aux/IAA nie wiążą się z DNA, a jedynie tworzą heterodimery z ARF wpływając w ten sposób aktywująco bądź hamująco na ekspresję genów. Biorąc pod uwagę fakt, że genom *A. thaliana* może kodować około 25 białek Aux/IAA i co najmniej 10 białek ARF, liczba możliwych kombinacji homo- i heterodimerów jest zaskakująco wysoka. Nie ulega wątpliwości, że możliwość tworzenia różnych form dimerycznych będzie zdeterminowana obecnością w danej tkance poszczególnych białek ARF, ARF-BP i Aux/IAA. Wydaje się więc prawdopodobne, że zróżnicowana ekspresja genów kodujących te białka w zależności od tkanki czy fazy rozwojowej rośliny może mieć istotne znaczenie, jednak ostateczna decyzja co do rodzaju powstającego dimeru musi w jakiś sposób zależeć od sygnału auksynowego (rys. 5b). W ostatnim czasie proponowany mechanizm regulacji został już częściowo potwierdzony. Wykazano eksperymentalnie, że niektóre białka ARF są aktywatorami, inne zaś powodują represję genów w zależności od tego, z jakimi partnerami tworzą dimeryczne kompleksy [27].

PODSUMOWANIE

W cyklu życiowym rośliny auksyny stymulują podziały komórek, aktywują bądź hamują (w zależności od stężenia) procesy wzrostowe regulując wzrost elongacyjny. Auksyny wpływają też na różnicowanie komórek i wykształcanie tkanki przewodzącej oraz uczestniczą w zawiązywaniu pąków, korzeni bocznych i kontrolowaniu bocznych odgałęzień pędu. Tak ogromna różnorodność odpowiedzi na jeden hormon zmusza do zastanawiania się nad złożonością układu percepcji i transdukcji sygnału auksynowego. Na przestrzeni ostatnich niemal trzydziestu lat zidentyfikowano wiele białek wiążących auksyny, spośród których tylko ABP1 jest obecnie poważnym kandydatem do roli białka receptorowego, a ściślej składnika kompleksu receptorowego funkcjonującego w percepcji sygnału auksynowego. W skład takiego kompleksu obok ABP1 powinno jeszcze wchodzić integralne białko błonowe (białko

„dokujące”), które przenosi zmiany konformacyjne w ABP1, towarzyszące wiązaniu auksyny, na białko G (rys. 6a). Mimo że takie białko transbłonowe nie zostało jeszcze zidentyfikowane, to o jego obecności w błonie plazmatycznej może świadczyć wysyceniowy charakter miejsc wiążących oczyszczone ABP1 na pęcherzykach błon plazmatycznych.

W poprzednich rozdziałach zwrócono uwagę na wątpliwości wynikające z lokalizacji subkomórkowej ABP1, a na powierzchni plazmolemy znajdującego doświadczalnie miejsca percepcji auksyny. Propozycja niektórych autorów dotycząca „zapasowej puli” ABP1 wewnątrz siateczki śródplazmatycznej wydaje się mało przekonująca, chociaż szereg obserwacji może rzeczywiście sugerować taką możliwość. Niewielka pula ABP1 przemieszczająca się z siateczki na zewnątrz pla-



RYSUNEK 6. Schemat ilustrujący proponowany mechanizm percepcji i transdukcji sygnału auksynowego: a – ABP1 zlokalizowane głównie wewnątrz siateczki śródplazmatycznej ulega w pewnych warunkach sekrecji i wiąże się z transbłonowym białkiem „dokującym”; b – kompleks receptorowy w wyniku związania auksyny aktywuje za pośrednictwem białka G fosfolipazę A₂ (FL). Kwasy tłuszczowe i lizofosfolipidy, produkty hydrolizy fosfolipidów, aktywują kinazę białkową (KB), a ta fosforyluje plazmatyczną H⁺-ATPazę regulując transport protonów przez plazmolemę. Na schemacie zaznaczono również przypuszczalne miejsce kaskady kinaz MAP w łańcuchu transdukcji sygnału. Zgodnie z proponowanym schematem kinaza MAP funkcjonuje w regulacji ekspresji genów wczesnych odpowiedzi auksynowych oraz fosforyluje białka regulatorowe przeznaczone do ubiquitynacji

zmolemy, z drugiej zaś strony grupowanie się ABP1 pod wpływem dodanej auksyny na powierzchni plazmolemy, które może prowadzić do tworzenia pęcherzyków klatrynowych, może potwierdzać powyższą koncepcję cyklicznego obiegu ABP1. Wydaje się, że zidentyfikowanie białka dokującego, które w założeniu powinno być białkiem integralnym plazmolemy, powinno wyjaśnić szereg wątpliwości.

Ostatnie dziesięciolecie przyniosło szczególnie dużo wyników przemawiających na korzyść receptorowej funkcji ABP1. Podsumowując te wyniki należy stwierdzić, że ABP1 uczestniczy w indukowanych przez auksyny zmianach błonowego potencjału elektrochemicznego. Wyniki doświadczeń prowadzonych na protoplastach świadczą o zewnątrzkomórkowej lokalizacji receptora oraz wyraźnie wskazują na receptorową rolę ABP1. Przeciwciała przeciw całemu ABP1 działają antagonistycznie w stosunku do auksyny, natomiast syntetyczne peptydy, a także przeciwciała przeciw D16 bądź C-końcowemu fragmentowi wywołują efekt taki jak agonista. Łańcuch transdukcji sygnału prowadzący do aktywacji plazmatycznej H^+ -ATPazy, a obejmujący białko G, fosfolipazę A_2 uwalniającą wtórne przekaźniki pochodzenia lipidowego oraz kinazę białkową fosforylującą H^+ -ATPazę jest obecnie najlepiej eksperymentalnie udokumentowanym szlakiem przenoszącym sygnał auksynowy (rys. 6b). Badania prowadzone na transgenicznym tytoniu i komórkach bielma kukurydzy z włączonym genem *ABP1* sugerują, że również w reakcjach związanych ze wzrostem komórki sygnał auksynowy odbierany jest przez ABP1. Jak na razie brakuje informacji na temat ewentualnego funkcjonowania ABP1 w szlaku sygnalizacyjnym prowadzącym do zmian w ekspresji genów. Zastanawiający jest powód, dla którego nie podjęto jeszcze tego typu badań, mimo że problematyka związana z ekspresją wczesnych genów auksynowych jest szeroko badana od ponad dziesięciu lat. Obiecujące, chociaż nieliczne jeszcze badania nad indukcją wczesnych genów auksynowych skierowują uwagę badaczy na kaskadę kinaz MAP jako jedno z ogniw w szlaku prowadzącym od receptora do czynników transkrypcyjnych. Kaskada kinaz MAP może ponadto funkcjonować w przekazywaniu sygnału auksynowego na układy regulujące cykl komórkowy. Wiadomo, że fosforylacja, w tym również fosforylacja przez kinazę MAP, podobnie jak selektywna proteolityczna degradacja białek regulatorowych, stanowi podstawowy element mechanizmu regulującego cykl komórkowy. Regulacja cyklu komórkowego u roślin jest jeszcze bardzo słabo poznana i dlatego odkrywanie nowych elementów tego mechanizmu nawiązujących do znanych już u innych organizmów, a szczególnie do najlepiej poznanych układów drożdżowych, zasługuje na szczególne podkreślenie. Poznanie związku między sygnałem auksynowym a układem ubikwitynacji białek regulowanym przez białka ubikwitynopodobne jest właśnie takim nowym wyzwaniem w badaniach transdukcji sygnału auksynowego.

LITERATURA

- [1] ABEL S, BALLAS N, WONG L-M, THEOLOGIS A. DNA elements responsive to auxin. *BioEssays* 1996; **18**: 647–654.
- [2] ABEL S, THEOLOGIS A. A polymorphic bipartite motif signals nuclear targeting of early auxin-inducible proteins related to PS-IAA4 from pea (*Pisum sativum*). *Plant J* 1995; **8**: 87–96.
- [3] ABEL S, THEOLOGIS A. Early genes and auxin action. *Plant Physiol* 1996; **111**: 9–17.
- [4] ANAI T, MIYATA M, KOSEMURA S, YAMAMURA S, TSUGE T, MATSUI M, UCHIDA H, HASEGAWA K. Comparison of *abpl* primary sequences from monocotyledonous and dicotyledonous species. *J Plant Physiol* 1997; **151**: 446–449.
- [5] ANDRÉ B, SCHERER GFE. Stimulation by auxin of phospholipase A in membrane vesicles from an auxin-sensitive tissue is mediated by an auxin receptor. *Planta* 1991; **185**: 209–214.
- [6] BAI C, SEN P, HOFMANN K, MA L, GOEBL M, HARPER JW, ELLEDGE SJ. *SKP1* connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* 1996; **86**: 263–274.
- [7] BARAŃSKA J. Przekazywanie sygnałów w komórce roślinnej; receptory błony komórkowej. *Post Biochem* 1998; **44**: 201–208.
- [8] BARBIER-BRYGOO H, EPHRITIKHINE G, KLÄMBT D, GHISLAIN M, GUERN J. Functional evidence for an auxin receptor at the plasmalemma of tobacco mesophyll protoplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 891–895.
- [9] BARBIER-BRYGOO H, EPHRITIKHINE G, KLÄMBT D, MAUREL C, PALME K, SCHELL J, GUERN J. Perception of the auxin signal at the plasma membrane of tobacco mesophyll protoplasts. *Plant J* 1991; **1**: 83–93.
- [10] BARBIER-BRYGOO H. Tracking auxin receptors using functional approaches. *Crit Rev Plant Sci* 1995; **14**: 1–25.
- [11] BENNETT MJ, MARCHANT A, GREEN HG, MAY ST, WARD SP, MILLNER PA, WALKER AR, SCHULZ B, FELDMANN KA. *Arabidopsis AUX1* gene: A permease-like regulator of root gravitropism. *Science* 1996; **273**: 948–950.
- [12] BRONSEMA FB, VAN OOSTVEEN WJF, VAN LAMMEREN AAM. Immunocytochemical localisation of auxin-binding proteins in coleoptiles and embryos of *Zea mays* L. *Protoplasma* 1998; **202**: 65–75.
- [13] BROWN JC, JONES AM. Mapping the auxin-binding site of auxin-binding protein 1. *J Biol Chem* 1994; **269**: 21136–21140.
- [14] CERNAC A, LINCOLN C, LAMMER D, ESTELLE M. The *SAR1* gene of *Arabidopsis* acts downstream of the *AXR1* gene in auxin response. *Development* 1997; **124**: 1583–1591.
- [15] CHAPMAN KD. Phospholipase activity during plant growth and development and in response to environmental stress. *Trends Plant Sci* 1998; **3**: 419–426.
- [16] CHOI S-Y. Molecular cloning and expression of the hot pepper *ERabp1* gene encoding auxin-binding protein. *Plant Mol Biol* 1996; **32**: 995–997.
- [17] CLAUSSEN M, LUTHEN H, BOTTGER M. Inside or outside? Localization of the receptor relevant to auxin-induced growth. *Physiol Plant* 1996; **98**: 861–867.
- [18] COUSSON A, VAVASSEUR A. Putative involvement of cytosolic Ca^{2+} and GTP-binding proteins in cyclic-GMP-mediated induction of stomatal opening by auxin in *Commelina communis* L. *Planta* 1998; **206**: 308–314.
- [19] DEL POZO JC, ESTELLE M. Function of the ubiquitin-proteasome pathway in auxin response. *Trends Plant Sci* 1999; **4**: 107–112.
- [20] DEL POZO JC, TIMPTE C, TAN S, CALLIS J, ESTELLE M. The ubiquitin-related protein RUB1 and auxin response in *Arabidopsis*. *Science* 1998; **280**: 1760–1763.

- [21] DIEKMANN W, VENIS MA, ROBINSON DG. Auxins induce clustering of the auxin-binding protein at the surface of maize coleoptile protoplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 3425–3429.
- [22] DOHRMANN U, HERTEL R, KOWALIK H. Properties of auxin binding sites in different subcellular fractions from maize coleoptiles. *Planta* 1978; **140**: 97–106.
- [23] FELDMAN RMR, CORRELL CC, KAPLAN KB, DESHAIES RJ. A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell* 1997; **91**: 221–230.
- [24] GEHRING CA, MCCONCHIE RM, VENIS MA, PARISH RW. Auxin-binding-protein antibodies and peptides influence stomatal opening and alter cytoplasmic pH. *Planta* 1998; **205**: 581–586.
- [25] GUILFOYLE T, HAGEN G, ULMASOV T, MURFETT J. How does auxin turn on genes? *Plant Physiol* 1998; **118**: 341–347.
- [26] GUILFOYLE TJ, ULMASOV T, HAGEN G. The ARF family of transcription factors and their role in plant hormone-responsive transcription. *Cell Mol Life Sci* 1998; **54**: 619–627.
- [27] GUILFOYLE TJ. Auxin-regulated genes and promoters. [w] Hooykaas PJJ, Hall MA, Libbenga KR [red.] *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*. Elsevier Science BV 1999; 423–459.
- [28] HARNDEN D, JONES AM. Organ distribution of auxin-binding protein 1 in the etiolated maize seedling. *J Plant Growth Regul* 1995; **14**: 109–113.
- [29] HENDERSON J, ATKINSON AE, LAZARUS CM, HAWES CR, NAPIER RM, MACDONALD H, KING LA. Stable expression of maize auxin-binding protein in insect cell lines. *FEBS Lett* 1995; **371**: 293–296.
- [30] HENDERSON J, BAULY JM, ASHFORD DA, OLIVER SC, HAWES CR, LAZARUS CM, VENIS MA, NAPIER RM. Retention of maize auxin-binding protein in the endoplasmic reticulum: quantifying escape and the role of auxin. *Planta* 1997; **202**: 313–323.
- [31] HERSHKO A, CIECHANOVER A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998; **67**: 425–479.
- [32] HERTEL R, THOMSON K-S, RUSSO VEA. *In-vitro* auxin binding to particulate cell fractions from corn coleoptiles. *Planta* 1972; **107**: 325–340.
- [33] HESSE T, FELDWISCH J, BALSHÜSEMANN D, BAUW G, PUYPE M, VANDEKERCKHOVE J, LÖBLER M, KLÄMBT D, SCHELL J, PALME K. Molecular cloning and structural analysis of a gene from *Zea mays* (L.) coding for a putative receptor for the plant hormone auxin. *EMBO J* 1989; **8**: 2453–2461.
- [34] HESSE T, GARBERS C, BRZOBOHATY B, KREIMER G, SÖLL D, MELKONIAN M, SCHELL J, PALME K. Two members of the *ERabp* gene family are expressed differentially in reproductive organs but to similar levels in the coleoptile of maize. *Plant Mol Biol* 1993; **23**: 57–66.
- [35] HOBBIIE LJ. Auxin: Molecular genetic approaches in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* 1998; **36**: 91–102.
- [36] INOHARA N, SHIMOMURA S, FUKUI T, FUTAI M. Auxin-binding protein located in the endoplasmic reticulum of maize shoots: Molecular cloning and complete primary structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 3564–3568.
- [37] JONAK C, LIGTERINK W, HIRT H. MAP kinases in plant signal transduction. *Cell Mol Life Sci* 1999; **55**: 204–213.
- [38] JONES AM, HERMAN EM. KDEL-containing auxin-binding protein is secreted to the plasma membrane and cell wall. *Plant Physiol* 1993; **101**: 595–606.
- [39] JONES AM, IM K-H, SAVKA MA, WU M-J, DEWITT NG, SHILLITO R, BINNS AN. Auxin-dependent cell expansion mediated by overexpressed auxin-binding protein 1. *Science* 1998; **282**: 1114–1117.

- [40] JONES AM, LAMERSON P, VENIS MA. Comparison of site I auxin binding and a 22-kilodalton auxin-binding protein in maize. *Planta* 1989; **179**: 409–413.
- [41] JONES AM. Auxin-binding proteins. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1994; **45**: 393–420.
- [42] KIM J, HARTEK K, THEOLOGIS A. Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 11786–11791.
- [43] KOSHIBA T, BALLAS N, WONG L-M, THEOLOGIS A. Transcriptional regulation of *PS-IAA4/5* and *PS-IAA6* early gene expression by indoleacetic acid and protein synthesis inhibitors in pea (*Pisum sativum*). *J Mol Biol* 1995; **253**: 396–413.
- [44] KOVTUN Y, CHIU W-L, ZENG W, SHEEN J. Suppression of auxin signal transduction by a MAPK cascade in higher plants. *Nature* 1998; **395**: 716–720.
- [45] KOWALCZYK S, JAKUBOWSKA A. Receptory etylenu, cytokinin i brasinosteroidów transmembranowymi kinazami białkowymi? *Post Biol Kom* 1999; **26**: 3–32.
- [46] LAMMER D, MATHIAS N, LAPLAZA JM, JIANG W, LIU Y, CALLIS J, GOEBL M, ESTELLE M. Modification of yeast Cdc53p by the ubiquitin-related protein Rub1p affects function of the SCF^{Cdc4} complex. *Genes Dev* 1998; **12**: 914–926.
- [47] LAZARUS CM, MACDONALD H. Characterization of a strawberry gene for auxin-binding protein, and its expression in insect cells. *Plant Mol Biol* 1996; **31**: 267–277.
- [48] LEBLANC N, PERROT-RECHENMANN C, BARBIER-BRYGOO H. The auxin-binding protein Nt-ERabp1 alone activates an auxin-like transduction pathway. *FEBS Lett* 1999; **449**: 57–60.
- [49] LEBLANC N, ROUX C, PRADIER J-M, PERROT-RECHENMANN C. Characterization of two cDNAs encoding auxin-binding proteins in *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol Biol* 1997; **33**: 679–689.
- [50] LEWAK S. Hormony roślinne – kierunki badań ostatniego dziesięciolecia. *Kosmos* 1995; **44**: 601–622.
- [51] LEYSER HMO, LINCOLN CA, TIMPTE C, LAMMER D, TURNER J, ESTELLE M. *Arabidopsis* auxin-resistance gene *AXR1* encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature* 1993; **364**: 161–164.
- [52] LEYSER O. Auxin signalling: protein stability as a versatile control target. *Curr Biol* 1998; **8**: R305–R307.
- [53] LEYSER O. Auxin: lessons from a mutant weed. *Physiol Plant* 1997; **100**: 407–414.
- [54] LEYSER O. Plant hormones: Ins and outs of auxin transport. *Curr Biol* 1999; **9**: R8–R10.
- [55] LI FN, JOHNSTON M. Grr1 of *Saccharomyces cerevisiae* is connected to the ubiquitin proteolysis machinery through Skp1: coupling glucose sensing to gene expression and the cell cycle. *EMBO J* 1997; **16**: 5629–5638.
- [56] LIAKOPOULOS D, DOENGES G, MATUSCHEWSKI K, JENTSCH S. A novel protein modification pathway related to the ubiquitin system. *EMBO J* 1998; **17**: 2208–2214.
- [57] LÖBLER M, KLÄMBT D. Auxin-binding protein from coleoptile membranes of corn (*Zea mays* L.). I. Purification by immunological methods and characterization. *J Biol Chem* 1985; **260**: 9848–9853.
- [58] LÖBLER M, KLÄMBT D. Auxin-binding protein from coleoptile membranes of corn (*Zea mays* L.). II. Localization of a putative auxin receptor. *J Biol Chem* 1985; **260**: 9854–9859.
- [59] MACDONALD H, HENDERSON J, NAPIER RM, VENIS MA, HAWES C, LAZARUS CM. Authentic processing and targeting of active maize auxin-binding protein in the baculovirus expression system. *Plant Physiol* 1994; **105**: 1049–1057.
- [60] MACDONALD H. Auxin perception and signal transduction. *Physiol Plant* 1997; **100**: 423–430.
- [61] MARCHANT A, KARGUL J, MAY ST, MULLER P, DELBARRE A, PERROT-RECHENMANN C, BENNETT MJ. AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO J* 1999; **18**: 2066–2073.

- [62] MILLNER PA, GROARKE DA, WHITE IR. Synthetic peptides as probes of plant cell signalling – G-proteins and the auxin signalling pathway. *Plant Growth Regul* 1996; **18**: 143–147.
- [63] MILLNER PA. The auxin signal. *Curr Opin Cell Biol* 1995; **7**: 224–231.
- [64] MIZOGUCHI T, GOTOH Y, NISHIDA E, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, HAYASHIDA N, IWASAKI T, KAMADA H, SHINOZAKI K. Characterization of two cDNAs that encode MAP kinase homologues in *Arabidopsis thaliana* and analysis of the possible role of auxin in activating such kinase activities in cultured cells. *Plant J* 1994; **5**: 111–122.
- [65] MUNNIK T, IRVINE RF, MUSGRAVE A. Phospholipid signalling in plants. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1389**: 222–272.
- [66] NAKASHIMA M, HIRANO K, NAKASHIMA S, BANNO H, NISHIHAMA R, MACHIDA Y. The expression pattern of the gene for *NPK1* protein kinase related to mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) in a tobacco plant: Correlation with cell proliferation. *Plant Cell Physiol* 1998; **39**: 690–700.
- [67] NAPIER RM, FOWKE LC, HAWES C, LEWIS M, PELHAM HRB. Immunological evidence that plants use both HDEL and KDEL for targeting proteins to the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 1992; **102**: 261–271.
- [68] NAPIER RM, VENIS MA, BOLTON MA, RICHARDSON LI, BUTCHER GW. Preparation and characterisation of monoclonal and polyclonal antibodies to maize membrane auxin-binding protein. *Planta* 1988; **176**: 519–526.
- [69] NAPIER RM, VENIS MA. Auxin action and auxin-binding proteins. *New Phytol* 1995; **129**: 167–201.
- [70] NAPIER RM, VENIS MA. Epitope mapping reveals conserved regions of an auxin-binding protein. *Biochem J* 1992; **284**: 841–845.
- [71] NAPIER RM, VENIS MA. Monoclonal antibodies detect an auxin-induced conformational change in the maize auxin-binding protein. *Planta* 1990; **182**: 313–318.
- [72] NAPIER RM. Towards an understanding of ABP1. *J Exp Bot* 1995; **46**: 1787–1795.
- [73] OELLER PW, KELLER JA, PARKS JE, SILBERT JE, THEOLOGIS A. Structural characterization of the early indoleacetic acid-inducible genes, *PS-IAA4/5* and *PS-IAA6*, of pea (*Pisum sativum* L.). *J Mol Biol* 1993; **233**: 789–798.
- [74] OHMIYA A, TANAKA Y, KADOWAKI K-I, HAYASHI T. Cloning of genes encoding auxin-binding proteins (ABP19/20) from peach: Significant peptide sequence similarity with germin-like proteins. *Plant Cell Physiol* 1998; **39**: 492–499.
- [75] OLIVER SC, VENIS MA, FREEDMAN RB, NAPIER RM. Regulation of synthesis and turnover of maize auxin-binding protein and observations on its passage to the plasma membrane: comparisons to maize immunoglobulin-binding protein cognate. *Planta* 1995; **197**: 465–474.
- [76] PALME K, HESSE T, CAMPOS N, GARBERS C, YANOFSKY MF, SCHELL J. Molecular analysis of an auxin binding protein gene located on chromosome 4 of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1992; **4**: 193–201.
- [77] PALMGREN MG. Proton gradients and plant growth: Role of the plasma membrane H⁺-AT-Pase. *Adv Bot Res* 1998; **28**: 1–70.
- [78] PORAT R, LU P, ONEILL SD. *Arabidopsis* SKP1, a homologue of a cell cycle regulator gene, is predominantly expressed in meristematic cells. *Planta* 1998; **204**: 345–351.
- [79] RAO-NAIK C, DELACRUZ W, LAPLAZA JM, TAN S, CALLIS J, FISHER AJ. The Rub family of ubiquitin-like proteins. Crystal structure of *Arabidopsis* Rub1 and expression of multiple Rubs in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 1998; **273**: 34976–34982.
- [80] RESCHER U, WALTHER A, SCHIEBL C, KLÄMBT D. *In vitro* binding affinities of 4-chloro-, 2-methyl-, 4-methyl-, and 4-ethylindoleacetic acid to auxin-binding protein 1 (ABP1) correlate with their growth-stimulating activities. *J Plant Growth Regul* 1996; **15**: 1–3.

- [81] ROUSE D, MACKAY P, STIRNBERG P, ESTELLE M, LEYSER O. Changes in auxin response from mutations in an *AUX/IAA* gene. *Science* 1998; **279**: 1371–1373.
- [82] RUEGGER M, DEWEY E, GRAY WM, HOBBIE L, TURNER J, ESTELLE M. The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes Dev* 1998; **12**: 198–207.
- [83] RÜCK A, PALME K, VENIS MA, NAPIER RM, FELLE HH. Patch-clamp analysis establishes a role for an auxin binding protein in the auxin stimulation of plasma membrane current in *Zea mays* protoplasts. *Plant J* 1993; **4**: 41–46.
- [84] SCHERER GFE, ANDRÉ B. A rapid response to a plant hormone: auxin stimulates phospholipase A₂ *in vivo* and *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **163**: 111–117.
- [85] SCHERER GFE, ANDRÉ B. Stimulation of phospholipase A₂ by auxin in microsomes from suspension-cultured soybean cells is receptor-mediated and influenced by nucleotides. *Planta* 1993; **191**: 515–523.
- [86] SCHERER GFE, ARNOLD B. Inhibitors of animal phospholipase A₂ enzymes are selective inhibitors of auxin-dependent growth. Implications for auxin-induced signal transduction. *Planta* 1997; **202**: 462–469.
- [87] SCHERER GFE, HECKER D, MÜLLER J. Ca²⁺ ions and lysophospholipids activate phosphorylation of different proteins in plasma membranes and tonoplast. *J Plant Physiol* 1993; **142**: 425–431.
- [88] SCHERER GFE. Activation of phospholipase A₂ by auxin and mastoparan in hypocotyl segments from zucchini and sunflower. *J Plant Physiol* 1995; **145**: 483–490.
- [89] SCHIEBL C, WALTHER A, RESCHER U, KLÄMBT D. Interaction of auxin-binding protein 1 with maize coleoptile plasma membranes *in vitro*. *Planta* 1997; **201**: 470–476.
- [90] SCHWOB E, CHOI S-Y, SIMMONS C, MIGLIACCIO F, ILAG L, HESSE T, PALME K, SÖLL D. Molecular analysis of three maize 22 kDa auxin-binding protein genes – transient promoter expression and regulatory regions. *Plant J* 1993; **4**: 423–432.
- [91] SHIMOMURA S, LIU W, INOHARA N, WATANABE S, FUTAI M. Structure of the gene for an auxin-binding protein and a gene for 7SL RNA from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 1993; **34**: 633–637.
- [92] SHIMOMURA S, WATANABE S, ICHIKAWA H. Characterization of auxin-binding protein 1 from tobacco: content, localization and auxin-binding activity. *Planta* 1999; **209**: 118–125.
- [93] SKOWYRA D, CRAIG KL, TYERS M, ELLEDGE SJ, HARPER JW. F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* 1997; **91**: 209–219.
- [94] THIEL G, BLATT MR, FRICKER MD, WHITE IR, MILLNER P. Modulation of K⁺ channels in *Vicia* stomatal guard cells by peptide homologs to the auxin-binding protein C terminus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 11493–11497.
- [95] TIAN H, KLÄMBT D, JONES AM. Auxin-binding protein 1 does not bind auxin within the endoplasmic reticulum despite this being the predominant subcellular location for this hormone receptor. *J Biol Chem* 1995; **270**: 26962–26969.
- [96] TILLMANN U, VIOLA G, KAYSER B, SIEMEISTER G, HESSE T, PALME K, LÖBLER M, KLÄMBT D. cDNA clones of the auxin-binding protein from corn coleoptiles (*Zea mays* L.): isolation and characterization by immunological methods. *EMBO J* 1989; **8**: 2463–2467.
- [97] ULMASOV T, HAGEN G, GUILFOYLE TJ. ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* 1997; **276**: 1865–1868.
- [98] VENIS MA, NAPIER RM, BARBIER-BRYGOO H, MAUREL C, PERROT-RECHENMANN C, GUERN J. Antibodies to a peptide from the maize auxin-binding protein have auxin agonist activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 7208–7212.
- [99] VENIS MA, NAPIER RM. Auxin perception and signal transduction. [w] Aducci P [red.] Signal Transduction in Plants. Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland 1997: 45–63.

- [100] VENIS MA, NAPIER RM. Auxin receptors and auxin binding proteins. *Crit Rev Plant Sci* 1995; **14**: 27–47.
- [101] VENIS MA, THOMAS EW, BARBIER-BRYGOO H, EPHRITIKHINE G, GUERN J. Impermeant auxin analogues have auxin activity. *Planta* 1990; **182**: 232–235.
- [102] WATANABE S, SHIMOMURA S. Cloning and expression of two genes encoding auxin-binding proteins from tobacco. *Plant Mol Biol* 1998; **36**: 63–74.
- [103] YI H, PARK D, LEE Y. In vivo evidence for the involvement of phospholipase A and protein kinase in the signal transduction pathway for auxin-induced corn coleoptile elongation. *Physiol Plant* 1996; **96**: 359–368.

Reaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 06.10.1999 r.

Przyjęto: 19.12. 1999 r.

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

CHARAKTERYSTYKA MOLEKULARNA MITOCHONDRIALNEGO DNA ŻYTA UPRAWNEGO (*Secale cereale* L.)

MOLECULAR CHARACTERISATION OF MITOCHONDRIAL DNA OF FALL RYE (*Secale cereale* L.)

Lidia Joanna SKUZA

Katedra Biologii Komórki, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Szczeciński

Streszczenie: W pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat genomu mitochondrialnego żyta (*Secale cereale* L.). Podano ogólną charakterystykę mitochondrialnego DNA (mtDNA) żyta uprawnego, charakterystykę mtDNA w liniach CMS, przedstawiono organizację genów rybosomalnych 18S i 5S w genomie mitochondrialnym żyta, a także genu *pol-r*, spokrewnionego z genem polimerazy DNA typu B.

(*Postępy Biologii Komórki* 2000; 27: 185–196)

Słowa kluczowe: *Secale cereale*, mitochondrialny DNA

Summary: In this paper current knowledge state about mitochondrial genome in rye is presented. General description of the character of mitochondrial DNA from rye, mitochondrial DNA in cytoplasmic male sterility (cms) lines, organization of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the mitochondrial genome of rye and also DNA – polymerase type B – related reading frame (*pol-r*) were described.

(*Advances of Cell Biology* 2000; 27: 185–196)

Key words: *Secale cereale*, mitochondrial DNA

Wykaz skrótów: **mtDNA** – mitochondrialny DNA, **cpDNA** – chloroplastowy DNA, **CMS** – rośliny cytoplazmatycznie męskosterylne, **pz** – pary zasad, **kpz** – kilo pary zasad, **rrn18**, **rrn5** – geny kodujące białka rybosomalne, **URF13** – białko kodowane przez gen *urf13* występujące w linii CMS-T kukurydzy

WSTĘP

Wyniki licznych badań, przeprowadzonych z mitochondrialnym DNA (mtDNA) linii cytoplazmatyczno-męskosterylnych (CMS) żyta i wielu innych roślin wyższych, wskazują na związek między zmianami występującymi w mtDNA a występowaniem sterylnej cytoplazmy [10, 11, 16]. Mutacja, której konsekwencją jest powstanie CMS, występuje w genomie mitochondrialnym, ale jej ujawnienie się w fenotypie jest zależne od informacji genetycznej zawartej w jądrze. Męskosterylne rośliny są więc doskonałym materiałem genetycznym do badań oddziaływań jądro – mitochondrion, a także odgrywają istotną rolę w produkcji nasion mieszańcowych. W życie uprawnym (*Secale cereale L.*), które jest ważnym zbożem w środkowej, wschodniej i północnej Europie, w latach sześćdziesiątych wyłoniono linię męskosterylną (CMS)-P w odmianie Pampa [9, 16]. Wkrótce potem przygotowano kilka odmian mieszańcowych żyta z udziałem linii CMS-P [8, 17]. W późniejszych latach poszukiwano nowych źródeł CMS, aby nie doprowadzić do zawężenia genetycznego istniejącego materiału hodowlanego. Wszystkie badane typy CMS miały widoczne zmiany w genomie mitochondrialnym, stąd też postępowi hodowli odmian mieszańcowych żyta towarzyszyły badania molekularne mitochondrialnego DNA. Dotyczyły one głównie molekularnej charakterystyki mtDNA przeprowadzonej na podstawie analizy restrykcyjnej – RFLP, badania fizycznej organizacji genów rybosomalnych 18SrRNA i 5SrRNA oraz charakterystyki otwartych ramek odczytu (ORF) [3, 6, 17].

W niniejszej pracy przedstawiono dotychczasowe dane literaturowe dotyczące wyżej wymienionych zagadnień.

1. GENOM MITOCHONDRIALNY ŻYTA UPRAWNEGO *Secale cereale L.*

Charakterystykę genomu mitochondrialnego żyta odmiany „Halo” przeprowadzono na podstawie analizy restrykcyjnej, hybrydyzacji DNA-DNA i oznaczenia gęstości pławnej (ang. *buoyant density*) [17]. W wyniku przeprowadzonej analizy restrykcyjnej przy użyciu trzech enzymów restrykcyjnych: SalI, XbaI i BamHI w 30 niezależnych próbach mtDNA stwierdzono występowanie tego samego obrazu restrykcyjnego, typowego dla mtDNA roślin wyższych, tzn. wystąpiło wiele prążków o różnej intensywności. Liczba fragmentów restrykcyjnych powstała wskutek działania wymienionych enzymów restrykcyjnych była różna (SalI – 31 fragmentów, co po zsumowaniu dawało wielkość 396 kpz; XbaI – 43 fragmenty, 410 kpz; BamHI – 20 fragmentów, 412 kpz). Na podstawie tych danych przyjęto, że wielkość molekularna genomu mitochondrialnego żyta uprawnego wynosi ok. 410 kpz. Wielkość

ta jest porównywalna z danymi uzyskanymi dla innych gatunków zbóż (pszenica – 430 kpz, kukurydza – 570 kpz) [15, 17]. Określono również gęstość pławną mtDNA żyta. Wynosi ona 1,705 g/ml, a dla jądrowego DNA ma wartość 1,702 g/ml. Podobne wartości otrzymano także dla kukurydzy (1,706 g/ml) i innych roślin wyższych [17]. Tak więc trzy cechy: obraz restrykcyjny, wielkość i gęstość pławna mtDNA żyta są porównywalne z wartościami tych cech w innych gatunkach zbóż i roślin wyższych [13, 17]. Cechą charakterystyczną genomu mitochondrialnego roślin wyższych jest występowanie fragmentów homologicznych z sekwencjami chloroplastowego DNA (cpDNA) [2, 10, 12, 17]. Poszukiwano również takich fragmentów u żyta. Ze względu na dużą ilość oraz różną intensywność fragmentów restrykcyjnych mtDNA, obecność lub brak fragmentów cpDNA nie mogła być wykryta wizualnie. Zastosowano zatem hybrydyzację DNA-DNA. Jako sondy hybrydyzacyjne posłużyły klonowane geny organelowe: podjednostka I oksydazy cytochromowej (*coxI*) z *Neurospora crassa*, która powinna być specyficzna dla mtDNA oraz dwa geny chloroplastowe (*P700* ze *Spinacea oleacea* i większa podjednostka karboksylazy RubLS z *Zea mays*).

Tak jak oczekiwano, zastosowanie wklonowanych fragmentów cpDNA ujawniło homologię do oznakowanego genu *coxI* – pojawił się słaby prążek w tej samej pozycji. Wskazuje to na częściowe zanieczyszczenie mtDNA chloroplastowym DNA. A więc i w tym względzie mtDNA żyta nie jest wyjątkiem.

2. SEKWENCJE POL-R W mtDNA *Secale cereale* L.

Informacja genetyczna genomu mitochondrialnego żyta, podobnie jak innych roślin, zawarta jest w genach rRNA, tRNA i genach białek enzymatycznych i strukturalnych. Niewiele wiadomo natomiast o genach polimeraz mtDNA. Jak dotąd oczyszczono dwie różne polimerazy mtDNA z zarodków pszenicy i z kultur komórkowych soi [6], ale nie wiadomo, czy są one kodowane przez genom mitochondrialny.

MtDNA żyta zawiera otwartą ramkę odczytu – *pol-r*, która koduje białko wykazujące istotną homologię z polimerazą DNA-B, kodowaną przez liniowy plazmid S1 z kukurydzy. Do identyfikacji tej sekwencji zastosowano mtDNA żyta odmian Halo (odmiana płodna) i Pampa (CMS) przygotowując bibliotekę w wektorze pUC19 i kosmidzie pYC1. Jako sond użyto plazmidów pC1K1 (i jego subklonów) oraz plazmidu S1 – tzn. centralny fragment o wielkości 6,2 kpz, otrzymany z S1 po trawieniu enzymem PstI, klonowany w wektorze.

Przeprowadzono także RT-PCR (*reverse transcriptase-PCR*) amplifikując fragmenty przy pomocy następujących starterów [6]:

pol-r 1: GGAATGGCCCTTTCTCAGGATGG – odpowiadający nukleotydom 2,172 – 2,195 z sekwencji *pol-r* z żyta odmiany Halo

pol-r 2: CCTATATGAGGAGGTTTAGTTCCT – odpowiadający nukleotydom 2,795 – 2,772 z sekwencji *pol-r* z żyta odmiany Halo

atp9 1: 5 AGAAAAGTGTTTTCTCGACTCG 3

atp9 2: 5 ACATCTGTAACACTACATTCTCAC 3

W wyniku hybrydyzacji z sondą pC1K1 z *Claviceps purpurea*, w obu odmianach żyta pojawił się pozytywny sygnał hybrydyzacyjny. Wielkość fragmentu wykazującego taki sygnał była różna. W odmianie Halo wynosiła 9,4 kpz, a w odmianie Pampa 3,3 kpz. Wskazuje to na występowanie zmian strukturalnych w mtDNA linii CMS Pampa w tym obszarze. Zastosowanie jako sond subklonów plazmidu z *C. purpurea*, homologicznych z mtDNA żyta, pozwoliło na zidentyfikowanie C-końcowej części otwartej ramki odczytu (ORF1), domniemanego genu polimerazy B DNA [6]. Dalsze szczegółowe badania tego fragmentu wymagały jego klonowania i przeprowadzenia analizy sekwencyjnej. Okazało się, że obie sekwencje ORF mają identyczny koniec 5' w obszarze 864 pz, potem homologia już nie występuje i w rezultacie końce 3' są różnej długości; u odmiany Halo wynoszą one 948 pz, a u odmiany Pampa – 1017 pz. Wewnątrz sekwencji ORF występują konserwatywne domeny typowe dla rodziny B polimeraz DNA. Znajdują się tam domeny IIa, IIb, III, IV i V. Bezpośrednio przed domeną IIa znajduje się kodon stop, który ogranicza rozmiary ORF, a pierwszy możliwy kodon ATG jest między domenami IIa i IIb, stąd powstający polipeptyd zawiera tylko domeny IIb, III, IV i V. Odpowiedni polipeptyd w odmianie Halo składa się z 289 aminokwasów, a w odmianie Pampa z 312 aminokwasów.

Z danych doświadczalnych wynika, że największą homologię z sekwencją polimerazy B DNA żyta wykazuje ORF3 plazmidu S1 kukurydzy. Obejmuje on odcinek 769 pz i rozpoczyna się w życie 75 pz w kierunku 5' od kodonu ATG. Homologia na poziomie aminokwasowym wynosi 61%. Różnice między ORF3 plazmidu S1 kukurydzy i sekwencją *pol-r* żyta ograniczają się do trzeciej pozycji kodonu i do „wstawek” w mitochondrialnych sekwencjach żyta, zawierających trzy lub wielokrotność trzech par zasad i dlatego nie indukują przesunięcia ramki odczytu. Homologia mitochondrialnych sekwencji żyta z sekwencjami plazmidu pC1K1 z *C. purpurea* wynosi 51% i jest ograniczona do obszaru +150 – +44432 pz (od kodonu ATG). W obszarze *pol-r* znajduje się motyw sekwencji homologiczny z miejscem inicjacji transkrypcji w mtDNA pszenicy i kukurydzy. U kukurydzy występuje motyw sekwencji o długości 11 pz, który poprzedza motyw powtórzony G(A/T)₃₋₄ i który jest niezbędny do inicjacji transkrypcji u kukurydzy [6]. Obszar *pol-r* żyta ma takie sekwencje, więc może pełnić funkcje w inicjacji transkrypcji.

Po zastosowaniu sekwencji *pol-r* żyta u odmian Halo i Pampa jako sond w hybrydyzacji *northern*, otrzymano złożony obraz hybrydyzacyjny mtRNA. Przeprowadzono RT-PCR ze starterami łączącymi się wewnątrz sekwencji *pol-r* ORF.

Po amplifikacji otrzymano fragment o długości 625 pz. Kontrolą pozytywną były startery amplifikujące fragment 300 pz genu *atp9*.

W przypadku zastosowania starterów *pol-r* i mtRNA z obu odmian, amplifikowany został fragment o oczekiwanej długości. Otrzymano także odpowiednie fragmenty przy użyciu starterów *atp9*, tym samym wykazując wiarygodność stosowanej metody. Dane uzyskane z tego doświadczenia potwierdzają występowanie transkryptu *pol-r* w obu cytoplazmach.

Fragmenty PCR klonowano następnie w wektorze pUC19 i niektóre z nich sekwencjonowano. Ujawniono kilka różnic pomiędzy transkryptem, amplifikowanym cDNA i genomową kopią *pol-r*. Polegały one na zmianach w pojedynczym nukleotydzie i występowały w każdym analizowanym klonie. Nie wystąpiły zamiany C na U (redagowanie transkryptu genów mitochondrialnych polega głównie na zamianie C na U – czasami odwrotnie); zatem różnice pomiędzy klonami przypisano błędom podczas amplifikacji [6]. Podobnie analizowano fragmenty genu *atp9* amplifikowane za pomocą PCR i stwierdzono występowanie kilku konserwatywnych miejsc redagowania w większości sekwencjonowanym cDNA. Produkt genu *pol-r* nie występuje w życie w odpowiednio dużym stężeniu i prawdopodobnie ulega degradacji podobnie jak transkrypt *pol-r* w petunii [6]. Z tego względu gen ten uważany jest jako ewolucyjnie „młody”, prawdopodobnie wprowadzony do mtDNA żyta w wyniku rekombinacji z wolnymi plazmidami (pS1 i pC1K1). Gen *pol-r* wykazuje istotną homologię z sekwencjami nukleotydowymi rodziny B polimeraz DNA, na poziomie nukleotydowym i aminokwasowym. W rodzinie tej znajduje się ludzka α DNA polimeraza i liczne polimerazy wirusowe [6] oraz produkty niektórych roślinnych i grzybowych plazmidów linearnych. Największą homologię z genem *pol-r* żyta wykazuje ORF plazmidu pC1K1 grzyba także poza określonymi domenami. Sądzi się, że kodowany przez *pol-r* polipeptyd może reprezentować rdzeń polimerazy, bez aktywności egzonukleolitycznej. Mała wielkość enzymu też nie jest czymś niezwykłym, bowiem małe enzymy występują np. u ssaków, gdzie polimeraza β DNA składa się z 334 aminokwasów [6].

W mitochondriach roślin wyższych znajdują się zasadniczo trzy typy genów:

I – obligatoryjne geny mitochondrialne, kodujące np. białka łańcucha oddechowego,

II – fakultatywne geny mitochondrialne, zlokalizowane w niektórych roślinach w jądrowym DNA (np. niektóre geny białek rybosomalnych i tRNA),

III – geny mitochondrialne obserwowane tylko w ograniczonej liczbie roślin (np. *T-urf13* w kukurydzy, *orfB*) [6].

Gen *pol-r* może należeć do grupy II lub III i dlatego nie jest typowym genem polimerazy DNA mitochondriów. Dane przemawiające za tym, że *pol-r* jest młodym ewolucyjnie genem są następujące:

1) sekwencje homologiczne z *pol-r* nie są obecne we wszystkich roślinnych mtDNA,

2) w *pol-r* procentowy udział T w trzeciej pozycji kodonu wynosi tylko 31; odpowiada to genom grupy II, np. zawartość T w genie *rps12* z rośliny ginseng wynosi 30,4% [6], a w genie *orfB* – 25–27%, natomiast w konserwatywnych genach mitochondrialnych zawartość T w trzeciej pozycji kodonu wynosi 37–43%, np. w genie *cob* z ryżu zawartość ta wynosi 41,4% [6],

3) brak redagowania transkryptu genu *pol-r*, co może wynikać z bardzo późnej introdukcji genu w mtDNA (podobna sytuacja ma miejsce z genem *T-urf13* i z jego transkrytem; należy on do nielicznych przykładów genu, którego transkrypt nie uległ preredagowaniu).

3. ORGANIZACJA GENÓW RYBOSOMALNYCH 18S I 5S W MITOCHONDRIALNYM GENOMIE ŻYTA

Genom mitochondrialny roślin wyższych jest zróżnicowany u różnych gatunków. Dowodem na to są wyniki analiz restrykcyjnych i sporządzone mapy restrykcyjne, które ukazują różnice w strukturze genomów mtDNA blisko spokrewnionych gatunków, takich jak np. *Brassica nigra* i *Brassica campestris* [3, 12] oraz pomiędzy liniami N i T (CMS) w kukurydzy [3]. Świadczy to o bardzo znacznym zróżnicowaniu strukturalnym genomu mitochondrialnego. Panuje pogląd, że genom mitochondrialny kumuluje najmniejszą ilość zmian w sekwencji nukleotydów DNA, głównie substytucji, które dokonywały się w czasie trwania procesu ewolucyjnego [3]. Jednak do tej pory nie poznano mechanizmu molekularnego leżącego u podstaw tych przemian.

Genom mitochondrialny roślin charakteryzuje się obecnością sekwencji powtórzonych, które podlegają rekombinacji. W celu poznania rozmiaru tego zjawiska przeprowadzono analizę porównawczą sekwencji i organizacji genów rRNA – 18S i 5S genomów mitochondrialnych pszenicy i żyta [3].

W mtDNA pszenicy geny rRNA 18S i 5S są położone bardzo blisko siebie [3, 4], wewnątrz powtórzeń sekwencji rekombinujących. W pszenicy rodzina powtórzeń 18S/5S występuje w trzech niezależnych kopiach [4, 7]. Należy podkreślić, że takie bliskie usytuowanie genów rybosomalnych jest charakterystyczne dla roślin wyższych. Cały obszar zajmowany przez powtórzenia 18S/5S został zsekwencjonowany. Okazało się, że regiony ograniczające (flankujące) powtórzenia są odmienne sekwencyjnie. Wstępna analiza sekwencyjna tych powtórzeń wykazała, że u żyta są one podobnie ułożone jak u pszenicy i także występują w wielokrotnych kopiach. Sekwencje flankujące u żyta są jednak zmienione w stosunku do sekwencji w pszenicy.

Szczegółowe badania przeprowadzone na mtDNA żyta odmiany Kodiak i pszenicy odmiany Monopol obejmowały zastosowanie analizy restrykcyjnej z użyciem

enzymów BamHI, EcoRI, HindIII i SalI. W celu zmapowania miejsc restrykcyjnych fragmenty DNA klonowano w bakteriofagu λ . Do zmapowania miejsc restrykcyjnych w klonach λ zastosowano metodę Kohara i in. [3]. Do identyfikacji genu 18SrRNA z żyta zastosowano jako sondę klon pszeniczny zawarty w plazmidzie pUC19, a jako sondę heterologiczną użyto insert 19SrRNA (pBS983). Natomiast w przypadku genu 5SrRNA jako sondę użyto klon trn (pNN290) w plazmidzie pUC19. Z biblioteki przygotowanej w wektorze pUC19, przy użyciu enzymu HindIII wyizolowano cztery fragmenty restrykcyjne, każdy zawierający geny kodujące 18SrRNA i 5SrRNA. Fragmenty te identyfikowano na podstawie pozytywnej hybrydyzacji z insertem pBS983. Z biblioteki pUC19 wyizolowano także dwa fragmenty SalI.

Sonda pBS983, specyficzna dla mitochondrialnego genu 18SrRNA pszenicy, hybrydyzowała w przypadku żyta, podobnie jak w pszenicy, z większą liczbą fragmentów restrykcyjnych. Wskazywało to na występowanie genu 18S żyta w kilku kopiach. Identyczny wzór hybrydyzacyjny otrzymano po hybrydyzacji z sondą pNN290. Wyniki te potwierdziły wcześniejsze przypuszczenia o sprzężeniu genów 18S i 5S w mtDNA żyta.

Na istnienie rodziny powtórzeń sekwencji rekombinujących, która składa się przynajmniej z dwóch członów zawierających 18S i 5SrRNA, wskazują ponadto przygotowane mapy restrykcyjne. Rodzina powtórzeń 18S/5S żyta ma w większości taką samą organizację fizyczną jak rodzina 18S/5S mtDNA pszenicy, tzn. że geny 18S i 5SrRNA są otoczone częściowo homologicznymi sekwencjami flankującymi. Dwa fragmenty sekwencji są wysoko homologiczne, ale nie są identyczne we wszystkich trzech powtórzeniach [3]. Sądzi się, że trzy kopie żyta – podobnie jak u pszenicy – mogą podlegać homologicznej rekombinacji, w wyniku której może powstawać dziewięć różnych flankujących sekwencji. Do tej pory zidentyfikowano siedem takich sekwencji.

Wielkość wysoce homologicznych sekwencji wśród trzech powtórzeń jest odmienna u żyta i pszenicy. U żyta wynosi ona 11 kpz, a u pszenicy 7 kpz. Wszystkie powtórzenia 18S/5S są ulokowane na „głównym” chromosomie mitochondrialnym żyta, podobnie jak i u pszenicy [4, 7].

4. POLIMORFIZM ORGANIZACJI GENÓW 18S I 5SrRNA mtDNA ŻYTA

Rodzina powtórzonej jednostki rekombinacyjnej 18S/5S występuje w trzech odmiennych kontekstach genowych w życie i w pszenicy. Polimorfizm organizacyjny tej rodziny powtórzeń w mtDNA różnych odmian żyta ozimego *S. cereale* oraz

w różnych gatunkach *Secale*: *Secale dighoricum*, *Secale segetale* i *Secale vavilovii* badano za pomocą RFLP i analizy *Southern* [5].

Okazało się, że w odmianach żyta ozimego występują różne genomowe przegrupowania, powodujące zróżnicowania w liczbie loci (jedno lub trzy) *rrn18* i *rrn5*, którym nie towarzyszą zmiany w liczbie kopii tego genu przypadających na jednostkę masy mtDNA [5].

Wydaje się, że w mtDNA żyta istnieje konieczność utrzymania ekspresji różnych genów rybosomalnych (26S, 18S i 5S) na jednakowym poziomie, co jest realizowane poprzez wspólną regulację stopnia transkrypcji tych genów. Nastąpiło tu zniwelowanie zróżnicowania przez wzrost liczby kopii tych genów na jednostkę masy mtDNA. Do tej pory nie wiadomo, jakie mechanizmy są za to odpowiedzialne.

Istniejące dane literaturowe [2, 7, 10, 12] wskazują na występowanie struktur subgenomowych w populacji cząsteczek mtDNA u roślin, grzybów, alg i *Protista*. Zgodnie z tym, w mtDNA roślin mogą występować modulacje kopii w jednym obszarze mtDNA bez równoczesnego powodowania zmian w innych obszarach genomu. Wskazuje to na ważność cząsteczek subgenomowych w determinacji całościowej struktury i składu populacji molekularnych mtDNA.

W wyniku analizy *Southern* mtDNA różnych gatunków żyta stwierdzono, że *Secale montanum* jest najprawdopodobniej gatunkiem wyjściowym dla *S. cereale* [5]. Gatunki *S. segetale*, *S. dighoricum* i *S. vavilovii* wykazywały natomiast obraz hybrydyzacyjny typowy dla odmiany Kodiak (*S. cereale* L.). Na tej podstawie wywnioskowano, że organizacja powtórzeń 18S/5S jest archaiczna i podobnie jak u pszenicy ma monofiletyczne pochodzenie wśród rodziny traw [5].

5. ANALIZA PORÓWNAWCZA RODZINY REKOMBINUJĄCYCH SEKWENCJI POWTÓRZONYCH W GENOMACH MITOCHONDRIALNYCH PSZENICY (*Triticum aestivum* L.) I ŻYTA (*Secale cereale* L.)

W genomach mitochondrialnych pszenicy i żyta znajduje się rodzina sekwencji powtórzonych, składająca się z trzech jednostek powtórzonych, zwanych też „konserwatywnymi jednostkami sekwencyjnymi” (ang. CSU – *conserved sequence unit*) [4, 7]. U obu tych gatunków jednostka powtórzona składa się z następujących sekwencji kodujących: 18SrRNA, 5SrRNA (geny *rrn18* i *rrn5*) i tRNA^{fMet} (*trnfM*), ORF (ang. *open reading frame* – otwarta ramka odczytu) i trzy elementy t. Elementy t to sekwencje nukleotydowe homologiczne z sekwencjami kodującymi tRNA [4]. Oprócz tych sekwencji w skład tej jednostki wchodzi część pseudogenu ϕ atpAc – sekwencji, która jest homologiczna z chloroplastowym genem *atpA* kodującym podjednostkę α F1ATPazy. Występowanie genów kodujących podjednostkę

niebłonowej części ATPazy, tzw. α F1 oraz 5S rRNA jest cechą charakterystyczną mitochondriów roślinnych [10, 13]. Jednostka powtórzona pszenicy obejmuje 4429 pz.

Sekwencje nukleotydów w jednostkach powtórzonych mtDNA pszenicy i żyta badano przy zastosowaniu reakcji PCR z udziałem następujących starterów:

- 1) 5'-CCCTGCAGAGCGGGGTAGAGGAATTGGTC-3'
- 2) 5'-CCTCTAGACCGTTCGCCACTTTGTTCTCA-3'
- 3) 5'-CCCTGCAGAGCGAAACCCTCGTTTTGTGTTGC-3'
- 4) 5'-CCTCTAGATCACTGGCAGTCCCTCGTGAGTGC-3'

Przeprowadzono również analizę restrykcyjną mtDNA pszenicy odmiany Capitole i żyta odmiany Kodiak przy użyciu zestawu następujących enzymów restrykcyjnych: SalI, HindIII i BamHI. Wszystkie te badania prowadziły do ustalenia, że w genomie mitochondrialnym pszenicy i żyta, w odróżnieniu od kukurydzy, w powtórzeniach 18S/5S jest zawarty gen *trnfM*. Gen *trnfM* koduje mitochondrialny inicjatorowy tRNA^{fMet} i leży w bliskim sąsiedztwie genu *rrn18*. Wykazano, że geny *trnfM*, *rrn18* i *rrn5* w pszenicy i w życie tworzą wspólną jednostkę transkrypcyjną, działającą w formie operonu, z sekwencją promotorową leżącą wewnątrz CSU [4]. Trzy elementy t, t1, t2 i t3, ułożone są w pszenicy odpowiednio w pozycjach 99-159pz, 438-541pz i 1313-1415pz, przylegając do sekwencji 3' genu *rrn5*. Produkty elementów-t mają strukturę II-rzędową podobną do prawidłowych cząsteczek jądrowego tRNA [4], jednakże tRNA kodowane przez elementy t są tak zmienione, że nie uczestniczą w procesie translacji. Prawdopodobnie pełnią one inne funkcje w mitochondrialnym genomie pszenicy i mogą być sygnałem dla zakończenia procesu transkrypcji i obróbki potranskrypcyjnej [4].

Przy prawym końcu jednostki CSU u pszenicy, 1578pz od genu *rrn5*, znajduje się sekwencja ϕ *atpAc*, homologiczna z chloroplastowym genem *atpA* kodującym podjednostkę α -chloroplastowej F1ATPazy. Położenie sekwencji jest takie, że obszar 3' pszenicznego CSU zlokalizowany jest wewnątrz pseudogenu ϕ *atpAc*. Mitochondrialna jednostka CSU żyta jest około 35% krótsza od pszenicznej i liczy 2855 pz, ale zawiera te same sekwencje genów oraz inne elementy sekwencyjne jak u pszenicy z tym, że dwa z trzech elementów t i fragment pseudogenu ϕ *atpAc* są obecne tylko w jednej z trzech sekwencji flankujących powtórzenia 18S/5S, przy prawej granicy CSU. Ciekawe, że w życie fragment DNA zawierający elementy t2, t3 i gen ϕ *atpAc*, znajdujący się przy końcu 3' genu *rrn5*, występuje tylko w jednym z trzech kontekstów flankujących – w VI flance wg Coultharta i in. [4]. Wynika z tego, że jeżeli wszystkie trzy powtórzenia są aktywne transkrypcyjnie, a elementy-t w tym uczestniczą, to pojedynczy element t1 musi być kompetentny do pełnienia swoistej funkcji w mtDNA żyta.

Wyniki uzyskane z przeprowadzonej analizy porównawczej pozwalają przypuszczać, że:

- bliskie sprzężenie *trnfM* i *rrn18* (rozdziela je tylko jedna para zasad) jest ograniczone do szlaku ewolucyjnego pszenicy i żyta,
- para *trnfM-rrn18* pojawiła się wskutek pojedynczej mutacji, polegającej na wstawieniu bloku sekwencji z *trnfM* bezpośrednio do *rrn18*,
- obecność domniemanego promotora polimerazy B DNA w sąsiedztwie genu *rrn18* we wszystkich powtórzeniach u pszenicy i żyta wskazuje, że trzy kopie powtórzeń podlegają transkrypcji [4].

6. CHARAKTERYSTYKA MITOCHONDRIALNEGO DNA W LINIACH CYTOPLAZMATYCZNO- -MĘSKOSTERYLNYCH (CMS) ŻYTA

Przeprowadzenie molekularnej charakterystyki mtDNA żyta uprawnego pozwoliło porównać mitochondrialne geny linii płodnych żyta z genami mitochondrialnymi linii CMS [16, 17].

W jednym z doświadczeń porównywano mtDNA homozygotycznej wsobnej linii L201-N z jej wersją CMS-P (typu Pampa) oraz z płodną odmianą żyta Halo [17]. Linia L201-N pochodzi z odmiany Petkus, a jej wersja CMS powstała przez wprowadzenie cytoplazmy sterylnej typu P – Pampa. Porównywano ze sobą obrazy restrykcyjne, powstałe w wyniku działania trzech enzymów restrykcyjnych: BamHI, SalI i XbaI na mitochondrialny genom badanych form. Obrazy restrykcyjne obu normalnych form – linii L201-N i odmiany Halo, były nierozróżnialne. Wynika z tego, że proces hodowlany nie wywołał zmian różnicujących mtDNA tych odmian. W celu dokładniejszego zbadania zmian w linii CMS L201-P przeprowadzono hybrydyzację ze sklonowanym fragmentem plazmidu S1 z kukurydzy jako sondą. Plazmid ten jest związany z typem CMS-S u kukurydzy [16, 17] i występuje w formie wolnej lub związanej z nicią „ciężką” mtDNA. We wszystkich badanych preparatach mtDNA pojawił się sygnał hybrydyzacyjny. W preparatach mtDNA z żyta Halo i z linii L201-N z sondą hybrydyzowały fragmenty jednakowej długości, a w preparacie L201-P – fragmenty o różnej długości, co wskazuje, że sekwencje homologiczne z plazmidem S1 znajdowały się w zmienionej części mtDNA cytoplazmy P. Potwierdza to fakt, że wystąpienie zmian w organizacji genomu mitochondrialnego jest jednym z czynników warunkujących powstanie sterylnej cytoplazmy.

Linie o sterylnej cytoplazmie są wykorzystywane w produkcji odmian mieszańcowych – nasiennych. W innym doświadczeniu przeprowadzono analizę restrykcyjną linii N (płodna) i P (CMS) odmiany Pampa oraz linii C (płodna) i G (CMS) odmiany Gülzow (odkryty w 1985 r. [1, 14]) w celu stwierdzenia, czy typ G sterylnej cytoplazmy jest odmienny od typu P. Jako wzorzec posłużyła odmiana płodna Pluto

[17]. Analizę restrykcyjną wykonano przy użyciu czterech enzymów: EcoRI, Sall, BamHI i HindIII. Linie płodne żyta miały inny obraz restrykcyjny niż linie cytoplazmatyczno-genetycznie męskoniopłodne. Stwierdzono także podobieństwo mtDNA typu G (linii sterylnej) do mtDNA płodnej odmiany Pluto. Wskazuje to na bliskie pokrewieństwo tych dwóch cytoplazm. Natomiast mitochondrialny genom typu P-CMS (Pampa), wydaje się być bardziej podobny do mtDNA z jego wsobnej wersji N niż do linii cms – G (Gülzow). W celu zbadania reorganizacji sekwencji nukleotydowych w mtDNA linii P i G przeprowadzono hybrydyzację z udziałem następujących klonów – sond:

- pS1 – klon obejmujący wewnętrzny fragment po działaniu PstI wielkości 6,2 kbp plazmidu S1 z *Zea mays*,
- coxII – 2,4 kbp fragment z II podjednostki oksydazy cytochromowej c z *Zea diploerennis*,
- coxIII – 1,1 kbp subklonowany fragment po działaniu EcoRI/PstI podjednostki III oksydazy cytochromowej,
- cob – 1,5 kbp subklonowany fragment EcoRI z *Oenothera berteriana*.

Do analizy *Southern* użyto sondy złożonej z klonowanych genów mitochondrialnych *coxI*, *coxIII* i *cob*, które hybrydyzowały bardzo podobnie z restrykcyjnymi fragmentami mtDNA cytoplazmy G i Pluto. Dopiero hybrydyzacja z udziałem sondy S1 ujawniła różnice pomiędzy mtDNA tych linii. Natomiast cytoplazmy G i P wykazywały odmienny obraz hybrydyzacyjny zarówno przy użyciu sondy złożonej, jak i pS1 z plazmidu S1 kukurydzy. Plazmid ten zawiera otwartą ramkę odczytu (ORF), kodującą białko homologiczne z licznymi polimerazami fagów i mitochondriów drożdży [16]. Homologia sekwencji obserwowana w mtDNA żyta wynika z obecności tej samej otwartej ramki odczytu. Nie wiadomo jednakże, czy sekwencja ta koduje funkcjonalną polimerazę DNA w mitochondriach żyta.

W wyniku tych doświadczeń stwierdzono, że nowa cytoplazma G – sterylna jest odmienna od sterylnej cytoplazmy P.

Podziękowanie

Pragnę złożyć serdeczne podziękowanie Pani Profesor zw. dr hab. Halinie Augustyniak za wprowadzenie w tajniki pracy z mitochondrialnym DNA roślin oraz za olbrzymią pomoc podczas moich pierwszych doświadczeń z mtDNA żyta, a także Pani Profesor zw. dr hab. Stanisławie Rogalskiej za pomoc przy pisaniu niniejszej pracy.

LITERATURA

- [1] ADOLF K, WINKEL A. A new source of spontaneous sterility in winter rye. Preliminary results. In: *Proc Eucarpia Meeting Cereal Section Rye. Svalov, Sweden 1985*; 293–307.

- [2] AUGUSTYNIAK H. Specyfika genomów organelowych. Nowe tendencje w biologii molekularnej i inżynierii genetycznej oraz medycynie. Sorus, Poznań 1996.
- [3] COUTHART MB, HUH GS, GRAY MW. Physical organization of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the mitochondrial genome of rye (*Secale cereale* L.). *Curr Genet* 1990; **17**: 339–346.
- [4] COULTHART MB, SPENCER DF, GRAY M. Comparative analysis of a recombining-repeat-sequence family in the mitochondrial genomes of wheat (*Triticum aestivum* L.) and rye (*Secale cereale* L.). *Curr Genet* 1993; **23**: 255–264.
- [5] COULTHART MB, SPENCER DF, HUH GS, GRAY MW. Polymorphism for ribosomal RNA gene arrangement in the mitochondrial genome of fall rye (*Secale cereale* L.). *Curr Genet* 1994; **26**: 269–275
- [6] DOHMEN G, TUDZYNSKI P. A DNA-polymerase-related reading frame (pol-r) in the mtDNA of *Secale cereale*. *Curr Genet* 1994; **25**: 59–65.
- [7] FALCONET D, LEJEUNE B, QUETIER F, GRAY MW. Evidence for homologous recombination between repeated sequences containing 18S and 5S ribosomal RNA genes in wheat mitochondrial DNA. *EMBO* 1984; **3**: 297–302.
- [8] GEIGER HH. Hybrid breeding. Proc. Eucarpia Meeting of the Serial Section on Rye. June 11–13 1985, Swalof.
- [9] GEIGER HH, SCHNELL FW. Cytoplasmic male sterility in rye (*Secale cereale* L.). *Crop Sci* 1970; **10**: 590–593.
- [10] GORAŃCZNIK R, AUGUSTYNIAK H. Małe cząsteczki DNA występujące w mitochondriach roślin wyższych. *Post Biol Kom* 1988; **15**: 347–366.
- [11] GRIERSON D, COVEY SN. Plant Molecular Biology (Tertiary Level Biology Series). Paperback 2nd edition. 1998; 73–98.
- [12] JAŃSKA H, WOŁOSZYŃSKA M. The dynamic nature of plant mitochondrial genome organization. *Acta Biochim Pol* 1997; **4**: 239–250.
- [13] KRUSZEWSKA A, BOGUTA M. Struktura i funkcja mitochondrialnych genomów. *Post Biol Kom* 1988; **15**: 327–346.
- [14] MELTZ G, ADOLF K. Genetic analysis of rye (*Secale cereale* L.). Genetics of male sterility of the G-type. *Theor Appl Genet* 1991; **82**: 761–764.
- [15] QUETIER F, LEJEUNE S, DELORME D, FALCONET D, JUBIER MF. Molecular form and function of the wheat mitochondrial genome. *Molecular Form and Function of the Plant Genome*. Plenum Press 1985; **83**: 413–420.
- [16] STEINBORN R, SCHWABE W, WEIHE A, ADOLF K, MELTZ G, BORNRR T. A new type of cytoplasmic male sterility in rye (*Secale cereale* L.): analysis of mitochondrial DNA. *Theor Appl Genet* 1993; **85**: 822–824.
- [17] TUDZYNSKI P, ROGMANN P, GEIGER HH. Molecular analysis of mitochondrial DNA from rye (*Secale cereale* L.). *Theor Appl Genet* 1986; **72**: 695–699.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 19.07. 1999 r.

Przyjęto: 13.12.1999 r.

Adres autora: ul. Łukasieńskiego 43, 71-215 Szczecin

KOMÓRKI ROZRUSZNIKOWE W PRZEWODZIE POKARMOWYM – ZALEŻNOŚCI STRUKTURY I FUNKCJI

THE PACEMAKING CELLS IN THE GASTROINTESTINAL TRACT – STRUCTURE - FUNCTION RELATIONSHIPS

Krzysztof ROMAŃSKI, Ludmiła BORODULIN-NADZIEJA, Maciej ZABEL

Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Akademia Rolnicza, Katedra i Zakład Fizjologii oraz Katedra i Zakład Histologii
i Embriologii Akademii Medycznej, we Wrocławiu

Streszczenie: Powolne czynnościowe potencjały elektryczne zwane falami wolnymi są generowane przez wyspecjalizowane komórki rozrusznikowe obecne w ścianie przewodu pokarmowego. Zjawisko to stanowi tzw. miogenną regulację motoryki, a wspomniane komórki są identyfikowane jako komórki śródmiąższowe Cajala. Jednakże funkcję rozrusznicową przypisuje się jedynie komórkom typu I i IV, podczas gdy komórkom typu II i III, a także typu IV przypisuje się rolę w przekazywaniu sygnałów elektrycznych z neuronów splotów śródściennych do komórek mięśniówki gładkiej. Podobieństwo śródmiąższowych komórek Cajala do innych komórek, zwłaszcza do neuronów, fibroblastów czy miocytów, stwarza trudności w ich precyzyjnym rozpoznawaniu.

(Postępy Biologii Komórki 2000; 27: 197–212)

Słowa kluczowe: komórki śródmiąższowe Cajala, przewod pokarmowy, rozrusznik, fale wolne

Summary: Electrical slow action potentials named slow waves are generated by the specialized pacemaking cells present within the gastrointestinal wall. This phenomenon is the basis for the so-called miogenic control of motor activity and the aforementioned cells are identified as the interstitial cells of Cajal. However, the pacemaking function is ascribed solely to the cells of type I and IV, while the cells of types II, III and also of type IV are believed to conduct the electrical signals from the intramural ganglionic neurons to the smooth muscle cells. The similarity of the interstitial cells of Cajal to other cells, especially to the neurons, fibroblasts or myocytes accomplishes their precise identification.

(Advances of Cell Biology 2000; 27: 197–212)

Key words: interstitial cells of Cajal, gastrointestinal tract, pacemaker, slow waves

1. MIOGENNA REGULACJA MOTORYKI PRZEWODU POKARMOWEGO

Motoryka przewodu pokarmowego to jedna z najważniejszych i zarazem najbardziej złożonych jego czynności. Jej regulacja obejmuje 3 grupy mechanizmów: miogenne, nerwowe i humoralne.

Miogenna regulacja motoryki przewodu pokarmowego to taki rodzaj regulacji, który wywodzi się bezpośrednio z mięśniówki gładkiej ściany przewodu pokarmowego. Regulacja ta funkcjonuje zasadniczo w oddzieleniu od mechanizmów nerwowo-humoralnych [4]. Jest ona uważana za regulację najbardziej podstawową, a więc taką, od której zależy bezpośrednio pojawienie się aktywności mioelektrycznej i ruchowej. Aktywność mioelektryczna pojawia się w początkowym etapie i poprzedza o drobne ułamki sekund występowanie aktywności mechanicznej, czyli skurczów. Aktywność elektryczna jest efektem transmembranowych przesunięć jonowych. W warunkach spoczynkowych błona komórki mięśnia gładkiego jest spolaryzowana, a przemieszczanie się jonów zarówno do komórki, jak i na zewnątrz jest niewielkie. Przemieszczanie to nie jest swobodne, gdyż po obu stronach błony występuje istotny gradient stężeń, zwłaszcza jonów sodowych, potasowych i chlorokowych. Jest on utrzymywany w sposób aktywny, a więc z nakładem energii, a różnica potencjałów elektrycznych mierzona po obu stronach błony wynosi około -70 mV. Wartość ta nie jest stała i ulega okresowym zmianom, powtarzającym się, w zależności od rejonu przewodu pokarmowego i gatunku zwierzęcia, co 3–20 s. W chwili gdy następuje pobudzenie i lokalna depolaryzacja, różnica potencjałów gwałtownie maleje stając się bliższa zeru. Zmiany różnicy potencjałów elektrycznych związanych z depolaryzacją trwają około 0,05 s. Widać zatem, że opisywane zmiany mogą być powolne i szybkie.

Powolne zmiany różnicy potencjałów nazwane zostały falami wolnymi. Amplituda wychyleń w obrębie tych zmian nie jest bardzo duża, toteż zwykle nie osiąga progowej wartości około -35 mV czyli takiej, powyżej której występuje już skurcz [56]. Ponadto czas tych wychyleń jest stosunkowo długi, tak aby w okresie tzw. płaskiej części fali wolnej zdążyła wystąpić seria krótkotrwałych wychyleń powodujących skurcz, zwanych potencjałami iglicowymi. Zatem rolą fal wolnych jest w zasadzie ułatwienie występowania skurczów i „dbanie” o to, aby między nimi występowała przerwa, choćby na odpoczynek. Od występowania fal wolnych zależy tzw. organizacja motoryki przewodu pokarmowego, czyli aktywność mioelektryczna i ruchowa poszczególnych odcinków przewodu pokarmowego, a co za tym idzie, ich właściwości ruchowe, a także determinowanie poszczególnych wzorów motorycznych. Ponadto fale wolne dzięki ułatwieniu generowania grup potencjałów iglicowych i skurczów równocześnie lokalizują je w czasie i przez to znacznie zwiększają precyzję ich występowania, a także ułatwiają kontrolę aktywności mioe-

lektrycznej i ruchowej przez inne mechanizmy. Z tych powodów od wielu lat wkładano ogromny wysiłek w badania regulacji miogennej motoryki przewodu pokarmowego, a w szczególności w badania nad mechanizmami generującymi fale wolne, które pojawiają się z bardzo precyzyjną rytmicznością.

2. KOMÓRKI ŚRÓDMIĄŻSZOWE CAJALA A GENEROWANIE POTENCJAŁÓW ELEKTRYCZNYCH

Już w końcu zeszłego stulecia Hiszpan Ramón y Cajal [7] opisał oddzielny rodzaj komórek jako prymitywne neurony obecne w unerwionych autonomicznie narządach, takich jak np. jelito. Komórki te zostały uznane za odrębne od komórek zwojów nerwowych ściany przewodu pokarmowego i nazwane komórkami śródmiąższowymi Cajala. Wspomniany autor w dalszych badaniach [6] opisał istnienie komórek śródmiąższowych w jelicie cienkim na dwóch poziomach: pomiędzy warstwą mięśni gładkich podłużnych i poprzecznych, związanych ze śródmiąższowym splotem Auerbacha oraz głębszą warstwą mięśniową, związaną z tzw. głębokim splotem mięśniowym, znajdującym się w obrębie mięśniówki okrężnej. Cajal identyfikował komórki śródmiąższowe jako mające jądro z niewielką ilością cytoplazmy oraz 2–5 wypustek nadających komórce kształt wrzecionowaty lub gwiazdzisty. Sugerował on, że z uwagi na ich położenie komórki śródmiąższowe pośredniczą w przekazywaniu pobudzeń pomiędzy nerwami a błoną mięśniową przyczyniając się do modyfikowania jej skurczów. Cajal uważał komórki śródmiąższowe za neurony, co stanowiło wówczas pogląd powszechny. Wkrótce potem Keith [28] badając strukturę splotu Auerbacha wyraził przypuszczenie, iż w obrębie komórek tworzących sieć, zwanych m.in. komórkami pośrednimi, znajduje się rozrusznik jelitowy oraz że wspomniane komórki stanowią nieodróżnicowane komórki mięśnia gładkiego kontaktujące się wypustkami zarówno z komórkami mięśniowymi, jak też z komórkami zwojowymi. Szereg lat później Feyrter [18] zauważył, że komórki znajdujące się między zakończeniami nerwowymi a komórkami mięśni gładkich jelita są odpowiedzialne za przekazywanie pobudzeń i zidentyfikował dwa typy takich komórek pośredniczących, z których typ I stanowią niewątpliwie komórki śródmiąższowe Cajala. Nie zaliczał on komórek tych do elementów nerwowych. Obecnie uważa się, iż stanowią one szczególny rodzaj komórek śródmiąższowych występujących w obrębie mięśniówki jelitowej [59]. Już dawno uważano, że komórki śródmiąższowe Cajala partycypują w rytmiczności skurczów jelita [63]. Jednakże nie znano wówczas fizjologicznych podstaw rytmiczności skurczów. Dopiero później wykryto, że rytmiczność skurczów pochodzi z rozrusznika generującego w sposób okresowy sygnały elektryczne zwane falami wolnymi. Toteż dalsze badania wzbudziły przypuszczenia, że komórki śródmiąższowe Cajala mogą partycypować w generowaniu fal wolnych

[15,54]. Hipoteza ta powstała w wyniku obserwacji, że fale wolne wydają się powstawać w tych subwarstwach ściany jelita, w których koncentracja komórek Cajala jest największa [2,16,55,62]. Stwierdzono, że np. w okrężnicy psa rozrusznik generujący fale wolne znajduje się w okolicy podśluzówkowej warstwy okrężnej mięśni gładkich, a jeśli ten rejon jest usunięty, to fale wolne w obrębie mięśniówki okrężnej znikają. Drobne fragmenty wspomnianego rejonu, o ile zawierają komórki śródmiąższowe Cajala, są zdolne do generowania fal wolnych [51]. W innych badaniach stwierdzono zgodność występowania komórek śródmiąższowych Cajala w tych odcinkach przewodu pokarmowego, które stale generują fale wolne. Dotyczy to całego jelita cienkiego [22] i dlatego najwięcej danych odnośnie tych komórek pochodzi z badań wspomnianego rejonu przewodu pokarmowego. Żołądek natomiast generuje fale wolne jedynie w obrębie swej dalszej części, a badania dotyczące dystrybucji komórek śródmiąższowych Cajala w żołądku [9] potwierdziły, że w obrębie dna żołądka, w którym fale wolne nie występują, rozmieszczenie komórek Cajala jest rzadkie. Podobna sytuacja jest w jelicie grubym. Najważniejsze fale wolne występują w środkowym rejonie okrężnicy, gdzie znaleziono największe nagromadzenie komórek śródmiąższowych Cajala [9]. Jednakże podobna zależność nie zawsze występuje. Komórki śródmiąższowe Cajala występują licznie w okrężnej warstwie mięśniówki gładkiej przełyku oposa, mimo iż nie zarejestrowano tam fal wolnych [10,13]. Stwierdzono ponadto, iż selektywny wychwyt błękitu metylowego przez komórki śródmiąższowe Cajala hamuje fale wolne [38,61]. Podobnie rodamina 123, wykazująca tendencję do gromadzenia się w mitochondriach, uszkadza komórki śródmiąższowe Cajala i hamuje występowanie fal wolnych [67].

W miarę przybywania dowodów eksperymentalnych ugruntowuje się opinia, że komórki śródmiąższowe Cajala są niezbędne dla generowania fal wolnych w obrębie przewodu pokarmowego [60]. Bezpośrednich dowodów w tej kwestii dostarczyli Barajas-Lopez i wsp.[1] oraz Langton i wsp. [36] wykrywając spontaniczną, rytmicznie generowaną, elektryczną aktywność, pochodzącą bezpośrednio z komórek śródmiąższowych Cajala, co zostało ostatnio potwierdzone przez Thomsena i wsp. [58] oraz Koha i wsp. [34] na izolowanych komórkach. W badaniach z użyciem izolowanych komórek śródmiąższowych Cajala [37] stwierdzono też m.in. występowanie wapniowego prądu o niskim progu aktywacji, indukowanego w czasie utrzymywania się transmembranowego potencjału ujemnego. Odpowiadający mu rodzaj kanału jonowego występuje także w innych tkankach wykazujących rytmiczną aktywność, jak np. serce, a środki blokujące ten kanał jonowy blokują także występowanie fal wolnych w nieuszkodzonej mięśniówce.

3. ROZWÓJ KOMÓREK ŚRÓDMIĄŻSZOWYCH CAJALA

Rozwój komórek śródmiąższowych Cajala był także wnikliwie badany. Stwierdzono, iż rozwój aktywności u myszy przebiega w zasadzie równoległe z rozwojem

komórek śródmiąższowych Cajala [70]. Całkowity rozwój komórek śródmiąższowych Cajala przypada na koniec okresu płodowego, podczas gdy elektryczna aktywność żołądka i jelita czczego przypominała tę u osobników dojrzałych w pierwszym tygodniu po urodzeniu. Najnowsze techniki badawcze pozwalają eksperymentalnie sterować rozwojem śródmiąższowych komórek Cajala. Komórki te mają bowiem w swoim genomie protoonkogen, *c-kit* [65] uczestniczący w różnicowaniu, migracji i dojrzewaniu niektórych komórek. Odkrycie to ma znaczenie zarówno poznawcze, jak i kliniczne. Podanie zwierzętom doświadczalnym przeciwciał mających zdolność wiązania się z białkiem *c-kit* niezwłocznie po urodzeniu hamuje bowiem powstawanie niektórych typów śródmiąższowych komórek Cajala i powoduje u tych zwierząt stan obniżonej aktywności motorycznej przewodu pokarmowego połączony z utratą zdolności generowania rytmicznej aktywności mioelektrycznej w jelicie cienkim. Wiadomo również, że pewne niekontrolowane mutacje genu *c-kit* powodują defekty w niektórych systemach komórek śródmiąższowych Cajala. Przykładowo komórki śródmiąższowe Cajala typu MY, uważane za typowe komórki rozrusznikowe, nie rozwijają się w jelicie cienkim tzw. mutantów W, których przewód pokarmowy pozbawiony jest fal wolnych [24,69]. Ostatnio stwierdzono występowanie immunoreaktywności charakterystycznej dla komórek śródmiąższowych Cajala w guzach zrębowych przewodu pokarmowego i zaproponowano nową nazwę dla tych guzów *gastrointestinal pacemaker cell tumor*, czyli guz komórek rozrusznikowych przewodu pokarmowego [30]. Izozaki i wsp. [26] stwierdzili brak komórek wykazujących pozytywną reakcję na *c-kit* u pacjentów z miopatyczną postacią przewlekłej idiopatycznej pseudoobstrukcji, a Nakama i wsp. [4] stwierdzili w tej sytuacji zaburzenia motoryki odźwiernika u myszy. Wyniki te wskazują dodatkowo na rolę śródmiąższowych komórek Cajala w kontroli motoryki żołądkowo-jelitowej. Kwestię zaburzeń motoryki przewodu pokarmowego w odniesieniu do komórek śródmiąższowych Cajala opisał nieco szerzej Huizinga i wsp. [23]. Proponowano także [25], aby wspomniane komórki stanowiły przedmiot zainteresowania farmakologów poszukujących sposobów farmakologicznej interwencji w zaburzeniach motoryki przewodu pokarmowego.

4. TYPY KOMÓREK ŚRÓDMIĄSZOWYCH CAJALA

W badaniach prowadzonych w ostatnim dwudziestoleciu stwierdzono, że komórki śródmiąższowe Cajala różnią się znacznie swym wyglądem i morfologicznie wyodrębniono różne ich typy. Funkcje poszczególnych typów komórek śródmiąższowych Cajala mogą być także odmienne. Thuneberg [60] wyróżnił cztery typy komórek Cajala. Typ I, występujący w obrębie splotu Auerbacha, a więc nazwany typem AP od *Auerbach plexus* (7) lub typem MY od określenia *myenteric* [8]. Sieć komórek

wspomnianego typu znajduje się pomiędzy podłużną a okrężną warstwą mięśni gładkich żołądka, jelita cienkiego oraz okrężnicy u człowieka i zwierząt. Uważa się, że generują fale wolne, przynajmniej w żołądku i w jelicie cienkim. Mają pierwotne i wtórne wypustki tworzące splot, który jest zlokalizowany między dwoma warstwami komórek mięśni gładkich i ma połączenia ze splotem Auerbacha. Wypustki te są bardzo długie i rozgałęzione, i rozpoczynają się od skąpej cytoplazmy okołojądrowej. Łączą się one z innymi wypustkami komórek typu AP. Opisywane komórki mają jądra owalne i jasne. W porównaniu z typowymi fibroblastami, aparat Golgiego jest mniej wyraźny, a cystyryny siateczki śródplazmatycznej szorstkiej są nieliczne i rozproszone. Dostrzega się obfitość mitochondriów. Ponadto nie zauważono w nich pośrednich struktur łączących je z mioblastami, a także podziałów miotycznych.

Typ II zwany też typem SS od *subserosal* lub prawdopodobnie także typem IM [50] z uwagi na to, że występuje w rejonie podsurowiczówkowym przetyku, żołądka i jelit. Komórki tego typu są ściśle związane z zakończeniami nerwowymi, a także są połączone z komórkami warstwy podłużnej mięśni gładkich przy pomocy krótkich, grubych wypustek. Wykazują pola bliskiego kontaktu z tzw. komórkami MCL (*macrophage-like cells*), obecnymi także w tym rejonie. Komórki MCL to nie poznany jeszcze rodzaj komórek, mogący pełnić zarówno lokalną rolę regulacyjną (czyli także stanowić jeden z podtypów komórek śródmiąższowych Cajala), jak też i rolę w procesach obronnych i odpornościowych. Komórki śródmiąższowe Cajala typu II mają cechy fibroblastów [59]. Cechuje je dobrze rozbudowany aparat Golgiego i siateczka śródplazmatyczna szorstka, która bywa niekiedy poszerzona. Mają bliski kontakt z włóknami kolagenowymi.

Typ III oznaczony też skrótem DMP od *deep muscular plexus*, zlokalizowany został w obrębie tzw. głębokiego splotu śródmięśniowego zwanego też *plexus muscularis profundus* (PMP). Komórki te znajdują się głównie w jelicie cienkim i są ewidentnie połączone z neuronami. Uważa się, iż pośredniczą one w przekazywaniu impulsów z neuronów jelitowego układu nerwowego do mięśniówki gładkiej jelita. Mają one zarówno cechy komórek Schwanna, jak też komórek mięśni gładkich [15]. Od komórek Schwanna odróżnia je m.in. stosunek do aksonów. Natomiast od komórek mięśniowych odróżnia je brak uporządkowanego układu filamentów, włączając w to wyraźny brak grubych, miozynopodobnych filamentów i ciałek gęstych [49]. Wiele podobnych cech wykazują komórki AP, ale tu jest lepiej wykształcona błona podstawna, jak również aparat Golgiego oraz siateczka śródplazmatyczna gładka, podczas gdy pęczki filamentów pośrednich są słabiej zaznaczone.

Typ IV, zwany też typem CM od *circular muscle* albo typem SM – *submucosal* [50]. Komórki te leżą w grubszej (zewewnętrznej) części warstwy mięśniówki okrężnej, bliżej warstwy podśluzowej, choć nie tak głęboko jak komórki typu III. Mają one także cechy fibroblastów. Towarzyszą pęczkom włókien nerwowych, toteż ich roli w generowaniu fal wolnych przypisuje się także udział w pośredniczeniu w

przebieżnictwie nerwowym, przede wszystkim w obrębie okrężnicy. Są to komórki o charakterze dwubiegunowym, mające długie, nierozgałęzione wypustki. Mają dobrze rozwinięty aparat Golgiego i siateczkę śródplazmatyczną szorstką z często poszerzonymi cysternami podobnie jak komórki typu SS oraz brak błony podstawowej. Pomimo okołonervej lokalizacji, ściśle połączenia tych komórek z aksonami są rzadko obserwowane, podczas gdy aksony (często bez towarzyszących im komórek śródmiąższowych Cajala) wykazują regularne połączenia, przypominające synapsy z komórkami mięśni gładkich [59]. Prócz tego, komórki typu CM łączą się za pomocą połączeń typu pośredniego (*intermediate-type junctions*) zarówno pomiędzy sobą, jak i z komórkami typu DMP, a także z komórkami mięśni gładkich.

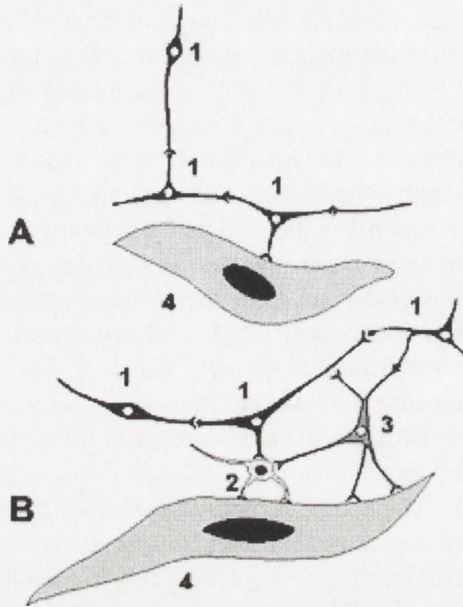
Rozmieszczenie komórek śródmiąższowych Cajala w przewodzie pokarmowym przedstawiono schematycznie na rysunku 1.

Ostatnio postuluje się istnienie u świnki morskiej 6 typów komórek śródmiąższowych Cajala [5]: 1) śródmięśniowe (IC-IM1), leżące pomiędzy warstwami mięśni przełyku, żołądka i jelita ślepego, 2) komórki śródmiąższowe Cajala położone w obrębie zwojów śródmięśniowych trzonu żołądka, antrum, jelita cienkiego i okrężnicy (IC-MY1), 3) komórki znajdujące się w głębokim splocie mięśniowym jelita cienkiego (IC-DMP), 4) komórki położone w obrębie okrężnej warstwy mięśniówki gładkiej okrężnicy, w pobliżu jej zetknięcia się z błoną podśluzową (IC-SM), 5) komórki typu gwiazdzistego, które są ściśle złączone ze splotem śródmięśniowym (IC-MY2) i zorientowane w kierunku podłużnej warstwy mięśniówki gładkiej okrężnicy oraz 6) śródmięśniowe, rozgałęzione komórki (IC-IM2) znajdujące się w okrężnicy bliższej w obrębie okrężnej warstwy mięśniówki gładkiej.

5. WSPÓLNE CECHY MORFOLOGICZNE KOMÓREK ŚRÓDMIĄŻSZOWYCH CAJALA

Nie ma, jak dotychczas, całkowitej zgodności odnośnie szczegółów morfologicznych komórek śródmiąższowych Cajala, a w ogólnym zarysie można je przedstawić następująco:

- 1) są zlokalizowane między zakończeniami nerwowymi a komórkami mięśni gładkich przewodu pokarmowego [50], w różnych warstwach mięśni gładkich,
- 2) są mniejsze od komórek nerwowych i podobne w swej wielkości do komórek mięśni gładkich [8],
- 3) są nieregularne i polimorficzne w swoim kształcie, mają szereg ważnych, rozgałęzionych wypustek [8]; uważa się, że z ciała komórki odchodzi ich zwykle 2–5, są więc podobne do fibroblastów,
- 4) mają okrągłe lub owalne jądro i możliwe do identyfikacji poszczególne organelle komórkowe [8].



RYSUNEK 1. Schemat połączeń komórek nerwowych i mięśniowych w ścianie przewodu pokarmowego bez udziału (A) lub z udziałem (B) śródmiaższowych komórek Cajala; inne objaśnienia: 1 – komórki zwojów nerwowych, 2 – komórki mięśnia gładkiego, 3 – śródmiaższowa komórka Cajala o przypuszczalnej funkcji rozrusznikowej, 4 – śródmiaższowa komórka Cajala prawdopodobnie o innej funkcji

Od fibroblastów i makrofagów odróżniają je następujące cechy: a) kształt komórki jest owalny, trójkątny lub bardziej nieregularny, z wypustkami, b) okołojądrowa cytoplazma jest skąpa, c) powierzchnia komórki jest gładka, d) wypustki mogą się rozgałęziać, ale można też zauważyć ich nie rozgałęzione odnogi, biegnące często w pęczkach, e) na przekroju poprzecznym wypustki są okrągłe.

Poszczególne typy śródmiaższowych komórek Cajala różnią się, jak wspomniano wyżej, pomiędzy sobą lokalizacją, współzależnościami z innymi komórkami oraz szczegółami ultrastruktury. Należy też dodać, że we wszystkich typach komórek występują pewne różnice gatunkowe.

6. IDENTYFIKACJA KOMÓREK ŚRÓDMIAŻSZOWYCH CAJALA

Komórki śródmiaższowe Cajala nie są łatwe do identyfikacji. Z uwagi na ich gwiaździsty kształt mogą być mylone przede wszystkim z komórkami zwojów jelitowego układu nerwowego, które także tworzą rodzaj sieci. Ponadto komórki śródmiaższowe Cajala należy odróżniać od komórek Schwanna, fibroblastów czy

makrofagów. Jak wiele wątpliwości w tym zakresie pojawiło się we wcześniejszych latach, ilustruje podsumowanie Thuneberga [60], a jak wiele wątpliwości jeszcze pozostało, pisze o tym Christensen [8]. Pomimo to nie ulega obecnie kwestii fakt, iż komórki śródmiąższowe Cajala istnieją jako odrębny rodzaj nie nerwowych i nie mięśniowych komórek, trudnych wprawdzie, lecz możliwych do identyfikacji [45,59]. Komórki śródmiąższowe Cajala mogą być identyfikowane metodami histologicznymi, elektrofizjologicznymi, biochemicznymi lub immunocytochemicznymi. Metody histologiczne należą do metod klasycznych. Początkowo bowiem hiszpański neuroanatom [6,7], a następnie inni [57] identyfikowali komórki śródmiąższowe przy użyciu metody Golgiego (chromian srebra) oraz przyżyciowego barwienia błękitem metylenowym. Do efektywnych metod należą i inne metody impregnowania metalami jak tzw. metoda ZIO (jodek cynkowy/kwas osmowy [45]). Metody te oraz inne sposoby barwienia, jak np. przy użyciu błękitu toluidynowego [17], są stosowane z powodzeniem do dnia dzisiejszego [9,13,38]. Ostatnio zaproponowano metodę przyżyciowego barwienia z użyciem *lipophilic dye Dil* [21]. Prócz metod z zastosowaniem mikroskopu świetlnego stosowane są w tym celu techniki z zastosowaniem mikroskopu elektronowego skaningowego [27,31]. Ultrastrukturę komórek śródmiąższowych Cajala badano po utrwalaniu immersyjnym w roztworach zawierających glutaraldehyd [35,67] lub utrwaleniu perfuzyjnym [3]. Szczegółowy opis tych technik podaje Rumessen [45], natomiast detale morfologiczne, opisywane w licznych pracach, zestawione są w szeregu publikacji podsumowujących [8,9,19,45,60,59,62].

Badaniom elektrofizjologicznym przyświecają dwa główne cele [11]:

- 1) poznanie roli komórek śródmiąższowych Cajala jako rozruszników,
- 2) dostarczenie informacji odnośnie „współpracy” wspomnianych komórek z układem nerwowym.

Podstawową techniką badawczą *in vitro* w tych eksperymentach jest śródkomórkowa rejestracja potencjałów elektrycznych, czyli fal wolnych z mięśni gładkich [38,55] oraz z izolowanych komórek Cajala [36]. Pozakomórkowa rejestracja aktywności mioelektrycznej przydatna w identyfikacji czynności komórek śródmiąższowych Cajala była również stosowana [32]. Tego typu badania pozwoliły na bliższe zlokalizowanie rejonu generowania fal wolnych. Rejony te odpowiadały lokalizacji komórek śródmiąższowych Cajala w badanym odcinku przewodu pokarmowego stwierdzonej w badaniach histologicznych i ultrastrukturalnych. Ponadto seria podobnych badań wykonywanych przez innych autorów [12,13] przyczyniła się z kolei do wzbogacenia wiedzy na temat elektrycznych właściwości komórek śródmiąższowych Cajala, do zlokalizowania rozrusznika żołądka [29] i do sformułowania teorii oscylatorów napięcia [52].

Jeśli chodzi o cel drugi, to dotychczasowe badania prowadzone były przy użyciu rozmaitych technik, w tym także klasycznych badań histologicznych [48]. Natomiast badania typu elektrofizjologicznego w tym zakresie przeprowadza się w celu oceny

wpływu mediatorów i modulatorów jelitowego układu nerwowego na elektryczną aktywność przewodu pokarmowego *in vitro*, a także w celu poznania funkcji kanałów jonowych [37].

Badania biochemiczne, a także farmakologiczne, to oddzielna grupa nieczęsto jeszcze stosowanych badań w odniesieniu do komórek Cajala. Badania te obejmują także dynamicznie rozwijające się badania genetyczne. Przy użyciu tych technik badawczych stwierdzono np. wytwarzanie przez komórki śródmiąższowe Cajala elastyny [47], wspomnianego uprzednio protoonkogenu *c-kit* [25], czy syntazy tlenu azotu [66].

Badania immunocytochemiczne [33,42] oraz techniki fluorescencyjne [40] stanowią dodatkową pomoc w identyfikowaniu komórek śródmiąższowych Cajala, mimo że są to metody o stosunkowo dużym stopniu trudności, zwłaszcza wówczas gdy niezbędną techniką przygotowawczą jest izolacja komórek śródmiąższowych Cajala [5,64]. Dlatego badania te rozwijają się tak powoli, iż jeszcze nie jest możliwe precyzyjne identyfikowanie tych komórek, a zwłaszcza ich podrodzajów.

7. FUNKCJE KOMÓREK ŚRÓDMIĄSZOWYCH CAJALA

Obecnie komórkom śródmiąższowym Cajala przypisuje się zdecydowaną rolę w kontroli motoryki przewodu pokarmowego [20]. Uważa się, iż odgrywają one istotną rolę jako komórki rozrusznikowe, biorą udział w koordynacji motoryki jelitowej kontrolując migrację potencjałów czynnościowych i pośredniczą w nerwowej regulacji motoryki.

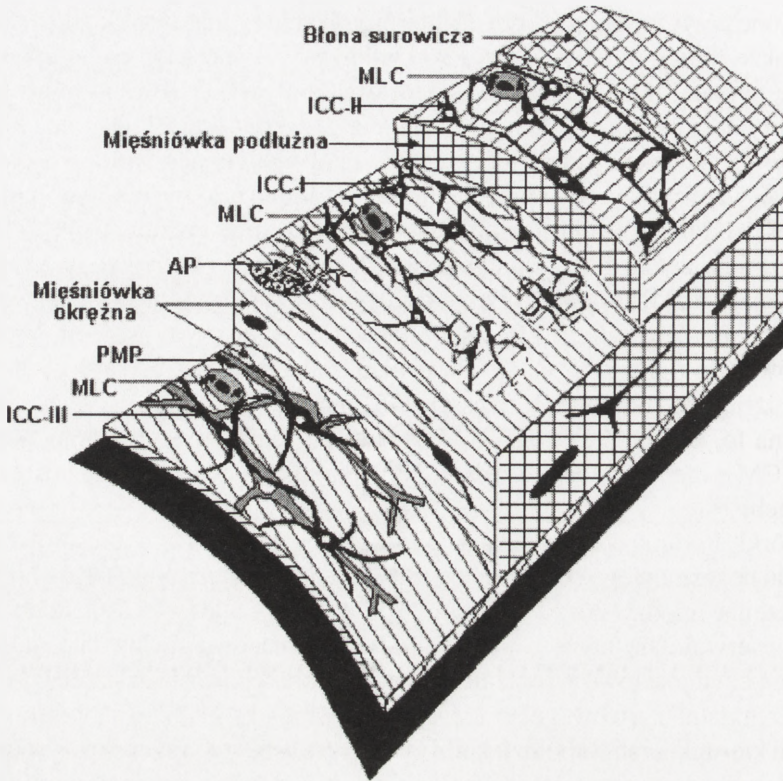
Pomimo wielu najnowocześniejszych technik zastosowanych w badaniach struktury i funkcji komórek śródmiąższowych Cajala, pytanie: czy pełnią one jeszcze inne funkcje w obrębie przewodu pokarmowego? – pozostaje otwarte. Wiadomo, że np. w obrębie warstwy mięśni gładkich przełyku oposa, gdzie fale wolne nie występują, komórki śródmiąższowe Cajala są obecne [16,17]. Dwa z czterech typów komórek (MY i IM) są, w przeciwieństwie do pozostałych, ściśle połączone z jelitowym układem nerwowym; zatem można przypuszczać, iż ich głównym zadaniem nie jest generowanie fal wolnych, lecz przekazywanie pobudzeń z układu nerwowego na mięśnie gładkie ściany przewodu pokarmowego. Nowsze badania potwierdzają tę tezę i choć nie ma jeszcze zbyt wielu na to dowodów, to argumentów naukowych stopniowo przybywa. Jak wynika z badań Warda i wsp. [68], zwierzęce mutanty, u których wyłączony jest czynnik komórki pnia aktywujący protoonkogen *c-kit*, nie mają komórek śródmiąższowych Cajala typu MY w jelicie cienkim i nie generują potencjałów elektrycznych w tym odcinku, ale mutacje te nie dotyczą komórek typu DMP, co przemawiać może za ich odmienną funkcją. Wiadomo, że komórki śródmiąższowe Cajala są unerwione nitriergicznie [53] i jest możliwe,

że mogą one przyczyniać się także do interpretowania sygnałów z układu nerwowego, w tym także do ich modulowania. Przykładowo, w komórkach tych zlokalizowano izoformę syntazy tlenu azotu [66], która może być aktywowana poprzez neurotransmitery lub neuromodulatory uwalniane z zakończeń jelitowego układu nerwowego, w tym także przez tlenek azotu. Stąd modulujące wpływy tlenu azotu mogą być wzmacniane w obrębie komórek śródmiąższowych Cajala poszerzając możliwości oddziaływania hamujących neuronów motorycznych [43].

Czy istnieją zatem funkcjonalne powiązania pomiędzy obydwojema grupami komórek Cajala, czyli grupą 1, obejmującą typy I i IV, generujące fale wolne oraz grupą 2, obejmującą typy II i III związane ściśle z jelitowym układem nerwowym? Dowodów fizjologicznych na to wprawdzie brakuje, lecz z badań histologicznych wynika, iż jest to możliwe. Rumessen [45] nie uzyskał co prawda wyraźnych dowodów na to, że komórki typu III (DMP) są połączone z komórkami typu I (AP) lub IV (CM); nie wyklucza to jednak istnienia takich połączeń, bezpośrednich lub pośrednich.

Komórki śródmiąższowe Cajala są połączone u ssaków z mięśniówką gładką przewodu pokarmowego i częściowo z układem nerwowym (rys. 2). Równie wyraźne są połączenia między poszczególnymi komórkami Cajala [45,59]. Podobne połączenia obserwuje się także u ptaków [44]. Stąd nasuwa się pytanie, jakie są ich wzajemne czynnościowe współzależności. Czy oprócz prostego przekazywania pobudzeń z układu nerwowego w kierunku mięśniówki gładkiej i być może w odwrotnym kierunku, ich współdziałanie ma szersze aspekty? Przede wszystkim należy jasno stwierdzić, że na temat kierunków przekazywania pobudzeń w rejonach występowania komórek śródmiąższowych Cajala nic pewnego nie jest wiadome. Mutanty myszy pozbawione komórek śródmiąższowych Cajala w obrębie splotu Auerbacha nie generują tzw. *slow wave-type action potentials*, ale generowanie aktywności elektrycznej nie jest zahamowane [39]. Natomiast w zakresie generowania fal wolnych można przypuszczać, że wzajemne połączenia komórek śródmiąższowych Cajala sprzyjać muszą synchronizacji pobudzeń i stąd mogą być odpowiedzialne za występowanie progów częstotliwości fal wolnych oraz migrację tych fal wzdłuż jelita [14], choć z braku odpowiednich danych trudno przytoczyć konkretne argumenty merytoryczne potwierdzające tę tezę. W świetle przytoczonych, bardzo skąpych danych można zaledwie domniemywać, że komórki śródmiąższowe Cajala tworzą w danej warstwie ścisłą, zintegrowaną funkcjonalnie sieć.

Nowe światło na rolę śródmiąższowych komórek Cajala typu MY rzuciły badania Rumessena i wsp. [46,47], które wykazały, że komórki te pozostają w ścisłym związku z włóknami elastycznymi, co może sugerować ich rolę w reagowaniu na rozciąganie [45] lub jakiegoś rodzaju wpływu na te włókna.



RYSUNEK 2. Proponowany schemat rozmieszczenia śródmięszowych komórek Cajala w ścianie przewodu pokarmowego: M – błona surowicza, AP – splot Auerbacha, LM – mięśniówka podłużna, CM – mięśniówka okrężna, CM-OL – warstwa powierzchniowa mięśniówki okrężnej, CH-IL – warstwa głęboka mięśniówki okrężnej, ICC₁ – komórki towarzyszące splotowi Auerbacha (Cajala), ICC₂ – komórki Cajala nie związane z elementami nerwowymi – rozmieszczone między błoną surowiczą a warstwą mięśni podłużnych, ICC₃ – komórki Cajala związane z komórkami splotu mięśniowego głębokiego, leżące między warstwą powierzchniową i głęboką mięśniówki okrężnej, PMP – komórki splotu mięśniowego głębokiego, MLC – komórki o cechach makrofagów

PIŚMIENNICTWO

- [1] BARAJAS-LOPEZ C, BEREZIN I, DANIEL EE, HUIZINGA JD. Pacemaker activity recorded in interstitial cells of Cajal of the gastrointestinal tract. *Am J Physiol* 1989; **257**: C830–C835.
- [2] BAUER AJ, PUBLICOVER NC, SANDERS KM. Origin and spread of slow waves in canine gastric antral circular muscle. *Am J Physiol* 1985; **249**: G800–G806.
- [3] BEREZIN I, HUIZINGA JD, DANIEL EE. Interstitial cells of Cajal in the canine colon: a special communication network at the inner border of the circular muscle. *J Comp Neurol* 1988; **273**: 42–51.
- [4] BORTOFF A. Myogenic control of intestinal motility. *Physiol Rev* 1976; **56**: 418–437.

- [5] BURNS AJ, HERBERT TM, WARD SM, SANDERS KM. Interstitial cells of Cajal in the guinea-pig gastrointestinal tract as revealed by c-Kit immunohistochemistry. *Cell Tissue Res* 1997; **290**: 11–20.
- [6] CAJAL SR. *Histologie du systeme nerveux de l'Homme et des Vertebres*. Maloine, Paris 1911.
- [7] CAJAL SR. Sur les ganglions et plexus nerveux de lintestin. *C R Soc Biol (Paris)* 1983; **45**: 217–223.
- [8] CHRISTENSEN J. A commentary on the morfological identification of interstitial cells of Cajal in the gut. *J Auton Ner Syst* 1992; **37**: 75–88.
- [9] CHRISTENSEN J, RICK GA, LOWE LS. Distribution of interstitial cells of Cajal in stomach and colon of cat, dog, ferret, opossum, rat, guinea-pig and rabbit. *J Auton Ner Syst* 1992; **37**: 47–56.
- [10] CHRISTENSEN J, RICK GA, SOLL DJ. Intramural nerves and interstitial cells revealed by the Champy-Maillet stain in the opossum esophagus. *J Auton Ner Syst* 1987; **19**: 137–151.
- [11] DANIEL EE, BEREZIN I. Interstitial cells of Cajal: are they mayor players in control of gastrointestinal motility? *J Gastrointest Motil* 1992; **4**: 1–24.
- [12] DANIEL EE, CRANKSHAW J, SARNA S. Prostaglandins and tetrodotoxin-insensitive relaxation of opossum lower esophageal sphincter. *Am J Physiol* 1979; **236**: E153–E172.
- [13] DANIEL EE, POSEY-DANIEL V. Neuromuscular structures in opossum esophagus: role of interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol* 1984; **246**: G305–G315.
- [14] DIAMANT NE, BORTOFF A. Nature of the intestinal slow wave frequency gradient. *Am J Physiol* 1969; **216**: 301–307.
- [15] DUCHON G, HENDERSON R, DANIEL EE. Circular muscle layers in the small intestine. [w] Daniel EE [red.] Proceedings of the Fourth International Symposium on Gastrointestinal Motility. Mitchel, Vancouver 1974; 635–646.
- [16] DURDLE NG, KINGMA J, BOWES KL. Origin of slow waves in the canine colon. *Gastroenterology* 1983; **84**: 375–382.
- [17] FAUSSONE-PELLEGRINI MS, PANTALONE D, CORTESINI C. Smooth muscle cells, interstitial cells of Cajal and myenteric plexus interrelationships in the human colon. *Acta Anat* 1990; **139**: 31–44.
- [18] FEYRTER F. Über die Pathologie der vegetativen nervösen Peripherie und ihrer ganglionären Regulationstätten. Mandrich, Vienna 1951.
- [19] GABELLA G. Innervation of the gastrointestinal tract. *Int Rev Cytol* 1979; **59**: 129–193.
- [20] HAGGER R, FINLAYSON C, JEFFREY I, KUMAR D. Role of the interstitial cells of Cajal in the control of gut motility. *Br J Surg* 1997; **84**: 445–450.
- [21] HANANI M, LOUZON V, MILLER SM, FAUSSONE-PELLEGRINI MS. Visualization of interstitial cells of Cajal in the mouse colon by vital staining. *Cell Tissue Res* 1998; **292**: 275–282.
- [22] HARA Y, KUBOTA M, SZURSZEWski JH. Electrophysiology of smooth muscle of the small intestine of some mammals. *J Physiol (Lond)* 1986; **372**: 501–520.
- [23] HUIZINGA JD. Neural injury, repair and adaptation in the GI tract. IV. Pathophysiology of GI motility related to interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol* 1998; **275**, G381–G386.
- [24] HUIZINGA JD, THUNEBERG L, KLUPPEL M, MAŁYSZ J, MIKKELSEN HB, BERNSTEIN A. W-Kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* 1995; **373**: 347–349.
- [25] HUIZINGA JD, THUNEBERG L, VANDERWINDEN JM, RUMESSEN JJ. Interstitial cells of Cajal as targets for pharmacological intervention in gastrointestinal motor disorders. *Trends Pharmacol Sci* 1997; **18**: 393–403.
- [26] IZOZAKI K, HIROTA S, MIYAGAWA J, TANIGUCHI M, SHINOMURA Y, MATSUZAWA Y. Deficiency of c-Kit+ cells in patients with a myopathic form of chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction. *Am J Gastroenterol* 1997; **92**: 332–334.

- [27] JESSEN H, THUNEBERG L. Interstitial cells of Cajal and Auerbach's plexus. A scanning electron microscopical study of guinea-pig small intestine. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1991; **23**: 195–212.
- [28] KEITH A. A new theory of the causation of enterostasis. *Lancet* 1915; **2**: 371–375.
- [29] KELLY KA, CODE CF. Canine gastric pacemaker. *Am J Physiol* 1971; **220**: 112–118.
- [30] KINDBLOMLG, REMOTTI HE, ALDENBORGF, MEIS KINDBLOM JM. Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol* 1998; **152**: 1259–1269.
- [31] KOBAYASHI S, FURNESS JB, SMITH T, POMPOLO S. Histological identification of the interstitial cells of Cajal in the guinea-pig small intestine. *Arch Histol Jpn* 1989; **52**: 267–286.
- [32] KOBAYASHI M, PROSSER CL, NAGAI T. Electrical properties of intestinal muscle as measured intracellularly. *Am J Physiol* 1967; **213**: 275–286.
- [33] KOBAYASHI S, SUZUKI M, ENDO T, TSUI S, DANIEL EE. Framework of the enteric nerve plexuses: an immunocytochemical study in the guinea-pig jejunum using an antiserum to S-100 protein. *Arch Histol Jpn* 1986; **49**: 159–188.
- [34] KOH SD, SANDERS KM, WARD SM. Spontaneous electrical rhythmicity in cultured interstitial cells of Cajal from the murine small intestine. *J Physiol (Lond)* 1998; **513**: 203–213.
- [35] KOMURO T. Three-dimensional observation of fibroblast-like cells associated with the rat myenteric plexus, with special reference to the interstitial cells of Cajal. *Cell Tissue Res* 1989; **255**: 343–351.
- [36] LANGTON P, WARD SM, CARL A, NORELL MA, SANDERS KM. Spontaneous electrical activity of interstitial cells of Cajal isolated from canine proximal colon. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 7280–7284.
- [37] LEE HK, SANDERS KM. Comparison of ionic currents from interstitial cells and smooth muscle cells of canine colon. *J Physiol (Lond)* 1993; **460**: 135–152.
- [38] LIU LWC, THUNEBERG L, HUIZINGA JD. Selective lesioning of interstitial cells of Cajal by methylene blue and light leads to loss of slow waves. *Am J Physiol* 1994; **266**: G485–G496.
- [39] MAŁYSZ J, THUNEBERG L, MIKKELSEN HB, HUIZINGA JD. Action potential generation in the small intestine of W mutant mice that lack interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol* 1996; **271**: G387–399.
- [40] MIKKELSEN HB, THUNEBERGL, RUMESSEN JJ, THORBALL N. Macrophage-like cells in the muscularis externa of mouse small intestine. *Anat Rec* 1985; **213**: 77–86.
- [41] NAKAMA A, HIROTA S, OKAZAKI T, NAGANO K, KAWANO S, HORI M, KITAMURA Y. Disturbed pyloric motility in Ws/Ws mutant rats due to deficiency of c-Kit-expressing interstitial cells of Cajal. *Pathol Int* 1998; **48**: 843–849.
- [42] PROSSER CL, HOLZWARTH MA, BARR L. Immunocytochemistry of the interstitial cells of Cajal in the rat intestine. *J Auton Nerv Syst* 1989; **27**: 17–25.
- [43] PUBLICOVER NG, HAMMOND EM, SANDERS KM. Amplification of nitric oxide signaling by interstitial cells isolated from canine colon. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 2087–2091.
- [44] REYNHOUT JK, DUKE GE. Identification of interstitial cells of Cajal in the digestive tract of turkeys (*Meleagris gallopavo*). *J Exp Zool* 1999; **283**: 426–440.
- [45] RUMESSEN JJ. Identification of interstitial cells of Cajal. Significance for studies of human small intestine and colon. Thesis. Copenhagen 1994; 1–23.
- [46] RUMESSEN JJ, MIKKELSEN HB, QVORTRUP K, THUNEBERG L. Ultrastructure of interstitial cells of Cajal (ICC) in the circular muscle of human small intestine. *Gastroenterology* 1993; **104**: 343–350.
- [47] RUMESSEN JJ, THUNEBERG L. Interstitial cells of Cajal in human small intestine. Ultrastructural identification and organization between the main smooth muscle layers. *Gastroenterology* 1991; **100**: 1417–1431.

- [48] RUMESSEN JJ, THUNEBERG L, MIKKELSEN HB. Nerve terminals and interstitial cell-types in plexus muscularis profundus (mouse small intestine). *Scand J Gastroenterol* 1982; **17**: suppl. 71, 145–146.
- [49] RUMESSEN JJ, THUNEBERG L, MIKKELSEN HB. Plexus muscularis profundus and associated interstitial cells. II. Ultrastructural studies of mouse small intestine. *Anat Rec* 1982; **203**: 129–146.
- [50] SANDERS KM. Interstitial cells of Cajal: 'spark plugs' of gastrointestinal motility. *Motility. Clinical Perspectives in Gastroenterology* 1996; **34**: 13–14.
- [51] SANDERS KM, SMITH TK. Electrophysiology of colonic smooth muscle. [w] Schultz SG, Wood JD, Rauner BB [red.] Handbook of Physiology. The Gastrointestinal System. Section 6. Vol. 1. Motility and Circulation. Waverly Press, Baltimore 1989; 251–271.
- [52] SARNA SK, DANIEL EE, KINGMA YJ. Stimulation of the electric control activity of the stomach by an array of relaxation oscillators. *Dig Dis* 1972; **17**: 299–310.
- [53] SHUTTLEWORTH CW, XUE C, WARD SM, de VENTE J, SANDERS KM. Immunohistochemical localization of 3,5-cyclic guanosine monophosphate in the canine proximal colon: responses to nitric oxide and electrical stimulation of enteric inhibitory neurons. *Neuroscience* 1993; **56**: 513–522.
- [54] STACH W. Der Plexus entericus extremus des Dickdarmes und seine Beziehungen zu den interstitiellen Zellen (Cajal). *Z Mikrosk Anat Forsch Leipz* 1972; **85**: 245–272.
- [55] SUZUKI N, PROSSER CL, DAHMS V. Boundary cells between longitudinal and circular layers: essential for electrical slow waves in cat intestine. *Am J Physiol* 1986; **250**: G287–G294.
- [56] SZURSZEWSKI JH. Electrical basis of gastrointestinal motility. [w] Johnson LR [red.] Physiology of Gastrointestinal Tract. 2nd ed. Vol. 1. Raven Press. New York 1987; 283–422.
- [57] TAXI J. Cellules de Schwann et cellules interstitielles de Cajal au niveau de plexus nerveux de la musculature intestinale du Cobaye: retour aux definitions. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 1952; **41**: 281–304.
- [58] THOMSEN L, ROBINSON TL, LEE JC, FARRAWAY LA, HUGHES MJ, ANDREWS DW, HUIZINGA JD. Interstitial cells of Cajal generate a rhythmic pacemaker current. *Nat Med* 1998; **4**: 848–851.
- [59] THUNEBERG L. Interstitial cells of Cajal. [w] Schultz SG, Wood JD, Rauner BB [red.] Handbook of Physiology. The Gastrointestinal System. Section 6. Vol. 1. Motility and Circulation. Waverly Press, Baltimore 1989; 349–386.
- [60] THUNEBERG L. Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells? *Adv Anat Embriol Cell Biol* 1982; **71**: 1–130.
- [61] THUNEBERG L, JOHANSEN V, RUMESSEN JJ, ANDERSEN BG. Interstitial cells of Cajal: selective uptake of methylene blue inhibits slow wave activity. [w] Roman C [red.] Gastrointestinal Motility. MTP Press, Lancaster 1984; 495–502.
- [62] THUNEBERG L, RUMESSEN JJ, MIKKELSEN HB. Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells? [w] Wienbeck M [red.] Motility of the Digestive Tract. Raven Press, New York 1982; 115–122.
- [63] TIEGS OW. The nerve net of plain muscle, and its relation of autonomic rhythmic movements. *Austr J Exp Biol Med. Sci* 1925; **2**: 156–166.
- [64] TORIHASHI S, HORISAWA M, WATANABE Y. c-Kit immunoreactive interstitial cells in the human gastrointestinal tract. *J Auton Nerv Syst* 1999; **75**: 38–50.
- [65] TORIHASHI S, KOBAYASHI S. Immunohistochemistry and nerve lesion experiments on the methionine-enkephalin immunopositive neurons in the small intestine of the bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Cell Tissue Res* 1995; **280**: 97–111.
- [66] XUE C, POLLOCK J, SCHMIDT HH, WARD SM, SANDERS KM. Expression of nitric oxide synthase immunoreactivity by interstitial cells of the canine proximal colon. *J Auton Nerv Syst* 1994; **49**: 1–14.

- [67] WARD SW, BURKE EP, SANDERS KM. Use of rhodamine 123 to label end lesion interstitial cells of Cajal in canine colonic circular muscle. *Anat Embryol* 1990; **182**: 215–224.
- [68] WARD SM, BURNS AJ, TORIHASHI S, HARNEY SC, SANDERS KM. Impaired development of interstitial cells and intestinal electrical rhythmicity in steel mutants. *Am J Physiol* 1995; **269**: C1577–C1585.
- [69] WARD SM, BURNS AJ, TORIHASHI S, SANDERS KM. Mutation of the protooncogene c-Kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. *J Physiol (Lond)* 1994; **480**: 91–97.
- [70] WARD SM, HARNEY SC, BAYGUINOV JR, Mc LAREN GJ, SANDERS KM. Development of electrical rhythmicity in the murine gastrointestinal tract is specifically encoded in the tunica muscularis. *J Physiol (Lond)* 1997; **505**: 241–258.

Redaktor prowadzący – S. Biliński

Otrzymano: 25.11. 1999 r.

Przyjęto: 15.12. 1999 r.

Adres autora: ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

CYTOKINY I PROCESY PRZEKAZYWANIA SYGNAŁU: GRUPA CYTOKIN TYPU INTERLEUKINY-6 JAKO UKŁAD MODELOWY*

CYTOKINES AND SIGNAL TRANSDUCTION MECHANISMS: IL-6-TYPE CYTOKINES AS A MODEL SYSTEM

Marcin KORTYLEWSKI, Andrzej MACKIEWICZ

Zakład Immunologii Nowotworów Akademii Medycznej,
Wielkopolskie Centrum Onkologii, Poznań

Streszczenie: Cytokiny pełnią ważną funkcję w kontroli kluczowych procesów życiowych organizmu, inicjując proliferację, różnicowanie bądź śmierć komórek. Różnorodność reakcji komórki docelowej na działanie cytokin jest wynikiem aktywacji szeregu swoistych szlaków przekazywania sygnału. Grupa cytokin typu interleukiny-6 oprócz samej IL-6 obejmuje ponadto: interleukinę-11 (IL-11), onkostatynę M (OSM), czynnik hamujący wzrost białaczki (LIF), rzęskowy czynnik neurotroficzny (CNTF) i kardirotrofinę-1 (CT-1). Cytokiny te łączą wykorzystanie gp130 jako wspólnego łańcucha β w multimerycznym kompleksie receptora. Związanie ligandu wywołuje aktywację kinaz tyrozynowych Jak, prowadząc do fosforylacji wewnątrzkomórkowej części receptora, a następnie aktywacji różnorodnych szlaków sygnalizacji za pośrednictwem czynników STAT, fosfatazy SHP-2, kinaz z rodziny Src. Procesy sygnalizacji szlakiem Jak/STAT podlegają również negatywnej regulacji, głównie w drodze defosforylacji czynników STAT i syntezy swoistych inhibitorów z rodziny PIAS lub SOCS/SSI/JAB. Ostateczny wynik działania cytokin wydaje się być wypadkową działania przeciwstawnych, a jednocześnie zaktywowanych szlaków przekazywania sygnału.

(*Postępy Biologii Komórki* 2000; 27: 213–227)

Słowa kluczowe: cytokiny, interleukina-6, gp130, przekazywanie sygnału, Jak, STAT, SHP-2

Summary: Cytokines play an important role in initiating the fate of cells, such as proliferation, differentiation or death. Distinct responses of target cells to cytokines are determined by specific signal transduction events. The group of interleukin-6-type cytokines comprises also: interleukin-11 (IL-11), oncostatinM (OSM), leukemia inhibitory factor (LIF), ciliary neurotrophic factor (CNTF) and cardiotrophin-1 (CT-1). IL-6-type cytokines use p130 as a common β chain of their multimeric receptor

*Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych

complexes. Binding of the ligands lead to the activation of Jak tyrosine kinases, which in turn phosphorylate intracellular part of the receptor and initiate various signal transduction events mediated by STAT factors, SHP-2 phosphatase or Src-family kinases. The signalization by Jak/STAT pathway is negatively regulated by dephosphorylation or synthesis of the specific inhibitors like PIAS or SOCS/SSI/JAB. The outcome of the signal transduction seems to be an effect of the interplay among the contradictory signaling pathways simultaneously activated via cytokine receptor. (*Advances of Cell Biology 2000; 27: 213–227*)

Key words: cytokines, interleukin-6, gp130, signal transduction, Jak, STAT, SHP-2

CYTOKINY

Cytokiny stanowią niskocząsteczkowe białka spełniające rolę mediatorów sygnalizacji międzykomórkowej. Pełnią ważną funkcję w kontroli kluczowych procesów życiowych organizmu, inicjując proliferację, różnicowanie bądź śmierć komórek. Wpływają na wszystkie fazy odpowiedzi immunologicznej zarówno typu komórkowego, jak i humoralnego, oddziałując na limfocyty B, T, komórki NK, monocyty-makrofagi i granulocyty. Biorą udział w patogenezie procesów zapalnych stawów, nerek, pęcherza moczowego, a także chorób autoimmunologicznych układu nerwowego i endokrynowego. W przeciwieństwie do hormonów, cytokiny nie są magazynowane w komórkach gruczołowych, lecz są szybko syntetyzowane i wydzielane przez różnego typu komórki, najczęściej w wyniku stymulacji. Regulacja ich wytwarzania może odbywać się na poziomie transkrypcji DNA, stabilizacji mRNA, translacji RNA lub wydzielania już zsyntetyzowanego białka. Uwolnione do krwi cytokiny są zwykle słabo wykrywalne. Ich działanie ogranicza się często do mikrośrodowiska wokół komórki je wydzielającej, może być więc auto- bądź parakrynowe. Efekt biologiczny działania cytokin zależy też od ilości receptorów na powierzchni komórki docelowej hamowania wewnątrzkomórkowego związanego z zaburzeniami szlaków przekazywania sygnału. Wpływ cytokin na komórki docelowe może być również modulowany obecnością w środowisku ich rozpuszczalnych receptorów lub przeciwciał wzmagających działanie danej cytokiny bądź je znoszących. Aktywacji komórek przez cytokiny mogą też zapobiegać naturalnie występujące białka, zwane antagonistami receptorów, uniemożliwiające związanie się ligandu z kompleksem receptora. Różne cytokiny mogą wpływać antagoniście, addycyjnie lub synergistycznie na te same procesy biologiczne, szczególnie takie jak: hematopoeza, reakcje na obce antygeny i reakcje ostrej fazy. Ich cechą jest też plejotropia, czyli działanie na różne typy komórek docelowych, a także częściowa zastępowalność funkcji, gdzie podobne efekty biologiczne mogą być wywoływane przez różne cytokiny.

Klasyfikacja cytokin może odwoływać się do ich efektów biologicznych, budowy kompleksu receptora lub ich trójwymiarowej struktury [28, 45].

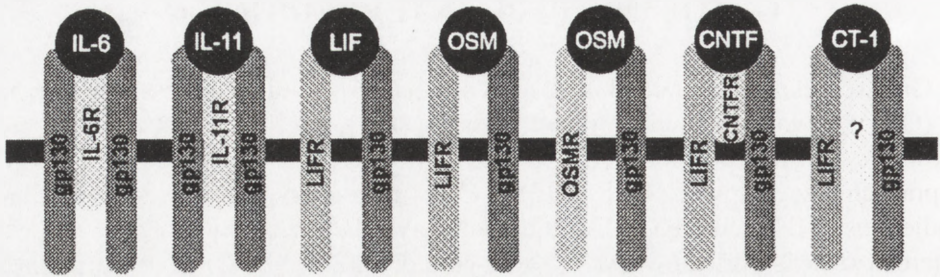
CYTOKINY TYPU INTERLEUKINY-6

Grupa cytokin typu interleukiny-6 obok samej IL-6 obejmuje ponadto: onkostatyne M (OSM), czynnik hamujący wzrost białaczki (LIF), interleukinę-11 (IL-11), rzęskowy czynnik neurotroficzny (CNTF) i kardiotrofinę-I (CT-1) (opisane szczegółowo w pracach przeglądowych - [16, 18, 55]). Cytokiny te łączą wykorzystanie wspólnej podjednostki β receptora, jak również podobny schemat budowy opartej na pęku czterech α -helis zorientowanych „góra-góra-dół-dół” [2]. Wszystkie są polipeptydami o masie molekularnej ok. 20 kDa.

Cytokiny z rodziny IL-6 cechuje funkcjonalna plejotropia, czyli szerokie spektrum działania. Są one niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania układu odpornościowego, nerwowego, wydzielniczego, regulacji przebiegu procesów krwiotworzenia, metabolizmu kości i procesów zapalnych. Cytokiny typu IL-6 często wykazują podobną aktywność biologiczną. Ich wspólne efekty dotyczą na przykład stymulacji rozwoju megakariocytów i tworzenia płytek krwi, przyspieszenia proliferacji wielopotencjalnych komórek macierzystych szpiku oraz regulacji syntezy białek ostrej fazy przez hepatocyty. Ponadto cytokiny typu IL-6 stymulują proliferację komórek szpiczaka, ale jednocześnie większość z nich, tzn. IL-6, OSM, LIF, CT-1, wykazuje odwrotne działanie na komórki mysiej linii białaczki M1, hamując ich wzrost i różnicowanie. IL-6 i OSM hamują także wzrost niektórych komórek raka płuc i raka piersi [5, 10, 19, 56]. Podobny efekt został opisany również w przypadku melanocytów [52] i komórek czerniaka pochodzących z wczesnych etapów wzrostu nowotworu, podczas gdy komórki z zaawansowanych stadiów czerniaka w większości przypadków wykazują oporność na działanie IL-6 i/lub OSM [29, 30, 31, 48]. Miejscowe parakrynowe mechanizmy hamowania wzrostu mogą więc być ważnym czynnikiem ograniczającym rozwój nowotworów.

RECEPTORY CYTOKIN TYPU IL-6

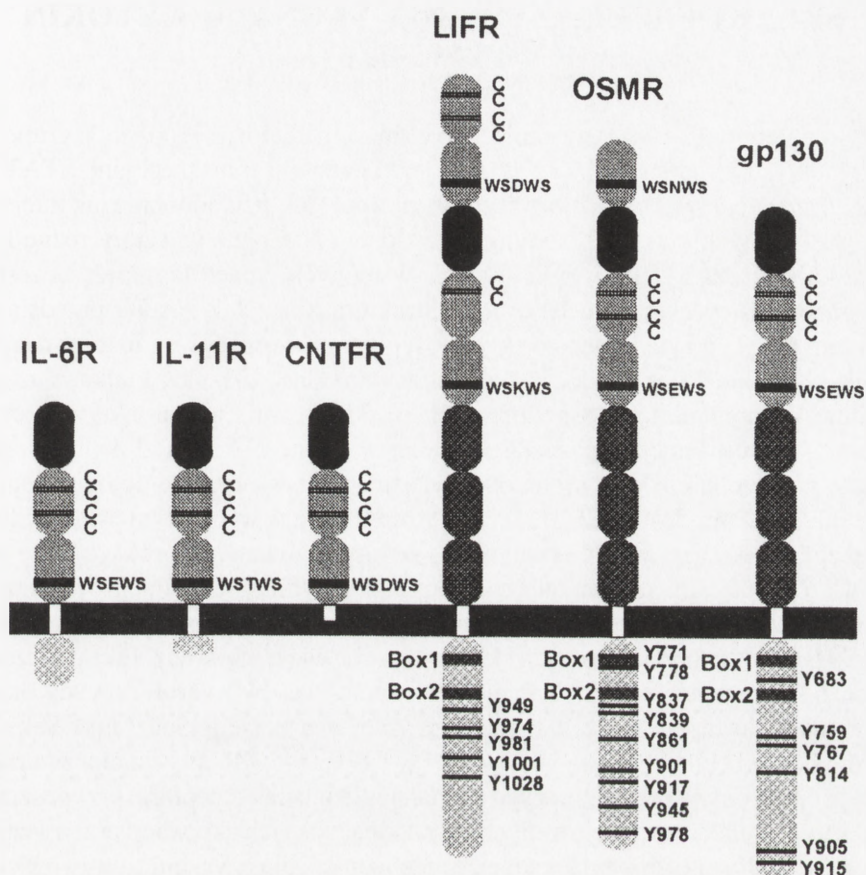
Zbliżony, a nawet w dużej części wzajemnie zastępowalny charakter funkcji cytokin typu IL-6, można wyjaśnić istnieniem wielu wspólnych elementów w ich szlakach transdukcji sygnału. Cytokiny te łączą bowiem wykorzystanie gp130 jako wspólnego łańcucha β w multimerycznym kompleksie receptora [16, 18]. W przypadku IL-6 pierwszym etapem sygnalizacji jest wywołana przez ligand homodimeryzacja podjednostek transdukcujących sygnał (gp130) przy udziale podjednostki α determinującej swoistość wiązania (rys. 1). Także rozpuszczalna forma IL-6R α (sIL6R) może asocjować z IL-6, a następnie tworzyć kompleks o wysokim powinowactwie z dimerem gp130 i inicjować procesy przekazywania sygnału do wnętrza komórki [34, 54]. Obecność sIL-6R potęguje działanie IL-6 umożliwiając prze-



RYSUNEK 1. Schemat kompleksów receptorów dla cytokin typu IL-6

zwyciężenie limitującego wpływu ograniczonej liczby podjednostek α na powierzchni komórek. Jak wykazały eksperymenty *in vitro*, sIL-6R może być wydzielany drogą ograniczonej proteolizy receptora błonowego [39], jednakże *in vivo* bardziej prawdopodobna jest jego sekrecja po translacji z alternatywnie złożonej formy mRNA [32]. Rozpuszczalny IL-6R występuje w osoczu krwi w stężeniach 30–70 ng/ml, jego podwyższony poziom stwierdzono w przypadku niektórych stanów chorobowych m.in. infekcji HIV czy szpiczaka mnogiego. Nie jest jednak jasne, czy w fizjologicznych stężeniach sIL-6R działa jako agonista, ze względu na stosunkowo wysokie stężenia rozpuszczalnego gp130 (ok. 300 ng/ml) także obecnego we krwi i mogącego działać neutralizująco. Homodimer gp130 jest również kluczowym elementem kompleksu receptora IL-11 [17]. W przypadku tego receptora podjednostka IL-11R podobnie jak IL-6R α , odpowiada za swoiste wiązanie ligandu i funkcjonuje także w formie rozpuszczalnej działając agonistycznie [1].

CNTF, CT-1, LIF i OSM sygnalizują za pośrednictwem heterodimerów receptorów gp130 i LIFR (rys. 1). W przypadku CNTF w procesie wiązania ligandu uczestniczy podjednostka α receptora, nie biorąca udziału w samym przekazywaniu sygnału [9]. Istnienie swoistej podjednostki receptora α zasugerowano także w przypadku CT-1, jak dotąd nie została ona jednak sklonowana [46]. W odróżnieniu od pozostałych cytokin ludzka OSM wykorzystuje dwa różne typy kompleksów receptora. Heterodimer gp130 z LIFR [14], jak i heterodimer gp130 ze swoistą podjednostką OSMR [38]. Pod względem struktury LIFR (gp190) oraz OSMR (gp180) wykazują duże podobieństwo do gp130 i również biorą udział w przekazywaniu sygnału. Wszystkie te receptory są białkami błonowymi typu I, tzn. mają jedną domenę przezbłonową i N-koniec po stronie zewnątrzkomórkowej. Ponadto wszystkie razem z IL-6R α należą do rodziny receptorów cytokinowych klasy I. Łączy je obecność przynajmniej jednego charakterystycznego regionu homologii, tzw. modułu wiązania cytokiny (ang. *cytokine binding module* CBM), długości ok. 200AA z charakterystycznymi czterema konserwatywnymi resztami cysteiny w części N-końcowej i motywu tryptofan seryna-(dowolny aminokwas)-seryna-tryptofan

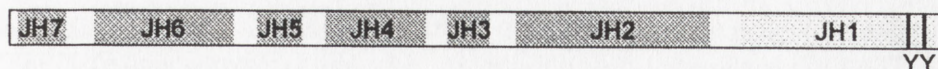
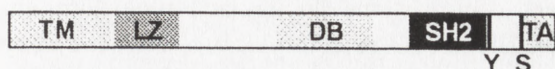
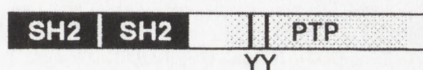
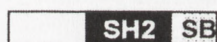


RYSUNEK 2. Struktura receptorów biorących udział w sygnalizacji cytokin typu IL-6: położoną po stronie zewnątrzkomórkowej domenę immunoglobulinową zaznaczono kolorem czarnym, domeny fibronektynowe typu III kolorem ciemnoszarym, moduły wiązania cytokiny (CBM) kolorem jasnoszarym z zaznaczeniem konserwatywnych reszt cysteiny (C) i sekwencji WSXWS; po stronie wewnątrzkomórkowej w podjednostkach receptorów transdukcujących sygnał zaznaczono lokalizację sekwencji box1/2 i reszt tyrozyny istotnych dla sygnalizacji

(WSXSW) w części C-końcowej. Pod względem strukturalnym w obrębie tego regionu wyróżnić można ułożone tandemowo dwa moduły fibronektynowe typu III, każdy złożony z siedmiokrotnie sfałdowanej struktury antyrównoległej β -harmonijki. Wszystkie receptory mają domenę immunoglobulinową zlokalizowaną na N-końcu bądź jak w przypadku LIFR i OSMR między dwoma modułami wiązania cytokiny (w przypadku OSMR region na N-końcu jest niekompletny). Podjednostki będące przekaźnikami sygnału zawierają trzy dodatkowe proksymalne domeny fibronektynowe typu III oraz w porównaniu z IL-6R α znacznie dłuższą część wewnątrzkomórkową (rys. 2).

SZLAKI PRZEKAZYWANIA SYGNAŁU CYTOKIN TYPU IL-6

Cytokiny typu IL-6 wykorzystują jako główne mediatory sygnalizacji grupę kinaz tyrozynowych z rodziny Jak (*Janus kinases*) i czynniki transkrypcyjne STAT (ang. *signal transducers and activators of transcription*) [33, 49], podobnie jak interferony oraz wiele innych cytokin i czynników wzrostu [7]. Znane są cztery różne kinazy Jak, z których Jak1, Jak2 i Tyk2, obecne w różnych typach komórek, uczestniczą w sygnalizacji cytokin typu IL-6 [44]. Struktura kinaz Jak została przedstawiona na rysunku 3. Typowa domena o aktywności kinazy tyrozynowej, inaczej nazywana domeną homologii Jak (JH1), jest zlokalizowana przy C-końcu białka. Tuż za nią znajduje się domena kinazo-podobna (JH2), pozbawiona jednak aktywności katalitycznej, której funkcja jest niejasna. Dalej w stronę N-końca zlokalizowane jest jeszcze pięć dodatkowych regionów wykazujących wysoką homologię pomiędzy różnymi kinazami Jak (JH3–JH7), które biorą udział w trwałym wiązaniu kinaz do receptora. Kinazy Jak są zasocjowane ze zlokalizowanymi proksymalnie w stosunku do membrany regionami box1 /box2 obecnymi w częściach cytoplazmatycznych wielu receptorów cytokinowych. Region box1 zawiera bogaty w reszty proliny motyw 8 reszt aminokwasowych, kluczowy dla wiązania kinaz Jak, podczas gdy region box2, będący zgrupowaniem reszt aminokwasów hydrofobowych oraz dodatnio naładowanych, odgrywa mniejszą rolę w asocjacji kinaz Jak. Sekwencje box1/box2 są obecne w gp130, jak również w LIFR i OSMR. Wywołana związaniem ligandu dimeryzacja przekazujących sygnał podjednostek receptora, przypuszczalnie prowadzi do zbliżenia zasocjowanych z nimi kinaz Jak i ich aktywacji przez wzajemną fosforylację lub autofosforylację miejsc niezbędnych dla uzyskania aktywności katalitycznej. Zaktywowane kinazy fosforylują następnie szereg substratów komórkowych, wśród nich motywy tyrozynowe w cytoplazmatycznym fragmencie receptora. Ufosforylowane motywy tyrozynowe stanowią z kolei miejsca wiążące dla białek zawierających domeny SH2 (domeny homologii z kinazami Src2). Należą do nich m.in. czynniki STAT, w przypadku cytokin typu IL-6 – głównie STAT3 i STAT1, białka o stosunkowo konserwatywnej budowie. W ich obrębie wyróżnić można szereg regionów: znajdujące się przy N-końcu – domenę tetrameryzacji i region zbliżony strukturą do zamka leucynowego, w środku – domenę odpowiedzialną za wiązanie DNA, przy C-końcu – domenę SH2 i domenę transaktywacji (rys. 3). W przypadku wszystkich czynników STAT charakterystyczne jest występowanie położonej C-terminalnie reszty tyrozyny, fosforylowanej w czasie aktywacji. Miejscami asocjacji czynników STAT, odbywającej się za pośrednictwem ich domen SH2, są cztery reszty fosfotyrozynowe w obrębie dystalnej części gp130 (Y767, Y814, Y905, Y915) [15, 50]. Czynniki STAT3 wiąże się z motywem pYXXQ (gdzie X to dowolny aminokwas), natomiast STAT1 jest rekrutowany przez bardziej

Jak**STAT****SHP-2****SOCS**

RYSUNEK 3. Schemat budowy kinaz Jak, czynników STAT, fosfatazy SHP-2 i białek SOCS: F, S – podlegające fosforylacji reszty tyrozyny i seryny, JH – domena homologii Jak, TM – domena tetrameryzacji, LZ – domena o strukturze suwaka leucynowego, DB – domena wiązania DNA, SH2 – domena homologii z kinazami Src 2, TA – domena transaktywacji PTP – domena fosfatazy tyrozynowej, SB – obszar homologii między białkami SOCS (na podstawie [16])

konserwatywną sekwencję pYXPQ. Następnie czynniki STAT same ulegają fosforylacji, asocjują ze sobą i tworzą homo- bądź heterodimery. Kluczowe dla dimeryzacji okazują się wspomniane wcześniej miejsca fosforylacji tyrozynowej - w przypadku STAT1 jest to reszta tyrozyny 701, a w STAT3 reszta tyrozyny w pozycji 705. Jako dimery czynniki STAT ulegają translokacji do jądra komórkowego i biorą tam udział w regulacji transkrypcji, wzmacniając bądź w pewnych przypadkach hamując ekspresję genów docelowych. W procesach tych uczestniczy zlokalizowana w środku cząsteczki domena wiążąca DNA. STAT3 i STAT1 rozpoznają podobną sekwencję (TTCN₃GAA) obecną w sekwencjach wzmacniacza (enhancer) szeregu genów: białek ostrej fazy (np. białka C-reaktywnego, α_1 – antychymotrypsyny, α_2 – makroglobuliny, tkankowego inhibitora metaloproteinaz (ang. *tissue inhibitor of metalloproteinases* TIMP-1), czynników transkrypcyjnych (np. Jun B, c-Fos, IRF-1, C/EBP5), a poza tym także naczynioaktywnego polipeptydu jelitowego (ang. *vasoactive intestinal peptide*, VIP), białka szoku termicznego Hsp90, antyapoptotycznego czynnika bcl-x oraz samego gp130. Dla pełnej aktywności transkrypcyjnej czynników STAT niezbędna jest ich dodatkowa fosforylacja serynowa, dotycząca reszty seryny 727 (w STAT1 i STAT3), która reguluje aktywność domeny transaktywacji. Kinaza odpowiedzialna za ten proces w przypadku stymulacji IL-6 nie

została jeszcze zidentyfikowana, najprawdopodobniej jednak nie jest to kinaza MAP [16].

Po stymulacji cytokinami typu IL-6 aktywacji ulegają nie tylko składniki szlaku Jak/STAT. Ze swoistym ufosforylowanym motywem tyrozynowym (pY759STV) w gp130 wiąże się także fosfataza tyrozynowa SHP-2 (inaczej Syp lub PTP1D) [50]. Asocjacja odbywa się za pośrednictwem dwu domen SH2 obecnych przy N-końcu fosfatazy (rys. 3), które są również istotne dla regulacji aktywności enzymatycznej tego białka. SHP-2 sama następnie ulega fosforylacji na resztach tyrozyny 304 i 327 w sposób zależny od Jak1 [47]. Reszta fosfotyrozyny 304 jest miejscem wiązania adaptera Grb2, za którego pośrednictwem dochodzi do przekazywania sygnału szlakiem Ras/MAPK, również aktywowanego przez cytokiny typu IL-6 [4, 23]. Dodatkowo ze względu na aktywność fosfatazową związaną z C-końcową domeną fosfatazy tyrozynowej, SHP-2 może także prowadzić do stopniowego wygaszania sygnału [21, 53]. W pewnych typach komórek wykazano ponadto zależną od gp130 aktywację szeregu innych białek, takich jak: Vav [24] czy kinazy tyrozynowe Hck [12], Tec, Btk [35] i Fes [36], ich znaczenie dla sygnalizacji cytokin typu IL-6 pozostaje jednak niejasne.

NEGATYWNA REGULACJA SZLAKU gp130/Jak/STAT

Precyzyjne działanie danego szlaku sygnalizacyjnego zależy od istnienia wydajnych mechanizmów mogących w krótkim czasie unieczynnić kluczowe mediatory sygnału. Jak wiadomo, w większości przypadków aktywacja STAT jest przejściowa. Możliwe mechanizmy inaktywacji czynników STAT mogą polegać na ich defosforylacji, proteolitycznej degradacji lub syntezie specyficznych białkowych inhibitorów. W pierwszym przypadku zdefosforylowane cząsteczki STAT powinny opuszczać jądro komórkowe i trafiać do cytoplazmy, gdzie mogłyby zostać powtórnie wykorzystane do sygnalizacji. W drugim przypadku, istniałaby stała konieczność uzupełniania puli STAT, malejącej w wyniku degradacji części z nich. Jak dotąd większość dowodów wskazuje na defosforylację, jako główny proces regulacji aktywności STAT. Badania immunofluorescencyjne wykazały przejściowe przemieszczenie STAT do i z jądra komórkowego po stymulacji, nie wykazano też utraty tych czynników. Także metaboliczne znakowanie białek dowodzi stosunkowo długiego okresu półtrwania przynajmniej w przypadku STAT3 – ok. 8 godzin, nie ulegającego zmianie pod wpływem stymulacji [16]. Inną możliwością inaktywacji STAT jest ich związanie przez niedawno odkryte swoiste białkowe inhibitory z rodziny PIAS (ang. *protein inhibitor of activated Stat*) [6, 26]. Jak dotąd zidentyfikowano pięć białek należących do tej grupy, z których PIAS3 okazał się asocjować wyłącznie ze zaktywowanym STAT3, a PIAS 1 swoiście ze STAT1 wykorzystując ufosforylowaną resztę tyrozyny 701. Pozwala to przypuszczać, że każdy ze znanych czynników STAT może posiadać swój swoisty inhibitor, a stosunek ilościowy między

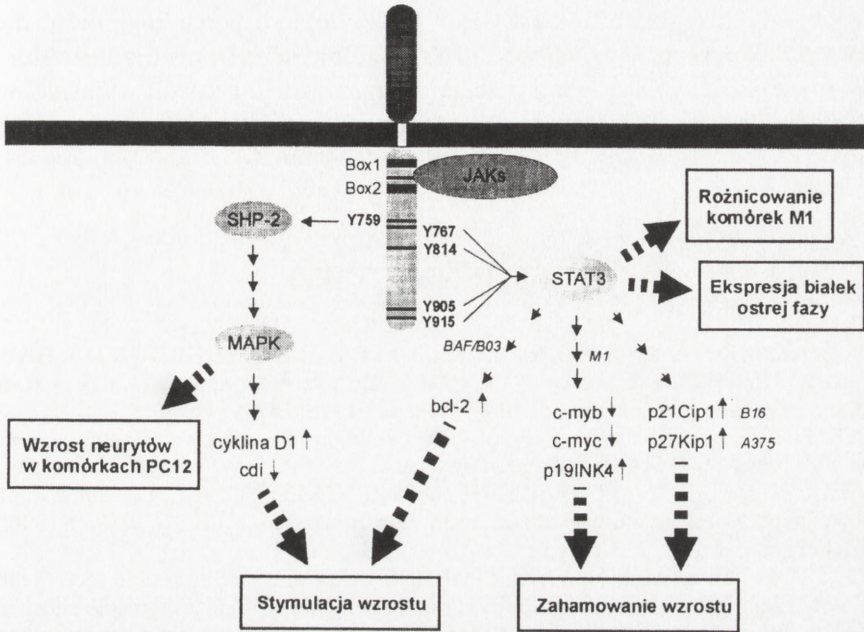
nimi określa aktywność danego szlaku sygnalizacyjnego. Zahamowanie sygnalizacji szlakiem Jak/STAT może odbywać się także na wcześniejszym etapie przekazywania sygnału. Ostatnio, niezależnie przez kilka grup badawczych, opisana została rodzina inhibitorów kinaz Jak, zwanych supresorami sygnalizacji cytokinowej (ang. *suppressor of cytokine signalling – SOCS*), białkami wiążącymi Jak (*Jak binding protein – JAB*) lub indukowanymi przez STAT inhibitorami STAT (ang. *Stat-induced Stat inhibitors – SSI*) [11, 40, 51]. Białka te są przykładem inhibitorów sygnalizacji działających zwrotnie, których transkrypcja jest aktywowana m.in. przez IL-6 i LIF. SOCS/JAB/SSI to białka mające domenę SH2 i najprawdopodobniej za jej pośrednictwem wiążą się z domeną kinazową Jak (JH1), obniżając jej aktywność i w rezultacie hamując fosforylację gp130, STAT1, STAT3. W ten sposób dochodzi do zwrotnej negatywnej regulacji szlaku Jak/STAT, indukującego powstawanie własnych swoistych inhibitorów.

MOLEKULARNE PODSTAWY PLEJOTROPII CYTOKIN TYPU IL-6

Jednym z najbardziej intrygujących zagadnień dotyczących właściwości cytokin typu IL-6 jest sposób, w jaki dochodzi do inicjacji swoistych dla danego typu komórki efektów, często wręcz przeciwstawnych np. proliferacji, zatrzymania wzrostu różnicowania, jeżeli są one wywoływane za pośrednictwem tych samych mediatorów sygnału. Aby zrozumieć mechanizmy tej plejotropii, konieczna jest identyfikacja ostatnich elementów w szlakach sygnalizacji – genów docelowych, których aktywacja powinna zachodzić według charakterystycznego dla każdego typu komórki wzoru. Badania prowadzone na komórkach mysiej białaczki linii M1 dowiodły, że wywoływane przez IL-6 efekty zahamowania wzrostu komórek i ich różnicowania do makrofagów, którym towarzyszy spadek ekspresji c-myc, c-myc oraz indukcja junB, IRF-1, są zależne od obecności funkcjonalnego STAT3. Transfektanty z dominującą negatywną formą STAT3 nie ulegały inhibicji wzrostu i różnicowaniu, ani nie modulowały ekspresji wspomnianych genów [37, 41, 57]. Ponadto w komórkach M1 wykazano również, że IL-6 indukuje ekspresję p19^{INK4d}, jednego z inhibitorów cyklinozależnych kinaz, w sposób zależny od STAT3 [42]. Tak więc wywoływane przez IL-6 zahamowanie wzrostu komórek M1 może być wynikiem dwu regulowanych przez STAT3 efektów – represji onkogenów c-myc i c-myc oraz indukcji p 19^{INK4d} – negatywnego regulatora cyklu komórkowego. Z drugiej strony IL-6 wywierała odwrotny wpływ na komórki M1 o inaktywowanym STAT3, stymulując ich wzrost. Pozwala to przypuszczać, że IL-6 w tym modelu komórkowym generuje równocześnie dwa przeciwstawne sygnały – stymulujące wzrost oraz hamujące wzrost, a indukujące różnicowanie. Pierwszy z tych sygnałów

ujawnia się jednak wyłącznie po inaktywacji STAT3. Ostateczny wynik działania cytokiny zależałby więc od równowagi lub interakcji między przeciwstawnymi, jednocześnie zaktywowanymi szlakami transdukcji sygnału (rys. 4). Analogiczne wyniki przyniosły badania prowadzone na zależnej od IL-3 linii komórek limfocytów pro-B - BAF/B03 [13]. Jak wykazano przy użyciu komórek transfekowanych gpl30, co najmniej dwa niezależne sygnały są niezbędne dla wywołania proliferacji komórek za pośrednictwem wprowadzonego receptora. Pierwszy z nich był sygnałem stymulującym proliferację zależnym od motywu tyrozynowego w pozycji 759, miejsca wiązania fosfatazy SHP-2 wymaganej dla aktywacji szlaku kinazy MAP. Wpływ MAPK na pozytywną regulację cyklu komórkowego może z kolei polegać na stymulacji ekspresji cykliny D1 oraz zmniejszeniu poziomu p27^{Kip1}, inhibitora cyklinozależnych kinaz [25]. Drugi sygnał był niezbędny dla supresji apoptozy i okazał się zależny od STAT3. Jako przypuszczalny czynnik antyapoptotyczny indukowany przez STAT3 zidentyfikowano białko Bcl-2 (rys. 4). Oba badane szlaki sygnalizacyjne – Ras/MAPK i Jak/STAT – współdziałają w komórkach BAF/B03 umożliwiając ich proliferację.

IL-6 może indukować różnicowanie i wzrost neurytów w przypadku komórek linii PC 12. Jest to jednak efekt ograniczony tylko do niektórych klonów komórek PC 12 bądź też zachodzi wyłącznie po wcześniejszej prestymulacji przy użyciu czynnika wzrostu nerwów (NGF). Jak się okazało, dla indukcji wzrostu neurytów po stymulacji IL-6, kluczowa okazała się aktywacja kinazy MAP za pośrednictwem SHP-2, natomiast aktywny STAT3 był inhibitorem całego procesu. Komórki PC 12 z wprowadzonym dominującym negatywnym STAT3 reagowały na IL-6 bez konieczności prestymulacji NGF [20]. Podobny negatywny efekt STAT3 na proces różnicowania warunkuje jedną z istotnych funkcji LIF – utrzymanie pluripotentjalnego wzrostu embrionalnych komórek macierzystych (ang. *embryonic stem cells*, ES). Inaktywacja STAT3 powoduje różnicowanie tych komórek pomimo obecności LIF [3]. W tych przypadkach szlak Jak/STAT odgrywa rolę dominującą w sygnalizacji i zapobiega różnym efektom biologicznym. IL-6 i OSM prawdopodobnie odgrywają też rolę negatywnych regulatorów wzrostu we wczesnych etapach rozwoju ludzkiego czerniaka złośliwego. Uzyskanie oporności na te cytokiny w późniejszych fazach progresji nowotworu może być wynikiem obniżenia ekspresji receptora [48], albo skutkiem zmian ekspresji czy też mutacji czynników uczestniczących w procesach transdukcji sygnału. Tego typu zaburzenia mogą dotyczyć szczególnie szlaku Jak/STAT, co potwierdzają wyniki badań Oh i wsp. [43], przeprowadzonych na komórkach mysiego czerniaka linii B16-F10.9. W komórkach tych, w których po stymulacji IL-6/sIL-6R dochodziło do zatrzymania wzrostu i różnicowania, wykazano wzrost ekspresji inhibitora cyklinozależnych kinaz p21^{Waf1/Cip1} i aktywację promotora tego genu. Nasze badania prowadzone na modelu ludzkich komórek czerniaka linii A375 wskazują jednak na odmienny gen docelowy sygnalizacji cytokin typu IL-6. Stymulacja komórek A375 przy pomocy IL-6/sIL-6R lub OSM prowadziła



RYSUNEK 4. Szlaki sygnalizacji związane z gp130 regulujące wzrost, różnicowanie i śmierć komórki

do akumulacji mRNA i białka innego inhibitora cyklu komórkowego – p27^{Kip1}. Efekt ten był ponadto zależny od obecności funkcjonalnego STAT3 i stanowił bardziej ogólne zjawisko, gdyż występował także w dwu innych liniach komórkowych ludzkiego czerniaka [22]. Inhibitory z rodziny Kip/Cip mogą więc pełnić rolę uniwersalnych genów docelowych w sygnalizacji cytokin o funkcji regulatorów wzrostu.

PODSUMOWANIE

Prowadzone w ciągu ostatnich lat badania dotyczące IL-6 i spokrewnionych z nią cytokin ujawniły wiele z mechanizmów molekularnych leżących u podłoża ich biologicznej aktywności. Model funkcjonowania cytokin typu IL-6 stał się też punktem wyjścia dla wielu ogólnych koncepcji na temat funkcjonowania cytokin. Stopniowo zaczęto poznawać złożony przebieg procesów regulacji wzrostu i różnicowania komórek za pośrednictwem receptorów cytokin. Wykorzystanie zwierząt transgenicznych i *knock-out* pozwoliło na uzyskanie wielu informacji na temat roli cytokin *in vivo*. Udało się określić udział IL-6 i cytokin pokrewnych w wielu procesach patologicznych i chorobach. Wciąż jednak identyfikowane są nowe ele-

menty szlaków sygnalizacji cytokin, pełniące rolę ich mediatorów bądź pozytywnych czy negatywnych regulatorów. Jak się wydaje, dopiero pełna znajomość mechanizmów molekularnych sygnalizacji, a szczególnie wzajemnych zależności i interakcji między różnymi drogami przekazywania sygnału pozwoli wyjaśnić, w jaki sposób decydują one o ogromnej różnorodności efektów biologicznych działania cytokin.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BAUMANN H, WANG Y, MORELLA KK, LAI C-F, DAMS H, HILTON D J, HAWLEY RG, MACKIEWICZ A. Complex of the soluble IL-11 receptor and IL-11 acts as IL-6-type cytokine in hepatic and nonhepatic cells. *J Immunol.* 1996; **157**: 284–290.
- [2] BAZAN JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 6934–6938.
- [3] BOEUF H, HAUSS C, DE GRAEYE F, BARAN N, KEDINGER C. Leukemia inhibitory factor-dependent transcriptional activation in embryonic stem cells. *J Cell Biol* 1996; **138**: 1207–1217.
- [4] BOULTON TG, STAHL N, YANCOPOULOS GD. Ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/interleukin 6/oncostatin M family of cytokines induces tyrosine phosphorylation of a common set of proteins overlapping those induced by other cytokines and growth factors. *J Biol Chem* 1994; **269**: 11648–11655.
- [5] CHEN L, MORY Y, ZILBERSTEIN A, REVEL M. Growth inhibition of human breast carcinoma and leukemia/lymphoma cell lines by recombinant interferon-beta 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 8037–8041.
- [6] CHUNG CD, LIAO J, LIU B, RAO X., JAY P, BERTA P, SHUAI K. Specific inhibition of Stat 3 signal transduction by PIAS3. *Science* 1997; **278**: 1803–1805.
- [7] DARNELL JR JE, KERR IM, STARK GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994; **264**: 1415–1421.
- [8] DARNELL JR JE. STATs and gene regulation. *Science* 1996; **277**: 1630–1635.
- [9] DAVIS S, ALDRICH TH, VALENZUELA DM, WONG V, FURTH ME, SQUINTO SP, YANCOPOULOS GD. The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science* 1991; **253**: 59–63.
- [10] DOUGLAS AM, GOSS GA, SUTHERLAND LR, HILTON D J, BERNDT MC, NICOLA NA, BEGLEY CG. Expression and function of members of the cytokine receptor superfamily on breast cancer cells. *Oncogene* 1997; **14**: 661–669.
- [11] ENDO TA, MASUHARA M, YOKOUCHI M, SUZUKI R, SAKAMOTO H, MITSUI K, MATSUMOTO A, TANIMURA S, OHTSUBO M, MISAWA H, MIYAZAKI T, LEONOR N, TANAGUCHI T, FUJITA T, KANAKURA Y, KOMIYA S, YOSHIMURA A. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 1997; **387**: 921–924.
- [12] ERNST M, GEARING DP, DUNN AR. Functional and biochemical association of Hck with the LIF/IL-6 receptor signal transducing subunit gp130 in embryonic stem cells. *EMBO J* 1994; **13**: 1574–1584.
- [13] FUKADA T, HIBI M, YAMANAKA Y, TAKAHASHI-TEZUKA M, FUJITANI Y, YAMAGUCHI T, NAKAJIMA K, HIRANO T. Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity* 1996; **5**: 449–460.

- [14] GEARING DP, COMEAU MR, FRIEND DJ, GIMPEL SD, THUT CJ, MCGOURTY J, BRASHER KK, KING JA. The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science* 1992; **255**: 1434–1437.
- [15] GERHARTZ C, HEESEL B, SASSE J, HEMMANN U, LANDGRAF C, SCHNEIDER-MERGENER J, HORN F, HEINRICH PC, GRAEVE L. Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *J Biol Chem* 1996; **271**: 12991–12998.
- [16] HEINRICH PC, BEHRMANN I, MULLER-NEWEN G, SCHAPER F, GRAEVE L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 1998; **334**: 297–314.
- [17] HILTON D J, HILTON AA, RAICEVIC A, RAKAR S, HARRISON-SMITH M, GOUGH NM, BEGLEY CG, METCALF D, NICOLA NA, WILSON TA. Cloning of a murine IL-11 receptor alpha-chain; requirement for gp130 for high affinity binding and signal transduction. *EMBO J* 1994; **13**: 4765–4775.
- [18] HIRANO T. Interleukin-6 and its receptor: Ten years later. *Int Rev Immunol* 1998; **16**: 249–284.
- [19] HORN D, FITZPATRICK WC, GOMPPER PT, OCHS V, BOLTON-HANSEN M, ZARLING J, MALIK N, TODARO GJ, LINSLEY PS. Regulation of cell growth by recombinant oncostatin M. *Growth Factors* 1990; **2**: 157–165.
- [20] IHARA S, NAKAJIMA K, FUKADA T, HIBI M, NAGATA S, HIRANO T, FUKUI Y. Dual control of neurite outgrowth by STAT3 and MAP kinase in PC 12 cells stimulated with interleukin-6. *EMBO J* 1997; **16**: 5345–5352.
- [21] KIM H, HAWLEY TS, HAWLEY RG, BAUMANN H. Protein tyrosine phosphatase 2 (SHP-2) moderates signaling by gp130 but is not required for the induction of acute-phase plasma protein genes in hepatic cells. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 1525–1533.
- [22] KORTYLEWSKI M, HEINRICH PC, MACKIEWICZ A, SCHNIERTSHAUER U, KLINGMULLER U, NAKAJIMA K, HIRANO T, HORN F, BEHRMANN I. Interleukin-6 and oncostatin M-induced growth inhibition of human A375 melanoma cells is STAT-dependent and involves upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1}. *Oncogene* 1999; **18**: 3742–3753.
- [23] KUMAR G, GUPTA S, WANG S, NEL AE. Involvement of Janus kinases p52shc, Raf-1, and MEK-1 in the IL-6-induced mitogen-activated protein kinase cascade of a growth-responsive B cell line. *J Immunol* 1994; **153**: 4436–4447.
- [24] LEE IS, LIU Y, NARAZAKI M, HIBI M, KISHIMOTO T, TAGA T. Vav is associated with signal transducing molecules gp130, Grb2 and Erk2, and is tyrosine phosphorylated in response to interleukin-6. *FEBS Lett* 1997; **401**: 133–137.
- [25] LLOYD AC. Ras versus cyclin-dependent kinase inhibitors. *Curr Opin in Genet Dev* 1998; **8**: 43–48.
- [26] LIU B, LIAO J, RAO X, KUSHNER SA, CHUNG CD, CHANG DD, SHUAI K. Inhibition of Stat 1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 10626–10631.
- [27] LIU C, YICKERS MF, KERBEL RS. Interleukin 6: a fibroblast-derived inhibitor of human melanoma cells from early but not advanced stages of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 9215–9219.
- [28] LOWE WL JR, DA SILVA BA. Cytokines. Ed. Jameson JL. *Principles of Molecular Medicine*. Totowa, NJ: Humana Press Inc. 1998; 267–271.
- [29] LU C, YICKERS MF, KERBEL RS. Interleukin 6: a fibroblast-derived growth inhibitor of human melanoma cells from early but not advanced stages of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 9215–9219.
- [30] LUC, RAK JW, KOBAYASHI H, KERBEL RS. Increased resistance to oncostatin M-induced growth inhibition of human melanoma cell lines derived from advanced-stage lesions. *Cancer Res* 1993; **53**: 2708–2711.

- [31] LU C, SHEEHAN C, RAK JW, CHAMBERS CA, HOZUMI N, KERBEL RS. Endogenous interleukin 6 can function as an *in vivo* growth-stimulatory factor for advanced-stage human melanoma cells. *Clin Canc Res* 1996; **2**: 1417–1425.
- [32] LUST JA, DONOVAN KA, KLINE MP, GREIPP PR, KYLE RA, MAIHLE NJ. Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine* 1992; **4**: 96–100.
- [33] LUTTICKEN C, WEGENKA UM, YUAN J, BUSCHMANN J, SCHINDLER C, ZIEMIECKI A, HARPUR AG, WILKS AF, YASUKAWA K, TAGA T, KISHIMOTO T, BARBIERI G, PELLEGRINI S, SENDTNER M, HEINRICH PC, HORN F. Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science* 1994; **263**: 89–92.
- [34] MACKIEWICZ A, SCHOOLTINK H, HEINRICH PC, ROSE-JOHN S. The complex of soluble human interleukin-6 receptor/interleukin-6 up-regulates expression of acute phase proteins. *J Immunol* 1992; **149**: 2021–2027.
- [35] MATSUDA T, TAKAHASHI-TEZUKA M, FUKADA T, OKUYAMA Y, FUJITANI Y, TSUKADA S, MANO H, HIRAI H, WITTE ON, HIRANO T. Association and activation of Btk and Tec tyrosine kinases by gp130, a signal transducer of the interleukin-6 family of cytokines. *Blood* 1995; **8**: 627–633.
- [36] MATSUDA T, FUKADA T, TAKAHASHI-TEZUKA M, OKUYAMAY, FUJITANI Y, HANAZONO Y, HIRAI H, HIRANO T. Activation of Fes tyrosine kinase by gp130, an interleukin-6 family cytokine signal transducer, and their association. *J Biol Chem* 1995; **270**: 11037–11039.
- [37] MINAMIM, INUOUE M, WEI S, TAKEDA K, MATSUMOTO M, KISHIMOTO T, AKIRA S. STAT3 activation is a critical step in gp 130-mediated terminal differentiation and growth arrest of a myeloid cell line. *Proc Natl. Acad Sci USA* 1996; **93**: 3963–3966.
- [38] MOSLEY B, DE IMUS C, FRIEND D, BOIANI N, THOMA B, PARK LS, COSMAN D. Dual oncostatin M (OSM) receptors. Cloning and characterization of an alternative signaling subunit conferring OSM-specific receptor activation. *J Biol Chem* 1997; **271**: 32635–32643.
- [39] MULLBERG JH, SCHOOLTINK T, STOYAN M, GUNTHER L, GRAEVE L, BUSE G, MACKIEWICZ A, HEINRICH PC, ROSE-JOHN S. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur J Immunol* 1993; **23**: 473–480.
- [40] NAKA T, NARAZAKI M, HIRATA M, MATSUMOTO T, MINAMOTO S, AONO A, NISHIMITO N, KAJITA T, TAGA T, YOSHIZAKI K, AKIRA S, KISHIMOTO T. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 1997; **387**: 924–929.
- [41] NAKAJIMA K, YAMANAKA Y, NAKAE K, KOJIMA H, ICHIB AM, KIUCHI N, KITAOKA T, FUKADA T, HIBI M, HIRANO T. A central role for Stat3 in IL-6-induced regulation of growth and differentiation in M1 leukemia cells. *EMBO J* 1996; **15**: 3651–3658.
- [42] NARIMATSU M, NAKAJIMA K, ICHIBA M, HIRANO T. Association of Stat3 dependent transcriptional activation of p19INK4D with IL-6-induced growth arrest. *Biochem Biophys Res Com* 1997; **238**: 764–768.
- [43] OH J-W, KATZ A, HAROCH S, EISENBACH L, REVEL M, CHEBATH J. Unmasking by soluble IL-6 receptor of IL-6 effect on metastatic melanoma: growth inhibition and differentiation of B16-F10.9 tumor cells. *Oncogene* 1997, **15**: 569–577.
- [44] PELLEGRINI S, DUSANTER-FOURTI I. The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs). *Eur J Biochem* 1997; **248**: 615–633.
- [45] ROBAK T. *Biologia i farmakologia cytokin*. Warszawa: Wyd. Naukowe PWN 1995.
- [46] ROBLEDO O, FOURCIN M, CHEVALIER S, GUILLET C, AUGUSTE P, POUPLARD-BARTHELAIX A, PENNICA D, GASCAN H. Signaling of the cardiotrophin-1 receptor. Evidence for a third receptor component. *J Biol Chem* 1997; **272**: 4855–4863.

- [47] SCHAPER F, GENDO C, ECK M, SCHMITZ J, GRIMM C, ANHUF D, KERR I, HEINRICH PC. Activation of the protein tyrosine phosphatase SHP2 via the interleukin-6 signal transducing receptor protein gp130 requires tyrosine kinase Jak1 and limits acute-phase protein expression. *Biochem J* 1998; **335**: 557–565
- [48] SILVANI A, FERRARI G, PAONESSA G, TONIATTI C, PARMIANI G, COLOMBO MP. Down-regulation of interleukin 6 receptor α chain in interleukin-6 transduced melanoma cells causes selective resistance to interleukin 6 but not to oncostatin M. *Cancer Res* 1995; **55**: 2200–2205.
- [49] STAHL N, BOULTON TG, FARRUGGELLA T, IP NY, DAVIS S, WITTHUHN BA, OUELLE FW, SILVENNOINEN O, BARBIERI G, PELLEGRINI S, IHLE JN, YANCOPOULOS GD. Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 receptor components. *Science* 1994, **263**: 92–95.
- [50] STAHL N, FARRUGGELLA TJ, BOULTON TG, ZHONG Z, DARNELL JR JE, YANCOPOULOS GD. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* 1995; **267**: 1349–1353.
- [51] STARR R, WILLSON TA, VINEY EM, MURRAY LJJ, RAYNER JR, JENKINS BJ, GONDA TJ, ALEXANDER WS, METCALF D, NICOLA NA, HILTON DJ. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 1997; **387**: 917–921.
- [52] SWOPE VB, ABDEL-MALEK Z, KASSEM LM, NORDLUND JJ. Interleukin-6 and tumor necrosis factor- α are paracrine inhibitors of human melanocyte proliferation and melanogenesis. *J Invest Dermatol* 1991; **96**: 180–185.
- [53] SYMES A, STAHL N, REEVES SA, FARRUGGELLA T, SERVIDEI T, GEARAN T, YANCOPOULOS G, FINK JS. The protein tyrosine phosphatase SHP-2 negatively regulates ciliary neurotrophic factor induction of gene expression. *Curr Biol* 1997; **7**: 697–700.
- [54] TAGA T, HIBI M, HIRATA Y, YAMASAKI K, YASUKAWA K, MATSUDA T, HIRANO T, KISHIMOTO T. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 1989; **58**: 573–581.
- [55] TAGA T, KISHIMOTO T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 1997; **15**: 797–819.
- [56] TAKIZAWA H, OHTOSHI T, OHTA K, YAMASHITA N, HIROHATA S, HIRAI K, HIRAMATSU K, ITO K. Growth inhibition of human lung cancer cell lines by interleukin 6 *in vitro*: a possible role in tumor growth via an autocrine mechanism. *Cancer Res* 1993; **15**: 4175–4181.
- [57] YAMANAKA Y, NAKAJIMA K, FUKADA T, HIBI M, HIRANO T. Differentiation and growth arrest signals are generated through the cytoplasmic region of gp130 that is essential for Stat3 activation. *EMBO J* 1996; **15**: 1557–1565.

Redaktorzy prowadzący – Bożena Kamińska i Jerzy Kawiak

Otrzymano: 15.12. 2000 r.

Przyjęto: 10.01. 2000 r.

Adres autora: ul. Garbary 15, 61-866 Poznań

CZĄSTECZKI RÓŻNICOWANIA NA POWIERZCHNI LIMFOCYTÓW PRZEŻUWACZY

CLUSTER OF DIFFERENTIATION ON RUMINANT LYMPHOCYTES

Anna WINNICKA

Katedra Chorób Wewnętrznych, Wydział Weterynaryjny SGGW w Warszawie

Streszczenie: Znajomość markerów limfocytów, a także poszczególnych subpopulacji limfocytów różnych gatunków zwierząt poszerza znacznie możliwości weterynaryjnej diagnostyki laboratoryjnej. Nie wszystkie jednak cząsteczki różnicowania opisane u ludzi znajdują swoje odpowiedniki na komórkach zwierzęcych. Dlatego wydaje się celowe bieżące śledzenie doniesień wyników badań laboratoryjnych uzupełniających listę rozpoznanych antygenów i przeciwciał monoklonalnych produkowanych do ich identyfikacji. Szczególnie starannie są one opisywane u przeżuwaczy, co w związku z częstością pojawiania się nowych chorób oraz trudnościami z wyeliminowaniem wcześniej występujących jest niezmiernie pożądane. Limfocyty przeżuwaczy stanowią liczną (od 45 do 75%) populację leukocytów. Wspólnym antygenem leukocytarnym jest cząsteczka CD45, jednak u przeżuwaczy nie występuje ona na limfocytach WC1+ oraz na monocytach. Podstawowym markerem limfocytów T przeżuwaczy jest cząsteczka TCR z tym, że komórki TCR-1(γ i δ)+ stanowią około 60% wszystkich limfocytów. Inne markery limfocytów T to cząsteczki CD1, CD2, CD5 i CD6 oraz CD4, CD8 i WC1. Wskaźnik CD4/CD8 we krwi obwodowej przeżuwaczy wynosi około 1,53, w mleku natomiast 0,85 i podlega wahaniom w przebiegu laktacji. Limfocyty WC1+ (CD4-CD8-TCR $\gamma\delta$ +) stanowią bardzo liczną (40%) populację limfocytów u młodych zwierząt. Markerami limfocytów B przeżuwaczy są przeciwciała, głównie klasy IgM, obecne na ich powierzchni oraz cząsteczki nie znajdujące odpowiednika homologicznego wśród cząsteczek obecnych na limfocytach ludzkich. Należą do nich WC3 (CD21-like), WC4 (CD19), WC6 (obecne na limfocytach B oraz na komórkach CD2+, nie występują natomiast na komórkach WC1+ i na tymocytach) i WC10 (na limfocytach B i na subpopulacjach komórek CD2+, nie ma ich na monocytach i granulocytach ani na komórkach WC1). Do markerów aktywacji na limfocytach zarówno T, jak i B należą: IL-2R, który wykazuje ekspresję w wyniku aktywacji limfocytów TCR($\alpha\beta$)+ i cząsteczka CD25, która wykazuje wysoki poziom ekspresji na populacji WC1+ (TCR $\gamma\delta$ +) . Głównymi markerami dojrzewania są cząsteczki CD1, izoformy CD45 oraz receptory dla L-selektyny. Spośród pozostałych komórek limfocytarnych (K, NK i LAK) we krwi obwodowej przeżuwaczy komórki NK była są CD4-CD5-CD6-WC1-, natomiast komórki LAK są CD2+CD4-CD8-.

(*Postępy Biologii Komórki* 2000; 27: 229–246)

Słowa kluczowe: limfocyty, CD, przeżuwacze.

Summary: The knowledge concerning cell surface markers and immunophenotypes of lymphocytes in different animal species opens possibilities in veterinary laboratory diagnostics. The human CD antigens do not always correspond to surface markers found on animal lymphocytes. Therefore, a close follow-up on research developments on new CD antigens and their corresponding monoclonal antibodies is important in veterinary laboratory diagnostics. A detailed description of known ruminant CD antigens is available. Thorough knowledge of clusters of differentiation is particularly important in the ruminant due to emerging diseases and difficulties in eliminating the already existing ones. Ruminant lymphocytes make up 45–75% of the total leukocyte population. CD45 is the common leukocyte antigen, however, it is absent from ruminant WC1⁺ lymphocytes and monocytes. Ruminant T cells are mainly identified by the TCR molecule, with TCR-1 (γ and δ) making up 60% of all T cells. Other T cell surface antigens are CD1, CD2, CD5, CD4, CD6, CD8 and WC1. In the ruminant, the CD4/CD8 index in peripheral blood is 1.53 and in milk it is 0.85, but fluctuates during lactation. WC1⁺ (CD4⁺CD8⁻TCR $\gamma\delta$ ⁻) lymphocytes account for 40% of the total T cell population in young ruminants. Cell surface bound IgM and other molecules not related to those found on human lymphocytes such as WC3 (CD21-like), WC4 (CD19), WC6 (present on B and CD2⁺ cells but not on WC1 and thymocytes) and WC10 (on B and CD2⁺ cells but not present on monocytes, granulocytes and WC1 cells). Activation markers on both T and B cells are IL-2R (expressed after TCR- $\alpha\beta$ ⁺ activation) and CD25 (highly expressed on WC1). CD1, CD45 isoforms and L-selectin receptors act as cell maturation markers. The immunophenotype of bovine peripheral blood NK cells is CD4⁻CD5⁻CD6⁻WC1⁻ while that of LAK cells is CD2⁺CD4⁻CD8⁻. (*Advances of Cell Biology 2000; 27: 229–246*)

Key words: lymphocytes, CD, ruminants.

WPROWADZENIE

Przejawem aktywacji limfocytów, tak jak i pozostałych leukocytów oraz płytek krwi jest pojawienie się na ich powierzchni cząsteczek, które mogą służyć do odróżniania subpopulacji komórek zarówno w obrębie organizmu, jak i porównawczo u różnych gatunków. W wielu laboratoriach prowadzone są badania cząsteczek, zwanych cząsteczkami różnicowania (ang. *CD – cluster of differentiation*) lub powierzchniowymi antygenami różnicowania, przy pomocy przeciwciał monoklonalnych (ang. *mAb – monoclonal antibodies*) (tab. 1). Na międzynarodowych spotkaniach warsztatowych określa się cechy mAb wiążących się z różnymi populacjami leukocytów oraz masy cząsteczek różnicujących, traktowanych jako markery badanych komórek [5, 13, 26, 27]. Lista markerów jest stale poszerzana. Te spośród nich, które są homologiczne z ludzkimi, nazywane są zgodnie z nomenklaturą stosowaną u ludzi, np. CD3, CD4. Aby uzyskać pewność, że zidentyfikowana cząsteczka jest odpowiednikiem cząsteczki opisywanej na komórkach człowieka, niezbędne jest ustalenie jej masy cząsteczkowej, przeprowadzenie badań genetycznych, analiza rozkładu w tkankach komórek, których markerem jest badana cząsteczka oraz sprawdzenie spełnianych przez te komórki funkcji. Pozostałe markery, zidentyfikowane u poszczególnych gatunków zwierząt, co do których nie ma jednoznacznych do-

wodów istnienia homologii, oznaczane są jako WC (ang. *workshop cluster*) z kolejną ustaloną liczbą poprzedzone skrótem nazwy odpowiedniego gatunku zwierząt, np. BoWC1 (ang. *Bo – bovine*). Jeszcze inny rodzaj identyfikowanych cząsteczek to, np. receptory dla L-selektyny czy VLA-4 (ang. *very late activation*), wykrywane przy użyciu mAb specyficznych dla człowieka, a wiążących się z odpowiednimi cząsteczkami u zwierząt wiązaniami krzyżowymi [35].

Przyjęto klasyfikować cząsteczki markerowe zgodnie z informacją, jaką dają o komórce. Można wyróżnić markery linii komórkowych, np. CD3, które występują na limfocytach T oraz markery dojrzewania, np. CD1, występujące na limfocytach podczas dojrzewania w grasicy, a nieobecne na dojrzałych limfocytach krwi obwodowej. Znane są także markery aktywacji obecne na komórkach stymulowanych przez antygen, np. receptor dla interleukiny 2 (IL-2). Według Roitta, należy ponadto uwzględnić fakt istnienia tych samych markerów na zdecydowanie różnych komórkach, np. antygenów MHC II na wszystkich ludzkich limfocytach B i jednocześnie na aktywowanych limfocytach T, a także na monocytach [32]. Zmienna jest także liczba cząsteczek różnicowania na powierzchni komórek, np. w następstwie aktywacji wzrasta liczba markerów aktywacji CD11a na monocytach.

WSPÓLNE ANTYGENY LEUKOCYTARNE

Wspólnym antygenem leukocytarnym jest cząsteczka CD45 (tab.1). Jest to grupa glikoprotein o dużej masie cząsteczkowej występujących na leukocytach i stanowiących około 10% powierzchni białkowych fragmentów błony komórkowej. U ludzi i gryzoni cząsteczka ta występuje w wielu izoformach. Ekspresja izoform jest ograniczona do subpopulacji leukocytów i dlatego może być użyta do identyfikacji różnych komórek, spełniających odmienne funkcje i pochodzących z różnych tkanek. Masa cząsteczkowa izoform może być bardzo zróżnicowana, od jednakowej do bardzo odległej. CD45 u owiec, charakteryzuje się masą 220 kDa i występuje na granulocytach oraz limfocytach B i T [13]. Nie występuje natomiast na limfocytach WC1-dodatnich, stanowiących jedną z głównych subpopulacji limfocytów T u przeżuwaczy, co zbliża cząsteczkę OvCD45 (ang. *ov – ovine*) do ludzkiej CD45RA, będącej markerem komórek pamięci. Ostatnio Mateo i wsp. opisali przeciwciało (Co-46DA), które rozpoznaje nowy epitop izoformy OvCD45 prawdopodobnie homologicznej do ludzkiego CD45RA [24]. Cząsteczka CD45 nie występuje na monocytach przeżuwaczy. Komórki te są identyfikowane dzięki obecności cząsteczki CD14 [3, 36]. Cząsteczka CD45 u bydła ma taką samą masę cząsteczkową jak u owiec, występuje na limfocytach i granulocytach i również nie ma jej na monocytach. Cząsteczka ta jest podobna do ludzkiej cząsteczki CD45RB, ale nie należy traktować jej jako homologicznej. Porównanie obu markerów: u owiec CD45RA

TABELA 1. Częsteczki różnicowania (*cluster of differentiation* – CD, *workshop cluster* – WC) na powierzchni limfocytów przeżuwaczy i przeciwciała monoklonalne używane do ich identyfikacji (VMRD, Inc. Pullman, USA*; Serotec, UK**; Compton Institute for Animal Health, UK***; Melbourne University, Australia****)

Komórki	CD/WC	Gatunek przeżuwaczy			Przeciwciała monoklonalne (linia komórkowa)
		bydło	owce	kozy	
Leukocyty	CD45	+			CACTB51A*, CC1** BAGB20A* VPM18**, SBU-1-28**** GS5A*, GC6A*, CC31**** 73B1* GC44A*
	CD45		+	+	
	CD45R	+	+	+	
	CD45RA		+		
	CD45RO	+	+	+	
Limfocyty T	TCR1 ($\gamma\delta$ sub)	+	+	+	86D*
	TCR1-N6 ($\gamma\delta$ sub)	+	+	+	CACTB6A*
	TCR1-N16 ($\gamma\delta$ sub)	+	+	+	CACTB14A*
	TCR1-N24 ($\gamma\delta$)	+		+	GB21A*
	TCR1-N7 ($\gamma\delta$ sub)	+			CACTB81A*
	TCR1-N12 ($\gamma\delta$ sub)	+			CACT61A*
	TCR1-N21 ($\gamma\delta$ sub)	+			CACT148A*
	CD1	+	+	+	TH97A*, CC14**
	CD1		+		VPM5**
	CD1ws1	+	+		SBU-20-27****
	CD1ws2	+	+		CC20***, CC40***
	CD1ws3	+	+		CC43***, CC118***
	CD2	+	+	+	MUC2A*
	CD2	+		+	BAQ95A*, B26A4*, CC42**
	CD2	+			CH128A*, 8-1E3*, 16-1E10*
	CD2		+		36F-18*, CC42***
	CD5	+	+	+	CC17**
	CD5	+	+		CC29***, SBU-25-91****
	CD5	+			B29A*, CACT105A*
	CD5			+	BAGB145A*, GR60A*
CD6	+	+	+	BAQ91A*	
CD6	+	+		BAQ82A*	
CD6	+			CC38**	
Limfocyty Th/i	CD4	+	+	+	GC50A1*
	CD4	+			CACT83B*, CACT138A*, IL-A11*, CC30**, CC8****
	CD4		+	+	GC1A*
	CD4		+		17D1*, CC8***, SBU-44-38****
Limfocyty Tc/s	CD8	+	+	+	CC63**, SBU-38-65****
	CD8 α	+	+	+	CACT80C*
	CD8 α	+		+	BAQ111A*
	CD8 β	+	+	+	BAT82A*

cd. TABELA 1

Komórki	CD/WC	Gatunek przeżuwaczy			Przeciwciała monoklonalne (linia komórkowa)
		bydło	owce	kozy	
Limfocyty WC1+	WC1	+	+	+	CC15**, SBU-19-19****
	WC1	+			IL-A29*
	WC1-N1	+	+	+	B7A1*
	WC1-N2	+	+	+	BAQ4A*
	WC1-N3	+			BAQ72A*
	WC1-N3(sub)	+	+	+	CACTB32A*
	WC1-N4	+	+	+	BAG25A*, BAQ159A*
	WC1-N4(sub)	+	+	+	BAQ89A*
	WC1-N11	+	+	+	BAQ167A*
	WC1-N11(sub)	+	+	+	BAQ90A*
	WC1-N22	+	+	+	CACTB31A*
WC1-N25	+	+	+	GB54A*	
Limfocyty B	B-B1	+	+	+	BAS9A*
	B-B2	+	+	+	BAQ44A*
	B-B4	+	+	+	BAQ155A*
	B-B5	+			CH127A*
	B-B8	+	+	+	GC65A*
	B		+		VPM30**
	B (łańcuch lekki Ig)		+		VPM8**
	WC3 (CD21)	+	+		GB25A*, CC21***, CC37***
	WC4 (CD19)	+	+	+	CC55***, CC57***
	WC6	+	+		CC98***
	WC10	+	+		CACT114A*, CC28***, CC62***
	CD11b	+	+	+	MM12A*
CD11b	+			MM10A*, BAQ147A*	
Komórki aktywowane	IL-2R α	+	+	+	CACT116A*
	IL-2R	+		+	LCTB2A*
	IL-2R α	+			CACT108A*
Komórki dojrzewające	L-selektyna R	+	+	+	DUI-29*

i u bydła CD45RB sugeruje rozpoznanie różnych izoform tego markera. Przy ich wykrywaniu nie stwierdzono tworzenia się wiązań krzyżowych. Markerem komórek aktywowanych u ludzi jest cząsteczka CD45RO. U przeżuwaczy cząsteczka CD45RO występuje na komórkach CD4+, CD8+ i na limfocytach WC1 oraz na monocytach. Nie występuje natomiast na limfocytach B. Cząsteczki CD45RO zawierają wszystkie komórki CD45RB dodatnie [13].

MARKERY LIMFOCYTÓW T

Podstawowym markerem limfocytów T jest cząsteczka TCR (ang. *T-cell antigen receptor*) (tab. 1). Znane są 2 typy tego receptora. TCR-1 to heterodimer dwóch polipeptydów γ i δ , natomiast na TCR-2 składają się polipeptydy α i β . Spośród wszystkich limfocytów TCR+ u myszy ponad 90% komórek wykazuje ekspresję TCR-2 ($\alpha\beta$), a poniżej 10% TCR-1 ($\gamma\delta$) [32]. U przeżuwaczy limfocyty TCR-1 stanowią od 50% wszystkich limfocytów (62% limfocytów T) u bydła, do 70% (93% limfocytów T) u owiec i kóz [12, 37, 47, 52, 53]. Odsetek limfocytów TCR-2 u tych gatunków wynosi odpowiednio 30% wszystkich limfocytów (38% limfocytów T) u bydła i 5% wszystkich limfocytów (7% limfocytów T) u owiec. Obydwa typy receptorów są połączone z zestawem pięciu polipeptydów nazywanych zespołem CD3, które razem tworzą kompleks TCR-CD3. Pośredniczy on w przekazywaniu sygnału przez TCR. Jak się wydaje, cząsteczka CD3 jest jedynym markerem wszystkich limfocytów T, obecnym u większości gatunków zwierząt. Opisano wiele przeciwciał monoklonalnych wykrywających antygeny na limfocytach przeżuwaczy [1, 32]. Przeważnie reagują one na zasadzie tworzenia wiązań krzyżowych z różnymi docelowymi determinantami na cząsteczkach innych gatunków, np. klon CACTB6A produkuje przeciwciała skierowane przeciwko TCR-1 bydła, kóz i owiec. Zdarzają się jednak przeciwciała swoiste gatunkowo, np. wyprodukowane przez klon CACTB81A wykrywa TCR-1 tylko u bydła. Znane są liczne przeciwciała skierowane przeciwko TCR-1, większość jednak rozpoznaje tylko niektóre subpopulacje, np. TCR-N6, TCR-N16, TCR-N7 często nakładające się wzajemnie na siebie. Nie ma dotychczas danych o mAb specyficznych dla TCR-2($\alpha\beta$) przeżuwaczy.

Spośród innych markerów limfocytów T dość dobrze opisane są cząsteczki CD1, CD2, CD5 i CD6 [13, 28, 31] (tab. 1). Rodzina cząstek CD1 składa się z ciężkiego łańcucha α i lekkiego β 2-mikroglobulin. Na leukocytach przeżuwaczy są co najmniej 3 różne cząsteczki CD1 (CD1ws1, 2, 3). U człowieka jest 5 odmiennych cząsteczek CD1, a u królika 8. Cząsteczki te są różne u owiec i u bydła. U owiec CD1ws1 identyfikuje epitop wspólny dla różnych antygenów CD1, u bydła mAb skierowane przeciwko temu antygenowi rozpoznaje odpowiednie epitopy także na limfocytach B i monocytach. Anty-BoCD1ws2 rozpoznaje ludzkie CD1b. Masy obu cząsteczek: ws1 i ws2 są równe i wynoszą 46 kDa. Natomiast BoWC1ws3 charakteryzuje się masą 44 kDa. CD1 są identyfikowane na komórkach dojrzewających pochodzących z kory grasicy oraz na komórkach dendrytycznych obwodowych narządów limfatycznych. Nie występują na dojrzałych limfocytach. Ekspresja tych cząsteczek jest różna, np. CD1ws1 występuje na komórkach Langerhansa naskórka, nie stwierdza się tam natomiast obecności CD1ws2. Na komórkach dendrytycznych skóry i węzłów chłonnych występują zarówno formy CD1ws1 i 2, jak i CD1ws3. Formy CD1ws1

i 3 występują na limfocytach B oraz monocytach bydła i są podobne do CD1c człowieka. Forma CD1ws2 nie występuje na komórkach krwi obwodowej.

CD2 jest to cząsteczka przylegania zaangażowana w aktywację i różnicowanie komórek T. Występuje u wszystkich przeżuwaczy. U bydła, testem immunoprecypitacji, ustalono masę tej cząsteczki na poziomie 50–60 kDa. Występuje ona na 41–60% limfocytów T. U owiec, masa tej cząsteczki, występującej na od 10 do 36% limfocytów T, wynosi 50–55 kDa. Ligandem dla CD2 jest cząsteczka CD58 (LFA-3) oraz CD48. CD58 jest obecne w wysokim stopniu na erytrocytach owiec, co pozwala na połączenie z receptorem limfocytów T i rozdział tych komórek od limfocytów B w teście rozetkowym. U przeżuwaczy antygen CD2 występuje na większości tymocytów oraz na komórkach CD4+CD8+TCR $\alpha\beta$ +. Nie występuje na WC1+CD4-CD8-TCR $\gamma\delta$ +, ale występuje na CD8+TCR $\gamma\delta$ + i na subpopulacjach CD4-CD8-CD6- limfocytów krwi obwodowej. Niektóre mAb specyficzne dla CD2 pobudzają limfocyty T do proliferacji, co powoduje, że CD2 może służyć tak jak u innych gatunków do przekazywania sygnałów aktywacji limfocytów T. Nie wykryto CD2 na spoczynkowych komórkach B owiec i bydła, natomiast na aktywowanych limfocytach B i monocytach istnieje prawdopodobieństwo ich znalezienia, tak zresztą jak i na niektórych makrofagach [13].

CD5 to cząsteczka występująca u bydła i owiec. Ma ona masę cząsteczkową wynoszącą 67 kDa (choć zdarzają się o masie 60–65 kDa u owiec) i jest homologiczna do ludzkiej [13]. U ludzi jest markerem większości tymocytów kory grasicy przy słabej ekspresji oraz dorosłych tymocytów i dojrzałych limfocytów T we krwi obwodowej, a także we wtórnych tkankach limfoidalnych, przy istotnie wyższej ekspresji. CD5 jest także na powierzchni około 20% limfocytów B i limfocytów B płodowych [31]. Wyróżniane są 2 subpopulacje limfocytów CD5+ (CD5.1 i CD5.2). U bydła zdecydowanie więcej tych cząsteczek jest na komórkach CD2+TCR $\alpha\beta$ + niż na komórkach WC1+TCR $\gamma\delta$ +. Liczbę i odsetek komórek CD5 pozytywnych we krwi u owiec określił Birkebak i współpracownicy [4]. Wynosi ona odpowiednio 3149 komórek/mm³ i 44,9% limfocytów.

CD6 jest cząsteczką początkowo traktowaną jako marker wszystkich limfocytów T. Jest to antygen powierzchniowy, który *in vitro* stymuluje komórki do rozwoju i wydaje się być istotny w przekazywaniu sygnałów zaangażowanych w aktywowaniu limfocytów. Masa tej cząsteczki wynosi 110 kDa [13]. Większość dorosłych komórek CD4+ i CD8+ ma na swojej powierzchni ten antygen, natomiast komórki WC1+ nie mają. Występuje na średnio dojrzałych tymocytach. Nie występuje na monocytach, granulocytach i limfocytach B.

Limfocyty T wykazują niektóre wspólne markery z komórkami innych linii. Np. CD2 jest markerem limfocytów T i wraz z kompleksem TCR-CD3 oraz innymi glikoproteinami związanymi z błoną komórkową pomaga aktywować komórki T przez związanie z odpowiednim ligandem. Ale równocześnie CD2 stwierdza się na około 75% komórek NK (ang. *natural killer*), które są CD3 negatywne (CD3-).

MARKERY SUBPOPULACJI LIMFOCYTÓW T

Głównymi markerami dojrzałych limfocytów T u przeżuwaczy są antygeny CD4, CD8 i WC1 [2, 16, 19, 28]. Częsteczką WC1 jest markerem populacji limfocytów T, które są CD4-CD8-, ale są TCR $\gamma\delta$ pozytywne (tab. 1).

Częsteczką CD4 była zawiera polipeptyd o masie około 50 kDa, natomiast u owiec 55 kDa. W zależności od struktury biochemicznej wyróżnia się CD4.1, CD4.2 i CD4.3.

Limfocyty CD4+ i CD8+ mogą być także definiowane za pośrednictwem izoform CD45. Odmierna ekspresja izoform CD45 podzieliła limfocyty CD4+ i CD8+ na subpopulacje. U owiec, Howard za Mackay zdefiniował częsteczkę CD4 przez CD45R-(mAb-73B) w odróżnieniu od komórek pamięci CD2+CD58+CD44++CD116+CD45R+ [13]. U owiec 30–49% komórek we krwi obwodowej jest CD45R-. Większość komórek w efferentnej limfie jest CD45R+, natomiast w afferentnej CD45R-. Wskazuje to na fakt, że komórki z fenotypem pamięci recyrkulują przez tkanki, a nie przez śródbłonek naczyń. Badania na bydle z częsteczką CD45R (homologiczną do ludzkiej CD45RB) wykazały, że częsteczką CD4, która wiąże się z albuminą owczą jest CD45R-. CD45RO identyfikuje 2 subpopulacje CD4 i CD8: są to CD4+CD8+CD45RO+CD45R- i CD4+CD8+CD45RO+CD45R+ oraz CD4+CD8+CD45RO-CD45R+.

Funkcjonalnie limfocyty CD4+ człowieka i przeżuwaczy podzielone są na 2 subpopulacje:

- komórki, które stymulują odpowiedzi limfocytów T i B, czyli sprawujące funkcje pomocnicze, są to komórki CD29+, które w większości są CD45RO+ (izoforma antygeny leukocytarnego CD45); najprawdopodobniej są to komórki aktywowane;
- komórki, które indukują funkcje cytotoksyczne (subpopulacja komórek CD4+) i wykazują ekspresję CD45RA; przyjmuje się, że są to komórki pamięci [32, 47].

Limfocyty CD4 można również klasyfikować na podstawie wydzielania cytokin. U ludzi i myszy rozróżnia się subpopulację Th1 (wydzielającą IL-2 i IFN- γ) oraz Th2 (wydzielającą IL-4, IL-5, IL-6 i IL-10). Brown i współpracownicy dokonali analogicznego podziału limfocytów pomocniczych bydła na Th1 i Th2 [6].

Limfocyty CD4+ stanowią od 25 do 35% limfocytów krwi obwodowej bydła [13, 46]. Największe skupiska limfocytów CD4+ opisywane są w korze grasicy, gdzie stanowią do 80% tymocytów. W większości są to jednak komórki podwójnie pozytywne (CD4+CD8+), ponieważ do 90% tymocytów jest także CD8+. Limfocyty CD4+ opisywane są także w strefie przykorowej węzłów chłonnych, kępkach Peyera oraz okołonaczyniowych regionach śledziony. Komórki te, choć mniej liczne, stwier-

dzane są także we wtórnych grudkach limfatycznych. Limfocyty CD4+ rozpoznają swoiste antygeny w połączeniu z cząsteczkami MHC klasy II.

Cząsteczka CD8 u przeżuwaczy jest homologiczna do ludzkiej, u bydła o masie 38 i 34 kDa, a u owiec o masie 36 i 33 kDa [13]. Stwierdzono różnice między budową tych cząsteczek u owiec i u bydła. Homologia BoCD8 α z ludzkimi CD8 ustalona na poziomie nukleotydów wynosi 75%, a na poziomie białkowym – 62%. Wyróżniamy 2 grupy przeciwciał monoklonalnych rozpoznających antygen CD8. Jedne rozpoznają łańcuch α tych antygenów, drugie – łańcuch β lub obydwa łańcuchy. Zastosowanie specyficznych mAb pozwala na rozróżnienie komórek wykazujących ekspresję form hetero- i homodimerycznych. W nabłonku dorosłego bydła większość komórek CD8+ jest heterodimeryczna. Formy homodimeryczne są obecne we krwi obwodowej i błonach śluzowych, głównie zaś w śledzionie noworodków. Jednakże wiele komórek CD2+ w śledzionie cieląt, które mogą spełniać takie same funkcje jak CD8+, wykazują ekspresję TCR $\gamma\delta$. Tu właśnie jest najwięcej komórek T $\gamma\delta$, które są WC1ujemne i w ten sposób odróżnia się je od komórek WC1 $\gamma\delta$ w krwiobiegu. U bydła, tak jak i u ludzi cząsteczki CD8 są także na komórkach NK (CD3-) [13]. Szczególne znaczenie ma udział tych limfocytów u bydła chorego na białaczkę (redukcja zakażenia RSV w płucach bydła i w infekcjach rotawirusowych) [13, 20, 21, 38, 39, 40, 41, 42, 43].

Limfocyty CD8+ odgrywają zasadniczą rolę w walce z zakażeniem pierwotnym za pomocą efektu cytotoxicznego. Limfocyty cytotoxiczne CD8+ dzielimy na 2 podstawowe subpopulacje. Pierwsza z nich wykazuje ekspresję cząsteczki CD28 i produkuje IL-2, druga zaś odpowiada na IL-2, ale jej nie produkuje, wykazuje natomiast ekspresję cząsteczki CD11b/CD18, będącej markerem limfocytów B. U ludzi limfocyty CD8+CD28+ charakteryzują się cytotoxicznością, natomiast limfocyty CD8+CD28- wykazują cechy komórek supresorowych [25, 34]. Limfocyty CD8+ stanowią od 15 do 25% limfocytów krwi obwodowej bydła [13, 47]. Szczególnie dużo stwierdza się tych komórek w strefie okołokorowej grasicy, w międzykomórkowych obszarach T-zależnych oraz w kępkach Peyera, a także w okołonaczyniowych obszarach śledziony. U młodych cieląt występują w miazdze czerwonej śledziony. W błonie śluzowej jelita komórki CD8+ występują w nabłonku. W nabłonku owiec stwierdza się także obecność CD8+TCR $\gamma\delta$ +

Wzajemne proporcje między odsetkiem limfocytów CD4+ i CD8+ określa wskaźnik CD4/CD8. We krwi obwodowej przeżuwaczy wynosi on około 1,53, zmieniając się jednak z wiekiem, wraz ze zmianą diety, a także w okresie okołoporodowym i w przebiegu zakażeń [17, 18, 19, 22, 23, 32, 47, 48, 49, 50, 51]. Wskaźnik ten nieco różni się u poszczególnych gatunków przeżuwaczy, a także u różnych ich ras [7, 44]. Wskaźnik CD4/CD8 w mleku wynosi około 0,85 i podlega wahaniom w przebiegu laktacji [8, 15, 46, 54]. Przewaga limfocytów CD8+ w wydzielinie gruczołu mlekowego potwierdza znaczny udział tej subpopulacji w błonie śluzowej.

Cząsteczka WC1 uznawana jest u przeżuwaczy jako marker jednej z głównych subpopulacji limfocytów T [9, 10, 30, 54, 55, 56]. Cząsteczka ta badana u owiec ma masę 215 kDa i występuje na komórkach CD2-CD4-CD8-CD5+ $\gamma\delta$ T+. Analizy genetyczne tego antygeny wykazały, że jest ona homologiczna z CD3+TCR $\gamma\delta$ +. Badania przeprowadzone u innych gatunków przeżuwaczy wykazały możliwość powstawania wiązań krzyżowych. Stwierdzono jednocześnie znaczne różnice osobnicze. W toku badań genetycznych marker WC1 został zróżnicowany na WC1.1 i WC1.2, różniące się masą cząsteczki, wynoszącą odpowiednio 205 i 215 kDa. U bydła cząsteczka ta jest heterodimerem o masie 300 kDa [47]. Komórki WC1+ we krwi są jednorodne, jeśli chodzi o ekspresję molekuł, które identyfikują funkcjonalnie różne subpopulacje CD4 i CD8. Większość z nich jest L-selektyno+ oraz CD45RO+, a także CD45RB- (w przypadku bydła) i CD45RA- (w przypadku owiec). Komórki WC1+ są bardzo liczne u zwierząt młodych i średnio stanowią 27% limfocytów krwi obwodowej 1–3-tygodniowych cieląt oraz ponad 40% u 1-tygodniowych kozłat [13, 53]. U zwierząt dorosłych odsetek komórek WC1+ nie przekracza 5%. Odsetek komórek WC1+ w zawieszynie węzłów chłonnych i śledziony wynosi około 4%.

Rozkład tych komórek we wtórnych tkankach limfatycznych zdecydowanie różni się od rozkładu komórek CD4+ i CD8+ [13]. W węzłach chłonnych komórki WC1 dodatnie spotykane są na zewnętrznych obszarach kory przylegających do zatok podtorebkowych. Część komórek jest obecna w zatokach i w warstwach podkorowych węzłów chłonnych. Występują także w częściach zewnętrznych śledziony oraz w skórze, w której stanowią aż 44% limfocytów, naskórku i błonach śluzowych, gdzie są zlokalizowane w błonie podstawnej. W odróżnieniu od krwi obwodowej, gdzie udział komórek WC1 obniża się z wiekiem, w błonach śluzowych odsetek wzrasta (badania przeprowadzone u cieląt) [52, 55]. Gdyby liczba komórek WC1 we krwi była dużo większa niż w gruczołach limfatycznych, wskazywało by to na utrudnioną recyrkulację tych komórek. Ale komórki WC1 są jednorodne, L-selektyno+, co wskazuje na zdolność do przechodzenia z krwi do gruczołów przez wysoki śródbłonek naczyń żylnych – HEV (ang. *high endothelial venules*). Porównanie rozkładu komórek WC1 u owiec wskazuje na 20% udział wśród leukocytów naczyń limfatycznych afferentnych, 6% w efferentnych i 13% we krwi obwodowej. Rozmieszczenie limfocytów w węzłach limfatycznych jest konsekwencją ich wejścia do węzła z limfy efferentnej. Rosnąca liczba komórek WC1+ w limfie afferentnej i ekspresja izoformy pamięci CD45RO została uznana za dowód, że są to komórki pamięci, które wybiórczo recyrkulują, jak CD4+ pamięci, ale obniżenie udziału komórek WC1 z wiekiem jest w wyraźnej sprzeczności ze wzrastającym udziałem komórek CD4+ pamięci wraz z wiekiem. Funkcja komórek WC1 nie jest do końca ustalona, bowiem prowadzone są badania, które wskazują na udział ich w rozprzestrzenianiu się innych limfocytów [13]. Może też je charakteryzować aktywność cytolityczna [13]. Szczególnie duży odsetek komórek TCR $\gamma\delta$ +, które prawdopo-

dobnie można traktować jako komórki WC1 dodatnie, występuje w gruczole mlekowym kóz, a także w wydzielinie gruczołu mlekowego [15, 52, 53]. Ekspresja badanych cząsteczek ulega zmianie w toku laktacji. Komórki TCR $\gamma\delta$ + są częste w endometrium macicy owcy. Szczepanik i wsp., za W.-J. Liu i L. Wen uważa, że ich aktywacja sprzyja wzrostowi łożyska i podtrzymaniu ciąży [37].

MARKERY LIMFOCYTÓW B

Markerami limfocytów B przeżuwaczy są przeciwciała głównie klasy IgM obecne na ich powierzchni [13, 47]. IgM tworzą wraz z CD79 α/β receptor charakterystyczny dla wszystkich limfocytów B-BCR (ang. *B-cell antigen receptor*) [33]. Markerami limfocytów BCR+ u przeżuwaczy są cząsteczki B-B1, B-B2, B-B5 i B-B8 (tab.1). Jedynie mała część przeciwciał obecnych na limfocytach B to przeciwciała klasy IgG1 lub IgG2 oraz IgA. Nie ma natomiast przeciwciał klasy IgD. Markerem tej populacji komórek jest cząsteczka B-B4.

Inne markery limfocytów B przeżuwaczy to cząsteczki nie znajdujące odpowiednika homologicznego wśród cząsteczek obecnych na limfocytach ludzkich. Należą do nich WC3, WC4, WC6 i WC10. WC3 charakteryzuje się masą 145 kDa, występuje na limfocytach B krwi obwodowej i węzłów chłonnych, kępek Peyera, śledziony i na komórkach dendrytycznych. Cząsteczka WC3 jest podobna do ludzkiego CD21 i dlatego często jest opisywana jako CD21-like. Cząsteczka WC4 o masie 90 kDa jest homologiczna do ludzkiej CD19 i coraz częściej tak jest opisywana. Niektórzy autorzy pozostają przy nazwie pierwotnej (WC4), jednak kolejne spotkania warsztatowe porządkując nomenklaturę z pewnością wprowadzą cząsteczkę CD19 u przeżuwaczy [13]. Cząsteczki WC6 o masie 210 kDa są na limfocytach B oraz na niskim poziomie na komórkach CD2+. Nie występują natomiast na komórkach WC1+, a także na tymocytach. Cząsteczki WC10 są o masie 39–115 kDa i występują, przy słabej ekspresji na limfocytach B. Nie są jednak charakterystyczne dla tej linii komórkowej. Cząsteczka WC10 występuje także na subpopulacjach komórek CD2+, nie ma jej natomiast na monocytach i granulocytach ani na komórkach WC1+.

Markerami limfocytów B są także cząsteczki CD5 i CD11b. We krwi obwodowej bywała od 5 do 35% limfocytów B jest CD5+, ale ekspresja na limfocytach B jest niższa od ekspresji na limfocytach CD2+. Większość komórek CD11b+ jest także CD5+. U myszy limfocyty CD5+ są źródłem IgM surowicy i uczestniczą w T niezależnej odpowiedzi immunologicznej oraz produkcji przeciwciał. Wysoki poziom IgM jest szczególnie widoczny u bydła i owiec z białaczką i chorobami pasożytniczymi [13].

Aktualnie wyróżniamy 2 subpopulacje komórek B [12, 47, 57]. Komórki B1, które są CD5+ i równocześnie L-selektyno+ oraz komórki B2 będące CD5+ i L-selektyno-. Z proporcji między tymi komórkami w węzłach chłonnych i we krwi, która wynosi 1/2 dla komórek B1 i 4/1 dla komórek B2, wynika, że komórki B2 mogą mieć wyższe powinowactwo do krążenia limfatycznego niż do krwi obwodowej. Niski poziom komórek B z CD5 lub CD11b u bydła w węzłach chłonnych w porównaniu z krwią obwodową potwierdzają powyższy wniosek [13].

MARKERY AKTYWACJI LIMFOCYTÓW T i B

Markery aktywacji na limfocytach zarówno T, jak i B podlegają ciągłym zmianom [13, 32, 47]. Aktywacja tych komórek wzmacnia ekspresję jednych antygenów bądź indukuje innych cząsteczek powierzchniowych. Markery aktywacji obejmują cząsteczki adhezyjne umożliwiające współdziałanie z innymi komórkami, a także receptory dla czynników wzrostu i różnicowania komórek [11, 14, 29, 45]. Przykładowo receptor dla IL-2 (IL-2R), który wykazuje ekspresję w wyniku aktywacji limfocytów T, składa się z 3 podjednostek. Spoczynkowa komórka T człowieka ma podjednostkę β (CD25 o masie 55 kDa) oraz γ , natomiast w czasie aktywacji pojawia się podjednostka α (70 kDa) powodując powstanie heterotrimerycznego receptora dla IL-2. U ludzi i myszy jest to przejściowo indukowana cząsteczka gp55 i 75. U przeżuwaczy cząsteczka wiążąca IL-2 wykazuje ekspresję na limfocytach TCR($\alpha\beta$)+, cząsteczka CD25 (łańcuch α receptora dla IL-2) wykazuje wysoki poziom ekspresji na populacji WC1+ (TCR $\gamma\delta$ +), co może wyjaśnić szybką odpowiedź komórek WC1+ na IL-2 *in vitro*. CD25 jest także mocno wyrażone na limfocytach aktywowanych w hodowli 1–7-dniowej, stymulowanej Con-A. Antygen występuje na komórkach przez 10 godzin po stymulacji lektynowej i osiąga najwyższą aktywność 3–4 dnia, po czym ekspresja powoli się obniża. Ekspresja CD25 na monocytach i limfocytach B w stymulowanej hodowli leukocytów krwi obwodowej jest zdecydowanie niższa.

Cząsteczka WC5, polipeptyd o masie 47 kDa, jest wyrażona na aktywowanych komórkach T i na niektórych subpopulacjach limfocytów T oraz spoczynkowych komórkach B krwi obwodowej. Cząsteczka WC8 (150 kDa) jest obecna na dojrzałych aktywowanych limfocytach T($\alpha\beta$), w 6 dni po aktywacji. Ekspresja tej cząsteczki jest stymulowana alloantygenami i lektynami. WC8 nie jest stwierdzana na komórkach spoczynkowych.

WYBRANE MARKERY DOJRZEWANIA

Głównymi markerami dojrzewania są cząsteczki CD1, izoformy CD45 oraz receptory dla L-selektyny [13, 47]. Występują one na powierzchni komórek macierzystych oraz na tymocytach na różnym etapie ich dojrzewania. Komórki macierzyste będące prekursorami limfocytów są CD1-CD4-CD8-L-selektyno+. Charakteryzuje je wysoka aktywność mitotyczna. U myszy szpik kostny zawiera dojrzałe limfocyty B oraz limfocyty TCR+, które są CD1-CD2+CD3+CD5+CD6+ i CD4+ lub CD8+. Komórek WC1+ jest bardzo mało i stanowią one poniżej 3% komórek szpiku. Badania owiec pozbawionych grasicy podczas życia płodowego pokazały, że obwodowe komórki WC1+ zależą od grasicy. Grasica przeżuwaczy zarówno strukturalnie, jak i funkcjonalnie jest podobna do grasicy innych gatunków ssaków. Komórki kory grasicy są CD1+CD2+CD4+CD8+CD5+CD6-CD45R-. Za pośrednictwem receptora dla L-selektyny mogą być także definiowane komórki CD4+ i CD8+. U młodego bydła istnieje przewaga komórek z receptorem dla L-selektyny, z wiekiem ich odsetek obniża się. Ekspresja receptorów dla L-selektyny nie ma związku ze statusem pamięci określanym testem proliferacji. Komórki CD4+CD8+ bydła dzielimy na L-selektyno dodatnie i L-selektyno ujemne oraz CD45R-dodatnie i CD45R-ujemne, co tworzy 4 różne subpopulacje tych komórek.

MARKERY KOMÓREK K, NK i LAK

Komórki K (ang. *killer*), NK (ang. *natural killer*) i LAK (ang. *lymphokine-activated killer*) należą do rodziny komórek układu limfatycznego, mających właściwości zabijania nieswoistego, a ich aktywność cytotoksyczna nie jest uzależniona od restrykcji cząsteczek MHC [34]. Komórki K i NK pochodzą przeważnie z „dużych komórek ziarnistych” (ang. *large granular lymphocytes – LGL*). Większość komórek NK jest CD3-CD16+CD56+. Wrażliwość na zabijanie jest odwrotnie skorelowana z ekspresją MHC klasy I, co oznacza ochronę komórki wykazującą tę ekspresję przed komórką NK. Komórki LAK nasilają swoją aktywność cytotoksyczną pod wpływem IL-2. Fakt ten, w powiązaniu z trudnościami w zróżnicowaniu funkcjonalnym tych komórek z komórkami NK, sugeruje, że komórki LAK nie reprezentują oddzielnej linii prekursorowej, a są następstwem aktywacji.

Komórki K, NK i LAK o potencjale cytotoksycznym, posiadające receptory Fc dla IgG mogą wiązać się z komórkami docelowymi opłaszczonymi IgG powodując ich lizę. Celem ataku tych komórek są antygeny wirusowe, cząsteczki MHC i niektóre epitopy obecne na komórkach nowotworowych. Mechanizm zabijania przez komórki limfoidalne obejmuje trzy fazy: wiązanie z komórką docelową, uwalnianie

pęcherzyków komórki cytotoksycznej (zawierających perforynę, esterazę serynową, TNF α i TNF β) zależnie od stężenia jonów wapnia i fazy zabicia komórki docelowej.

Aktywność cytotoksyczna komórek K i NK krwi obwodowej była w stosunku do komórek nowotworowych jest bardzo niska, natomiast w stosunku do komórek zainfekowanych wirusem, np. białaczki lub BHV-1 (ang. *bovine herpesvirus*) jest bardzo wysoka [12]. Wzrasta ona dodatkowo przy braku ekspresji cząsteczek MHC klasy II. Komórki NK była są CD4-CD5-CD6-WC1-. Niektóre tylko klony tych komórek wykazują ekspresję cząsteczek CD2 i CD8. Komórki LAK natomiast są CD2+CD4-CD8- i ich aktywność cytotoksyczna jest zdecydowanie większa w stosunku do wszystkich komórek docelowych.

PODSUMOWANIE

Limfocyty przeżuwaczy stanowią liczną (od 45 do 75%) populację leukocytów i ich ocena jest przedmiotem wielu opracowań z zakresu weterynaryjnej diagnostyki laboratoryjnej. Przejawem aktywacji limfocytów jest pojawienie się na ich powierzchni cząsteczek, które mogą służyć do odróżniania subpopulacji komórek w obrębie organizmu. Cząsteczki, które są homologiczne z ludzkimi, nazywane są zgodnie z nomenklaturą stosowaną u ludzi (CD), pozostałe markery oznaczane są jako WC (tab.1). Wspólnym antygenem leukocytarnym jest cząsteczka CD45, jednak u przeżuwaczy nie występuje ona na limfocytach WC1+ oraz na monocytach. Podstawowym markerem limfocytów T przeżuwaczy jest cząsteczka TCR z tym, że komórki TCR-1(γ i δ)+ stanowią około 60% wszystkich limfocytów. Inne markery limfocytów T to cząsteczki CD1, CD2, CD5 i CD6 oraz CD4, CD8 i WC1. Wskaźnik CD4/CD8 we krwi obwodowej przeżuwaczy wynosi około 1,53, w mleku natomiast 0,85 i podlega wahaniom w przebiegu laktacji. Limfocyty WC1+ (CD4-CD8-TCR $\gamma\delta$ +) stanowią bardzo liczną (40%) populację limfocytów u młodych zwierząt. Markerami limfocytów B przeżuwaczy są przeciwciała, głównie klasy IgM, obecne na ich powierzchni oraz cząsteczki nie znajdujące odpowiednika homologicznego wśród cząsteczek obecnych na limfocytach ludzkich. Należą do nich WC3 (CD21-like), WC4 (CD19), WC6 (obecne na limfocytach B oraz na komórkach CD2+, nie występują natomiast na komórkach WC1+ i na tymocytach) i WC10 (na limfocytach B i na subpopulacjach komórek CD2+, nie ma ich na monocytach i granulocytach ani na komórkach WC1).

Do markerów aktywacji na limfocytach, zarówno T jak i B, należą: IL-2R, który wykazuje ekspresję w wyniku aktywacji limfocytów TCR($\alpha\beta$)+ i cząsteczka CD25, która wykazuje wysoki poziom ekspresji na populacji WC1+ (TCR $\gamma\delta$ +), a także cząsteczki WC5 i WC8. Głównymi markerami dojrzewania są cząsteczki CD1, izoformy CD45 oraz receptory dla L-selektyny. Spośród pozostałych komórek

limfocytarnych (K, NK i LAK) we krwi obwodowej przeżywaczy komórki NK była są CD4-CD5-CD6-WC1-. Ich aktywność cytotoksyczna w stosunku do komórek nowotworowych jest bardzo niska, natomiast w stosunku do komórek zainfekowanych wirusem wysoka. Komórki LAK natomiast są CD2+CD4-CD8- i ich aktywność cytotoksyczna jest zdecydowanie wyższa w stosunku do wszystkich komórek docelowych.

LITERATURA

- [1] ABELLA N, SCHELCHER F, DELVERDIER M, RAYMOND I, ESPINASSE J, CABANIE P. Flow cytometry and immunophenotyping of bovine lymphocyte subpopulations. *Revue de Medicine Veterinaire* 1994; **3**: 177–184.
- [2] ABELLA N, SCHELCHER F, DELVERDIER M, CONCORDET D, VALARCHER J F, ESPINASSE J, CABANIE P. Flow cytometric analysis of bovine CD4 and CD8 lymphocytes: influence of blood sampling and processing methods. *Res Vet Sci* 1994; **57**: 163–171.
- [3] BERTHON P, HOPKINS J. Ruminant cluster CD14. *Vet Immunol Immunopathol* 1996; **52**: 245–248.
- [4] BIRKEBAK TA, PALMER GH, DAVIS WC, ELWAIN TF. Quantitative characterisation of the CD5 bearing lymphocyte population in the peripheral blood of normal sheep. *Vet Immunol Immunopathol* 1994; **41**: 181–186.
- [5] BRODERSEN R, BIJLSMA F, GORI K, JENSEN KT, CHEN W, DOMINGUEZ J, HAVERSON K, MOORE PF, SAALMÜLLER A, SACHS D, SLIERENDRECHT WJ, STOKES C, VAINIO O, ZUCKERMANN F, AASTED B. Analysis of the immunological cross reactivities of 213 well characterised monoclonal antibodies with specificities against various leucocyte surface antigens of human and 11 animal species. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; **64**: 1–13.
- [6] BROWN WC, RICE-FICHT AC, ESTES DM. Bovine type 1 and 2 responses. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; **63**: 45–55.
- [7] CHARON KM, RUTKOWSKI B, MOSKWA B, WINNICKA A, ŚWIDEREK WP. The relation between nematode parasite infection and frequency of lymphocyte subpopulations in blood of the Polish heath lambs. 50th Annual Meeting of the European Association for Animal Production. Zurich, 1999; **S4**: 1–4.
- [8] CONCHA C, SAAD A, HOLMBERG O. Comparison of mammary gland T-cell proliferative responses and proportions of three T-lymphocyte subpopulations (CD2, CD4 and CD8) between late lactation and mid-involution. Third IDF International Mastitis Seminar, Israel 1995; 91–94.
- [9] COLLINS RA, SOPP P, PARSONS KR, MORRISON WI, HOWARD CJ. What are the cells and molecules involved in stimulating bovine $\gamma\delta$ T cells? *Vet Immunol Immunopathol* 1996; **54**: 93.
- [10] DAVIS WC, BROWN WC, HAMILTON MJ, WYATT CR, ORDEN JA, KHALID AM, NAESSENS J. Analysis of monoclonal antibodies specific for the $\gamma\delta$ TcR. *Vet Immunol Immunopathol* 1996; **52**: 275–283.
- [11] ESTES DM, BROWN WC, HIRANO A. CD40 ligand-dependent signaling of bovine B lymphocyte development and differentiation. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; **63**: 15–20.
- [12] HANRAHAN C F, KIMPTON W G, HOWARD C J, PARSONS K R, BRANDON M R, ANDREWS A E, NASH A D. Cellular requirements for the activation and proliferation of ruminant gamma delta T cells. *J Immunol* 1997; **159**: 94287–4294.

- [13] HOWARD C J, MORRISON W I. Cell-mediated immunity in ruminants. CRC Press. Inc. London 1994.
- [14] ISAACSON JA, FLAMING KP, ROTH JA. Increased MHC Class II and CD25 expression on lymphocytes in the absence of persistent lymphocytosis in cattle experimentally infected with bovine leukemia virus. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; **64**: 235–248.
- [15] 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.
- [16] JOSEFSEN TD, LANDSVERK T. T cell subsets and Langerhans cells in the forestomach of the adult sheep and sheep foetuses. *Vet Immunol Immunopathol* 1996; **51**: 101–111.
- [17] KAMBARA T, MCFARLANE RG. Changes in the T cell subpopulations of sheep due to age and dietary protein intake; association with protective immunity to *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet Immunol Immunopathol* 1996; **51**: 127–135.
- [18] KLUCIŃSKI W, WINNICKA A, KAWIAK J, HOSER G, RYNIEWICZ Z, BAŃKOWSKI R, SITARSKA E, SIKORA J. Analiza cytometryczna podstawowych subpopulacji limfocytów, komórek null i komórek MHC II pozytywnych krwi obwodowej kóz w różnym wieku. *Zesz Nauk SGGW*, 1997; **1**: 109–116.
- [19] KLUCIŃSKI W, WINNICKA A, KAWIAK J, HOSER G, MIKS B, BAŃKOWSKI R, SITARSKA E, KLECZKOWSKI M. 1997. Analiza subpopulacji limfocytów krwi obwodowej przeżuwaczy metodą cytometrii przepływowej. *Med Wet* 1997; **53**: 588–591.
- [20] KUŹMAK J, KOZACZYŃSKA B, BICKA L, WINNICKA A, KLUCIŃSKI W. Lymphocyte subset analysis in sheep inoculated with bovine immunodeficiency virus (BIV) and bovine leukemia virus (BLV). XV Int. Conference Microbiological Diagnostics, Puławy 1999; 30.
- [21] KUŹMAK J, KOZACZYŃSKA B, BICKA L, WINNICKA A. Wpływ współinfekcji wirusem białaczki bydła i nabytego braku odporności bydła na subpopulacje limfocytów krwi obwodowej owiec. XXXV Zjazd PT Bioch. Olsztyn, 1999; 181.
- [22] LITTLE D, ALZUHERRI HM, CLARKE CJ. Phenotypic characterisation of intestinal lymphocytes in ovine paratuberculosis by immunohistochemistry. *Vet Immunol Immunopathol* 1996; **55**: 175–187.
- [23] LLOYD JB, GILL HS, HUSBAND AJ. The effect of storage on immunophenotyping of sheep peripheral blood lymphocytes by flow cytometry. *Vet Immunol Immunopathol* 1995; **47**: 135–142.
- [24] MATEO A, GARRIDO JJ, PERAZ DE LA LASTRA J, MARTIN DE LAS MULAS J, MORENO A, PINDADO CO, LLANES D. A new epitope on sheep CD45R molecule detected by a monoclonal antibody. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1999; **22**: 125–136.
- [25] MODLIN H L, BLOOM B R. Immune regulation: learning from leprosy. *Hospital Practice* 1993; **15**: 71–84.
- [26] NAESSENS J, HOPKINS J. Introduction and summary of workshop findings. *Vet Immunol Immunopathol* 1996; **52**: 213–235.
- [27] NAESSENS J, HOWARD C J, HOPKINS J. Nomenclature and characterization of leukocyte differentiation antigens in ruminants. *Immunology Today* 1997; **18**: 365–368.
- [28] NAVARRO JA, CARO MR, SEVA J, ROSILLO MC, GOMEZ MA, GALLEGU MC. Study of lymphocyte subpopulations in peripheral blood and secondary lymphoid organs in the goat using monoclonal antibodies to surface markers of bovine lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 1996; **51**: 147–156.
- [29] ONAH DN, HOPKINS J, LUCKINS AG. Increase in CD 25+ B cells and depression of immune responses in sheep infected with *Trypanosoma evansi*. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; **63**: 209–222.
- [30] PARSONS KR, CROCKER G, SOPP P, HOWARD C J, DAVIS W C. Identification of monoclonal antibodies specific for the $\gamma\delta$ TCR. *Vet Immunol Immunopathol* 1993; **52**: 161–167.

- [31] RHIND SM, DUTIA BM, HOWARD CJ, HOPKINS J. Discrimination of two subsets of CD1 molecules in the sheep. *Vet Immunol Immunopathol* 1996; **52**: 265–270.
- [32] ROITT I, BROSTOFF J, MALE D. Immunologia. Mosby, London, 1996.
- [33] RUPNIEWSKA Z M, DMOSZYŃSKA M. Rola heterodimeru CD79 α /CD79 β i kompleksu CD19/CD21/CD81 w rozwoju i czynności receptora dla antygeny na komórce B. *Post Biol Kom* 1999; **26**: 841–861.
- [34] SHAFER-WEAVER K A, SORDILLO L M. Bovine CD8+ suppressor lymphocytes alter immune responsiveness during the postpartum period. *Vet Immunol Immunopathol* 1997; **56**: 53–64.
- [35] SOPP P, HOWARD CJ. Cross-reactivity of monoclonal antibodies to defined human leucocyte differentiation antigens with bovine cells. *Vet Immunol Immunopathol* 1997; **56**: 11–25.
- [36] SOPP P, KWONG LS, HOWARD CJ. Identification of bovine CD14. *Vet Immunol Immunopathol* 1996; **52**: 323–328.
- [37] SZCZEPANIK M, PŁYTYCZ B. Limfocyty o receptorach gamma/delta ($\gamma\delta$ T). *Post Biol Kom* 1998; **25**: 155–170.
- [38] SZCZOTKA M, KAWIAK J, WINNICKA A, KUBIS P. Flow cytometric analysis of lymphocytes subsets in cattle infected with bovine leukemia virus (BVL). XV Int. Conference Microbiological Diagnostics – Pulawy, 1999; 62.
- [39] SZCZOTKA M, WINNICKA A, KUBIS P, KAWIAK J. The lymphocytes subsets in cattle infected with bovine leukemia virus (BVL). Warszawa, SGGW. Konferencja: Biologia molekularna w diagnostyce chorób zakaźnych i biotechnologii, 1999; S1–6.
- [40] SZCZOTKA M, KAWIAK J, WINNICKA A, KUBIS P. Flow cytometric analysis of lymphocytes subsets in cattle infected with bovine leukemia virus (BVL). Int. Conf. of Vet.-Lyon, 1999; B123.
- [41] SZCZOTKA M, KAWIAK J, RULKA J, KUBIS P, WINNICKA A, BUZALA E. Analysis of phenotype, expression of BLV-GP51 protein and activation markers of bovine lymphocytes infected with BVL. XIth Int. Workshop on Retroviral Pathogenesis – Bordeaux, France, 1999; 82.
- [42] SZCZOTKA M, KAWIAK J, RULKA J, KUBIS P, WINNICKA A, BUZALA E. Analysis of phenotype, expression of BLV-GP51 protein and activation markers of bovine lymphocytes infected with BLV. Satellite Workshop on Lentiviruses of Sheep and Goats: Pathogenesis, Diagnosis and Prevention – Bordeaux, France, 1999.
- [43] SZCZOTKA M, KAWIAK J, KUBIS P, RULKA J, WINNICKA A. Określenie determinant antygenowych limfocytów krwi i tkanki białaczkowej bydła zakażonego wirusem enzoptycznej białaczki bydła (BVL). XXXV Zjazd PTBioch.- Olsztyn, 1999; 206.
- [44] ŚWIDEREK W, WINNICKA A, KLUCIŃSKI W, CHARON M. Investigation of lymphocyte subpopulations in Polish Heatherhead Sheep and Polish Lowland Sheep of Żelazna variety. *J Applied Genetics* 1998; A39.
- [45] TANI K, ASAHINA M, WU DI, AJITO T, MURAKAMI K, GORYO M, AIDA Y, DAVIS W C, OKADA K. Further analysis of the phenotype and distribution of tumor cells in sporadic B-cell and T-cell lymphomas in the lymph node and spleen of cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 1997; **55**: 283–290.
- [46] TAYLOR BC, DELLINGER JD, CULLOR JS, STOTT JL. Bovine milk lymphocytes display the phenotype of memory T cells and are predominantly CD8+. *Cell-Immunol* 1994; **156**: 245.
- [47] TIZARD I. Veterinary Immunology. 5 wyd WB Saunders, Philadelphia 1996: 94–120.
- [48] TRAININ Z, BRENNER J, MEIROM R, UNGAR-WARON H. Detrimental effect of bovine leukemia virus (BLV) on the immunological state of cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 1996; **54**: 293–302.
- [49] VAN KAMPEN C, MALLARD BA. Effect of peripartum stress and health on circulating bovine lymphocyte subsets. *Vet Immunol Immunopathol* 1997; **59**: 79–91.

- [50] WILSON R, ZOLNAI A, RUDAS P, FRENYO LV. T-cell subsets in blood and lymphoid tissues obtaining from the fetal calves, maturing calves, and adult bovine. *Vet Immunol Immunopathol* 1996; **53**: 49–60.
- [51] WINNICKA A, KLUCINSKI W, KAWIAK J. Examination of lymphocyte subpopulations in pregnant goats and their offsprings by flow cytometry. VIII Int Symp of Vet Lab Diagnosticians - Israel, 1996.
- [52] WINNICKA A, KLUCINSKI W, KAWIAK J. Examination of lymphocyte subpopulations in sheep by flow cytometry. IV Int Conf for Sheep Vet AU, 1997; 455–456.
- [53] WINNICKA A, KLUCIŃSKI W, KAWIAK J, HOSER G, RYNIOWICZ Z, SIKORA J, SIRTARSKA E, BAŃKOWSKI R. Lymphocyte subpopulations, null cells and MHC II positive cells in peripheral goat blood in the different age. *Small Ruminant Research* 1999; **33**: 247–253.
- [54] WINNICKA A, KLUCIŃSKI W, KAWIAK J, HOSER G, SIKORA J. Flow cytometry analysis of milk and peripheral blood cells from goats during lactation. *J Vet Med A* 1999; **46**: 459–464.
- [55] WYATT CR, BRACKETT EJ, PERRYMAN LE, DAVIS WC. Identification of $\gamma\delta$ T lymphocyte subsets that populate calf ideal mucosa after birth. *Vet Immunol Immunopathol* 1996; **52**: 91–103.
- [56] WYATT CR, MADRUGA C, CLUFF C, PARISH S, HAMILTON MJ, GOFF W, DAVIS W. Differential distribution of gamma delta T-cell receptor lymphocyte subpopulations in blood and spleen of young and adult cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 1994; **40**: 187–199.
- [57] WU D, TAKAHASHI K, MURAKAMI K, TANI K, KOGUCHI A, GORYO M, AIDA Y, OKADA K. B-1a, B-1b and conventional B cell lymphoma from enzootic bovine leukosis. *Vet Immunol Immunopathol* 1996; **55**: 63–72.

Redaktor prowadzący – Barbara Płytycz

Otrzymano: 02.11. 1999 r.

Przyjęto: 10.01. 2000 r.

Adres autora: 03-849 Warszawa, ul. Grochowska 272

winnicka@amaltea.sggw.waw.pl

NIEKTÓRE CECHY FENOTYPOWE I CZYNNOŚCIOWE KOMÓREK ŚRÓDBŁONKÓW NACZYNIOWYCH*

PHENOTYPIC AND FUNCTIONAL FEATURES OF ENDOTHELIAL CELLS*

Maria PAPROCKA, Danuta DUŚ

Laboratorium Oddziaływań Międzykomórkowych, Zakład Immunologii
Nowotworów, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN
im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu

Streszczenie: Śródbłonek naczyniowy jest strukturą odgrywającą krytyczną rolę w procesie krążenia i krzepnięcia krwi, w miażdżycy, w stanach zapalnych, jak również w progresji nowotworowej. Szczególnym rodzajem śródbłonka jest tzw. śródbłonek wysoki zlokalizowany w węzłach chłonnych, biorący udział w krążeniu limfocytów. Charakterystyczną cechą śródbłonka jest niski obrót komórkowy, przy zachowanej zdolności do szybkiej migracji i proliferacji w odpowiedzi na uszkodzenie. Cechą fenotypową odróżniającą go od innych komórek jest selektyna E oraz swoiste cząsteczki adhezyjne zwane adresynami. Biorą one udział w zapoczątkowaniu procesu adhezji leukocytów do ściany naczynia. Pod wpływem chemokin następuje aktywacja leukocytów umożliwiającą ich ścisłą adhezję do ściany naczynia i w końcu transmigrację przez ścianę naczynia, do otaczającej tkanki. Precyzyjne zdefiniowanie cząsteczek adhezyjnych oraz aktywatorów i inhibitorów tego wieloetapowego procesu pozwoli, być może, na próby interwencji terapeutycznej w przypadku stanów zapalnych lub chorób nowotworowych. (*Postępy Biologii Komórki* 2000; 27: 247–260)

Słowa kluczowe: Fenotyp komórki śródbłonka, cząsteczki adhezyjne, adhezja, transmigracja leukocytów.

Summary: Endothelial cells play a critical role in blood circulation and hemostasis, in atherosclerosis, inflammation and cancer progression. Low cellular turnover, migration and proliferation capacity in response to specific stimuli are characteristic features of endothelial cells. High endothelial venules in lymph nodes are the type of endothelium specialized in lymphocyte circulation. E selectin and other endothelium specific adhesive molecules called addressins, initiate process of leukocytes' adhesion to the vascular wall. Under influence of chemokines, activated leukocytes adhere firmly and finally

*Praca finansowana z programu statutowego IITD PAN, Nr 8/99.

transmigrate through the vascular wall to the surrounding tissues. The knowledge of adhesive molecules and their activators/inhibitors, participating in the process, would possibly allow a specific antiadhesive therapy of inflammatory and neoplastic diseases.

(*Advances of Cell Biology* 2000; 27: 247–260)

Key words: Endothelial cell phenotype, adhesive molecules, adhesion, transmigration.

WSTĘP

Śródbłonek naczyniowy długo postrzegany był jako „warstwa celofanu, zawierająca jądra komórkowe”, tj. jako bierna, choć selektywna warstwa, wyściełająca naczynia krwionośne i limfatyczne, pełniąca rolę mechanicznej przegrody pomiędzy krwią i otaczającymi naczynie tkankami [cyt. za: 16]. Postęp wiedzy o biologii naczyń, jaki dokonał się w ostatnim dwudziestolecu, wykazał, że śródbłonek naczyniowy jest skomplikowaną, aktywną metabolicznie strukturą pełniącą ważną rolę w wielu procesach ustrojowych. Stosunkowo najwcześniej poznano jego udział w procesie krzepnięcia krwi. Stwierdzono, że w normalnych warunkach śródbłonek produkuje zarówno czynniki anty-, jak i prokoagulacyjne. Na wewnętrznej powierzchni naczyń, w miejscu kontaktu z przepływającą krwią, jest eksponowana trombomodulina, jedno z najważniejszych białek o właściwościach antytrombogenicznych. Inne białka pełniące zbliżone funkcje, produkowane lub opłaszczane na śródbłonku to antytrombina, tkankowy aktywator plazminogenu (tPA) i prostacyklina (PGI₂). Z kolei główną glikoproteiną prokoagulacyjną jest czynnik von Willebranda (vWf), będący białkiem nośnikowym VIII czynnika krzepnięcia. Niektóre z czynników biorących udział w procesach krzepnięcia, mają także inne funkcje, związane z homeostazą naczyniową, np. PGI₂ odgrywa ważną rolę w utrzymywaniu napięcia naczynia (ang. *vascular tonus*), wpływając tym samym na ciśnienie panujące w naczyniach i na ich przepuszczalność dla płynów ustrojowych oraz metabolitów. Badając udział komórek śródbłonka w procesach prawidłowych szybko dostrzeżono ich kluczową rolę w niektórych stanach patologicznych. I tak stwierdzono krytyczny udział śródbłonka w progresji nowotworowej, warunkowanej neoangiogenezą, w przewlekłych stanach zapalnych, reumatoidalnym zapaleniu stawów, w miażdżycy i w retinopatii cukrzycowej. Ostatnio intensywnie badana jest rola śródbłonek w adhezji i następowej transmigracji komórek krążących, z krwi do tkanek otaczających naczynie. Śródbłonek jest w tym przypadku pierwszą, selektywną i krytyczną dla tego procesu barierą.

POCHODZENIE I CECHY MORFOLOGICZNE ŚRÓDBŁONKÓW

Śródbłonek naczyniowy jest jednym z typów wyspecjalizowanego nabłonka płaskiego, wywodzącego się z mezodermy. Komórki śródbłonka wyściełają ściany

naczynia w sposób spolaryzowany. Do światła naczynia zwrócona jest ich nietrombogenna powierzchnia, zaś częścią proksymalną przylegają one do błony podstawnej. W dużych naczyniach, kapilarach płucnych, mięśniach, siatkówce oka i tkance tłuszczowej, śródbłonek ma postać ciągłą. W naczyniach włosowatych występujących w śluzówce przewodu pokarmowego, gruczołach dokrewnych i w kłębuszkach nerkowych występuje śródbłonek zbudowany z komórek posiadających otworki przeczycoplazmatyczne, określane mianem „okienkowego”. Nieciągła warstwa komórek śródbłonkowych wyścielająca naczynia zatokowe (sinusoidy), występujące m.in. w wątrobie, śledzionie i mikronaczyniach szpiku, jest także silnie „okienkowana”. Szczególną strukturą wyróżniają się żyłki zawłosowate (ang. *post-capillary venules*) węzłów chłonnych, zbudowane z tzw. śródbłonka wysokiego (ang. *high endothelial venules, HEVs*). HEVs są to wyspecjalizowane żyłki pośredniczące w wychodzeniu limfocytów z krwiobiegu [10]. U człowieka HEVs występują we wszystkich wtórnych narządach limfatycznych (z wyjątkiem śledziony, gdzie migracja limfocytów zachodzi w zatokach żylnych strefy obwodowej): w setkach obwodowych węzłów chłonnych, migdałkach, grudkach limfatycznych skupionych jelita (d. kępki Peyera, ang. *Peyer's patches; PPs*), wyrostku robaczkowym, grudkach limfatycznych w żołądku i w jelicie grubym. HEVs zawdzięczają swą nazwę nietypowej morfologii, tworzą bowiem strukturę zbliżoną do jednowarstwowego nabłonka sześciennego, podczas gdy śródbłonek innych naczyń jest płaski. W badaniach ultrastrukturalnych można stwierdzić w tych komórkach rozbudowany aparat Golgiego, liczne polirybosomy i obfitą szorstką siateczkę wewnątrzcytoplazmatyczną oraz ciała Weibel-Palade'a, świadczące o aktywnym procesie biosyntezy i wydzielania. Podczas gdy w innych żyłkach i tętniczkach występują zazwyczaj ściśle połączenia międzykomórkowe typu *tight junctions* [7], charakterystyczną cechą HEVs jest występowanie połączeń nieciągłych (ang. *spot-welded junctions*) pomiędzy błonami sąsiadujących komórek, stanowiących miejsce przechodzenia limfocytów. Śródbłonek o morfologii zbliżonej do wysokiego śródbłonka (ang. *HEVs-like*), pojawia się w czasie przewlekłych stanów zapalnych w tkankach nielimfoidalnych, w chorobach: Crohna, Hashimoto czy w reumatoidalnym zapaleniu stawów. HEVs i struktury *HEVs-like* wydają się pełnić tę samą funkcję, tzn. są miejscem wychodzenia z naczynia do otaczających tkanek limfocytów T i B [9].

Śródbłonek naczyń limfatycznych powstaje ze śródbłonka żylnego w czasie waskulogenezy. Morfologicznie naczynia te wyróżniają się szczególną formą, ułatwiająca im absorpcję limfy – ich błona podstawna jest nieciągła, a kotwiczące ją filamenty sięgają od warstwy abluminalnej aż do sąsiadującej tkanki łącznej. Komórki śródbłonków naczyń limfatycznych wyróżnia także obecność 5' nukleotydu (5'nase), natomiast cyklazy: adenylova i guanylova są charakterystyczne dla naczyń żylnych [37].

CECHY FENOTYPOWE KOMÓREK ŚRÓDBŁONKOWYCH

Komórki śródbłonkowe (*ang. endothelial cells, ECs*) mają wiele szczególnych cech, odróżniających je od innych komórek. Klasycznymi markerami ECs są: vWf, CD143 – enzym konwertujący angiotensynę (*ang. angiotensin converting enzyme, ACE*) oraz cząsteczka adhezyjna zwana selektyną E (CD62E). Na ECs występują także: selektyna P (CD62P), PECAM-1 (CD31), CD34, CD44, CD51, czy CD105, ale są to antygeny znajdujące także na innych rodzajach komórek [12, 17]. Na przykład antygen CD34 oprócz występowania na komórkach śródbłonka żyłek włosowatych, śródbłonkach w szpiku oraz w nowotworach wywodzących się z komórek śródbłonkowych jest również markerem wielopotencjalnych komórek progenitorowych krwi, funkcjonując jako ich cząsteczka adhezyjna. CD34 nie występuje natomiast na śródbłonkach dużych naczyń i arterii, łożyska oraz naczyń limfatycznych. Z kolei selektyna P jest charakterystyczna dla megakariocytów i płytek krwi, pełniąc ważną funkcję w procesie krzepnięcia.

Oprócz przedstawionych powyżej cech wspólnych, ECs wykazują znaczną heterogenność. Komórki śródbłonka z dużych naczyń różnią się od tych z naczyń włosowatych m.in. determinantami antygenowymi, białkami powierzchniowymi, wzorem glikozylacyjnym, (co znajduje swoje odbicie w zróżnicowanym wiązaniu lektyn), aktywnością enzymatyczną, metabolizmem, ekspresją cząsteczek adhezyjnych, fenotypem wydzielniczym, wymaganiami odżywczymi, odpowiedzią na czynniki wzrostowe [5, 26, 37]. Śródbłonki wykazują również swoistość: gatunkową, osobniczą oraz narządową. Są one pierwszymi komórkami w przeszczepianym narządzie, spotykanymi przez układ odpornościowy biorcy. Różnice osobnicze między śródbłonkami są jedną z przyczyn odrzucania przeszczepów. Różnice narządowe występują pomiędzy śródbłonkami z krtani, języka, jelita cienkiego, jamy otrzewnej (krezka), Różnice narządowe opisano również w odniesieniu do tropizmu dla wirusów, co jest szczególnie istotne np. w przypadku wrażliwości na zakażenie wirusem cytomegalii (CMV), który może być czynnikiem indukującym rozwój miażdżycy lub odrzucanie przeszczepów [15].

KOMÓRKI ŚRÓDBŁONKOWE: MIGRACJA vs. PROLIFERACJA

Fizjologiczne formowanie nowych naczyń (angiogeneza) ma miejsce w embriogenezie, w endometrium w czasie cyklu menstruacyjnego i ciąży oraz w gojeniu się ran. Angiogeneza zachodzi także w warunkach patologicznych, takich jak: neowaskularyzacja tkanki nowotworowej, choroby reumatyczne czy retinopatia cukrzycowa. Wtedy formowaniu nowych naczyń zwykle towarzyszy proces zapalny. Poza wymienionymi powyżej sytuacjami, komórki śródbłonka wykazują niski obrót ko-

mórkowy. Zachowują jednak zdolność do szybkiej migracji i proliferacji w odpowiedzi na uszkodzenie i czynniki o właściwościach angiogennych. Pierwszym etapem w kaskadzie wydarzeń prowadzących do utworzenia nowego naczynia jest migracja komórek śródbłonkowych. W przypadku uszkodzenia śródbłonka istniejącego naczynia, pozostałe ECs mogą migrować w postaci płachty przykrywającej uszkodzone obszary. W przypadku formowania nowego naczynia włosowatego, czoło kapilary migruje do otaczającej tkanki, sterowane przez gradient chemotaktyczny w kierunku stymulatora angiogenezy. Gradient chemotaktyczny może być tworzony przez cytokiny lub chemokiny z grupy klasycznych chemoatraktantów, w sposób autokryny, w odpowiedzi na uszkodzenie mechaniczne albo w wyniku obecności guza nowotworowego [32]. W procesie angiogenezy migrujące czoło nowego naczynia nie syntetyzuje DNA ani nie wchodzi w mitozę. Jak wykazano autoradiograficznie, *in vitro*, komórki te wchodzi w fazę mitozy dopiero po 12–20 godz. od momentu uszkodzenia warstwy śródbłonka, podczas gdy ich migracja zaczyna się już po ok. 4 godz. [1].

ECs mają specyficzny fenotyp migracyjny, nie związany z cyklem komórkowym, objawiający się wzrostem ekspresji niektórych glikokoniugatów i pojawieniem się specyficznych glikoprotein powierzchniowych [22]. Zaobserwowano m.in. związane z migracją podwyższenie syntezy siarczanu chondroityny, siarczanu dermatanu oraz syndekanu, proteoglikanu powierzchni komórki w EC z ziarninującej tkanki [1, 8]. W migrujących EC stwierdzono podwyższoną, w porównaniu z komórkami niemigrującymi, ekspresję niektórych glikoprotein oraz pojawienie się nowych glikoprotein, np. gp25 i gp48 kD. Badając znaczenie zmian glikozylacyjnych dla migracji komórek, stwierdzono, że prawidłowa N-glikozylacja jest jednym z czynników koniecznych dla formowania naczyń włosowatych. Zaobserwowano, że wypustki migrujących ECs wiążą lektyny: ConA, LCA i PSA, co wskazuje, pośrednio, na wzrost zawartości frakcji oligomannozydowej, wzrost ilości reszt GlcNAc i/lub SA oraz na ekspozycję subterminalnej Gal w glikokoniugatach tych komórek. Wykazano również modulację ekspresji glikoprotein komórkowych ECs po zmianie substratu adhezyjnego [1].

W oddziaływaniach ECs ze składowymi macierzy zewnątrzkomórkowej w trakcie migracji ważną rolę odgrywiają integryny. Termin integryna odzwierciedla główną funkcję tych cząsteczek służących jako łącznik między cytoszkieletem a macierzą. Większość integryn obecnych na ECs służy bowiem do stabilnego mocowania komórek do białek macierzy międzykomórkowej, takich jak: fibronektyna, kolagen, hialuroniany czy witronektyna. Przekazywanie sygnałów przez „zajęte” receptory integrynowe, wspólnie z sygnałami pochodzącymi od receptorów dla czynników wzrostowych, warunkują przeżywalność tych komórek, a przerwanie tego kontaktu może zapoczątkować apoptozę. Również stres spowodowany przepływem krwi wpływa regulująco na ekspresję integryn, a co za tym idzie, adhezję EC do składowych macierzy komórkowej. Niektóre integryny, np. $\alpha V\beta 3$, są jednak niezbędne do prze-

mieszczania się komórek ECs w trakcie formowania nowego naczynia. Zablokowanie funkcji tej integryny, odpowiednim przeciwciałem, hamuje proces angiogenezy poprzez indukcję apoptozy w migrujących ECs [33]. Integryny pełnią również ważną rolę w procesie transmigracji leukocytów przez śródbłonek.

ROLA KOMÓREK ŚRÓDBŁONKOWYCH W ADHEZJI I TRANSMIGRACJI LEUKOCYTÓW

Znakomita większość opublikowanych do tej pory prac, dotyczących krążenia leukocytów w organizmie, a zwłaszcza interakcji ze śródbłonkiem naczyniowym, prowadzących do ich transmigracji, rozpatruje ten proces w aspekcie komórek krążących. Jest to zrozumiałe, zważywszy łatwość uzyskania do badań komórek z krwi obwodowej oraz dostępność linii komórkowych reprezentujących różne typy leukocytów.

Aby jakkolwiek leukocyt płynący z prądem krwi mógł wejść w oddziaływania adhezyjne ze śródbłonkiem, muszą zaistnieć określone warunki natury fizycznej. Krew przepływa przez duże naczynia tętnicze pod znacznym ciśnieniem, tak więc szansa przepływających komórek na bezpośredni kontakt ze ścianą naczynia jest niewielka. Dodatkowo, niepobudzone śródbłonki dużych naczyń nie mają ekspresji cząsteczek adhezyjnych niezbędnych do zapoczątkowania procesu przylegania komórek z krążenia. Obserwowane oddziaływania adhezyjne krążących komórek ze ścianą dużego naczynia mają zazwyczaj miejsce w procesach patologicznych, takich jak np. tworzenie blaszki miażdżycowej. W stanie prawidłowym, leukocyty mogą adherować tylko w miejscach, w których stres przepływu krwi obniży się na tyle, aby siły oddziaływań adhezyjnych mogły go zrównoważyć i przewyższyć. Ma to miejsce na poziomie naczyń zawłosowatych, w których panuje optymalne dla tego procesu ciśnienie, ok. 15 mm Hg (w porównaniu z 35 mm Hg we włosniczkach i ok. 90 mm Hg w małych tętniczkach).

Szczegółowy przebieg tego procesu zależy od rodzaju adherujących komórek (granulocyty/neutrofile, makrofagi czy limfocyty) i ich zróżnicowania czynnościowego (limfocyty „naiwne” vs. pamięci immunologicznej i komórki efektorowe), od lokalnej (tkankowo/narządowej) swoistości ECs, i od stopnia aktywacji obydwu partnerów adhezji [3]. Na przykład granulocyty wchodzi w oddziaływania adhezyjne ze śródbłonkiem w miejscu, w którym toczy się proces zapalny, a ich przejście do otaczających tkanek to proces jednokierunkowy. Z kolei komórki linii monocytarnej mają ograniczone zdolności reakcji z niepobudzonym śródbłonkiem. Najbardziej złożony jest proces adhezji i recyrkulacji limfocytów T i B, komórek wyspecjalizowanych w swoistej odpowiedzi odpornościowej. Nabywają one tę umiejętność dzięki procesowi recyrkulacji w organizmie, w poszukiwaniu antygeny, który są w stanie rozpoznać. Migracja naiwnych limfocytów T i B ma miejsce

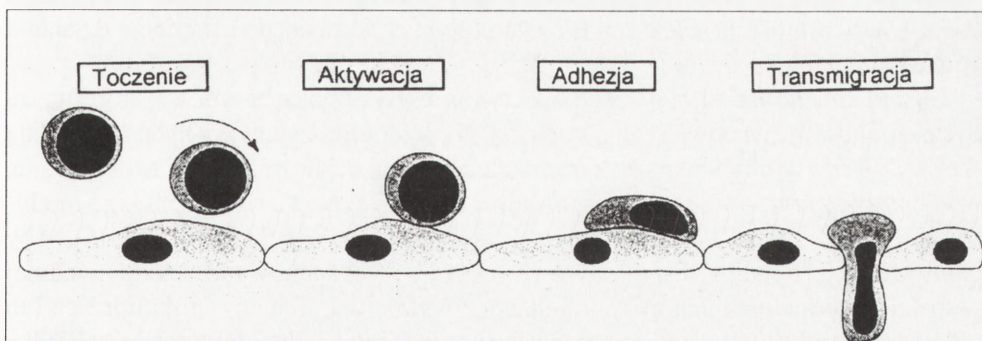
w HEVs drugorzędowych tkanek limfatycznych, takich jak węzły chłonne czy PPs. Natomiast dojrzałe limfocyty i komórki pamięci immunologicznej mają zdolność do migracji do tkanek pozalimfoidalnych (ang. *extralymphoid effector sites*) także przez płaski śródbłonek żyłek zawłosowatych [6]. Limfocyty mogą także, tak jak neutrofile i monocyty, migrować przez aktywowany śródbłonek do otaczającej tkanki w miejscu, gdzie toczy się proces zapalny.

Proces krążenia leukocytów jest precyzyjnie regulowany przez wiele czynników rozpuszczalnych. Stwierdzono, że śródbłonek produkuje i ekspozuje, w miejscu kontaktu z krążącymi komórkami, cząsteczki o właściwościach adhezyjnych, a także cytokiny i chemokiny (np. MCP-1, RANTES, IL-8a) [28]. Niektóre z cytokin produkowanych przez śródbłonek – IL-1, IL-3, IL-6, G-CSF, GM-CSF i M-CSF, poza udziałem w procesach adhezyjnych, wpływają także na proliferację i różnicowanie limfocytów T i B oraz prekursorów komórek krwiotwórczych [16, 18, 38].

Proces adhezji i transmigracji komórek uwarunkowany jest przez wzajemne rozpoznanie cząsteczek adhezyjnych ekspozowanych na powierzchni błony komórkowej obydwu partnerów tego procesu, czyli leukocytów i śródbłonek. W międzykomórkowych oddziaływaniach adhezyjnych, prowadzących do transmigracji komórek krążących, stwierdzono udział prawie wszystkich znanych rodzajów cząsteczek adhezyjnych: selektyn i ich ligandów, integryn, cząsteczek o strukturze immunoglobulinowej oraz kadheryn.

Proces wychodzenia leukocytów z naczynia można przedstawić jako sekwencję następujących po sobie wydarzeń [6, 28]:

1. *rolling* – toczenie się leukocytów po powierzchni ECs,
2. *triggering* – aktywacja ECs, przez receptory chemokinowe,
3. ścisła adhezja leukocytu do ECs,
4. transmigracja – przechodzenie leukocytu przez śródbłonek naczyńniowy (rys. 1).



RYSUNEK 1. Schemat „kaskady adhezyjnej” – procesu adhezji leukocytu do komórek śródbłonka naczyńniowego w trakcie wychodzenia z naczynia (wg [16] zmodyfikowane)

Ad. 1. W pierwszym etapie procesu adhezyjnego: toczeniu się leukocytów po powierzchni aktywowanego śródbłonka, główną rolę odgrywają selektyny. Selektyny są lektynami endogennymi, o budowie segmentowej. N-końcowy fragment ich łańcucha polipeptydowego, o aktywności lektyny, umieszczony jest na „wysięgniku” tworzonym w przypadku ludzkich selektyn L, E i P, odpowiednio, przez 2, 6 lub 9 powtarzających się segmentów białkowych, SRC (ang. *short consensus repeats*), przy czym cząsteczka selektyny P ma ponad 40 nm długości i jest jedną z najdłuższych tego rodzaju struktur [20]. Ligandy dla selektyn z reguły występują na mucynach, dużych cząsteczkach mających strukturę linearną, a na dodatek zarówno selektyny, jak i ich ligandy eksponowane są na mikrowypustkach (ang. *microvilli*) błony komórkowej, co zwiększa ich koncentrację na jednostkę powierzchni oraz ułatwia kontakt między przepływającą komórką a ECs [4, 23, 36].

W przypadku adhezji naiwnych limfocytów do niepobudzonego śródbłonka, główną rolę odgrywa selektyna L. Selektyna L jest konstytutywną składową większości krążących leukocytów. Jedynie limfocyty T pamięci i aktywowane limfocyty nie prezentują powierzchniowej selektyny L lub mają niską jej ekspresję. Po związaniu swojego liganda prezentowanego przez komórki śródbłonka, selektyna L jest odcinana z powierzchni komórki przez endoproteazy, a jej funkcje w dalszych etapach procesu przylegania przejmują inne cząsteczki adhezyjne, głównie integryny.

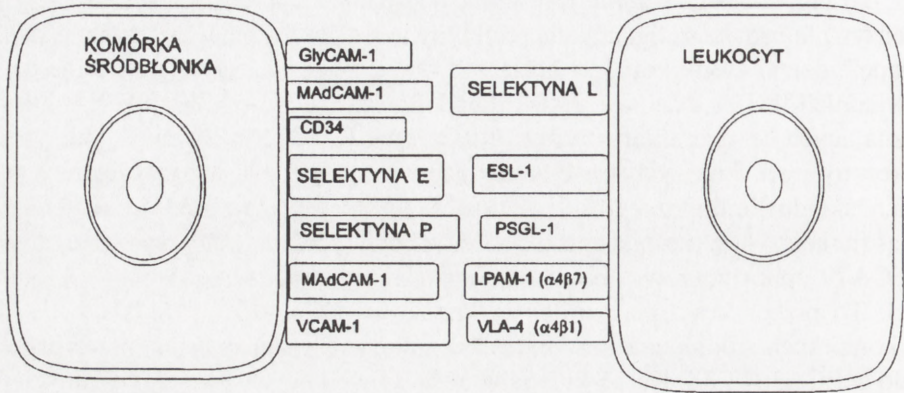
Na aktywowanych komórkach śródbłonka występują selektyny E i P. Selektyna P jest cząsteczką „szybkiego reagowania”. Składowana w ciałkach Weibel-Palade’a, w przypadku aktywacji ECs np. trombiną, histaminą lub produktami rozpadu komplementu, jest ona transportowana, w ciągu kilku minut, na powierzchnię komórki. Ekspresja selektyny E następuje w wyniku syntezy *de novo*, po aktywacji ECs cytokinami. Aktywatorami ECs są zazwyczaj cytokiny stanu zapalnego, m. in. IL-1 czy TNF, a także LPS. Selektyna E pojawia się na powierzchni komórek dopiero po godzinie od zadziałania bodźca, a najwyższy poziom jej ekspresji obserwuje się po ok. 4 godz., po czym, w ciągu 24 godzin, następuje powrót do stanu wyjściowego, chyba, że po aktywacji ECs w środowisku pojawi się dodatkowo interferon INF γ , wtedy produkcja selektyny E może utrzymywać się aż do ustąpienia działania bodźca.

Ligandami dla wszystkich trzech selektyn są reszty oligosacharydowe, które muszą być eksponowane na powierzchni komórki. Na wzór glikozylacyjny ligandu składają się zwykle reszty oligocukrowe z terminalną fukozą, usjalowane i/lub sulfonowane, w większości związane z antygenem sjalo Lewis X (sLe^x, CD15s) i/lub jego modyfikacjami, np. Lewis X, sulfo Lewis X czy sjalo Lewis A [11, 14, 35, 36]. Aby pełnić funkcję liganda, reszty cukrowe muszą być eksponowane w odpowiedniej gęstości, na odpowiednich glikoproteinach, zwykle typu mucyny, glikolipidach lub glikozaminoglikanach. Główną cząsteczką noszącą ligand dla selektyny P jest PSGL-1, (ang. *P-selectin glycoprotein ligand*), glikoproteina obecna na leukocytach [25], która rozpoznawana jest także, chociaż z niższym powinowactwem, przez selektynę

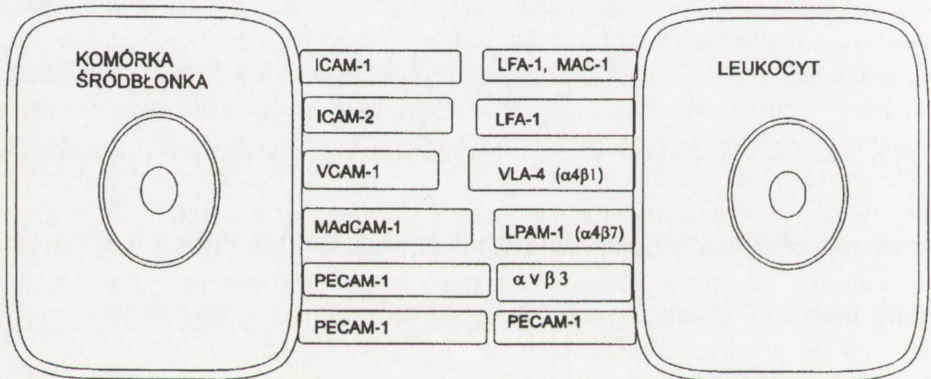
E. Z kolei najlepiej poznaną cząsteczką partnerską dla selektyny E jest glikoproteina ESL-1 (ang. *E-selectin ligand*), również występująca na leukocytach. Szczególnie intensywnie badane są ligandy dla selektyny L. Stanowią one w organizmie swoistą „mapę”, dzięki której komórki krążące z krwią mogą precyzyjnie docierać do odpowiednich tkanek i narządów. Jak dotąd, opisano jedynie kilka przeciwciał, rozpoznających te charakterystyczne glikoproteiny, które nazwano „adresynami”. Adresyny warunkują wybiórcze zatrzymanie limfocytów T w odpowiednich miejscach układu limfatycznego lub w tkance, w których mają one do „wykonania” jakąś funkcję. Najwcześniej opisaną adresyną był, rozpoznawany przez przeciwciało MECA79, epitop cukrowy obecny na mysich HEVs obwodowych węzłów chłonnych [31]. To przeciwciało reaguje także, krzyżowo, z komórkami ludzkimi. Z kolei na komórkach śródbłonna PPs znaleziono adresynę, rozpoznawaną przez przeciwciało MECA367 [30]. Komórki śródbłonnków obwodowych węzłów chłonnych oraz PPs mają wyraźnie zróżnicowaną ekspresję tych adresyn. W tkance limfatycznej węzłów krezkowych występuje ekspresja obydwu obu adresyn. Na śródbłonku obwodowych węzłów chłonnych i w tkance limfatycznej migdałków znaleziono także glikoproteinę VAP-1, ale jej funkcja jako adresyny nie jest jeszcze dowiedziona [24]. Jak dotychczas, opisano kilka cząsteczek o właściwościach adresyn. Adresynami rozpoznawanymi przez przeciwciało MECA79, charakterystycznymi dla obwodowych węzłów limfatycznych są: GlyCAM-1, CD34 i Sgp200. Adresyną charakterystyczną dla tkanki limfatycznej jamy otrzewnej – PPs i węzłów krezkowych jest reagująca z przeciwciałem MECA367 cząsteczka MAdCAM-1 (ang. *mucosal cell adhesion molecule 1*). Adresyny, podobnie jak opisane powyżej cząsteczki będące ligandami dla selektyn E i P, są zazwyczaj glikoproteinami typu mucyny, zdolnymi do pełnienia funkcji adresyny tylko pod warunkiem posiadania odpowiedniego wzoru glikozylacyjnego. Poszukiwania adresyn na powierzchni HEVs miały na celu znalezienie fizycznej podstawy od dawna znanego zjawiska osiedlania się i migracji do tkanek różnych subpopulacji limfocytów. Wiadomo było, że limfocyty naiwne migrują inaczej niż limfocyty pamięci, że istnieją subpopulacje limfocytów, które wykazują znaczną preferencję do migracji do skóry czy do blaszki właściwej błony śluzowej (łac. *lamina propria*) jelita [3, 4, 6]. Ponieważ mimo usilnych poszukiwań znaleziono niewiele adresyn, przyjęto w chwili obecnej hipotezę, że swoistość procesu adhezji jest warunkowana przez wzajemne oddziaływanie kilku receptorów, w tym także adresyn, występujących w określonej sekwencji czasowej, na komórkach partnerskich (rys. 2a).

Ad. 2. Stosunkowo słabe oddziaływania lektynowe: selektyna/oligocukier są odwracalne i w trakcie kilku do kilkunastu sekund toczenia się leukocyta po powierzchni ECs podejmowana jest przez komórki „decyzja”, czy proces adhezji będzie kontynuowany. Jeżeli cząsteczki na wzajemnie rozpoznających się komórkach przekażą do wnętrza komórki informacje o swoistości reakcji, to w obecności czynników wspomagających – chemokin następuje aktywacja cząsteczek z grupy integryn,

A



B



RYSUNEK 2. Pary: receptor - ligand na partnerskich komórkach uczestniczących w w procesie transmigracji leukocytów: A – etap wstępnego toczenia się leukocyta – *rollingu*, B – etap ścisłej adhezji i transmigracji

na powierzchni adherujących leukocytów. Aktywację promuje związanie receptora chemokinowego. Większość chemokin jest gromadzona na glikokalix komórek w postaci związanej z z heparyną. Zapewnia to utrzymywanie lokalnej koncentracji oraz tworzenie gradientów stężeń chemokin. Receptory dla chemokin z grupy CXC występują głównie na neutrofilach, bazofilach oraz na komórkach spoza układu krwiotwórczego, a dla chemokin zaliczanych do grupy CC- na monocytach i niektórych subpopulacjach limfocytów T [28, 29]. Stosunkowo niewiele wiadomo natomiast o chemokinach swoistych dla limfocytów, które byłyby w stanie wywołać podobną, jak w przypadku neutrofilów i makrofagów, aktywację integryn. Dopiero w 1998 r. opisano SLC (ang. *secondary lymphoid tissue chemokine*), która wydaje się działać wybiórczo na limfocyty T [34].

Ad. 3. Aktywacja integryn na powierzchni komórek krążących jest warunkiem koniecznym, by mogły one silnie adherować do komórek śródbłonna. Najważniejszą rolę w oddziaływaniu z ECs mają leukocytarne integryny zawierające łańcuch typu β_2 , tzn. LFA-1 (CD11a/CD18) i Mac-1 (CD11b/CD18) oraz integryny zawierające łańcuch α_4 : VLA-4 oraz LPAM-1. Kontrreceptorami dla leukocytarnych integryn posiadających podjednostkę β_2 są dwie cząsteczki z nadrodziny immunoglobulin: ICAM-1 i ICAM-2. Występują one na większości niestymulowanych ECs. Obydwie wiążą się z cząsteczką LFA-1, a ICAM-1 wiąże się także z Mac-1. Po stymulacji komórek śródbłonna cytokinami, np. IL-1 i/lub TNF, lub INF γ , ekspresja ICAM-1 znacząco wzrasta, natomiast poziom ekspresji ICAM-2 pozostaje bez zmian. Po aktywacji, ECs może prezentować jeszcze dwie cząsteczki z nadrodziny immunoglobulin: VCAM-1 i MAdCAM-1. Ekspresjonowany pod wpływem przewlekłego stanu zapalnego VCAM-1 reaguje swoiście z leukocytarną integryną – VLA-4; może także, chociaż słabiej, reagować z LPAM-1, która jest z kolei głównym kontrreceptorem dla cząsteczki MAdCAM-1, będącej, jak pamiętamy, również ligandem dla selektyny L (rys. 2b).

Ad. 4. Po silnej adhezji komórek krążących do ECs, za pomocą indukowanych oddziaływań integrynowych, następuje transmigracja, czyli przechodzenie przez ECs do otaczających tkanek. Zjawisko to jest stosunkowo słabo poznane. Do niedawna sugerowano, na podstawie analizy skrawków histologicznych, że komórki migrują przez warstwę śródbłonna w drodze transcytozy, czyli poprzez cytoplazmę ECs. Obecnie przyjmuje się, że transmigracja odbywa się w miejscu kontaktu pomiędzy sąsiadującymi ECs, z wyjątkiem zatok śledzionowych i wątroby, gdzie występują śródbłonna okienkowe. Wykazano, że w miejscach toczącego się procesu zapalnego trombina i histamina poza aktywacją ECs, której efektem jest wystawienie na powierzchnię komórki selektyny P, wywołują także destabilizację ścisłych połączeń między komórkami śródbłonna. Kluczową rolę odgrywają na tym etapie ekspresjonowane na powierzchni ECs cząsteczki ICAM-1 i PECAM-1 [2, 7]. Tak jak w poprzednim etapie ścisłego przylegania, reakcja integryn komórek krążących z ICAM-1 jest warunkiem koniecznym do transmigracji. Dowodu wprost dostarczyły badania limfocytów od pacjentów z rzadkim defektem immunologicznym opisanym jako LAD-1 (ang. *leukocyte adhesion deficiency*). Jest to schorzenie, objawiające się bardzo ciężkimi, częstymi infekcjami u pacjentów, których neutrofile wskutek defektu (zaburzonej glikozylacji) łańcucha β_2 , wspólnego dla integryn LFA-1 i MAC-1, pozbawione są zdolności do swoistej reakcji z ICAM-1. Neutrofile tych pacjentów, dzięki prawidłowej ekspresji selektyn i ich ligandów, mogą się efektywnie wiązać z aktywowanym śródbłonkiem. Nie mogą jednak wychodzić z naczyń i gromadzić się w miejscu stanu zapalnego. W procesie przechodzenia przez EC ważną rolę odgrywa także białko z rodziny immunoglobulin PECAM-1. Badając transmigrację leukocytów stwierdzono, że cząsteczka ta bierze udział w dwóch typach reakcji: homofilowej, pomiędzy dwiema cząsteczkami PECAM-1 lub hete-

rofilowej, gdy cząsteczka ta reaguje ze swoistym receptorem, którym okazała się integryna $\alpha v \beta 3$. PECAM-1 występuje na większości leukocytów, tzn. na neutrofilach, monocytach, na niektórych subpopulacjach limfocytów oraz na płytkach krwi i ECs. W przypadku tych ostatnich stwierdzono, że PECAM-1 jest zlokalizowane w miejscach kontaktu między sąsiadującymi komórkami. Sugeruje się więc, że oddziaływania homofilowe między cząsteczkami PECAM-1 tworzą szczelne połączenie pomiędzy sąsiadującymi komórkami śródbłonna stanowiąc równocześnie rodzaj „molekularnego zamka błyskawicznego” używanego przez komórki z krążenia, które weszły w ścisły kontakt z EC do „przeciskania” się pomiędzy ECs. Na rysunku 2 zestawiono schematycznie najważniejsze pary: receptor - ligand, na partnerskich komórkach biorących udział w oddziaływaniach komórki śródbłonna z limfocytom.

UDZIAŁ ŚRÓDBŁONKÓW W PROCESIE PRZERZUTOWANIA NOWOTWORÓW

Okazało się, że mechanizmy oddziaływań adhezyjnych ze śródbłonnkami oraz transmigracji, stosowane przez leukocyty, mogą być również używane przez przerzutujące komórki nowotworowe [13, 27]. Chodzi zwłaszcza o etap przylegania komórek nowotworowych do śródbłonna naczyniowego, co umożliwia im wyjście z naczynia i zasiedlenie określonej tkanki docelowej. Lokalizacja przerzutów często nie jest przypadkowa: niektóre typy nowotworów preferencyjnie przerzutują do pewnych narządów lub tkanek [21]. Uważa się, że wybiórczość ich lokalizacji zależy od dwóch czynników: po pierwsze, zgodnie z hipotezą *seed and soil* (ziarna i gleby) ogłoszoną w 1889 roku przez angielskiego patologa Stephena Pageta [19], od obecności odpowiedniego środowiska okołokomórkowego, wspierającego wzrost danego rodzaju nowotworu, a po wtóre, od zdolności do zatrzymania się komórki nowotworowej w określonym miejscu. Jesteśmy jeszcze daleko od zrozumienia, w jaki sposób odbywa się swoiste rozpoznanie komórek i następnie zapoczątkowanie procesu transmigracji. Istnieją dowody, że zapoczątkowanie efektywnych oddziaływań adhezyjnych komórek nowotworowych z komórkami śródbłonkowymi zależy w znacznej mierze od pochodzenia tkankowego komórki śródbłonkowej. Szeroko prowadzone badania zmierzają do identyfikacji cząsteczek adhezyjnych i/lub ich ligandów odpowiedzialnych za obserwowane preferencyjne oddziaływania adhezyjne. Potencjalnymi kandydatami są tu zarówno adresyny, jak również cząsteczki o charakterze lektyn endogennych, obecne na komórkach śródbłonnków oraz ich ligandy oligocukrowe, eksponowane przez komórki nowotworowe. Bliższe poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za międzykomórkowe oddziaływania adhezyjne pozwoli być może na racjonalne planowanie antyadhezyjnej terapii przeciwn przerzutowej i przeciwn przerzutowej.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AUGUSTIN-VOSS HG, PAULI BU. Migrating endothelial cells are distinctly hyperglycosylated and express specific migration-associated cell surface glycoproteins. *J Cell Biol* 1992; **119**: 483–491.
- [2] BIANCHI E, BENDER JR, BLASI F, PARDI R. Through and beyond the wall: late steps in leukocyte transendothelial migration. *Immunol Today* 1997; **18**: 586–591.
- [3] BRADLEY LM, WATSON SR. Lymphocyte migration into tissue: the paradigm derived from CD4 subsets. *Curr Op Immunol* 1996; **8**: 312–320.
- [4] BRANDTZAEG P, FARSTAD IN, HARALDSEN G. Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track. *Immunol Today* 1999; **20**: 267–277.
- [5] BROULAND JP, GILBERT MA, BONNEAU M, PIGNAUD G, SOLIER BD, DROUET L. Macro and microheterogeneity in normal endothelial cells: differential composition of luminal glycocalyx and functional implications. *Endothelium* 1999; **6**: 251–262.
- [6] BUTCHER EC, PICKER LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996; **272**: 60–66.
- [7] DEJANA E, CORADA M, LAMPUGNANI MG. Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J* 1995; **9**: 910–918.
- [8] ELENIUS K, VAINIO S, LAATO M, SALMIVIRTA M, THESLEFF I, JALKANEN M. Induced expression of syndecan in healing wounds. *J Cell Biol* 1991; **114**: 585–595.
- [9] GIRARD J-P, SPRINGER TA. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol Today* 1995; **16**: 449–457.
- [10] GOWANS JL. The recirculation of lymphocytes from blood to lymph in the rat. *J Physiol* 1959; **146**: 54–67.
- [11] HEMMERICH S, BUTCHER EC, ROSEN SD. Sulfation-dependent recognition of high endothelial venules (HEV)-ligands by L-selectin and MECA 79, and adhesion-blocking monoclonal antibody. *J Exp Med* 1994; **180**: 2219–2226.
- [12] HEWETT PW, MURRAY JC. Human microvessel endothelial cells: isolation, culture and characterization. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1993; **29A**: 823–830.
- [13] JAIN RK, KOENIG GC, DELLIAN M, FUKUMURA D, MUNN LL, MELDER RJ. Leukocyte-endothelial adhesion and angiogenesis in tumors. *Cancer and Metastasis reviews* 1996; **15**: 195–204.
- [14] LASKY LA. Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Annu Rev Biochem* 1995; **64**: 113–139.
- [15] LATHEY JL, WILEY CA, VERITY MA, NELSON JA. Cultured human brain capillary endothelial cells are permissive for infection by human cytomegalovirus. *Virology* 1990; **176**: 266–273.
- [16] MANTOVANI A, DEJANA E. Endothelium. [w] Delves PJ, Roitt JM [red.] *Encyclopedia of Immunology*, San Diego, London: Academic Press 1998: 802–806.
- [17] MC CARTHY SA., KUZU I, GATTER KC, BICKNELL R. Heterogeneity of the endothelial cell and its role in organ preference of tumour metastasis. *TiPS* 1991; **12**: 462–467.
- [18] NILSEN EM, JOHANSEN FE, JAHNSEN FL, LUNDIN KE, SCHOLZ T, BRANDTZAEG P, HARALDSEN G. Cytokine profiles of cultured microvascular endothelial cells from the human intestine. *Gut* 1998; **42**: 635–642.
- [19] PAGET S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1889; **i**: 571–573.
- [20] PATEL KD, NOLLERT MU, MC EVER R. P-selectin must extend a sufficient length from the plasma membrane to mediate rolling of neutrophils. *J Cell Biol* 1995; **131**: 1893–1902.

- [21] PAULI BU, LEE C. Organ preference of metastasis. The role of organ-specifically modulated endothelial cells. *Lab Invest* 1988; **58**: 379–387.
- [22] PILI R, CHANG J, PARTIS RA, MUELLER RA, CHREST FJ, PASSANITI A. The alpha-glucosidase I inhibitor castanospermine alters endothelial cell glycosylation, prevents angiogenesis, and inhibits tumor growth. *Cancer Res* 1995; **55**: 2920–2926.
- [23] ROSEN SD, BERTOZZI CR. Leukocyte adhesion: Two selectins converge on sulphate. *Current Biology* 1996; **6**: 261–264.
- [24] SALMI M, JALKANEN S, ANDREW DP, BUTCHER EC. Dual binding capacity of mucosal immunoblasts to mucosal and synovial endothelium in humans: dissection of the molecular mechanisms. *J Exp Med* 1995; **181**:137–149.
- [25] SAKO D, CHANG XJ, BARONE KM, VACHINO G, WHITE HM, SHAW G, VELDMAN GM, BEAN KM, AHERN TJ, FURIE B. Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell* 1993; **75**:1179–1186.
- [26] SHIMA DT, SAUNDERS KB, GOUGOS A, D'AMORE PA. Alterations in gene expression associated with changes in the state of endothelial differentiation. *Differentiation* 1995; **58**: 217–226.
- [27] SIEGEL G, MALMSTEN M. The role of the endothelium in inflammation and tumor metastasis. *Int J Microcirc* 1997; **17**:257–272.
- [28] SPRINGER TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 1995; **57**: 827–872.
- [29] STOKŁOSA T. Chemokines – the new family of inflammatory cytokines. *Central-European Journal of Immunology* 1997; **22**: 69–77.
- [30] STREETER PR, BERGEL, ROUSE BTN, BARGATZER RF, BUTCHER EC. A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing. *Nature* 1988; **331**:41–46.
- [31] STREETER PR, ROUSE BTN, BARGATZER RF, BUTCHER EC. Immunohistologic and functional characterization of a vascular addressin involved in lymphocyte homing into peripheral lymph nodes. *J Cell Biol* 1988; **107**: 1853–1862.
- [32] SZALA S, RADZIKOWSKI C. Podłoże molekularne angiogenezy nowotworów. *Nowotwory* 1997; **47**: 1–19.
- [33] STROMBLAD S, CHERESH DA. Integrins, angiogenesis and vascular cell survival. *Chem Biol* 1996; **3**: 881–885.
- [34] TANGEMANN K, GUNN MD, GIBLIN P, ROSEN SD. A high endothelial cell-derived chemokine induces rapid, efficient, and subset-selective arrest of rolling T lymphocytes on a reconstituted substrate. *J Immunol* 1998; **161**: 6330–6337.
- [35] VARKI A. Cell adhesion in vascular biology. Selectin ligands: will the real ones stand up? *J Clin Invest* 1997; **99**: 158–162.
- [36] VESTWEBER D, BLANKS JE. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* 1999; **79**: 181–213.
- [37] WEBER E, LÖRENZONI P, LOZZI G, SACCHI G. Cytochemical differentiation between blood and lymphatic endothelium: bovine blood and lymphatic large vessels and endothelial cells in culture. *J Histochem Cytochem* 1994; **8**: 1109–1115.
- [38] YAMAGUCHI H, ISHII E, TASHIRO K, MIYAZAKI S. Role of umbilical vein endothelial cells in hematopoiesis. *Leuk Lymphoma* 1998; **31**:61–69.

Redaktor prowadzący – Jan Żeromski

Otrzymano: 10.12. 1999 r.

Przyjęto: 11.02. 2000 r.

Adres autora: ul. Rudolfa Weigla 12, 53114 Wrocław

Email: danuta@immuno.iitd.pan.wroc.pl

TWORZENIE I ROZPAD KOMPLEKSU KOHEZYJNEGO CHROMATYD SIOSTRZANYCH*

FORMATION AND DECAY OF SISTER CHROMATID COHESION COMPLEX

Anna KURLANDZKA

Zakład Genetyki, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

Streszczenie: Kohezja chromatyd siostrzanych jest niezbędna do zachowania dokładnej segregacji chromosomów w cyklu komórkowym. W ostatnich latach zidentyfikowano kohezynę – kompleks białek odpowiedzialnych za utrzymanie kohezji mitotycznej do momentu wejścia komórki w anafazę. Zidentyfikowano również niektóre białka indukujące i regulujące rozpad kompleksu kohezyjnego. Głównymi regulatorami są: APC – wielopodjednostkowa ligaza ubikwityna - białko, Pds1p – inhibitor anafazy oraz Esp1p – separyna, bezpośrednio wpływająca na rozpad kohezyny.

(*Postępy Biologii Komórki 2000; 27: 261–272*)

Słowa kluczowe: mitoza, chromosomy, chromatydy, kohezja

Summary: Sister chromatid cohesion is essential for accurate chromosome segregation in the cell cycle. Recently a cohesin complex has been identified, required for establishing and maintaining mitotic cohesion up to the metaphase to anaphase transition. A few proteins inducing and regulating cohesin complex destruction have also been identified: APC – a multisubunit protein – ubiquitin ligase, Pds1p – anaphase inhibitor, and Esp1p – separase, directly influencing cohesin destruction.

(*Advances of Cell Biology 2000; 27: 261–272*)

Key words: mitosis, chromosomes, chromatids, cohesion

WSTĘP

Podział mitotyczny każdej komórki eukariotycznej poprzedzony jest duplikacją chromosomów, rozejściem się siostrzanych chromatyd i ich segregacją do prze-

*Praca dofinansowana przez Komitet Badań Naukowych: grant 6P04A 050 14

ciwnych biegunów. Bezbłędna segregacja chromosomów zależy od precyzyjnej koordynacji zdarzeń w cyklu komórkowym. W fazie S cyklu dochodzi do replikacji chromosomów i powstania połączeń między siostrzanymi chromatydami na całej ich długości. Połączenie to jest utrzymywane do momentu, gdy wszystkie chromosomy zajmą odpowiednią pozycję we wrzecionie mitotycznym. Do kinetochorów siostrzanych chromatyd zostają przyłączone mikrotubule, zaś przeciwne końce tych mikrotubul są związane z przeciwnymi biegunami wrzeciona mitotycznego (centrosomami). Podczas przejścia z metafazy do anafazy kohezja między chromatydami zanika, co pozwala na ich rozsuniecie przez mikrotubule w kierunku biegunów, odległość między biegunami nie zmienia się, mikrotubule się skracają. Dalsze rozsuniecie jest osiągane przez odsunięcie się od siebie biegunów komórkowych (centrosomów) i rozciągnięcie wrzeciona [32].

Wiadomo obecnie, że należy rozróżniać niezależne zespoły białek odpowiedzialnych za kohezję i rozpad chromatyd i kohezję oraz rozpad regionu centromerycznego oraz że istnieją związki między kohezją i kondensacją chromosomów i kilka poziomów regulacji tych procesów.

Przedstawione w dalszej części informacje dotyczą głównie komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* oraz zwierzęcych.

KOHEZJA CHROMATYD W MITOZIE

Skoordynowane ruchy i segregacja chromosomów do przeciwnych biegunów komórkowych budziły zainteresowanie już w początkach biologii komórki. Świadczą o tym obserwacje Strasburgera i Fleminga poczynione około 1880 roku, opisujące wygląd i zachowanie się chromosomów na poszczególnych etapach mitozy. Następne ponad 100 lat przyniosło pewien postęp w poznaniu szczegółów cyklu komórkowego, zaś ostatnie kilka lat intensywnych badań sprawiło, że zaczynamy rozumieć mechanizmy mitozy, a w szczególności – tworzenia i rozpadu kompleksu kohezyjnego chromatyd.

Dwie cząsteczki DNA powstałe w wyniku replikacji tworzą kompleksy z białkami i ulegają zwinięciu. Niektóre z tych białek są odpowiedzialne za równe ułożenie i spójne połączenie siostrzanych chromatyd na całej ich długości, do momentu wejścia komórki w anafazę, kiedy to dochodzi do ich rozdzielenia. Kohezja chromatyd musi być utrzymana w czasie, gdy chromosomy ulegają kondensacji i układają się w płytce metafazalnej (płaszczyźnie równikowej) wrzeciona mitotycznego. Natomiast precyzyjna i zsynchronizowana segregacja chromosomów jest jednym z warunków zapobieżenia aneuploidyacji i genetycznej niestabilności, które mogą doprowadzić do degeneracji i śmierci komórki. Wydaje się również, że kohezja chromatyd ułatwia rekombinacyjną naprawę DNA.

W momencie wejścia w anafazę kohezja musi szybko zaniknąć, aby siostrzane chromatydy mogły się rozdzielić i podążyć do przeciwnych biegunów wrzeciona.

Wiadomo dziś, że zanik kohezji nie jest wynikiem ciągnięcia chromatyd przez mikrotubule, lecz jest złożonym procesem wymagającym skorelowania wielu poziomów regulacji.

Jedną z pierwszych obserwacji dotyczących mechanizmu separacji chromatyd było to, że wymaga on udziału topoizomeraz typu II; mutacje w genie *top2*¹ w *Schizosaccharomyces pombe* powodowały zaburzenia w kondensacji chromosomów i rozdzielaniu chromatyd [45, 46]. Stosunkowo wcześniej zaobserwowano, że separacja chromatyd zależy od ubikwityno-zależnej proteolizy nieznanymi białek. Uważano również, że rozdzielanie się chromatyd jest niezależne od proteolizy cyklin mitotycznych [17, 18, 43].

Postęp w wyjaśnianiu składu i mechanizmów rozpadu kompleksu kohezyjnego był powolny z tego powodu, że w tych organizmach, w których można było łatwo prowadzić obserwacje cytologiczne, np. w komórkach roślinnych i dużych komórkach zwierzęcych, są trudności z analizą genetyczną, tj. nie jest łatwo otrzymać i utrzymać przy życiu mutanty zaburzone w procesach mitozy. Z kolei dobrze rozpracowane genetycznie drożdże nie są bardzo wygodne do tego typu obserwacji cytologicznych ze względu na to, że w odróżnieniu od innych organizmów mają relatywnie nieduże chromosomy i mitozę wewnątrzjądrową, tj. przebiegającą bez rozpadu otoczki jądrowej. Niemniej jednak, wraz z rozwojem technik mikroskopowych i nowych metod biologii komórki, to właśnie dzięki drożdżom dokonano znaczącego postępu w wyjaśnieniu wielu szczegółów procesu mitozy. Znakowanie białek wrzeczona mitotycznego i białek związanych z różnymi obszarami chromosomów za pomocą GFP (*green fluorescent protein*) pozwoliło na dokonywanie *in vivo* obserwacji następstw zaburzeń mitotycznych wywołanych konkretnymi mutacjami.

KOHEZYNA

Białka zaangażowane w kohezę chromatyd zidentyfikowano w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*, zaś niektóre ich homologi są obecne w *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster* oraz u *Xenopus laevis* i innych kręgowców; wiele z nich wymieniono w tabeli 1. W literaturze często spotykane są podwójne nazwy tych białek lub genów je kodujących, były one bowiem niezależnie odkrywane i nazywane przez różne zespoły. Największy i najszybszy postęp w analizie składu i sposobu funkcjonowania kompleksu kohezyjnego odnotowano w przypadku drożdży. Kompleks kohezyjny *S. cerevisiae*, zwany kohezyną, utrzymujący chromatydy ze sobą w fazie G₂ składa się z co najmniej 4 podjednostek. Tworzą go białka z rdziny SMC (od: *structural maintenance of chromosomes*): Smc1p i Smc3p oraz SCC (od: *sister chromatid cohesion*): Scc1p (Mcd1p) i Scc3p.

¹Sposób zapisywania nazw genów i białek przez nie kodowanych nie jest ujednoczony. W niniejszej publikacji zastosowano pisownię w formie przyjętej dla danego organizmu.

TABELA 1. Najlepiej poznane białka zaangażowane w kohezję i rozdzielanie chromatyd

Białko	Homologi	Funkcja białka
Scclp (<i>S. cerevisiae</i>)	XRAD2 (<i>XENOPUS</i>) Rad21 (<i>S. pombe</i>)	składnik kohezyny, u drożdży – oddysocjowuje, u <i>Xenopus</i> trwale związany z chromosomami
Smc1p (<i>S. cerevisiae</i>)	XSMC1 (<i>Xenopus</i>)	zaangażowane w kohezję, kondensację chromosomów, rekombinację
Smc3p(<i>S. cerevisiae</i>)	XSMC3 (<i>Xenopus</i>)	jak powyżej
p155 (<i>Xenopus</i>)	?	składnik kohezyny u <i>Xenopus</i>
p95 (<i>Xenopus</i>)	?	jak powyżej
Scs2p(<i>S. cerevisiae</i>)	Mis4 (<i>S. pombe</i>)	białko chromosomowe, ale poza kohezyną, zanika w metafazie
Mis6 (<i>S. pombe</i>)	?	kohezja centromerów ?
MEI-S332 (<i>Drosophila</i>)		kohezja centromerów, obecne w centromerach mitotycznych i mejotycznych
Cut2 (<i>S. pombe</i>)	Pds1p (<i>S. cerevisiae</i>)	inhibitor anafazy, aktywator Cut1/Esp1
Cut1 (<i>S. pombe</i>)	Esp1p (<i>S. cerevisiae</i>)	promuje rozdzielanie chromatyd

Pierwsze białko SMC zostało zidentyfikowane w *S. cerevisiae* w roku 1993 przez Strunnikova i wsp. [40] jako niezbędne podczas podziału jądra. W ciągu następnego roku znaleziono wiele białek z tej rodziny i stwierdzono, że występują one powszechnie, także w bakteriach, co sugerowało, że mogą być odpowiedzialne za utrzymanie struktury nukleoprotein i musiały występować u jakiegoś wspólnego przodka wszystkich żywych organizmów [16, 38, 39]. Białka z rodziny SMC mają aktywność ATP-az i wspólny plan budowy. Część N-końcowa zawiera motyw wiązania nukleotydów (ang. *P-loop motif*), część centralna – dwa długie obszary – α -helikalne połączone nie tworzącą helisy sekwencją „zawiasową” (*hinge*) [14], zaś część C-końcowa – unikalne, konserwowane ewolucyjnie sekwencje nazywane DA box, odpowiedzialne za wiązanie z DNA. Motyw N-końcowy jest obecny w sekwencjach wielu białek, o których wiadomo, że ich aktywność biologiczna wymaga zużycia ATP [33]. Są to m.in. białka zaangażowane w reperację i rekombinację DNA w *Escherichia coli* i w drożdżach, np. sbcC [28] i Rad50p [1], a także białka motoryczne – kinezy i miozyny [15,31]. Uważa się, że oprócz współtworzenia kompleksu kohezijnego – białka SMC biorą udział w kondensacji chromosomów. Wraz z innymi białkami tworzą one kompleks – kondensynę, bezpośrednio wiążący się z DNA. Wiązanie z DNA jest ATP-zależne, zaś białka wiążą się w ilościach stechiometrycznych [16, 37]. Bardzo ciekawą, choć na razie

unikalną, gdyż dotyczy jedynie *Caenorhabditis elegans*, cechą homologów białek SMC jest ich udział w globalnej regulacji ekspresji genów na poziomie chromosomalnym [3]. Kompleks kondensyna jest w tym wypadku odpowiedzialny za zahamowanie transkrypcji genów położonych na chromosomie X osobników hermafrodytycznych [35].

Białka tworzące rodzinę SCC nie są do siebie podobne i nie można przewidzieć ich funkcji na podstawie sekwencji. Nie wszystkie białka z grupy SCC są bezpośrednio zaangażowane w tworzenie kompleksu kohezyjnego; na przykład *Scs2* jest potrzebne do zasocjowania kohezyny z chromosomem. Nie zostało dotąd ustalone, w jaki sposób białka SCC oddziałują w kompleksie z białkami SMC. Nie ma również bezpośrednich dowodów, że cały kompleks kohezyna stanowi bezpośrednie połączenie między chromatydami, gdyż w istocie siostrzane chromatydy mogą być utrzymywane razem wyłącznie przez heterodimery białek SMC [27], zaś białka SCC pełnią rolę uzupełniającą. Białka o silnej homologii do białek z rodziny SCC *S. cerevisiae* znaleziono w *S. pombe* (jest to np. produkt genu *rec11*, konieczny do zajścia rekombinacji mejozy [21]) i u ssaków (są to słabo poznane jądrowe stromaliny, występujące w komórkach erytropoetycznych [2]).

W *S. cerevisiae* zidentyfikowano ponadto dodatkowe białko *Eco1*, nie będące składnikiem kohezyny. Jest ono potrzebne do ustanowienia i utrzymywania kohezji w fazie S, lecz nie w fazach G_2 i M [44].

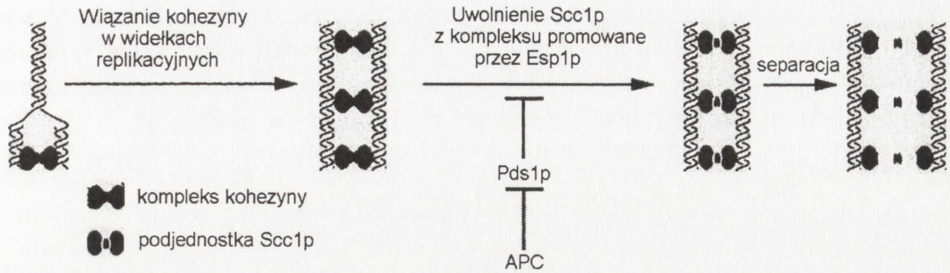
Badania na oocytach *Xenopus*, z zastosowaniem inaktywacji odpowiednich homologów kohezyn przez przeciwciała (*immunodepletion*), potwierdziły rolę kompleksu kohezyjnego i wykazały niezależność procesów kohezji i kondensacji chromosomów [16]. Okazało się jednak, że kompleks kohezyjny złożony z homologów białek drożdżowych funkcjonuje w *Xenopus* tylko w chromatynie interfazowej, natomiast w czasie mitozy za utrzymanie kohezji chromatyd odpowiedzialne są jakieś inne białka [22]. W odróżnieniu od drożdży poziom odpowiedników białek *Scs1* i *Scs3* u *Xenopus* pozostaje niezmienny w cyklu komórkowym, podczas gdy zniknięcie białka *Scs1* z kompleksu kohezyjnego *S. cerevisiae* jest w zasadzie początkiem rozpadu tego kompleksu i wejścia komórek w anafazę. Sugeruje to, że w komórkach zwierzęcych mogą istnieć 2 typy wiązań pomiędzy chromatydami siostrzanymi: stabilne połączenie powstałe w czasie replikacji DNA i utrzymujące się przez pozostałą część interfazy oraz inne, mniej stabilne połączenie ustanawiane podczas wchodzenia komórek w mitozę.

Wprawdzie nie wiadomo do końca, czy to właśnie kompleks kohezyna bierze bezpośredni udział w tworzeniu konkretnych wiązań utrzymujących ze sobą chromatydy siostrzane, ustalono jednak, że przejściu od metafazy do anafazy towarzyszy nagłe zniknięcie z chromosomu podjednostki kompleksu – białka *Scs1* [24].

REGULACJA ROZPADU KOMPLEKSU KOHEZYJNEGO

Od pewnego czasu wiadomo było, że wejściu komórek w mitozę towarzyszy gwałtowna degradacja cyklin typu B [8, 30]. Proteoliza tych cyklin poprzedzona jest ich ubikwitinacją przeprowadzaną przez kompleks APC (ang. *anaphase promoting complex*), zwany też cyklosomem [42]. Ten wielopodjednostkowy kompleks mający aktywność ligazy ubikwityna-białko jest zlokalizowany w jądrze komórkowym. Wszystkie znane do tej pory substraty reakcji przeprowadzanej przez APC zawierają dziewięcioaminokwasowy motyw zwany *destruction box* [12]. Usunięcie tego motywu prowadzi do zakumulowania w komórce niedegradowalnych białek. Destrukcja cyklin B towarzyszy wejściu komórek w anafazę, ale nie jest konieczna do zajścia tej fazy cyklu. Zaobserwowano jednak, że rozdzielanie chromatyd siostrzanych jest kontrolowane przez tą samą maszynę, która zaangażowana jest w degradację cyklin [25, 41]. Specyficzność kompleksu APC wobec substratów ulegających degradacji zmienia się w czasie cyklu komórkowego i zależna jest od zasocjowanych z nim czynników. W *S. cerevisiae* znane są co najmniej dwie formy istnienia APC: zasocjowana z białkiem Cdc20 promuje degradację Pds1p – inhibitora anafazy, zaś związana z Cdh1/Hct1 promuje degradację cyklin mitotycznych i wyjście komórek z mitozy [5, 9, 49].

Obecnie jest już pewne, że przejście z metafazy do anafazy i wyjście komórek z mitozy są także regulowane przez degradację specyficznych białek zależną od APC (schemat na rys. 1). Najlepiej scharakteryzowanymi inhibitorami anafazy są Pds1p w *S. cerevisiae* [5] i jego odpowiednik w *S. pombe* – Cut2 [10]. Ostatnio zidentyfikowano odpowiednik Pds1p u kręgowców (M. Kirschner, nieopublikowane, cytowane za [27]). Stabilne formy inhibitorów anafazy, zawierające mutacje w *destruction box* powodują zatrzymanie komórek w metafazie, co wskazuje, że ich degradacja jest niezbędna dla normalnego przebiegu mitozy. Dokładny mechanizm działania Pds1p jest nieznan, lecz przypuszcza się, że hamuje on jeden lub więcej aktywatorów przejścia komórki z metafazy do anafazy. Wykazano, że Pds1 wiąże się z septyną (Esp1p), białkiem bezpośrednio odpowiedzialnym za rozpad kompleksu kohezyjnego, które w stanie związanym nie jest aktywne. Odpowiednikiem Esp1p w *S. pombe* jest białko Cut1. Oba te białka mają homologiczne domeny C-końcowe; zmutowane, nieaktywne formy Esp1p i Cut1 uniemożliwiają rozdzielanie chromatyd siostrzanych, chociaż nie powodują zatrzymania cyklu komórkowego [23, 47]. Proteoliza Pds1p uwalnia i tym samym aktywuje Esp1p, zaś uwolnione Esp1p aktywuje z kolei separację chromatyd [4,19]. Zatem to Esp1p jest wprost odpowiedzialne za destrukcję kompleksu kohezyjnego, jednak bez Pds1p, APC i Cdc20p destrukcja ta byłaby niemożliwa. Delecja genu *PDS1* nie jest w normalnych warunkach letalna; powoduje jedynie permanentne uwalnianie białka Scc1 z kompleksu kohezyjnego i rozchodzenie się chromatyd nawet przy braku aktywności APC [4]. Odpowiednik Pds1p w *S. pombe* – Cut2p ma podobne, lecz nie identyczne



RYSUNEK 1. Schemat wiązania z DNA i rozpadu kompleksu kohezynowego: kompleks kohezynowy wiąże się z chromatydami siostrzanymi podczas replikacji DNA, rozpadowi kompleksu towarzyszy uwolnienie z niego podjednostki Scc1p, a następnie jej degradacja; w regulacji rozpadu uczestniczą: Esp1p – separyna, Pds1p – inhibitor anafazy i APC – kompleks promujący anafazę (wg [26] zmodyfikowane)

cechy: delecja genu *cut2* powoduje śmierć komórki [11]. Wydaje się, że w normalnych warunkach Pds1p działa raczej jako modulator rozpadu chromatyd, staje się jednak niezbędne, gdy dochodzi do uszkodzenia DNA lub wrzeciona mitotycznego (wtedy to kompleks Pds1p/Esp1 nie rozpada się, komórka nie wchodzi w anafazę i ma czas na ewentualną reperację uszkodzeń) oraz gdy komórki są hodowane w podwyższonej temperaturze [27]. Ostatnio pojawiły się dobrze udokumentowane przesłanki wskazujące, że Pds1p nie tylko reguluje inicjację anafazy, lecz niezależnie od tej funkcji jest inhibitorem degradacji cyklin mitotycznych [6].

Jak już wspomniano, głównym regulatorem poziomu cyklin mitotycznych jest APC. Zmiany w poziomie cyklin powodują z kolei zmiany aktywności CDK, kinazy zależnej od cyklin: niski poziom cyklin mitotycznych towarzyszący zakończeniu mitozy powoduje niską aktywność CDK i jest sygnałem do cytokinezy i organizacji kompleksów prereplikacyjnych. Precyzyjne skoordynowanie przejścia metafaza - anafaza i inaktywacji CDK jest warunkiem prawidłowego podziału komórki, musi zatem istnieć mechanizm, który ogranicza degradację cyklin wyłącznie do późnej fazy mitozy [13]. Jest możliwe, że rolę tego regulatora pełni Pds1p.

W drożdżach *S. pombe* wyizolowano serię wspomnianych już mutantów *cut* (ang. *cells untimely torn*), mających różnego rodzaju zaburzenia w mitozie. Analiza tych szczepów potwierdziła wiele danych uzyskanych podczas badania mutantów *S. cerevisiae*. W komórkach większości mutantów *cut* poszczególne etapy mitozy przebiegają w sposób nieskoordynowany i następują w nich aberracje w separacji chromatyd. Wykazano, że defekty te wynikały z zaburzeń w kondensacji chromosomów, z nieprawidłowo tworzonych kompleksów kohezyny i z zaburzeń w regulacji rozpadu tego kompleksu oraz z nieprawidłowości w elementach motorycznych wrzeciona mitotycznego [48]. Co zaskakujące, stwierdzono że zaburzenia w podziale jądra komórkowego (materiał jądrowy jest nierównomiernie segregowa-

wany) mogą też wynikać z defektów w metabolizmie kwasów tłuszczowych. Mutanty *cut6* i *lsd1*, mające zmiany odpowiednio w genach kodujących karboksylazę acetylo-CoA i syntazę kwasów tłuszczowych, nie wykazywały zaburzeń w separacji chromatyd, lecz ich chromosomy były silniej skondensowane, a nierównomierna segregacja dotyczyła innych niż chromosomy składników jądra [34].

KOHEZJA CENTROMERÓW

Generalnie przyjmuje się, że mechanizmy utrzymywania i zaniku kohezji powinny być takie same lub bardzo podobne w mitozie i mejozie, jednak trudno nie zauważyć, że w czasie pierwszego podziału mejotycznego centromery siostrzanych chromosomów pozostają połączone, podczas gdy ramiona inaczej niż w mitozie rozdzielają się podczas przejścia z metafazy do anafazy. Można zatem przypuszczać, że za spójność regionu centromerycznego odpowiada inny mechanizm niż za pozostałą część chromosomu. Co więcej, w mejozie muszą występować różnice w czasie pomiędzy zanikiem kohezji między ramionami i w obszarze centromerycznym chromosomu.

Genom *S. pombe* zawiera 2 geny kodujące białka podobne do *Scclp* z *S. cerevisiae*: *rad21* i *rec8*. Białko *Rad21* jest niezbędne w mitozie, zaś *Rec8* w mejozie. Ostatnio wykazano, że specyficzne dla mejozy *Rec8* bierze udział w kohezji centromerów i chromatyd. Białko to pojawia się w fazie S mejozy i przez dłuższy czas jest związane zarówno z chromatydami, jak i z obszarem centromerowym. Następnie znika z ramion chromosomu, lecz pozostaje związane z centromerami podczas metafazy I i znika całkowicie w czasie anafazy podziału II. Brak tego białka (delecja genu) powoduje oddzielenie chromatyd w I podziale mejotycznym, w wyniku czego dochodzi do zbliżonej do mitotycznej, a nie redukcyjnej, segregacji chromosomów [27, 29].

Badania na *D. melanogaster* również przyczyniły się do wyjaśnienia sposobu połączenia chromosomów w rejonach centromerów. W *Drosophila* znaleziono zlokalizowane w centromerach białko (*MEI-S332*) potrzebne do kohezji centromerów w późnej anafazie I. Jest ono obecne w czasie przechodzenia z metafazy I do anafazy I i oddysocjowuje, gdy siostrzane centromery rozdzielają się w anafazie II. Białko to jest obecne także w centromerach mitotycznych i oddysocjowuje od nich w anafazie. Nie jest ono jednak bezwzględnie konieczne w mitozie, gdyż mutacje w genie je kodującym powodują tylko nieznaczne zaburzenia w segregacji chromosomów. W mutantach *mei* dochodzi do całkowitego rozdzielenia chromatyd w I podziale mejotycznym, co prowadzi do przypadkowej segregacji w czasie podziału drugiego [20].

UWAGI KOŃCOWE

Niewiele jest doniesień dotyczących mechanizmów utrzymywania kohezji chromatyd w komórkach ssaków. Jest to o tyle istotne, że większość, jeśli nie wszystkie nowotwory wiążą się z zaburzeniami w segregacji chromosomów wynikającymi zarówno z zaburzeń w regulacji mitozy i cyklu komórkowego, jak i prawdopodobnie z defektów w białkach utrzymujących spójność chromatyd. W komórkach myszy znaleziono odpowiedniki drożdżowych białek Smc i Scc1, ale ich poziom w cyklu komórkowym nie zmienia się w znaczący sposób, zmienia się zaś ich lokalizacja w komórce – ulegają przemieszczeniu z chromosomów do cytoplazmy [7]. W komórkach ludzkich zidentyfikowano odpowiedniki białek SMC tworzące 2 różne heterodimery i wskazano na ich rolę w kondensacji chromosomów i zaangażowanie w przebieg metafazy. Podobnie jak w komórkach myszy zmienia się ich rozmieszczenie w komórce [36]. Uważa się, że podobnie jak u *Xenopus* u ssaków są 2 mechanizmy utrzymywania kohezji: interfazowy i mitotyczny, wymagające różnych zestawów białek. Niestety, dotychczas nic nie wskazuje na to, że podobny podwójny mechanizm istnieje u drożdży, co nieco utrudni dalsze jego poznawanie.

Identyfikacja kohezyny to zaledwie wstęp do zrozumienia skomplikowanych procesów zachodzących podczas mitozy. Nie wiadomo, w jaki sposób kompleks ten (lub kompleksy) powstaje w czasie replikacji DNA, czym się różnią kompleksy: interfazowy i mitotyczny. Bardzo niewiele wiadomo o przebiegu mejozy na poziomie molekularnym. Nie wiadomo też zbyt wiele o sposobie działania Esp1p i o białkach z nim współdziałających; bardzo mało wiadomo o koordynacji separacji chromatyd z wydłużaniem wrzeciona mitotycznego. Można jednak przypuszczać, że wzrastająca ostatnio lawinowo liczba badaczy zajmujących się tymi zagadnieniami doprowadzi do rozwiązania wielu spośród wymienionych problemów.

LITERATURA

- [1] ALANI E, SUBBIAH SI, KLECKNER N. The yeast RAD50 gene encodes a predicted 153 kd protein containing a purine nucleotide-binding domain and two large heptad-repeat regions. *Genetics* 1989; **122**: 47–57.
- [2] CARRAMOLINO L, LEE BC, ZABALLOS A, PELED A, BARTHELEMY I, SHAV-TAL Y, PRIETO I, CARMIP, GOTHELF Y, GONZALES DE BUIRTAGO G, ARACIL M, MARQUEZ G, BARBERO JL, ZIPORI D. SA-1, a nuclear protein encoded by one member of a novel gene family: molecular cloning and detection in hemopoietic organs. *Gene* 1997; **195**: 151–159.
- [3] CHUANG P, ALBERTSON DGI, MEYER BJ. DPY-27: a chromosome condensation protein homolog that regulates *C. elegans* dosage compensation through association with the X chromosome. *Cell* 1994; **79**: 459–474.
- [4] CIOSK R, ZACHARIAE W, MICHAELIS C, SHEVCHENKO A, MANN M, NASMYTH K. An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell* 1998; **93**: 1067–1076.
- [5] COHEN-FIX O, KOSHLAND D. Pds1p of budding yeast has dual roles: inhibition of anaphase initiation and regulation of mitotic exit. *Genes & Dev* 1999; **13**: 1950–1959.

- [6] COHEN-FIX O, KOSHLAND D. The anaphase inhibitor of *Saccharomyces cerevisiae* Pds1p is a target of the DNA damage checkpoint pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 14361–14366.
- [7] DARWICHE N, FREEMAN LA, STRUNNIKOV A. Characterization of the components of the putative mammalian sister chromatid cohesion complex. *Gene* 1999; **233**: 39–47.
- [8] DESHAIES RJ. The self-destructive personality of a cell cycle in transition. *Curr Opin Cell Biol* 1995; **7**: 781–789.
- [9] FANG G, YU H, KIRSCHNER MW. Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1. *Mol Cell* 1998; **2**: 163–171.
- [10] FUNABIKI H, YAMANO H, KUMADA K, NAGAO K, HUNT T, YANAGIDA M. Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast. *Nature* 1996; **381**: 438–441.
- [11] FUNABIKI H, KUMADA K, YANAGIDA M. Fission yeast Cut1 and Cut2 are essential for sister chromatid separation, concentrate along the metaphase spindle and form large complexes. *EMBO J* 1996; **15**: 6617–6628.
- [12] GLOTZER M, MURRAY AW, KIRSCHNER MW. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 1991; **349**: 132–138.
- [13] HERSHKO A. Roles of ubiquitin-mediated proteolysis in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* 1997; **9**: 788–799.
- [14] HIRANO T, MITCHINSON TJ, SWEDLOW JR. The SMC family: from chromosome condensation to dosage compensation. *Curr Opin Cell Biol* 1995; **7**: 329–336.
- [15] HIRANO T. Biochemical and genetic dissection of mitotic chromosome condensation. *Trends Biochem Sci* 1995; **20**: 357–361.
- [16] HIRANO T, KOBAYASHI R, HIRANO M. Condensins, chromosome condensation protein complex containing XCAP-C, XCAP-E and *Xenopus* homolog of the *Drosophila* barren protein. *Cell* 1997; **89**: 511–521.
- [17] HOLLOWAY SL, GLOTZER M, KING RW, MURRAY AW. Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of MPF. *Cell* 1993; **73**: 1393–1402.
- [18] IRNIGER S, PIATTI S, MICHAELIS C, NASMYTH K. Genes involved in sister chromatid separation are needed for B-type cyclin proteolysis in budding yeast. *Cell* 1995; **77**: 1037–1050.
- [19] KUMADA K, NAKAMURA T, NAGAO K, FUNABIKI H, NAKAGAWA T, YANAGIDA M. Cut1 is loaded onto the spindle by binding to Cut2 and promotes anaphase spindle movement upon Cut2 proteolysis. *Curr Biol* 1998; **8**: 633–641.
- [20] LEBLANC HN, TZU-LING TANG T, WU J, ORR-WEAVER TL. The mitotic centromeric protein MEI-S332 and its role in sister-chromatid cohesion. *Chromosoma*; **108**: 401–411.
- [21] LI YF, NUMATA M, WAHLS WP, SMITH GR. Region-specific meiotic recombination in *Schizosaccharomyces pombe*: the *rec11* gene. *Mol Microbiol* 1997; **23**: 869–878.
- [22] LOSADA A, HIRANO M, HIRANO T. Identification of *Xenopus* SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion. *Genes Dev* 1998; **12**: 1986–1997.
- [23] MCGREW JT, GOETSCH L, BYERS B, BAUM P. Requirement for ESP1 in the nuclear division of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 1992; **3**: 1443–454.
- [24] MICHAELIS C, CIOSK R, NASMYTH K. Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* 1997; **91**: 32–46.
- [25] MORGAN DO. Regulation of the APC and the exit from mitosis. *Nature Cell Biol* 1999; **1**: E47–E53.
- [26] MURRAY A. A snip separate sisters. *Nature* 1999; **400**: 19–21.
- [27] NASMYTH K. Separating sister chromatids. *Trends Biochem Sci* 1999; **24**: 98–104.
- [28] NAOM IS, MORTON SJ, LEACH DRF, LLOYD RG. Molecular organization of SbcC, a gene that affects genetic recombination and the viability of DNA palindromes in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res* 1989; **17**: 8033–8045.

- [29] PARISI S, MCKAY MJ, MOLNAR M, THOMPSON MA, VAN DER SPEK PJ, VAN DRUNEN-SCHOENMAKER E, KANAAR R, LEHMANN E, HOEIJMAKERS JH, KOHLI J. Rec8p, a meiotic recombination and sister chromatid cohesion phosphoprotein of the Rad21p family conserved from fission yeast to humans. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 3515–3528.
- [30] PETERS JM. SCF and APC: The yin and yang of cell cycle regulated proteolysis. *Curr Opin Cell Biol* 1998; **90**: 759–769.
- [31] PETERSON CL. The SMC family: novel motor proteins for chromosome condensation? *Cell* 1994; **79**: 389–392.
- [32] RIEDER CL, SALMON ED. The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. *Trends Cell Biol* 1998; **8**: 310–318.
- [33] SAITOH N, GOLDBERG I, WOOD ER, EARNSHAW WC. ScII: an abundant chromosome scaffold protein is a member of a family of putative ATPase with unusual predicted tertiary structure. *J Cell Biol* 1994; **127**: 303–318.
- [34] SAITOH S, TAKAHASHI K, NABESHIMA K, YAMASHITA Y, NAKASEKO Y, HIRATA A, YANAGIDA M. Aberrant mitosis in fission yeast mutants defective in fatty acid synthetase and acetyl CoA carboxylase. *J Cell Biol* 1996; **134**: 949–961.
- [35] SAKA Y, SUTANI T, YAMASHITA Y, SAITOH, TAKEUCHI M, NASEKO Y, YANAGIDA M. Fission yeast cut3 and cut14, members of a ubiquitous protein family, are required for chromosome condensation and segregation in mitosis. *EMBO J* 1994; **13**: 4938–4952.
- [36] SCHMIESING JA, BALL AR JR, GREGSON HC, ALDERTON JM, ZHOU S, YOKOMORI K. Identification of two distinct human SMC protein complexes involved in mitotic chromosome dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 12906–12911.
- [37] STRUNNIKOV AV, HOGAN E, KOSHLAND D. SMC2, a *Saccharomyces cerevisiae* gene essential for chromosome segregation and condensation defines a subgroup within the SMC family. *Genes Dev* 1995; **9**: 587–599.
- [38] STRUNNIKOV AV. SMC proteins and chromosome structure. *Trends Cell Biol* 1998; **8**: 454–459.
- [39] STRUNNIKOV AV. Structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins: conserved molecular properties for multiple biological functions. *Eur J Biochem* 1999; **263**: 6–13.
- [40] STRUNNIKOV AV, LARIONOV VL, KOSHLAND D. SMC1: an essential yeast gene encoding a putative hed-rod-tail protein is required for nuclear division and defines a new ubiquitous family. *J Cell Biol* 1993; **123**: 1635–1648.
- [41] STRAIGHT AF, BELMONT AS, ROBINETT CC, MURRAY AW. GFP tagging of budding yeast chromosomes reveals that protein-protein interactions can mediate sister chromatid cohesion. *Curr Biol* 1996; **6**: 1599–1608.
- [42] SUDAKIN V, GANOTH D, DAHAN A, HELLER H, HERSHKO J, LUCA FC, RUDERMAN JV, HERSHKO A. The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol Biol Cell* 1995; **6**: 185–197.
- [43] SURANA U, AMON A, DOWZER C, MCGREW J, BYERS B, NASMYTH K. Destruction of the CDC28/CLB mitotic kinase is not required for the metaphase transition in budding yeast. *EMBO J* 1993; **12**: 1969–1978.
- [44] TOTH A, CIOSK R, UHLMANN F, GALOVA M, SCHLEIFFER A, NASMYTH K. Yeast cohesin complex requires a conserved protein, Eco1p (Ctf7), to establish cohesion between sister chromatids during DNA replication. *Genes & Dev* 1999; **13**: 320–333.
- [45] UEMURA T, OHKURA H, ADACHI Y, MORINO K, SHIOZAKI K, YANAGIDA M. DNA topoisomerase II is required for condensation and separation of mitotic chromosomes in *S. pombe*. *Cell* 1987; **50**: 917–925.
- [46] UEMURA T, MORIKAWA K, YANAGIDA M. The nucleotide sequence of the fission yeast DNA topoisomerase II gene: structural and functional relationships to other DNA topoisomerases. *EMBO J* 1986; **5**: 2355–2361.

- [47] UZAWA S, SAMEJIMA I, HIRANOT, TANAKA K, YANAGIDA M. The fission yeast *cut1+* gene regulates spindle pole body duplication and has homology to the budding yeast *ESP1* gene. *Cell* 1990; **62**: 913–925.
- [48] YANAGIDA M. Fission yeast *cut* mutations revisited: control of anaphase. *Trends Cell Biol* 1998; **8**: 144–149.
- [49] ZACHARIAE WM, SCHWAB K, NASMYTH K, SEUFERT W. Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science* 1998; **282**: 1721–1724.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 22.12.1999 r.

Przyjęto: 10.02.2000 r.

Adres autora: 02-106 Warszawa, Pawińskiego 5A

NEUROKININY I ICH RECEPTORY

NEUROKININS AND THEIR RECEPTORS

Krzysztof PTAK*, Marian H. LEWANDOWSKI**, Roger MONTEAU ***

*Department of Physiology, Medical School, Northwestern University, Chicago,

**Zakład Fizjologii Zwierząt, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński,

***Laboratoire de Neurobiologie des Fonctions Végétatives, Faculté des Sciences
St Jérôme, Marseille

Streszczenie: Neurokininy to grupa peptydów występująca w układzie nerwowym ssaków. Charakteryzują się one występowaniem wspólnej sekwencji 4 aminokwasów przy C-końcu łańcucha peptydowego. Do neurokinin zalicza się substancję P (SP), neurokininę A (NKA) i neurokininę B (NKB). Neurokininy łączą się ze specyficznymi dla nich receptorami: NK₁, NK₂, NK₃. Sekwencja aminokwasowa tych receptorów jest w ponad 65% homologiczna. SP jest ligandem receptora NK₁, NKA – receptora NK₂, a NKB – receptora NK₃. Każda z nich jest jednocześnie agonistą każdego typu receptora neurokinin. Receptory neurokinin sprzężone są z białkami G, które działają na różne układy efektorowe wtórnych przekaźników, poprzez które neuropeptydy te depolaryzują błonę postsynaptyczną komórki nerwowej. Depolaryzacja ta wywołana jest zablokowaniem kanałów potasowych. Zakończenia synaptyczne zawierające neurokininy oraz receptory neurokinin pojawiają się we wczesnych etapach embriogenezy. Pozwala to przypuszczać, że neurokininy zaangażowane są w różnicowanie i rozwój neuronów. (*Postępy Biologii Komórki* 2000; 27: 273–285)

Słowa kluczowe: neurokininy, neuropeptydy, receptory transbłonowe, substancja P, tachykininy

Summary: Neurokinins are a group of peptide compounds occurring in the nervous system of mammals. They are characterized by a common sequence of four amino acids at the C-terminal of a peptide chain. The neurokinins include substance P (SP), neurokinin A (NKA) and neurokinin B (NKB). The neurokinins bind to their specific receptors NK₁, NK₂ and NK₃. An amino acid sequence of these receptors is over 65 per cent homologous. SP is a ligand of the NK₁ receptor, NKA – of the NK₂ receptor, and NKB – of the NK₃ receptor. Each of them is simultaneously an agonist of neurokinin receptors of every type. The neurokinin receptors are linked to the G proteins which produce an effect on different effector system of secondary transmitters by which these neuropeptides depolarize the postsynaptic membrane of a nerve cell. The depolarization is connected with inactivation of potassium current. Synaptic terminals containing neurokinins and neurokinin receptors occur at early stages of embryogenesis. All these findings permit

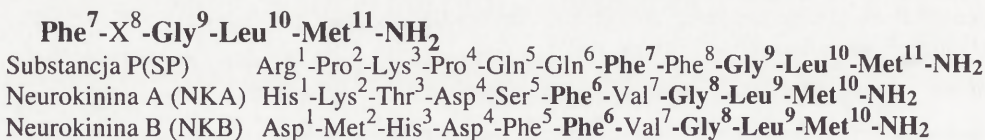
a hypothesis that neurokinins are engaged in differentiation and development of neurones. (*Advances of Cell Biology* 2000; 27: 273–285)

Key words: neurokinins, neuropeptides, transmembrane receptors, substance P, tachykinins

Przeszło pół wieku temu w czasie badania zawartości acetylcholin w wyciągach tkankowych, wyekstrahowano z tkanki mózgowej i jelit konia substancję, która podana dożylnie powodowała spadek ciśnienia krwi i skurcz jelit królików. W odróżnieniu od ACh efekt jej działania nie był blokowany przez atropinę, dlatego nazwano ją substancją P. Był to pierwszy czynny biologicznie peptyd. Z powodu wywoływania skurczu jelit zaliczono go do tachykinin w odróżnieniu od bradykinin, powodujących ich rozkurcz. Obecnie po ujednoczeniu nomenklatury, określenie neurokininy stosuje się do peptydów występujących tylko u ssaków, a tachykininy w odniesieniu do gromad niższych od ssaków. Neurokininy występują we wszystkich strukturach ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego, biorąc udział w licznych procesach fizjologicznych i patologicznych ustroju. W latach 70. substancje P wyizolowano, oczyszczono i oznaczono jej sekwencję aminokwasów. Jest ona peptydem złożonym z 11 aminokwasów o masie cząsteczkowej 1348 D. W latach osiemdziesiątych wykazano istnienie u ssaków dwóch innych neurokinin: neurokininy A (substancja K, neurokinina α lub neuromedyna L) oraz neurokininy B (neurokinina β lub neuromedyna L).

1. CHARAKTERYSTYKA NEUROKININ I KODUJĄCYCH JE GENÓW

Neurokininy charakteryzuje występowanie wspólnej sekwencji 4 aminokwasów przy C-końcu łańcucha peptydowego:



Tachykininy to grupa starych filogenetycznie peptydów. Obecność zakończeń SP-ergicznych wykazano już w układzie nerwowym słuźbi. Wśród skorupiaków, owadów, mięczaków oraz szkarłupni występują peptydy, których sekwencja aminokwasowa zbliżona jest do sekwencji neurokinin. Peptydy te oddziałują na dwa typy receptorów związanych z białkami G oraz z fosfolipazą C [24].

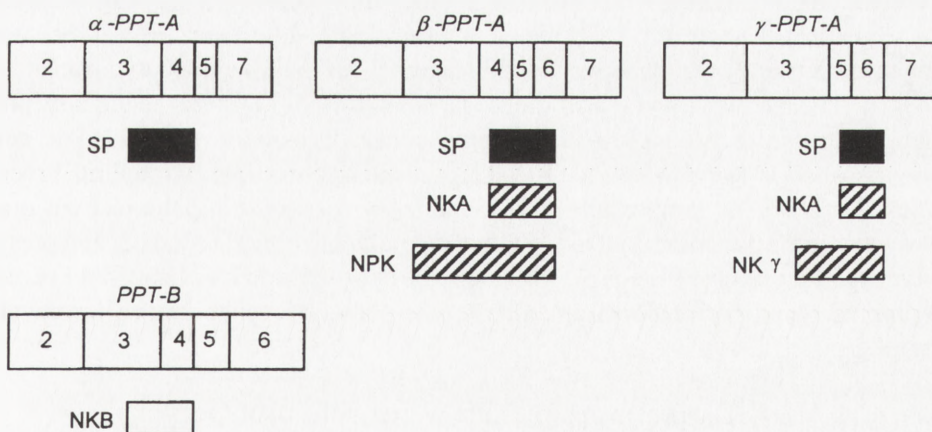
1.1. Geny kodujące neurokininy

W wyniku klonowania oraz analizy sekwencji cDNA ustalono istnienie trzech mRNA: α -, β -, γ - preprotachykininy (PPT)-A, z których – w wyniku przemian potranslacyjnych – powstaje substancja P [6]. Wszystkie trzy typy mRNA kodowane są przez jeden wspólny gen preprotachykinin (*ppt*)-A (gen *ppt-I*, gen SP/NKA) i są wynikiem odmiennego składania produktów różnych eksonów tego genu. Z α -PPT-A mRNA powstaje SP, z β -PPT-A mRNA – SP, NKA, NKA(3-10) i neuropeptyd K, natomiast z γ -PPT-A mRNA – SP, NKA, NKA(3-10) i neuropeptyd γ . W obwodowym układzie nerwowym w wyniku ekspresji (*ppt*)-A powstaje około 80% mRNA α -*ppt*-A, około 20% β -PPT-A mRNA i około 1% γ -PPT-A mRNA. Neurokinina B powstaje w wyniku ekspresji genu *ppt-B*. Sekwencja genów *ppt*-A i *ppt*-B jest zbliżona do siebie, co sugeruje, iż powstały one w wyniku duplikacji wspólnego przodka (rys. 1).

1.2. Gromadzenie i uwalnianie neurokinin

Po zsyntetyzowaniu, substancja P gromadzona jest w pęcherzykach, które za pośrednictwem szybkiego transportu aksonalnego, przesuwane są do zakończeń synaptycznych. Zniszczenie mikrotubul kolchicyną przerywa transport, powodując gromadzenie się pęcherzyków zawierających SP w ciele neuronu.

Neurokininy – podobnie jak inne neuromediatory – uwalniane są pod wpływem impulsu depolaryzacyjnego lub w środowisku o podwyższonym zewnątrzkomórkowym stężeniu jonów potasowych w obecności wapnia [15]. W zależności od rodzaju komórek nerwowych, depolaryzacja aktywuje kanały wapniowe typu L



RYSUNEK 1. W wyniku odmiennego składania produktów różnych eksonów genów (*ppt*)-A oraz (*ppt*)-B (oznaczone cyframi) powstają różne mRNA, z których syntetyzowane są odpowiednie neurokininy. Umieszczono je pod odpowiednimi eksonami, z których powstały w wyniku procesów potranslacyjnych

lub N zależne od potencjału błonowego [23, 11, 15]. Uwalnianie substancji P zależy może również od jej współwystępowania z innymi neuromediatorami w obrębie tych samych zakończeń synaptycznych. W obszarze jądra szwu, substancja P występuje wspólnie z serotoniną, neurokininą A oraz tyreoliberyną, i jest uwalniania jednocześnie z nimi.

1.3. Unieczynnianie neurokinin

Uwolnione neurokininy łączą się ze specyficznymi receptorami zlokalizowanymi na błonie postsynaptycznej, powodując określone skutki biologiczne. Po czym neurokininy ulegają unieczynnianiu przez rozkład enzymatyczny i mechanizm wychwytu zwrotnego.

Neuroendopeptydaza (NEP; E.C. 3.4.24.11), enzym występujący w pobliżu błony komórkowej, zaangażowana jest w proces unieczynniania neuropeptydów i hormonów peptydowych. W ośrodkowym układzie nerwowym enzym ten bierze udział w katabolizmie neurokinin i enkefalin. W wielu obszarach ośrodkowego układu nerwowego wykazano obecność tego enzymu w pobliżu zakończeń zawierających substancję P lub inne neurokininy.

Rozkład enzymatyczny odpowiedzialny jest za unieczynnianie endogennych neurokinin. W mózgowiu człowieka wykryto endopeptydazę, która hydrolizuje wiązania $\text{Gln}^6\text{-Phe}^7$ oraz $\text{Phe}^8\text{-Gly}^9$ substancji P [12]. Również w mózgu szczurów wykazano obecność podobnej endopeptydazy, która różni się od ludzkiej masą cząsteczkową, wartością pH konieczną do jej aktywacji, a ponadto katalizuje hydrolizę wiązań peptydowych między $\text{Pro}^4\text{-Gln}^5$, $\text{Gln}^5\text{-Gln}^6$ i $\text{Gln}^6\text{-Phe}^7$ [13]. Wyniki badań immunohistochemicznych potwierdziły obecność endopeptydazy także w okolicach zakończeń SP-ergicznym rdzenia kręgowego.

W rozkładzie substancji P bierze udział również enzym konwertujący angiotensynę (E.C. 3.4.15.1). Enzym ten hydrolizuje wiązania $\text{Phe}^7\text{-Phe}^8$ oraz $\text{Phe}^8\text{-Gly}^9$ wykazując mniejsze powinowactwo do substancji P niż neuroendopeptydaza.

Nie wykazano wychwytu zwrotnego substancji P (1-11) przez elementy presynaptyczne neuronów oraz głąz. Niemniej jednak, w ośrodkowym układzie nerwowym ssaków C-końcowa część SP (5-11) podlega wychwytowi zwrotnemu. Proces ten jest wrażliwy na temperaturę, nie zachodzi w roztworze hipotonicznym oraz blokowany jest działaniem ouabainy i dihydrofenuolu. Uwolniona z zakończeń presynaptycznych substancja P ulega prawdopodobnie hydrolizie do fragmentu 5-11 przed/ lub po połączeniu się z receptorem, a następnie podlega mechanizmowi wychwytu zwrotnego.

1.4. Ekspresja neurokinin w rozwoju osobniczym

Pierwsze zakończenia SP-ergiczne pojawiają się w 14. dniu życia embrionalnego szczurów. W późniejszych stadiach embriogenezy następuje ich gwałtowny wzrost,

przede wszystkim w przodomózgowiu oraz w rdzeniu przedłużonym. Największe nagromadzenie zakończeń SP-ergicznych w obszarze kory mózgowej i hipokampa występuje między 5. a 15. dniem postnatalnym. Po tym okresie w wymienionych obszarach mózgu następuje spadek syntezy substancji P i utrzymuje się na stałym poziomie w organizmie dojrzałym płciowo.

Komórki nerwowe syntetyzują substancję P przed pojawieniem się między nimi połączeń synaptycznych. Sugeruje to, iż ten neuromodulator zaangażowany jest w różnicowanie i rozwój tkanki mózgowej [29]. Neuroblasty płyty brzusznej cewki nerwowej biorą udział w projekcji włókien osiowych neuronów spoidłowych w kierunku rdzenia kręgowego. Proces ten odbywa się za pośrednictwem chemoatraktantów, których uwalnianie regulowane jest przez substancję P [2].

W obszarze rdzenia kręgowego i mózgu szczurów podwyższona synteza neurokinin A i B oraz neuropeptydu K zachodzi w drugim tygodniu życia postnatalnego. Proces ten jest szczególnie intensywny w neuronach kory mózgowej i podwzgórza. W kolejnych etapach rozwoju osobniczego szczurów następuje spadek syntezy neurokinin A i B w obszarze rdzenia kręgowego i mózgowia.

1.5. Współwystępowanie substancji P z innymi neuromediatorami

Fizjologiczna rola współwystępowania neuromediatorów w tej samej komórce nerwowej jest nadal nieznaną. Jedną z hipotez zakłada, iż współwystępowanie to jest niezbędne do zwiększenia ilości sygnałów koniecznych do przesłania i odebrania impulsu przez komórkę postsynaptyczną. Jednoczesne presynaptyczne uwalnianie neuromediatora działającego w sposób krótkotrwały (np. aminokwasy pobudzające lub hamujące) oraz neuromediatora działającego w sposób długotrwały (np. neuropeptydy) prowadzi do powstania w części postsynaptycznej krótkotrwałych lub długotrwałych postsynaptycznych potencjałów pobudzających lub hamujących. Inna hipoteza mówi, iż neurotransmitery oraz neuromodulatory zlokalizowane w tym samym zakończeniu presynaptycznym nie są uwalniane jednocześnie. Wysokiej częstotliwości impulsy działające na komórkę presynaptyczną powodują uwalnianie neuromodulatorów, których rola polega na modulacji aktywności neurotransmitera.

W obrębie tego samego zakończenia synaptycznego różnych neuronów ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego substancja P występuje wspólnie z innymi neuromediatorami: serotoniną, tyreoliberyną, kwasem glutaminianowym, somatostatyną oraz enkefalinami [8, 22].

1.6. Działanie neurokinin na błonę komórkową

Neurokininy po związaniu się ze swoistym receptorem powodują depolaryzację błony postsynaptycznej neuronów oraz włókien mięśni gładkich. Mogą one prowadzić również do hiperpolaryzacji [10]. Depolaryzacja wywołana działaniem neurokinin

związana jest przede wszystkim z blokowaniem przewodnictwa jonów potasowych. Jednakże, w zależności od rodzaju komórki nerwowej, SP może modulować przewodnictwo błonowe jonów potasowych i wapniowych. Depolaryzacja wywołana działaniem substancji P prowadzi do zwiększenia wejściowej oporności błonowej oraz wzrostu jej pobudliwości [14, 26, 27]. W neuronach cholinergicznym mózgowia nowonarodzonych szczurów oraz w neuronach jąder podstawnych szczurów [32], substancja P blokuje wejściowy prąd potasowy typu I_{KIR} . Prąd ten bierze udział w regulacji potencjału spoczynkowego neuronów. W komórkach nerwowych rdzenia kręgowego myszy, w neuronach układu współczulnego oraz w neuronach jąder podstawnych szczurów, SP moduluje także prąd potasowy wrażliwy na muskarynę (I_M). Ten typ prądu jonowego zaangażowany jest w generowanie serii potencjałów czynnościowych (*burst*). W neuronach zwojów gwiazdzistych u świnek morskich substancja P zamyka kanały wapniowe typu N, hamując wejściowy prąd wapniowy [4]. W neuronach rogów tylnych rdzenia kręgowego szczurów pod wpływem SP następuje zmniejszenie wyjściowego prądu potasowego typu $IK(Ca)$, ułatwiającego repolaryzację błony na końcu potencjału czynnościowego. W neuronach czuciowych minogów substancja P blokuje, zależny od 4-aminopirydyny, prąd potasowy typu I_A [25]. Ten typ przewodnictwa potasowego reguluje m.in. opóźnienie między kolejnymi potencjałami czynnościowymi. W komórkach nerwowych rdzenia przedłużonego [14] oraz motoneuronach przeponowych [26, 27] szczurów depolaryzacja wywołana działaniem substancji P, jest spowodowana zablokowaniem kanałów potasowych, konsekwencją czego jest zahamowanie prądu potasowego I_{leak} biorącego udział w utrzymaniu potencjału spoczynkowego. W zakończeniach czuciowych nerwu błędnego fretek substancja P hamuje wejściowy prąd potasowy I_h , prowadząc do hiperpolaryzacji [10]. I_h odpowiada za prawidłowe spolaryzowanie błony oraz utrzymanie potencjału spoczynkowego. SP blokuje również kanały błonowe za pośrednictwem, których równocześnie wchodzi do komórki jony potasowe oraz wapniowe [9].

2. RECEPTORY NEUROKININ

Na podstawie badań farmakologicznych i molekularnych scharakteryzowano trzy rodzaje receptorów neurokinin: NK_1 , NK_2 oraz NK_3 . Po sklonowaniu cDNA kodującego określone białko receptorowe wykazano, iż receptory te zbudowane są z 350 do 500 aminokwasów, które tworzą długie, pojedyncze łańcuchy białkowe, o strukturze analogicznej do budowy rodopsyny bakteryjnej, tzn. posiadające po siedem helikalnych domen transbłonowych sprzężonych z białkami G. Sekwencja aminokwasowa tych receptorów w ponad 65% jest homologiczna [7].

TABELA 1. Receptory neurokinin oraz ich ligandy i agonisty

Receptory neurokinin	Ligandy i stopień ich powinowactwa do swoistego receptora (K_i)	Agonisty receptorów	Powinowactwo neurokinin do określonego receptora
NK ₁	SP; 0,5–1,0 nM	NKA, NKB	SP>NKA>NKB
NK ₂	NKA; 1,0 nM	SP, NKB	NKA>NKB>SP
NK ₃	NKB; 1,0 nM	SP, NKA	NKB>NKA>SP

Substancja P jest ligandem receptora NK₁, neurokinina A – receptora NK₂, a neurokinina B – receptora NK₃. Należy jednak zaznaczyć, iż każda z neurokinin jest agonistą każdego typu ich receptora wykazując do nich różny stopień powinowactwa (tab. 1).

Receptory NK₁ obecne są w komórkach nerwowych i glejowych ośrodkowego układu nerwowego oraz w neuronach obwodowego układu nerwowego. W części ośrodkowej, największe ich rozmieszczenie występuje w I i w II warstwie Rexeda tylnych rogów rdzenia kręgowego. Receptory NK₂ występują w obwodowym układzie nerwowym oraz w tylnych rogach rdzenia kręgowego, a także w istocie czarnej i prążkowi. Receptory NK₃ zlokalizowane są w dużej ilości w głębokich warstwach kory mózgowej i w rdzeniu kręgowym.

2.2. Typy receptorów neurokinin

2.2.1. Charakterystyka receptorów NK₁

U człowieka gen kodujący receptor NK₁ zawiera 45–60 tysięcy par zasad ułożonych w 5. eksonach, które poprzedzielane są 4. intronami. Ludzkie białko receptora NK₁ zbudowane jest z 407 aminokwasów o masie cząsteczkowej 46,248 kDa.

Łańcuch tego białka wielokrotnie przechodzi przez błonę komórkową, tworząc w jej obrębie 7 α -heliks zbudowanych z 20–25 hydrofobowych aminokwasów. Zarówno u człowieka, jak i u szczurów, transbłonowe odcinki łańcucha polipeptydowego są ze sobą naprzemiennie połączone trzema pętlami zewnątrzkomórkowymi oraz trzema (u człowieka) lub czterema (u szczurów) pętlami cytosolowymi. U szczurów, białko receptora NK₁ łączy się z właściwym dla niego białkiem G poprzez trzecią (Lys²⁴⁸, Lys²⁵¹, Arg²⁵², Lys²⁵³) oraz fragment czwartej (Arg³¹¹, Arg³¹³) pętli cytoplazmatycznej. N-koniec białka receptora NK₁ występuje w obszarze zewnątrzkomórkowym, które ma miejsca dla N-glikolizacji (Asn¹⁴ i Asn¹⁸). Fragment C-końcowy białka występuje w obszarze cytoplazmatycznym i bogaty jest w reszty serynowe i treoninowe będące miejscem fosforylacji.

Receptory NK_1 wykazują dużą homologię w sekwencji aminokwasów. Szczurzy receptor NK_1 wykazuje 95-procentowe podobieństwo w strukturze I-rzędowej z ludzkim homologiem: spośród 407 aminokwasów budujących łańcuch polipeptydowy tylko 21 jest różnych. Największe podobieństwo dotyczy odcinków transbłonowych (6 różnych reszt aminokwasowych), natomiast najmniejsze N- i C-końca [28]. Domeny transbłonowe receptora NK_1 myszy i szczurów są identyczne. Receptory NK_1 człowieka i świnek morskich są homologiczne w 96,5%, a ich sekwencja transbłonowa jest identyczna. Pomimo wysokiego podobieństwa międzygatunkowego w strukturze I-rzędowej, receptory NK_1 wykazują odmienne właściwości farmakologiczne. Receptory te mają dwa miejsca wiązania liganda. Jedno z nich jest swoiste dla substancji P, drugie dla agonisty tego receptora – septydu [pGlu⁶, Pro⁶]-SP(9-11) [16, 21]. Interakcja między receptorem NK_1 a ligandem prowadzi do zmiany konformacji receptora na dwa sposoby: albo substancja P i agonista receptora NK_1 działają na ten receptor w jednakowo wysokim stężeniu (0,5 nM) prowadząc do aktywacji fosfolipazy C, albo działanie agonistów receptora NK_1 i substancji P (stężenie agonisty niższe od stężenia SP) prowadzi do pobudzenia fosfolipazy C i cykazy adenylowej [16].

2.2.2. Ekspresja receptorów NK_1 w rozwoju

W okresie rozwoju osobniczego gęstość receptorów neurokinin oraz ich rozmieszczenie ulegają zmianie w obrębie układu nerwowego. U szczurów między 18. a 21. dniem prenatalnym ilość tych receptorów wzrasta 5-krotnie. W 3. dniu postnatalnym następuje gwałtowny spadek gęstości tych receptorów. Najmniejsza gęstość receptorów NK_1 występuje między 7. a 14. dniem życia postnatalnego. Po tym okresie, ich gęstość równa jest poziomowi u dojrzałych płciowo szczurów. W trakcie ontogenezy mózgu szczurów następuje zmiana rozmieszczenia receptorów NK_1 . W okresie między 1. a 4. dniem postnatalnym, receptory dla substancji P występują w większej gęstości w obszarze rdzenia przedłużonego niż w przednich odcinkach mózgowia. W 21. dniu życia postnatalnego receptory rozmieszczone są w sposób analogiczny jak u osobników dojrzałych płciowo: spada gęstość w okolicach rdzenia przedłużonego oraz zwiększa się w obszarze mózgowia.

W hipokampie, korze mózgowej oraz mózdzku szczurów określono zmianę poziomu ekspresji genu receptora NK_1 między dniem urodzenia a 56. dniem rozwoju postnatalnego [33]. W neuronach hipokampa najintensywniejszą ekspresję tego genu obserwuje się w 3. dniu postnatalnym, a w obszarze kory mózgowej w pierwszych godzinach życia. W 56. dniu życia postnatalnego w obu tych strukturach następuje spadek ekspresji tego genu o około 50%. Ponadto wykazano, iż w badanym okresie gen receptora NK_1 ulega niskiej ekspresji w komórkach nerwowych mózdzka [33].

Zmiana gęstości oraz rozmieszczenia receptorów NK_1 podczas ontogenezy sugeruje, że substancja P uczestniczy w procesie rozwoju i dojrzewania ośrodkowego układu nerwowego [29]. Substancja P przyspiesza wzrost aksonów zarówno z neu-

roblastów, jak i z embrionalnych komórek nerwowych zwojów grzbietowych rdzenia kręgowego.

W obszarze rdzenia kręgowego szczurów, receptory NK_1 pojawiają się w 14. dniu życia embrionalnego. W trakcie dalszego rozwoju płodowego poziom mRNA dla tego receptora maleje [31]. Między 1. dniem, a 6. tygodniem życia postnatalnego gęstość receptorów NK_1 maleje 4,5-krotnie na poziomie segmentów szyjnych i piersiowych rdzenia kręgowego. Tuż po urodzeniu, receptory NK_1 rozproszone są w obrębie istoty szarej rdzenia kręgowego, a począwszy od 14. dnia postnatalnego lokalizacja ich zaczyna ograniczać się do motoneuronów.

2.2.3. Internalizacja receptorów NK_1

Po połączeniu z substancją P receptory NK_1 ulegają odwracalnemu, a następnie ponownemu uwrażliwieniu na ligand. Odwracalność polega na utracie wysokiej wrażliwości receptora na działanie swoistego liganda i zdolności do maksymalnej odpowiedzi, czyli wytworzenia wtórnego przekaźnika. W procesie odwracalności receptora najważniejsze znaczenie ma fosforylacja C-końca łańcucha polipeptydowego receptora. W receptorze NK_1 koniec ten zawiera liczne reszty serynowe i treoninowe, będące miejscami fosforylacji. W porównaniu z receptorami NK_2 i NK_3 , receptor NK_1 ulega silniejszemu odwracalnemu uwrażliwieniu. Jest to spowodowane występowaniem większej ilości miejsc fosforylacji w łańcuchu polipeptydowym receptora NK_1 . Zjawisko odwracalności i ponownego uwrażliwienia jest związane z procesem internalizacji i recyklicacji receptorów NK_1 . U szczurów, proces ten wykazano w komórkach nerwowych prądkowia [17], rdzenia kręgowego [18, 1, 20] oraz w neuronach zlokalizowanych w śródbłonku jelita cienkiego [5, 30]. Substancja P prowadzi do szybkiej internalizacji receptorów NK_1 . W neuronach prądkowia, w ciągu pierwszej minuty działania egzogennej SP następuje internalizacja około 60% receptorów NK_1 . Internalizacja receptorów NK_1 zależna jest od klatryny, która uczestniczy w endocytozie tych receptorów [5]. Internalizacja powoduje reorganizację morfologiczną zakończeń dendrytycznych neuronów prądkowia, w zakończeniach których pojawiają się żyłakowatości [17]. Przypuszcza się, iż proces ten zaangażowany jest w plastyczność neuronalną.

W wyniku recyklicacji receptory NK_1 powracają na powierzchnię błony. W neuronach prądkowia, receptory te recyklicują po około jednej godzinie od momentu podania egzogennej SP [17], a w neuronach unerwiających jelito cienkie dopiero po okresie 4. godzin [5]. Internalizacja receptorów odbywa się na poziomie ciała komórki nerwowej i aksonów. Recyklicacja zachodzi jedynie na poziomie perykarionu. Pozwala to przypuszczać, że internalizacja uczestniczy w regulacji neuroprzekaznictwa synaptycznego [5].

2.3. Receptory NK₂

Ludzki gen kodujący receptor NK₂ znajduje się w regionie q11-q21 chromosomu 10. Gen ten złożony jest z 5. eksonów poprzedzielanych 4. intronami. Receptor NK₂ po raz pierwszy został sklonowany z komórek ściany żołądka wołu i składa się z 384 reszt aminokwasowych. W następnych latach sklonowano receptory NK₂ z komórek żołądka szczurów (390 reszt aminokwasowych) oraz komórek tchawicy człowieka (398 reszt aminokwasowych).

Receptory NK₂ wykazują w swojej sekwencji aminokwasowej 85-procentową homologię międzygatunkową. Różnice dotyczą przede wszystkim N- i C-końca. Na N-końcu ludzkiego receptora NK₂ występują dwa miejsca N-glikolizacji, natomiast receptor myszy ma tylko jedno takie miejsce. Struktura I-rzędowa receptorów NK₁ i NK₂ szczurów wykazuje 68-procentowe podobieństwo. Homologia ta obejmuje głównie pierwszą i trzecią pętlę cytosolową. Ze względu na niewielką ilość reszt aminokwasowych podlegających fosforylacji na C-końcu, receptor NK₂ ulega w mniejszym stopniu procesowi uwrażliwienia niż receptor NK₁.

Receptory NK₂ uczestniczą prawdopodobnie w rozwoju i w dojrzewaniu kory mózgowej szczurów. U nowonarodzonych szczurów receptory te obecne są w głębokich warstwach kory, zanikają one natomiast u dojrzałych płciowo gryzoni.

2.4. Receptory NK₃

Do dzisiaj nie określono położenia genu receptora NK₃ w genomie zwierząt. Długość genu receptora NK₃ wynosi 45 Kb, a jego struktura jest identyczna z budową genów receptorów NK₁ i NK₂: 5. eksonów przedzielonych 4. intronami. W strukturze I-rzędowej receptor NK₃ wykazuje 74-procentowe podobieństwo z receptorem NK₁ oraz 68-procentowe z NK₂. Po raz pierwszy receptor NK₃ został sklonowany z komórek mózgowych szczurów i człowieka. Złożony jest on z 452 reszt aminokwasowych. Na początku lat dziewięćdziesiątych wyizolowano i sklonowano z komórek łożyska człowieka białko receptorowe składające się z 440 aminokwasów. Wykazuje ono podobieństwo do białka receptora NK₃ i uważane jest za receptor NK₄ [3].

2.5. Receptory neurokinin i wewnętrzkomórkowy układ efektorowy przekazywania sygnału

Receptor NK₁ związany jest z białkami G typu: G₀, G_i, G_{q11} [28]. Białka G związane z receptorem NK₁ działają na różne układy efektorowe wtórnych przekaźników:

- aktywując fosfolipazę C (PLC), która hydrolizuje dwufosforofosfatydylinozytolu (PIP₃) i powoduje utworzenie z niego 1,4,5-trójfosfoinozytolu (IP₃) i

1,2-diacylglicerolu (DG), IP₃ prowadzi do uwolnienia wapnia ze zbiorników wewnątrzkomórkowych;

- aktywując fosfolipazę A₂ powoduje uwalnianie kwasu arachidonowego;
- cyklazę adenylową, która aktywuje lub hamuje syntezę cAMP.

Białka G sprzężone z receptorami NK₁ są wrażliwe i odporne na działanie toksyny krztuśca. Wśród pierwszych wyróżnia się białka G otwierające kanały chlorkowe i aktywujące fosfolipazę A₂. W drugiej grupie, odpornej na toksynę krztuśca, występują białka G aktywujące PIP₃ i zamykające kanały potasowe [28]. Białka G połączone z receptorami NK₁ mogą bezpośrednio, czyli bez udziału wtórnych przekaźników modulować aktywność kanałów jonowych. W ten sposób modulują kanały potasowe w ludzkich limfocytach T oraz kanały chlorkowe w komórkach okrężnicy królików. W neuronach jądra sinawego substancja P aktywuje wejściowy prąd mieszany typu kationowego. Mechanizm ten nie jest powiązany z białkami G.

LITERATURA

- [1] ABBADIE C, TRAFTON J, LIU H, MANTYH PW, BASBAUM AI. Inflammation increases the distribution of dorsal horn neurons that internalize the neurokinin-1 receptor in response to noxious and non-noxious stimulation. *J Neurosci* 1997; **17**: 8049–8060.
- [2] DE FELIPE C, PINNOCK RD, HUNT SP. Modulation of chemotropism in the developing spinal cord by substance P. *Science* 1995; **267**: 899–902.
- [3] DONALDSON LF, HASKELL CA, HANLEY MR. Functional characterization by heterologous expression of a novel cloned tachykinin peptide receptor. *Biochem J* 1996; **320**: 1–5.
- [4] GILBERT R, RYANNJS, HORACKOVA M, SMITH FM, KELLY ME. Actions of substance P on membrane potential and ionic currents in guinea pig stellate ganglion neurons. *Am J Physiol* 1998; **274**: 892–903.
- [5] GRADY EF, GAMP PD, JONES E, BALUK P, MCDONALD DM, PAYAN DG, BUNNETT NW. Endocytosis and recycling of neurokinin 1 receptors in enteric neurons. *Neuroscience* 1996; **75**: 1239–1254.
- [6] HRABEC E, HRABEC Z, PŁUCIENNICZAK A. Biosynteza substancji P oraz innych neurokinin ssaków. *Post Biochem* 1992; **38**:23–27.
- [7] HRABEC E, HRABEC Z. Receptory neurokinin. Udział substancji P w procesach zapalnych. *Post Biochem* 1992; **38**:28–32.
- [8] HENRY JN, MANAKER S. Colocalization of substance P or enkephalin in serotonergic neuronal afferents to the hypoglossal nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 1998; **391**: 491–505.
- [9] INOUE K, NAKAZAWA K, INOUE K, FUJIMORI K. Nonselective cation channels coupled with tachykinin receptors in rat sensory neurons. *J Neurophysiol* 1995; **73**: 736–742.
- [10] JAFARI MS, WEINREICH D. Substance P regulates I_h via a NK-1 receptor in vagal sensory neurons of the ferret. *J Neurophysiol* 1998; **79**: 769–777.
- [11] KAGEYAMA M, FUJITA H, NAKATA K, SHIRASAWA E. Involvement of both L- and N-type voltage-dependent Ca²⁺ channels in KCl⁻ and veratridine-evoked transmitter release from non-adrenergic, non-cholinergic nerves in the rabbit iris sphincter muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1997; **355**: 638–644.

- [12] KARLSSON K, NYBERG F. Purification of substance P endopeptidase (SPE) activity in human spinal cord and subsequent comparative studies with SPE in cerebrospinal fluid and with chymotrypsin. *J Mol Recognit* 1998; **11**: 266–269.
- [13] KARLSSON K, ERIKSSON U, ANDREN P, NYBERG F. Purification and characterization of substance P endopeptidase activities in the rat spinal cord. *Prep Biochem Biotechnol* 1997; **27**: 59–78.
- [14] LI YW, GUYENET PG. Effect of substance P on C1 and other bulbospinal cells of the RVLM in neonatal rats. *Am J Physiol* 1997; **273**: 805–813.
- [15] LIPPI A, SANTICIOLI P, CRISCUOLI M, MAGGI CA. Depolarization evoked co-release of tachykinins from enteric nerves in the guinea-pig proximal colon. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998; **357**: 245–251.
- [16] MAGGI CA, SCHWARTZ TW. The dual nature of the tachykinin NK₁ receptor. *Trends Pharmacol Sci* 1997; **18**: 351–355.
- [17] MANTYH PW, ALLEN CJ, GHILARDI JR, ROGERS SD, MANTYH CR, LIU H, BASBAUM AI, VIGNA SR, MAGGIO JE. Rapid endocytosis of a G protein-coupled receptor: substance P evoked internalization of its receptor in the rat striatum *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995a; **92**: 2622–2626.
- [18] MANTYH PW, DEMASTER E, MALHORTA A, GHILARDI JR, ROGERS SD, MANTYH CR, LIU H, BASBAUM AI, VIGNA SR, MAGGIO JE. Receptor endocytosis and dendrite reshaping in spinal neurons after somatosensory stimulation. *Science* 1995; **268**: 1629–1632.
- [19] MARVIZON JC, GRADY EF, STEFANI E, BUNNETT NW, MAYER EA. Substance P release in the dorsal horn assessed by receptor internalization: NMDA receptors counteract a tonic inhibition by GABA(B) receptors. *Eur J Neurosci* 1999; **11**: 417–426.
- [20] MARVIZON JC, MARTINEZ V, GRADY EF, BUNNETT NW, MAYER EA. Neurokinin 1 receptor internalization in spinal cord slices induced by dorsal root stimulation is mediated by NMDA receptors. *J Neurosci* 1997; **17**: 8129–8136.
- [21] MAUBACH KA, JONES RS. Electrophysiological characterisation of tachykinin receptors in the rat nucleus of the solitary tract and dorsal motor nucleus of the vagus *in vitro*. *Br J Pharmacol* 1997; **122**: 1151–1159.
- [22] MIMODA T, KITAMURA N, HONDOE, YAMADA J. Immunohistochemical colocalization of serotonin, substance P and Met-enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8 in the endocrine cells of the ruminant duodenum. *Anat Histol Embryol* 1998; **27**: 65–69.
- [23] MORIMOTO H, MATSUDA A, OHORII, M, FUJII T. Effects of omega-conotoxin GVIA on the activation of capsaicin-sensitive afferent sensory nerves in guinea pig airway tissues. *Jpn J Pharmacol* 1996; **71**: 161–166.
- [24] NASSEL DR. Tachykinin-related peptides in invertebrates: a review. *Peptides* 1999; **20**: 141–158.
- [25] PARKER D, SVENSSON E, GRILLNER S. Substance P modulates sensory action potentials in the lamprey via a protein kinase C-mediated reduction of a 4-aminopyridine-sensitive potassium conductance. *Eur J Neurosci* 1997; **9**: 2064–2076.
- [26] PTAK K, DI PASQUALE E, MONTEAU R. Substance P and central respiratory activity: a comparative *in vitro* study on foetal and newborn rat. *Dev Brain Res* 1999; **114**: 217–227.
- [27] PTAK K, KONRAD M, DI PASQUALE E, TELL F, HILAIRE G, MONTEAU R. Cellular and synaptic effect of substance P on neonatal phrenic motoneurons. *Eur J Neurosci* 2000; **12**: 1–13.
- [28] QUARTARA L, MAGGI CA. The tachykinin NK₁ receptor. Part I: ligands and mechanisms of cellular activation. *Neuropeptides* 1997; **31**: 537–563.
- [29] RAFA RB. Possible role(s) of neurokinins in CNS development and neurodegenerative or other disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 1998; **22**: 789–813.

- [30] SOUTHWELL BR, WOODMAN HL, MURPHY R, ROYAL SJ, FURNESS JB. Characterisation of substance P-induced endocytosis of NK₁ receptors on enteric neurons. *Histochem Cell Biol* 1996; **106**: 563–571.
- [31] St JOHN PA, LUDWIG CP, LAI J. Substance P receptor expression and cellular responses to substance P in prenatal rat spinal cord cells. *J Recept Signal Transduct Res* 1997; **17**: 569–583.
- [32] TAKANO K, STANFIELD PR, NAKAJIMA S, NAKAJIMA Y. Protein kinase C-mediated inhibition of an inward rectifier potassium channel by substance P in nucleus basalis neurons. *Neuron* 1995; **14**: 999–1008.
- [33] TAOKA M, SONG SY, KUBOTA M, MINEGISHI A, YAMAKUNI T, KONISHI S. Increased level of neurokinin-1 tachykinin receptor gene expression during early postnatal development of rat brain. *Neuroscience* 1996; **74**: 845–853.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 13.01. 2000 r.

Przyjęto: 02.02. 2000 r.

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

E-mail: LEW@ZUK.IZ.UJ.edu.pl

Sprawozdanie Zarządu Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej za rok 1999

ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa
tel. 8340344, fax 8340470, e-mail: jkawiak@cmkp.edu.pl

W obecnym okresie sprawozdawczym Zarząd działał do czerwca 1999 w niezmiennym składzie: Jerzy Kawiak – prezes, Maciej Nałęcz – wiceprezes, Maciej Zabel – sekretarz, Joanna Liwska – skarbnik. Również skład Rady Fundacji nie zmienił się: Zofia Osuchowska – przewodnicząca, członkowie: Tadeusz Cichocki, Antoni Horst, Józef Kałuża, Aleksander Koj, Włodzimierz Korohoda, Andrzej Łukaszyk, Andrzej Myśliwski, Maria Olszewska, Aleksandra Stojalowska, Jan Steffen. Zarząd pracował społecznie. W pracy Zarządu pomagały panie: Ewa Próchniewicz – księgowa oraz Barbara Miks i Danuta Wasilewska w rozprowadzaniu zeszytów „Postępów Biologii Komórki”. Zarząd składa tym osobom serdeczne podziękowania. Firma „Script” wspomagała współpracę z drukarniami.

1. Działalność wydawnicza

Jest to główny zakres działania Zarządu Fundacji. Fundacja wspiera wydawanie czasopism „Folia Histochemica et Cytobiologica” oraz „Postępy Biologii Komórki”.

A. Folia Histochemica et Cytobiologica

Czasopismo ukazywało się regularnie w dotychczasowej formie odpowiadającej standardom międzynarodowym. Rozszerzono redakcję o koedytatorów w osobach: Z. Darżynkiewicz, A. Hinek, M. Z. Ratajczak, K. Reiss, J. P. Robinson, T. Skórski. Wprowadzono zwyczaj częstego publikowania artykułów przeglądowych pisanych przez wybitnych specjalistów. Skład i druk czasopisma odbywa się w Krakowie.

Merytoryczną pieczę sprawuje i podejmuje decyzje o składzie redaktorów „Folii” Polskie Towarzystwo Histochemików i Cytochemików. Również Towarzystwo od 1995 r. jest formalnym właścicielem czasopisma.

Wydawanie czasopisma odbywa się z finansową pomocą Komitetu Badań Naukowych oraz z funduszy zebranych ze sprzedaży czasopisma. Artykuły z „Folii” są indeksowane w: Medline, Biological Abstracts, Excerpta Medica, Index Medicus, SciSearch, Research Alert; IF=0.289.

B. Postępy Biologii Komórki

Czasopismo ukazywało się regularnie w nowej formie. Okładka czasopisma, spis artykułów, informacje o redaktorach i czasopiśmie są obecnie w języku polskim i j. angielskim. Założono okno internetowe „Postępów”, gdzie oprócz informacji o czasopiśmie są bieżąco publikowane tytuły artykułów i ich streszczenia.

Adres internetowy okna brzmi **www.mol.uj.edu.pl/pbk**.

W dalszym ciągu wydawano suplementy. Suplementy ukazały się pod redakcją: supl. 12 – Adam J. Zięcik – Zagadnienia rozrodu człowieka i zwierząt.

supl. 13. Andrzej Myśliwski, Zbigniew Kmiec – Starzenie się w aspekcie komórkowym (27 Konferencja Biologii Komórki) oraz

Maria Olszewska – Mechanizmy różnicowania i wzrostu komórek u roślin.

Merytoryczną pieczę nad „Postępami” ma od 27 lat Polskie Towarzystwo Anatomiczne oraz od 6 lat Polskie Towarzystwo Biologii Komórki. Tytuł własności czasopisma „Postępy Biologii Komórki” ma Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej. Wydawanie czasopisma odbywa się z finansową pomocą Komitetu Badań Naukowych oraz z funduszy zebranych ze sprzedaży czasopisma. Skład czasopisma odbywał się w Wydawnictwie Fundacji „Rozwój SGGW” w Warszawie.

Artykuły z Postępów są indeksowane w: Ulrich’s International Periodicals Directory, Bibliotekę Narodową i Bibliotekę UJ; są czynione starania o włączenie „Postępów” do Medline.

2. Wybory nowego Zarządu Fundacji na kadencję 1999–2005

Praca Zarządu była kontrolowana dwukrotnie w 1999 r.

16 kwietnia 1999 w Warszawie przedstawiono i przedyskutowano sprawy dotyczące wydawania „Postępów Biologii Komórki”, sprawy nagród i stypendiów oraz założenia funduszu stypendialnego oraz odbyła się kontrola finansowa pracy Zarządu. Kontrolę przeprowadzili Fundatorzy i Przewodnicząca Rady Fundacji.

9 września 1999 odbyło się w Krakowie zebranie sprawozdawczo-wyborcze, w którym uczestniczyli Fundatorzy, Przewodnicząca Rady Fundacji i Zarząd. Zebraniu przewodniczył prof. dr Tadeusz Cichocki. Sprawozdanie z dotychczasowej pracy Zarządu za lata 1994–1999 składało się z kopii publikowanych rocznych sprawozdań w „Postępach” (1996; 23, 717; 1998; 25, 477; 1999; 26, 439) oraz dodatkowego tekstu. Sprawozdania publikowane są wynikiem corocznej kontroli Fundatorów. Podkreślono dobrą merytoryczną i finansową sytuację czasopism wydawanych przez Fundację: *Folia Histochemica et Cytobiologica* i *Postępy Biologii Komórki*. Czasopisma mają wysoką punktację KBN (*Folia* – 8 punktów. IF=0.289, *Postępy* – 5 punktów). Szata graficzna obu czasopism jest pozytywnie oceniana przez czytelników.

W 1999 r. założono fundusz stypendialny Fundacji (informacja o funduszu jest w *Postępach* 1999; 26, 877). Fundusz będzie wykorzystywany po zgromadzeniu

na koncie odpowiedniej kwoty. Sprawozdanie Skarbnika dr. J. Liwskiej zostało przyjęte bez zastrzeżeń. Fundacja finansuje ok. 20% kosztów wydawania czasopism. Dochody Fundacji pochodzą ze sprzedaży czasopism, druku reklam, dofinansowania ze źródeł zewnętrznych oraz procentów bankowych. Fundacja bardzo oszczędnie gospodaruje finansami, na część etatu zatrudnia księgową, za niewielką odpłatnością organizuje prenumeratę i wysyłkę „Postępów”. Prace członków Zarządu i Rady Fundacji, redaktorów, recenzentów są wykonywane społecznie. Saldo na dzień 31.08.99 jest dodatnie i wynosi 92 224, 47 zł, fundusz stypendialny wynosi 1613,67 zł. W dyskusji podkreślono wzrastanie objętości kolejnych zeszytów „Postępów”, co zwiększa koszty wydawnicze. Apelowano o ostrzejszą selekcję artykułów i ich skracanie. Celowe byłoby publikowanie reklam, o które jednak nie jest łatwo. Ogólna opinia czytelników o „Postęпах” jest bardzo dobra i wielu prenumeruje je prywatnie.

Ustępującemu Zarządowi w głosowaniu udzielono absolutorium. W głosowaniu tajnym wybrano nowy Zarząd Fundacji na lata 1999–2005 (Statut Fundacji II.8.2) w osobach: prezes – Jerzy Kawiak, sekretarz – Maciej Zabel, skarbnik – Joanna Liwska. Plany na najbliższą przyszłość są podobne do dotychczasowej działalności. Przedstawiono propozycję, aby zamiast przyznawać nagrody roczne Fundacji pieniądze te kierować na fundusz stypendialny.

3. Finanse i inwestycje

Zarząd zakupił kserokopiarkę na miejsce uprzednio używanej, którą oddał i za którą otrzymał bonifikatę. Inwestycja ta jest dużym ułatwieniem w pracy Zarządu. Zarząd zakupił również i przekazał nieodpłatnie Centrum Biostruktury AM w Warszawie nowy nadajnik S/85/1 37.9MHz oraz główkę mikrofonową DM 190.60 na salę wykładową im. L. Paszkiewicza zamiast podobnego sprzętu zepsutego podczas ostatniej 27. Konferencji Biologii Komórki (27 listopada 1999).

Prezes Fundacji

Sekretarz

Jerzy Kawiak

Maciej Zabel

Warszawa marzec 2000.

KOMUNIKATY

Wykaz recenzentów z tomu 26 – Referees of the volume 26 1999

prof. Halina Augustyniak,
 prof. Teresa Banaś,
 prof. Grzegorz Bartosz,
 prof. Barbara Bilińska,
 prof. Szczepan Biliński,
 prof. Marian Dróżdź,
 prof. Franciszek Dubert,
 dr hab. Grzegorz Jackowski
 prof. Wiesław W. Jędrzejczak,
 doc. dr hab. Bożena Kamińska,
 prof. Jerzy Kawiak,
 prof. Wincenty Kilarski,
 prof. Zbigniew Kmieć,
 dr hab. Andrzej K. Kononowicz,
 prof. Stanisław Lewak,
 prof. Jolanta Małuszyńska,
 prof. Jan Michejda,
 prof. Andrzej Myśliwski,
 prof. Maria J. Olszewska,
 prof. Jerzy Ostrowski,

prof. Barbara Płytycz,
 dr n. med. Monika Puzianowska-Kuźnicka,
 dr hab. Elżbieta Pyza,
 dr hab. Elżbieta Romanowska,
 prof. Danuta Rożynkowa,
 prof. Wiesława Rudnicka,
 prof. Marian Saniewski,
 doc. dr hab. Ewa Sikora,
 prof. Piotr Stępień,
 prof. Kazimierz Strzałka,
 prof. Cezary Szczylik,
 prof. Krzysztof Szyfter,
 dr Małgorzata Tarczyńska,
 prof. Andrzej Tretyn,
 prof. Wiesław Trzeciak,
 prof. Marcin Zabel,
 prof. Włodzimierz Zagórski-Ostoja,
 prof. Alojzy Zgirski,
 prof. Michał Zimecki.

Komunikat

Oddział Śląski Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego informuje szanownych Członków i Sympatyków, że w dniach 1–2 czerwca 2000 roku organizuje dwudniową II Konferencję Naukową nt.:

Metabolizm leków i ksenobiotyków

która odbędzie się w Bukowinie Tatrzańskiej.

W ramach Konferencji zostaną wygłoszone referaty plenarne i doniesienia naukowe oraz zostanie zorganizowana sesja plakatowa.

Szczegółowe informacje dotyczące kosztów, sposobu płatności, dojazdu i innych zostaną przesłane w osobnym komunikacie osobom, które zgłoszą swój czynny lub bierny udział w Konferencji do dnia 15 lutego 2000 roku na adres:

dr Andrzej Plewka
 II Katedra Histologii i Embriologii, Śląska Akademia Medyczna
 ul. Medyków 18, 40-752 Katowice-Ligota
 tel/fax: (0-32) 252-65-74; e-mail: aplewka@polbox.com

Wskazówki przygotowania rysunków i streszczeń 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.

Streszczenie ma mieć następującą strukturę:

j. polski		j. angielski
Podstawy zagadnienia:	jedno zdanie	Background:
Podtytuły:	do każdego podtytułu 3–5 zdań	Subtitles:
Wnioski:	2 zdania	Conclusions:
Słowa kluczowe:	do 8 słów	Key words:

Takie streszczenia standardowe mogą być ważne, gdyż obecnie czyta się je komputerowo. Treść streszczenia zachęca bądź nie zachęca do przeczytania całego artykułu.

Prosimy również Autorów o podawanie adresów e-mail, o ile je mają.

Cennik odbitek prac dla Autorów w 2000 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.

Warunki prenumeraty kwartalnika PBK

Prenumerata na rok 2000

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 2000 pod adresem:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99,
01-813 Warszawa; tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl

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 2000:

dla instytucji (bibliotek) wynosi 68 zł,
a dla odbiorców indywidualnych 25 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2000 should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland,
tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl:

On account: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa;

Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa, No 12401053-40006576-2700-401112-001.

Price per year 20 dollars USA.

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 15 stron maszynopisu i do 100 pozycji bibliograficznych koniecznie z ostatnich 5 lat (natomiast wcześniejsze prace mogą być pracami przeglądowymi);

2) doniesienia z ostatniej chwili na 3-5 stronach maszynopisu z kilkoma pozycjami bibliograficznymi ostatniego roku (licząc od daty wystania do redakcji);

3) listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przysyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 w układzie normalnym 1800 znaków na stronie. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki s. 291) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona dla redakcji winna zawierać: imiona, nazwiska, tytuły naukowe autorów i adresy: w pracy, domowy wraz z telefonem i e-mail, 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 1 str.) 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 niezmięnionej formie. Wszystkie załączniki muszą być opatrzone na odwrocie nazwiskiem pierwszego autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji. Stosowane jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu doby. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi 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. 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. Poprawioną po recenzji wersję pracy należy zwrócić do redakcji koniecznie w ciągu 30 dni. Redakcja zrezygnuje z publikacji maszynopisu, którego autorzy do 30 dni nie odpowiedzą na list redaktora.

Redakcja prosi także o dołączenie do maszynopisu tytułu artykułu i podpisanej odpowiedzi na następujące pytania:

Dołączono 2 kopie maszynopisu, tabel i rycin.	<i>tak</i>	<i>nie</i>	Treść pracy nie była uprzednio publikowana nie została wysłana do innej redakcji	<i>tak</i>	<i>nie</i>
Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę.	<i>tak</i>	<i>nie</i>	Dołączono kopię pracy na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM	<i>tak</i>	<i>nie</i>
Jest zgoda osób, których informacje niepublikowane są zamieszczone w tekście artykułu	<i>tak</i>	<i>nie</i>	Odpowiadam za całość pracy opisanej w zał. maszyn.	<i>tak</i>	<i>nie</i>

Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w "Postępie Biologii Komórki" przechodzi na własność redakcji i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji.

podpisy wszystkich autorów

TREŚĆ – CONTENTS

W tym Zeszyście	153
ZIELIŃSKA E., KOWALCZYK S.: Percepcja i transdukcja sygnału auksynowego Perception and transduction of auxin signal	155
SKUZA L. J.: Charakterystyka molekularna mitochondrialnego DNA żyta uprawnego (<i>Secale cereale</i> L.) Molecular characterisation of mitochondrial DNA of fall rye (<i>Secale cereale</i> L.)	185
ROMAŃSKI K., BORODULIN-NADZIEJA L., ZABEL M.: Komórki rozrusznikowe w przewodzie pokarmowym – Zależności struktury i funkcji The pacemaking cells in the gastrointestinal tract – Structure - function relationships	197
KORTYLEWSKI M., MACKIEWICZ A.: Cytokiny i procesy przekazywania sygnału: Grupa cytokin typu interleukinY-6 jako układ modelowy Cytokines and signal transduction mechanisms: IL-6-type cytokines as a model system	213
WINNICKA A.: Cząsteczki różnicowania na powierzchni limfocytów przeżuwaczy Cluster of differentiation on ruminant lymphocytes	229
PAPROCKA M., DUŚ D.: Niektóre cechy fenotypowe i czynnościowe komórek śródbłonek naczyniowych Phenotypic and functional features of endothelial cells	247
KURLANDZKA A.: Tworzenie i rozpad kompleksu kohezyjnego chromatyd siostrzanych Formation and decay of sister chromatid cohesion complex	261
PTAK K., LEWANDOWSKI M. H., MONTEAU R.: Neurokininy i ich receptory Neurokinins and their receptors	273
Sprawozdanie Zarządu Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej za rok 1999	287
Komunikaty	290
Recenzenci tomu 26 z 1999 r.	290
Wskazówki przygotowania rysunków i streszczeń do publikacji w PBK	291
Warunki prenumeraty kwartalnika PBK	291