

PL ISSN 0324-833X

P 2435

9.3.2001

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

Postępy Biologii Komórki

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

Advances in Cell Biology

VOL. 28, ISSUE 1/2001
(1-160)



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 UL, 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. Chalubińskiego 6a*

Jan ZEROMSKI – 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.

Wykaz recenzentów tomu 27 z 2000 r. zamieszczono na s. 1

Referees of the volume 27, 2000 are on page 1.

© Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej – Foundation for Cell Biology and Molecular Biology
address: www.mol.uj.edu.pl/pbk

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.

Ark. wyd. 12,5. Ark. druk. 10,0. Podpisano do druku w styczniu 2001 r. Druk ukończono w lutym 2001 r.

W tym zeszycie „Postępów Biologii Komórki

- W roku 2000 Nagroda Nobla z dziedziny medycyny i fizjologii przypadła Arvidowi Carlssonowi, Paulowi Greengardowi i Ericowi Kandelowi. Omówienie osiągnięć noblistów 2000 znajdzie Czytelnik na str. 147.
- W trakcie oogenezy i wczesnej embriogenezy tworzy się przestrzenny plan organizacji zarodka. Dokładniej powstawanie tego planu omówiono na str. 69.
- Molekularne aspekty starzenia się liści roślin omówiono w pracy na str. 17.
- Sygnałowe funkcje ATP w centralnym układzie nerwowym są interesującą dziedziną. Podstawowe typy receptorów P2X i P2Y przedstawiono na str. 33–50.
- Funkcje, pochodzenie i znaczenie w rozwoju nowotworów komórek dendrytycznych były omawiane w suplemencie 15 „Postępów” (2000; supl. 15, str. 91). Obecnie publikowany artykuł zawiera szersze omówienie funkcji i pochodzenia tych komórek oraz możliwości ich otrzymywania i mechanizmy działania przeciwnowotworowego.

Wykaz recenzentów z tomu 27, 2000 Referees of the volume 27 2000

doc. dr hab. M. Balińska
prof. dr hab. S. Biliński,
prof. dr hab. M. Drózdź,
prof. dr hab. B. Grzelakowska-Sztabert
doc. dr hab. A. Guzdek
doc. dr hab. B. Kamińska,
prof. dr hab. J. Kawiak,
prof. dr hab. W. Kilariski,
prof. dr hab. A. K. Kononowicz
prof. dr hab. W. Korohoda
prof. dr hab. M. Kossut
prof. dr hab. H. Krzanowska
prof. dr hab. P. Laidler
prof. dr hab. J. Legocka
prof. dr hab. S. Lewak
prof. dr hab. J. Limon

prof. dr hab. M. J. Olszewska,
prof. dr hab. Z. Osuchowska
prof. dr hab. B. Płytycz
prof. dr hab. J. Rafałowska
doc. dr hab. J. A. Siedlecki
prof. dr hab. P. Stępień,
prof. dr hab. M. Stryjecka-Zimmer
doc. dr hab. J. Styryna
doc. dr hab. A. Szewczyk
doc. dr hab. L. Witalińska
prof. dr hab. M. Zabel,
prof. dr hab. T. Zalewski
prof. dr hab. J. Żeromski



GLIPIKANY

THE GLYPICANS

Rafał BOBIŃSKI, Krystyna OLCZYK, Grzegorz WISOWSKI, Krzysztof JARCO

Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej,
Śląska Akademia Medyczna, Sosnowiec

Streszczenie: Proteoglikany (PG) – molekuly syntetyzowane przez komórki eukariotyczne – obecne są w przestrzeni okołokomórkowej oraz w macierzy pozakomórkowej. Składają się z białka rdzeniowego, do którego przyłączony jest jeden lub więcej łańcuchów glikozoaminoglikanowych. Jedną z kilku rodzin PG stanowią gliplikany – proteoglikany heparanosiarczanowe. Cechami charakterystycznymi gliplikanów są: wielkość białka rdzeniowego – wynosząca w przybliżeniu 60 kDa, czternaście konserwatywnie rozmieszczonych reszt cysteiny w obrębie białka rdzeniowego, hydrofobowe C i N-końcowe sekwencje o strukturze podobnej do peptydu sygnałowego, dwa lub więcej miejsc akceptorowych dla łańcuchów glikozoaminoglikanowych oraz połączenie z błoną komórkową za pośrednictwem glikozylofosfatydyloinozytolu. Gliplikany kontrolują podziały, adhezję i migrację komórek, a także modulują właściwości niektórych czynników wzrostowych. Mutacje w obrębie genów gliplikanów są przyczyną kilku ciężkich schorzeń, prowadzących często do przedwczesnej śmierci organizmu.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28: 3–15)

Słowa kluczowe: proteoglikany, gliplikany

Summary: Proteoglycans, produced by most eukaryotic cells are versatile components of pericellular and extracellular matrix. They are composed of protein core to which one or more glycosaminoglycan (GAG) chains are attached. One of few families of proteoglycans are glypicans. All glypicans share similar features as core protein of 60 kDa, 14 conserved cysteine residues, a special region localized near the plasma membrane, containing 2 or more Ser-Gly sequences for GAG attachment, hydrophobic C- and N-terminal parts of core protein similar to signal peptide, as well as linkage with external leaflet of the plasma membrane via a glycosylphosphatidylinositol. The glypicans are implicated in cell division, adhesion, migration and modulation of growth factor activities. Mutation in glypicans may cause few congenital diseases and premature death.

(*Advances in Cell Biology* 2001; 28: 3–15)

Key words: proteoglycans, glypicans

Wykaz stosowanych skrótów: PG – proteoglikany, GAG – glikozoaminoglikany, HS – łańcuchy siarczanu heparanu, pz – pary zasad, FGF – czynnik wzrostowy fibroblastów, aFGF – kwaśny czynnik

wzrostowy fibroblastów, **bFGF** – zasadowy czynnik wzrostowy fibroblastów, **FGFR** – receptor dla czynnika wzrostowego fibroblastów, **KGF** – czynnik wzrostowy keratynocytów, **KGFR** – receptor dla czynnika wzrostowego keratynocytów, **IGF** – insulino-podobny czynnik wzrostowy, **IGFR** – receptor dla insulino-podobnego czynnika wzrostowego, **VEGF** – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostowy.

WSTĘP

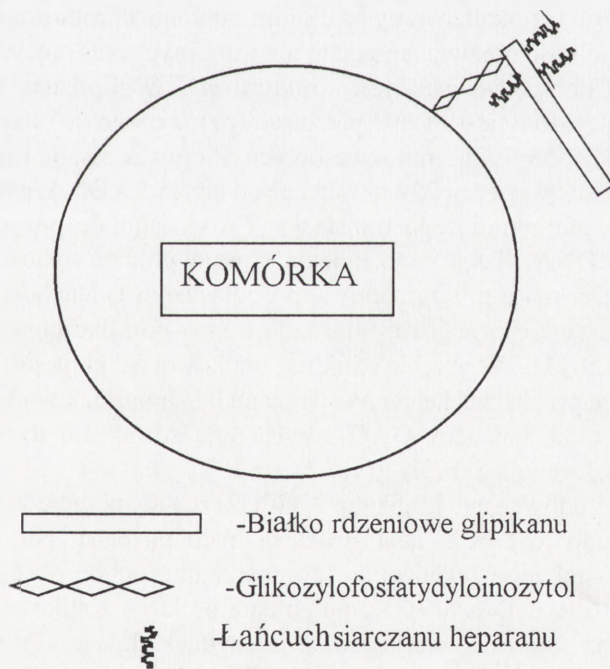
Glipikany stanowią jedną z rodzin proteoglikanów (PG) – glikoprotein, zbudowanych z białka rdzeniowego, do którego przyłączony jest jeden lub więcej łańcuchów glikozoaminoglikanowych (GAG) określonego typu [17,21–23,28]. W przypadku glipikanów, wspomnianym typem GAG są siarczany heparanu. Obecnie wyróżnia się siedem rodzin proteoglikanów, gdzie podstawą klasyfikacji jest różnica w budowie ich białek rdzeniowych [28]. Różnice, dotyczące białek rdzeniowych poszczególnych rodzin PG, wahają się w granicach 20–80%. Obejmują one strukturę pierwszorzędową oraz – obecność i położenie określonych domen w białku, co rzutuje na rodzaj i miejsce przyłączenia łańcucha GAG, a co za tym idzie – na właściwości PG oraz ich tkankowe umiejscowienie. Na podstawie przedstawionych różnic podział proteoglikanów przedstawia się następująco:

- Duże, zewnątrzkomórkowe PG chondroitynosiarczanowe, zdolne do agregacji z kwasem hialuronowym.
- Małe śródmiażdżowe PG o białkach rdzeniowych zasobnych w reszty leucyny.
- Duże PG heparanosiarczanowe występujące w macierzy zewnątrzkomórkowej i błonach podstawnych.
- Syndekany – proteoglikany transmembranowe.
- Wewnątrzkomórkowe PG serglycyłowe, zasobne w naprzemiennie ułożone reszty seryny i glicyny.
- Glipikany – PG połączone z błoną komórkową przez glikozylofosfatydyloinozitol.
- Pozostałe PG – nie należące z uwagi na strukturę i właściwości do żadnej z wymienionych rodzin.

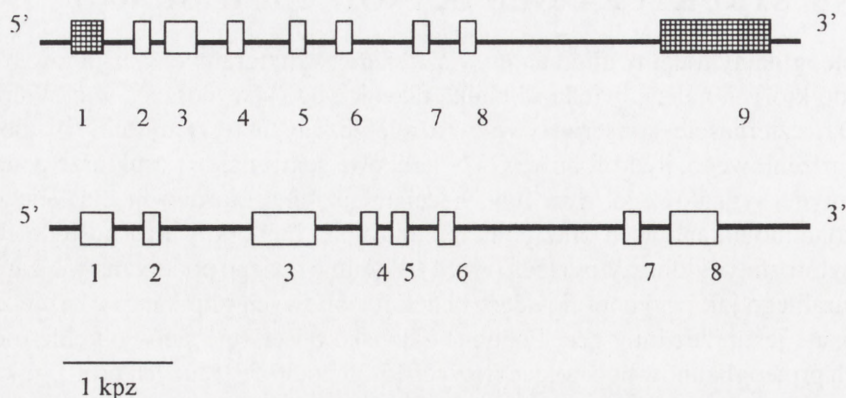
Rodzina glipikanów obejmuje sześć proteoglikanów, wyizolowanych z tkanek różnych kręgowców: glipikan (glipikan-1), cerebroglikan (glipikan-2), OCI-5 (glipikan-3), K-glipikan (glipikan-4), glipikan-5, glipikan-6. Siódmego przedstawiciela glipikanów, odkrytego u *Drosophila melanogaster*, nazwano Dally [26,36]. Wspólnie z syndekanami – rodziną transmembranowych PG heparanosiarczanowych, glipikany są nadrodziną powierzchniowo-komórkowych proteoglikanów, kontrolujących odpowiedź komórkową na czynniki wzrostowe i molekuly adhezyjne [26,36,51,52].

STRUKTURA GLIPIKANÓW I ICH GENÓW

Proteoglikany rodziny glipikanów wiąże szereg strukturalnych i czynnościowych cech, do których należą: wielkość białka rdzeniowego – wynosząca w przybliżeniu 60 kDa, czternaście konserwatywnie rozmieszczonych reszt cysteiny w obrębie białka rdzeniowego, hydrofobowe C i N-końcowe sekwencje, o strukturze podobnej do peptydu sygnałowego, dwa lub więcej miejsc akceptorowych dla łańcuchów glikoaminoglikanowych oraz połączenie z błoną komórkową za pośrednictwem glikozylofosfatydyloinozytolu [52] (ryc. 1). Pomimo dużego podobieństwa, zarówno strukturalnego jak i czynnościowego, białek rdzeniowych glipikanów, każde z nich kodowane jest przez inny gen. Podobne zjawisko obserwuje się w obrębie rodziny małych proteoglikanów bogatoleucylowych [5,25,26,50,55], dużych proteoglikanów agregujących z kwasem hialuronowym [6,21,22,42,43,45] czy też wśród syndekanów – proteoglikanów transmembranowych [7,10,16,29,44]. Zbliżona struktura genów kodujących białka rdzeniowe wspomnianych proteoglikanów sugeruje, iż geny te pochodzą od wspólnego genu „przodka”, natomiast różnice w lokalizacji chromosomalnej wskazują na wczesne ich „rozbiegnięcie” się po chromosomach [15–23].



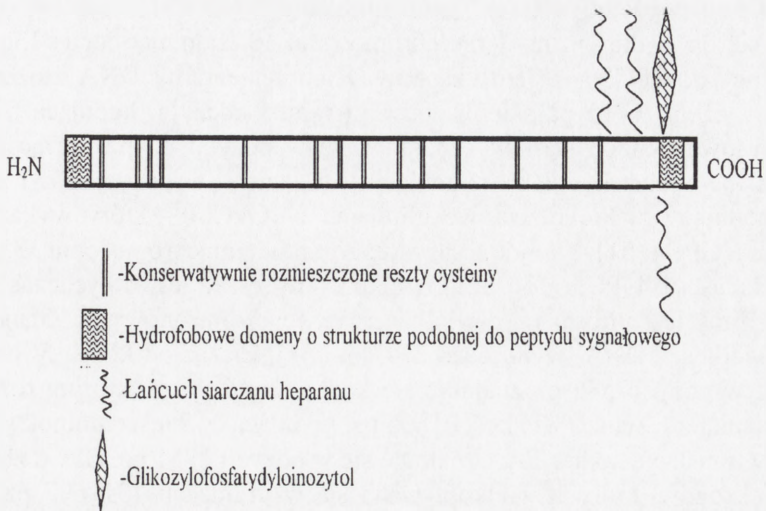
RYCINA 1. Kotwiczenie glipikanów w błonie komórkowej za pośrednictwem glikozylofosfatydyloinozytolu



RYCINA 2. Schemat budowy genów obu podrodziny gliplikanów. Górna część ryciny prezentuje strukturę genu, charakterystyczną dla podrodziny gliplikanów 1, 2, 4 i 6, dolna – przedstawia gen o cechach charakterystycznych dla podrodziny gliplikanów 3 i 5. Białe pola wskazują eksony, natomiast linie – introny. Pola zakreskowane, wskazują eksony – w obrębie podrodziny – różniące się znacznie wielkością. Wielkość eksonów jest proporcjonalna do zamieszczonej skali

Najwcześniej odkrytym genem kodującym białka rdzeniowe gliplikanów jest gen gliplikanu 1 (GPC1), zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 2, locus 2q35-q37 (ryc. 2). Wielkość omawianego genu nie jest dotychczas precyzyjnie określona, natomiast dość dobrze poznana jest struktura cDNA gliplikanu 1 [11]. Komplementarny DNA złożony jest z 3692 par zasad (pz), z czego 1674 pz kodują łańcuch białkowy, liczący 558 reszt aminokwasowych. Pierwsza zasada tripletu startowego (ATG) znajduje się w pozycji 222 pz – licząc od końca 5' cDNA, natomiast pierwsza zasada kodonu, zatrzymującego translację (TAA), zajmuje pozycję 1986 pz, we wspomnianym cDNA. Masa całego, ludzkiego proteoglikanu wynosi – w przybliżeniu – ponad 200 kDa, masa glikoproteiny – po odłączeniu łańcuchów GAG – wynosi 64 kDa, natomiast masę samego rdzenia białkowego – po odłączeniu oligosacharydów – szacuje się na 56 kDa. W obrębie struktury białkowej znajdują się cztery sekwencje Ser-Gly, mogące przyłączać łańcuchy siarczanu heparanu. Jak wnika jednak z badań Davida i wsp. [11], łańcuchy GAG przyłączone zostają do trzech ostatnich, C-terminalnych sekwencji Ser-Gly (ryc. 3).

Badania nad budową genu gliplikanu 2 (GPC2) zostały podjęte stosunkowo wcześniej [49]. Pomimo to GPC2 jest strukturą mało poznana. Nie określono dotąd wielkości genu ani jego lokalizacji chromosomalnej, choć dość dobrze poznano jego transkrypt oraz cDNA [49]. Komplementarny DNA zbudowany jest z 2631 pz, z czego 1737 pz stanowi otwarta ramka odczytu, kodująca 579 reszt aminokwasowych. Kodon startowy dla translacji znajduje się w pozycji 236 pz, natomiast kodon kończący translację, umieszczony jest w pozycji 1973 pz, licząc od końca 5' transkryptu [49]. W strukturze białka rdzeniowego znajduje się siedem sąsied-



RYCINA 3. Schemat struktury glikoproteiny. Ze względu na znaczną wielkość łańcuchów siarczanu heparanu, nie zachowano proporcji między wielkością białka rdzeniowego a wielkością łańcuchów siarczanu heparanu

dujących reszt aminokwasowych Ser-Gly, do których mogą być przyłączane łańcuchy glikoaminoglikanowe. Wszystkie ze wspomnianych par reszt oflankowane są resztami aminokwasów o charakterze kwaśnym [24,49].

Gen glikoproteiny 3 (GPC3), którego część kodująca ma budowę ośmioeksonową, znajduje się w długim ramieniu chromosomu X, zajmując locus Xq 26.1 [12,17,20,34,54]. W skład tej struktury wchodzi ponad 500 kpz, z kolei cDNA zbudowany jest z 1764 pz, kodując 588 reszt aminokwasowych. Kodon startowy jest oddalony w kierunku 3', od miejsca startu transkrypcji, o 197 pz. W regionie promotora genu GPC3 znaleźć można szereg sekwencji, mogących przyłączać czynniki transkrypcyjne, z których trzy należą do Sp1, natomiast siedem do AP2 [24]. GPC3 wykazuje 26-41% homologii z pozostałymi genami rodziny glikoprotein [52].

Białko rdzeniowe glikoproteiny 4 (K-glikoproteiny) kodowane jest przez gen GPC4 znajdujący się w długim ramieniu chromosomu X i zajmujący to samo locus co GPC3 (Xq 26.1). Ludzki gen GPC4 jest około pięć razy mniejszy niż GPC3, zajmując ok. 100 kpz genomu, zlokalizowanych bliżej centromeru chromosomu w stosunku do GPC3. Wielkość sekwencji kodującej, rozmieszczonej w 9 eksonach, wynosi w przybliżeniu 3,7 kpz, z czego 1668 pz zajmuje otwarta ramka odczytu, kodująca 556 reszt aminokwasowych [54]. Kodon startowy (ATG) oraz końcowy (TAA), znajdują się, odpowiednio, w pozycji 213 oraz 1883 kpz, licząc od końca 5' nici cDNA. Masa glikoproteiny 4 wynosi około 220 kDa, natomiast masa białka rdzeniowego, otrzymanego po enzymatycznej depolimeryzacji łańcuchów siarczanów heparanu, jest w przybliżeniu równa 57,5 kDa [19].

Nie jest znana dotąd wielkość genu glipikanu 5 (GPC5), wiadomo jednak, iż znajduje się on w długim ramieniu chromosomu 13, zajmując locus 13q 32 i ma – podobnie jak GPC3 – osiem eksonów. Komplementarny DNA złożony jest z 2558 pz, z czego 1716 pz stanowi otwartą ramkę odczytu, kodującą 572 reszty aminokwasowe. Kodon startowy znajduje się w pozycji 15 pz, licząc od końca 5' cDNA, natomiast kodon zatrzymujący translację – w pozycji 1731 pz [52].

Gen kodujący białko rdzeniowe glipikanu 6 (GPC6) – który wykazuje 63% homologii z GPC4 [51] – znajduje się w długim ramieniu chromosomu 13, zajmując to samo locus, co GPC5 (13q 32). Wielkość GPC6 nie jest dotychczas poznana, ponieważ brak jest informacji o wielkości sekwencji intronowych. Znana jest natomiast wielkość cDNA, wynosząca 2747 pz [51]. Licząc od końca 5' omawianej struktury, w pozycji 586 pz znajduje się kodon startowy, po którym rozciąga się otwarta ramka odczytu, o wielkości 1665 pz, kodująca 555 reszt aminokwasowych. Kończący translację kodon TAA znajduje się w pozycji 2251 pz. GPC6 zbudowany jest z 9 eksonów, których wielkość waha się w granicach 131–697 pz [39,51].

W genomie *Drosophila melanogaster* odkryto gen Dally, kodujący białko rdzeniowe o strukturze bardzo zbliżonej do struktury białek rdzeniowych glipikanów występujących u człowieka [26,32,36]. Białko Dally złożone jest z 626 reszt aminokwasowych i podobnie jak w rodzinie glipikanów kręgowców zawiera łańcuchy heparanu siarczanu oraz łączy się z błoną komórkową za pośrednictwem glikozylfosfatydyloinozytolu. Choć wiadomo, iż w obrębie rdzenia białkowego Dally występuje 13 sekwencji Ser-Gly, to liczba faktycznie przyłączonych łańcuchów glikozoaminoglikanowych nie jest znana [26,36].

Uwzględniając różnice w budowie glipikanów, proteoglikany te podzielono na dwie podrodziny, gdzie do pierwszej zaliczono glipikany 1,2,4 i 6, wykazujące 40-60% homologii białka rdzeniowego, natomiast do drugiej – glipikany 3 i 5, z homologią w granicach 40% (tab. 1). Podobieństwo obu podrodzin obejmuje także organizację sekwencji kodujących mRNA. Matrycowy RNA GPC1, 2, 4 i

TABELA 1. Analiza porównawcza genów glipikanów człowieka. Liczby zawarte w tabeli obrazują – podane w procentach – stopień homologii między poszczególnymi genami

	GPC1	GPC2	GPC3	GPC4	GPC5	GPC6
GPC1	100	35	21	42	21	44
GPC2		100	19	37	17	41
GPC3			100	23	43	24
GPC4				100	24	63
GPC5					100	25
GPC6						100

6 złożony jest z dziewięciu eksonów, z kolei mRNA GPC3 i 5 – z ośmiu (ryc. 2).

MUTACJE GENETYCZNE GLIPIKANÓW CZŁOWIEKA I KONSEKWENCJE MUTACJI

Obecna wiedza na temat mutacji genów glikoprotein oraz konsekwencji z tym związanych, jest dość skromna, ponieważ wspomniane mutacje są dla organizmu ludzkiego zwykle letalne [40,56]. Prawdopodobnie, w większości przypadków płody giną na etapie rozwoju zarodkowego, co uniemożliwia poznanie ewentualnych skutków mutacji genetycznych. Dotychczas poznano tylko jeden zespół chorobowy, u podłoża którego leżą zmiany w strukturze genów glikoprotein. I tak, mutacje genów GPC3 i GPC4 prowadzą do powstania zespołu Simpsona-Golabiego-Behmela (SGB) [40,56]. Choroba ta w 50% prowadzi do przedwczesnej śmierci osobników płci męskiej, głównie z powodu zachorowalności na nowotwory, takie jak: neuroblastoma (nerwiak niedojrzały), czy też nowotwór Wilmsa [41]. Zespół SGB charakteryzuje się szeregiem zmian, obejmujących upośledzoną budowę narządów wewnętrznych, często rzutującą na wygląd zewnętrzny. Rozległe zmiany wewnętrzne obejmują uszkodzenie mięśnia sercowego, dysplazję nerek, wnetrostwo (zaburzenia zstępowania jąder), spodziectwo (nieprawidłowe ujście cewki moczowej), anomalie kręgow i żeber [41,56]. Osoby z zespołem SGB charakteryzuje nadmierny wzrost (zwykle powyżej 195 cm), zniekształcenie twarzy, zębów, języka oraz obecność sześciu palców [41,56]. Za wystąpienie zespołu SGB odpowiedzialne są – blisko siebie leżące – geny glikoproteiny 3 oraz 4, znajdujące na chromosomie X [15,18,40,41,53,56].

Jednak, najwięcej mutacji odkryto w strukturze genu kodującego białko rdzeniowe glikoproteiny 3. Wszystkie z nich prowadziły do wystąpienia objawów zespołu SGB. Strukturalne zmiany GPC3 obejmują translokacje w obrębie intronu 2, prowadzące do zaburzeń w odczycie na poziomie transkrypcji. Kolejnym rodzajem mutacji, odkrytym w genie GPC3 są delecje, dotyczące eksonów 2 oraz 6,7,8. Nieobecność trzech ostatnich eksonów powoduje najpoważniejsze zmiany w organizmie człowieka, bowiem to właśnie w tych strukturach zapisana jest informacja o miejscach przyłączania łańcuchów glikozoaminoglikanowych oraz glikozylofosfatydiloinozytolu. Mutacje w obrębie genu glikoproteiny 4 pogłębiają jedynie objawy zespołu SGB, wywołane równoległą mutacją w genie GPC3 [19], jednakowoż produkt genu GPC4 nie jest konieczny do życia, pod warunkiem, że nie zmutowany GPC3 podlega ekspresji i prawidłowo funkcjonuje [19]. Nieprawidłowa struktura glikoprotein może być także konsekwencją braku lub nieprawidłowej ekspresji genów, kontrolujących syntezę łańcuchów siarczanu heparanu [4]. Zespół chorobowy określany jako mnogie dziedziczne wyrostki kostne (ang. *Hereditary multiple exostoses*), powstaje

w wyniku mutacji genu kodującego enzym – polimerazę siarczanu heparanu. Choroba ta dziedziczy się autosomalnie jako cecha dominująca, prowadząc do powstania licznych wyrosła kostnych, klasyfikowanych jako łagodna zmiana nowotworowa w obrębie płytki wzrostowej kości. Zmiana ta może ulec złośliwej transformacji do chrzęstniakomięsaka lub kostniakomięsaka [4].

Innym przykładem mutacji prowadzących do powstawania nieprawidłowych glipikanów, jest defekt struktury genu kodującego enzym przyłączający łańcuchy siarczanu heparanu do rdzenia białkowego. Opisano, iż niedobór 2-sulfotransferazy siarczanu heparanu (Hs2st), prowadzi do nieprawidłowego rozwoju zarodkowego myszy, które tuż po urodzeniu giną [46]. Okazało się, iż myszy te pozbawione były nerek oraz miały nieprawidłowo zbudowany szkielet [46].

Konsekwencją zmian w strukturze oraz ekspresji genu Dally, występującego w genomie *Drosophila melanogaster*, są – podobnie jak u człowieka – zaburzenia rozwojowe, które zwykle nie są letalne dla muchy, a prowadzą jedynie do nieprawidłowej morfogenezy oczu i narządów płciowych [46].

FUNKCJE GLIPIKANÓW

Badania genetyczne, biologiczne i biochemiczne wykazały jak ważną rolę pełnią gliplikany w procesach morfogenezy, kontroli wzrostu komórek, czy regulacji właściwości biologicznych niektórych czynników wzrostowych [1,2,9,13,18,19,24,-27,30,33,35,38,41,57]. Bonneh-Barkay i wsp. [8] wykazali, iż obecność glipikanów na błonie komórkowej jest niezbędna do interakcji pomiędzy zasadowym (bFGF) lub kwaśnym (aFGF) czynnikiem wzrostowym fibroblastów a ich receptorem (FGFR). Badania dowiodły, iż powyższe oddziaływania możliwe są jedynie w obecności łańcuchów siarczanu heparanu, będących koreceptorem dla FGFR. Pozbawienie glipikanów ich części glikanowej uniemożliwiało przekazywanie sygnału do komórki [3, 47]. Gliplikany wykazują działanie osłonowe wobec FGF, chroniąc wspomniany czynnik wzrostowy przed proteinazami a także – kwaśną i ciepłą inaktywacją. Co więcej, mają zdolność przywracania biologicznych właściwości zinaktywowanym cieplnie FGF [14]. Gliplikany modulują także odpowiedź mitogenną keratynocytów na KGF (czynnik wzrostowy keratynocytów) oraz aFGF [8]. W keratynocytach, wytwarzających receptor dla ich czynnika (KGFR), gliplikany znacznie ograniczają odpowiedź mitogenną wspomnianych komórek na KGF. Natomiast połączenie omawianych proteoglikanów z aFGF – nasila proces podziału mitotycznego. Jednym z efektów współdziałania glipikanów i FGF jest kontrola procesów embriogenezy u kręgowców [37].

W trakcie rozwoju zarodkowego, gliplikany pojawiają się na powierzchni komórek nie podzielonej przyśrodkowej mezodermy. Następnie – podczas podziału mezodermy – ekspresja genów glipikanów staje się najsilniejsza, utrzymując się na tym poziomie do momentu uformowania się młodych somitów. Zawartość glipikanów

w dojrzałych somitach znacznie się obniża. Proteoglikany te skupiają się w centralnej części omawianych struktur, nie występując na powierzchni bocznej somitów [37].

Spośród całej rodziny glipikanów, jedynie glipikan 1 oddziałuje z naczyniowo-śródbłonkowym czynnikiem wzrostowym (VEGF) – stymulującym angiogenezę, naprawy tkankowe, procesy zapalne, a także – tworzenie wolnych rodników. Powstające przy udziale VEGF wolne rodniki, prowadzą do oksydacyjnej modyfikacji wymienionej makrocząsteczki. Glipikan 1, ma zdolność przywracania biologicznej aktywności utlenionemu VEGF oraz ochrony przed niszczącymi go czynnikami [14]. Glipikan 3, stymuluje insulino-podobny czynnik wzrostowy 2 (IGF2) dołączenia się z receptorem IGF2R [48]. Stwierdzono ponadto, iż w przebiegu zespołu Simpsona-Golabiego-Behmela, zmienionej strukturze glipikanu 3 czy też – brakowi tego PG, towarzyszy zwiększony poziom IGF-2 w ustroju. Myszy transgeniczne, obarczone mutacją w zakresie genu GPC3, cechowały się – podobnie jak u człowieka – nieprawidłową budową kośćca, równocześnie, zwiększony poziom IGF-2 hamował procesy apoptozy, wywołane mutacją genu GPC3 [15]. Cytowani wyżej autorzy analizowali możliwość istnienia związku między zjawiskiem apoptozy a nieprawidłowościami w strukturze glipikanu 3, wynikającymi z nieobecności łańcuchów siarczanu heparanu – bądź łańcucha glikozylofosfatydylinozytolu. Stwierdzili oni,

TABELA 2. Ogólna charakterystyka glipikanów człowieka

Nazwa proteoglikanu	Nazwa genu	Wielkość cDNA [pz]	Ilość eksonów	Lokalizacja chromosomalna	Liczba reszt aminokwasowych	Występowanie proteoglikanu
Glipikan 1	GPC1	3692	9	2q35-q37	558	Komórki mięśnia sercowego płodu, fibroblasty płucne
Glipikan 2 (Cerebroglikan)	GPC2	2631	9	nie znana	579	Mózg płodu, włókna nerwowe płodu
Glipikan 3 (OCI-5)	GPC3	2200	8	Xq26.1	588	Embrionalna mezoderma, entoderma, ektoderma
Glipikan 4 (K-glipikan)	GPC4	~3700	9	Xq26.1	556	Mózg i nerki płodu
Glipikan 5	GPC5	2558	8	13q32	572	Mózg, płuca i wątroba płodu, dojrzały mózg
Glipikan 6	GPC6	2747	9	13q32	555	Embrionalna mezenchyma, nerki płodu, dojrzałe jajniki

że pozbawienie proteoglikanu łańcuchów siarczanu heparanu nie eliminuje apoptozy, zaś odłączenie łańcucha glikozylofosfatydyloinozytolu skutecznie hamowało śmierć komórek [15]. Poza czynniki wzrostowymi, glikoproteiny mogą wiązać enzymy, do których należą lipaza lipoproteinowa i trombina oraz jej inhibitor – antytrombina [46].

Ekspresja poszczególnych genów glikoprotein jest zwykle narządowo specyficzna, jednak najliczniej glikoproteiny występują w tkance nerwowej oraz w tkankach embrionalnych (tab. 2) [46]. W tkankach osobników dojrzałych, spotyka się jedynie glikoproteiny 1, 5 i 6 [46].

PIŚMIENNICTWO

- [1] ASUNDI VK, KEISTER BF, CAREY DJ. Organization, 5'-flanking sequence and promoter activity of the rat GPC1 gene. *Gene* 1998; **206**: 255–261.
- [2] ASUNDI VK, KEISTER BF, STAHL RC, CAREY DJ. Developmental and cell-type-specific expression of cell surface heparan sulfate proteoglycans in the rat heart. *Exp Cell Res* 1997; **230**: 145–153.
- [3] BERMAN B, OSTROVSKY O, SHLISSEL M, LANG T, REGAN D, VLODAVSKY I, ISHAI-MICHAELI R, RON D. Similarities and differences between the effect of heparin and glypican-1 on the bioactivity of fibroblast growth factor and keratinocyte growth factor. *J Biol Chem* 1999; **274**: 36132–16238.
- [4] BERNFIELD M, GÖTTE M, WOO PARK P, REIZES O, FITZGERALD ML, LICECUM J, ZAKO M. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* 1999; **68**: 729–777.
- [5] BOBIŃSKI R, OLCZYK K, KRZYŻOWSKA-BOBIŃSKA E. Małe proteoglikany śródmiąższowe – genetyczne różnice i podobieństwa. *Post Biochem* 1998; **44**: 64–71.
- [6] BOBIŃSKI R, OLCZYK K, KRZYŻOWSKA-BOBIŃSKA E. Proteoglikany agregujące z kwasem hialuronowym. *Post Biochem* 1998; **44**: 245–251.
- [7] BOBIŃSKI R, OLCZYK K, KRZYŻOWSKA-BOBIŃSKA E, JANIC W. Syndekany-proteoglikany transmembranowe. *Post Biol Kom* 1999; **3**: 477–490.
- [8] BONNEH-BARKAY D, SHLISSEL M, BERMAN B, SHAOUL E, ADMON A, VLODAVSKY I, CAREY DJ, ASUNDI VK, REICH-SLOTKY R, RON D. Identification of glypican as a dual modulator of the biological activity of fibroblast growth factor. *J Biol Chem* 1997; **272**: 12415–12421.
- [9] BRANDAN E, CAREY DJ, LARRAIN J, MELO F, CAMPOS A. Synthesis and processing of glypican during differentiation of skeletal muscle cells. *Eur J Cell Biol* 1996; **71**: 170–176.
- [10] DAVID G. Integral membrane heparan sulfate proteoglycans. *FASEB J* 1993; **7**: 1023–1030.
- [11] DAVID G, LORIES V, DECOCK B, MARYNEN P, CASSIMAN JJ, Van den BERGHE H. Molecular cloning of a phosphatidylinositol-anchored membrane heparan sulfate proteoglycan from human lung fibroblast. *J Cell Biol* 1990; **111**: 3165–3176.
- [12] FILMUS J, SHI W, WONG ZW, WONG MJ. Identification of a new membrane-bound heparan sulphate proteoglycan. *Biochem J* 1995; **311**: 561–565.
- [13] GALLAGHER JT, TURNBULL JE. Heparan sulphate in the binding and activation of basic fibroblast growth factor. *Glycobiology* 1992; **2**: 523–528.
- [14] GENGRINOVICH S, BERMAN B, DAVID G, WITTE L, NEUFELD G, RON D. Glypican-1 is a VEGF₁₆₅ binding proteoglycan that acts as an extracellular chaperone for VEGF₁₆₅. 1999; **274**: 10816–10822.

- [15] GONZALEZ AD, KAYA M., SHI W, SONG H, TESTA JR, PENN LZ, FILMUS J. OCI-5/GPC3, a glypican encoded by a gene that is mutated in the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome, induces apoptosis in a cell line-specific manner. *J Cell Biol* 1998; **141**: 1407–1414.
- [16] HINKES MT, GOLDBERGER OA, NEUMAN PE, KOKENYESI R, BERNFIELD M. Murine gene structure suggests that syndecan belongs to an evolutionary distinct class of proteoglycan. *J Biol Chem* 1993; **268**: 114480–11448.
- [17] HUBER R, CRISPONI L, MAZZARELLA R, CHEN CN, SU Y, SHIZUYA H, CHEN EY, CAO A, PILIA G. Analysis of exon/intron structure and 400 kb genomic sequence surrounding the 5-promoter and 3-terminals ends of the human glypican (GPC3) gene. *Genomics* 1997; **45**: 48–58.
- [18] HUBER R, HANSEN RS, STRAZZULLO M., PENGUE G, MAZZARELLA R, DURSO M., SCHLESSINGER D, PILIA G, GARTLER SM, DESPOSITO M. DNA methylation in transcriptional repression of two differentially expressed X-linked genes, GPC3 and SYBL1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 616–621.
- [19] HUBER R, MAZZARELLA R, CHEN CN, CHEN E, IRELAND M., LINDSAY S, PILIA G, CRISPONI L. Glypican 3 and glypican 4 are juxtaposed in Xq26.1. *Gene* 1998; **225**: 9–16.
- [20] HUBER R, SCHLESSINGER D, PILIA G. Multiple Sp1 sites efficiently drive transcription of the TATA-less promoter of the human glypican 3 (GPC3) gene. *Gene* 1998; **214**: 35–44.
- [21] IOZZO RV. The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1997; **32**: 141–174.
- [22] IOZZO RV, DANIELSON KG. Transcriptional and posttranscriptional regulation of proteoglycans gene expression. *Prog Nucl Acid Res Mol Biol* 1999; **62**: 19–53.
- [23] IOZZO RV, MURDOCH AD. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perpectives in molecular diversity and function. *FASEB J* 1996; **10**: 598–614.
- [24] IVINS JK, LITWACK ED, KUMBASAR A, STIPP CS, LANDER AD. Cerebroglycan, a developmentally regulated cell-surface heparan sulfate proteoglycan, is expressed on developing axons and growth cones. *Dev Biol* 1997; **184**: 320–332.
- [25] IWATA Y, SHINOMURA T, KURITA K, ZAKO M, KIMATA K. The gene structure and organization of mouse PG-Lb, a small chondroitin/dermatan sulphate proteoglycan. *Biochem J* 1998; **331**: 959–964.
- [26] JACKSON SM, NAKATO H, SUGIURA M., JANNUZI A, OAKES R, KALUZA V, GOLDEN C, SELLECK SB. Dally, a *Drosophila* glypican, controls cellular responses to the TGF- β -related morphogen, Dpp. *Development* 1997; **124**: 4113–4120.
- [27] KARTHIKEYAN L, FLAD M, ENGEL M, MEYER-PUTTLITZ B, MARGOLIS RU, MARGOLIS RK. Immunocytochemical and *in situ* hybridization studies of the heparan sulfate proteoglycan, glypican, in nervous tissue. *J Cell Sci* 1994; **107**: 3213–3222.
- [28] KIELLEN L, LINDAHL U. Proteoglycans; structures and interactions. *Annu Rev Biochem* 1991; **60**: 443–475.
- [29] LARRAIN J, CIZMECI-SMITH G, TRONCOSO V, STAHL RC, CAREY DJ, BRANDAN E. Syndecan-1 expression is down-regulated during myoblast terminal differentiation. *J Biol Chem* 1997; **272**: 18418–18424.
- [30] LI M., CHOO B, WONG ZM, FILMUS J, BUICK RN. Expression of OCI-5/glypican 3 during intestinal morphogenesis: regulation by cell shape in intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res* 1997; **235**: 3–12.
- [31] LI H, SCHWARTZ NB. Gene structure of chick cartilage chondroitin sulfate proteoglycan (aggrecan) core protein. *J Mol Evol* 1995; **41**: 878–885.
- [32] LIANG Y, ANNAN RS, CARR SA, POPPS, MEVISSSEN M, MARGOLIS RK, MARGOLIS RU. Mammalian homologues of the *Drosophila* slit protein are ligands of heparan sulfate proteoglycan glypican-1 in brain. 1999; **274**: 17885–17892.

- [33] LIU W, LITWACK ED, STANLEY MJ, LANGFORD JK, LANDER AD, SANDERSON RD. Heparan sulfate proteoglycans as adhesive and anti-invasive molecules. *J Biol Chem* 1998; **273**: 22825–22832.
- [34] MAST AE, HIGUCHI DA, HUANG ZF, WARSHAWSKY I, SCHWARTZ AL, BROZE GJ, Jr. Glypican-3 is a binding protein on the HepG2 cell surface for tissue factor pathway inhibitor. *Biochem J* 1997; **327**: 577–583.
- [35] MERTENS G, Van der SCHUEREN B, Van den BERGHE H, DAVID G. Heparan sulfate expression in polarized epithelial cells: the apical sorting of glypican (GPI-anchored proteoglycan) is inversely related to its heparan sulfate content. *J Cell Biol* 1996; **132**: 487–497.
- [36] NAKATO H, FUTCH TA, SELLECK SB. The division abnormally delayed (dally) gene: a putative integral membrane proteoglycan required for cell division patterning during postembryonic development of nervous system in *Drosophila*. *Development* 1995; **121**: 3687–3702.
- [37] NIU S, ANTIN PB, AKITOTO K, MORKIN E. Expression of avian glypican is developmentally regulated. *Dev Dynamics* 1996; **207**: 25–34.
- [38] NOSJEANO, BRIOLAY A, ROUX B. Mammalian GPI proteins: sorting, membrane residence and functions. *Biochem Biophys Acta* 1997; **1331**: 153–186.
- [39] PAINE-SAUNDERS S, VIVIANO BL, SAUNDERS S. GPC6, a novel member of the glypican gene family, encodes a product structurally related to GPC4 and is colocalized with GPC5 on human chromosome 13. *Genomics* 1999; **57**: 455–458.
- [40] PELLEGRINI M., PILIA G, PANTANO S, LUCCHINI F, UDA M, FUMI M, CAO A SCHLESSINGER D, FORABOSCO A. GPC3 expression correlates with the phenotype of the Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *Dev Dynamics* 1998; **213**: 431–439.
- [41] PILIA G, HUGHES-BENZIE RM, MacKENZIE A, BAYBAYAN P, CHEN EY, HUBER R, NERI G, CAO A, FORABOSCO A, SCHLESSINGER D. Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome. *Nat Gen* 1996; **12**: 241–247.
- [42] RAUCH U, GRIMPE B, KULBE G, ARNOLD-AMMER I, BEIER DR, FÄSSLER R. Structure and chromosomal localization of the mouse neurocan gene. *Genomics* 1995; **28**: 405–410.
- [43] RAUCH U, MEYER H, BRAKEBUSCH C, SEIDENBECHER C, GUNDELFINGER ED, BEIER DR, FÄSSLER R. Sequence and chromosomal localization of the mouse brevican gene. *Genomics* 1997; **44**: 15–21.
- [44] SALVIMIRTA M., JALKANEN M. Syndecan family of cell surface proteoglycans: developmentally regulated receptors for extracellular effector molecules. *Experientia* 1995; **51**: 863–872.
- [45] SEIDENBECHER CI, GUNDELFINGER ED, BÖCKERS TM, TROTTER J, KREUTZ MR. Transcripts for secreted and GPI-anchored brevican are differentially distributed in rat brain. *Eur J Neurosci* 1998; **10**: 1621–1630.
- [46] SELLECK SB. Genetic analysis of function for cell surface proteoglycans. *Matrix Biol* 1998; **17**: 473–476.
- [47] SELLECK SB. Proteoglycans and pattern formation. *Trend Genet* 2000; **16**: 206–212
- [48] SONG HH, SHI W, FILMUS J. OCI-5/rat glypican-3 binds to fibroblast growth factor-but not to insulin-like growth factor-2. *J Biol Chem* 1997; **272**: 7574–7577.
- [49] STIPP CS, LITWACK ED, LANDER AD. Cerebroglycan: an integral membrane heparan sulfate proteoglycan that is unique to the developing nervous system and expressed specifically during neuronal differentiation. *J Cell Biol* 1992; **124**: 149–160.
- [50] UNGEFROREN H, KRULL NB. Transcriptional regulation of the human biglycan gene. *J Biol Chem* 1996; **271**: 15787–15795.
- [51] VEUGELERS M, DE CAT B, CEULEMANS H, BRUYSTEN AM, COOMANS C, DÜRR J, VERMEESCH J, MARYNEN P, DAVID G. Glypican-6, a new member of glypican family of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 1999; **274**: 26968–26977.

- [52] VEUGELERS M, VERMEESCH J, REEKMANS G, STANFIELD R, MARYNEN P, DAVID G. Characterization of glypican-5 and chromosomal localization of human GPC5, a new member of the glypican gene family. *Genomics* 1997; **40**: 24–30.
- [53] VEUGELERS M., VERMEESCH J, WATANABE K, YAMAGUCHI Y, MARYNEN P, DAVID G. GPC4, the gene for human K-glypican, flanks GPC3 on Xq26: deletion of GPC3-GPC4 gene cluster in one family with Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *Genomics* 1998; **53**: 1–11.
- [54] WATANABE K, YAMADA H, YAMAGUCHI Y. K-glypican: a novel GPI-anchored heparan sulfate proteoglycan that is highly expressed in developing brain and kidney. *J Cell Biol* 1995; **130**: 1207–1218.
- [55] WĘGROWSKI Y, PILLARISETTI J, DANIELSON KG, SUZUKI S, IOZZORV. The murine biglycan: complete cDNA cloning, genomic organization, promoter function, and expression. *Genomics* 1995; **30**: 8–17.
- [56] WEKSBERG R, SQUIRE JA, TEMPLETON DM. Glypicans: a growing trend. *Nat Gen* 1996; **12**: 224–227.
- [57] WILLIAMSON TG, MOK SS, HENRY A, CAPPARI R, LANDER AD, NURCOMBE V, BEYREUTHER K, MASTERS CL, SMALL DH. Secreted glypican binds to the amyloid precursor protein of Alzheimer disease (APP) and inhibits APP-induced neurite outgrowth. *J Biol Chem* 1996; **271**: 31215–31221.

Redaktor prowadzący – W. Kilarski

Otrzymano: 10.07.2000 r.

Przyjęto: 19.09. 2000 r.

Adres autorów: ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec

BIOCHEMICZNE I MOLEKULARNE ASPEKTY STARZENIA SIĘ LIŚCI

BIOCHEMICAL AND MOLECULAR ASPECTS OF LEAF SENESCENCE

Ewa SIMEONOVA, Agnieszka MOSTOWSKA

Zakład Anatomii i Cytologii Roślin, Uniwersytet Warszawski

Streszczenie: Starzenie się jest ważnym procesem w cyklu życiowym rośliny, bezpośrednio poprzedzającym śmierć wybranej grupy komórek, określonych organów np. liści, lub całych organizmów. Zapoczątkowanie starzenia się liści, jak również jego prawidłowy przebieg wymaga ekspresji szeregu specyficznych genów, z których największą poznaną rodzinę stanowią tzw. geny *sags* - *senescence-associated genes*. Zidentyfikowano wiele genów, których produktami białkowymi są enzymy uczestniczące podczas starzenia się w procesach degradacyjnych, takie jak: proteazy, nukleazy, a także enzymy zaangażowane w metabolizm lipidów i węglowodanów. Kondensacja chromatyny na terenie jądra, a także nieprzypadkowa internukleosomalna fragmentacja jądrowego DNA (nDNA), jak również występowanie w starzejących się komórkach mezofilu specyficznych nukleaz oraz proteaz cysteinowych wskazują, iż proces starzenia się liści angażuje mechanizmy programowanej śmierci komórkowej (PCD). (*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28: 17–32)

Słowa kluczowe: geny *sags*, internukleosomalna fragmentacja jądrowego DNA, mezofil, programowana śmierć komórkowa (PCD), proteazy cysteinowe, starzenie się liści.

Summary: Senescence is a developmental stage of the plant life cycle, leading to the death of specific cells, organs for instance leaves, or whole organisms. Initiation of the leaf senescence and its normal process require expression of many specific genes, called senescence-associated genes – *sags*. Different senescence-enhanced genes encoding degradative enzymes such as: proteases, nucleases, also enzymes involved in lipid and carbohydrate metabolism, enzymes involved in nitrogen mobilization, were identified. Significant chromatin condensation, non-random, internucleosomal fragmentation of nuclear DNA (nDNA) and enhanced expression of genes, of which products are specific cysteine proteases in senescing mesophyll prove, that leaf senescence is genetically defined process involving mechanisms of the programmed cell death (PCD).

(*Advances in Cell Biology* 2001; 28: 17–32)

Key words: cysteine proteases, internucleosomal fragmentation of nuclear DNA, leaf senescence, mesophyll, programmed cell death (PCD), *sags* genes.

GENETYCZNA KONTROLA PROCESU STARZENIA SIĘ LIŚCI

Zapoczątkowanie procesu starzenia się liści, jak również jego prawidłowy przebieg wymaga ekspresji szeregu specyficznych genów, z których największą poznaną rodzinę stanowią tzw. geny *sags* – *senescence-associated genes* [4, 6, 9].

Wyniki badań potwierdzające zaangażowanie mechanizmów genetycznych w regulowaniu procesu starzenia się dotyczą:

- 1) starzenia się komórek mezofilu pozbawionych jądra;
- 2) zastosowania specyficznych inhibitorów syntezy RNA oraz białek;
- 3) zastosowania mutantów obarczonych defektem przebiegu starzenia się liści;
- 4) zastosowania technik molekularnych, takich jak: translacja *in vitro* przy użyciu mRNA wyizolowanego z zielonych oraz starzejących się liści czy tworzenie klonów cDNA genów ulegających wzmocnionej ekspresji w czasie starzenia się liści;
- 5) zastosowania roślin transgenicznych [28].

Większość poznanych genów zaangażowanych w procesie starzenia się liści to geny jądrowe, z wyjątkiem genu *cytG* tzw. *stay green* u soi [4, 6, 27, 28, 29]. Wiadomo, iż chloroplasty w protoplastach mezofilu z liści *Elodea* starzeją się według typowego dla nich wzorca, zaś w protoplastach pozbawionych jąder nie podlegają starzeniu się. Podobne obserwacje poczyniono dla jednokomórkowego glonu *Acetabularia*, którego cykl życiowy znacznie się wydłuża, gdy z komórki zostanie usunięte jądro [28]. Zastosowanie aktynomycyny D, inhibitora specyficznego dla DNA–zależnej syntezy RNA, spowodowało wstrzymanie starzenia się liści i płatków kwiatowych. Cykloheksimid hamujący syntezę białek na rybosomach cytoplazmatycznych i jemu podobne substancje, mają właściwość opóźniania starzenia się, podczas gdy chloramfenikol, hamujący syntezę białek na rybosomach chloroplastowych, w większości badanych przypadków nie wykazuje tej właściwości. Dane te dowodzą, że starzenie się liści jest procesem przebiegającym z zaangażowaniem głównie genów jądrowych oraz białek syntetyzowanych na terenie cytoplazmy. Nie można jednak wykluczyć zaangażowania w procesie starzenia się liści genów chloroplastowych oraz białek syntetyzowanych na terenie chloroplastów. Badania przeprowadzone z użyciem inhibitorów sugerują, iż indukcja procesu starzenia się zachodzi poprzez włączenie pewnych specyficznych genów, nie zaś przez zniesienie ekspresji już działających genów [28]. Obniżenie poziomu ekspresji określonych genów np. zaangażowanych w procesie fotosyntezy [1], a także zupełne wygaśnięcie ich ekspresji, jest prawdopodobnie konieczne, aby zapobiec regeneracji na poziomie komórkowym/subkomórkowym. Identyfikacja genów ulegających specyficznej ekspresji w czasie starzenia się liści jest bezpośrednim dowodem, iż do zainicjowania oraz prawidłowego przebiegu tego procesu niezbędna jest transkrypcja *de novo*.

Szereg genów, których ekspresja ulega wzmocnieniu lub jest specyficzna dla procesu starzenia się zostało wyizolowanych przy użyciu metody tworzenia klonów cDNA [4, 6, 29]. Klony zawierają informację dla mRNA występujących tylko w starzejących się liściach, zaś nieobecnych w tkankach młodych, lub mRNA, których poziom znacząco wzrasta w czasie starzenia się w porównaniu z poziomem w liściach zielonych. Powyższa metoda zwana *differential screening* pozwoliła zidentyfikować ekspresję genów *sags* związanych ze starzeniem się liści (*senscence-related genes; senscence-associated genes – sags*) takich roślin, jak: *Arabidopsis* [11, 21], *Brassica napus* [3], *Zea* [37]. Niestety metoda ta znajduje zastosowanie tylko w przypadku, gdy gen reprezentowany przez dany klon cDNA ulega ekspresji w badanej tkance na bardzo wysokim poziomie. Wyselekcjonowane klony cDNA wykazujące podwyższony poziom określonych transkryptów w starzejącej się tkance używa się w dalszych eksperymentach z zastosowaniem hybrydyzacji Northern w celu scharakteryzowania wzoru ich ekspresji (tzn. momentu indukcji ekspresji oraz jej poziomu) w czasie rozwoju liścia, a także w innych organach w cyklu życiowym rośliny [4]. Na podstawie takich analiz wyróżniono 6 klas genów zaangażowanych w czasie starzenia się liści (tab. 1).

TABELA 1. Ekspresja genów zaangażowanych w starzenie się liści (na podstawie Buchanan-Wollaston [4])

Klasa	Czas ekspresji genów	Charakterystyka klasy
I	Stały poziom ekspresji w czasie rozwoju liścia	Geny metabolizmu podstawowego; niespecyficzne dla starzenia się
II	Ekspresja w zielonych liściach; Wyłączone przed pojawieniem się jakichkolwiek symptomów starzenia się	Produkty białkowe aktywowane w dalszych etapach starzenia się
III	Ekspresja w zielonych liściach, wyłączone przed pojawieniem się jakichkolwiek symptomów starzenia się	Produkty białkowe prawdopodobnie biorą udział w indukcji starzenia się (sygnałem może być ich brak)
IV	Ekspresja tuż przed rozpoczęciem starzenia się bądź na początku procesu przez stosunkowo krótki czas	Geny regulatorowe
V	Ekspresja w czasie procesu starzenia się aż do śmierci komórki	Geny zaangażowane w proces remobilizacji różnych związków
VI	Ekspresja w czasie procesu starzenia się aż do śmierci komórki	Geny odpowiedzialne za mobilizację materiałów zapasowych, które mogą być wykorzystane w innych stadiach rozwoju rośliny

CHARAKTERYSTYKA GENÓW I ICH PRODUKTÓW BIAŁKOWYCH ZANGAŻOWANYCH W PROCESY DEGRADACYJNE PODCZAS STARZENIA SIĘ LIŚCI

Geny kodujące proteazy i ich rola

Najbardziej znaczącym procesem podczas starzenia się komórek mezofilu jest niewątpliwie degradacja białek. Większość białek w komórkach fotosyntetyzujących zawarta jest w chloroplastach (>60%), stąd też inicjacja proteolizy prawdopodobnie ma miejsce w tych organellach [2, 4, 32]. W chloroplastach *Arabidopsis* wykryto podjednostki ClpP oraz ClpC ATP-zależnej proteazy, jednakże ekspresja genu dla tego białka zachodzi nieprzerwanie w czasie całego rozwoju liścia. Przyjęto, iż proteaza ta nie należy do specyficznych dla procesu starzenia się liści [2, 4]. Oczywiście proteazy zawarte są w centralnych wakuolach komórek mezofilu, gdzie wykryto największą aktywność proteolityczną [2, 4]. Przypuszcza się, że istnieje dotąd nie opisany mechanizm transportu do wakuoli białek przeznaczonych do degradacji w kolejnych etapach starzenia się oraz ich degradacja w tymże organellum [2, 4, 29]. Udało się wyodrębnić kilka genów, których ekspresja jest znacznie wzmocniona w czasie starzenia się. Geny te, wyizolowane z *Zea* (*see-1*), *Arabidopsis* (klony SAG2, SAG12) i *Brassica napus* (klon LSC-7) charakteryzują się sekwencją zbliżoną do sekwencji genów, których produkty są proteazami z klasy proteaz cysteinowych, reprezentowanych przez proteazy specyficzne dla kiełkujących ziarniaków zbóż, które uczestniczą w mobilizacji białek zapasowych (np. oryzano- γ proteaza występująca w ziarniakach ryżu) [4, 11, 21, 37]. Jedną ze znanych proteaz cysteinowych, której zawartość wzrasta w czasie starzenia się liści, reprezentowana przez klon cDNA SAG 12, wykazuje podobieństwo w swej sekwencji aminokwasowej do proteazy papainowej [4, 21]. Inna proteaza cysteinowa pochodząca z *B. napus*, reprezentowana przez klon cDNA LSC790, jest obecna we wszystkich stadiach rozwoju liścia i występuje także w kwiatach i kiełkujących nasionach [4]. Poziom transkryptu w tym przypadku jest wysoki w młodych, zielonych liściach, następnie spada w liściach dojrzałych, po czym w starzejących się komórkach ponownie znacząco wzrasta (podobną sekwencję do genu z klonu LSC790 ma gen z klonu RD19 kodujący proteazę cysteinową wyizolowaną z *Arabidopsis*, pojawiającą się w komórkach liści w czasie deficytu wodnego). Klon LSC760 wyodrębniony z *B. napus*, zawiera gen, którego produktem jest proteaza asparaginianowa. Gen ten ulega ekspresji na zbliżonym poziomie w liściach młodych i dojrzałych jeszcze zielonych, zaś w starzejącej się tkance liścia jego ekspresja znacząco wzrasta [4]. U *Zea* wyizolowano gen *see-2*, który ulega ekspresji w czasie starzenia się, a proteaza cysteinowa będąca jego produktem jest podobna do enzymu biorącego udział w procesie prowadzącym do uaktywnienia enzymów zawartych w wakuoli w nasionach *Ricinus* [37]. Wzór ekspresji tego genu sugeruje, że pewne geny

kodujące enzymy uczestniczące w procesach degradacyjnych związanych ze starzeniem się są transkrybowane w czasie całego rozwoju liścia, a ich produkty pozostają w formie nieaktywnej wewnątrz wakuoli; ich aktywacja zachodzi przy udziale specyficznych enzymów w czasie przebiegu starzenia się. Lokalizacja proteaz syntetyzowanych w kolejnych etapach starzenia się nie została określona. Analiza sekwencji dwóch proteaz cysteinowych oraz proteazy asparaginianowej, wyizolowanych z *B. napus* wskazuje, że wszystkie zawierają podobny N-region hydrofobowy, prawdopodobnie odpowiedzialny za kierowanie białka do siateczki śródplazmatycznej. Nie wykryto sekwencji, która wskazywałaby na transport tych proteaz do chloroplastów. Jednakże istnieją dane, uzyskane przy zastosowaniu immunodetekcji, wskazujące, iż proteaza cysteinowa, kodowana przez gen z klonu LSC7 w starzejącym się mezofilu liści *B. napus*, zlokalizowana jest w chloroplastach [4].

Istnieją doniesienia dotyczące zaangażowania szlaku ubiquitynowego w procesy degradacyjne białek w starzejących się komórkach liści. Wzmocnioną ekspresję dwóch genów kodujących białka ubiuitynowe (typu E2) wykazano w starzejących się liściach *Nicotiana silvestris*. Podobnie gen *ubi-3*, kodujący poliubiquitynę u ziemniaka charakteryzuje się podwyższonym poziomem ekspresji w czasie starzenia się komórek mezofilu [2, 4, 29]. Wiadomo, iż szlak ubiuitynowy odpowiedzialny jest w komórce za degradację np. białek o nieprawidłowej strukturze lub innych białek, których obecność w cytoplazmie jest zbędna, oraz białek o krótkim czasie trwania i funkcjonowania. Dlatego też przypuszcza się, że ubiuitynowy system degradacji białek dotyczy specyficznych białek cytosolowych [2, 4, 29].

Geny odpowiedzialne za wtórny metabolizm azotu

Bezpośrednim produktem proteolizy są znaczne ilości aminokwasów, które mogą być toksyczne dla komórki. Aminokwasy podlegają deaminacji i są przetwarzane w formy mniej toksyczne, oraz łatwiejsze do transportu takie jak: amidy, glutamina i asparagina [4, 17, 28, 42]. Z komórek mezofilu wyodrębniono dwie formy syntazy glutaminowej (GS1 i GS2), enzymu uczestniczącego w przetwarzaniu azotu zawartego w makrocząsteczkach w glutaminę. GS1 zlokalizowano w cytoplazmie, zaś GS2 jest formą plastydową. W czasie starzenia liści poziom aktywności GS1 wzrasta. W mezofilu kilku gatunków roślin głównie w komórkach wokół wiązek przewodzących wykazano wzmożoną ekspresję genu dla GS1. GS2 wykryto na terenie tkanki fotosyntetyzującej. Wiadomo, że aktywność GS2 w czasie starzenia się maleje [17]. W starzejącej się tkance mezofilu u *Asparagus* ujawniono wzmocnioną ekspresję genu kodującego syntazę asparaginową (klon pTIP12) zaangażowaną w syntezę asparaginy – dogodnej do transportu formy związanego azotu [4].

Geny zaangażowane w degradację RNA

Spadek całkowitej zawartości RNA jest wiązany z działalnością rybonukleaz (RNaz). Wiadomo, że w starzejących się liściach *Arabidopsis* ekspresji na wysokim poziomie ulegają geny kodujące 3 RNazy, o których wiadomo, że ulegają również wzmocnionej ekspresji podczas deficytu fosforu. Przypuszcza się, iż produkty tych genów odgrywają ważną rolę w degradacji RNA oraz uczestniczą w metabolizmie grup fosforanowych [4]. Losy puryn i pirymidyn, będących produktem degradacji kwasów nukleinowych, nie są jasne. Przypuszcza się, że w ich przemiany zaangażowane są enzymy, takie jak oksydaza moczanowa i oksydaza ksantynowa, których podwyższoną ilość wykryto w peroksysomach starzejących się liści [4, 31, 42].

Enzymy występujące w peroksysomach starzejących się liści

Z peroksysomami związany jest szereg enzymów, których podwyższony poziom odnotowuje się w różnych fazach starzenia się. Należy do nich m.in. katalaza, enzym typowy dla peroksysomów [4, 31, 42]. Katalazy są obecne we wszystkich stadiach rozwoju liścia. Udało się wyizolować trzy geny dla katalaz *Nicotiana glauca* oraz gen dla katalazy *Brassica napus*. Wysoki poziom tej ostatniej zaobserwowano w późnym stadium starzenia się, kiedy – jak się przypuszcza – system peroksydazy askorbinianowej w chloroplastach traci swą aktywność. Katalaza wraz z wspomnianą peroksydazą, neutralizują w chloroplastach nadtlenek wodoru, produkowany w czasie fotoodychania w starzejącym się mezofilu. Peroksysomy zawarte w starzejących się komórkach liści, ze względu na procesy biochemiczne w nich przebiegające nazywane są zwykle glioksysomami [4, 23, 31, 42]. Zawierają one enzymy β -oksydacji kwasów tłuszczowych oraz enzymy cyklu glioksalanowego, między innymi liazę izocytrynianową i syntazę jabłczanową, a także enzymy glukoneogenezy [4, 31, 23, 42]. Vicentini i Matile [42] sugerują, że najlepszymi substratami dla tych enzymów są galaktolipidy pochodzące z degradacji błon. Ogólny poziom lipidów podczas starzenia się spada; te, które uwalniane są z błon, podlegają przemianom i stanowią źródło energii potrzebnej do procesu starzenia się. Poziom oddychania podczas starzenia się liści znacząco wzrasta, zaś poziom dostarczanych przez fotosyntezę substratów spada. Wyniki badań potwierdzają przypuszczenia dotyczące mobilizacji lipidów jako substratów do oddychania. Przemiany lipidów zachodzą w drodze β -oksydacji kwasów tłuszczowych oraz cyklu glioksalanowego i glukoneogenezy. W peroksysomach/glioksysomach starzejących się komórek mezofilu wykazano obecność enzymów charakterystycznych dla wymienionych powyżej procesów. Wiadomo, że specyficznej ekspresji związanej z zaawansowanym starzeniem się liścieni u ogórka ulegają geny liazy izocytrynianowej (produkt sekwencji z klonu ICL), syntazy jabłczanowej (produkt genu *ms*) oraz NAD-dehydrogenazy jabłczanowej (klon gMDH) [7, 23]. Inne enzymy związane z uwalnianiem i mobilizacją lipidów, których zawartość w starzejących się komórkach

znacząco wzrasta to: α -galaktolipaza (produkt z klonu pTIP11 u *Asparagus*), włączona w mobilizację galaktozy uwolnionej podczas degradacji galaktolipidów oraz fosfolipaza D (sekwencja z klonu PLD u *Ricinus*) przeprowadzająca hydrolizę fosfolipidów membranowych [4].

Geny o niewyjaśnionej funkcji ulegające specyficznnej ekspresji podczas starzenia się liści

Wyizolowano i scharakteryzowano geny, które ulegają ekspresji w czasie starzenia się liści, a których rola nie jest do końca zrozumiała. Przykładem są dwa geny *Brassica napus*, których produktami są białka o charakterze metalotioneiny (klon LSC54) i ferrytyny (klon LSC30) wiążące jony metali [3, 4, 5]. Ferrytyna wiąże jony żelaza, metalotioneina zaś jony metali dwuwartościowych uwolnione w czasie proteolizy. Prawdopodobnie białka te biorą udział w magazynowaniu i transporcie uwolnionych jonów, jednocześnie zabezpieczając komórkę przed ich toksycznym działaniem. Wiadomo, że w komórkach zwierzęcych metalotioneiny uczestniczą w procesach zapobiegających uszkodzeniom DNA wywołanym przez wolne rodniki [3,4]. Degradacja błon oraz rozkład chlorofilu powoduje wzrost poziomu wolnych rodników. Być może w komórkach starzejącego się mezofilu metalotioneina również bierze udział w zapobieganiu uszkodzeniom DNA.

W czasie starzenia się liści kukurydzy wykryto wzmocnienie ekspresji genu z klonu GSTII-27 oraz wzrost aktywności jego produktu białkowego, którym jest S-transferaza glutationowa. Enzym ten prawdopodobnie uczestniczy w zabezpieczeniu komórki przed nadtlenkiem wodoru [4, 29]. Wiadomo, iż jest on odpowiedzialny za detoksykację herbicydów przez wiązanie glutationu. Glutation stanowi jeden z elementów systemu detoksyfikującego peroksydazy askorbinianowej (szlak Halliwell-Asady), działającego na terenie chloroplastów, eliminującego nadtlenek wodoru [25]. Związek ten uczestniczy w regeneracji askorbinianu z dehydroaskorbinianu. Zredukowany glutation (G-SH) inaktywuje wolne rodniki (np. hydroksylowe) dzięki obecności grup SH przy udziale peroksydazy glutationu. Związek ten wchodzi w reakcję z tlenem singletowym oraz zabezpiecza przed utlenieniem grupy tiolowe enzymów [25]. Innym genem, wykazującym wzmocnioną ekspresję podczas starzenia się liści, jest gen kodujący ATP-sulfurylaza u *B. napus* (z klonu LSC680) [4]. W pierwszych etapach biosyntezy cysteiny i metioniny enzym ten, w obecności ATP aktywuje reszty siarczanowe. Przypuszcza się, iż w metabolizmie siarki bierze także udział wspomniana wyżej S-transferaza glutationu [4].

U *B. napus* zidentyfikowano również trzy geny dla cytochromu P450 (klony LSC550, LSC260, LSC226), które nie wykazują aktywności w liściach zielonych, zaś w starzejących się liściach poziom ich ekspresji znacznie wzrasta [4]. Cytochrom P450 w komórkach roślinnych jest kluczowy w szlakach biosyntezy metabolitów wtórnych między innymi: flawonoidów, fitoaleksyn i lignin.

Podane przykłady wyodrębnionych i scharakteryzowanych genów oraz ich białkowych produktów stanowią tylko część tych wszystkich, które zostały zidentyfikowane w latach dziewięćdziesiątych. Identyfikacja genów, które ulegają ekspresji specyficznemu podczas starzenia się jest najlepszym dowodem na to, że transkrypcja *de novo* jest koniecznym warunkiem dla indukcji oraz prawidłowego przebiegu procesu starzenia się liści. Sklonowanie genów zaangażowanych w tym procesie umożliwiło określenie czasu i poziomu ich ekspresji, miejsca aktywności oraz rolę ich produktów.

MUTACJE ZABURZAJĄCE PRZEBIEG STARZENIA SIĘ LIŚCI

Wśród mutacji związanych z procesem starzenia się wyróżniamy te, które wywołują przedwczesną degenerację i śmierć komórek oraz mutacje opóźniające starzenie się liści [28]. Najliczniej reprezentowane mutacje to tzw.: *non-yellowing* lub *stay green* [9, 28, 29]. Są to w większości mutacje recesywne. Dotyczą one blokowania pojedynczych genów kodujących enzymy zaangażowane w procesie starzenia się. Wiadomo, że mutacje *cytG* oraz d_1d_2 zapobiegają żółknięciu liści i innych części rośliny podczas starzenia się liści soi [28, 29]. Mutacja *cytG* tylko częściowo uczestniczy w powstrzymywaniu procesu starzenia się, przez blokowanie degradacji polipeptydów głównej anteny energetycznej PS II-LHCII. *CytG* jest genem chloroplastowym. Zaangażowanie tego genu w procesie starzenia się wskazuje, iż chloroplasty w pewnym stopniu kontrolują własną dezintegrację. Mutacja d_1d_2 wyraża się szeregiem efektów, co sugeruje, że d_1 i d_2 stanowią prawdopodobnie geny regulatorowe starzenia się. Mutacja ta warunkuje zachowanie zdolności do fotosyntezy; wiadomo, że hamuje degradację chlorofilu, białek wiążących chlorofil i Rubisco. Powyżej wspomniane mutacje *cytG* oraz d_1d_2 nie powstrzymują odpadania liści.

Inną mutacją, której poświęcono wiele uwagi, jest *Sid* (*senescence-induced degradation*) [22, 28, 41]. Gen *sid* jest jednym z jądrowych genów kontrolujących rozpad chloroplastów podczas starzenia się liści pastewnej trawy *Festuca pratensis*. Mutacja *sid* zapobiega żółknięciu liści, jest odpowiedzialna za blokowanie jednego z etapów rozpadu chlorofilu, prawdopodobnie na poziomie porfiryny [34, 41]. Wiadomo także, iż cytochrom *f*, w przypadku starzejących się liści mutantów wykazuje większą stabilność niż u roślin dzikich [22, 28, 41]. *Sid* nie powstrzymuje spadku poziomu fotosyntezy i śmierci komórkowej. Inny przykład mutacji *non-yellowing* stanowią mutanty *NY Phaseolus vulgaris*, u których nie odnotowuje się spadku zawartości chlorofilu *a* i *b* podczas starzenia się liści [35]. Liście, łodygi oraz pąki zachowują zielony kolor podczas całego cyklu życiowego rośliny, włączając

proces starzenia się. Analiza ultrastruktury chloroplastów nie wykazała różnic w procesie degradacji błon tylakoidów u przedstawicieli obu badanych genotypów tzn. mutantów NY oraz osobników dzikich. Jedyną różnicę stanowi brak plastoglobul w starzejących się chloroplastach liści mutantów [35]. Stwierdzono, iż ogólna zawartość białek liścia spada podczas starzenia się zarówno w przypadku roślin dzikich, jak też zmutowanych. SDS-PAGE elektroforeza białek wykazała, iż w przypadku mutantów zawartość białek o masach cząsteczkowych 14 kDa i 58 kDa nie zmniejsza się, podczas gdy w liściach roślin dzikich znacząco spada. Nie ustalono jednakże pochodzenia i właściwości tych białek [35]. Mutacje *stay green* mogą występować w genach, których produkty zaangażowane są w szlaku syntezy cytokinin, których określony poziom blokuje proces starzenia się. Istnieją także mutanty z defektem syntezy etylenu, które charakteryzują się opóźnieniem procesu starzenia się liści. Wstrzymanie starzenia się liści obserwuje się w przypadku roślin *Arabidopsis* obarczonych dominującą mutacją *etr1*, która warunkuje niewrażliwość mutantów na działanie etylenu. Cykl życiowy mutantów *etr1* wydłuża się w stosunku do roślin dzikich o ok. 30%, jednakże poziom fotosyntezy spada wraz z wiekiem liści. W tym przypadku starzenie się ulega opóźnieniu, ale gdy się rozpocznie, przebiega tak jak u roślin dzikich [9]. Pewna grupa mutantów wykazuje nieprzerwaną ekspresję genów, która w przypadku roślin dzikich podlega regulacji z udziałem światła niebieskiego lub czerwonego (np. gen kodujący małą podjednostkę RuDP, gen kompleksu antenowego LHCP). W wyniku mutacji tego typu następuje także opóźnienie procesu starzenia się [9, 28]. Tabela 2 zawiera przykłady mutacji związanych z przebiegiem procesu starzenia się.

ROŚLINY TRANSGENICZNE W BADANIACH PROCESU STARZENIA SIĘ LIŚCI

Powszechnie wiadomo, iż cytokiny hamują rozpoczęcie procesu starzenia się liści. Wraz ze zmniejszeniem się ich stężenia w ksylemie, zachodzi inicjacja starzenia się. Istnieją sugestie, iż redukcja poziomu cytokinin stanowi sygnał do zapoczątkowania procesu starzenia się liści [4, 9, 28]. W celu zbadania powyższego problemu uzyskano rośliny transgeniczne *Nicotiana* i *Arabidopsis*, w których bakteryjny gen dla izopentylo-transferazy (IPT), enzymu katalizującego jeden z etapów biosyntezy cytokinin, sklonowano z promotorem genu specyficznego dla starzenia się – *sag-12* [4, 6, 9]. Rośliny transgeniczne rozwijały się prawidłowo do momentu, w którym winno rozpocząć się starzenie. Początek procesu starzenia się liści został wyraźnie wstrzymany. Liście roślin transgenicznych nie wykazywały syndromu starzenia się, fotosynteza przebiegała na poziomie porównywalnym z poziomem fotosyntezy w przypadku młodych roślin kontrolnych. Zaobserwowano również dodatkowy rozwój

TABELA 2. Mutacje zaburzające starzenie się liści (zmodyfikowana za Noodén i Guiamét [28])

Mutacja	Efekt fenotypowy	Gatunek
ND	Opóźnienie zamierania całej rośliny, przedłużenie owocowania, liście pozostają zielone aż do momentu pojawienia się pierwszych owoców	<i>Dolichos sinensis</i>
ND	Opóźnienie zamierania całej rośliny, zachowanie zielonych liści, przedłużenie czasu syntezy cytokinin w cyklu życiowym rośliny	<i>Sorghum</i> sp.
dt ₁ , dt ₂ e ₁ e ₂	Opóźnienie zamierania całej rośliny, nasilenie rozwoju pędów bocznych, spowolnienie spadku poziomu fotosyntezy oraz wiązania azotu	<i>Glycine max</i>
E Sn Hr	Opóźnienie starzenia wierzchołka wzrostu, opóźnienie zamierania całej rośliny w warunkach fotoperiodu krótkiego dnia	<i>Pisum</i> sp.
ih (recesywna), Gr (dominująca)	Hamowanie degradacji błon tylakoidów oraz chlorofilu, kompleksu LHC oraz cytochromu f	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Dominująca	Hamowanie utraty chlorofilu i wody	<i>Zea mays</i>
Sid ^B (recesywna)	Hamowanie degradacji błon tylakoidów, barwników, kompleksu LHC, białka D1 oraz cytochromu f	<i>Festuca pratensis</i>
d ₁ d ₂	Hamowanie rozpadu chlorofilu, białek wiążących chlorofil, Rubisco oraz innych białek rozpuszczalnych	<i>Glycine max</i>
G (dominująca)	Hamowanie spadku zawartości chlorofilu z łupiny nasiennej	<i>Glycine max</i>
CytG (gen chloroplastowy)	Hamowanie degradacji chlorofilu, LHC II oraz cytochromu f	<i>Glycine max</i>
gf (recesywna)	Hamowanie dezintegracji błon tylakoidów i chlorofilu	<i>Solanum lycopersicum</i>
Sab (recesywna)	Opóźnienie opadania liści, szczególnie w warunkach stresu	<i>Glycine max</i>
etr (dominująca)	Zmniejszenie wrażliwości na etylen opóźnia starzenie się liści	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Nr	Zmniejszenie wrażliwości na etylen opóźnia rozpad chlorofilu oraz starzenie się kwiatów	<i>Solanum lycopersicum</i>
rin	Brak wzrostu syntezy etylenu spowalnia degradację chlorofilu i rozluźnienie ścian komórkowych	<i>Solanum lycopersicum</i>
Sdet 2 (recesywna)	Mutacja ścieżki sygnałowej związanej z działaniem światła opóźnia utratę chlorofilu	<i>Arabidopsis thaliana</i>

paków kwiatowych. Wykorzystanie promotora genu *sag-12* ulegającego specyficznej ekspresji podczas starzenia się miało kluczowe znaczenie dla powodzenia eksperymentu. Ekspresja *sag-12* była indukowana przez zapoczątkowanie starzenia się, jednocześnie synteza cytokinin na tym etapie powodowała wyłączenie promotora. W wyniku takiego mechanizmu starzenie się zostało wstrzymane przez wciąż wysoki

poziom cytokinin. Nie nastąpiła także nadprodukcja cytokinin, która zaburzyłaby prawidłowy rozwój roślin, jak miało to miejsce w badaniach z zastosowaniem promotora ulegającego konstytutywnej ekspresji. Powyższe wyniki jednoznacznie wskazują, iż krytycznie niski poziom cytokinin w roślinie stanowi jeden z kluczowych czynników/sygnatów odpowiedzialnych za zapoczątkowanie procesu starzenia się liści. Wysoki poziom cytokinin blokuje ekspresję genów związanych ze starzeniem się [4, 6, 9]. Eksperymenty z roślinami transgenicznymi wykorzystano również w celu określenia roli etylenu podczas starzenia się liści. Synteza etylenu z S-adenozylometioniny wymaga między innymi udziału enzymu zwanego oksydazą ACC. Wiadomo, iż ekspresja genu dla oksydazy ACC w starzejących się liściach pomidora wzrasta w początkowych etapach starzenia się poprzedzających degradację chlorofilu. Rośliny transgeniczne o zredukowanej produkcji etylenu zawierające antysensowną sekwencję genu dla oksydazy ACC charakteryzowały się opóźnieniem starzenia się liści w stosunku do roślin kontrolnych. Jednakże, jeśli starzenie się zostało zapoczątkowane, to jego przebieg nie odbiegał od wzorca starzenia się liści u roślin kontrolnych [4, 6, 9].

PROCES STARZENIA SIĘ LIŚCI W KONTEKŚCIE PROGRAMOWANEJ ŚMIERCI KOMÓRKOWEJ (PCD)

Opisane w literaturze aspekty starzenia się liści obejmują szereg zmian ultrastrukturalnych, fizjologicznych i biochemicznych zachodzących w komórkach mezofilu w sposób ściśle zaprogramowany i kontrolowany genetycznie [12, 13, 14, 15, 22, 26, 27, 31, 33, 34]. Zmiany te prowadzą do nieprzypadkowej śmierci wybranej grupy komórek. Wielu autorów rozpatruje proces starzenia się liści w kontekście programowanej śmierci komórkowej u roślin (PCD) [2, 8, 16, 29, 32, 36, 45]. Wyniki badań wskazują, że podczas starzenia się i śmierci zachodzi kondensacja chromatyny w jądrach komórek mezofilu [13, 14, 18, 36, 45]. Od dawna zjawisko to traktowane jest jako jeden z wyznaczników PCD zarówno w komórkach zwierzęcych, jak też roślinnych [8, 10, 32]. Elektroforeza DNA wyizolowanego ze starzejących się komórek liści pięciu gatunków roślin wykazała nieprzypadkową, internukleosomalną fragmentację jądrowego DNA (nDNA) [45]. Wraz z zaawansowaniem procesu starzenia się liści wyrażającym się zmianą ich barwy na żółtą aż do brązowej, a także całkowitą dezintegracją chloroplastów, postępuje również fragmentacja nDNA. Powyższe wyniki potwierdzono analizując nDNA tzw. „testem kometkowym” ujawniającym degradację nDNA [20]. „Test kometkowy” wykazał nieprzypadkową fragmentację nDNA w starzejących się komórkach mezofilu *Ornithogalum virens* oraz *Nicotiana tabacum* [36]. Stosunkowo niewiele wiadomo na temat endonukleaz odpowiedzialnych za fragmentację nDNA w czasie PCD u roślin. Udało się wy-

izolować endonukleazy działające w pH 5,5 w obecności jonów cynku w czasie ksylogenezy w komórkach *Zinnia elegans*, a także zidentyfikowano endonukleazy zależne od jonów wapnia, aktywne podczas superczułej odpowiedzi na patogen w komórkach liści tytoniu [24, 40]. Istnieją doniesienia, iż podczas starzenia się liści rzepaku, indukowanego zaciemnieniem, a także w początkowych etapach naturalnego starzenia się liści zbóż (pszenica, ryż) obserwuje się wzmożoną aktywność pewnych nukleaz (SSNs) tnących pojedyncze nici DNA (ssDNA) [44]. Nie udało się jednak ustalić, czy nukleazy SSNs odpowiedzialne są za specyficzną fragmentację nDNA w czasie starzenia się liści [44]. Wiadomo, iż nukleazy zależne zarówno od jonów wapnia, jak i cynku zaangażowane są w degradację DNA plastydowego, która w liściach brzoskwini i ryżu poprzedza wszelkie zmiany związane ze starzeniem się, takie jak: kondensacja chromatyny na terenie jąder, zmniejszenie wielkości chloroplastów czy dezintegracja ultrastruktury chloroplastów. [13, 14, 18, 19, 26, 38, 39].

Wykazanie specyficznego dla PCD fragmentacji nDNA podczas starzenia się liści zapewne skłoni do podjęcia dalszych badań mających na celu wyodrębnienie i identyfikację endonukleaz odpowiedzialnych za degradację nDNA, jak to miało miejsce w przypadku programowanej śmierci w komórkach zwierzęcych, a także we wspomnianych powyżej procesach zachodzących u roślin.

Znaczącym wyznacznikiem PCD (zwanej powszechnie u zwierząt apoptozą) jest zaangażowanie w tym procesie specyficznych proteaz cysteinowych, kaspaz, które stanowią centralny komponent systemu regulacyjnego apoptozy, a także biorą udział w procesach proteolitycznych prowadzących do dezintegracji komórki. Powyżej opisano szereg enzymów o charakterze proteaz cysteinowych, których ilość, jak też aktywność znacząco wzrasta w różnych etapach procesu starzenia się liści. Badacze przypuszczają, iż obok funkcji proteolitycznej enzymy te mogą spełniać funkcję regulatorowe podczas starzenia się.

REGULACJA PROCESU STARZENIA SIĘ LIŚCI

Nie ulega wątpliwości, iż procesy zachodzące podczas starzenia się liści podlegają ścisłej kontroli genetycznej. Ich koordynacja wymaga działania złożonego, wielostopniowego mechanizmu regulacyjnego, obejmującego interakcje szeregu czynników, przekazywanie oraz percepcję specyficznych sygnałów, a także indukcję ekspresji wielu genów odpowiedzialnych za prawidłowy przebieg całego procesu prowadzącego do śmierci określonej grupy komórek [4, 6, 9, 29]. Początek starzenia się liści może być zainicjowany przez różne czynniki zarówno wewnętrzne, jak i zewnętrzne, takie jak: susza, brak światła, niedobory składników odżywczych lub atak patogenu [30, 43]. W sprzyjających dla rośliny warunkach środowiskowych

starzenie się liści zachodzi jako końcowy etap rozwojowy w cyklu życiowym rośliny. W warunkach naturalnych proces starzenia się liści rozpoczyna się w ściśle określonym czasie, kiedy liście osiągną odpowiedni wiek lub też gdy cykl życia rośliny osiąga fazę reprodukcji. Powszechnie wiadomo, że wraz ze spadkiem intensywności fotosyntezy poniżej określonego poziomu zapoczątkowany zostaje proces starzenia się liści [9]. Nie udało się ustalić, co stanowi bezpośredni sygnał do rozpoczęcia starzenia się. Przypuszczalnie obok roślinnych regulatorów wzrostu, takich jak cytokininy i etylen, które uczestniczą w regulacji starzenia się, czynnikiem indukującym ekspresję specyficznych genów związanych ze starzeniem się może być poziom metabolitów np. cukrów, który zmienia się w określony sposób wraz ze spadkiem poziomu fotosyntezy. Wiadomo np., że indukcja ekspresji pewnych genów, których produkty zaangażowane są w szlaku glioksalanowym, jest regulowana przez poziom związków węgla [4]. Rola hormonów roślinnych w regulacji procesu starzenia się liści została w pewnym stopniu określona dzięki zastosowaniu do badań roślin transgenicznych, a także szeregu mutantów. Jak wspomniano powyżej, egzogenne cytokininy opóźniają inicjację starzenia się. Egzogenne etylen indukuje przedwczesne starzenie się. Etylen prawdopodobnie nie bierze bezpośredniego udziału w aktywacji genów związanych ze starzeniem się. Przypuszcza się, że może uczestniczyć w hamowaniu ekspresji genów związanych z fotosyntezą. Prawdopodobnie obecność etylenu zwiększa wrażliwość na czynniki sygnałowe związane ze starzeniem się, bądź przyspiesza lub wzmacnia ich transmisję [4].

Wiadomo, iż w regulacji procesu starzenia się, głównie indukowanego przez określone warunki stresu, uczestniczą także kwas abscysynowy oraz jasmonian metylu [4, 30, 43]. Ostatnio ukazały się informacje na temat zaangażowania w regulację starzenia się pewnej klasy hormonów roślinnych zwanych brassinosteroidami [6, 9].

Nie ma wątpliwości, że regulacja procesu starzenia się liści obejmuje skomplikowany system sygnałów, które w wyniku wielu interakcji indukują ekspresję genów specyficznych dla starzenia się umożliwiając uruchomienie mechanizmów degradacyjnych prowadzących do śmierci komórek mezofilu.

Wyizolowanie oraz scharakteryzowanie promotorów kontrolujących ekspresję genów związanych ze starzeniem się, a także analiza czynników, które wiążą się z tymi promotorami regulując ekspresję w kolejnych etapach starzenia się, zapewne umożliwi zrozumienie całego mechanizmu regulacyjnego starzenia się liści w relacji z innymi procesami rozwojowymi i w kontekście programowanej śmierci komórkowej.

LITERATURA

- [1] BATE NJ, ROTHSTEIN SJ, THOMPSON JE. Expression of nuclear and chloroplast photosynthesis-specific genes during leaf senescence. *J Exp Bot* 1991; **42**: 801–811.
- [2] BEERS EP. Programmed cell death during plant growth and development. *Cell Death Diff* 1997; **4**: 649–661.
- [3] BUCHANAN-WOLLASTON V. Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus*. Identification of a gene encoding a senescence-specific metallothionein-like protein. *Plant Physiol* 1994; **105**: 839–846.
- [4] BUCHANAN-WOLLASTON V. The molecular biology of leaf senescence. *J Exp Bot* 1997; **48**: 181–199.
- [5] BUTT A, MOUSLEY C, MORRIS K, BEYNON J, CAN C, HOLUB E, GREENBERG JT, BUCHANAN-WOLLASTON V. Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein gene in *Arabidopsis* in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringae*. *Plant J* 1998; **16**: 209–221.
- [6] GAN S, AMASINO RM. Making sense of senescence. *Plant Physiol* 1997; **113**: 313–319.
- [7] GRAHAM IA, LEAVER CJ, SMITH SM. Induction of malate synthase gene expression in senescent and detached organs of cucumber. *Plant Cell* 1992; **4**: 349–357.
- [8] GREENBERG JT. Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc Natl Acad Sci* 1996; **93**: 12094–12097.
- [9] HADFIELD KA, BENNET AB. Programmed senescence of plant organs. *Cell Death Diff* 1997; **4**: 662–670.
- [10] HAVEL L, DURZAN DJ. Apoptosis in plants. *Bot Acta* 1996; **109**: 268–277.
- [11] HENSEL LL, GRBIĆ V, BAUMGARTEN DA, BLEECKER AB. Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1993; **5**: 553–564.
- [12] HÖRTENSTEINER S. Chlorophyll breakdown in higher plants and algae. *CMLS Cell Mol Life Sci* 1999; **56**: 330–347.
- [13] INADA N, SAKAI A, KUROIWA H, KUROIWA T. Three-dimensional analysis of the senescence program in rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles. *Planta* 1998; **205**: 153–164.
- [14] INADA N, SAKAI A, KUROIWA H, KUROIWA T. Senescence program in rice *Oryza sativa* L. leaves: analysis of the blade of the second leaf at the tissue and cellular levels. *Protoplasma* 1999; **207**: 222–232.
- [15] JACKOWSKI G. Rozpad aparatu fotosyntetycznego w trakcie starzenia się liści. *Post Biol Kom* 1998; **25**: 63–73.
- [16] JONES AM, DANGL JL. Longjam at the Styx: programmed cell death in plants. *Trends Plant Sci* 1996; **1**: 114–119.
- [17] KAMACHI K, YAMAYA T, HAYAKAWA T, MAE T, OJIMA K. Changes in cytosolic glutamine synthetase polypeptide and its mRNA in a leaf blade of rice plants during natural senescence. *Plant Physiol* 1992; **98**: 1323–1329.
- [18] KURAN H. Changes in DNA, dry mass and protein content of leaf epidermis nuclei during aging of perennial monocotyledonous plant. *Acta Soc Bot Pol* 1993; **62**: 149–154.
- [19] KUROIWA T. The replication, differentiation, and inheritance of plastids with emphasis on the concept of organelle nuclei. *Int Rev Cytol* 1991; **128**: 1–62.
- [20] LEŚNIEWSKA J, SIMEONOVA E, SIKORA A, MOSTOWSKA A, CHARZYŃSKA M. Application of the comet assay in studies of programmed cell death (PCD) in plants. *Acta Soc Bot Pol* 2000; **69**: 101–107.
- [21] LOHMAN KN, GAN S, JOHN MC, AMASINO RM. Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 1994; **92**: 322–328.

- [22] MATILE P. Chloroplast senescence. [w] Baker NR, Thomas H [red.] *Crop Photosynthesis: spatial and temporal determinants*. Amsterdam, London: Elsevier 1992: 413–440.
- [23] McLAUGHLIN JC, SMITH SM. Glyxylate cycle enzyme synthesis during the irreversible phase of senescence of cucumber cotyledons. *J Plant Physiol* 1995; **146**: 133–138.
- [24] MITTLER R, LAM E. Identification, characterization, and purification of a tobacco endonuclease activity induced upon hypersensitive response cell death. *Plant Cell* 1995; **7**: 1951–1962.
- [25] MOSTOWSKA A. Environmental factors affecting chloroplasts.[w]: Pessarakli M [red.] *Handbook of photosynthesis*. New York: Marcel Dekker 1997: 407–426.
- [26] NIIN, KAWANO S, NAKAMURA S, KUROIWA T. Changes in fine structure of chloroplast and chloroplast DNA of peach leaves during senescence. *J Japan Soc Hort Sci* 1988; **57**: 390–398.
- [27] NOODÉN LD. The phenomena of senescence and aging. [w] Noodén LD, Leopold AC [red.] *Senescence and aging in plants*. San Diego: Academic Press 1988: 1–50.
- [28] NOODÉN LD, GUIAMÉT JJ. Genetic control of senescence and aging in plants. [w] Schneider EL, Rowe JW [red.] *Handbook of the biology of aging*. San Diego, New York: Academic Press 1996: 94–118.
- [29] NOODÉN LD, GUIAMÉT JJ, JOHN I. Senescence mechanisms. *Physiol Plant* 1997; **101**: 746–753.
- [30] PARK J-H, OH SA, KIM YH, WOO HR, NAM HG. Differential expression of senescence-associated mRNAs during senescence induced by different senescence-inducing factors in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 1998; **37**: 445–454.
- [31] PASTORI G, DEL RIO LA. Natural senescence of pea leaves. An activated oxygen-mediated function for peroxisomes. *Plant Physiol* 1997; **113**: 411–418.
- [32] PENNELL RI, LAMB C. Programmed cell death in plants. *Plant Cell* 1997; **9**: 1157–1168.
- [33] RODONI S, MÜHLECKER W, ANDERL M, KRÄUTLER B, MOSER D, THOMAS H, MATILE P, HÜRTESTEINER. Chlorophyll breakdown in senescent chloroplasts. Cleavage of pheophorbide a in two enzymic steps. *Plant Physiol* 1997; **115**: 669–676.
- [34] RODONI S, SCHELLENBERG M, MATILE P. Chlorophyll breakdown in senescing barley leaves as correlated with pheophorbide a oxygenase activity. *J Plant Physiol* 1998; **152**: 139–144.
- [35] RONNING CM, BOUWKAMP JC, SOLOMOS T. Observations on senescence of a mutant non-yellowing genotype of *Phaseolus vulgaris* L. *J Exp Bot* 1991; **42**: 235–241.
- [36] SIMEONOVA E, SIKORA A, MOSTOWSKA A, CHARZYŃSKA M. Aspects of programmed cell death (PCD) during leaf senescence of mono- and dicotyledonous plants. *Protoplasma* 2000; w druku.
- [37] SMART CM, HOSKEN SE, THOMAS H, GREAVES JA, BLAIR BG, SCHUCH W. The timing of maize leaf senescence and characterisation of senescence-related cDNAs. *Physiol Plant* 1995; **93**: 673–682.
- [38] SODMERGREN, KAWANO S, TANO S, KUROIWA T. Preferential digestion of chloroplast nuclei (nucleoids) during senescence of the coleoptile of *Oryza sativa*. *Protoplasma* 1989; **152**: 565–568.
- [39] SODMERGREN, KAWANO S, TANO S, KUROIWA T. Degradation of chloroplast DNA in second leaves of rice (*Oryza sativa*) before leaf yellowing. *Protoplasma* 1991; **160**: 89–98.
- [40] THELEN MP, NORTHCOTE DH. Identification and purification of nuclease from *Zinnia elegans* L.: a potential molecular marker for xylogenesis. *Planta* 1989; **179**: 181–195.
- [41] THOMAS H, OUGHAM HJ, DAVIES TGE. Leaf senescence in non-yellowing mutant of *Festuca pratensis*. Transcripts and translation products. *J Plant Physiol* 1992; **139**: 403–412.
- [42] VICENTINI F, MATILE P. Gerontosomes, a multifunctional type of peroxisomes in senescent leaves. *J Plant Physiol* 1993; **142**: 50–56.

- [43] WEAVER LM, GAN S, QUIRINO B, AMASINO RM. A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Mol Biol* 1998; **37**: 455–469.
- [44] WOOD M, POWER JB, DAVERY MR, LOWE KC, MULLIGAN BJ. Factors affecting single strand-preferring nuclease activity during leaf aging and dark-induced senescence in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Sci* 1998; **131**: 149–159.
- [45] YEN CH-H, YANG CH-H. Evidence for programmed cell death during leaf senescence in plants. *Plant Cell Physiol* 1998; **39**: 922–927.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 23.08. 2000 r.

Przyjęto: 03.10. 2000 r.

Adres autorek: Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

SYGNAŁOWA FUNKCJA ATP W CENTRALNYM UKŁADZIE NERWOWYM

SIGNAL FUNCTIONS OF ATP IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

Filip KUKULSKI, Michał KOMOSZYŃSKI

Zakład Biochemii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Streszczenie: ATP wiążąc się z receptorami purynowymi P2 pełni funkcję neuroprzekaźnika w centralnym układzie nerwowym. Dwa podstawowe typy tych receptorów – P2X i P2Y zlokalizowano w komórkach wszystkich struktur mózgu. Każdą strukturę charakteryzuje specyficzny profil ekspresji białek receptorowych. Profil ten w niektórych przypadkach może zmieniać się wraz z dojrzewaniem struktur. Receptory P2X, z uwagi na szybkość przekazu stanowią istotny element szlaków transmisji sygnałów w centralnym układzie nerwowym. Receptory P2X są kanałami o niskiej selektywności jonowej. Receptory P2Y działają za pośrednictwem białek G. Ich funkcja wiąże się z aktywacją wewnątrzkomórkowych wtórnych przekaźników (głównie wapnia i cAMP). Szereg receptorów P2 zostało sklonowanych. Rezultaty tych badań wykazały wyraźne różnice w sekwencji aminokwasów nie tylko między podstawowymi typami receptorów – P2X i P2Y, ale również między receptorami należącymi do obu typów. Szczególną funkcję w procesie neurotransmisji z udziałem ATP odgrywają hydrolazy z rodziny E-NTPDaz, które degradując ATP i ADP nie tylko uwalniają receptory P2 od agonisty, lecz współdziałając z ekto-5'-nukleotydazą produkują adenozyne – ligand purynoreceptorów P1. Odmienne efekty, jakie wywołuje w komórkach stymulacja purynoreceptorów przez substraty (ATP) i produkty tych przemian (ADP i adenozyne), wskazują, że ilościowe relacje między obu grupami agonistów ([ATP] : [ADP i/lub adenozyne]) mogą regulować intensywność metabolizmu komórek. (*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28: 33–50)

Słowa kluczowe: ATP, ektoenzymy, ektoapiraza, ektoATPaza, E-NTPDazy, purynoreceptory P2, receptor P2X, receptor P2Y.

Summary: ATP cooperating with the P2 purinoceptors plays a role of neurotransmitter in the CNS. Both types of these purinoceptors (P2X and P2Y) are present in CNS. These receptors are found in all structures of the brain, but the P2X to P2Y ratio is characteristic for every structure. This ratio might change during the development and maturation of the brain structures. The special role in CNS is played by P2X purinoceptors, which are the ion channels characterized by low selectivity and fast transmission. On the

other hand, the action of P2Y purinoceptors is mediated by the G proteins. The function of P2Y is connected to the activation of the intracellular second messengers. The sequence comparison of cloned P2 purinoceptors has revealed the differences not only between P2X and P2Y types, but also between members of this groups. The enzymes belonging to the E-NTPDase family play the special role in the ATP mediated neurotransmission. They break the signal and co-operate with 5'-nucleotidase in generation of other neurotransmitters. The antagonistic action of substrates and products of the chain of these enzymatic reactions suggests that the cell metabolism would depend on the [ATP] and/or [Ado] ratio. (*Advances in Cell Biology 2001; 28: 33–50*)

Key words: ATP, ecto-enzymes, ecto-apyrase, ecto-ATPase, E-NTPDase, purinoceptors P2, P2X receptor, P2Y receptor.

1. WSTĘP

Podstawową funkcją ATP jest magazynowanie energii, która jest wykorzystywana w wielu procesach metabolicznych, np. transporcie jonów i metabolitów, transporcie pęcherzykowym, regulacji aktywności enzymów, procesach fałdowania białek. Najmniej eksponowaną funkcją tego nukleotydu jest jego udział w przenoszeniu informacji. Na początku lat siedemdziesiątych G. Burnstock opierając się na badaniach nad przekazywaniem sygnałów przez komórki nerwowe układu autonomicznego zasugerował, iż w pewnych typach synaps ATP może być głównym neuroprzekaźnikiem [8]. Ten sam autor zaproponował istnienie specyficznych receptorów dla ATP i produktu jego degradacji – adenozyne, które nazwał purynoreceptorami (*purinoceptors*) [8]. Wyniki badań z lat dziewięćdziesiątych przyczyniły się do poznania funkcji ATP jako szybkiego neuroprzekaźnika w centralnym układzie nerwowym [17]. Jednocześnie badania nad enzymami uczestniczącymi w tych procesach pozwoliły na opisanie mechanizmów degradacji pozakomórkowych puryn (ektipuryn) i określenie miejsca tych enzymów w metabolizmie komórek oraz opracowanie nowej nomenklatury ektofosfohydrolaz [72]. W prezentowanej pracy przeglądowej przedstawiliśmy rezultaty badań oraz poglądy ostatniego dziesięciolecia na metabolizm, funkcję i mechanizm działania pozakomórkowego ATP w centralnym układzie nerwowym.

2. ATP JEST NEUROPRZEKAŹNIKIEM

ATP ma wszystkie cechy klasycznych neuroprzekaźników [34]:

1. Jest syntetyzowane i magazynowane w pęcherzykach w zakończeniach presynaptycznych.
2. Stymulacja neuronów powoduje uwalnianie ATP do szczeliny synaptycznej.

3. ATP uwolniony z komórki lub podany egzogennie wyzwała odpowiedź postsynaptyczną.
4. Przerwanie stymulacji purynoreceptorów przez ATP następuje z udziałem ektohydrolaz.
5. Analogi ATP, które nie ulegają hydrolizie enzymatycznej, wzmacniają odpowiedź postsynaptyczną.

W większości komórek centralnego układu nerwowego ATP jest magazynowany i uwalniany do szczeliny synaptycznej wspólnie z acetylocholiną [9]. W pęcherzykach synaptycznych wyizolowanych i oczyszczonych z neuronów cholinergicznym mózgu, molekularny stosunek acetylocholinę do ATP wynosi 7:1, podczas gdy w pęcherzykach synaptycznych kory mózgu 1:1. W pęcherzykach synaptycznych poza ATP mogą występować również inne nukleotydy, np. GTP, UTP, AP₄A (diadenozyno-tetra-fosforan), AP₅A (diadenozyno-penta-fosforan). Wszystkie nukleotydy występują w pęcherzykach synaptycznych w stężeniu milimolowym, ale w każdym z analizowanych przypadków stężenie ATP było wyższe od stężeń innych nukleotydów [71]. Jak dotąd nie został dokładnie opisany mechanizm, który uwalnia z komórki pęcherzyki wypełnione ATP. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, iż w mózgu uwalnianie ATP do szczeliny synaptycznej zachodzi dzięki depolaryzacji wywołanej gwałtownym wzrostem przepuszczalności błony komórkowej dla jonów K⁺. Wzrost stężenia jonów K⁺ w zakończeniach synaptycznych uwalnia ATP z synaptosomów izolowanych z całego mózgu, z hipokampu i z kory mózgowej [56]. Wtórny efekt tej depolaryzacji jest wzrost stężenia jonów Ca²⁺ w komórce.

3. PURYNORECEPTORY P2

Receptory purynowe podzielono na dwie klasy – P1 oraz P2. Receptory P1 wykazują wysokie powinowactwo do adenozyliny i niewielkie do nukleotydów. ATP, a także inne nukleotydy purynowe i pirymidynowe współdziałają z purynoreceptorami P2 [9,55].

3.1. Klasyfikacja receptorów P2

W 1994 roku Abbracchio i Burnstock [2] zaproponowali podział purynoreceptorów na dwa podstawowe typy:

- P2X obejmujący wszystkie receptory o charakterze kanałów jonowych i
- P2Y, do którego zaliczono receptory działające za pośrednictwem białek G.

Stosując do badań metody autoradiograficzne, w mózgu i rdzeniu kręgowym zidentyfikowano receptory należące do obu typów P2. Jednak w komórkach centralnego układu nerwowego najliczniej występują receptory P2X. W obrębie obu

typów purynoreceptorów opisano wiele różnych podtypów, z których do roku 1998 sklonowano po siedem receptorów P2X i P2Y [9].

4. PURYNORECEPTORY P2X

4.1. Budowa molekularna receptorów P2X

W centralnym układzie nerwowym występują wszystkie dotąd poznane podtypy receptorów P2X (P2X₁₋₇) [13]. Na podstawie analizy cDNA stwierdzono, że receptory P2X są zbudowane z 379 do 595 reszt aminokwasowych (tab. 1) [19] i wykazują odmienną budowę w porównaniu z innymi wcześniej poznanymi i sklonowanymi receptorami o charakterze kanałów jonowych (receptory nikotynowe czy NMDA) [58]. Podjednostki receptorów P2X są zbudowane z dwóch transmembranowych domen połączonych dużą zewnątrzkomórkową pętlą. Koniec aminowy i karboksylowy łańcucha białkowego znajduje się po stronie cytoplazmatycznej (ryc. 1A). W części zewnątrzkomórkowej znajduje się dziesięć zachowanych ewolucyjnie reszt cysteinowych i czternaście reszt glicyny oraz od 2–6 potencjalnych miejsc glikozylacji. Końce C białka różnych podtypów receptorów P2X nie wykazują żadnego podobieństwa w sekwencji aminokwasów, podczas gdy sekwencja aminokwasów fragmentu łańcucha białkowego pomiędzy końcem N i końcem drugiej hydrofobowej domeny każdego z podtypów jest identyczna w 37–48% [7]. Porównując masy molekularne i właściwości farmakologiczne zrekombinowanych receptorów P2X₁, P2X₂ i P2X₃ z innymi receptorami P2X sądzi się, że w niektórych typach neuronów mogą one tworzyć heteromeryczne kompleksy (ryc. 1C). Nieznana jest stechiometria tych kompleksów, lecz sądzi się, że receptory składają się co najmniej z trzech podjednostek lub wielokrotności tej liczby [38,48]. Do tej pory nieznanym jest mechanizm wiązania się ATP z receptorem i otwierania zlokalizowanego w błonie neuronów kanału jonowego.

4.2. Podział i lokalizacja receptorów P2X

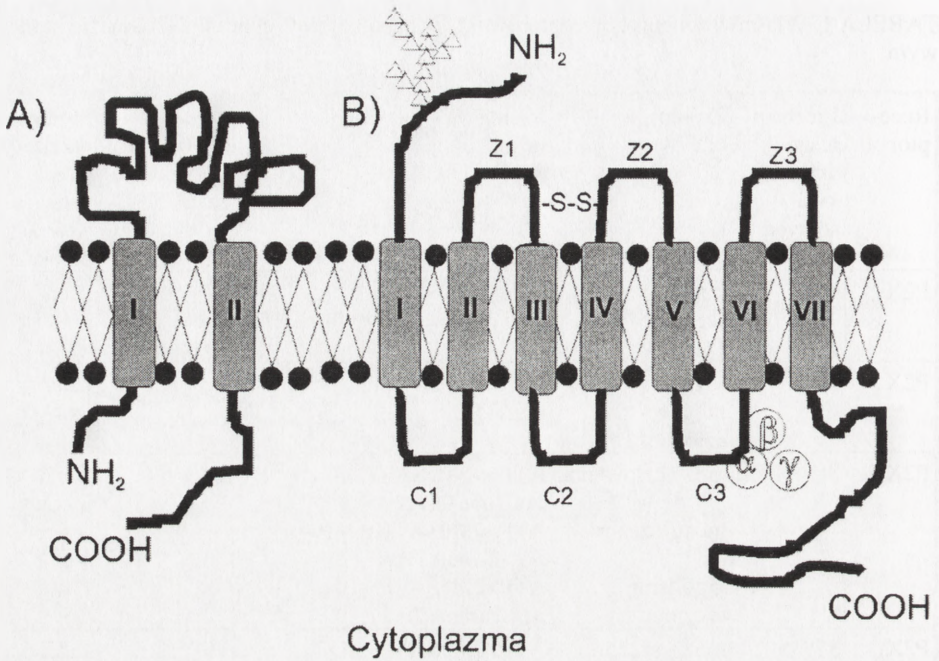
Receptor P2X₁ ma sekwencję TMTTIGSG, która wykazuje wysokie podobieństwo do regionu tworzącego porę innych kanałów K⁺ błony plazmatycznej. Sekwencja ta nie występuje w pozostałych typach receptorów P2X [7]. W dojrzałym układzie nerwowym receptory P2X₁ występują przede wszystkim w dużych neuronach ruchowych rdzenia kręgowego [13]. Receptor P2X₂ występuje w neuronach czuciowych, przysadce nerwowej, rogach grzbietowych i brzusznych rdzenia kręgowego, wzgórzu wzrokowym, podwzgórzu, polu przedwzrokowym, jądrze czerwonym, jądrze okoruchowym oraz grzbietowym ruchowym jądrze błędnika, autonomicznych neuronach zwojowych i rdzeniu nadnerczy [13,65,66]. Jest aktywowany przez 2Me-

TABELA 1. Właściwości purynoreceptorów P2 występujących w centralnym układzie nerwowym

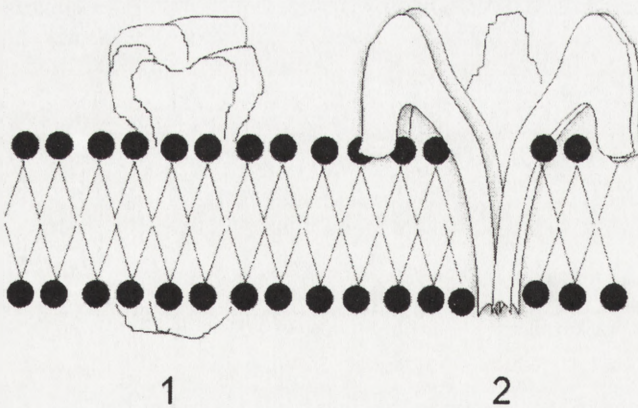
Receptor	Liczba reszt aminokwasowych	Źródło cDNA	Szereg farmakologiczny	Powinowactwo ATP do receptora EC50 [μ M]	Mechanizm przekazywania sygnału i układ wtórnego przekaźnika
P2X ₂	472	komórki szczurze PC12	2MeSATP>ATP; niewrażliwy na α , β -meATP	10	kanał jonowy \uparrow Ca ²⁺
P2X ₃	397	rdzeń kręgowy człowieka	2MeSATP>ATP > α , β -meATP	1	kanał jonowy \uparrow Ca ²⁺
P2X ₄	388	mózg człowieka, mózg szczura, hipokamp szczura	ATP>>2MeSATP \geq CTP> > α , β -meATP; ATP>2MeSATP \geq CTP> > α , β -meATP; ATP>2MeSATP> > α , β -meATP	10	kanał jonowy \uparrow Ca ²⁺
P2X ₆	379	mózg szczura	ATP>2MeSATP>ADP; niewrażliwy na α , β -meATP	10	kanał jonowy \uparrow Ca ²⁺
P2X ₇	595	mózg szczura	BzATP>ATP>2MeSATP> >ADP; niewrażliwy na UTP	200	kanał jonowy \uparrow Ca ²⁺
P2Y ₁	362	mózg człowieka mózg kurczaka	2MeSATP>ATP>>UTP; 2MeSATP>ATP=ADP	50	receptor współdziałający z białkiem G PLC- β / \uparrow IP ₃ / \uparrow Ca ²⁺
P2Y ₂	373	komórki mysie-neuroblastoma NG108-15	ATP=UTP>ATP γ S> >2MeSATP	1,5	receptor współdziałający z białkiem G PLC- β / \uparrow IP ₃ / \uparrow Ca ²⁺

\uparrow – wzrost stężenia wtórnego przekaźnika

SATP oraz ATP (tab. 1) [4]. Receptor P2X₃ jest lokalizowany jedynie w grupie małych komórek neuronów czuciowych, biorących udział w przewodzeniu bodźców nocyceptywnych [12,38]. Receptor P2X₄ jest szeroko rozpowszechniony w centralnym układzie nerwowym [7]. 2MeSATP ma zdecydowanie mniejsze powinowactwo do tego receptora niż ATP (tab. 1) [12]. Występowanie receptora P2X₅,



C)



RYCINA 1. Struktura purynoreceptorów P2: A – budowa podjednostki receptora P2X, B – budowa receptora P2Y – Z1, Z2, Z3 – pętle zewnątrzkomórkowe; C1, C2, C3 – pętle cytoplazmatyczne; Δ – reszty cukrowe; α, β, γ – podjednostki białek G, C – struktura kompleksu receptora P2X – 1 – pentamer; 2 – przekrój poprzeczny

o najwyższym powinowactwie do ATP, ogranicza się do ciał komórkowych neuronów proprioceptywnych w jądrach trójdzielnych śródmózgowia i zwojów czuciowych [13,31]. Rozmieszczenie receptora P2X₆ jest podobne do występowania receptora P2X₄ z wyjątkiem komórek wyściółki, gdzie występują jedynie receptory P2X₆, i komórek gruczołów ślinowych, gdzie występują tylko receptory P2X₄. Receptory te charakteryzuje najwyższe powinowactwo do ATP i nieco mniejsze do 2MeSATP (tab. 1) [13].

4.3. Mechanizm przekazywania sygnału i efekty fizjologiczne wywołane stymulacją receptorów P2X

Drogi, jakimi po aktywacji receptorów P2 przez ATP sygnał przenoszony jest we wnętrzu komórek centralnego układu nerwowego, zależą od typu aktywowanego receptora. Nasza wiedza o mechanizmie przekazywania sygnału z udziałem receptorów P2X jest niewielka. Wszystkie receptory P2X są kanałami jonowymi przepuszczalnymi dla jonów Na⁺, K⁺ i Ca²⁺ [4]. Sygnalizację z udziałem receptorów P2X cechuje brak wtórnych przekaźników, wskutek czego czas przekazywania sygnału jest niezwykle szybki (10–100 ms) [53]. Ta cecha sygnalizacji wydaje się być kluczowa dla szybkiej transmisji informacji w neuronach oraz w połączeniach nerwowo-mięśniowych. Efektem stymulacji receptorów P2X jest depolaryzacja błony komórkowej, otwarcie zależnych od potencjału błonowego kanałów Ca²⁺ i wzrost stężenia tego jonu w komórce [42]. Badania prowadzone na komórkach PC12 (komórki guza nadnerczy szczura) wykazały, iż stymulacja receptorów P2X przez ATP (0,1–1 mM) powoduje otwarcie nieselektywnych kanałów wapniowo/sodowo/potasowych, szybki transport tych jonów do cytoplazmy i depolaryzację. Powstający prąd dokomórkowy (20,2–42 A/pF przy –100 mV) wywołuje otwarcie wewnętrznych kanałów wapniowych komórki i w efekcie szybki wzrost stężenia tego jonu w cytozolu. Efektem tych procesów jest aktywacja prądu odkomórkowego związanego z kanałami potasowymi typu BK stymulowanymi przez Ca²⁺ (*large conductans*). Autorzy stwierdzili, że UTP nie wpływał na zmianę potencjału elektrycznego komórek PC12 [21]. Zmiany potencjału elektrycznego błony plazmatycznej pod wpływem aktywacji kanałów bramkowanych przez ATP zostały szczegółowo omówione w pracy przeglądowej [59]. Aktywność receptorów P2X i związanego z tymi kanałami prądu jest regulowana obecnością jonów dwuwartościowych. Jony Ca²⁺ i Mg²⁺ hamują powstawanie prądu [39], podczas gdy Zn²⁺ potęguje przewodnictwo jonowe [40]. Wydaje się, że ten pierwszy proces jest związany z obniżeniem powinowactwa ATP do miejsc wiążących nukleotydy na receptorze [39]. Nie można jednak wykluczyć, iż zmiany te są wynikiem stymulacji przez jony wapnia i magnezu lub też hamowania jonami cynku ekto-ATPazy i ektoapirazy i obniżenia lub wzrostu stężenia agonisty w szczelinie synaptycznej [73]. Specyficznym typem receptorów P2X występujących w mózgu jest receptor

receptorów charakteryzuje 27% stopień identyczności (ryc. 2). W strukturze molekularnej tej grupy purynoreceptorów stwierdzono obecność siedmiu domen transmembranowych o strukturze α -helisy. Taką budowę posiadają wszystkie dotychczas poznane receptory współdziałające z białkami G. Koniec aminowy polipeptydu tego receptora zlokalizowany jest po stronie zewnątrzkomórkowej i ma wiele potencjalnych miejsc glikozylacji. Koniec karboksylowy znajduje się po stronie cytoplazmatycznej błony (ryc. 1B). Pierwsza i druga pętla zlokalizowana na zewnętrznej powierzchni błony zawierają po dwie konserwatywne reszty cysteiny, natomiast w trzeciej cytoplazmatycznej pętli są liczne miejsca fosforylacji dla kinazy białkowej C i kinazy zależnej od kalmoduliny [53,62]. Wiązanie się ligandu do receptora zachodzi wskutek elektrostatycznego oddziaływania pomiędzy resztami fosforanowymi ATP i aminokwasami III, VI i VII domeny transmembranowej [62]. W VI i VII domenie transmembranowej receptora P2Y₂ występują cztery kluczowe dla tego procesu reszty aminokwasowe – histydyna 262, arginina 265, lizyna 289 i arginina 292. Reszta histydyny i dwie reszty argininy biorą udział w przyłączaniu ligandu. Zastąpienie lizyny 292 arginina zmniejsza powinowactwo receptora dla trifosfonukleotydów (ATP, UTP), a zwiększa dla difosfonukleotydów (ADP, UDP). Miejsca wiązania ligandu w receptorach P2Y₄ i P2Y₂ mają identyczny skład aminokwasowy, podczas gdy UDP-zależne receptory P2Y₃ i P2Y₆ w miejscu argininy 265 mają lizynę. Wynika z tego, iż zamiana argininy 265 na lizynę decyduje o powinowactwie do di- lub trifosfonukleotydów [18].

5.2. Mechanizm przekazywania sygnału i efekty fizjologiczne wywołane stymulacją receptorów P2Y

Przekazywanie sygnału z udziałem receptora P2Y do wnętrza komórek odbywa się z udziałem różnych białek G. Najczęściej wymienianymi białkami są G_q i G₁₁, ale niektóre z uzyskanych rezultatów wskazują na udział w tych procesach białek G_i/G_o oraz G_s [53,68]. Receptor P2Y₁ związany jest z białkiem G_i, G_o lub G_q/G₁₁ [43,68], podczas gdy receptor P2Y₂ działa poprzez białka G_i, G_{i/o} lub G_q/G₁₁ [53]. Wyniki badań prowadzonych na astrocytach wykazały, że receptory P2Y₁ z udziałem białek G_q/G₁₁ aktywują fosfolipazę C (PLC). Wzrost aktywności tego enzymu jest w części hamowany przez toksynę krztuśca. Sugeruje to istnienie dwóch mechanizmów aktywacji. Pierwszego niezależnego od tej toksyny, w którym udział bierze podjednostka α białka G_q/G₁₁ oraz fosfolipaza C- β ₁ [36], oraz drugiego zależnego od toksyny, związanego z podjednostkami β białka G_i i fosfolipazą C- β ₂ [10]. Należy zaznaczyć, iż wrażliwość fosfolipaz C na toksynę krztuśca związana jest z podjednostkami β białka G. Szlak zależny od toksyny krztuśca generuje w komórkach astrocytów królika syntezę prostaglandyny E₂ [28]. Stymulacja receptorów P2Y₁ z udziałem białka G α _q aktywuje PLC (tab. 1). PLC hydrolizuje fosfatydyloinozitol(4,5)bisfosforan do trisfosfoinozytolu (IP₃) i diacyloglicerolu

(DAG). IP_3 uwalnia Ca^{2+} z wewnątrzkomórkowych magazynów komórek PC12. Wzrost stężenia tych jonów oraz stymulowana DAG kinaza białkowa C (PKC) aktywują kinazę tyrozynową Pyk2. W efekcie następuje uruchomienie szlaku sygnałowego prowadzącego do aktywacji kinaz MAP (MAPK) [37]. Mechanizm transmisji sygnału w komórkach centralnego układu nerwowego z udziałem receptorów P2Y opisano na podstawie zmian, jakie sygnał ten wywołuje w komórkach glejaka C6 i C6-2B [44] i astrocytach szczurzych [46]. Aktywacja przez ATP i ADP receptorów P2Y₂ komórek glejaka C6-2B hamuje aktywność cykazy adenylnowej. Toksyna krztuśca nie wpływa na ten proces. Sądzi się, że inhibicja związana jest ze wzrostem aktywności fosfolipazy C, bowiem wrażliwość cykazy na nukleotydy malała w obecności estrów forbolu aktywujących PKC. W efekcie rośnie poziom IP_3 oraz Ca^{2+} (tab. 1). Powyższe fakty sugerują, że:

- 1) regulacja aktywności cykazy adenylnowej przez ATP odbywa się z udziałem enzymów działających poniżej fosfolipazy C;
- 2) stymulacja receptorów P2Y₂ modyfikuje aktywność cykazy adenylnowej typu IV;
- 3) bezpośrednią przyczyną obniżenia aktywności tego enzymu jest wzrost stężenia Ca^{2+} w komórce.

Odmienny szlak przekazywania sygnału w komórkach glejaka z udziałem receptorów P2Y opisuje Boyer i współpr. (1995) [5]. Badania te wykazały, że w glejaku C6 w regulacji aktywności kinazy adenylnowej nie uczestniczy fosfolipaza C, a obserwowane obniżenie aktywności cykazy adenylnowej jest wynikiem stymulacji receptora P2Y przez ATP lub ADP. Wpływ obu nukleotydów na aktywność tego enzymu blokuje preinkubacja komórek w roztworze toksyny krztuśca. Powyższe różnice, w obu opisanych wyżej mechanizmach transmisji sygnału w komórkach glejaka mogą wynikać z odmienności linii komórkowych używanych w różnych laboratoriach.

6. FUNKCJA PURYNORECEPTORÓW P2 W CENTRALNYM UKŁADZIE NERWOWYM

Jak dotąd mało wiadomo o funkcji purynoreceptorów P2 w centralnym układzie nerwowym. W rdzeniu kręgowym ATP uczestniczy w przekazywaniu sygnałów czuciowych [12,38]. ATP poprzez receptory P2X₁ i P2X₂ bierze udział w generowaniu sygnałów bólowych w komórkach takich struktur, jak rogi grzbietowe i rdzeń kręgowy [30], podczas gdy w czuciowych włóknach nerwowych C w odbiorze bodźców bólowych uczestniczą tylko receptory P2X₃ [14]. Antagoniści receptora P2X₃ mogą stać się w przyszłości skutecznymi lekami przeciwbólowymi [12,30,38]. ATP może regulować uwalnianie innych neuroprzekazników. Stwierdzono, że ATP

i jego analogi hamują wydzielanie noradrenaliny [63] i serotoniny w korze mózgowej [64]. Efekt fizjologiczny ATP zależy od typu aktywowanego receptora, bowiem ligand ten, z jednej strony stymuluje wydzielanie dopaminy w prądkowiu [32], z drugiej zaś hamuje wydzielanie tego neuroprzekaźnika w nowym prądkowiu [33]. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, iż ATP i purynoreceptory P2 biorą udział w procesach uczenia się i zapamiętywania zachodzących w hipokampie. Wyniki tych badań nie są jednak jednoznaczne. Do niedawna sądzono, iż ATP poprzez stymulację receptorów P2 wywołuje egzocytozę glutaminianu, co z kolei indukuje LTP (długotrwałe wzmocnienie synaptyczne) [22]. W 1998 roku Inoune [27] stwierdził, iż ATP może również hamować spontaniczne wydzielanie glutaminianu w hipokampie wywołując tym samym LTD (długotrwałe osłabienie synaptyczne). Sądzimy, iż te niejednoznaczne rezultaty są, nie jak uważają autorzy wynikiem stymulacji przez ATP receptorów P2 związanych z LTD, lecz aktywacją receptorów P1 przez powstającą w wyniku enzymatycznej degradacji ATP – adenozyne.

7. KOLOKALIZACJA RÓŻNYCH PODTYPÓW RECEPTORÓW PURYNOWYCH

Wiele komórek ma więcej niż jeden typ purynoreceptorów P2. Biologiczne znaczenie tego faktu nie zostało w pełni wyjaśnione. Najprawdopodobniej kolokalizacja receptorów P2 umożliwia ich współdziałanie, a także sprawia, iż ten sam agonista (ATP) może w komórce aktywować różne systemy efektorowe. W astrocytach grzbietowej części rdzenia kręgowego ekspresji ulegają dwa różne podtypy receptorów P2Y (P2Y₁ i P2Y₂) [25]. Mimo iż stymulacja receptorów P2Y₁ i P2Y₂ działa na ten sam system efektorowy (PLC), to jednak końcowe efekty fizjologiczne są różne. Ekspresja receptorów P2 może ulegać zmianom w warunkach patologicznych. Z taką sytuacją mamy do czynienia w przypadku fagocytów jednojądrzastych. Stany zapalne powodują, iż w komórkach tych gwałtownie spada ekspresja receptorów P2X₁ i P2Y₂, a wzrasta ekspresja receptorów P2X₇ [16]. Ekspresja różnych podtypów receptorów P2 może również zmieniać się wraz z wiekiem komórki. Receptory P2Y₁ są obecne jedynie w niedojrzałych komórkach macierzystych szpiku. W dojrzałych komórkach macierzystych szpiku występują przede wszystkim receptory P2Y₂ [16,41].

Purynoreceptory P1 i P2 występują obok siebie w wielu różnych typach komórek.

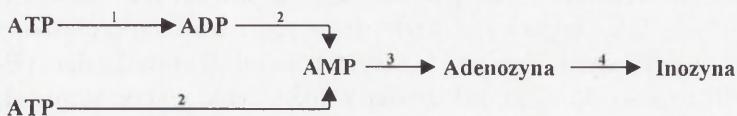
W komórkach centralnego systemu nerwowego występują wszystkie podtypy receptorów P2X, receptory P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₇, a także aktywowane przez adenozyne receptory P1: A1, A2_A, A2_B i A3 [13,15,23]. W wielu przypadkach receptory P1 i P2 działają antagonistycznie, a końcowy efekt fizjologiczny jest

wypadkową aktywności tych receptorów [70]. Ten rodzaj współdziałania receptorów P1 i P2 najlepiej opisano w regulacji ciśnienia krwi [51]. Presynaptyczne receptory A1 i presynaptyczne heteromeryczne receptory P2X_{2/3}, zlokalizowane w zakończeniach układu sympatycznego i nerwów czuciowych naczyń krwionośnych, hamują lub pobudzają wydzielanie różnych neuroprzekazników (np. noradrenaliny i ATP). W większości dotychczas przebadanych struktur mózgu receptory A1 i P2X występują razem [13,15]. Ochronna rola adenozyiny w przypadku niedotlenienia mózgu jest powszechnie znana. Obniżenie konsumpcji tlenu przez neurony następuje w wyniku aktywacji presynaptycznych receptorów A1 [49]. Skutkiem jest zahamowanie wydzielania ATP i obniżenie związanej z receptorami P2X aktywacji komórek. Kolokalizacja obu typów receptorów w neuronach mózgu zapobiega śmierci tych komórek wskutek niedotlenienia i niedokrwienia [6,35]. Wzrost stężenia wapnia w komórkach PC12 wywołany ich stymulacją przez ATP, jest hamowany z udziałem receptorów A_{2A} i adenozyiny [50].

8. HYDROLITYCZNA AKTYWNOŚĆ E-NTPDaz UWALNIA PURYNORECEPTORY P2 OD AGONISTÓW

Procesy przekazywania informacji wymagają istnienia efektywnych mechanizmów powodujących przerwanie sygnału. W mózgu, pozakomórkowy ATP jest degradowany przez grupę ektohydrolaz z rodziny E-NTPDaz (*ecto nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family*) [72]. E-NTPDazy wyraźnie różnią się właściwościami kinetycznymi i strukturą od ATPazy [34,52]. W skład tej grupy wchodzi ektoenzymy: e-ATPazy [EC 3.6.15] oraz e-difosfohydrolazy ATP-apirazy [EC 3.6.1.5]. Ich centrum katalityczne znajduje się po zewnętrznej stronie błony plazmatycznej. Do tej pory poznano budowę molekularną trzech różnych E-NTPDaz pochodzących z mózgu – E-NTPDazy 1 (CD39, ektoapiraza), E-NTPDazy 2 (CD39L1, ekto-ATPaza) i E-NTPDazy 3 (CD39L3, HB6) [29,57,67]. E-NTPDaza 1 i 2 hydrolizują w podobnym stopniu różne nukleotydy purynowe i pirymidynowe, takie jak: ATP, GTP, UTP, ITP, CTP, a apiraza dodatkowo ADP, GDP, UDP, IDP i CDP [73]. Żaden z tych enzymów nie hydrolizuje AMP. CD39 i CD39L1 różnią się wrażliwością na niektóre związki będące antagonistami receptorów P2. Ektoapiraza była silnie hamowana przez błękit Evansa, suramina efektywniej hamowała aktywność ekto-ATPazy [73], a NaN₃ w stężeniu 20 mM w 70% hamował hydrolizę ADP przez enzym HB6 [57].

Powszechnie sądzi się, (lecz brak do tej pory bezpośrednich dowodów), iż ta grupa enzymów degradując ATP i/lub ADP odpowiedzialna jest za uwolnienie receptorów P2 od agonisty. Powyższe reakcje stanowią początek łańcucha przemian prowadzącego do degradacji tych nukleotydów do adenozyiny (kolejnego neuromo-



RYCINA 3. Mechanizm degradacji ATP w przestrzeni synaptycznej mózgu: 1 – ekto-ATPaza, 2 – ektoapiraza, 3 – ekto-5'-nukleotydaza, 4 – deaminaza ektoadenozyny

dulatora/neuroprzekaźnika). Efektem całego ciągu przemian jest inozyna, która uzupełnia pulę puryn w komórce (ryc. 3) [34].

Powstawanie z jednego neuroprzekaźnika – ATP innych związków sygnałowych – ADP lub adenozyny w jednym ciągu reakcji sugeruje, iż sygnalizacja z udziałem pozakomórkowych puryn może podlegać regulacji podobnej do sprzężenia zwrotnego. ATP – substrat tego łańcucha przemian aktywuje, podczas gdy produkt – adenozyna hamuje metabolizm komórek [17,35]. Fakty te wskazują na istotną rolę enzymów w regulacji tych szlaków sygnałowych. W degradacji ATP uczestniczą dwa enzymy – e-ATPaza i e-apiraza. Ich produktami są różne związki – ADP i AMP (ryc. 3). Sugeruje to, że stężenie tego nukleotydu w przestrzeniach pozakomórkowych musi podlegać szczególnej kontroli. Wynika to prawdopodobnie z apoptycznego i lizogenicznego działania mM stężeń ATP [11,59]. Naszym zdaniem przeciwstawne działanie sygnałów ATP i ADP oraz ATP i adenozyny [70] wskazuje, że w przypadku pozakomórkowych puryn istnieje unikalny mechanizm regulacji sygnałów, w którym poziom substratów (ATP) i intensywność ich przemian w produkty (ADP i adenozynę) reguluje metabolizm w komórkach i poza nimi. Tak więc, ektoenzymy uczestniczące w tych przemianach wydają się być niezwykle ważnym elementem omawianego mechanizmu przekazywania sygnałów.

9. PODSUMOWANIE

ATP jest cząsteczką sygnałową, która reguluje różnorodne procesy metaboliczne, takie jak: funkcjonowanie układu sercowo-naczyniowego, agregację płytek krwi, skurcz i rozkurcz mięśni gładkich, wydzielanie hormonów, odpowiedź immunologiczną i wzrost komórek [1,24,70]. W układzie nerwowym ATP działa jako samodzielny neuroprzekaźnik bądź moduluje uwalnianie i funkcjonowanie innych neuroprzekaźników [9,32,33,45,63,64]. Mimo intensywnych badań wiele spraw dotyczących procesów przekazywania informacji z udziałem pozakomórkowych puryn nadal pozostaje niewyjaśnionych. Wynika to z braku selektywnych inhibitorów obu systemów (enzymatycznego i receptorowego). Większość agonistów i anta-

gonistów purynoreceptorów jest jednocześnie substratami lub inhibitorami ektohydrolaz puryn [73]. Podstawową trudnością jest odróżnienie efektów fizjologicznych wywołanych stymulacją purynoreceptorów, od efektów działania E-NTPDaz. Pomimo wielu niewiadomych, już dzisiaj w medycynie wykorzystuje się niektóre sterowane przez purynoreceptory mechanizmy do leczenia takich schorzeń, jak: mukowiscydoza, migrena, cukrzyca czy nowotwory [69]. Wyniki badań prowadzonych w drugiej połowie lat dziewięćdziesiątych pokazują, iż ATP uczestniczy nie tylko w szybkiej transmisji informacji, ale współdziałając z czynnikami wzrostowymi wpływa na długoterminowe zmiany trofizmu komórek i organów [3,54]. Doniesienia o tej funkcji ATP pochodzą z badań nad apoptozą, podziałami, wzrostem i cytotoksycznością komórek [3, 20, 47]. Udział puryn w długoterminowych regulacjach metabolizmu wykazały badania nad transplantacją splotów nerwowych z jelita do mózgu. Podczas tych badań prowadzonych na neuronach prądkowia wykazano, że w procesach neuroregeneracyjnych współdziałają czynniki wzrostowe komórek glijowych z NO oraz adenozyną (powstającą w wyniku degradacji ATP) uwalnianą z nerwów nieadrenergicznych, niecholinergicznym (NANC) [26]. Opisanie roli pozakomórkowych puryn w procesach sygnalizacji wyraźnie wskazuje, że regulacja metabolizmu w komórkach organizmów żywych jest wynikiem współdziałania różnych systemów informacyjnych, które wzajemnie się przenikają i uzupełniają.

LITERATURA

- [1] ABBRACCHIO MP, BURNSTOCK G. Purinergic signalling: pathophysiological roles. *J Pharmacol* 1998; **78**: 113–145.
- [2] ABBRACCHIO MP, BURNSTOCK G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 1994; **64**: 445–475.
- [3] ABBRACCHIO MP, CERUTI S, BOLEGO C, PUGLISI L, BURNSTOCK G, CATTABENI F. Trophic roles of P2 purinoceptors in the central nervous system astroglial cells. [w] Chadwick DJ, Goode JA [red.] P2 purinoceptors: localization, function and transduction mechanisms. Chichester: John Wiley and Sons 1996:142–148.
- [4] BHAGWAT SS, WILLIAMS M. P2 purine and pyrimidine receptors: emerging, superfamilies of G- protein -coupled and ligand-gated ion channel receptors. *Eur J Med Chem* 1997; **32**: 183–193.
- [5] BOYER JL, OTUEL JW, FISCHER B, JACOBSON KA, HARDEN TK. Potent agonist action of 2-thioether derivatives of adenine nucleotides at adenylyl cyclase-linked P2Y-purinoceptors. *Br J Pharmacol* 1995; **116**: 2611–2616.
- [6] BUCK LT, BICKLER PE. Adenosine and anoxia reduce N-methyl-D-aspartate receptor open probability in turtle cerebrocortex. *J Exp Biol* 1998; **201**: 289–297.
- [7] BUELL G, COLLO G, RASSENDREN F. P2X receptors: an emerging channel family. *Eur J Neurosci* 1996; **8**: 2221–2228.
- [8] BURNSTOCK G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 1972; **24**: 509–581.

- [9] BURNSTOCK G. History of extracellular nucleotides and their receptors. [w] Turner JT, Weisman GA, Fedan JS [red.] *The P2 Nucleotide Receptors*. Totowa, USA: Humana Press 1998; 3–40.
- [10] CAMPS M, CAROZZI A, SCHNABEL P, SCHEER A, PARKER PJ, GIERSHIK P. Isozyme-selective stimulation of phospholipase C- β_2 by G protein $\beta\gamma$ -subunits. *Nature* 1992; **360**: 684–686.
- [11] CARIO-TOUMANIANTZ CH, LOIRAND G, LADOUX A, PACAUD P. P2X₇ receptor activation-induced contraction and lysis in human saphenous vein smooth muscle. *Circ Res* 1998; **83**: 196–203.
- [12] CHEN C-C, AKOPIAN AN, SIVILOTTI L, COLQUHOUN D, BURNSTOCK G, WOOD JN. A P2X – purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature (Lond.)* 1995; **377**: 428–431.
- [13] COLLO G, NORTH RA, KAWASHIMA E, MERLO-PICH E, NEIDHART S, SURPRENANT A, BUELL G. Cloning of P2X₅ and P2X₆ receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J Neurosci* 1996; **16**: 2495–2507.
- [14] COOK SP, VULCHANOWA L, HARGREAVES KM, ELDER, MCCLESKEY EW. Distinct ATP receptors on pain-sensing and stretch-sensing neurons. *Nature* 1997; **387**: 505–508.
- [15] DIXON AK, GUBITZ AK, SIRINATHSINGHI DJ, RICHARDSON PJ, FREEMAN TC. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br J Pharmacol* 1996; **118**: 1461–1468.
- [16] DUBYAK GR, CLIFFORD EE, HUMPHREYS BD, KERTESY SB, MARTIN KA. Expression of multiple ATP receptor subtypes during the differentiation and inflammatory activation of myeloid leukocytes. *Drug Dev Res* 1996; **39**: 269–278.
- [17] EDWARDS FA, GIBB AJ, COLQUHOUN D. ATP receptor mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature* 1992; **359**: 144–147.
- [18] ERB L, GARRARD R, WANG Y, QUINN T, TURNER JT, WEISMAN GA. Site-directed mutagenesis of P2u purinoceptors. Positively charged amino acids in transmembrane helices 6 and 7 affect agonist potency and specificity. *J Biol Chem* 1995; **270**: 4185–4188.
- [19] EVANS RJ, SURPRENANT A, NORTH RA. P2X receptors. [w] Turner JT, Weisman GA, Fedan JS [red.] *The P2 Nucleotide Receptors*. Totowa, USA: Humana Press 1998: 43–61.
- [20] FRANCESCHI C, ABBRACCHIO MP, BARBIERI D, CERUTI S, FERRARI D, ILIOU JP, ROUNDS S, SCHUBERT P, SCHULSE-LOHOFF E, RASSENDREN FA, STAUB M, VOLONTÉ C, WAKADE AR, BURNSTOCK G. Purines and cell death. *Drug Dev Res* 1996; **39**: 442–449.
- [21] FUJII F, KIMURA J, TASE Ch. Ca²⁺-activated current induced by external ATP in PC12 cells. *Clin Exp Pharm Physiol* 1999; **26**: 39–47.
- [22] HARA K, KITAJIMA T. LTP plays a distinct role in various brain structures. *Behav Brain Sci* 1997; **20**: 620.
- [23] HEILBRONN E, KNOBLAUCH BHA, MÜLLER CE. Uridine nucleotide receptors and their ligands: structural, physiological, and pathophysiological aspects, with special emphasis on the nervous system. *Neurochem Res* 1997; **22**: 1041–1050.
- [24] HILGELMANN DW. Cytoplasmic ATP-dependent regulation of ion transporters and channels: mechanisms and messengers. *Annu Rev Physiol* 1997; **59**: 193–220.
- [25] HO C, HICKS J, SALTER MW. A novel P2-purinoceptor expressed by a subpopulation of astrocytes from the dorsal spinal cord of the rat. *Br J Pharmacol* 1995; **116**: 2909–2918.
- [26] HÖPKER VH, SAFFREY MJ, BURNSTOCK G. Neurite outgrowth of striatal neurons *in vitro*: involvement of purines in the growth-promoting effect of myenteric plexus explants. *Int Dev Neurosci* 1996; **14**: 439–451.
- [27] INOUE K. The functions of ATP receptors in the hippocampus. *Pharmacol Res* 1998; **38**: 323–331.

- [28] ISHIMOTO H, NAKAHATA N, MATSUOKA I, NAKANISHI H. Effects of ATP on phosphoinositide hydrolysis and prostaglandin E₂ generation in rabbit astrocytes. *J Pharm Pharmacol* 1997; **49**: 520–524.
- [29] KEGEL B, BRAUN N, HEINE P, MALISZEWSKI CR, ZIMMERMANN H. An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. *Neuropharmacology* 1997; **36**: 1189–1200.
- [30] KENNEDY C, LEFF P. Painful connection for ATP. *Nature* 1995; **3**: 385–386.
- [31] KHAKH BS, HUMPREY PPA, HENDERSON G. ATP-gated cation channels (P2X purinoceptors) in trigeminal mesencephalic nucleus neurones of the rat. *J Physiol* 1997; **498.3**: 709–715.
- [32] KITTNER H, KRÜGER U, GRAF D, ILLES P. Influence of 2-methylthio ATP (2-MeSATP) on the mesolimbic dopaminergic system of the rat: microdialysis, electroencephalography and behavior. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1997; **355**: R36.
- [33] KOCH H, TRENDELENBURG AU, BÜLTMAN R, VON KÜGELGEN I, STARKE K. P2-purinoceptors inhibiting the release of endogenous dopamine in rat neostriatum. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1997; **355**: R33.
- [34] KOMOSZYŃSKI M, WOJTCZAK A. Apyrases (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1310**: 233–241.
- [35] LATINI S, BORDONI F, PEDATA F, CORRADETTI R. Extracellular adenosine concentrations during *in vitro* ischaemia in rat hippocampal slices. *Br J Pharmacol* 1999; **127**: 729–739.
- [36] LEE CH, PARK D, WU D, RHEE SG, SIMON MI. Members of the G_qα subunit gene family activate phospholipase C-β isoenzymes. *J Biol Chem* 1992; **267**: 16044–16047.
- [37] LEV S, MORENO H, MARTINEZ R, CANOLL P, PELES E, MUSACCHIO JM, PLOWMAN GD, RUDY B, SCHLESSINGER J. Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca²⁺ induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* 1995; **376**: 737–745.
- [38] LEWIS C, NEIDHART S, HOLY C, NORTH RA, BUELL G, SURPRENANT A. Coexpression of P2X₂ and P2X₃ receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* 1995; **377**: 432–435.
- [39] LI C, PEOPLES RW, WEIGHT FF. Mg²⁺ inhibition of ATP-activated current in rat nodose ganglion neurons. *J Neurophysiol* 1997; **77**: 3391–3395.
- [40] LI C, PEOPLES RW, WEIGHT FF. Proton potentiation of ATP-gated ion channel responses to ATP and Zn²⁺ in rat nodose ganglion neurons. *J Neurophysiol* 1996; **76**: 3048–3058.
- [41] MARTIN KA, KERTESY SB, DUBYAK GR. Down-regulation of P2u-purineric nucleotide receptor messenger RNA expression during *in vitro* differentiation of human myeloid leukocytes by phorbol esters or inflammatory activators. *Mol Pharmacol* 1997; **51**: 97–108.
- [42] MATEO J, GARCIA-LECEA M, MIRAS-PORTUGAL MT, CASTRO E. Ca²⁺ signals mediated by P2X-type purinoceptors in cultured cerebellar purkinje cells. *J Neurosci* 1998; **18**: 1704–1712.
- [43] MAURICE DH, WALDO GL, MORRIS AJ, NICHOLAS RA, HARDEN TK. Identification of G_{α11} as the phospholipase C-activating G-protein of turkey erythrocytes. *Biochem J* 1993; **290**: 765–770.
- [44] MUNSHI R, DEBERNARDINI MA, BROOKER G. P2u-purineric receptors on C6-2B rat glioma cells: modulation of cytosolic Ca²⁺ and cAMP levels by protein kinase C. *Mol Pharmacol* 1994; **44**: 1185–1191.
- [45] NEAL MJ, CUNNINGHAM JR, DENT Z. Modulation of extracellular GABA levels in the retina by activation of glial P2X-purinoceptors. *Br J Pharmacol* 1998; **124**: 317–322.
- [46] NEARY JT, ZHU Q, BRUCE JH, MOORE AN, DASH PK. Signalling from P2 purinoceptors to MAP kinase in astrocytes involves protein kinase C. *Soc Neurosci Abstr* 1995; **21**: 581.
- [47] NEARY JT, BURNSTOCK G. Purinoceptors in the regulation of cell growth and differentiation. *Drug Dev Res* 1996; **39**: 407–412.

- [48] NICKE A, BAUMERT HG, RETTINGER J, EICHELE A, LAMBRECHT G, MUTSCHLER E, SCHMALZING G. P2X₁ and P2X₃ receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J* 1998; **17**: 3016–3028.
- [49] ONGINI E, SCHUBERT P. Neuroprotection induced by stimulating A1 or blocking A2A adenosine receptors: an apparent paradox. *Drug Dev Res* 1998; **45**: 387–393.
- [50] PARK T-J, SONG S-K, KIM K-T. A2A adenosine receptors inhibit ATP-induced Ca²⁺ influx in PC12 cells by involving protein kinase A. *J Neurochem* 1997; **68**: 2177–2185.
- [51] PIROTTON S, DESGRANGES C, VASSORT G, BOEYNAEMS J-M. The role of nucleotide receptors in the cardiovascular system. [w] Turner JT, Weisman GA, Fedan JS [red.] *The P2 Nucleotide Receptors*. Totowa, USA: Humana Press 1998: 319–359.
- [52] PLESNER L. Ecto-ATPase: identities and functions. *Int Rev Cytol* 1995; **158**: 141–214.
- [53] RALEVIC V, BURNSTOCK G. Receptors for purines and pyrimidines. *Am J Pharmacol Exp Ther* 1998; **50**: 413–492.
- [54] RATHBONE MP, MIDDLEMISS P, ANDREW C, CACIAGLIF, CICCARELLIF, DI IORIO P, HUANG R. The trophic effects of purines and purinergic signaling in pathologic reactions of astrocytes. *Alz Dis Assoc Disorder* 1998; **12**: S36–S45.
- [55] SABAŁA P. Receptory purynergiczne. [w] Nowak JZ, Zawilska JB [red.] *Receptory: struktura, charakterystyka, funkcja*. Warszawa, Polska: PWN 1997; 211–223.
- [56] SILINSKY EM, VON KÜGELGEN I, SMITH A, WESTFALL DP. Functions of extracellular nucleotides in peripheral and central neuronal tissues. [w] Turner JT, Weisman GA, Fedan JS [red.] *The P2 Nucleotide Receptors*. Totowa, USA: Humana Press 1998: 259–290.
- [57] SMITH TM, KIRLEY TL. Cloning sequencing, and expression of human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1386**: 65–78.
- [58] SURPRENANT A, BUELL G, NORTH RA. P2X receptors bring new structure to ligand-gated ion channels. *Trends Neurosci* 1995; **18**: 224–229.
- [59] SURPRENANT A. Functional properties of native and cloned P2X receptors. [w] Chadwick DJ, Goode JA [red.] *P2 purinoceptors: localization, function and transduction mechanisms*. Chichester: John Wiley and Sons 1996: 208–222.
- [60] SURPRENANT A, RASSENDREN F, KAWASHIMA E, NORTH RA, BUELL G. The cytolytic P2z receptor for extracellular ATP identified as P2X receptor (P2X₇). *Science* 1996; **272**: 735–738.
- [61] van RHEE AM, JACOBSON KA, GARRAD R, WEISMAN GA, ERB L. P2 receptor modeling and identification of ligand binding sites. [w] Turner JT, Weisman GA, Fedan JS [red.] *The P2 Nucleotide Receptors*. Totowa, USA: Humana Press 1998: 135–166.
- [62] van RHEE AM, FISCHER B, van GALEN PJM, JACOBSON KA. Modelling the P2Y purinoceptor using rhodopsin as template. *Drug Des Discov* 1995; **13**: 133–154.
- [63] von KÜGELGEN I, SPÄTH L, STARKE K. Evidence for P2-purinoceptor-mediated inhibition of noradrenaline release in rat brain cortex. *Br J Pharmacol* 1994; **113**: 815–822.
- [64] von KÜGELGEN I, KOCH H, STARKE K. P2-receptor-mediated inhibition of serotonin release in the rat brain cortex. *Neuropharmacology* 1997; **36**: 1221–1227.
- [65] VULCHANOWA L, ARVIDSSON U, RIEDL M, WANG J, BUELL G, SURPRENANT A, NORTH RA, ELDE R. Differential distribution of two ATP-gated channels (P2X receptors) determined by immunocytochemistry. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 8063–8067.
- [66] VULCHANOWA L, RIEDL MS, SHUSTER SJ, BUELL G, SURPRENANT A, NORTH RA, ELDE R. Immunohistochemical study of the P2X₂ and P2X₃ receptor subunits in rat and monkey sensory neurons and their central terminals. *Neuropharmacology* 1997; **36**: 1229–1242.
- [67] WANG T-F, ROSENBERG PA, GUIDOTTI G. Characterization of brain ecto-apyrase: evidence for only one ecto-apyrase (CD39) gene. *Mol Brain Res* 1997; **47**: 295–302.

- [68] WEBB TE, FOELDE E, VIGNE P, NEARY JT, RUNBERG A, FRELIN C, BARNARD EA. The P2Y purinoceptor in rat brain microvascular endothelial cells couple to inhibition of adenylate cyclase. *Br J Pharmacol* 1996; **119**: 1385–1392.
- [69] WILLIAMS M, JACOBSON KA. P2-purinoceptors: advances and therapeutic opportunities. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 1995; **4**: 925–934.
- [70] WINDSCHEIF U. Purinoceptors: from history to recent progress. A review. *J Pharm Pharmacol* 1996; **48**: 993–1011.
- [71] ZIMMERMANN H. Signalling via ATP in the nervous system. *Trends Neurosci* 1994; **10**: 420–426.
- [72] ZIMMERMANN H, BEAUDOIN AR, BOLLEN M, GODING JW, GUIDOTTI G, KIRLEY TL, ROBSON SC, SANO K. Proposed nomenclature for two novel nucleotide hydrolysing enzyme families expressed on the cell surface.[w]: Vanduffel L, Lemmens R [red.] Ecto-AT-Pases and related ectonucleotidases. Maastricht, The Netherlands: Shaker Publishing BV 2000: 1–8.
- [73] ZIMMERMANN H, BRAUN N, HEINE P, KOHRING K, MARXEN M, SÉVIGNY J, ROBSON SC. The molecular and functional properties of E-NTPDase1, E-NTPDase2 and ecto-5-nucleotidase in nervous tissue.[w]: Vanduffel L, Lemmens R [red.] Ecto-ATPases and related ectonucleotidases. Maastricht, The Netherlands: Shaker Publishing BV 2000: 9–20.

Redaktor prowadzący – Barbara Kamińska

Otrzymano: 02.08. 2000 r.

Przyjęto: 17.10.2000 r.

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

KOMÓRKI DENDRYTYCZNE W IMMUNOTERAPII

DENDRITIC CELLS FOR IMMUNOTHERAPY

Arkadiusz MILLER, Wiesław Wiktor JĘDRZEJCZAK

Klinika Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych
Centralnego Szpitala Klinicznego Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie: Komórki dendrytyczne to komórki wyspecjalizowane w prezentacji antygenów. Licznie występują w skórze, krwi obwodowej, chłonce, węzłach chłonnych i innych narządach wewnętrznych. W organizmie obecne są dwie ich subpopulacje pochodzenia mieloidalnego i limfoidalnego, i jest to jedyny znany taki przykład. Komórki dendrytyczne pełnią kluczową rolę w procesach odpowiedzi odpornościowej. Liczne prace kliniczne i doświadczalne sugerują możliwość wykorzystania ich w leczeniu nowotworów, zakażeń wirusowych i chorób autoimmunizacyjnych. W artykule omówiono biologię i znaczenie fizjologiczne komórek dendrytycznych, metody ich hodowli w warunkach *in vitro* oraz zastosowania kliniczne.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28: 51–68)

Słowa kluczowe: komórki prezentujące antygeny, komórki dendrytyczne, immunoterapia

Summary: Dendritic cells are professional antigen-presenting cells. They are found in the skin, blood, lymph nodes and other organs. Two their subpopulations are present in an organism – myeloblastic and lymphoblastic, and this is the only example that we know. Dendritic cells play a key role in immune response. The clinical and experimental studies suggest their use in tumor treatment, viral infections and autoimmune disorders. In this review the biology of dendritic cells, their physiology, *in vitro* culturing methods and clinical use is described.

(*Advances in Cell Biology* 2001; 28: 51–68)

Key words: antigen-presenting cells, dendritic cells, immunotherapy

WSTĘP

Wyniki najnowszych badań doświadczalnych wskazują na możliwość zastosowania autologicznych komórek dendrytycznych do leczenia chorób rozrostowych i zakażeń wirusowych. Zrozumienie reakcji odpornościowych zależnych od komórek

dendrytycznych wymaga poznania ich wytwarzania i funkcjonowania – co zostało przedstawione w pierwszej części pracy. W drugiej, omówiono problematykę związaną ze sposobami hodowli komórek dendrytycznych i prezentacji przez nie ściśle określonych antygenów. Na koniec przytoczono przykłady leczniczego zastosowania komórek dendrytycznych.

WYTWARZANIE I FUNKCJONOWANIE KOMÓREK DENDRYCZNYCH

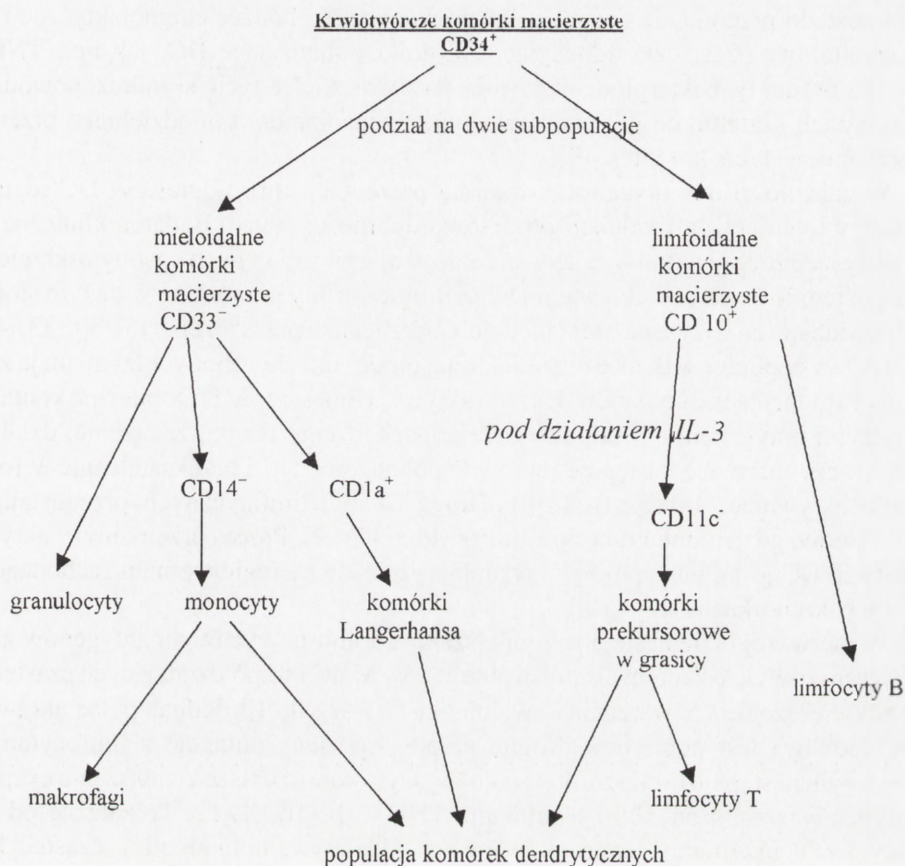
Komórki dendrytyczne (DC) są jednym z elementów układu odpornościowego biorącym aktywny udział w zapoczątkowywaniu reakcji odpornościowych. Mają zdolność do pochłaniania antygenów i przenoszenia ich do narządów limfatycznych oraz odpowiedniej obróbki umożliwiającej wydajną jego prezentację. DC uczestniczą w aktywacji limfocytów T oraz procesach negatywnej selekcji limfocytów w grasicy. Wszystkie te działania są możliwe dzięki ich podstawowej funkcji – prezentacji antygenów [2, 9, 17, 27, 30].

Określenie „komórki prezentujące antygeny” jest ogólnie przyjęte w stosunku do tych, które robią to za pomocą cząsteczek MHC klasy II (mogą one prezentować antygeny równolegle także przy pomocy cząsteczek MHC I). Trzy główne grupy takich komórek to – komórki dendrytyczne, limfocyty B i makrofagi. Te ostatnie mają znacznie lepiej rozwinięte mechanizmy fagocytozy niż pozostałe, ale limfocyty B i komórki dendrytyczne są znacznie skuteczniejsze w procesach prezentacji antygenów [32, 37].

Nazwa „komórki dendrytyczne” pochodzi od ich długich drzewiasto rozgałęzionych wypustek przypominających wyglądem dendryty komórek nerwowych. Dodatkowo DC mają porównywane z welonami wypustki blaszkowate, które są w ciągłym ruchu [13].

DC to komórki pochodzenia mieloidalnego albo limfoidalnego (w organizmie obecne są dwie subpopulacje) i pod tym względem są wyjątkowe. Jest to bowiem jedyna linia różnicowania w obrębie hematopoezy, która „siedzi okrakiem” na podstawowym podziale układu krwiotwórczego na mielo- i limfopoezę. Wspólnym prekursorem są komórki $CD34^+$. Dają one początek dwóm odrębnym subpopulacjom różniąc się w komórki $CD33^+$ dla linii mieloidalnej lub w komórki $CD10^+$ linii limfoidalnej [9, 32].

Komórki $CD33^+$ przekształcają się w komórki $CD14^+$ mające możliwość dalszego przekształcenia się w komórki różniące się w kierunku makrofagów lub w obecności GM-CSF i TNF ostatecznie w śródkankowe DC. $CD33^+$ mogą także przekształcić się w komórki $CD1a^+$, które pod wpływem GM-CSF i TNF przekształcają się ostatecznie w komórki Langerhansa [32].



RYCINA 1. Schemat różnicowania się komórek w kierunku DC (na podstawie [32])

Drugą podlinią rozwojową DC jest linia limfoidalna. Ze wspólnej dla obu subpopulacji krwiotwórczej komórki macierzystej, występującej wśród komórek CD34⁺ wykształcają się tym razem w komórki CD10⁺. Dalej komórki te różnicują się w CD11c⁻, które pod wpływem IL-3 mają zdolność ostatecznego przekształcenia się w grasicze DC i DC układu pokarmowego (ryc. 1) [9, 32].

Komórki prekursorowe są obecne zarówno w szpiku, jak i krwi obwodowej [9]. Tą drogą trafiają do większości narządów (wyjątkiem jest mózg). DC są komórkami dojrzałymi i nie mnożą się. Pod wpływem czynników zewnętrznych mogą jednak ulegać pewnym przemianom morfologicznym [7, 30, 33].

DC są komórkami ruchliwymi, zdolnymi do przenoszenia się z miejsca na miejsce – z tkanek obwodowych do narządów limfatycznych, gdzie mogą kontaktować się z niepobudzonymi limfocytami T [7]. Procesy związane z migracją DC i ich

zdolność do przenikania tkanek są regulowane przez bodźce chemotaktyczne i powierzchniowe cząsteczki adhezyjne. Czynniki pobudzające DC, jak np.: TNF- α , IL-1 β , produkty bakteryjne, wpływają na cytoskielet tych komórek powodując zmiany ich kształtu, co jest podstawowym mechanizmem samodzielnego przemieszczania się tych komórek [9].

W zależności od antygenów i miejsca prezentacji (np. w grasicy) DC regulują procesy tolerancji lub indukcji procesów odpornościowych. Badania kliniczne dowiodły, że procesy patologiczne w przebiegu alergii wziewnych i astmy oskrzelowej bezpośrednio zależą od aktywacji DC. Z drugiej strony komórki te w dużym stopniu odpowiadają za zjawiska tolerancji lub odrzucania przeszczepu [5, 30, 33, 44].

DC występujące w tkance niezmięnionej procesami chorobotwórczymi mają zdolność do prezentacji antygenów, lecz nie aktywują limfocytów T. Dopiero po kontakcie z obcymi antygenami, w odpowiedzi na: uszkodzenie tkanki, zakażenie, działanie toksyn czy martwicę następuje raptowne pobudzenie DC i przekształcenie w formy silnie aktywujące limfocyty T [9]. Drogą naczyń limfatycznych przedostają się do węzłów, gdzie kontaktują się z limfocytami [7, 12]. Proces przemiany w aktywne postaci DC jest dwustopniowy i charakteryzuje się szeregiem zmian zachodzących w tych komórkach.

W pierwszej fazie następuje zmniejszenie zdolności wychwytu antygenów z jednoczesnym zwiększeniem ekspresji antygenów MHC i współdziałających cząsteczek oraz zwiększenie wytwarzania i uwalniania TNF- α i IL-1 β . Jednak pełna aktywacja DC możliwa jest dopiero w drugim etapie – po ich kontakcie z limfocytami T, po którym następuje utrata zdolności do fagocytowania i dalsze zwiększenie ekspresji antygenów oraz produkcji i uwalniania TNF- α , IL-1 β , IL-12. Te zależne od limfocytów T przemiany uwarunkowane są oddziaływaniem między cząsteczkami powierzchniowymi limfocytów i komórek dendrytycznych oraz działaniem na te ostatnie przede wszystkim INF- γ produkowanego przez limfocyty T [7, 9, 12, 15].

Komórki dendrytyczne w porównaniu z makrofagami są mniej sprawne w procesach endocytozy, co prawdopodobnie związane jest z niewielką liczbą receptorów dla fragmentów Fc IgG i dla składnika C3 dopełniacza na ich powierzchni. Z drugiej strony wyposażone są w liczne cząsteczki MHC I i II oraz mają zdolność do długotrwałego utrzymywania prezentowanych antygenów. Przepuszczalnie, zachodzi ścisła współpraca między obu populacjami komórek polegająca na przekazywaniu pochłoniętych przez makrofagi i poddanych enzymatycznej obróbce antygenów komórkom dendrytycznym (tab. 1) [1, 27, 28].

Komórki dendrytyczne narządów nielimfatycznych

Do tej grupy należą komórki Langerhansa oraz śródmiąższowe komórki dendrytyczne tkanki łącznej wielu narządów. Te pierwsze są zlokalizowane w naskórku, gdzie stanowią 3–8% komórek. Licznie występują w nabłonkach wyściełających

TABELA 1. Miejsce występowania komórek dendrytycznych

	Miejsce występowania
Narządy nielimfatyczne	Naskórek, nabłonki, nieliczne w skórze właściwej Tkanka łączna różnych narządów
Krążenie	Krew Chłonka naczyń limfatycznych doprowadzających
Narządy limfatyczne	Grasica Strefa grasiczozależna węzłów i śledziony Grudki limfatyczne

drogi oddechowe i moczowe oraz przewod pokarmowy. Na swojej powierzchni mają receptory dla fragmentów Fc IgG. Prawdopodobnie po związaniu antygenów przechodzą do naczyń limfatycznych, gdzie ulegają przemianom i jako komórki welonowe docierają do węzłów chłonnych. Tu ulegają następnemu przekształceniu w komórki dendrytyczne splatające się i w tej postaci nawiązują kontakt z limfocytami [1, 28, 30, 32, 41].

Komórki dendrytyczne narządów limfatycznych

Komórki tej grupy występują w grasicy, węzłach i grudkach chłonnych. W grasicy biorą aktywny udział w procesach negatywnej selekcji dojrzewających limfocytów. DC obecne w węzłach chłonnych i śledzionie to komórki, które po związaniu antygenów na obwodzie przywędrowały tu i prezentują te białka limfocytom T. Pochodzenie komórek dendrytycznych w ośrodkach rozmnażania grudek nie jest do końca wyjaśnione [1, 19, 24, 27].

Obserwacje interakcji między limfocytami a DC potwierdziły sugestię, że DC pochodzenia szpikowego i limfoidalnego różnią się między sobą morfologicznie i funkcjonalnie. Wszystkie wykazują silne właściwości do prezentacji antygenów, ale różnią się:

- a) produkcją cytokin,
- b) wpływem na pobudzanie limfocytów T,
- c) pobudzaniem limfocytów T do apoptozy,
- d) właściwościami w zależności od organu, z którego pochodzą.

ad a) i b). Badania nad fizjologią DC sugerują możliwość istnienia znacznych różnic pomiędzy poszczególnymi ich populacjami w ilości uwalnianych cytokin – głównie IL-12. Na tej podstawie podzielono DC na dwa typy: I – wytwarzający dużo IL-12 i typ II produkujący jej mało. Prace doświadczalne wskazują na możliwość aż 50-krotnej różnicy w wydzielaniu IL-12 pomiędzy liniami DC CD11b^{low} (typ I o pochodzeniu limfatycznym) i CD11b^{high} (typ II o pochodzeniu szpikowym) [15, 16]. Istnieją dane wskazujące, że komórki typu I silnie wpływają na różnico-

wanie i pobudzanie limfocytów Th1, a przez to aktywują odpowiedź komórkową, natomiast DC typu II – na limfocyty Th2 pobudzając odpowiedź humoralną [15].

ad c). Prace doświadczalne sugerują wpływ DC pochodzenia limfatycznego – DC CD8 α^+ na apoptozę limfocytów CD4. Procesy apoptozy wydają się być uruchamiane po połączeniu się cząsteczek Fas (w dużej ilości obecnych na DC CD8 α^+) z receptorem Fc na limfocycie. Jednocześnie wykazano, że populacja DC CD8 α^- nie ma takich właściwości. Do tej pory nie udało się wykryć cząsteczek Fas na ludzkich DC [35].

ad d). Doświadczenia wskazują także na możliwość istnienia różnic pomiędzy komórkami dendrytycznymi związanymi z tkanką lub narządem, w którym one występują. Na przykład DC obecne w grasicy biorą udział nie tyle w prezentacji obcych antygenów i pobudzaniu limfocytów, co w wychwytywaniu i niszczeniu limfocytów autoagresywnych. W procesach tych DC unieszkodliwiają wszystkie te limfocyty, które są zdolne rozpoznać prezentowane przez nie antygeny. Zaskakujące jest to, że DC obecne w grasicy mają niewielką zdolność do wywoływania apoptozy. Dlatego przypuszcza się, że procesy niszczenia autoagresywnych limfocytów muszą opierać się na innych jeszcze nie poznanych mechanizmach [22, 26].

Inaczej zachowują się DC pobrane z wątroby. Wywołują one anergię limfocytów na prezentowane antygeny i długotrwałą ich tolerancję [29]. Przypuszcza się, że wywoływanie tolerancji na antygeny jest związane nie tyle z bliżej nieokreśloną cechą DC, co z warunkami, w jakich one dojrzewają.

PREZENTACJA ANTYGENU

Reakcje odpornościowe, polegające na rozpoznaniu i zniszczeniu antygenów, mogą przebiegać dwoma drogami – humoralną, zależną od przeciwciał i komórkową, z komórkami wykonawczymi w postaci cytotoksycznych limfocytów T. Te ostatnie nie rozpoznają antygenów rozpuszczalnych, lecz związane z cząsteczkami MHC na powierzchni komórek [12, 20, 28].

Proces prezentacji antygenów składa się z trzech zasadniczych etapów:

- 1) pochłonięcia antygenów przez komórki lub ich produkcja wewnątrz komórki,
- 2) przetworzenia enzymatycznego antygenów wewnątrz komórki i przyłączenie ich fragmentów do cząsteczki antygeny MHC,
- 3) egzocytozy kompleksu antygen-MHC i prezentacji limfocytom [12, 38].

ad 1). Komórki prezentujące antygen mogą pochłaniać antygeny zarówno rozpuszczalne, jak i nierozpuszczalne w procesach [19, 24, 38]:

- pinocytozy fazy płynnej,
- endocytozy adsorpcyjnej,
- fagocytozy.

Mogą też same produkować białka antygenowe np. komórki zakażone wirusem czy nowotworowe.

ad 2). Większość antygenów zbudowana jest z dużej liczby aminokwasów. Muszą one zostać poddane obróbce polegającej na enzymatycznej denaturacji, rozwinięciu łańcucha białkowego oraz pocięciu go przez proteazy na fragmenty odpowiednio małe, aby pasowały do miejsc wiązania antygenów w cząsteczce MHC. Procesy te zachodzą w organellach komórek prezentujących antygen – endosomach, lizosomach i ostatecznie w proteasomach. Proteasomy zdolne są do tworzenia szerokiego spektrum peptydów z pojedynczego antygeny ulegającego w nich degradacji. Niektóre z powstałych peptydów są wybiórczo transportowane do siateczki śródplazmatycznej i tam wiązane z łańcuchem ciężkim cząsteczki MHC. Tak przygotowane peptydy antygenowe wędrują na powierzchnię komórek [12, 19, 20, 28, 31, 38, 42].

Obserwacje doświadczalne sugerują, że w warunkach patologicznych, w których pojawia się wiele antygenów np. w transformacji nowotworowej, funkcje proteasomów przejmują wyspecjalizowane immunoproteasomy (proteasomy z podjednostkami indukowanymi przez $\text{INF-}\gamma$) – wydajniejsze w produkcji odpowiednich peptydów antygenowych. Aktywne limfocyty T oraz NK wydzielają $\text{INF-}\gamma$, który wpływa na podjednostki proteasomów powodując przyspieszenie generacji peptydów antygenowych. W wyniku jego oddziaływania zmienia się również repertuar peptydów produkowanych przez proteasomy, przystosowując je bardziej do potrzeb wewnątrzkomórkowych białek transportujących i cząsteczek MHC [42].

ad 3). Prezentacja antygenów może być realizowana przez cząsteczki MHC klasy I lub II. Pierwszy przypadek dotyczy głównie antygenów syntetyzowanych w komórce. Mogą to być białka cytoplazmy, białka wydzielnicze oraz białka błonowe. Antygeny w połączeniu z MHC I są rozpoznawane przez limfocyty T CD8^+ , a komórka prezentująca jest jednocześnie dla nich komórką docelową, którą atakują i niszczą [12, 23, 37].

W odróżnieniu od cząsteczek MHC I występujących na prawie wszystkich komórkach organizmu, cząsteczki MHC II są obecne tylko na niektórych komórkach. W połączeniu z nimi prezentowane są głównie antygeny pochodzenia bakteryjnego i wirusowe po ich uprzedniej enzymatycznej obróbce, ale także i autoantygeny pochodzące z różnych komórek ustroju. Kompleksy MHC II z antygenem są rozpoznawane przez limfocyty CD4^+ . Grupa komórek prezentujących antygen tą drogą nie jest jednorodna i obejmuje: komórki dendrytyczne, limfocyty B, makrofagi [37].

Do wydajnej stymulacji limfocytów T niezbędne jest także występowanie na DC, obok antygenów MHC I i II, cząsteczek pomocniczych B7-1 lub B7-2. Wiążą się one z antygenem CD28 na limfocytach dostarczając im dodatkowych sygnałów pobudzających [10, 13, 17]. Obserwacje doświadczalne sugerują, że oddziaływanie cząsteczek pomocniczych z cząsteczką CD28 prowadzi do przekazania sygnału

do wnętrza komórki i indukuje produkcję różnych limfokin. Skutkiem wiązania B7-1 do CD28 jest synteza IL-2 i INF- γ , natomiast wiązanie z B7-2 warunkuje produkcję IL-4 i IL-5. Wewnątrzkomórkowy sygnał powstający w wyniku pobudzenia CD28 powoduje również wzrost ekspresji receptorów powierzchniowych limfocyta [40]. Brak B7-1 czy B7-2 i jednoczesna prezentacja antygenów w obecności cząsteczek MHC może doprowadzić do zjawiska anergii limfocytów na rozpoznany w ten sposób antygen. Wykazano doświadczalnie, że blokowanie wiązania cząsteczek pomocniczych B7-1 i B7-2 z CD28 jest skutecznym sposobem zapobiegania lub łagodzenia przebiegu chorób autoagresyjnych i odrzucania przeszczepu [10, 13, 17, 40].

METODY OTRZYMYWANIA KOMÓREK DENDRYTYCZNYCH

Komórki dendrytyczne można znaleźć w wielu narządach wewnętrznych w tym w węzłach chłonnych, szpiku i jako swobodnie krążące we krwi obwodowej. Pomimo tak szerokiego zakresu występowania stanowią one zaledwie 0,1% populacji wszystkich komórek. Głównie dlatego otrzymanie czystych kolonii DC, bez domieszek innych komórek, do niedawna nastroczało wiele kłopotów. Nie udawało się także uzyskać odpowiedniej do badań liczby tych komórek. Ostatnio jednak nastąpił zdecydowany postęp w pokonaniu tych problemów [9]. Obecnie istnieje kilka metod otrzymywania komórek dendrytycznych. Zasadniczo polegają one na pozyskaniu z krwi obwodowej lub szpiku prekursorowych komórek DC, a następnie ich hodowli w ściśle określonych warunkach.

Metody oparte o negatywną lub pozytywną selekcję DC z puli PBMC

W celu uzyskania DC pobiera się z krwi obwodowej zdrowych dawców za pomocą leukoferezy populację PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*). Otrzymane komórki przenosi się do kolumn zawierających specjalnie przygotowane w obecności neuroamidazy owcze erytrocyty. Obecne w PBMC limfocyty T rozetkują z erytrocytami i są usuwane z próbki. Po 36 godzinach tego procesu pozostałą frakcję komórek przenosi się na podłoże z ludzkimi adhezynami dla monocytów. W pozostałej próbce pozostają jedynie DC [43].

Frakcje powstałą z komórek nierozetkujących z erytrocytami można także hodować w temperaturze 37°C na podłożu RPMI z dodatkiem 10% surowicy cielęcej (FCS). Po 36 godzinach inkubacji komórki celem oczyszczenia z innych populacji dwukrotnie wysiewa się na nowe podłoża mające zdolność adhezji monocytów. Następnie oczyszczoną w ten sposób hodowlę przenosi się do kolumn z 14,5%

metrizamidem rozpuszczonym w RPMI z 10% FCS, gdzie usunięte zostają limfocyty B i NK. Pozostała po tym procesie frakcja komórkowa zawiera dużą liczbę DC [28].

Możliwa jest także metoda pozyskiwana z DC krwi obwodowej oparta na mechanizmach pozytywnej selekcji. Otrzymane, tak jak poprzednio PBMC, poddane są kilkugodzinnej ekspozycji na CMRF-44 MAb, co umożliwia izolowanie aktywnych funkcjonalnie DC [6]. Następnie otrzymane komórki mogą zostać poddane działaniu różnych czynników wyzwalających ich dojrzewanie np. LPS czy GM-CSF [12].

Metody wykorzystujące komórki prekursorowe pochodzące ze szpiku i krwi obwodowej

W celu otrzymania stabilnych i zdolnych do przeprowadzenia reakcji odpornościowych DC opracowano kilka nieznacznie różniących się metod. Odmienności między nimi wynikają z użycia różnych czynników wzrostu i ich mieszanin (np. LPS, TNF- α , GM-CSF), innych komórek wyjściowych (np. CD14⁺ CD1a⁻, CD34⁺) oraz czasu inkubacji z czynnikami wzrostu.

Jedna z opisanych metod opiera się o komórki prekursorowe CD34⁺. Od zdrowych dawców pobiera się niewielkie próbki szpiku, z których komórki CD34⁺ izolowane są metodą pozytywnej selekcji [43]. Następnie tak otrzymane komórki hoduje się w obecności GM-CSF i TNF- α , otrzymując zróżnicowane DC. W dalszej kolejności z hodowli usuwa się cytokiny. Zauważono jednak, że po tej czynności komórki natychmiast zwiększają swój potencjał adhezyjny i tracą właściwości immunogenne. Jest to poważna wada tej metody, która może skutecznie uniemożliwić jej praktyczne wykorzystanie [9].

W badaniach laboratoryjnych wykazano, że po 12 dniach hodowli 10⁶ komórek krwiotwórczych CD34⁺ w obecności GM-CSF i TNF- α można otrzymać hodowlę 10–30 x 10⁶ DC z domieszkami 50–80% innych komórek. Otrzymane DC charakteryzują się [32]:

- morfologią komórek dendrytycznych,
- ekspresją cząsteczek powierzchniowych: MHC II, CD1a, CD4, CD40, CD54, CD58, CD80, CD83, CD86,
- brakiem cząsteczek: CD14, CD64/Fc γ R1, CD35/CR1,
- obecnością ciałek Birbecka w niektórych komórkach,
- dużą zdolnością do pobudzania limfocytów T.

Inna metoda wykorzystuje komórki CD14⁺ pochodzące z krwi obwodowej i przebiega w dwóch etapach. Pierwszy – obejmuje hodowanie CD14⁺ przez 6–7 dni z GM-CSF i IL-4 w obecności surowicy cielęcej (FCS). W drugim – kolonie są oczyszczane z FCS i wystawiane na podłożu dla makrofagów na działanie 1%

autologicznej surowicy przez 3 dni. W ten sposób otrzymuje się stabilne DC bardzo wydajnie prezentujące antygen [9]. Pozyskanie DC z monocytów krwi obwodowej (CD14⁺) wydaje się metodą interesującą i wartą dalszych badań, ponieważ komórki te występują licznie we krwi i są łatwe do izolacji i hodowli. W innej odmianie tej metody komórki prekursorowe CD14⁺ CD1a⁻ poddaje się działaniu czynnika stymulującego kolonie granylocytarno-makrofagowe (GM-CSF) i IL-4, co powoduje różnicowanie się ich w komórki, które pod wpływem mediatorów zapalnych (LPS, TNF- α) przekształcają się w typowe DC [12].

MECHANIZMY DZIAŁANIA PRZECIWNOWOTWOROWEGO

Komórki nowotworowe mają na swojej powierzchni peptydy antygenowe, które stanowią cel dla przeciwciał lub komórek biorących udział w reakcjach odpornościowych [11, 34, 37]. W warunkach naturalnych reakcje te mogą jednak przebiegać w różnych kierunkach – od procesów odrzucenia komórek nowotworowych po zupełną ich tolerancję. To, jak układ odpornościowy zareaguje na patologicznie zmienione komórki, zależy od stopnia ekspresji i sposobów prezentacji antygenów nowotworowych [11, 19].

Główną linię obrony przeciw nowotworom stanowią cytotoksyczne limfocyty T CD8⁺. Jednak dziewicze limfocyty T krążą zazwyczaj z krwią i limfą między narządami limfatycznymi i rzadko trafiają do tkanek zajętych procesem nowotworowym. Ich aktywacja zachodzi w narządach limfatycznych drenujących chorobowo zmienione obszary, a w procesie tym pośredniczą DC prezentujące antygeny guzowe [19].

Rozpoznawanie antygenów związanych z nowotworem przez limfocyty T wymaga ich prezentacji w połączeniu z cząsteczkami MHC. Doświadczalnie wykazano jednak, że komórki nowotworowe bardzo często cechuje obniżona ekspresja tych antygenów lub ich zupełny brak [11]. W rezultacie na takich komórkach, nawet jeśli mają one typowe dla siebie antygeny nowotworowe, nie ma kompleksów MHC-antygen, które mogłyby pobudzić limfocyty. Dzięki temu nowotwory „unikają” reakcji odpornościowych zależnych od limfocytów T.

Wskazuje się na możliwość istnienia jeszcze kilku innych mechanizmów prowadzących do tolerancji odpornościowej komórek nowotworu. Produkowany przez nie czynnik wzrostu śródbłonna naczyń, w badaniach doświadczalnych, silnie hamował dojrzewanie DC z komórek prekursorowych [8]. Również IL-10, często wytwarzana przez nowotwory, wpływa ujemnie na liczbę kostymulujących cząsteczek na powierzchni DC, co zmniejsza skuteczność prezentowanych przez nie antygenów [39]. Wreszcie komórki nowotworu mogą produkować czynniki immu-

nosupresyjne, np. TFG β , hamujące efektywną stymulację układu odpornościowego [36].

Opracowywane nowoczesne metody lecznicze chorób nowotworowych oparte na mechanizmach odpornościowych zakładają:

- wzmocnienie odpowiedzi odpornościowej organizmu przez aktywację limfocytów T przeciw komórkom nowotworowym,
- wywołanie i utrzymanie długotrwałej i skutecznej odpowiedzi odpornościowej w obrębie nowotworu.

Prace doświadczalne sugerują, że zastosowanie specjalnie przygotowanych DC daje zachęcające wyniki i umożliwia przybliżenie osiągnięcia postawionych celów [25]. Wstępne wyniki obserwacji histopatologicznych i klinicznych wykazują ścisłą, pozytywną zależność między liczbą komórek DC przenikających do tkanek guza, wzrostem odpowiedzi odpornościowej a rokowaniem [37]. Dlatego jednym z najważniejszych celów w badaniach nad DC jest opracowanie metod wzmocnienia z ich pomocą odpowiedzi odpornościowej skierowanej przeciwko nowotworom. W toku prac doświadczalnych okazało się, że spośród wszystkich leukocytów obecnych w tkance guzowej tylko niewielka część to DC, z których tylko niektóre następnie aktywnie prezentują nowotworowe antygeny w węzłach chłonnych i to właśnie te komórki cechowały się silnymi właściwościami pobudzającymi limfocyty T. Obserwacje te sugerują, że „środowisko nowotworowe” hamuje dojrzewanie i przemiany morfologiczne DC [37]. Na tej podstawie rozwinął się pomysł wzmocnienia reakcji odpornościowych poprzez wyhodowanie *in vitro* dużej liczby komórek DC aktywnie prezentujących wybrane antygeny i po takim ich przygotowaniu ponownie podanych choremu. Dodatkową zaletą takiej metody jest możliwość (przynajmniej teoretyczna) leczenia zmian rozsianych czy niszczenia nawet pojedynczych komórek nowotworowych pozostałych po leczeniu zasadniczym [9]. W badaniach doświadczalnych udało się uzyskać zatrzymanie, a nawet regresję wzrostu guza po dożylnym podaniu DC, które wcześniej poddane zostały działaniu *in vitro* antygenów nowotworowych. Podobne wyniki uzyskano podając tak przygotowane DC bezpośrednio do tkanki nowotworowej.

By pobudzić i wzmocnić odpowiedź odpornościową, opracowuje się metody wykorzystujące:

- 1) zmodyfikowane komórki nowotworowe do wywołania skutecznej odpowiedzi odpornościowej,
- 2) odpowiednie pobudzenie komórek dendrytycznych poddanych działaniu antygenów nowotworowych.

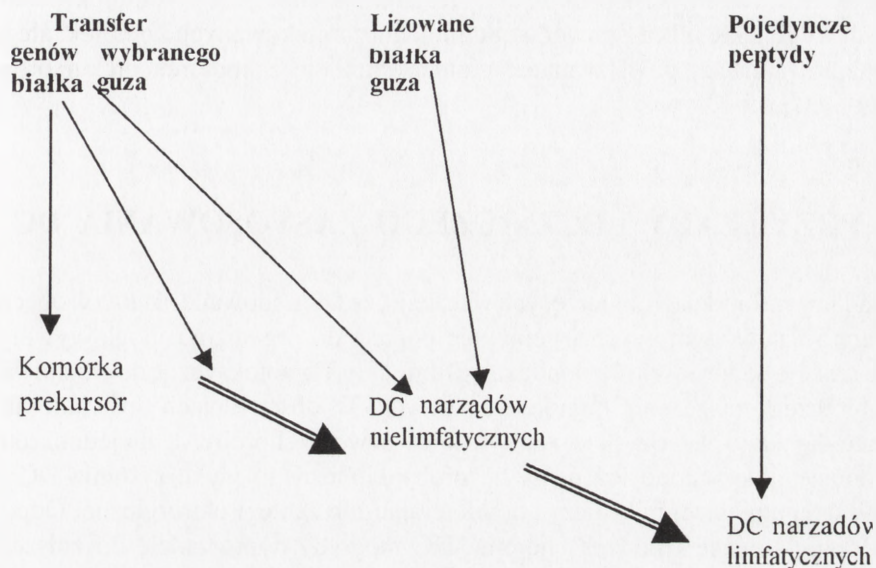
ad 1). Immunogenność komórek nowotworowych próbuje zwiększać się kilkoma metodami. Jedną z nich jest metoda polegająca na przeniesieniu genu kodującego białko B7 do komórek nowotworowych. W ten sposób udało się je zmusić do ekspresji na swojej powierzchni białka B7, które współdziała w prezentacji antygenów i potęguje reakcje odpornościowe. Białko to łączy się z obecną na limfocy-

tach cząsteczką CD28, co w obecności kompleksu antygen-MHC I związanym z odpowiednim receptorem na limfocycie uruchamia reakcje cytolityczne. W ten sposób udało się pobudzić cytotoksyczne limfocyty T do reakcji przeciwko komórkom, które do tej pory były przez nie ignorowane [11]. Inna metoda opiera się na wprowadzeniu do genomu DC fragmentów DNA zmutowanej komórki kodujących charakterystyczne dla niej antygeny. W ten sposób DC będą je produkowały jako własne i prezentowały w połączeniu z cząsteczkami MHC [12].

ad 2). Ideą tej metody jest wystawienie komórek dendrytycznych na duże stężenia antygenów nowotworowych, co wywołuje silne pobudzenie tych komórek, zwiększenie wychwytu i pochłaniania antygenów, przetworzenie i następnie prezentowanie ich na powierzchni. Dodatkowo hodowle DC przeprowadza się w obecności GM-CSF, co jeszcze bardziej poprawia skuteczność wymienionych reakcji. Antygeny nowotworowe otrzymuje się poprzez lizę komórek nowotworowych. Inkubowane w ich obecności DC ponownie podaje się dawcy, w którego organizmie wywołują silną odpowiedź odpornościową [11]. Badania na modelach zwierzęcych pokazują, że metodą tą można osiągnąć silną odpowiedź odpornościową przeciw komórkom nowotworowym. Ma jednak wadę, która może uniemożliwić zastosowanie jej dla potrzeb klinicznych. W pracach doświadczalnych stosowano antygeny guza nie pasujące do rozmiarów miejsca wiązania na cząsteczce MHC. Ponieważ antygeny nowotworowe o odpowiedniej wielkości (właściwej dla miejsca wiązania na cząsteczce MHC) są trudne do otrzymania, a istnieje możliwość wywołania pożądanej odpowiedzi odpornościowej nawet przeciwko fragmentom tych antygenów sugeruje się użycie niefrakcjonowanych białek guza. Alternatywą jest wystawienie DC na działanie RNA pochodzącego z komórek nowotworowych. W ten sposób można by wytwarzać odpowiedź przeciwko wielu różnym antygenom mimo wykorzystania niewielkiej ilości materiału nowotworowego [9]. Ze względu na przemiany morfologiczne i fizjologiczne, jakim podlegają DC, są one w różnym stopniu podatne na opisywane powyżej metody ich pobudzenia i zwiększenia ekspresji pożądanych antygenów (ryc. 2) [12].

WPLYW INFEKCJI WIRUSOWYCH NA DC

Ze względu na swoje właściwości (mnogość powierzchniowych receptorów dla antygenów, zdolność do ich aktywnego pochłaniania, obecność w tkankach sąsiadujących ze środowiskiem zewnętrznym np. w nabłonkach dróg oddechowych, moczopłciowych, skórze) komórki dendrytyczne mogą stanowić łatwy cel dla zakażeń wirusowych. W wyniku takich infekcji może dochodzić, oprócz spodziewanej prezentacji antygenów wirusowych, do szeregu niekorzystnych reakcji ułatwiających przetrwanie patogenu i rozprzestrzenienie się zakażenia na cały organizm. Obser-



RYCINA 2. Zmienność skutecznych metod stymulacji komórek dendrytycznych do prezentacji antygenów nowotworowych w trakcie ich dojrzewania (na podstawie [12])

wacje doświadczalne DC poddanych działaniu retrowirusów sugerują, że wywołują one w tych komórkach znaczące zmniejszenie, a nawet zupełny zanik prezentowanych dotychczas antygenów oraz uniemożliwiają ekspresję nowych (w tym wypadku antygenów wirusa). Jednocześnie zmniejsza się zdolność DC do aktywacji limfocytów, a w surowicy obserwuje się zmniejszenie miana przeciwciał. Część zarażonych DC ulega lizie, pozostałe (te zainfekowane niewielką liczbą wirusów) przeżywają i utrzymują zdolność do wiązania się z limfocytami [4], stanowiąc rezerwar wirusa, który może łatwo infekować otaczające DC, jak i kontaktujące się z nimi limfocyty. Zaobserwowano, że wirusy obecne w DC zachowują duże zdolności zakaźne nawet wówczas, gdy nie są w stanie replikować się [3]. Dlatego bardzo ważne jest poznanie roli, jaką odgrywają DC w patofizjologii zakażeń wirusem HIV. Badania doświadczalne wykazują, że komórki te odgrywają znaczącą rolę w rozprzestrzenianiu się tego zakażenia. Po kontakcie z wirusem HIV, np. w nabłonku narządów płciowych, DC przenoszą go i jego antygeny do węzłów chłonnych, gdzie prezentują je limfocytom. Tu prawdopodobnie zachodzą dwa procesy jednocześnie – pobudzone limfocyty zapoczątkowują reakcje odpornościowe skierowane przeciwko patogenowi, ale jednocześnie same ulegają wtórnemu zakażeniu wirusem z DC. Następuje zmniejszenie liczby zarówno DC, jak i limfocytów

CD4, a w konsekwencji dalszych reakcji odpornościowych spadek ilości przeciwciał przeciwwirusowych. Zaobserwowano, że zmniejszenie liczby komórek dendrytycznych wynika nie tylko z powodu obumierania zainfekowanych komórek, ale także z zahamowania ich powstawania i różnicowania się z komórek prekursorowych CD34⁺ [21].

PRZYKŁADY LECZNICZEGO ZASTOSOWANIA DC

Badania na modelach zwierzęcych wskazują, że DC hodowane *in vitro* w obecności antygenów nowotworowych i ponownie podane do organizmu mogą wywoływać żywe reakcje odpornościowe pobudzając limfocyty T cytotoksyczne do odnajdywania i wybiórczego niszczenia komórek guzowych. W obserwacjach doświadczalnych tą metodą udało się uzyskać zatrzymanie rozwoju choroby, a niejednokrotnie i jej remisję. Poczyniono też pierwsze próby klinicznego wykorzystania DC, jako terapii uzupełniającej radio- czy chemioterapię lub zabiegi chirurgiczne. Odpowiednio przygotowane i podane choremu DC mogłyby doprowadzić do zniszczenia niewielkich zmian przerzutowych oraz pojedynczych komórek nowotworowych rozsianych po całym organizmie, a pozostałych po leczeniu zasadniczym, zmniejszając prawdopodobieństwo nawrotu choroby i dając większą szansę na pełne wyleczenie [12, 34].

W badaniach doświadczalnych DC hodowano *in vitro* w obecności idiotypowych przeciwciał skierowanych przeciwko komórkom chłoniaka (w tym wypadku limfocytom B). Tak przygotowane DC zostały podane dożylnie czterem pacjentom, u których zaobserwowano następnie silną odpowiedź odpornościową skierowaną przeciwko nowotworowi. U trzech z nich zaobserwowano regresję guza [12].

Podobne próby lecznicze poczyniono u pacjentów z czerniakiem złośliwym. Prace genetyczne i immunologiczne prowadzone od lat osiemdziesiątych umożliwiły wykrycie kilku charakterystycznych dla tego guza antygenów. Jednym z nich jest MAGE-1, w którego obecności hodowano DC podane następnie trzem pacjentom. U wszystkich zaobserwowano wzmoczenie reakcji odpornościowych skierowanych przeciwko nowotworowi [12]. Inne badania wskazują na możliwość transdukcji do DC genu MUC-1 kodującego nieprawidłowe białko mucyny, typowe dla komórek czerniakowych. W ten sposób DC uzyskałyby zdolność do prezentacji tego antygeny w obecności niezbędnych cząsteczek wspomagających i antygenów MHC [18]. Przeprowadzono także próby polegające na podaniu do węzłów chłonnych pacjentów z czerniakiem DC hodowanych wcześniej w mieszaninie różnych, charakterystycznych dla tego nowotworu antygenów. Przeprowadzono podobne badania wykorzystując DC hodowane w obecności syntetycznego antygeny Melan-A/MART-1. Podanie tak przygotowanych DC pacjentom wywołało u nich, w odpowiedzi na

prezentowany antygen, proliferację limfocytów CD4, CD8 i reakcje cytotoksyczne skierowane przeciwko komórkom nowotworu.

Podanie autologicznych DC wydaje się być także korzystne u chorych z rakiem prostaty. W pierwszych klinicznych próbach wykorzystano antygen PSM do pobudzenia DC, które następnie podano pacjentom. U kilku z nich zaobserwowano wyraźną odpowiedź komórkową skierowaną przeciwko rakowi [37].

Badania nad interakcjami pomiędzy wirusami, zainfekowanymi DC a limfocytami powinny zaowocować w przyszłości opracowaniem szczepionek np. przeciwko AIDS [34]. Wydaje się prawdopodobne, że hodowle DC z odpowiednimi, pozbawionymi zakaźności antygenami wirusa pozwoliłyby otrzymać populację komórek pobudzających limfocyty do reakcji przeciwko patogenowi, bez obawy o ich zakażenie aktywnym wirusem. Tak przygotowane DC mogłyby zostać podane chorym uzupełniając powstałe w wyniku infekcji niedobory komórek oraz wzmacniając reakcje odpornościowe. Inną drogą jest opracowanie szczepionki z odpowiednio spreparowanych antygenów wirusowych, która mogłaby zostać podana osobom zdrowym śródskórnie lub do nabłonka np. narządów płciowych. Obecne tam komórki Langerhansa wychwyciłyby antygeny i przenieśli do węzłów chłonnych powodując pojawienie się, w toku dalszych reakcji odpornościowych, długotrwałej odporności na zakażenie wirusem HIV [34].

PODSUMOWANIE

Najnowsze badania, polegające na zastosowaniu odpowiednio przygotowanych i aktywowanych komórek dendrytycznych, wskazują na możliwość wzmożenia i ukierunkowania reakcji odpornościowych skierowanych przeciwko nowotworom i zakażeniom wirusowym. Opanowanie umiejętności pozyskiwania i hodowli komórek dendrytycznych umożliwiło szybki rozwój prac nad ich klinicznymi zastosowaniami. Zachęcające wyniki badań doświadczalnych sugerują, że w niedalekiej przyszłości komórki dendrytyczne mogłyby zostać zastosowane jako szczepionki z autologicznych komórek. Metody lecznicze wykorzystujące odpowiednio przygotowane DC umożliwiłyby skuteczną walkę z niewielkimi zmianami nowotworowymi rozszanymi po całym organizmie, pozostałymi po radio- lub chemioterapii. Zwiększyłyby to szansę na uzyskanie długotrwałych remisji choroby, a nawet pełne wyleczenie.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AUSTYN JM. Migration patterns of dendritic leukocytes. *Ann Surg* 1997; **226**: 898–902.
- [2] BANCHEREAU J, STEINMAN R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; **392**: 245–252.

- [3] BURTON GF, MASUDA A, HEATH SL, SMITH BA, TEW JG. Follicular dendritic cells in retroviral infection: host/pathogen perspectives. *Immunol Rev* 1997; **156**: 185–197.
- [4] CAMERON P, POPE M, GRANELLI-PIPERNO A, STEINMAN RM. Dendritic cells and replication of HIV-1. *J Leukocyte Biol* 1996; **59**: 158–171.
- [5] FAZEKAS DE S, GROTH B, COOK M, SMITH A, WINKSTROM M, BASTEN A. Role of dendritic cells in induction of tolerance and immunity *in vivo*. 1997; Plenum Press, New York: 255–263.
- [6] FEARNLEY DB, McLELLAN AD, MANNERING SI, HOCK BD, HART DN. Isolation of human blood dendritic cells using the CMRF-44 monoclonal antibody: implications for studies on antigen presenting cell function and immunotherapy. *Blood* 1997; **83**: 3708–3711.
- [7] FOSSUM S. Dendritic leukocytes: features of their *in vivo* physiology. *Ann Surg* 1997; **226**: 883–891.
- [8] GABRILOVICH DJ, CHEN HL, GIRGS KR, CUNNINGHAM HT, MENY GM, NADAF S, KAVANAUGH D, CARBONE DP. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 1996; **2**: 1096–1103.
- [9] GIROLOMONI G, RICCIARDI-CASTAGNOLI P. Dendritic cells hold promise for immunotherapy. *Immunol Today* 1997; **3**: 102–104.
- [10] GUINAN EC, GRIBBEN JG, BOUSSIOTIS VA, FREEMAN GJ, NADLER LM. Pivotal role of the B7:CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity. *Blood* 1994; **84**: 3261–3282.
- [11] GRABBE S, BESSERT S, SCHWARZ T, GRANSTEIN RD. Dendritic cells as initiators of tumor immune responders; a possible strategy for tumor immunotherapy? *Immunol Today* 1995; **16**: 117–121.
- [12] HERBST B, LINDEMANN A. Dendritic cells for immunotherapy. *Biomedical Progress* 1998; **11**: 1–6.
- [13] HEUFLE C, KOCH F, STANZL U, TOPAR G, WYSOCKA M, TRINCHIERI G, ENK A, STEINMAN RM, ROMANIN, SCHULER G. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol* 1996; **26**: 659–668.
- [14] JAKÓBISIAK M. Immunologia. 1995; Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- [15] KALIŃSKI P. The role of dendritic cells in development of polarized Th1 and Th2 cells. 1998; Amsterdam Thela-Thesis.
- [16] KANG K, KUBIN M, COOPER KD, LESSIN SR, TRINCHIERI G, ROOK AH. IL-12 synthesis by human Langerhans cell. *J Immunol* 1996; **156**: 1402–1407.
- [17] KRAAL G. Immunocytochemistry of dendritic cells. A clue to their function. *Ann Surg* 1997; **226**: 891–895.
- [18] KARANIKAS V, HWANG L, PEARSON J, ONG CS, APOSTOPOULOS V, VANGHAN H, ING P, JANZIESIN G, PIETRESZ G, TAIT B, BRODDLENT R, THYNNE G, MCKENZIE IF. Antibody and T cell responses of patients with adenocarcinoma immunized with mannan-MUC1 fusion protein. *J Clin Invest* 1997; **100**: 2783–2793.
- [19] KAWIAK J, HOSER G. Niektóre mechanizmy immunologiczne w nowotworach. Immunoterapia nowotworów w modelach zwierzęcych oraz w klinice. *Post Biol Kom* 2000; **27** supl. 15: 91–118.
- [20] KLEIJMEER MJ, OSSEVOORT MA, van VEEN CJH, VAN HELLEMOND I, NEEFJES JJ, KAST WM, MELJEF CJ, GEUZE HJ. MHC class II compartments and kinetics of antigen presentation in activated mouse spleen dendritic cells. *J Immunol* 1995; **154**: 5715–5724.
- [21] KNIGHT SC, PATTERSON S. Bone marrow-derived dendritic cells, infection with human immunodeficiency virus, and immunopathology. *Annu Rev Immunol* 1997; **15**: 593–615.
- [22] KOTZIN BL, BABCOCK SK, HERRON LR. Deletion of potentially self-reactive T cell receptor specificities in L3T4⁺, Lyt-2⁻ T cells of lpr mice. *J Exp Med* 1988; **168**: 2221–2229.

- [23] LENZ A, HEUFLER C, HAMMANSEE HG, GLASSL H, KOCH F, RAMONIN, SCHULER G. Murine epidermal Langerhans cell express significant amounts of class I histocompatibility antigens on the cell surface. *Proc Nat Acad Sci* 1989; **86**: 7527–7531
- [24] LEVINE TP, CHAIN BM. Endocytosis by antigen presenting cells: dendritic cells are as endocytically active as another antigen presenting cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 8342–
- [25] LOTZE MT. Getting to the source: dendritic cells as therapeutic reagents for the treatment of patients with cancer. *Ann Surg* 1997; **226**: 1–5.
- [26] MATZINGER P, GUERDER S. Does T-cell tolerance require a dedicated antigen-presenting cell? *Nature* 1989; **338**: 74–76.
- [27] MELIEF CJM. Dendritic cells as specialized antigen presenting cells. *Res Immunol* 1989; **140**: 902–926.
- [28] NIJMAN HW, KLEIJMEER MJ, OSSEVOORT MA, OORSCHOT VMJ, VIERBOOM M.P., van-de KEUR M, KENEMANS P, KAST WM, GEUZE HJ, MELIEF CJ. Antigen capture and major histocompatibility class II compartments of freshly isolated and cultured human blood dendritic cells. *J Exp Med* 1995; **182**: 163–174.
- [29] RASTELLINI C, LU L, RICORDI C, STRAVEL TE, RAU AS, THOMPSON AW. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-stimulated hepatic dendritic cell progenitors prolong pancreatic islet allograft survival. *Transplantation* 1995; **60**: 1366–1370.
- [30] ROMANI N, LENZ A, GASSEL H, STOSSEL H, STAUZL U, MAJCLIC O, FRITSCH P, SCHULER G. Cultured human Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotype and function. *J Invest Dermatol* 1989; **93**: 600–609.
- [31] ROMANI N, KOIDE S, CROWLEY M, WITMER-PACH M, LIVINGSTONE AM, FATHMAN CG, INABE K, STEINMAN RM. Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 1989; **169**: 1169–1178.
- [32] SHORTMAN K, CAUX Ch. Dendritic cell development: multiple pathways to nature adjuvants. *Stem Cells* 1997; **15**: 409–419.
- [33] STEINMAN RM. The dendritic cell system and their role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; **9**: 271–296
- [34] STEINMAN RM. DC: clinical aspects. *Ann Surg* 1997; **226**: 911–918
- [35] SUSS G, SHORTMAN K. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J Exp Med* 1996; **183**: 1789–1796.
- [36] TORRE-AMIONE G, BAUCHAMP RD, KOEPPEN H, PARK BH, SCHREIBER H, MOSES HL, ROWLEY DA. A highly immunogenic tumor transfected with a murine TGF β cDNA escapes immune surveillance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 1486–1490.
- [37] TROY AJ, HART DNJ. Dendritic cells and cancer: progress toward a new cellular therapy. *J Hematotherapy* 1997; **6**: 523–533.
- [38] WATTSC. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol* 1997; **15**: 821–850.
- [39] WILLEMS F, MARCHANT A, DELVILLE J, GERARD C, DELVAUX A, VELU T, DE BOER M, GOLDMAN M. Interleukin 10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur J Immunol* 1994; **24**: 1007–1009.
- [40] WITAS HW, MŁYŃARSKA A, MŁYŃARSKI W, BODALSKI J. CD28/CTLA4: Dodatkowy sygnał w aktywacji limfocytów T. *Post Biol Kom* 1998; **25**: 111–123.
- [41] WOLFF K, STINGL G. The Langerhans cell. *J Invest Dermatol* 1983; **80**: 17–21.
- [42] WÓJCIK C. Znaczenie proteasomów w prezentacji antygenów. *Post Biol Kom* 1998; **25**: 171–192.

- [43] YOUNG JW, SZABOLCS P, MOOR MAS. Identification of dendritic cells colony-forming units among normal human CD34⁺ bone marrow progenitors that are expanded by c-kit-ligand and yield pure dendritic cell colonies in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor α . *J Exp Med* 1995; **182**: 1111–1120.
- [44] ZAL T, VOLKMANN A, STOCKINGER B. Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J Exp Med* 1994; **180**: 2089–2099

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 16.10. 2000 r.

Przyjęto: 30.11. 2000 r.

Adres autora: ul. Gołkowska 6 A, 05-502 Piaseczno

MECHANIZMY PRZESTRZENNEGO RÓŻNICOWANIA ZARODKA*

MECHANISMS OF SPATIAL PATTERNING OF EMBRYOS

Andrzej i Janina KACZANOWSCY

Instytut Zoologii, Uniwersytet Warszawski

Streszczenie: W trakcie oogenezy lub wczesnej embriogenezy tworzy się przestrzenny plan organizacji zarodka. W pewnych typach jaj specyficzne czynniki (determinanty) są asymetrycznie rozmieszczone, co następnie powoduje występowanie mitoz różnicujących podczas rozwoju zarodka. Przestrzenny plan budowy zarodka powstaje w wyniku hierarchicznych i wzajemnie ograniczających się przestrzennie aktywacji zasadniczo uniwersalnych genów programu kodujących czynniki transkrypcyjne kontrolujące przebieg tworzenia mapy zarodka oraz aktywacji genów regulujących geometrię przebiegu procesów brudzkowania. Pojawianie się planu budowy przestrzennej zarodka rozpoczyna się od wyznaczenia osi przednio-tylnej i grzbietowo-brzuszej i ustalenia proporcjonalnej pierwotnej regionalizacji jego części ciała. Dwa typy mechanizmów tworzących informację pozycyjną komórek zarodka to: 1) ścieżki przekazywania informacji między poszczególnymi komórkami zarodka oraz wymiana sygnałów między zarodkiem i przyległymi komórkami jajnika oraz 2) mechanizmy kontrolujące orientację przestrzenną mitoz w zarodku. Pojawianie się informacji pozycyjnej w zarodku obejmuje procesy tworzenia gradientów morfogenów, pierwotnej indukcji embrionalnej, inhibicji bocznej i mechanizmów segmentacji. Omówiony jest także współczesny pogląd na ewolucję genów homeotycznych w drodze ich duplikacji i różnicowania, co prowadziło do powstawania wzajemnych zależności między czynnikami transkrypcyjnymi kodowanymi przez te geny.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28: 69–98)

Summary: The overall body plan of the organism is laid down during oogenesis, and in early embryogenesis. In many types of eggs some specific factors (determinants) are symmetrically deposited within these cells what results thereafter in differential mitoses of embryos. The overall body plan of embryo results from a hierarchy and spatially self-limiting activations of fairly universal classes of genes coding some transcription factors essential for pattern formation in different types of embryos, and from activations of genes controlling the geometry of cleavage. Implementation of instructions concerning the emergence of the body plan specifies the main anteroposterior and dorso-ventral reference axes and

*Referat wygłoszony podczas 28 Konferencji Biologii Komórki w Warszawie w dn. 4 listopada 2000 r.

the proportional assessment of the primary regionalization of embryos. Two kinds of mechanisms creating positional information are presented: 1) based on cross-talks of signalling pathways either among particular cells within the embryos, or between the embryo and adjacent somatic cells of the ovary, and 2) based on mechanism polarising and orienting mitoses. The emergence of positional information within the embryos is discussed in terms of appearance of gradients of morphogens, the primary embryonal induction, lateral inhibition and mechanisms of segmentation. The recent idea of evolution of homeotic genes by their tandem duplications and diversification is summarized, that results in combinatory networks of the homeotic genes, monitoring specification of the body parts.
(*Advances in Cell Biology* 2001; 28: 69–98)

1. Definicja różnicowania i opis wyznaczania miejsc różnicowania zarodka.
Wstęp, geny programu rozwoju,
Definicja różnicowania i główne mechanizmy różnicowania,
Informacja przestrzenna różnicowania; wyznaczanie biegunów zarodka.
2. Gradienty morfogenów wewnątrz zarodka i gradient zewnętrzny aktywacji receptorów powierzchniowych TOLL zarodka *Drosophila*.
Tworzenie polarnośći zarodka, morfogeny,
Wytworzenie pierwotnej wstępnej regionalizacji zarodka,
Wzajemne oddziaływanie sygnałów i ich inhibitorów zarodka i gonady źródłem instrukcji różnicowania, problem *twin peaks*,
Wytworzenie osi grzbietowo-brzuszej zarodków *Drosophila melanogaster* i *Caenorhabditis elegans*.
3. Mechanizm indukcji embrionalnej: przykład szlaku przewodnictwa sygnału WNT/receptor Frizzled, Modele segmentacji.
Indukcja embrionalna, i rola β -kateniny w szlaku przekazywania mechanizmem tworzenia granicy różnych losów przyległych komórek w obrębie nabłonka parasegmentu *Drosophila*,
Indukcyjna rola β -kateniny w metamerycznym wytwarzaniu polipów w hydrze.
4. Mechanizm inhibicji bocznej – wyznaczanie losu poszczególnej komórki w nabłonku neurektodermalnym; szlak przekazywania sygnału DELTA/receptor NOTCH.
5. Ekspresja genów homeotycznych jako przestrzenna specyfikacja różnicowania poszczególnych metamerów, lub części zarodka,
Definicja i cechy genów homeotycznych,
Zmiany w funkcjonowaniu genów homeotycznych w programowaniu rozwoju różnych typów świata zwierzęcego,
Ekspresja genów homeotycznych związana z polarnością indywidualnej komórki, a nie całego zarodka *Caenorhabditis elegans*.
6. Podsumowanie: Cechy mechanizmów tworzenia informacji pozycyjnej wyznaczającej mapę różnicowania w zarodku.

1. DEFINICJA RÓŻNICOWANIA I OPIS WYZNACZANIA MIEJSC RÓŻNICOWANIA ZARODKA

Wstęp: geny programu rozwoju

Rok 2000 przejdzie do historii jako rok, w którym poznano pełną sekwencję pierwszorzędową ludzkiego DNA. Wiadomo jednak, że tylko niewielka jego część koduje funkcjonalne geny, a co ważniejsze, że pojemność informatyczna genomu jest ograniczona w taki sposób, że genom koduje nieco mniej niż 100 000 wzajemnie niezastępowalnych białek (prawdopodobnie około 70 000). Ograniczenie liczby kodujących genów narzuca obciążenie mutacyjne populacji, które wzrasta wraz z liczbą unikalnych genów. Dwa lata wcześniej poznano pełną sekwencję genomu nicienia *Caenorhabditis elegans* i okazało się, że zawiera on około 20 000 genów. Jednocześnie wiadomo, że ciało tego robaka zbudowane jest zaledwie z 959 komórek, podczas gdy liczba komórek ludzkich szacowana jest na około 10^{14} . Porównanie przytoczonych liczb wskazuje na to, że w toku ewolucji świata zwierzęcego następował ogromny wzrost wielkości i stopnia złożoności organizmu przy stosunkowo niewielkim wzroście zawartości informatycznej genomu. Można to tłumaczyć tym, że informacja genetyczna u wyższych zwierząt jest zorganizowana w sposób hierarchiczny i zawiera geny, których produkty w sposób kaskadowy włączają wiele kolejnych genów. Te hierarchicznie uruchamiane procesy decydują o różnicowaniu komórek poszczególnych tkanek i narządów. Geny te często określane są jako geny programu rozwojowego albo jako geny selektorowe (z ang. *selector genes*). Produkty genów programu rozwojowego zwykle są czynnikami transkrypcyjnymi lub są to czynniki, które w sposób pośredni aktywują czynniki transkrypcyjne włączając lub wyłączając szlaki przetwarzania sygnałów w komórce. W ciągu ostatnich kilkunastu lat okazało się, że istnieje bardzo znaczne podobieństwo molekularne wielu genów programu rozwoju w całym świecie zwierzęcym poczynając od jamochłonów, a kończąc na człowieku (podobieństwo tak duże, że geny te są genami ortologicznymi) i że w różnych grupach zwierząt działają one w podobny sposób. Ewolucja organizmalna zwana także makroevolucją jest związana ze zmianami w programie rozwoju zwierzęcia. Pewien zestaw genów rozwoju, jaki występował na początku ewolucji świata zwierzęcego był warunkiem koniecznym dla dalszej ewolucji planów budowy, a więc dla powstania nowych typów embriogenezy odrębnych w grupach o charakterze wyższych jednostek taksonomicznych, np. typów, gromad, rzędów itd.

Ale są także i inne geny regulujące embriogenezę, związane z mitozami różnicującymi, które regulują geometrię podziałów komórek (np. geny *par* w nicieniu *Caenorhabditis elegans*).

Definicja różnicowania i główne mechanizmy różnicowania

Istotą różnicowania są procesy prowadzące do wyznaczania odmiennych losów pewnych komórek (nazwiemy je umownie losem typu A) w stosunku do innych komórek tego samego pochodzenia, których wygląd, rola i funkcje są losami typu „nie A” lub różnymi rodzajami losów, np. B, C, D. Przez poszczególne losy komórki rozumiemy albo morfologiczną, albo funkcjonalną zmianę komórki w stosunku do komórki macierzystej, jak też brak doraźnie takich zmian, ale zmienioną determinację i przebieg dalszego programu różnicowania. Operacyjnie oznacza to określony wskaźnik lub wskaźniki, które definiujemy jako „los A” pewnych komórek w klonie w stosunku do odmiennych „losów nie A” realizowanym przez komórki siostrzane. Zadaniem tego artykułu jest usystematyzowanie typów mechanizmów związanych z tworzeniem zarodka, w którym komórki realizujące losy A, B, C czy D występują w określonych częściach ciała.

Samo różnicowanie losów komórek wspólnego pochodzenia może zachodzić przez dwa uzupełniające się, ale odrębne **grupy mechanizmów: związanych z mitozami różnicującymi lub z wymianą sygnałów pomiędzy komórkami:**

Mechanizm różnicowania może być konsekwencją nierównego rozdziału tzw. **determinant** (to jest pewnych mRNA czynników transkrypcyjnych, różnych białek cytoplazmatycznych i pewnych struktur komórkowych, np. skupień mitochondriów lub ziarnistości ważnych dla dalszego rozwoju) w trakcie mitozy różnicującej. W wyniku podziału powstają dwie różne komórki realizujące losy A i nie A. Ukształtowanie pojedynczej komórki jajowej jest poprzedzone oogenezą, w której uczestniczą produkty genów programu rozwoju przyszłego zarodka. Zatem już na poziomie pojedynczej komórki jajowej uruchamiane są mechanizmy komórkowe powodujące, że nawet pierwszy podział mitotyczny zarodka może być podziałem różnicującym. Zwykle są to normalne podziały mitotyczne segregujące determinanty w sposób niejako bierny. Istnieje jednak coraz więcej danych wskazujących, że polarność poszczególnej komórki organizmu czy też całego zarodka powoduje nieprzypadkową lokalizację wrzeciona mitotycznego, a co za tym idzie nieprzypadkową lokalizację bruzdy cytokinetycznej. Lokalizacja bruzdy przesądza o rozdziale zawartości (w tym determinant) komórki rodzicielskiej. Ponadto w niektórych typach komórek o wyrażonej osi, a więc spolaryzowanych pojawia się w trakcie cytokinezy mechanizm nieprzypadkowej segregacji zawartości komórki rodzicielskiej do komórek potomnych. Tak np. u nicienia *Caenorhabditis elegans* wykazano, że sam mechanizm cytokinezy tworzy asymetrię podziału komórki [20]. Asymetryczna cytokineza pojawia się również w trakcie rozwoju narządów czuciowych *Drosophila* [27]. Podobna asymetryczna cytokineza charakteryzuje również metameryczny podział jednokomórkowych orzęsków [25] i pączkowanie drożdży [4]. Wobec tego można sądzić, że jest to bardzo stary i konserwatywny ewolucyjnie mechanizm

różnicowania, który powstał wcześniej, jeszcze przed wyodrębnieniem się wielokomórkowych *Metazoa*.

W drugiej grupie mechanizmów początkowe powielanie komórek, a następnie różnicowanie odbywa się przez system cząsteczek sygnałowych, odbieranych przez kompetentne receptory na innych lub tych samych komórkach. Kilkakrotna sygnalizacja albo jednego rodzaju cząsteczki sygnałowej, albo kilku różnych cząsteczek uruchamia szlaki przekazywania prowadzące do różnicowania losów komórek w klonie. Wysyłanie sygnałów w postaci uwalnianych ligandów i ich odbieranie przez komórki docelowe zawierające receptory tych cząsteczek jest uniwersalnym mechanizmem sterującym procesami różnicowania. W wyniku odbierania sygnałów komórka docelowa odbiera informacje wyznaczające:

- a) jej przeżycie i zmiany w niej samej obejmujące reorganizację jej struktury, np. reorganizację cytoszkieletu, jak i uruchamianie pewnych szlaków metabolicznych i produkcję nowych typów transkryptów, a następnie nowych typów białek funkcjonujących w komórce,
- b) ta nowa sytuacja może powodować uruchomienie szlaków sygnalizacji wewnętrznej regulującej dalsze losy komórki (cykl mitotyczny, apoptozę, lub różnicowanie) i koordynację współdziałania pomiędzy przedziałami komórki, np. pomiędzy cytoplazmą, jądrem i mitochondriami,
- c) pobudzenie lub odwrotnie zahamowanie komórki w wysyłaniu nowych informacji do otoczenia.

Jednocześnie warto zauważyć, że reorganizacja cytoszkieletu spowodowana albo przez zlokalizowany sygnał, albo przez aktywację ośrodków polimeryzacji w komórce, np. mitotyczna aktywacja MTOC (ang. *Microtubule Organizing Centers*) może pociągać za sobą wtórne konsekwencje. Otóż powstający cytoszkielet staje się sam źródłem dalszych sygnałów (por. przykład podany przez Tsukita i innych [40]), a także pewne enzymy są aktywowane przez sam kontakt z cytoszkieletem, np. grupa kinaz białkowych aktywowanych kontaktem z cytoszkieletem mikrotubularnym [33]. W ten sposób może powstawać określona morfologia komórki.

Obie grupy mechanizmów łączą pewne podobieństwa, a mianowicie pewna sukcesja zjawisk i kolejność, czyli hierarchia uruchamiania pewnych genów kontrolujących rozwój całego zarodka. A więc nie tylko rozwój, ale też jego składowa, czyli różnicowanie jest wobec tego pod kontrolą genów programu rozwoju zarodka.

Informacja przestrzenna różnicowania; wyznaczanie biegunów zarodka

W tym artykule uwagę skupimy jedynie na omówieniu tych mechanizmów, które tworzą informację przestrzenną, tzn. związaną z wyznaczaniem parametrów przestrzennych różnicowania. Formułując bardziej kolokwialnie, zadajemy trzy pytania:

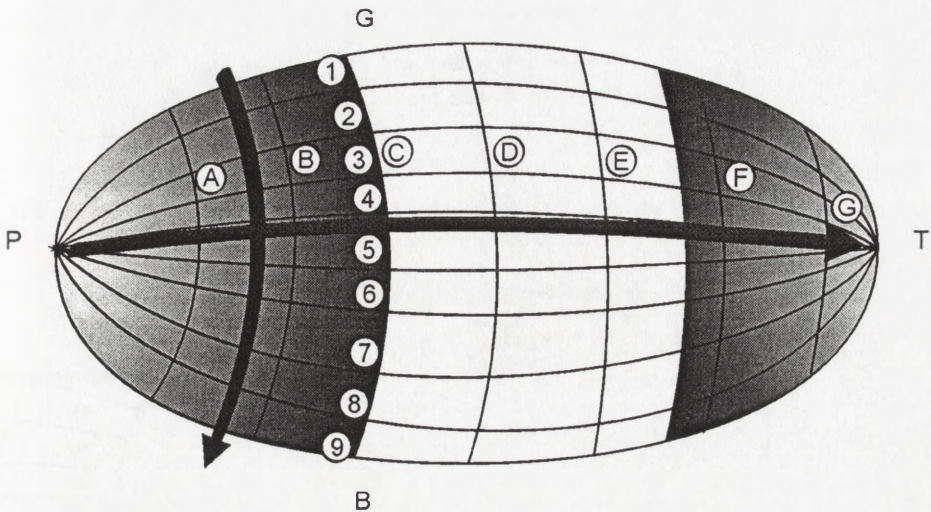
1. W jaki sposób zapłodniona komórka jajowa uzyskuje informację, gdzie będzie przód i tył oraz strona grzbietowa i brzuszna zarodka, a inaczej mówiąc, w jaki sposób odbywa się **uzyskanie polarności zarodka**?
2. W jaki sposób uzyskana polarność zarodka wyznacza pozycję komórek podejmujących określony typ różnicowania, tworząc regiony zarodka, np. wyznaczając część przednią, środkową i tylną zarodka (co można przyrównać do wytworzenia flagi francuskiej składającej się z proporcjonalnych trzech odrębnie zróżnicowanych kolorystycznie części: niebieskiej, białej i czerwonej zestawionych w odpowiedniej proporcji i kolejności – model Wolperta [45]).
3. W jakim stopniu mechanizmy regulujące podziały różnicujące są uniwersalnymi mechanizmami genetycznej kontroli rozwoju?

Takie pytania zadawali sobie embriologowie od wielu lat, a zostały one sformułowane w 1969 r. przez Lewisa Wolperta jako pytanie o mechanizmy tworzące informację pozycyjną, której wynikiem jest odpowiedź poszczególnej komórki zarodka (poprzez jej typ różnicowania nazwany „interpretacją uzyskanej informacji pozycyjnej”) regulowana jej położeniem w zarodku. O ile pytania są stare, to ostatnio co najmniej kilka odkryć stanowi zasadniczy postęp w rozumieniu mechanizmów tworzenia informacji pozycyjnej.

Do geometrycznego opisu poszczególnej pozycji w zarodku można posłużyć się modelem wydłużonego globusa z systemem koordynat Kartezjusza, a więc: z arbitralnie wyznaczonym jego biegunem przednim ($A=anterior$) i wobec tego drugim biegunem tylnym ($P=posterior$). Wtedy określenie dwóch współrzędnych w tym zarodku obejmuje parametry jego długości, np. dana pozycja znajduje się w jednej trzeciej długiej osi ciała oraz parametry osi grzbietowo-brzusznej ($D=dorsal$ i $V=ventral$), np. w połowie tej osi, co wyznacza nam aż dwie symetryczne pozycje. Dopiero dodanie informacji lewa ($L=left$) i prawa ($R=right$) wyznacza nam jednoznacznie jedną pozycję w tym modelu. Wzdłuż osi A-P można wyznaczyć szereg równoleżników; posługując się odliczaniem równoleżników względem całej osi A-P można wyznaczyć proporcjonalne regiony o odrębnej specyfikacji, np. jako strefę przednią, środkową i tylną lub jako strefę niebieską, białą i czerwoną flagi francuskiej posługując się modelem Wolperta (ryc. 1).

Jednym z najbardziej zdumiewających odkryć jest to, że istotnie w rozwoju zarodków wielu typów można posłużyć się modelem przedstawionym na rycinie 1. Otóż w trakcie rozwoju najpierw zostają wyznaczone **bieguny zarodka**. Istnieją bardzo różnorodne mechanizmy wyznaczania biegunów zarodka. A oto kilka przykładów:

Lokalizacja wrzeciona mejozytycznego może być źródłem wyznaczania bieguna oocytu. W większości typów jaj *Metazoa* wykryto, że aktywacja mejozy jest związana z aktywacją MAP kinazy. Na przykład, wchodzenie w mejozę jądra oocytu rozgwiazdy powoduje powstanie dwubiegunowego wrzeciona i wytworzenie mitotycznych struktur astrów na obu biegunach. Jednakże tylko jeden biegun trwale



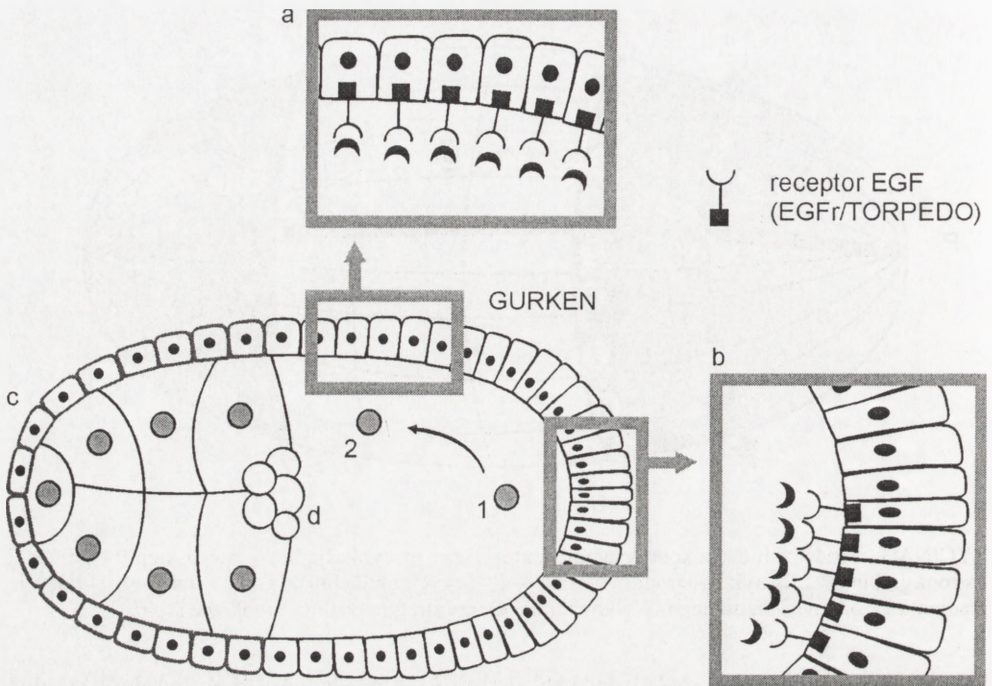
RYCINA 1. Model zarodka z koordynatami Kartezjusza i specyfikacją flagi francuskiej: P – przód; G – strona grzbietowa; T – tył; B – strona brzuszna; A-G – pozycje gradientu przednio-tylnego; 1-9 – pozycje gradientu grzbietowo-brzuszego. Wyodrębnione są trzy strefy: przednia, środkowa i tylna

zakotwicza pęcherzyk zarodkowy i to jest miejsce przyszłego bieguna animalnego zarodka [31].

Wchodzenie komórek w mejozę i wytworzenie wrzeciona wymaga aktywnego MPF (ang. *Meiosis/mitosis Promoting Factor*) składającego się z kinazy białkowej cdc2 i cykliny B1. Ostatnio okazało się, że regulacja syntezy białka cykliny B1 z nieaktywnego mRNA jest indukowana wchodzeniem oocytu w mejozę [2,38], a sama cyklina B1 jest związana przestrzennie z wrzecionem [1]. Natomiast w trakcie oogenezy wielu typów zwierząt centrosomy nie powielają się w trakcie dwu kolejnych cykli mejotycznych i albo wręcz zanikają i ostatecznie dojrzałe jajo ma albo tylko jeden centrosom z pojedynczą centriolą, albo jest pozbawione własnej centrioli (ssaki) [28]. W trakcie zapłodnienia plemnik wnosi własny centrosom jako centrum organizacji cytoszkieletu determinującego wyznaczenie bieguna tylnego zarodka (ang. *polar organiser*), a następnie całej osi przednio-tylnej ciała. Taki biegun następnie determinuje powstawanie osi tylnoprzodnej, np. w jaju *Caenorhabditis elegans* [13].

Polaryzujące oddziaływanie miejsca wniknięcia plemnika wykazano w rozwoju zarodków zwierzęcych, a ostatnio doświadczalnie także w zapłodnionym jaju glonu *Fucus* [21].

Inny mechanizm wyznaczania biegunów zarodka jest związany z regulacją położenia oocytu w gonadzie, np. bieguny oocytu *Drosophila melanogaster* są wyznaczone przez wzajemne oddziaływanie oocytu z otaczającymi somatycznymi komórkami foliularnymi [16,42]. Oddziaływanie komórek somatycznych gonady



RYCINA 2. Determinacja osi zarodka *Drosophila* i różnicowanie komórek folikularnych na: biegunowe, płytkowe i kolumnowe (wg [42]): 1,2 – kolejne położenia jądra oocyty z przyległym GURKEN; a – determinacja grzbietowa komórek folikularnych; b – determinacja tylna komórek folikularnych; a, b – nabłonki kolumnowe; c – nabłonek płytkowy; d – nabłonek biegunowy

może być zarówno źródłem polaryzacji jaja *Drosophila*, jak też wyznacza typy różnicowania przyległych komórek folikularnych gonady. W czasie oogenezy *Drosophila* receptory EGFR (receptory nabłonkowego czynnika wzrostu, ang. *Epidermal Growth Factor Receptor*) w komórkach somatycznych są aktywowane przez co najmniej trzy odrębne typy ligandów typu EGF. Są to białka: GURKEN, SPITZ i ARGOS. Proces różnicowania zarówno komórek folikularnych, jak i samego oocyty rozpoczyna się przez migrację somatycznych komórek folikularnych pomiędzy grupę komórek odżywczych (ang. *nurse cells*) siostrzanych względem oocyty oraz migrację samego oocyty ku tyłowi komory zarodkowej. Część tych komórek folikularnych zatrzymuje się w kontakcie z oocytem tworząc skupienie okrągłych komórek (tzw. pierwsza populacja komórek folikularnych), inne migrują po powierzchni oocyty i tworzą zamkniętą kapsułę. W tym stadium samo jądro oocyty także przesuwają się ku tyłowi komórki. W cytoplazmie, w okolicy tego jądra odbywa się synteza [39], a następnie wydzielanie na zewnątrz białka GURKEN. Wydzielanie liganda GURKEN na tylnym końcu oocyty ma cztery skutki:

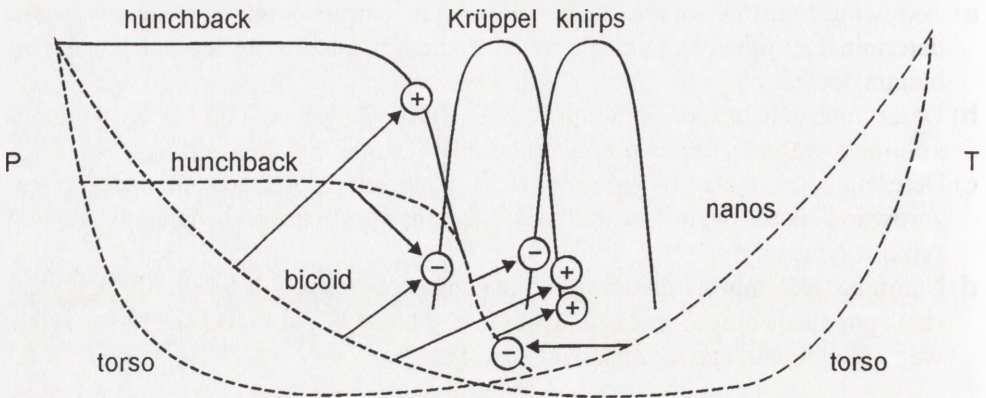
- a) Aktywuje EGFR komórek foliularnych tylnych powodując ich nieodwracalną determinację; odtąd te komórki będą źródłem sygnałów wyznaczających tylny biegun oocytu.
- b) Determinacja ta bezpośrednio powoduje ich różnicowanie w tak zwany nabłonek kolumnowy (ang. *columnar epithelium*).
- c) Determinacja bieguna tylnego wyznacza w oocycie zlokalizowane podczepianie zarówno końców (+) mikrotubuli, jak i innych specyficznych białek, np. kinazy A tylko w tyle oocytu.
- d) Natomiast te komórki foliularne, które migrując otaczają tylko komórki odżywcze (tzw. populacja druga) przekształcają się w spłaszczone komórki nabłonka płytkowego (ang. *epthelium squamosum*) [16] (ryc. 2).

2. GRADIENTY MORFOGENÓW WEWNĄTRZ ZARODKA I GRADIENT ZEWNĘTRZNY AKTYWACJI RECEPTORÓW POWIERZCHNIOWYCH ZARODKA *Drosophila*

Tworzenie polarności zarodka; morfogeny

Pomiędzy biegunami powstaje oś przednio-tylna (oś AP) albo oocytu, albo zygoty lub ten etap odbywa się później już w wielokomórkowym zarodku. Powstanie osi AP wyznacza **polarność osi zarodka**. Polarność zarodka wiąże się w tej czy innej formie z wytworzeniem przednio-tylnych i tylnoprednich gradientów determinant. Białka powstające z mRNA determinant albo mogą być zakotwiczone w błonie komórkowej, albo mogą swobodnie przemieszczać się w cytoplazmie pojedynczej komórki, albo też pomiędzy komórkami zarodka. Jeżeli takie białka przemieszczają się ku przodowi i tyłowi komórki, tworzą się centra ich aktywności, a gdy są zakotwiczone biegunowo, powstają jednobiegunowe gradienty stężeń wzdłuż osi AP (ryc. 3). Doświadczalnie wykazano, że **morfogenami** są takie determinanty, które w zarodku (jednokomórkowym czy też wielokomórkowym) tworzą gradient stężeń, a następnie pewne krytyczne wartości stężenia tego morfogenu wyznaczają kolejne strefy odrębnych losów komórek [5]. Istnieją różne mechanizmy tworzenia spolaryzowanego zarodka. Znowu parę przykładów:

Dość prostym mechanizmem tworzenia osi AP może być samorzutne powstawanie gradientów receptorów poznane wprawdzie na modelu roślinnym, ale zapewne realizowane w innych zarodkach zwierzęcych. Tworzenie w błonie specyficznego skupienia receptorów zawierających motywy EGF i ich związanie z cytoszkieletem błony jest zapewne jednym z pierwszych źródeł polarności jaja. Tak np. jajo brunatnicy *Fucus* jest zupełnie apolarne i ma budowę komórki idealnie promienistej; źródłem polarności nie jest grawitacja, a kierunkowe oświetlenie wyznaczające polarne położenie pędu zarodka. Ale nawet w kompletnej ciemności powstaje także



RYCINA 3. Schemat rozmieszczenia gradientów głównych rodzajów mRNA wzdłuż osi AP oocyty *Drosophila*. (wg [26] uproszczony). Przerzywaną linią zaznaczono stężenia białek

ość ciała; w sposób zupełnie przypadkowy najpewniej skutkiem pierwotnej przypadkowej kolizji receptorów w dowolnym miejscu powstanie ich krótkotrwała aktywacja i ich zakotwiczenie z cytoszkieletem błonowym w postaci podbłonowego skupienia aktyny wyznaczające jeden biegun zarodka [21]. Prawdopodobnie taki przypadkowy incydent pierwotny jest wzmagany przez pogłębiającą się akumulację w płaszczyźnie błony receptorów pływających wokół początkowej „łatki” aktyn. Wobec tego odbywa się zlokalizowany wychwytywanie następnymi receptorami wokół tej „łatki”, a to powoduje postępujące zmniejszanie ich liczby poza tym miejscem. W ten sposób może powstawać pewien gradient gęstości wolnych receptorów wokół aktynowej „łatki” [7].

Zróźnicowanie biegunów oocyty *Drosophila* prowadzi do zlokalizowanego transportu pewnych transkryptów w jaju i wytworzenia gradientów determinant, których koncentracja wyznacza przyszłe losy regionu. Pierwotne wyznaczanie biegunów oocyty wiąże się z docelowym transportem mRNA pewnych czynników transkrypcyjnych lub regulatorowych. Otóż, nietranskrybowane odcinki tych mRNA tzw. 3'UTR, a także 5'UTR (ang. 3', 5' *Untranslated Regions*) mogą zawierać sekwencje rozpoznawane przez białka regulacyjne, które pośredniczą w podczepianiu się transkryptów do białek motorycznych przesuwanych wzdłuż mikrotubul. Takie transkrypty są zatem kierunkowo transportowane w komórce. Co więcej transkrypty niezwiązane z aparatem motorycznym podlegają degradacji. Przemieszczane transkrypty mogą być także związane z czynnikami translacji. Dopiero ostateczne zakotwiczenie transportowanego transkryptu do określonego miejsca cytoszkieletu podbłonowego uwalnia ten transkrypt i pobudza lokalną syntezę białka z matrycy mRNA [22]. W przypadku oocyty *Drosophila* na biegunach oocyty jest zlokalizowany czynnik transkrypcyjny mRNA *torso*, a następnie tworzy się przedni gra-

dient mRNA *bicoid* [24] i aż trzy tylne gradienty: mRNA *nanos* (i niewzględzone na rycinie) *oskar* i *caudal* (ryc. 3) [18]. Badania genetyczne rozwoju *Drosophila* wykazały, że prawidłowa lokalizacja determinant polarności w stadium wielojądrowego, jednokomórkowego zarodka warunkuje jego prawidłowy rozwój po wyodrębnieniu się poszczególnych komórek blastodermi. Ostatnio Ruden i inni [34] stwierdzili, że pewne białka regulujące fuzję plemnika z jajem są także niezbędne dla tylnej lokalizacji mRNA *oskar* i lokalizacji pasma płciowego na tylnym biegunie oocytu.

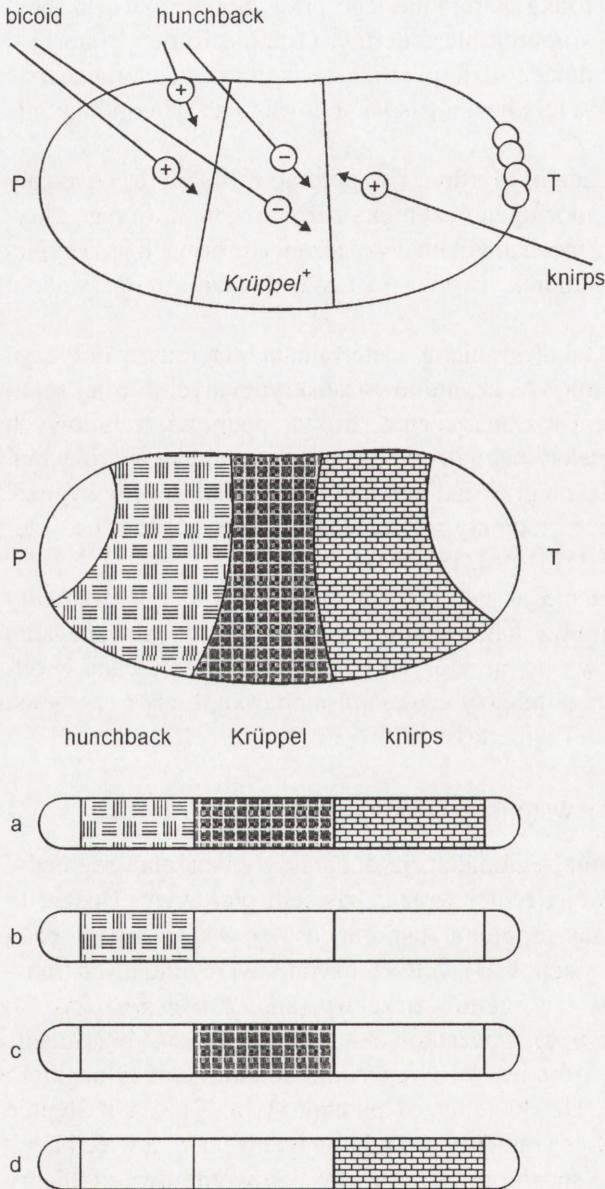
Podobnie jest u kręgowców; badania Gurдона i współpracowników [6] wykazały związek powstawania gradientu morfogenu czynnika różnicowania zwanego aktywiną w zarodku płaza (*Xenopus*) z mechanizmem wyznaczania informacji pozycyjnej różnicowania poszczególnych komórek zarodka (a także działania tego systemu *in vitro*).

Warto jednak zauważyć, że takie gradienty determinant nie muszą dotyczyć wyłącznie cytoplazmatycznych mRNA, czynników transkrypcyjnych lub jej regulatorów, ale może to być gradient rozmieszczenie struktur podpowierzchniowych pod błoną stanowiący tzw. korteks spełniający funkcje determinant w rozwoju. Takimi determinantami mogą być na przykład niektóre kinazy białkowe w zygocie *Caenorhabditis elegans* tworzące gradienty rozmieszczone odpowiednio na przednim i tylnym biegunie zygoty [12] (por. ryc. 7).

Powstaje jednak następne pytanie, w jaki sposób początkowo ciągłe gradienty stężenia morfogenów warunkują powstanie regionalizacji, to znaczy powstawania granic, które rozdziela obszary, w obrębie których komórki są różnicowane w odmienny sposób (takie jak granice pomiędzy częściami niebieską, białą i czerwoną we fladze francuskiej w modelu Wolperta).

Wytworzenie pierwotnej wstępnej regionalizacji ciała zarodka

W zarodku *Drosophila* wstępna regionalizacja dotyczy wytworzenia regionów przyszłej głowy, części środkowej i tylnej wraz z pasmem płciowym. Będzie to więc praktycznie pierwsza realizacja problemu flagi francuskiej, w którym nadrzędną kontrolną rolę pełnią gradienty występowania mRNA czynników regulujących transkrypcję trzech głównych genów, tzw. **genów przerwy** (ang. *gap genes*) (ryc. 4, genów *hunchback*, *Krüppel* i *knirps*). Początkowo w jaju występują dwie determinanty: determinanta przednia, którą jest mRNA *bicoid* i determinanta tylna, którą stanowi mRNA *nanos* (ryc. 3). Dzięki temu oś przednio-tylna jaja, a następnie zarodka wyznaczona jest przez dwa gradienty produktów tych genów, a więc białek BICOID i NANOS działające w sposób przeciwstawny. Pierwotne dwa gradienty białek BICOID i NANOS wyznaczają obszary ekspresji w zarodku kolejnych trzech genów, zwanych genami przerw (ang. *gap genes*) determinującymi rozwój głowy i tułowia (gen *hunchback*), przedniej części odwłoka (gen *Krüppel*) i tylnej części



odwłoka (gen *knirps*). Delecje tych genów powodują powstanie skróconych zarodków, w których brakuje odpowiednio wymienionych wyżej części zarodka (ryc. 4). Ekspresja genu *hunchback* zależy bezpośrednio od gradientu białka BICOID ponieważ białko BICOID stanowi czynnik transkrypcyjny, który aktywuje w zarodku transkrypcję genu *hunchback*. Gen ten ma kilka wzmacniaczy położonych przed miejscem przyłączenia kompleksu transkrypcyjnego i z którymi łączy się białko BICOID. Badania

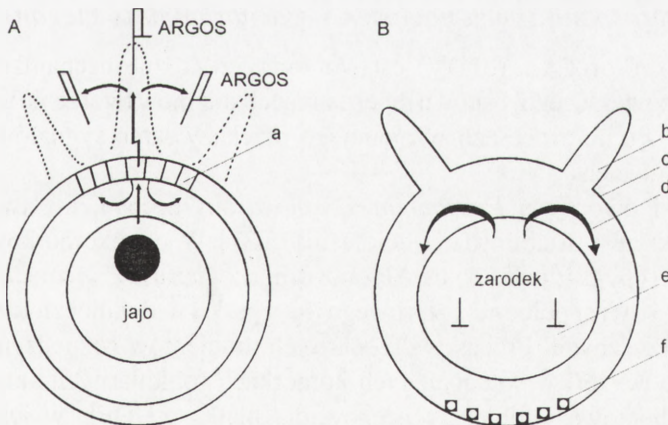
RYCINA 4. Ekspresja transkryptów genów przerwy (*gap genes*) w oocycie *Drosophila* jako realizacja modelu flagi francuskiej (kombinacja różnych rysunków wg Gilberta [11]); rysunek górny – schemat regionalizacji aktywności mRNA: *bicoid*, *Krüppel* i *knirps* w stadium wielojądrowego zarodka z wyodrębnionymi komórkami linii płciowej na biegunie tylnym, poniżej schematy tej regionalizacji z wyodrębnionymi regionami biegunowymi (puste regiony) oraz schematy kolejności tych regionów: a – w linii dzikiej; b – w przypadku delecji lub mutacji genu *hunchback* (zaznaczony obszar ekspresji) obserwuje się ubytek tylnej części głowy i tułowia (brak segmentu wargowego i trzech segmentów tułowia); c – w przypadku delecji lub mutacji genu *Krüppel* (zaznaczony obszar ekspresji w środkowej części zarodka) nie tworzą się segmenty tułowia i pięć pierwszych segmentów odwłoka; d – w przypadku delecji lub mutacji genu *knirps* (zaznaczony tylny obszar ekspresji) nie powstają segmenty odwłokowe od drugiego A2 do siódmego A7

z użyciem konstruktów genetycznych zawierających różną liczbę wzmacniaczy transkrypcji genu *hunchback* oraz gen reporterowy wykazały, że ostra granica ekspresji genu reporterowego przebiegająca w środkowej części zarodka wymagała pięciu wzmacniaczy, a przy mniejszej liczbie wzmacniaczy granica stawała się nieostra. Białko HUNCHBACK także jest czynnikiem transkrypcyjnym i aktywuje kolejne geny kaskady genów programu. Ponadto HUNCHBACK przyłącza się do własnego mRNA i blokuje jego translację, co dodatkowo wzmacnia granicę pomiędzy przednim i dalszymi częściami zarodka. Widzimy więc, że u *Drosophila* produkty matczynych mRNA *bicoid* i *nanos* wyznaczające oś A-P (ryc. 2) prowadzą do wstępnej realizacji modelu flagi francuskiej (ryc. 4, górna część).

Ale są i inne mechanizmy regionalizacji: Podziały różnicujące w bruzdkowaniu zygoty *Caenorhabditis elegans* prowadzą również do wstępnej regionalizacji [3] (ryc. 7 A).

Wzajemne oddziaływanie sygnałów i ich inhibitorów zarodka i gonady *Drosophila* źródłem instrukcji różnicowania; problem *twin peaks*

Jeszcze raz przypomnijmy, że w oocyty *Drosophila* po wytworzeniu osi przednio-tylnej odbywa się migracja jądra oocyty z pozycji tylnej do przedniej, a zarazem grzbietowej (ryc. 2). Jądro oocyty przesunięte na nowe miejsce powoduje, że sygnał GURKEN jest wydzielany tylko po grzbietowej stronie zarodka do płynu perivitellarnego pobudzając przyległe grzbietowe komórki folikularne do wytworzenia



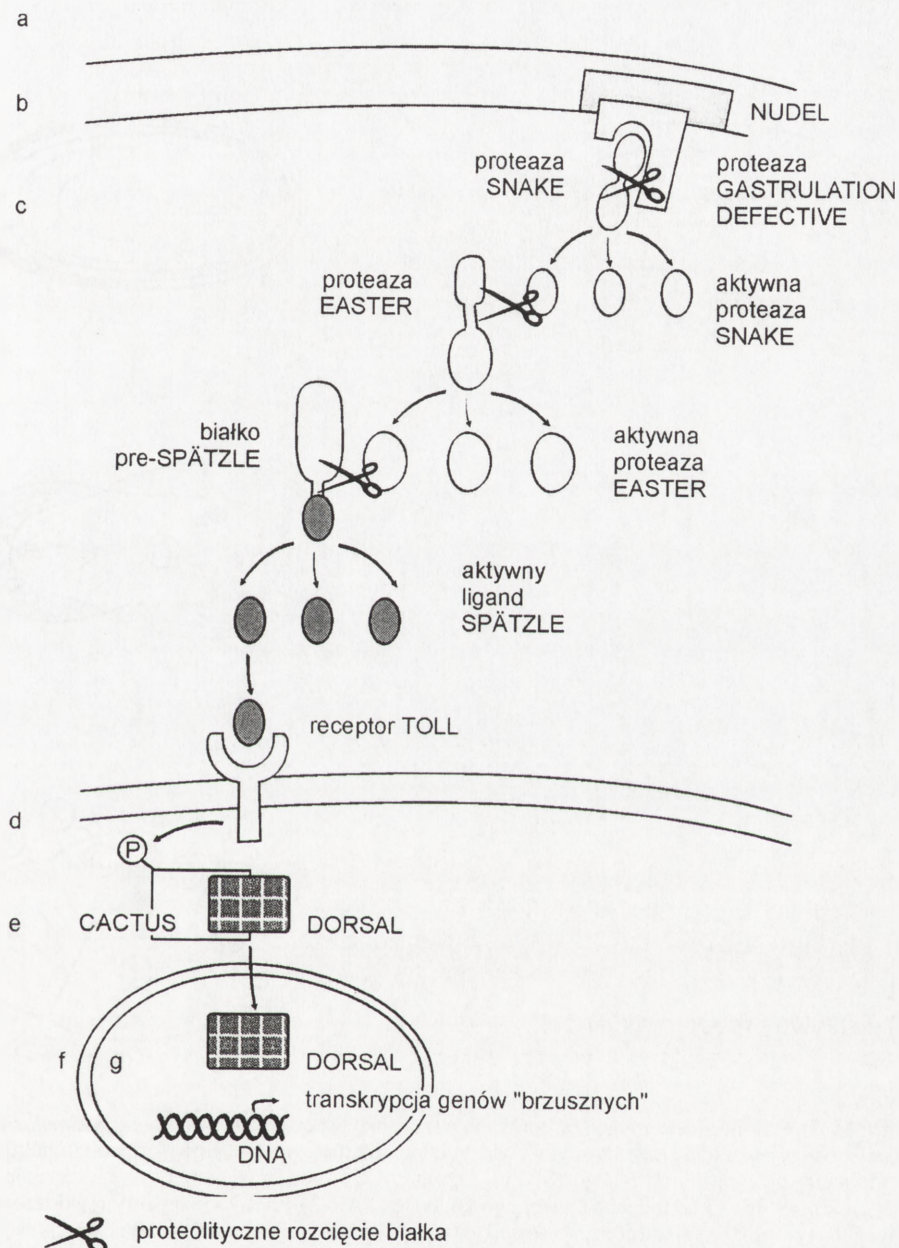
RYCINA 5. A – rozchodzenie się sygnałów aktywujących MAP kinazy i sygnału hamującego (ARGOS) w grzbietowym nabłonku folikularnym wykazującym początkowo najwyższą aktywność MAP kinaz (środkowy schemat aktywacji zaznaczony linią kropkowaną) i tworzenie gradientu dwuwierzchołkowego tej aktywacji (dwa boczne szczyty) (*twin peaks*) i B – stadium późniejsze rozmieszczenie wyrostków oddechowych i symetrycznych gradientów grzbietowo-brzusznym w zarodku *Drosophila*: a – komórki folikularne; b – wyrostki oddechowe; c – chorion; d – gradient białka DECAPENTAPLEGIC (DPP); e – gradient DORSAL hamujący ekspresję DPP; f – brzuszny gradient białka NUDEL

szeregu nowych transkryptów, a następnie białek. Tylko grzbietowo położone komórki folikularne wydzielają do przestrzeni periwitelarnej białko sygnalizacyjne SPITZ w formie nieaktywnej (pre-SPITZ) i białko proteolityczne RHOMBOID aktywujące SPITZ. Oba sygnały GURKEN i SPITZ odbierane są przez receptory błonowe komórek folikularnych typu EGFR i aktywują w tych komórkach kinazy mitogenne (ang. *MAP kinases*). Wysoki poziom aktywacji kinaz mitogennych w komórkach folikularnych grzbietowych hamuje syntezę białka NUDEL, a pobudza syntezę i wydzielanie do przestrzeni periwitelarnej białka ARGOS. ARGOS łączy się z receptorami błonowymi typu EGFR tych samych komórek folikularnych, które go wydzielają. Białko to jednak działa przeciwnie w stosunku do białek SPITZ czy GURKEN, bo jest inhibitorem wygaszającym aktywność kinaz mitogennych. W rezultacie w nabłonku folikularnym po stronie grzbietowej oocyta występuje następująca sekwencja zdarzeń: najpierw silna aktywacja kinaz, a następnie jej wygaszenie. Zarówno fala aktywacji, jak i następnie wygaszania rozchodzą się ze strony grzbietowej symetrycznie na boki. W ten sposób powstają wkrótce dwa symetryczne podgrzbietowe szczyty omawianego gradientu aktywacji kinaz mitogennych. Są to dwa miejsca intensywne powielanie się komórek folikularnych, które następnie zwrotnie działają na zarodek i powodują wyznaczenie miejsc wytworzenia dwóch płatów oddechowych. Zjawisko to zostało obrazowo nazwane mianem tworzenia podwójnych wierzchołków (ang. *twin peaks* [43] (ryc. 5 A i B)).

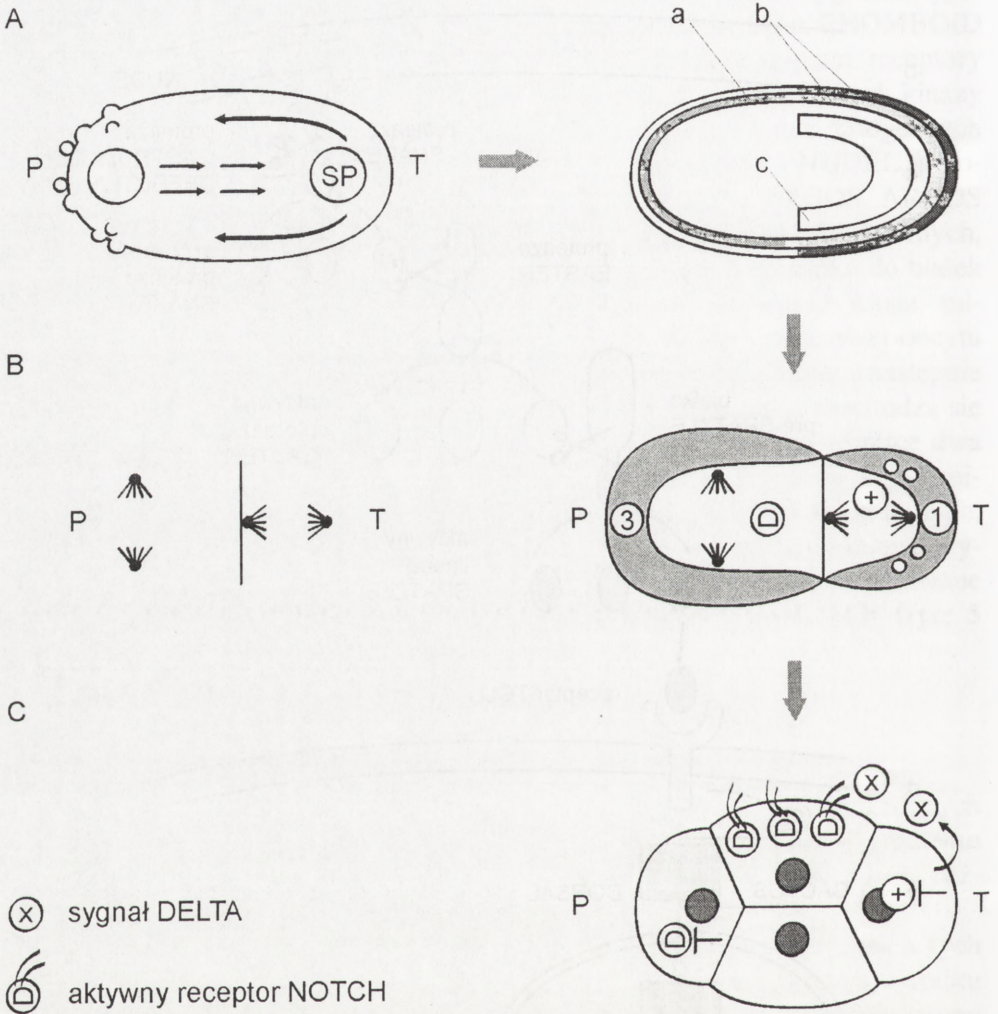
Wytworzenie osi grzbietowo-brzuszej zarodków *Drosophila melanogaster* i *Caenorhabditis elegans*

Oś grzbietowo-brzusza (oś DV) jest tworzona przez różne mechanizmy w różnych typach świata zwierzęcego. I znowu repertuar mechanizmów tworzenie tego gradientu może opierać się na procesach wzajemnego przekazywania sygnałów lub na różnicujących mitozach.

Dla muszki owocowej *Drosophila melanogaster* mechanizmy tworzenia tych osi zostały odkryte w ostatnim dziesięcioleciu [15,37]. W jednokomórkowym zarodku powstają dwa typy osi; jedna to oś AP oraz druga związana z wyznaczeniem strony grzbietowej (a więc południka zerowego na ryc. 1) i dwubocznych gradientów grzbietowo-brzusznych. Proces tworzenia tych gradientów rozpoczyna się (jak to opisane jest powyżej) w somatycznych komórkach folikularnych aktywacją MAP kinaz i gradientową inhibicją występowania białka NUDEL w ich błonie wyścielającej przestrzeń periwitelarną. Po stronie grzbietowej zarodka brak jest białka NUDEL, a występuje wobec tego głównie po stronie brzusznej tworząc gradient brzuszno-grzbietowy NUDEL w błonie komórek folikularnych stanowiących osłonkę żółtkową kapsuły jajowej (ryc. 6). W płynie przestrzeni periwitelarnej znajduje się szereg nieczynnych zewnętrznych proteaz serynowych (GASTRULATION DE-



RYCINA 6. Przykład gradientu aktywacji receptora TOLL przez środowisko zewnętrzne tworzące gradient brzuszno-grzbietowy zarodka *Drosophila*. Rola białka NUDEL i kolejnych proteaz w przetwarzaniu prekursora SPÄTZLE w przestrzeni periwitelarnej; a – chorion, b – osłonka żółtkowa kapsuły jajowej; c – przestrzeń periwitelarna; d – błona jaj/komórek zarodka; e – cytoplazma; f – otoczka jądrowa, g – regulacja transkrypcji na chromatynie



RYCINA 7. Przebieg determinacji informacji pozycyjnej w czterech blastomerach *Caenorhabditis elegans*: A – wytworzenie przednio-tylnej osi zygoty z przesuniętym ku tyłowi jądrem (strzałki) i tylną determinantą bieguna mitotycznego (SP=ang. *spindle pole*) oraz gradientowe rozmieszczenie białek PAR-2 i kinazy PKC-3 od bieguna przedniego (a), białek PAR-3 i kinazy serynowo-treoninowej od bieguna tylnego (b) oraz strefy ziarnistości (c) (wg [12]); B – drugi podział postzygotyczny, w którym odbywa się rotacja wrzeciona mitotycznego w blastomerze tylnym P1 (schemat) i mitozy różnicujące obu blastomerów; białko PAR-3 przypadnie dwu przednim blastomerom, białko PAR1 tylnym, a ziarnistości będą zlokalizowane wyłącznie w tylnym biegunowym blastomerze; C – powstałe cztery blastomery to: blastomer tylny wysyłający sygnał X (DELTA); odbierany przez blastomer grzbietowy (uprzędnie przedni), blastomer przedni niestymulowany sygnałem i blastomer brzuszny nieprodukujący sygnału

FECTIONE, SNAKE i EASTER) oraz nieczynny ligand SPÄTZLE. Białko NUDEL indukuje kaskadę aktywacji proteaz serynowych (które aktywują się kolejno przez proteolityczne odcinanie fragmentu peptydu, podobnie jak to jest w przypadku aktywacji fibrynogenu w krwi) (ryc. 6, nożyce). Dopiero ostatnia proteaza EASTER aktywuje ostatecznie liganda SPÄTZLE. Ta aktywacja zachodzi w przestrzeni periwitelarnej głównie po stronie brzusznej zarodka. W ten sposób SPÄTZLE aktywuje tylko po stronie brzusznej receptory TOLL równomiernie rozmieszczone w komórkach blastodermy zarodka. A więc gradientowy charakter aktywacji receptorów TOLL jest zdeterminowany przez gradient zewnętrzny rozmieszczenia białka NUDEL w osłonce. Aktywowane receptory TOLL oddziałują na cytoplazmatyczne, nieczynne heterodimery białek CACTUS i DORSAL (przez fosforylację białka CACTUS prowadzące do uwolnienia i aktywacji DORSAL). Białko DORSAL jest czynnikiem transkrypcyjnym wnikającym do jądra, aktywującym transkrypcję genów brzusznych (w tym także transkrypcję genu DORSAL). Wobec tego w blastodermie brzusznej powstaje dodatkowa porcja białka DORSAL, który hamuje transkrypcję genu *decapentaplegic*. Wobec tego, białko DECAPENTAPLEGIC jest wydzielane do płynu periwitelarnego wyłącznie przez komórki blastodermy po stronie grzbietowej zarodka (ryc. 6).

DECAPENTAPLEGIC jest bardzo ważnym morfogenem, który jest ligandem aktywującym receptory typu TGF- β (ang. *Transformation Growth Factor β*), a więc ligandem receptorów czynnika transformującego. Te ligandy receptora TGF- β mają swój odpowiednik u kręgowców w postaci białek BMP (ang. *bone morphogenetic protein*). W ten sposób powstają w końcu w osi dorso-ventralnej D-V gradienty grzbietowo-brzuszne aktywacji TGF- β i brzuszno-grzbietowe DORSAL. Od stężenia tych morfogenów zależą dalsze losy poszczególnych grup komórek w osi grzbietowo-brzusznej zarodka: np. komórki blastodermy grzbietowej przekształcają się w ektodermę grzbietową larwy, komórki położone po stronie brzusznej przekształcają się w mezodermę, a komórki położone bocznie staną się neurrektodermą przyszłej larwy. Można zauważyć, że opisany proces jest skomplikowany i nużący dla czytelnika. A jednak taki wieloetapowy proces tworzenia osi DV jest konserwowany ewolucyjnie w embriogenezie i morfogenezie zarówno owadów, jak i kręgowców.

Powstanie osi grzbietowo-brzusznej nicienia *Caenorhabditis elegans* odbywa się jednak przez podziały różnicujące. Osiowe i polarne rozmieszczenie różnych składników korteksu zapłodnionego jaja nicienia (ryc. 7 A) stanowi informację kontrolującą wyznaczenie geometrii położenia bruzd cytokinetycznych w blastomerze przednim (AB) i tylnym (P1) (ryc. 7 B). W tym bruzdkowaniu determinacyjnym prowadzi to do zróżnicowania czterech blastomerów. Mutacje typu *par* (ang. *partitioning*) *C. elegans* odnoszą się właśnie do czynników kontrolujących prawidłową symetrię podziałów postzygotycznych. Prawdopodobnie aktywacja cytoplazmatycznej kinazy serynowo-treoninowej PAR 4 kontroluje zakotwiczenie białek PAR

6 i pewnej odmiany kinazy białkowej C (PAR 3) tylko w przedniej części jaja, a ziarnistości (tzw. ziarnistości P) białka cytoszkieletalnego PAR 2 i innej kinazy serynowo-treoninowej PAR 1 – wyłącznie w tyle zarodka. Zapłodnione mutanty matczyne genów *par* szybko giną w stanie homozygotyczności, a heterozygoty charakteryzuje równomierne rozmieszczenie białek w korteksie zapłodnionego zarodka. Wadliwe rozmieszczenie bruzd cytokinetycznych prowadzi do powstania nieprawidłowych zarodków i ich śmierci. Tylko heterozygoty powstałe z zapłodnienia prawidłowego jaja plemnikiem noszącym mutacje *par* są prawidłowe i żywotne. Z tych danych wynika, że rozmieszczenie białek w osi AP ma znaczenie determinujące dla wyznaczania położenia bruzd cytokinetycznych w trakcie bruzdkowania determinacyjnego (ryc. 7). W trakcie dwóch kolejnych podziałów bruzdkowania *C. elegans* [3,44] polaryzacja wrzecion mitotycznych wyznacza determinację przedniego i tylnego oraz grzbietowego i brzuszno-blastomery (ryc. 7 C).

3. MECHANIZM INDUKCJI EMBRIONALNEJ: PRZYKŁAD SZLAKU PRZEWODNICTWA SYGNAŁU WINGLESS (WNT)/RECEPTOR FRIZZLED – MODELE SEGMENTACJI

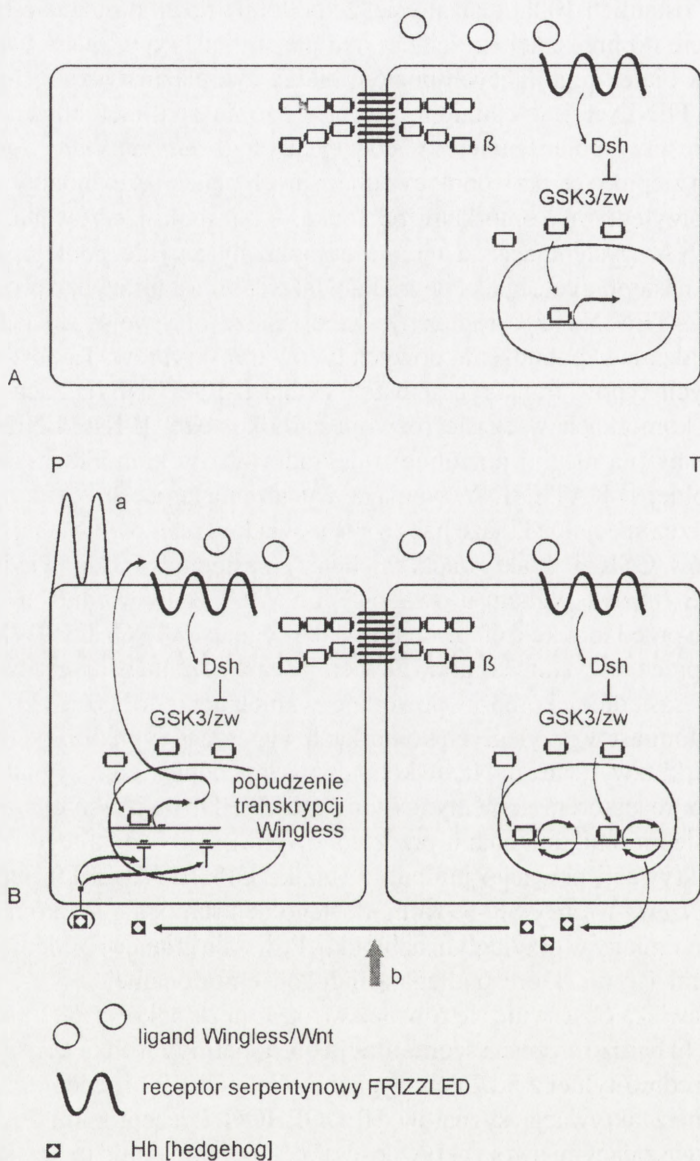
Indukcja embrionalna i rola β -kateniny w szlaku przekazywania mechanizmem tworzenia granicy różnych losów przyległych komórek w obrębie nabłonka ektodermy *Drosophila*

W obrębie działania tych samych gradientów morfogenów mogą powstawać ostre granice pomiędzy losami przylegających do siebie komórek. Źródłem takiego różnicowania może być wzajemne oddziaływanie komórek w strefie ich przylegania za pośrednictwem cząsteczek adhezyjnych, takich jak kadheryny. W czasie przylegania (adhezji) komórek aktywne są kadheryny, co ma trojaki skutek; po pierwsze odbywa się lokalna polimeryzacja cytoszkieletołów pod błoną zlepionych komórek, po drugie zwiększone wydzielanie cząsteczek sygnalizacyjnych z jednej komórki powoduje inhibicję tego procesu w komórce przyległej, a to może stanowić przyczynę zróżnicowania losów komórek na te, które są źródłem sygnałów i sąsiednie, które je odbierają (ryc. 8 A).

Oddziaływanie jednych komórek, które determinuje losy innych komórek, nazywamy **indukcją embrionalną**. Termin ten został wprowadzony przed około siedemdziesięciu laty przez Spemana i Mangolda, którzy wykazali, że komórki górnej wargi blastoporu zarodka płaza (nazwane przez nich organizatorem) przeszczepione na brzuszną stronę zarodka mogą indukować powstanie drugiej osi ciała, to znaczy drugiej cewki nerwowej, drugiej struny grzbietowej i towarzyszących jej somitów.

W ciągu ostatnich 10 lat okazało się, że podobny rezultat można otrzymać przez wstrzyknięcie do brzusznej części zarodka płaza transkryptu mRNA *beta kateniny* oraz mRNA białek regulujących poziom białka cytoplazmatycznej β -KATENINY [19]. β -KATENINA jest białkiem, które w formie spolimeryzowanej występuje powszechnie przy połączeniach zwierających (ang. *adherens junctions*) błon komórkowych zlepionych przy pomocy adhezyjnych białek przezbłonowych kadheryn pomiędzy przyległymi komórkami nabłonka. Niespolimeryzowana, czyli wolna β -KATENINA występująca na terenie cytoplazmy zwykle podlega najpierw fosforylacji, a następnie całe białko degradowuje. Jeżeli nie nastąpi szybko proces usunięcia wolnej β -KATENINY z cytoplazmy, wtedy może ona wejść do jądra komórki, gdzie współdziała w pobudzeniu nowych typów transkryptów. Takie zjawisko aktywacji nowych typów transkrypcji przez wolną β -KATENINĘ zachodzi tylko w niektórych komórkach w czasie rozwoju zarodkowego. β -KATENINA jest stale syntetyzowana (na niskim poziomie) i degradowana w komórkach zarodka, a powstanie wolnej β -KATENINY wymaga wyłączenia procesu fosforylacji β -KATENINY przez specjalną kinazę nazywaną u owadów *zeste-white*, a jej odpowiednik u kręgowców GSK-3. Inaktywacja tej kinazy następuje w odpowiedzi na sygnał WINGLESS (nazwa sygnału u owadów) lub WNT (odpowiednik u kręgowców). W nabłonku przed indukcją embrionalną słabe sygnały WINGLESS/WNT wysyłane są przez wszystkie komórki zawierające połączenia kadherynowe. Wysłanie sygnału do sąsiedniej komórki powoduje wzmocnienie własnej aktywności sygnałowej, natomiast w przyległych komórkach wygasza tę sygnalizację. W przypadku płaza komórki tzw. centrum Nieuwkoop wysyłają odpowiedni sygnał WNT, który wiąże się z receptorem serpentynowym FRIZZLED (mającym charakterystyczną budowę z siedmioma domenami przezbłonowymi). Aktywacja tego receptora prowadzi do aktywacji pewnego inhibitora (białka DISHEVELLED) inaktywującego kinazę typu *zeste-white*/GSK-3. Komórki tego centrum stają się komórkami indukującymi przemianę w przyległym nabłonku. Powstaje granica pomiędzy komórkami indukującymi i tymi, które podlegają indukcji embrionalnej.

Takie zjawiska obserwuje się również w rozwoju zarodkowym *Drosophila*. Przykładem jest tu bardzo wczesna **segmentacja** blastodermi zarodka *Drosophila* wzdłuż jego osi przednio-tylnej z udziałem sygnałów WINGLESS i receptora FRIZZLED, sprzężonymi z aktywacją sygnałów HEDGEHOG i receptorami PATCHED nawzajem wygaszającymi swoją aktywność (ryc. 8 B). Powoduje to powstanie granicy pomiędzy segmentami z segmentalnie powtarzalnym znacznikiem morfologicznym w postaci pojawiania się kutikularnych ząbków w komórkach wydzielających ligandy WINGLESS. Jak się okazało [35], receptory typu FRIZZLED warunkują polarność w płaszczyźnie nabłonka podlegającego metamerycznej segmentacji (więcej szczegółów [17] (ryc. 8 B).



RYCINA 8. Mechanizm indukcji embrionalnej; A – szlak przekazywania sygnału WINGLESS/WNT na receptorze FRIZZLED i wzajemne różnicujące oddziaływanie dwóch komórek na siebie; lewa komórka wysyła sygnał odbierany przez komórkę prawą i schemat działania β -KATENINY (dalsze objaśnienia w tekście); B – schemat przekazywania sygnału WINGLESS produkowanego w przedniej komórce blastodermis zarodka *Drosophila* na uruchomienie transkrypcji przez β -KATENINĘ, a w końcu pobudzającej wysyłanie sygnału HEDGEHOG w tylnej komórce. Sygnał HEDGEHOG działając zwrotnie na komórkę przednią pobudza dodatkową produkcję sygnału WINGLESS, a to prowadzi do różnicowania losów przedniej i tylnej komórki tworząc granicę parasegmentu; a – ząbki kutikularne przedniej komórki, b – granica parasegmentu (gruba strzałka); P – przód; T – tył

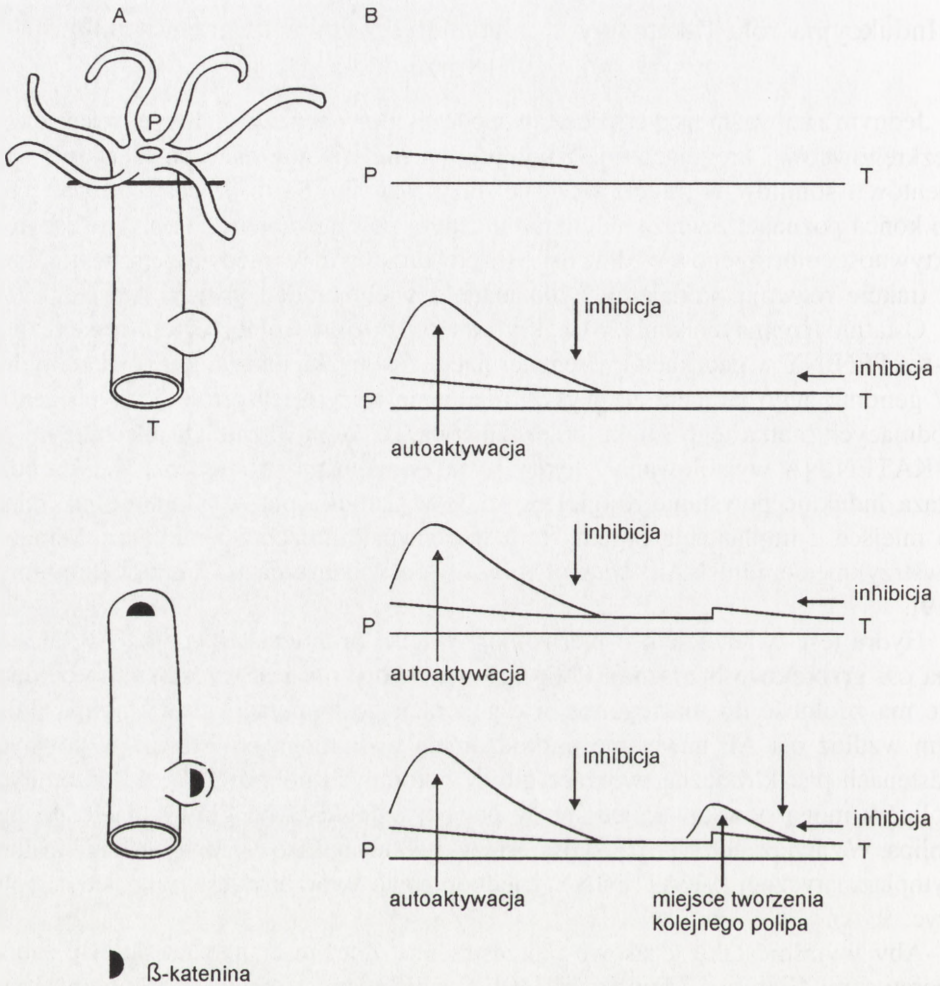
Indukcyjna rola β -kateniny w metamerycznym wytwarzaniu polipów w hydrze

Jednym z najważniejszych procesów podczas morfogenezy wielu typów zarodków bezkręgowców i kręgowców jest **kolejne, a nie równoczesne** powstawanie segmentów i somitów w trakcie wczesnej fazy rozwoju. Są to procesy złożone i nie do końca poznane, a wiążą się hierarchicznym powstawaniem kolejnych szczytów aktywności morfogenów wzdłuż osi AP i powtarzalnym różnicowaniem się komórek w trakcie rozwoju. Podajemy tylko jeden z wielu modeli [10].

Ostatnio Hobmayer i inni [23] wykryli wysoki poziom wolnej (cytoplazmatycznej) β -KATENINY w pączkach i w regenerującym zawiązku pączka głowowego hydry. W genomie tego jamochłona wykryto istnienie wszystkich ortologicznych genów kodujących białka tego szlaku przekazywania. A co najważniejsze okazało się, że β -KATENINA wyizolowana z hydry i wstrzyknięta po stronie brzusznej zarodka płaza indukuje powstanie drugiej osi ciała w zarodku płaza, podobnie jak miało to miejsce z implantacją organizatora w doświadczeniach Spemmana i Mangold i wstrzyknięciem mRNA β -kateniny płaza w doświadczeniach Gugera i Gumbinera [19].

Hydra jest zwierzęciem o pierwotnej symetrii promienistej; ma oś AP, ale nie ma osi grzbietowo-brzusznej. Polip (głowa) hydry nie jest też całym zarodkiem, ale ma zdolność do morfogenezy i regeneracji po amputacji głowy polipa. Poza tym wzdłuż osi AP nawet nie uszkodzonych hydr mogą powstawać w pewnych odstępach pączki boczne tworzące głowy potomnych polipów. Pączki potomnych polipów mogą powstawać jedynie w pewnej odległości od głowy macierzystego polipa. W zawiązkach tych pączków jest wykrywany bardzo wysokie stężenie wolnej, cytoplazmatycznej β -KATENINY i jednorazowo tworzony jest tylko jeden polip (ryc. 9 A).

Aby wyjaśnić takie czasowe i przestrzenne zależności, można przyjąć model teoretyczny Gierera i Meinhardta [10] z założeniami *a priori* zaproponowanymi przez autorów, a następnie obserwować w komputerze zmiany w kolejnych wykresach stężenia hipotetycznego morfogenu wzdłuż osi poziomej AP. Synteza morfogenu (w tym przypadku β -KATENINY) jest procesem autokatalitycznym. Odcięcie starej głowy powoduje powstanie łagodnego gradientu morfogenu wzdłuż osi AP pozostałej części polipa (ryc. 9 B, wykres górny). Wymaga to założenia, że wszystkie komórki hydry zachowują zdolność do produkcji niewielkiego stężenia wolnej β -KATENINY, a jednocześnie z tylnego bieguna rozchodzi się gradientowo ku przodowi inhibitor występowania (syntezy lub uwalniania) wolnej β -KATENINY. Po odcięciu starej głowy przez eksperymentatora, stymulowana przyrana przednia część polipa wytwarza coraz więcej morfogenu i słaby gradient zamienia się w bardzo stromy gradient z wyraźnym przednim szczytem (ryc. 9 B drugi wykres). Po osiągnięciu pewnej wartości progowej te same komórki strefy przyrannej, które



RYCINA 9. A – rozmieszczenie osi ciała i organizatora głowy polipa w hydrze i β -KATENINY w regenerującym jamochłonie i B – model teoretyczny okresowego pojawiania się takich organizatorów (wg [10])

wytwarzają morfogen, zaczynają produkować jego inhibitor, który rozchodzi się w drodze dyfuzji ku tyłowi i to znacznie szybciej niż postępuje aktywacja gradientu morfogenu. To wyklucza powstanie kolejnej głowy zbyt blisko starej. Jeżeli jednak założymy, że zasięg dyfuzji inhibitora z bieguna przedniego organizatora głowy jest jednak ograniczony, to na osi AP powstaje nowe miejsce, w którym może ujawnić się znowu aktywacja morfogenu. Powstaje miejsce na nowy pączek, skoro tworzy się następny szczyt gradientu morfogenu (ryc. 9 B, dwa wykresy dolne). Ta sytuacja może się powtarzać przy tworzeniu kolejnych pączków wzdłuż osi AP.

Model ten został zaproponowany około 30 lat temu przez Gierera i Mainhardta [10] i pod nazwą **modelu inhibicji bocznej**, który dobrze ilustruje obserwacje nad hierarchicznym pojawianiem się segmentacji zarodka (metamerów i somitów) w trakcie embriogenezy wielu stawonogów i kręgowców. Jednakże dopiero obecnie znaleziono mechanizm molekularny, który byłby zgodny z tym modelem.

4. MECHANIZM INHIBICJI BOCZNEJ – WYZNACZANIE LOSU POSZCZEGÓLNEJ KOMÓRKI W NABŁONKU NEUREKTODERMALNYM; SZLAK PRZEKAŹNICTWA DELTA/RECEPTOR NOTCH

W trakcie rozwoju zarodków bezkręgowców i kręgowców zaobserwowano, że w obrębie jednolitej warstwy neurektodermy zarodka tylko niektóre komórki podejmują los A (w tym przypadku tworzą komórki o charakterze pierwotnych komórek neuroblastów), podczas gdy komórki otaczające pozostają komórkami nabłonkowymi, a więc podejmują los nie A. A więc nie chodzi tu o graniczne stężenia morfogenu w obrębie osi ciała zarodka, a tylko o warunki rekrutacji niektórych komórek w zespole tak, aby podjęły inną drogę różnicowania. Jaki jest mechanizm takiego różnicowania?

Otóż jeżeli w obrębie warstwy nabłonka przypadkowa jedna komórka zaczyna nieco wcześniej wydzielać cząsteczkę sygnałową DELTA, to ten sygnał jest odebrany przez sąsiednie komórki przez ich receptory NOTCH. Odebranie sygnału DELTA w komórkach sąsiadujących z komórką sygnalizującą powoduje zahamowanie (inhibicję boczną) wydzielania tego sygnału przez nie. Tak na zasadzie sprzężenia zwrotnego kilkakrotne powtórzenie inhibicji autokrynnego wydzielania DELTA przez komórki otaczające komórkę sygnalizacyjną prowadzi do różnicowania ich losów [36].

Warto zauważyć, że podobne procesy dyskryminacji losów poszczególnych blastomerów u *C. elegans* zależą w dwublastomerowym zarodku od emisji sygnału GLP (typu sygnału DELTA) odbieranego przez receptory typu NOTCH zlokalizowane w grzbietowym blastomerze (ryc. 7 C) [14].

5. EKSPRESJA GENÓW HOMEOTYCZNYCH JAKO PRZESTRZENNA SPECYFIKACJA RÓŻNICOWANIA POSZCZEGÓLNYCH METAMERÓW LUB CZĘŚCI ZARODKA

Definicja i cechy genów homeotycznych

Od dawna znane są mutacje, które u muchy powodują zmiany przydatków charakterystycznych dla danego segmentu owada na przydatki charakterystyczne dla innego segmentu. Najbardziej znanymi są mutacje genu *bithorax*, które powodują zamianę przezmianek na pełne skrzydła błoniaste, a więc powstanie much czteroskrzydłych i mutacje genu *Antennapedia*, które powodują, że na głowie owada zamiast czułków wyrastają w pełni ukształtowane odnóża kroczone. Mutacje tego typu zostały nazwane mutacjami homeotycznymi, a geny, w których one występują, genami homeotycznymi. Geny te kodują białka, które są czynnikami transkrypcyjnymi. Zawierają one bardzo silnie konserwowaną domenę złożoną z 60 aminokwasów o konformacji helisa-skręt-helisa, która wiąże się z wzmacniaczami odpowiednich genów. Odkrycie tej domeny i kodującego ją odcinka DNA nazwanego „homeoboksem” pozwoliło na otrzymanie odpowiedniej sondy molekularnej i przy jej pomocy na przeszukanie genomów wielu zwierząt. Okazało się, że geny *hox* (to znaczy takie geny, które zwierają homeoboks) występują we wszystkich typach *Metazoa* poczynając od jamochłonów i że geny te podlegają ekspresji podczas wczesnego rozwoju zarodkowego. U kręgowców znaleziono cztery zespoły genów *hox*, które znajdują się na czterech różnych chromosomach (autosomach). Zespoły genów *hox* u kręgowców oznaczono przy pomocy liter A, B, C i D, a poszczególne geny w zespole kolejnymi numerami, np. *hox* A1, A2... A13, B1...B13, C1...C13 i D1, ... D13. Geny oznaczone różnymi literami i tym samym numerem są w całości homologiczne względem siebie. Natomiast geny oznaczone różnymi numerami (np. A1, A2, ...) wykazują silną homologię jedynie w obrębie homeoboksu. Dla poznania funkcji genów *hox* w embriogenezie ssaków wykonano szereg nokautów tych genów u myszy. Pierwszym znokautowanym genem był gen *hox A3*. Okazało się, że w homozygotycznym zarodku z takim nokautem występuje niedorozwój m.in. żuchwy, grasicy i przedniego łuku aorty. Z kolei nokaut genu *hox D13* spowodował jedynie skrócenie palców w częściach dystalnych we wszystkich czterech kończynach myszy. Od dawna znane są występujące niekiedy u ludzi dziedziczne wady dotyczące rozwoju dłoni i stóp. Są to m.in. przypadki synpolidaktylii, w których występuje duplikacja palca wskazującego, a zarazem dodatkowy palec jest zrośnięty z jednym lub dwoma sąsiednimi palcami. Przy pomocy odpowiednich sond udało się powielić sekwencje genu *hox D13* u ludzi dotkniętych synpolidaktylią oraz u ludzi zdrowych. Okazało się, że synpolidaktylia związana jest z występowaniem nieco dłuższej sekwencji tego genu [29]. Natomiast delecja genu *HOXA 13* jest związana z niedorozwojem powodującym zmniejszenie liczby palców (hypodaktylią) [32]. A więc u ludzi odnaleziono odpowiedniki pewnych mutacji homeotycznych owada.

Najbardziej zdumiewającą cechą genów homeotycznych jest to, że geny te tworzą w genomie poszczególnego zwierzęcia wyraźne zespoły, a porządek i występowania poszczególnych genów na chromosomie ściśle koreluje z ich przestrzenną ekspresją wzdłuż osi przednio-tylnej ciała (obserwacja Lewisa z 1964 r. nagrodzona nagroda

Nobla w 1995 r.) [30]. Zrozumienie molekularnych uwarunkowań powodujących linearny porządek powstawania transkryptów kolejnych genów homeotycznych w zespołach genów homeotycznych i to w pewnym porządku przestrzennym w zarodku stało się podstawą dla rozważań nad ewolucją mechanizmów embriogenezy w odmiennych typach świata zwierzęcego. Należało również rozważyć, czy ekspresja genów homeotycznych wiąże się wyłącznie z polarnością całego zarodka, czy też przynajmniej w niektórych typach embriogenezy wiąże się z komórkowymi mechanizmami wyznaczającymi polarność indywidualnej komórki.

Zmiany w funkcjonowaniu genów homeotycznych w programowaniu rozwoju różnych typów świata zwierzęcego

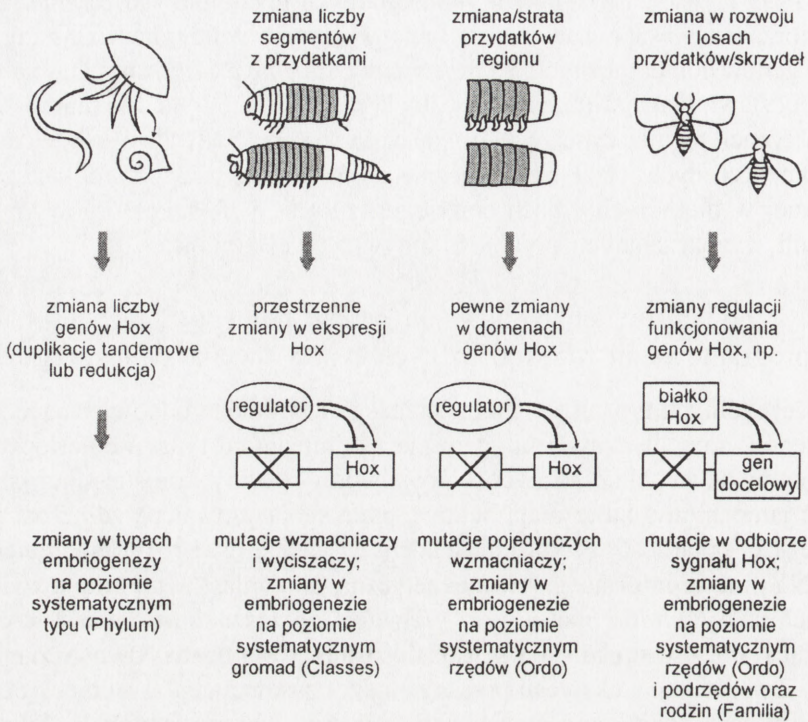
W poszczególnych typach świata zwierzęcego zasadniczo odpowiadające sobie zespoły genów homeotycznych są związane z odmiennymi typami embriogenezy, prowadzącymi do zupełnie różnych typów budowy formy dorosłej. Przykładem mogą być jamochłony, które mają budowę ciała spolaryzowaną wzdłuż osi przednio-tylnej i ta polarność (wyrażona choćby gradientami i rozmieszczeniem β -KATENINY) niesie informację morfogenetyczną. Natomiast w tej grupie zwierząt określanych jako *Radialia* brak jest osi grzbietowo-brzuszej, a więc jest to cecha wyróżniająca je w stosunku do wszystkich zwierząt o symetrii dwubocznej (*Bilateralialia*). Z porównania ekspresji przestrzennej i czasowej genów homeotycznych w różnych typach świata zwierzęcego wynikły trzy wnioski ogólne:

Po pierwsze mutacje genów homeotycznych, czyli mutacje homeotyczne są wyrażane albo jako brak pewnej okolicy ciała, albo jako błąd w kolejności przednio-tylnej poszczególnych regionów, albo jako rozszerzenie programu poszczególnego regionu na regiony przyległe, które normalnie mają inne losy. A więc mutacje homeotyczne powodują błędy w realizacji programu wyznaczającego losy poszczególnych części ciała.

Po drugie istnieje tendencja do pewnej metameryzacji osi ciała, w których zmiany w przestrzennej i czasowej ekspresji poszczególnych genów homeotycznych odgrywają rolę instrukcji dotyczącej ostatecznego różnicowania się poszczególnych komórek w danym metamerycznym odcinku ciała. To nadaje specyfikę temu właśnie odcinkowi ciała i stanowi ostatecznie mechanizm, który pozwala wobec tego rozróżnić poszczególne metamery ciała (i badać zmianę w przypadku pojawienia się mutacji homeotycznej prowadzącej do błędów w determinacji losów poszczególnych części ciała).

Po trzecie, nadrzędna regulacja całymi zespołami genów *hox* w danym organizmie odgrywa zasadniczą rolę w morfogenezie. A więc na przebieg embriogenezy mają zasadniczy wpływ:

1) czynniki kontrolujące funkcjonowanie ogólnych czynników transkrypcji (takie jak czynniki kondensacji lub dekondensacji całego regionu chromosomu regulujące



RYCINA 10. Główne zmiany w liczbie i kontroli funkcjonowania genów homeotycznych i zmiany w planie budowy w niektórych grupach zwierząt bezkręgowych (uproszczone wg [8])

albo podjęcie transkrypcji w danym zespole genów, albo wstrzymujące ich ekspresję), oraz

- 2) bardziej specyficzne systemy kontroli ekspresji genów homeotycznych przez wzmacniacze (ang. *enhancers*) lub wyciszacze (ang. *silencers*) transkrypcji poszczególnych genów homeotycznych.

Z tego typu analiz wynikały wstępne jeszcze przypuszczenia dotyczące przebiegu makroewolucji świata zwierzęcego (ryc. 10). Gellon i McGinnis [8] zestawiając dużą liczbę genów homeotycznych w jamochłonach z małą liczbą tych genów u nicieni postulują, że jednym z podstawowych mechanizmów zmian w embriogenezy mogą być zmiany w liczbie genów *hox* w poszczególnych typach (systematycznie: *Phyla*) świata zwierzęcego. Istnieją dane dotyczące porównania funkcjonowania genów homeotycznych różnych skorupiaków i wielu owadów pozwalające sądzić, że zróżnicowania typów embriogenezy na poziomie systematycznym gromad (*Classes*) mogą dotyczyć zmian właśnie w systemie kontroli ogólnej transkrypcji genów *hox*. Konsekwentnie zmiany w embriogenezy i ostatecznej morfologii ciała na poziomie systematycznym rzędów (*Ordo*) dotyczyłyby zmian w poszczególnych

wzmacniaczach (ang. *enhancers*) lub wyciszaczach (ang. *silencers*) kontrolujących ekspresję poszczególnego genu homeotycznego lub też funkcjonowania białka, poszczególnego genu homeotycznego i jego substratów.

Ekspresja genów homeotycznych związana z polarnością indywidualnej komórki, a nie całego zarodka *Caenorhabditis elegans*

W genomie *C. elegans* wykryto sekwencję zaledwie czterech genów homeotycznych. Jest to liczba znacznie mniejsza w stosunku do liczby występującej u jamochłonów. Zapewne jest to wtórny regres w ewolucji. W każdym razie jeden z genów ortologiczny względem genu homeotycznego *labial* w genomie stawonogów został zidentyfikowany w genomie *C. elegans* i nazwany genem *Hox ceh-13*. Zbadano ekspresję tego genu w trakcie bruzdkowania nicienia [41]. Otóż okazało się, że na początku gastrulacji *ceh 13* jest asymetrycznie ekspresjonowany w komórkach tylnych w trakcie asymetrycznego podziału w komórce prekursorowej endodermy jelita oraz w tylnych produktach podziału czwartej generacji blastomeru przedniego (AB). Doświadczalnie wykazano, że prawidłowa ekspresja genu *ceh-13* jest istotna dla prawidłowego rozwoju zarodka, ale nie zależy od położenia komórki prekursorowej endodermy w zarodku ani od wpływu komórek sąsiednich. Natomiast prawidłowy typ ekspresji *ceh 13* w tylnych blastomerach ma charakter podziału różnicującego i zależy od uzyskania prawidłowej polarności wszystkich czterech blastomerów po drugim podziale bruzdkowania (ryc. 7 C).

6. PODSUMOWANIE: CECHY MECHANIZMÓW TWORZENIA INFORMACJI POZYCYJNEJ WYZNACZAJĄCEJ MAPEŁ RÓŻNICOWANIA ZARODKA

Istnieją różne mechanizmy wyznaczania polarności zarodka i tworzenia gradientów morfogenetycznych, a następnie w ich obrębie wyznaczania podpodziałów determinujących mapę różnicowania.

Tworzenie ostrych granic w obrębie zarodka regionów podejmujących różne typy losów oraz granic wyznaczających różne losy przyległych komórek są mechanizmami dwóch typów:

- a) podziałów różnicujących, wyznaczających los A potomnej komórki przedniej, a los B potomnej komórki tylnej oraz
- b) wymiany sygnałów pomiędzy przyległymi komórkami o zbliżonej pozycji i wzajemnie dyskryminującymi ich losy; a są to mechanizmy indukcji embrionalnej i inhibicji bocznej.

Rozwój w poszczególnych typach świata zwierzęcego posługuje się tym samym, lub zbliżonym repertuarem genów programu i podobnymi mechanizmami różnicowania, ale różnice w determinacji przestrzennej mapy różnicowania w poszcze-

gólnych typów embriogenezy zależą od różnych zależności kombinatorycznych i hierarchii ekspresji poszczególnych genów programu [9].

Opisane powyżej przykłady mechanizmów różnicowania drogą sygnałów i ścieżek przekazywania wykazują niezwykle konserwatywny ewolucyjny i są pod kontrolą genetyczną wielu genów programu rozwoju.

Ostateczna determinacja losów poszczególnych części zarodka (segmentów, somitów lub linii klonalnej poszczególnych blastomerów) wiąże się z okresową sekwencją aktywacji poszczególnych zespołów genów homeotycznych. W poszczególnych typach świata zwierzęcego zasadniczo ortologiczne zespoły genów homeotycznych mogą podlegać:

- a) duplikacjom tandemowym całych zespołów,
- b) zmianom w systemie kontroli funkcjonowania tych zespołów genów,
- c) mutacjom i delecjom w systemie kontroli poszczególnego zespołu i
- d) wreszcie mutacjom w regulacji podrzędnych genów [8].

Ostateczne wyznaczenie losu poszczególniej komórki w zespole komórek w trakcie embriogenezy podlega korektom związanym albo ze zmianą parametrów przestrzennych zarodka, albo są modyfikowane przez warunki lokalne. W przypadku zarodków rozwijających się wewnątrz organizmu matki wzajemne kontakty komórek somatycznych z rozwijającym się oocytom *Drosophila* bezpośrednio wyznaczają różnicowanie komórek somatycznych nabłonka folikularnego (ryc. 2).

BIBLIOGRAFIA

- [1] ALFA CE, DUCOMMUN B, BEACH D, HYAMS JS. Distinct nuclear and spindle pole body populations of cyclin-cdc2 in fission yeast. *Nature* 1990; **347**: 680–682.
- [2] BARKOFF AF, DICKINSON KS, GRAY NK, WICKENS M. Translational control of cyclin B1 mRNA during meiotic maturation: coordinated repression and cytoplasmic polyadenylation. *Dev Biol* 2000; **220**: 97–109.
- [3] BOYD I, GUO S, LEVITAN D, STINCHCOMB DT, KEMPHUES KJ. Par-2 is asymmetrically distributed and promotes association of P granules and PAR-1 with the cortex in *C. elegans* embryos. *Development* 1996; **122**: 3075–3084.
- [4] CHANT J, HERSKOWITZ I. Genetic control of bud site selection in yeast by a set of gene products that constitute a morphogenetic pathway. *Cell* 1991; **65**: 1203–1212.
- [5] DRIEVER W, NÜSSLEIN-WOLHARD C. The bicoid protein determines position in the *Drosophila* embryo in a concentration dependent manner. *Cell* 1988; **54**: 95–104.
- [6] DYSON S, GURDON J. The interpretation of position in a morphogen gradient as revealed by occupancy of activin receptors. *Cell* 1998; **93**: 557–568.
- [7] FIVAZ M, ABRAMI L, van der GOOT FG. Pathogens, toxins, and lipid rafts. *Protoplasma* 2000; **212**: 8–14.
- [8] GELLON G, MCGINNIS W. Shaping animal body plans in development and evolution by modulation of *Hox* expression patterns. *BioEssays* 1998; **20**: 116–125.
- [9] GERHART J, KIRSCHNER M. Cells, Embryos and Evolution. ed. Blackwell Sci. Inc, Malden, USA 1997: 1–642.
- [10] GIERER A, MEINHARDT H. A theory of biological pattern formation. *Kybernetik* 1972; **12**: 30–39.

- [11] GILBERT SF. *Developmental Biology*. (Vth ed) Sinauer Publ. Sunderland, USA 1997: 1–918.
- [12] GOLDEN A. Cytoplasmic flow and the establishment of polarity in *C. elegans* 1-cellembryos. *Curr Opin Gen Dev* 2000; **10**: 414–420.
- [13] GOLDSTEIN B, HIRD SN. Specification of the anteroposterior axis in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 1996; **122**: 1467–1474.
- [14] GOODWIN EB, EVANS TC. Translational control of development of *C. elegans*. *Sem in Cell Devel* 1997; **8**: 551–559..
- [15] GONZALES-REYES A, ELLIOTT H, St JOHNSTON D. Polarization of both major body axes in *Drosophila* by gurken-torpedo signalling. *Nature* 1995; **375**: 654–658.
- [16] GONZALES-REYES A, St JOHNSTON D. Patterning of the follicle cell epithelium along the anterior-posterior axis during *Drosophila* oogenesis. *Development* 1998a; **125**: 2837–2846.
- [17] GONZALES-REYES A, St JOHNSTON D. The *Drosophila* AP axis is polarised by the cadherin-mediated positioning of the oocyte. *Development* 1998b; **125**: 3635–3644.
- [18] GRÜNERT S, St JOHNSTON D. RNA localization and the development of asymmetry during *Drosophila* oogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 1996; **6**: 395–402.
- [19] GUGER KA, GUMBINER BM. β -catenin has wnt-like activity and mimics the Nieuwkoop signaling center in *Xenopus* dorsal-ventral patterning. *Dev Biol* 1995; **172**: 115–125.
- [20] GUO S, KEMPHUES KJ. A non-muscle myosin required for embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1996; **382**: 455–458.
- [21] HABLE WF, KROPF DL. Sperm entry induces polarity in fucoid zygotes *Development* 2000; **127**: 493–501.
- [22] HAZELRIGG T. The destinies and destinations of RNAs. *Cell* 1998; **95**: 451–460.
- [23] HOBMAYER B, RENTZSCH F, KUHN K, HAPPEL CM, ROTHBACHER U, HOLSTEIN TW. WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan *Hydra*. *Nature* 2000; **407**: 186–189.
- [24] JANODY F, STURNY R, CATALA F, DESPLAN C, DOSTATNI N. Phosphorylation of Bicoid on MAP-kinase sites: contribution to its interaction with torso pathway. *Development* 2000; **127**: 279–289.
- [25] KACZANOWSKA J, JOACHIMIAK E, BUZANSKA L, KRAWCZYŃSKA W, WHEATLEY DN, KACZANOWSKI A. Molecular subdivision of the cortex of dividing *Tetrahymena* is coupled with the formation of the fission zone. *Dev Biol* 1999; **212**: 150–164.
- [26] KALTHOFF K. *Analysis of Biological Development*. ed. McGraw-Hill Inc. N.Y. 1996; 1–738.
- [27] KNOBLICH JA. Mechanisms of asymmetric cell division during animal development. *Curr Opin Cell Biol* 1997; **9**: 833–841.
- [28] KRIOUTCHKOVA MM, ONISHCHENKO GE. Structural and functional characteristics of the centrosome in gametogenesis and early embryogenesis of animals. *Int Rev Cytol* 1999; **185**: 107–148.
- [29] MURAGAKI Y, MUNDLOS S, UPTON J, OLSEN BR. Altered growth and branching patterns in synpolydactyly caused by mutations in *HOXD13*. *Science* 1996; **272**: 548–551.
- [30] MCGINNIS W, KRUMLAUF R. Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 1992; **68**: 283–302.
- [31] MIYAZAKI A, KAMITSUBO E, NEMOTO S-I. Premeiotic aster as a device to anchor the germinal vesicle to the cell surface of the presumptive animal pole in starfish oocytes. *Dev Biol* 2000; **218**: 161–171.
- [32] MORTLOCK PD, POST LC, INNIS JW. The molecular basis of hypodactyly (Hd); A deletion in *Hoxa 13* leads to arrest of digital arch formation. *Nature Genet* 1996; **13**: 284–289.
- [33] OOKATA K, HISANAGA S, BULINSKI JC, MUROFUSHI H., AIZAWA H, ITOH MJ, HOTANI H, OKUMURA E, TACHIBANA K, KISHIMOTO T. Cyclin B interaction with microtubule-associated protein 4 (MAP 4) targets 34^{cdc2} kinase to microtubules and is a potential regulator of M-phase microtubule dynamics. *J Cell Biol* 1995; **128**: 849–862.

- [34] RUDEN DM, SOLLARS V, WANG X, MORI D, ALTERMAN M, LU X. Membrane fusion proteins are required for oskar mRNA localization in the *Drosophila* egg chamber. *Dev Biol* 2000; **218**: 314–325.
- [35] SHULMAN JA, PERRIMON N, AXELROD JD. Frizzled signaling and the developmental control of cell polarity. *Trends in Gen* 1998; **14**: 452–458.
- [36] SIMPSON P. Notch signalling in development: on equivalence groups and asymmetric developmental potential. *Curr Opin Gen Dev* 1997; **7**: 537–542.
- [37] St JOHNSTON D, NÜSSLEIN-VOLHARD C. The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* 1992; **68**: 201–219.
- [38] TAY J, HODGMAN R, RICHTER JD. The control of cyclin B1 mRNA translation during mouse maturation. *Dev Biol* 2000; **221**: 1–9.
- [39] THIO GL, RAY RP, BARCELO G, SCHÜPBACH T. Localization of gurken RNA in *Drosophila* oogenesis requires elements in the 5' and 3' regions of the transcript. *Dev Biol* **221**: 435–446.
- [40] TSUKITA S, YONEMURA S, TSUKITA S. ERM proteins: head-to-tail regulation of actin plasma membrane interaction. *Trends in Biol Sci* 1997; **22**: 53–58.
- [41] WITTMANN C, BOSSINGER O, GOLDSTEIN B, FLEISCHMANN M, KOHLER R, BRUNSCHWIG K, TOBLER H, MULLER F. The expression of the *C. elegans* labial-like Hox gene *ceh-13* during early embryogenesis relies on cell fate and on anteroposterior cell polarity. *Development* 1997; **124**: 4193–4200.
- [42] Van BUSKIRK C., SCHÜPBACH T. Versatility in signalling: multiple responses to EGF receptor activation during *Drosophila* oogenesis. *Trends in Cell Biol* 1999; **9**: 1–4.
- [43] WASSERMAN JD, FREEMAN M. An autoregulatory cascade of EGF receptor signaling patterns *Drosophila* egg. *Cell* 1998; **95**: 355–364.
- [44] WATTS JL, MORTON DG, BESTMAN J, KEMPHUES KJ. The *C. elegans* *par-4* gene encodes a putative serine-threonine kinase required for establishing embryonic asymmetry. *Development* 2000; **127**: 1467–1475.
- [45] WOLPERT L. Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J Theor Biol* 1969; **24**: 1–7.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 29.11. 2000 r.

Przyjęto: 18.12. 2000 r.

Adres autora: Warszawa 02-096, ul. Miecznikowa 1.

E-mail kaczan@mail.biol.uw.edu.pl

MECHANIZMY SYGNALIZACJI INTERLEUKINY 1*

MECHANISMS OF INTERLEUKIN 1 SIGNAL TRANSDUCTION

Małgorzata M. DOSZCZAK, Arkadiusz PIERZCHAŁSKI, Jacek BIGDA

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-AMG,
Katedra Histologii i Immunologii, Akademia Medyczna w Gdańsku

Streszczenie: Interleukina 1 (IL-1) jest jedną z głównych cytokin prozapalnych, odpowiedzialnych za regulację odpowiedzi immunologicznej i zapalnej. Przedstawiona praca prezentuje aktualny stan wiedzy dotyczącej mechanizmów wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału indukowanego przez tę cytokinę. Interleukina 1 działa na komórki docelowe za pośrednictwem receptorów błonowych, z których jeden (typ I) odpowiada za jej sygnalizację wewnątrzkomórkową, drugi natomiast (typ II) stanowi naturalny regulator aktywności cytokiny. Receptory interleukiny 1 należą do dużej nadrodziny białek wykazujących podobieństwa w części wewnątrzkomórkowej lub zewnątrzkomórkowej. W nadrodzinie tej wyróżniono rodzinę silnie konserwowanych ewolucyjnie białek Toll, mających istotne funkcje w systemach odpornościowych różnych organizmów, począwszy od roślin, a skończywszy na człowieku. Interakcja interleukiny 1 z receptorem typu I prowadzi do asocjacji z receptorem cząsteczek adaptorowych, a w konsekwencji do utworzenia kompleksu receptorowego inicjującego szlaki sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Jednym z głównych szlaków wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału interleukiny 1 jest szlak prowadzący do mobilizacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Czynniki ten jest niezbędny do inicjacji transkrypcji większości genów, których produkty uczestniczą w reakcji zapalnej. Pośrednikami w aktywacji innych czynników transkrypcyjnych przez interleukinę 1 są często kinazy białkowe z rodziny MAP. Pomimo uzyskanych w ostatnich latach licznych informacji o mechanizmie sygnalizacji IL-1, zarówno jego pełne poznanie, jak i zrozumienie znaczenia interakcji pomiędzy poszczególnymi szlakami sygnalizacyjnymi wymaga dalszych badań.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28: 99–127)

Słowa kluczowe: interleukina 1, receptory IL-1, transdukcja sygnału, czynnik transkrypcyjny NF- κ B, kinazy MAP.

Summary: Interleukin 1 (IL-1) is one of the major proinflammatory cytokines responsible for the regulation of immune and inflammatory response. In this paper we present up-to date information concerning the mechanisms of intracellular signal transduction induced by this cytokine. Interleukin 1

*Praca wykonana w ramach tematu finansowanego przez KBN, Nr rej. P04A02316.

effects on target cells are mediated via membrane receptors. One of them (type I) is responsible for interleukin 1 intracellular signaling, whereas the other (type II) is a natural regulator of the cytokine activity. Interleukin 1 receptors belong to a large superfamily of proteins showing similarities either in intra- or extracellular domains. A group of highly conserved Toll proteins has been distinguished within this superfamily; these proteins play important roles in immune systems of various organisms, from plants to a man. Interaction of interleukin 1 with its type I receptor leads to the association of adaptor proteins with the receptor, and in turn to the formation of receptor complex which initiates signaling pathways. One of the major pathways of intracellular signal transduction of interleukin 1 leads to mobilization of the transcription factor NF- κ B. NF- κ B is necessary for transcription initiation of almost all genes, which products participate in inflammatory response. Activation of other transcription factors by interleukin 1 is often mediated by protein kinases of MAP kinase family. In spite of recent achievements in clarifying the IL-1 signaling mechanisms, still there is a need for intense research on interactions between distinct signaling pathways and their significance for different activities of interleukin 1. (*Advances in Cell Biology 2001*; 28: 99–127)

Key words: interleukin 1, IL-1 receptors, signal transduction, transcription factor NF- κ B, MAP kinases.

Wykaz skrótów: **AcPL** (ang. *accessory protein-like*) – białko spokrewnione z białkiem pomocniczym IL-1R; **Akt/PKB** (ang. *protein kinase B*) – kinaza białkowa B; **AP-1** (ang. *activator protein-1*) – czynnik transkrypcyjny-1; **ASK-1** (ang. *apoptosis signal-regulating kinase*) – kinaza regulująca sygnał apoptotyczny; **CAK** (ang. *ceramid-activated kinase*) – kinaza aktywowana przez ceramid; **cAMP** – cykliczny AMP; **CD** (ang. *cluster of differentiation*) – kompleks różnicowania; **COX2** – cyklooksygenaza 2; **CREB** (ang. *cAMP-response element*) – element zależny od cAMP, czynnik transkrypcyjny; **DAG** – diacyloglicerol; **DD** (ang. *death domain*) – domena śmierci; **ECSIT** (ang. *evolutionary conserved signaling intermediate in Toll pathways*) – ewolucyjnie konserwowany pośrednik sygnalizacyjny w szlakach Toll; **EGF** (ang. *epidermal growth factor*) – czynnik wzrostu naskórka; **ERK** (ang. *extracellular signal-regulated kinase*) – kinaza regulowana czynnikami zewnętrznymi; **FIL** (ang. *family of interleukin 1*) – rodzina interleukiny 1; **GTP** – trójfosforan guanozyny; **hsp27** (ang. *heat shock protein*) – białko szoku termicznego o masie 27 kDa; **ICAM** (ang. *intercellular adhesion molecule*) – cząsteczka adhezji międzykomórkowej; **IFN** – interferon; **IKAP** (ang. *IKK complex-associated protein*) – białko zasocjowane z kompleksem IKK; **I κ B** – inhibitor κ B; **IKK** – kinaza I κ B; **IKK γ /NEMO** (ang. *NF κ B essential regulator*) – kinaza I κ B γ podstawowy regulator NF κ B; **IL** – interleukina; **IL-1H** (ang. *interleukin 1 homologue*) – homolog interleukiny 1; **IL-1R** (ang. *interleukin 1 receptor*) – receptor interleukiny 1; **IL-1Ra** (ang. *interleukin 1 receptor antagonist*) – antagonist receptora IL-1; **IL-1RAcP** (ang. *interleukin 1 receptor accessory protein*) – białko pomocnicze receptora IL-1; **IL-1RAPL** (ang. *IL-1R accessory protein-like*) – białko podobne do IL-1RAcP; **IL-1Rrp** (ang. *IL-1 receptor related protein*) – białko spokrewnione z receptorem interleukiny 1; **iNOS** (ang. *inducible nitric oxide synthase*) – indukowalna syntaza tlenu azotu; **IRAK** (ang. *interleukin 1 receptor-associated kinase*) – kinaza związana z receptorem IL-1; **JNK/SAPK** (ang. *Jun N-terminal kinase/ stress-activated protein kinase*) – kinaza fosforylująca N-terminalną część Jun/kinaza białkowa aktywowana przez czynniki stresowe; **LPS** – lipopolisacharyd; **MAP** (ang. *mitogen-activated protein*) – białko aktywowane przez mitogeny; **MAPK** (ang. *mitogen-activated protein kinase*) – kinaza białka aktywowanego przez mitogeny; **MAPKK** – kinaza kinazy MAP; **MAP3K** – kinaza kinazy kinazy MAP; **MAPKAPK-2** (ang. *MAPK-associated protein kinase-2*) – kinaza białka zasocjowanego z MAPK 2; **MEK** (ang. *MAPK/ERK kinase*) – kinaza MAPK/ERK; **MEKK** (ang. *MAPK/ERK kinase kinase*) – kinaza kinazy MAPK/ERK; **MKK** (ang. *MAP kinase kinase*) – kinaza kinazy MAP; **MyD88** (ang. *myeloid differentiation factor 88*) – mieloidalny czynnik różnicowania 88; **NAK/TBK1** (ang. *NF κ B-activating kinase/ TRAF-binding kinase*) – kinaza aktywująca NF κ B/kinaza wiążąca TRAF; **NF κ B** (ang. *nuclear factor κ B*) – czynnik jądrowy κ B; **NIK** (ang. *NF κ B-inducing kinase*) – kinaza indukująca NF κ B; **nSmaza** (ang. *neutral sphingomyelinase*) – obojętna sfingomielinaza; **OUN** – ośrodkowy układ nerwowy; **PGE2** – prostaglandyna E2; **PI-3K** (ang. *phosphatidylinositol 3-kinase*) – 3-kinaza fosfatydyloinozytolu; **PKA** (ang. *protein kinase A*) – kinaza białkowa A; **PKC** (ang. *protein kinase C*) – kinaza białkowa C; **PLC** (ang. *phospholipase*

C) – fosfolipaza C ; **PP1** (ang. *protein phosphatase 1*) – fosfataza białkowa 1; **PP2A** (ang. *protein phosphatase 2A*) – fosfataza białkowa 2A; **SAP-1**; **SIGIRR** (ang. *single IG domain IL-1R-related protein*) – białko spokrewnione z IL-1R, mające jedną domenę IG; **TAB-1** (ang. *TAK1-binding protein*) – białko wiążące się z TAK1; **TAK1** (ang. *TGF β -activated kinase*) – kinaza aktywowana przez TGF β ; **TANK/i-TRAF**; **TGF β** (ang. *transforming growth factor β*) – transformujący czynnik wzrostu β ; **TIGIRR** (ang. *Three IG domain-containing IL-1R-related protein*) – białko spokrewnione z IL-1R mające trzy domeny IG; **TIR** (ang. *Toll/interleukin-1 receptor domain*) – domena Toll/IL-1R; **TLR** (ang. *Toll-like receptor*) – receptor podobny do Toll; **TNF** (ang. *tumor necrosis factor*) – czynnik martwicy nowotworu; **TRAF** (ang. *TNF receptor-associated factor*) – czynnik związany z receptorem TNF; **VCAM** (ang. *vascular cell adhesion molecule*) – cząsteczka adhezji komórkowej naczyń.

1. WSTĘP

Interleukina 1 (IL-1) jest plejotropową cytokiną regulującą przebieg lokalnych i układowych reakcji odpornościowych i zapalnych. Pierwotnie opisana została jako ko-mitogen dla proliferujących *in vitro* tymocytów; dalsze badania ujawniły również inne jej efekty na komórki układu immunologicznego, np. stymulację dojrzewania tymocytów, aktywację limfocytów T cytotoksycznych, proliferację limfocytów B, syntezę łańcucha lekkiego κ w komórkach pre-B. IL-1 działa także na układ krwiotwórczy, stymulując syntezę i sekrecję hemopoetycznych czynników wzrostowych w różnych rodzajach komórek. Poza oddziaływaniem na komórki limfoidalne interleukina 1 reguluje szereg procesów w komórkach innych tkanek, m.in. w fibroblastach, keratynocytach, osteoklastach, hepatocytach, śródbłonku, komórkach mięśni gładkich i OUN [1]. Niektóre aktywności IL-1 wymieniono w tabeli 1.

Pomimo dobrego udokumentowania efektów biologicznych interleukiny 1, molekularne mechanizmy przekazywania sygnału nie zostały dotychczas w pełni poznane. Badania prowadzone na przestrzeni lat 1984–1994 pozwoliły na poznanie

TABELA 1. Niektóre komórki docelowe i aktywności indukowane w nich przez IL-1

Komórki docelowe	Aktywność indukowana przez IL-1
Limfocyty B	Aktywacja, wytwarzanie przeciwciał
Limfocyty T	Aktywacja, wytwarzanie IL-2, IFN- γ i innych limfokin
Tymocyty	Wczesny etap dojrzewania
Makrofagi	Sekrecja TNF, IL-1, IL-6
Neutrofile i monocyty	Powstawanie, aktywacja, chemotaksja
Granulocyty	Wzmoczenie krążenia
Płytki krwi	Stymulacja tworzenia
Fibroblasty, synowioocyty	Proliferacja, synteza i wydzielanie kolagenazy i prostaglandyn
Kom. śródbłonka	Aktywacja, przyleganie
Komórki OUN	Senność, gorączka, jadłowstręt, wytwarzanie ACTH
Kom. wątroby	Synteza białek ostrej fazy
Kom. mięśniowe	Uwalnianie aminokwasów
Osteoklasty	Aktywacja prowadząca do resorpcji i przebudowy kości

molekularnej struktury i podstaw funkcjonowania receptorów IL-1 oraz identyfikację szeregu cząsteczek zaangażowanych w sygnalizację IL-1. Niestety wiele publikacji prezentowało sprzeczne dane, dotyczące elementów szlaków sygnalizacji i ich regulacji, co wynikało z doboru różnych modeli komórkowych oraz niedostępności uniwersalnych metod. Przełom w badaniach nad sygnalizacją interleukiny 1 dokonał się w roku 1995 za sprawą zastosowania drożdżowego systemu dwuhybrydowego, umożliwiającego badanie bezpośrednich interakcji między białkami. Dzięki tej metodzie do dnia dzisiejszego udało się dokładniej poznać działanie kompleksu receptorowego i rozpoczęto systematyczne badanie poszczególnych dróg transdukcji sygnału. Przedstawiona praca prezentuje aktualny stan wiedzy na temat mechanizmów sygnalizacji interleukiny 1.

2. INTERLEUKINA 1

Nazwą interleukina-1 określa się w zasadzie dwie cytokiny: IL-1 α i IL-1 β . Są one produktami różnych genów i wykazują znaczne różnice w budowie. Pomimo jedynie 26% homologii sekwencji aminokwasowej mają podobną aktywność biologiczną. Geny kodujące obie formy IL-1 zidentyfikowano u człowieka na chromosomie 2. Homologia sekwencji DNA na poziomie 45% sugeruje powstanie dwóch genów przez duplikację. Obie formy interleukiny-1 są produkowane w postaci prekursorów o masach cząsteczkowych około 31 kDa. Nie zawierają one peptydów sygnałowych ani dłuższych sekwencji o charakterze hydrofobowym, co sugeruje, że mechanizm uwalniania interleukiny 1 z komórek różni się od tradycyjnego 2. Po translacji obie formy pro-IL-1 gromadzone są w cytosolu. Prekursor IL-1 α ma aktywność biologiczną i może działać jako autokryny przekaźnik wewnątrzkomórkowy, zwłaszcza w komórkach nabłonkowych i śródbłonkowych [2]. Stwierdzono możliwość jego wiązania się z receptorem IL-1 (prawdopodobnie nowo syntetyzowanym) i translokację kompleksu do jądra komórkowego, gdzie dochodzi do wiązania kompleksów z DNA [1]. *In vivo* w warunkach fizjologicznych IL-1 α nie występuje w płynach ustrojowych. Pojawia się tam jedynie w stanach patologicznych, prawdopodobnie na skutek lizy komórek, w których została zsyntetyzowana. W pewnych sytuacjach może ulegać proteolizie z udziałem kalpain, zależnych od wapnia proteaz błonowych, co prowadzi do powstania dojrzałej formy IL-1 α o masie cząsteczkowej 17 kDa. Niewielka frakcja IL-1 α występuje w formie błonowej: jej transport do błony komórkowej odbywa się dzięki mirystylacji reszt lizyny, natomiast zakotwiczenie w błonie poprzez oddziaływania reszt mannozowych cząsteczki IL-1 α z lektynami. Prekursor IL-1 β nie ma aktywności biologicznej, w związku z czym wymaga cięcia proteolitycznego przez specyficzną proteazę cysteinową zwaną enzymem konwertującym IL-1 β (ICE – *interleukin-1 β converting enzyme*) [3]. W wyniku proteolizy powstaje aktywna postać IL-1 β o masie cząsteczkowej 17 kDa. Jest ona wydzielana i w postaci wolnej może inicjować od-

powiedzi biologiczne parakrynnie. Wśród mechanizmów zaangażowanych w sekrecję IL-1 β wymienia się egzocytozę, transport aktywny z udziałem białek nośnikowych oporności wielolekowej, „przeciekanie” i lizę komórek [1].

Do rodziny interleukiny-1 należy również antagonistą receptora IL-1 (IL-1Ra – *interleukin-1 receptor antagonist*) oraz interleukina 18 (IL-18). IL-1Ra jest produkowany w postaci prekursora, ciętego następnie proteolitycznie. Zidentyfikowano trzy formy tej cytokiny: sekrecyjną (22 kDa) i dwie wewnątrzkomórkowe (18 kDa, icIL-1Ra – *intracellular IL-1Ra* lub IL-1Ra2 i 3), będące efektem alternatywnego składania mRNA. W przeciwieństwie do IL-1 α i β oraz form wewnątrzkomórkowych forma sekrecyjna IL-1Ra ma peptyd sygnałowy. Sekrecyjny IL-1Ra ma zdolność do wiązania się z receptorami IL-1, lecz nie do ich aktywacji. Blokując receptory zapobiega wiązaniu się z nimi IL-1 i tym samym hamuje działanie tej cytokiny 4, 5. Formy wewnątrzkomórkowe funkcjonują w ten sposób wyłącznie po wydzieleniu z uszkodzonych komórek [6].

W ostatnim okresie pojawiły się doniesienia o sklonowaniu genów kodujących nowe białka należące do rodziny IL-1. Smith i in. oraz Kumar i in. sklonowali po 4 nowe geny i uzyskali ekspresję białek oznaczonych przez nich odpowiednio FIL-1 δ , ϵ , ζ , η (ang. *Family of IL-1*) oraz IL-1H1, 2, 3 i 4 (ang. *IL-1 homologue*) [7, 8].

3. RECEPTORY INTERLEUKINY 1

Pierwszym etapem niezbędnym do wywołania efektu biologicznego przez interleukinę 1 (z wyjątkiem aktywności wewnątrzkomórkowej IL-1) jest jej związanie z receptorem błonowym. Na powierzchni pojedynczej komórki znajduje się od kilkudziesięciu do kilkudziesięciu tysięcy cząsteczek receptorów IL-1. Odkryto dwa typy receptorów: typ I (IL-1RI) o masie cząsteczkowej 80 kDa [9], oraz typ II (IL-1RII) o masie cząsteczkowej 68 kDa [10]. Początkowo obecność IL-1RI stwierdzono na limfocytach T, a IL-1RII na limfocytach B, monocytach i neutrofilach. Obecnie jednak uważa się, że receptory typu I występują na większości komórek organizmu, natomiast receptory typu II głównie na komórkach leukocytarnych [11].

Oba receptory kodowane są przez niezależne geny. Ich ekspresja na powierzchni komórek jest ściśle regulowana: zwiększenie poziomu przez syntezę białka *de novo* stymulują cytokiny przeciwzapalne, np. IL-4, oraz glukokortykoidy, a także wzrost ekspresji IL-2R [12]. Obniżenie ekspresji receptorów IL-1 następuje w wyniku proteolizy, prowadzącej do uwalniania rozpuszczalnych form receptorów [13, 14]. Oba receptory IL-1 są białkami integralnymi błony komórkowej typu I, zbudowanymi z domeny wiążącej ligand, fragmentu transbłonowego oraz domeny cytoplazmatycznej. Domenę wiążącą ligand stanowi zewnątrzkomórkowa część receptora, składająca się w przypadku obu rodzajów receptorów z około 325 aminokwasów i zawierająca trzy domeny immunoglobulinopodobne, o charakterystycznej strukturze

trzeciorzędowej złożonej z dwóch struktur beta połączonych mostkiem dwusiarczkowym [15]. Krótkie segmenty śródbłonowe, złożone odpowiednio z 20 i 26 aminokwasów, wykazują znaczną homologię sekwencji. Największe różnice obserwuje się w strukturze domen cytoplazmatycznych. W przypadku IL-1RII zbudowana jest ona zaledwie z 29 aminokwasów, natomiast w IL-1RI z 213. W części cytoplazmatycznej receptora typu I nie stwierdzono aktywności katalitycznej. Nie znaleziono również miejsc akceptorowych dla kinaz tyrozynowych. Opisano natomiast sekwencję akceptorową dla kinazy białkowej C (aa 429-433: KKSRR) oraz sekwencję homologiczną do GTPazy [15].

Pomimo niewielkiej homologii sekwencji IL-1 α i β obie cytokiny wiążą się z tymi samymi receptorami, co wskazuje na znaczne podobieństwo struktury trzeciorzędowej cytokin i wyjaśnia ich wspólną aktywność biologiczną [16]. IL-1 α preferuje IL-1RI, podczas gdy interleukina-1 β wiąże się z większym powinowactwem do IL-1RII. IL-1Ra, podobnie jak IL-1 α wiąże preferencyjnie IL-1RI, w wyniku czego jego antagonistyczny efekt wywołuje poważniejsze konsekwencje [17].

Działanie dwóch receptorów IL-1 jest zupełnie odmienne. Podczas gdy receptor typu I wiążąc ligand wywołuje różnorodną odpowiedź komórkową, receptor typu II stanowi wyłącznie „molekularną pułapkę” dla interleukiny-1. Wiążąc ligand blokuje jego aktywność, nie dopuszczając do kontaktu z receptorem typu I. Jest zatem fizjologicznym regulatorem aktywności interleukiny-1 [12]. Nie stwierdzono interakcji obu typów receptorów prowadzącej do tworzenia heterodimerów [18]. Funkcja naturalnie występujących form rozpuszczalnych obu typów receptorów jest podobna do roli błonowej formy IL-1RII [19].

4. RODZINA RECEPTORÓW IL-1

Na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasowej oraz struktury trzeciorzędowej wyróżniono rodzinę receptorów interleukiny 1 [19]. Trzon rodziny stanowią transbłonowe białka ssaków, charakteryzujące się znacznym podobieństwem do receptorów IL-1 zarówno w części zewnątrzkomórkowej, jak i wewnątrzkomórkowej. Do grupy tej należą: IL-1RAcP – białko wspomagające receptor IL-1 (*IL-1 receptor accessory protein*), ko-receptor dla IL-1R 20; IL-1Rrp – białko spokrewnione z IL-1R (*IL-1 receptor-related protein*), stanowiące receptor dla interleukiny 18 [21]; AcPL (*accessory protein-like*), ko-receptor IL-1Rrp w sygnalizacji IL-18, odpowiednik IL-1RAcP [22]; IL-1Rrp-2 [23]; białko T1/ST2, występujące w formie błonowej i sekrecyjnej [24]; SIGIRR (*single IG domain IL-1R-related protein*), białko o nieznanym działaniu, bardzo zbliżone do IL-1R w domenie wewnątrzkomórkowej, natomiast w części pozakomórkowej mające tylko jedną domenę immunoglobulinopodobną [25]; IL-1RAPL/TIGIRR-1, białko o znaczącej homologii do IL-1RAcP, którego działanie może być związane z procesami pamięci i uczenia

się, wykazujące ekspresję w mózgu [26]; TIGIRR-2, nowe białko o nieznannej funkcji i sposobie sygnalizacji [26].

Drugą ważną gałąź rodziny receptorów IL-1 tworzy grupa białek wykazujących podobieństwo do domeny cytoplazmatycznej IL-1RI, określanej jako TIR (*Toll/Interleukin-1 receptor domain*). Ich domeny zewnątrzkomórkowe wykazują podobieństwo między sobą, są jednak odmienne od części pozakomórkowej receptora IL-1. Stanowią one wyróżnianą osobno rodzinę receptorów Toll [27], do której należą: Toll, białko prototypowe rodziny, produkt genu odpowiedzialnego za polarność grzbieto-brzuszną w rozwoju *Drosophila melanogaster* [28]; 18-wheeler, białko *Drosophila melanogaster* homologiczne do Toll [29]; MstProx, białko owadzie [24]; Tehao, białko owadzie [30]; hToll (TLR1), ludzki homolog białka Toll *Drosophila melanogaster*, receptor sierocy 31 oraz TLR2, 3, 4, 5 i 6 [27, 32]; RP105, białko ulegające ekspresji na ludzkich i mysich limfocytach B oraz ludzkich komórkach dendrytycznych [33]; hRSC 786/TIL [19]; MyD88, białko cytoplazmatyczne, pierwotnie opisane jako produkt genu indukowanego w mysich komórkach białaczkowych M1 pod wpływem stymulacji IL-6 (*myeloid differentiation protein*) [34, 35]; białka roślinne: białko N *Nicotiana* wywołujące oporność na wirus mozaiki tytoniu [36], RPP5, białko roślinne zidentyfikowane u *Arabidopsis* [37], białko L6 [38].

Poza wymienionymi, istnieją także białka wykazujące podobieństwo do domeny pozakomórkowej IL-1R, np. B15R, rozpuszczalny wczesny antygen wirusa vaccinia, który może działać jako rozpuszczalny receptor dla interleukiny 1, hamując obronę przeciwwirusową [39].

Białka należące do rodzin IL-1R i Toll uczestniczą w regulacji odporności. Białka transbłonowe mogą działać jako receptory, których aktywacja przez swoje ligandy lub czynniki infekcyjne (np. lipopolisacharyd bakteryjny) prowadzi do aktywacji mechanizmów obronnych. Inne białka uczestniczą w sygnalizacji jako koreceptory lub białka adaptorowe [40]. Według ostatnich doniesień ważną rolę w odporności pełnią ludzkie białka TLR: TLR4 powoduje wzrost ekspresji cytokin i cząsteczek kostymulujących w komórkach prezentujących antygen [31], natomiast TLR2 jest zaangażowany w odpowiedź na LPS [np. 41]. Ostatnio sugeruje się jednak, że to TLR4 jest głównym receptorem dla LPS, natomiast TLR2 rozpoznaje bakterie Gram(+) i drożdże [42]. Jednak udział receptorów Toll w odporności nie jest ograniczony tylko do białek ssaczy; u *Drosophila* Toll kontroluje odpowiedź na infekcje grzybicze [43], a 18-wheeler na infekcje bakteryjne [44]. Wskazuje się również na zaangażowanie białek roślinnych z rodziny IL-1R w oporność na zakażenia wirusowe. Na przykład obecność białka N tytoniu wywołuje oporność tej rośliny na wirus mozaiki tytoniu poprzez tzw. odpowiedź nadwrażliwą, której objawy przypominają lokalną odpowiedź zapalną indukowaną przez interleukinę 1 u ssaków [36].

5. KOMPLEKS RECEPTOROWY

Konsekwencją związania interleukiny 1 z receptorem typu I jest inicjacja sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Ponieważ w cytoplazmatycznej części receptora nie stwierdzono żadnej aktywności enzymatycznej, rozpoczęto poszukiwania molekuł oddziałujących z receptorem i łączących go z enzymami efektorowymi. Obecnie przyjmuje się, że IL-1RI tworzy multimeryczny kompleks aktywujący wiele dróg sygnalizacji. Kompleks ten składa się z cząsteczki receptora związanej z ligandem oraz białka błonowego IL-1RAcP (*interleukin-1 receptor accessory protein* – białko wspomagające IL-1RI), które jest ko-receptorem niezbędnym do przekazania sygnału [20, 45]. Struktura IL-1RAcP jest bardzo zbliżona do IL-1RI: ma trzy domeny immunoglobulinopodobne w części zewnątrzkomórkowej, krótki segment transbłonowy i długą domenę cytoplazmatyczną homologiczną do receptora IL-1. IL-1RAcP nie wiąże samodzielnie IL-1, nie ma też, podobnie jak IL-1RI, aktywności enzymatycznej. Rozpoznaje natomiast i wiąże kompleks receptor/ligand tworząc z nim heterodimer. Być może dochodzi także, jak sugerują Guo i in., do agregacji takich kompleksów [46]. Konsekwencją utworzenia heterodimeru jest zwiększenie powinowactwa miejsca wiążącego ligand oraz zbliżenie części cytoplazmatycznych obu cząsteczek receptorowych [17, 47]. Do inicjacji szlaków transdukcji sygnału niezbędna jest obecność prawie całej domeny cytoplazmatycznej receptora, a zwłaszcza dwóch najsilniej konserwowanych krótkich motywów zlokalizowanych w pozycjach aa10 (box 1) i aa60 (box 2) [48, 49] oraz IL-1RAcP [47]. Okazało się, że receptor IL-1 typu II również ma zdolność oddziaływania z IL-1RAcP za pomocą domeny pozakomórkowej po związaniu liganda. Jednak brak domeny wewnątrzkomórkowej uniemożliwia mu inicjowanie sygnalizacji. Sugeruje się więc, że IL-1RII i IL-1RI konkurują ze sobą o białko pomocnicze, którego ekspresja tylko w niewielkim stopniu podlega regulacji [50].

Wzajemne oddziaływanie elementów kompleksu receptorowego umożliwia interakcję z białkiem adaptorowym, którym okazał się być kolejny członek rodziny receptorów Toll: białko MyD88 [35, 51]. MyD88 ma budowę dwudomenową, charakterystyczną dla białek adaptorowych, których podstawową funkcją jest łączenie ze sobą dwóch składników transdukcujących. Koniec C-terminalny stanowi domena homologii do Toll (TIR), za pomocą której MyD88 (prawdopodobnie w postaci homodimeru) oddziałuje z domeną TIR białka pomocniczego IL-1RAcP [52, 53]. Natomiast N-terminalna domena śmierci (DD – *death domain*), zidentyfikowana pierwotnie w białkach zaangażowanych w sygnalizację receptorów TNF i Fas jako odpowiedzialna za indukcję apoptozy [54], umożliwia interakcję z N-terminalnym końcem białka zwanego IRAK [51], dzięki czemu MyD88 staje się pośrednikiem pomiędzy IRAK a IL-1RAcP [53]. IRAK (*interleukin-1 receptor-associated kinase*) jest specyficzną dla kompleksów receptorowych typu IL-1RI/Toll kinazą serynowo-treoninową [55], aktywowaną już po ok. 30 sekundach od związania IL-1 z

receptorem. Nie jest do końca pewne, jaki jest mechanizm aktywacji kinazy. Pierwsze badania Cao i in. sugerowały autofosforylację. Późniejsze prace postawiły jednak tę hipotezę pod znakiem zapytania i obecnie ci sami autorzy uznają za niewyjaśnione, czy IRAK jest fosforylowana autokatalitycznie, czy też przez inne kinazy [56]. Ufosforylowana IRAK dysocjuje od kompleksu receptorowego i oddziałuje z kolejnym białkiem przekaźnikowym, TRAF6. Stwierdzono natomiast, że aktywność kinazowa IRAK nie jest krytyczna dla jej udziału w sygnalizacji interleukiny-1 [56, 57, 58].

Ostatnio zostały zidentyfikowane nowe elementy kompleksu receptorowego IL-1RI: IRAK-2 [52] i IRAK-M [59]. IRAK-2 jest białkiem homologicznym do IRAK o niewielkiej aktywności kinazowej. Podobnie jak IRAK za pomocą domeny N-terminalnej oddziałuje z domeną DD białka MyD88, natomiast po fosforylacji za pomocą domeny C-terminalnej oddziałuje z TRAF6. Co ciekawe natomiast, w doświadczeniach immunoprecypitacyjnych IRAK-2 koprecypituje raczej z receptorem IL-1, a nie z IL-1RAcP [52]. Nie wiadomo jeszcze, jaka jest wzajemna relacja pomiędzy IRAK a IRAK-2, czy mogą one np. działać alternatywnie. Stwierdzono jednak, że utrata funkcji IRAK nie może być całkowicie skompensowana ani przez IRAK-2, ani przez inne spokrewnione kinazy [60]. IRAK-M ulega ekspresji głównie w komórkach linii szpikowych i podobnie jak IRAK-2 ma nieznaczną aktywność autokatalityczną. Odkrycie IRAK-2 oraz IRAK-M znacznie skomplikowało zrozumienie mechanizmu regulacji sygnalizacji IL-1.

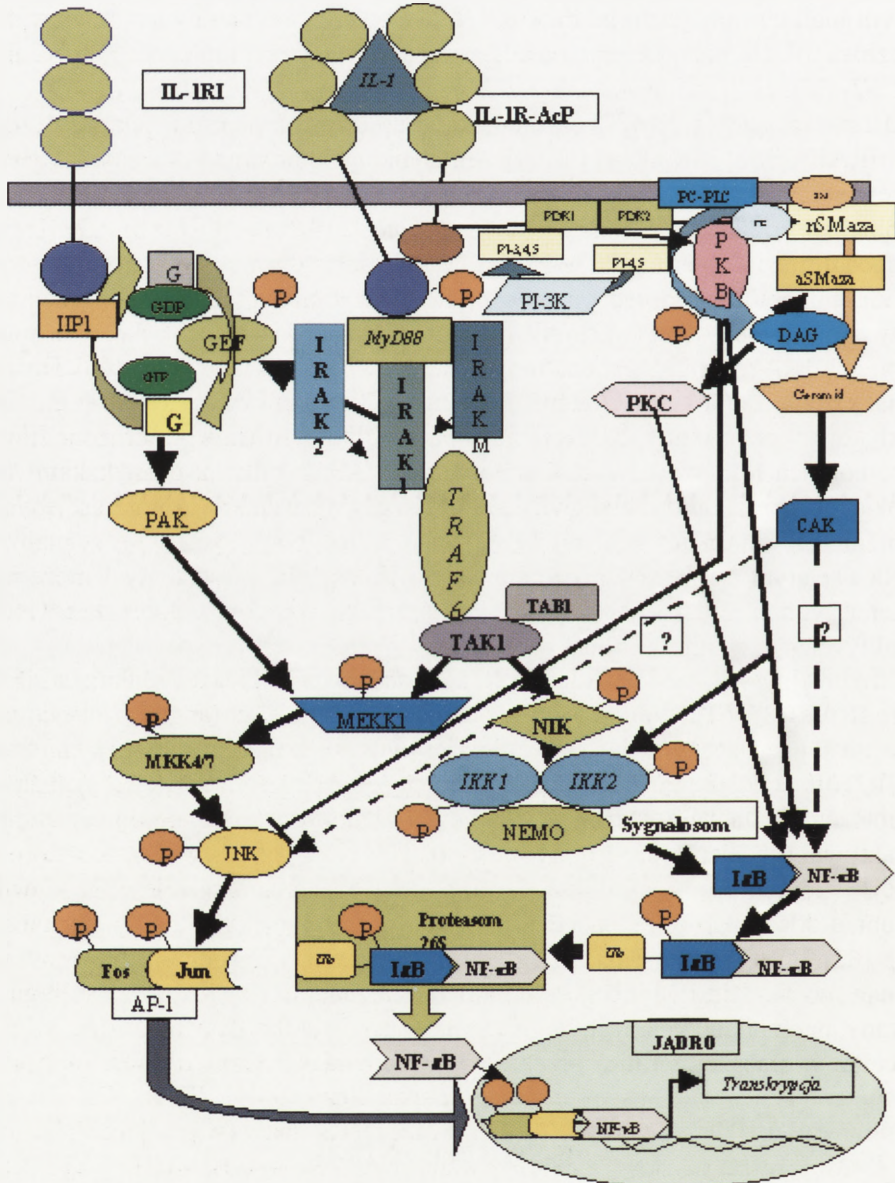
Na obecnym etapie badań wydaje się, że IRAK jest jednym z tych elementów systemu sygnalizacji interleukiny 1, od którego rozchodzą się rozmaite szlaki wiodące do aktywacji czynników transkrypcyjnych. Wniosek ten jest potwierdzany przez analizę dróg sygnalizacji ludzkich TLR, analogicznych do IL-1R i wykorzystujących także IRAK [27, 61]. Warto również zauważyć, że IRAK, chociaż dotychczas uważana za kinazę specyficzną tylko dla transdukcji sygnału receptorów z rodziny IL-1R/Toll, wydaje się mieć znaczenie również w pewnych szlakach sygnalizacji receptora p55 dla TNF. Udział IRAK w tych szlakach sygnalizacji wymaga jednak jej aktywności katalitycznej [58].

Z drugiej jednak strony doświadczenia prowadzone na myszach z nieaktywnym genem IRAK wskazują, że obecność tej kinazy nie jest niezbędna dla sygnalizacji IL-1 [62]. Autorzy sugerują, że ostatnim elementem niezbędnym dla transdukcji sygnału od IL-1 jest MyD88, natomiast brak działania IRAK może być kompensowany przez inne kinazy lub, że sygnał od receptora IL-1 może być również (choć w słabszej formie) przekazywany innymi szlakami.

6. SZLAK NF κ B

Jednym z najważniejszych, a zarazem najlepiej poznanych szlaków przekazywania sygnału IL-1 jest szlak NF κ B. Szlak ten jest również kluczowy w sygnalizacji

ludzkich receptorów TLR oraz Toll u *Drosophila* [27, 41]. Szlak prowadzący do mobilizacji czynnika NF κ B, a także inne szlaki transdukcji sygnału indukowane przez IL-1 przedstawiono na rycinie 1. NF κ B to grupa czynników transkrypcyjnych, biorących udział w regulacji ekspresji szeregu genów, przede wszystkim zaangażowanych



RYCINA 1. Główne szlaki sygnalizacji wewnątrzkomórkowej interleukiny I (opis w tekście)

zowanych w odpowiedzi odpornościowe i zapalne, odpowiedź stresową i ochronę przed apoptozą. Mogą one być aktywowane nie tylko przez IL-1, ale również inne białka prozapalne i immunomodulacyjne, np. TNF, limfotoksynę α (LT α) i β (LT β), lipopolisacharyd (LPS), ligandy CD30 oraz CD40. NF κ B jest dimerem składającym się najczęściej z podjednostek białkowych p50 i p65/RelA, który w stanie nieaktywnym związany jest z inhibitorem I κ B. Aktywacja czynnika transkrypcyjnego polega na fosforylacji I κ B, co powoduje jego dysocjację od kompleksu, a następnie degradację przez proteasom. Wolny dimer NF κ B ulega następnie translokacji do jądra komórkowego, gdzie bierze udział w uruchamianiu transkrypcji [63].

Uruchomienie szlaku sygnalizacji interleukiny 1 prowadzącego do aktywacji NF κ B następuje przez oddziaływanie C-terminalnej domeny ufosforylowanej IRAK [64] z białkiem nazwanym TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*) [65]. TRAF6 należy do rodziny białek adaptorowych współdziałających m.in. z receptorem p75 dla TNF, charakteryzujących się występowaniem konserwowanej C-końcowej domeny złożonej z ok. 170 aminokwasów, określanej jako TRAF-C, α -helikalnej domeny TRAF-N oraz N-terminalnego palca RING i palca cynkowego [66]. Domena TRAF-C jest zaangażowana w agregację homo- i heterotypową oraz w oddziaływanie z receptorami nadrodziny TNF-R [67]. W przypadku TRAF6 nie stwierdzono silnych asocjacji z innymi cząsteczkami z rodziny TRAF, a tylko z cząsteczkami tego samego typu [65]. Ostatnio pojawiły się dane sugerujące, że TRAF6 nie jest jedynym przedstawicielem białek rodziny TRAF, który może być mediatorem sygnalizacji IL-1. Stwierdzono mianowicie, że w transdukcji sygnału interleukiny 1 może mieć udział również TRAF2, jeden z mediatorów szlaku inicjowanego przez TNFR1 [68, 69].

TRAF6 aktywuje kinazę NIK (*NF κ B-inducing kinase* – kinaza indukująca NF κ B) [70], najprawdopodobniej za pośrednictwem kinazy TAK1 (ang. *TGF β -activated kinase*) [71]. Kinaza TAK1, pierwotnie zidentyfikowana jako mediator sygnalizacji TGF β , należy do grupy kinaz MAP3K (*mitogen-activated kinase kinase*). Jest ona konstytutywnie zasocjowana z białkiem TAB-1, które wydaje się mieć znaczenie również w sygnalizacji IL-1 [71]. Aktywacja TAK1 zachodzi w drodze autofosforylacji [72]. Nie jest jednak jasne, w jaki sposób TAK1 aktywuje NIK. Prawdopodobnie dochodzi do fosforylacji w rejonie N-terminalnym NIK, co doprowadza do jej częściowej aktywacji i umożliwia autofosforylację kluczowych reszt aminokwasowych. Kinaza NIK jest wspólnym mediatorem sygnalizacji szeregu receptorów cytokin, oprócz IL-1RI także p55 TNF-R, Fas/Apo-1, CD 30, CD 40, IL-17R zachodzącej z udziałem białek z grupy TRAF [70, 73]. Jest pierwszym elementem szlaku sygnalizacji całkowicie specyficznym dla NF κ B. NIK uczynnia kompleks I κ B-NF κ B poprzez aktywację kinaz I κ B, określanych jako IKK (ang. *I κ B kinase* – kinaza I κ B). Zidentyfikowano dwie kinazy I κ B: IKK α [74] i β [75] Są one homologicznymi białkami, fosforylującymi po 2 reszty seryny w N-końcowych fragmentach inhibitorów I κ B- α i β , co prowadzi do poliubikwitynacji tych

cząsteczek i degradacji przez proteasom 26S [76]. IKK α i IKK β tworzą dimery połączone zamkiem leucynowym, które wraz z NIK są elementami makromolekularnego kompleksu enzymatycznego o masie cząsteczkowej 800 kDa (ang. *signalosome*). NIK preferencyjnie fosforyluje jedną specyficzną resztę seryny w cząsteczce IKK α , może również fosforylować IKK β [77]. Jednak nie wiadomo, czy znajduje to odbicie w biologicznej różnicy w działaniu obu kinaz. Dla aktywności tego kompleksu, a więc do mobilizacji NF κ B, niezbędna jest zarówno NIK, jak i kinazy I κ B (IKK α i IKK β) [75]. Dla aktywności kompleksu niezbędna jest również obecność białka IKK γ /NEMO (*NF κ B essential modulator*). Delecje zarówno w części N-, jak i C-terminalnej tego białka blokują aktywację czynnika NF κ B pod wpływem IL-1 i innych stymulatorów (LPS, TNF, PMA) [78, 79]. IKK γ zawiera m.in. zamek leucynowy, za którego pomocą prawdopodobnie łączy aktywatory z kompleksem IKK. W skład kompleksu wchodzi ponadto białka tworzące rusztowanie (*scaffold proteins*), których zadaniem jest także regulacja i koordynacja aktywności IKK. Do chwili obecnej sklonowano jedno takie białko, nazwane IKAP (*IKK-complex-associated protein*) [80].

Niedawno odkryto kolejną kinazę serynowo-treoninową IKK-i zdolną do fosforylacji I κ B α . Nie jest ona jednak aktywowana przez znane stymulatory NF κ B, co rodzi wątpliwości co do jej fizjologicznego znaczenia dla aktywacji tego czynnika transkrypcyjnego [81]. Podobnie bardzo zbliżona do niej kinaza NAK/TBK1 (*NF κ B-activating kinase/TRAF-binding kinase*), która tworzy kompleks z TANK (I-TRAF) i TRAF2 może być mediatorem aktywacji NF κ B przez TRAF2, 5, 6 oraz TANK. Pomimo znacznej homologii do IKK wydaje się ona działać powyżej, aktywując w niewielkim stopniu IKK β i uruchamiając mechanizm dodatniego sprzężenia zwrotnego powodującego wzmocnienie tej aktywacji. Nie jest jednak niezbędna dla aktywacji NF κ B przez IL-1, TNF i CD40, w związku z czym wydaje się być elementem innego szlaku sygnalizacji [82, 83].

W ostatnim czasie pojawiło się kilka publikacji sugerujących, że interleukina 1 aktywuje czynnik transkrypcyjny NF κ B również drogą niezależną od IRAK, TRAF6 i NIK, natomiast zależnej od 3-kinazy fosfatidyloinozytolu (PI-3K – *phosphatidylinositol 3-kinase*) [np. 84, 85]. Podjednostka regulatorowa tej kinazy p85 oddziałuje z domeną wewnątrzkomórkową IL-1RACp (być może w interakcję tę zaangażowana jest również cząsteczka IL-1RI) [84, 86], co prowadzi do fosforylacji p85, a w konsekwencji do aktywacji podjednostki katalitycznej p110 dzięki zapewnieniu kontaktu z błonowymi substratami lipidowymi. Powstające produkty lipidowe pełnią rolę wtórnych przekaźników aktywując m.in. kinazę białkową Akt/PKB. W ten sposób uruchamiany jest szlak prowadzący do aktywacji NF κ B. Część prac wskazuje na niezależną od NIK aktywację IKK i za ich pośrednictwem fosforylację i degradację I κ B oraz uwolnienie aktywnego NF κ B [84, 87]. Część natomiast sugeruje aktywację NF κ B niezależną od degradacji I κ B, translokacji NF κ B do jądra i wiązania do DNA. Polegałaby ona na fosforylacji w obrębie podjednostki

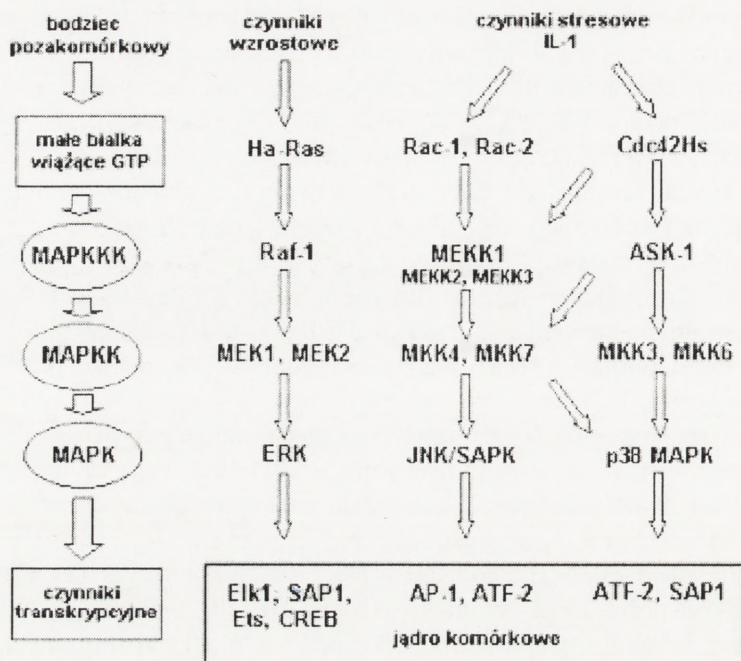
p65/RelA NFκB, prowadzącej do wzrostu aktywności transaktywacyjnej tego czynnika transkrypcyjnego [86]. Wydaje się, że w przypadku obu przedstawionych ścieżek dla efektywnej aktywacji NFκB niezbędna jest kooperacja z innymi szlakami transdukcji sygnału, przede wszystkim z opisaną powyżej klasyczną drogą mobilizacji NFκB. Istnieją również doniesienia, że w pewnych modelach sygnalizacja IL-1 za pośrednictwem PI-3K i Akt, choć ma antyapoptotyczne skutki, jednak w ogóle nie prowadzi do mobilizacji czynnika transkrypcyjnego NFκB [88].

NFκB może być aktywowany także za pośrednictwem kinaz z grupy MAPK. Aktywacja ta może zachodzić zarówno zależnie, jak i niezależnie od degradacji IκB. Najczęściej podkreślany jest udział MEKK1 (kinaza kinaz MAP kinaz 1) [89, 90]. Szlaki mobilizacji NFκB z udziałem kinaz MAPK zostaną przedstawione w kolejnym rozdziale.

Czynnik transkrypcyjny NFκB aktywuje transkrypcję wielu genów odpowiedzi wczesnej (ang. *immediate-early*) indukowanych przez IL-1 i inne czynniki stresowe, takich jak IL-6, IL-8, selektyna E, cząsteczki adhezyjne ICAM-1 i VCAM-1. Do grupy tej należą również geny kodujące białka protekcyjne, chroniące komórki przed apoptozą, np. A20. Białko A20 wydaje się być ważnym negatywnym regulatorem aktywności NFκB w odpowiedzi na IL-1 [91]. Regulacja ta zachodzi prawdopodobnie dzięki bezpośredniej interakcji pomiędzy C-terminalną domeną A20 a TRAF6 [92]. Białko A20 pełni wówczas prawdopodobnie rolę białka adaptorowego łączącego TRAF6 (dotyczy to także TRAF2) z białkiem ABIN, które negatywnie reguluje działanie domeny transaktywacyjnej NFκB [93]. Sugerowano również, że aktywność NFκB po indukcji przez IL-1 może być regulowana przez TRAF1 zarówno negatywnie, jak i pozytywnie. Stwierdzono, że w komórkach HEK293T nadekspresja białka TRAF1 powoduje znaczne obniżenie transkrypcji zależnej od NFκB, tymczasem w komórkach HeLa zaobserwowano zjawisko odwrotne [94, 95].

7. SZLAKI KINAZ MAP

Kinazy MAP (*mitogen-activated protein kinase*) stanowią ewolucyjnie konserwatywną rodzinę enzymów złożoną z trzech grup, określaną jako MAPK, MAPKK i MAPKKK. Kinazy MAPK są kinazami Ser/Thr ukierunkowanymi przez prolinę. Są one aktywowane przez fosforylację reszt Thr i Tyr w motywie TXY przez kinazy wyższego rzędu MAPKK o podwójnej specyficzności. Kinazy te są z kolei aktywowane przez fosforylację konserwowanych Ser i Thr przez MAPKKK, tworzące zróżnicowaną grupę kinaz Ser/Thr, aktywowane przez receptory błonowe za pośrednictwem np. innych kinaz, małych białek wiążących GTP. Domeny katalityczne kinaz MAP są ewolucyjnie konserwatywne, natomiast w domenach regulatorowych zaobserwowano znaczące różnice. Różnią się one także specyficznością substratową. W komórkach ssaczy występują trzy typy kinaz MAP: ERK,



RYCINA 2. Kaskady kinaz MAP w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej interleukiny 1 (opis w tekście)

JNK/SAPK i p38 MAPK [96]. IL-1 aktywuje efektywnie szlaki kinaz JNK/SAPK i p38 MAPK, które mogą też być aktywowane przez czynniki stresowe, cytokiny i czynniki wzrostowe, takich jak EGF, NGF, czy TNF. Natomiast kaskada ERK uważana jest za najmniej istotną w sygnalizacji interleukiny 1. Kaskady kinaz MAP w transdukcji sygnału IL-1 przedstawiono na rycinie 2.

7.1. Szlak JNK/SAPK

Szlak JNK/SAPK jest bardzo silnie indukowany przez IL-1 w szeregu linii komórkowych [97, 98, 99, 100, 101, 102, 103]. Kinazy JNK aktywują przede wszystkim czynnik transkrypcyjny c-Jun przez fosforylację specyficznych miejsc w N-końcowej części domeny transaktywacyjnej [97]. Mogą również aktywować inne czynniki transkrypcyjne, w tym c-Fos i ATF2 (podobnie jak c-Jun są one składnikami kompleksu AP1) [99]. W konsekwencji dochodzi do zwiększenia transkrypcji genów kodujących cytokiny [103], indukowaną syntazę tlenku azotu (iNOS) [99], indukcji cyklooksygenazy-2, a w konsekwencji wzrostu syntezy prostaglandyn [104, 105]. Szlak JNK indukowany przez IL-1 uczestniczy w procesach zapalnych [106]. W wielu układach doświadczalnych w kaskadę sygnalizacyjną są zaangażowane tylko

określone typy i izoformy JNK [101, 107]. Różne izoformy JNK wiążą czynniki transkrypcyjne c-Jun i ATF-2 z różnym powinowactwem, co może decydować o specyficznej funkcji poszczególnych izoform JNK [108]. Konsekwencje funkcjonalne aktywacji pojedynczego typu lub izoformy JNK zostaną zapewne poznane dzięki badaniom prowadzonym na myszach z nieaktywnymi genami JNK [109, 110, 111]. Aktywacja JNK po indukcji za pomocą IL-1 zachodzi niezależnie od p21 Ras i Raf-1 [112]. Pośrednikami są dwa białka wiążące GTP z rodziny Rho, spokrewnione z p21 Ras: Rac-1 i -2 oraz Cdc42Hs [113, 114]. Aktywują one zróżnicowaną grupę białek homologicznych do drożdżowego STE20, które z kolei są zaangażowane w indukcję aktywności MAPKKK. Należą do niej m.in. kinazy Ser/Thr zwane PAK [113, 114] oraz inne białka np. GCK, HPK, KHS, MLK3, NIK [wg 96]. Większość z nich aktywuje przez fosforylację MAPKKK, której rolę w szlaku JNK pełni MEKK1 [115, 116], rzadziej MEKK2 i 3 [117], MLK [118] lub ASK-1 [119]. Następnie fosforylowana jest MAPKK, w tym wypadku MKK4 [104, 120] lub MKK7 [100, 101, 116, 118], które podwójnie fosforylują JNK w subdomenie VIII [118].

JNK/SAPK może również ulegać aktywacji na drodze zależnej od MyD88, IRAK i TRAF6. Proces ten zachodzi bez udziału aktywności katalitycznej IRAK [57, 64, 69]. Jednym z mediatorów jest MEKK1, podobnie jak w klasycznym szlaku JNK/SAPK [69, 121]. Rolę mediatora może również pełnić kompleks TAK1/TAB-1, wspomniany wcześniej jako aktywator kinazy indukującej NFκB (NIK) [71]. Efektem aktywacji tych dróg jest aktywacja JNK i w rezultacie mobilizacja czynnika transkrypcyjnego AP-1. Jak wspomniano wcześniej, kinaza MEKK1 może uczestniczyć również w aktywacji czynnika NFκB [89, 116; 122]. MEKK1 została wykryta w aktywnym kompleksie zawierającym kinazy IKK oraz NIK (ang. *signalosome*). Stwierdzono, że preferencyjnie stymuluje aktywność kinazy IKK [90]. Zidentyfikowano cząsteczkę, która może działać jako pośrednik pomiędzy TRAF6 a MEKK1. Białko to, zwane ECSIT (*evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathways* – ewolucyjnie konserwowany pośrednik sygnalizacyjny w szlakach Toll), jest prawdopodobnie specyficzna dla szlaków sygnalizacji IL-1R/Toll. Pełni ono rolę białka adaptorowego oddziałującego z TRAF6 i MEKK1 oraz promuje proteolizę długiej formy MEKK1 o masie cząsteczkowej 195 kDa (prawdopodobnie z udziałem kaspazy), w wyniku czego powstaje forma aktywna katalitycznie o m. cz. 80 kDa [123]. Dowiedziano również udziału dwóch innych kinaz MEKK2 i MEKK3 w procesie aktywacji kinaz IKK [124].

Pojawiło się również doniesienie, że kinazy z rodziny MAP mogą negatywnie regulować szlak aktywacji czynnika transkrypcyjnego NFκB. A mianowicie: wymieniona już kinaza typu MAPKKK, zwana ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase* – kinaza regulująca sygnał apoptotyczny), funkcjonująca w szlakach JNK/SAPK i p38 MAPK, może wchodzić w bezpośrednią interakcję z kinazą TAK1,

co uniemożliwia tworzenie kompleksu TAK1 z białkiem adaptorowym TRAF6, przerywając tym samym szlak mobilizacji NF κ B [125].

7.2. Szlak p38 MAPK

Szlak p38 MAPK jest aktywowany, podobnie jak szlak JNK/SAPK, przez czynniki stresowe, a więc również przez interleukinę 1. Dowody na udział kinazy p38 MAPK w sygnalizacji IL-1 w różnych typach komórek pojawiają się w szeregu prac [np. 102, 126, 127, 128, 129, 130, 131]. Znaczenie kaskady p38 w sygnalizacji IL-1 potwierdziły także doświadczenia na myszach z *knockoutem* genu p38 MAPK [132]. Efektem działania kaskady p38 jest aktywacja czynnika transkrypcyjnego SAP-1 [102], a także fosforylacja MAPKAP kinazy-2 (MAPK – *associated protein kinase-2*) [126, 130, 132] oraz hsp 27 [126]. Ostateczną konsekwencją działania kaskady p38 MAPK jest wzrost ekspresji cytokin, np. IL6 [128, 130], IL-8 [133], IL-2 [103], wzrost ekspresji cyklooksygenazy-2 (COX-2) i związany z tym wzrost produkcji prostaglandyn [104, 105] oraz wzrost ekspresji indukowalnej syntazy tlenu azotu (iNOS) [105]. Należy zauważyć, że regulacja ekspresji genu przy udziale p38 MAPK zachodzić może nie tylko na poziomie transkrypcji, ale także stabilizacji mRNA [130], translacji [128] i potranslacyjnie [103, 105]. W literaturze trudno jednak znaleźć informacje dotyczące kinaz aktywujących p38 w odpowiedzi na IL-1. Z badań niezwiązanych bezpośrednio z sygnalizacją interleukiny 1 wiadomo jednak, że bezpośrednimi aktywatorami p38 są najczęściej MKK3 i MKK6 [wg 96], które z kolei są uruchamiane dzięki fosforylacji przez kinazę ASK-1 [119]. Guan i in. potwierdzili te dane oraz wykazali, że p38 MAPK może również ulegać aktywacji pod wpływem MKK4, jednej z podstawowych kinaz aktywujących JNK/SAPK [104]. Aktywacja kaskady p38MAPK zachodzi, podobnie jak w przypadku JNK/SAPK, za pośrednictwem niskocząsteczkowych białek wiążących GTP.

7.3. Szlak ERK

Kinaza ERK jest aktywowana głównie przez mitogeny, np. czynniki wzrostowe, których receptory mają endogenną aktywność kinazy tyrozynowej. Aktywacja ta zachodzi za pośrednictwem p21 Ras (małe białko wiążące GTP), kinazy Raf-1, która pełni tu rolę MAPKKK oraz MEK1 lub MEK2. Aktywowana kinaza ERK fosforyluje czynniki transkrypcyjne Elk-1, SAP1, Ets1 i 2 oraz CREB [wg 96]. W przeciwieństwie do czynników wzrostowych, cytokiny, takie jak IL-1, nie są silnymi aktywatorami ERK [np. 100, 101, 134]. Pojawiają się jednak doniesienia sugerujące zaangażowanie szlaku ERK w transdukcję sygnału interleukiny 1 [np. 127, 129, 135, 136, 137]. Jak sugerują niektórzy autorzy, IL-1 aktywuje ERK nie bezpośrednio, lecz zależnie od dodatkowych czynników, np. obecności jonów wapnia [129]. Wydaje się, że zaangażowanie tego szlaku w sygnalizację receptora

IL-1 jest ograniczone do pewnych układów doświadczalnych i tylko niektórych komórek.

Za pośrednictwem kinaz MAP interleukina 1 może również indukować aktywację czynnika transkrypcyjnego NF κ B w sposób niezależny od IKK. W procesie tym bierze udział małe białko wiążące GTP Rac1, które może asocjować z kompleksem receptorowym IL-1 [138] oraz kinaza efektorowa PAK1, która może regulować aktywację kinaz MAP uaktywniających z kolei inne kinazy, np. kinazy białkowe PKA i PKC ζ , oraz kinazę kazeiny II. Rezultatem jest wzmocnienie zdolności transaktywacyjnej podjednostki p65 NF κ B już związanej ze specyficzną sekwencją promotorową dzięki fosforylacji reszt seryny [139]. Dowiedziono udziału atypowych izoform PKC w aktywacji NF κ B w niektórych modelach komórkowych, ale na razie nie potwierdzono ich bezpośredniego związku z opisywanym szlakiem [140]. Wydaje się, że opisany szlak jest komplementarny do klasycznego szlaku aktywacji NF κ B z udziałem IKK. Prawdopodobne jest, że dla efektywnej mobilizacji czynnika NF κ B niezbędne są oba przedstawione sygnały. Szlak z udziałem PKC można również powiązać z opisanym wcześniej szlakiem mobilizacji NF κ B przy udziale 3-kinazy fosfatydyloinozytolu (PI-3K), której działanie może prowadzić m.in. do aktywacji PKA i PKC.

Wielość danych dotyczących udziału trzech kaskad kinaz MAP w sygnalizacji interleukiny 1 komplikuje obraz transdukcji sygnału tej cytokiny. Sprzeczność danych prezentowanych przez różnych autorów wydaje się wynikać z doboru modelu komórkowego oraz metod badawczych. W wielu przypadkach IL-1 może jednocześnie aktywować różne szlaki kinaz MAP [102, 103, 104, 105, 127, 129, 141, 142]. Niekiedy zaś do uzyskania efektu biologicznego cytokiny niezbędny wydaje się udział co najmniej dwóch kaskad kinaz MAP lub ich kooperacja z innymi szlakami transdukcji [103, 104, 105, 142]. Z drugiej strony kinazy MAP mogą uczestniczyć w negatywnej regulacji ekspresji genów [141]. Prawdopodobnie szlaki kinaz MAP są dodatkowo regulowane przez białka nie będące elementami tych kaskad. Przykładem może być kontrola ścieżki JNK/SAPK przez oddziaływanie z białkiem rusztowania (ang. *scaffold protein*) IB1/JIP-1 [143]. Za negatywną regulację szlaków kinaz MAP wydaje się być również odpowiedzialny układ PI3K/Akt. Sugeruje się, że regulacja ta może za pośrednictwem Akt z JNK lub z Raf albo Rac [88]. Ważnymi regulatorami kaskad kinaz MAP wydają się być również fosfatazy białkowe PP2A i PP1 [144, 145]. Stwierdzono na przykład, że PP2A hamuje działanie MAPK i w dalszej kolejności MAPKAPK-2. W odpowiedzi na IL-1 kinaza typu pp60 src fosforyluje PP2A, co powoduje jej inaktywację i w konsekwencji umożliwia funkcjonowanie kaskady MAPK [146].

Szlaki sygnalizacji prowadzące do aktywacji podstawowych dla cytokin prozapalnych czynników transkrypcyjnych, tzn. NF κ B i AP1, są bardzo złożone i splecione ze sobą. Przy obecnym stanie wiedzy postuluje się, że regulacja odpowiedzi na IL-1 jest wielostopniowa i wymaga udziału co najmniej dwóch szlaków. Przy-

kładem może być synteza interleukiny 2 bardzo istotna dla prawidłowego przebiegu i efektywności odpowiedzi odpornościowej. Wymaga ona nie tylko indukcji ekspresji genu na poziomie transkrypcji, która zachodzi zależnie od IRAK, TRAF6, a więc szlakiem NFκB, ale również dodatkowych sygnałów stabilizujących mRNA i indukujących translację, niezależnych od tych mediatorów [147].

8. INNE SZLAKI SYGNALIZACJI IL-1

Wiele wczesnych prac dotyczących sygnalizacji wewnątrzkomórkowej interleukiny 1 wskazywało na oddziaływanie klasycznych białek G z receptorem IL-1, co skutkuje aktywacją cykazy adenylowej i innych enzymów efektorowych i w konsekwencji wzrostem stężeń wtórnych przekaźników, takich jak cAMP [148, 149]. Późniejsze badania dowiodły, że klasyczne białka G nie są bezpośrednio zaangażowane w początkowe etapy transdukcji sygnału od receptora IL-1. Stwierdzono jednak, że cAMP jest istotnym wtórnym przekaźnikiem w wielu układach doświadczalnych [136, 150, 151]. Za pośrednictwem cAMP aktywowana może być kinaza białkowa A (PKA), która z kolei może przyczyniać się do aktywacji dwóch najważniejszych w sygnalizacji IL-1 czynników transkrypcyjnych, czyli NFκB i API [150, 152]. Wydaje się jednak, że PKA może uczestniczyć w sygnalizacji interleukiny 1 niezależnie od cAMP, o czym wspomniano wcześniej. Być może PKA wpływa permissywnie na szlaki aktywacji API dzięki fosforylacji inhibitora I, który blokuje aktywność fosfatazy białkowej PP1. Nieaktywna fosfataza PP1 nie może blokować działania kaskady prowadzącej do aktywacji czynnika transkrypcyjnego [152].

W sygnalizację interleukiny 1 mogą być również zaangażowane mediatory lipidowe. Jeden z nich, diacyloglicerol (DAG), może powstawać z różnych lipidów błonowych zarówno zależnie, jak i niezależnie od fosfolipazy C (PLC). W tym drugim przypadku może on powstawać przez konwersję za pośrednictwem fosfohydrolazy fosfatydowej z kwasu fosfatydowego lub z ceramidu. Prawdopodobnie DAG aktywuje niektóre izoformy kinazy białkowej C (PKC). Ceramid powstaje z rozpadu sfingomieliny katalizowanego przez błonową sfingomielinazę obojętną (nSMazę). Pomimo istnienia doniesień o produkcji ceramidu w odpowiedzi na interleukinę 1 [153] nie ma pewności, czy jest on przekaźnikiem tej cytokiny, czy też tylko wspomaga jej sygnalizację wewnątrzkomórkową, a powstaje pod wpływem innych czynników. Ceramid wzmacnia aktywność zarówno kinazową, jak i fosfatazową. Przy jego udziale może być aktywowana fosfataza PP2A [154]. Natomiast aktywowaną przez ceramid kinazą jest CAK (*ceramid-activated kinase*), która została zidentyfikowana jako kinaza ERK [155]. Ceramid może być również przekaźnikiem w szlaku prowadzącym do syntezy cyklooksygenazy II (COXII) w odpowiedzi na IL-1 i w konsekwencji do powstawania produktów rozpadu kwasu arachidonowego, przede wszystkim prostaglandyny E₂ (PGE₂) [156]. Wskazano również na

udział kinazy białkowej C ζ (PKC ζ) w indukcji ekspresji COXII i produkcji PGE2 [157].

Za ważny wtórny przekaźnik w sygnalizacji IL-1 uważa się również tlenek azotu (NO) [np. 158, 159]. NO powstaje dzięki działaniu syntazy tlenu azotu (NOS – *nitric oxide synthase*). IL-1 aktywuje przede wszystkim indukowaną formę syntazy tlenu azotu, tzw. iNOS, stymulując jej syntezę [160]. Prawdopodobnie dochodzi również do zależnej od IL-1 fosforylacji NOS przy udziale PKA, PKC lub innych kinaz. Zjawisko to dotyczy również konstytutywnie produkowanej syntazy tlenu azotu [161].

W odpowiedzi na stymulację przez interleukinę 1 aktywowane są również inne, poza wymienionymi wcześniej, kinazy, np. kinaza hsp27 i kinaza β -kazeiny [162], oraz kinazy tyrozynowe. Jak wspomniano wcześniej, interleukina 1 aktywuje również fosfatazy białkowe PP1 i PP2A. Rola fosfataz nie została dotychczas całkowicie wyjaśniona, jednak najprawdopodobniej pełnią one bardzo ważną rolę w regulacji odpowiedzi na IL-1. Mogą regulować aktywność wielu kinaz, a także czynników transkrypcyjnych. Są odpowiedzialne za powrót czynnika NF κ B do stanu spoczynkowego oraz za pełną aktywację czynnika c-Jun, do której wymagana jest m.in. defosforylacja specyficznych reszt aminokwasowych. Sposób działania regulacyjnego fosfataz PP2A i PP1 został przedstawiony powyżej.

9. ZAKOŃCZENIE

W ciągu ostatnich lat badań nad transdukcją sygnałów IL-1 udokumentowano szerokie spektrum aktywności tej ważnej cytokiny immunomodulacyjnej i prozapalnej. Zidentyfikowano skład kompleksu receptorowego i zbadano mechanizm jego działania, zidentyfikowano szereg kinaz, wtórnych przekaźników i czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w sygnalizację wewnątrzkomórkową. Dotychczas udało się dosyć dokładnie opisać szlaki prowadzące do aktywacji czynników transkrypcyjnych NF κ B i AP1, w które zaangażowane są z jednej strony liczne cząsteczki adaptorowe, nie wykazujące aktywności enzymatycznej, a z drugiej strony kinazy z grupy MAP tworzące charakterystyczne kaskady. Publikowane w ostatnich miesiącach prace komplikują jednak wydawałoby się już w miarę przejrzysty obraz, dokumentując odkrycia nowych białek, których rola polega najczęściej na regulacji i łączeniu ze sobą kilku szlaków. Wiele białek uczestniczących w sygnalizacji IL-1 nie zostało jeszcze przypisanych do konkretnych szlaków. Na skomplikowanej mapie wzajemnych połączeń i zależności widnieje wciąż wiele znaków zapytania. Identyfikacja interakcji pomiędzy szlakami sygnalizacji oraz znaczenia poszczególnych szlaków i interakcji między nimi w indukcji określonych efektów biologicznych IL-1 wymagać będzie jeszcze intensywnych badań.

PIŚMIENNICTWO

- [1] DINARELLO CA. The biological properties of interleukin-1. *Eur Cytokine Netw* 1994; **5**: 517–531.
- [2] MARCH CJ, MOSLEY B, LARSEN A, CERRETTI DP, BRAEDT G, PRICE V, GILLIS S, HENNEY CS, KRONHEIM SR, GRABSTEIN K, CONLON PJ, HOPP TP, COSMAN D. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* 1985; **315**: 641–647.
- [3] THORNBERRY NA, BULL HG, CALAYCAY JR, CHAPMAN KT, HOWARD AD, KOSTURA MJ, MILLER DK, MOLINEAUX SM, WEIDNER JR, AUNINS J, SCHMIDT JA, TOCCI M. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. *Nature* 1992; **356**: 768–774.
- [4] DRIPPS DJ, BRANDHUBER BJ, THOMPSON RC, EISENBERG SP. Interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist binds to the 80 kDa IL-1 receptor but does not initiate IL-1 signal transduction. *J Biol Chem* 1991; **266**: 10331–10336.
- [5] GRANOWITZ EV, CLARK BD, MANCILLA J, DINARELLO CA. Interleukin-1 receptor antagonist competitively inhibits the binding of interleukin-1 to the type II interleukin-1 receptor. *J Biol Chem* 1991; **266**: 14147–14150.
- [6] MUZIO M, POLENTARUTTI N, FACCHETTI F, PERI G, DONI A, SIRONI M, TRANSDICO P, SALMONA M, INTRONA M, MANTOVANI A. Characterization of type II intracellular IL-1 receptor antagonist (IL-1ra3): a depot IL-1ra. *Eur J Immunol* 1999; **29**: 781–788.
- [7] SMITH DE, RENSCHAW BR, KETCHEM RR, KUBIN M, GARKA KE, SIMS JE. Four new members expand the interleukin 1 superfamily. *J Biol Chem* 2000; **275**: 1169–1175.
- [8] KUMAR S, MCDONNELL PC, LEHR R, TIERNEY L, TZIMAS MN, GRISWOLD DE, CAPPER EA, TAL-SINGER R, WELLS GI, DOYLE ML, YOUNG PR. Identification and initial characterization of four novel members of the interleukin 1 family. *J Biol Chem* 2000; **275**: 10308–10314.
- [9] DOWER SK, KROMHEIM SR, MARCH CJ, CONLON PJ, HOPP TP, GILLIS S, URDAL DL. Detection and characterization of high affinity plasma membrane receptors for human interleukin 1. *J Exp Med* 1985; **162**: 501.
- [10] HORUK R, HUANG JJ, COVINGTON M, NEWTON RC. A biochemical and kinetic analysis of the interleukin 1 receptor. *J Biol Chem* 1987; **262**: 16275–16278.
- [11] DAYER JM, BURGER D. Interleukin-1, tumor necrosis factor and their specific inhibitors. *Eur Cytokine Network* 1994; **5**: 563–572.
- [12] COLOTTA F, RE F, MUZIO M, BERTINI R, POLENTARUTTI N, SIRONI M, SIMS JE, MANTOVANI A. Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science* 1993; **261**: 472–475.
- [13] COLOTTA F, SACCANI S, GIRI JG, DOWER SK, SIMS JE, INTRONA M, MANTOVANI A. Regulated expression and release of the IL-1 decoy receptor in human mononuclear phagocytes. *J Immunol* 1996; **156**: 2534–2541.
- [14] ORLANDO S, SIRONI M, BIANCHI G, DRUMMOND AH, BORASCHI D, YABES D, COLOTTA F, MANTOVANI A. Role of metalloproteinases in the release of the IL-1 type II decoy receptor. *J Biol Chem* 1997; **272**: 31763–31769.
- [15] SIMS JE, MARCH CJ, COSMAN D, WIDNER MB, MACDONALD HR, MCMAHAN CJ, GRUBIN CE, JACKSON JL, CALL SM, FRIEND D, ALPERT AR, GILLIS S, URDAL DL, DOWER SK. cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* 1988; **241**: 585–589.

- [16] DOWER SK, KRONHEIM SR, HOPP TP, CANTRELL M, DEELEY M, GILLIS S, HENNEY CS, URDAL DL. The cell surface receptors for interleukin-1 α and interleukin-1 β are identical. *Nature* 1986; **324**: 266–268.
- [17] MARTIN MU, FALK W. The interleukin-1 receptor complex and interleukin-1 signal transduction. *Eur Cytokine Network* 1997; **8**:5–17.
- [18] SLACK J, MCMAHAN CJ, WAUGH S, SCHOOLEY K, SPRIGGS MK, SIMS JE, DOWER SK. Independent binding of interleukin-1 α and interleukin-1 β to type I and type II interleukin-1 receptors. *J Biol Chem* 1993; **268**: 2513–2524.
- [19] SIMS JE, DOWER SK. Interleukin-1 receptors. *Eur Cytokine Netw* 1994; **5**: 539–546.
- [20] GREENFEDER SA, NUNES P, KWEE L, LABOW M, CHIZZONITE RA, JU G. Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J Biol Chem* 1995; **270**: 13757–13765.
- [21] TORIGOE K, USHIO S, OKURA T, KOBAYASHI S, TANIAI M, KUNIKATA T, MURAKAMI T, SANOU O, KOJIMA H, FUJII M, OHTA T, IKEDA M, IKEGAMI H, KURIMOTO M. Purification and characterization of the human interleukin-18 receptor. *J Biol Chem* 1998; **272**: 25737–25742.
- [22] BORN TL, THOMASSEN E, BIRD TA, SIMS JE. Cloning of a novel receptor subunit, AcPL, required for interleukin-18 signaling. *J Biol Chem* 1998; **273**: 29445–29450.
- [23] LOVENBERG TW, CROWE PD, LIU C, CHALMERS DT, LIU XJ, LIAW C, CLEVINGER W, OLTERS DORF T, DE SOUZA EB, MAKI RA. Cloning of a cDNA encoding a novel interleukin-1 receptor related protein (IL-Rrp2). *J Neuroimmunol* 1996; **70**: 113–122.
- [24] MITCHAM JL, PARNET P, BONNERT TP, GARKA KE, GERHART MJ, SLACK JL, GAYLE MA, DOWER SK, SIMS JE. T1/ST2 signaling establishes it as a member of an expanding interleukin-1 receptor family. *J Biol Chem* 1996; **271**: 5777–5783.
- [25] THOMASSEN E, BLAIR RR, SIMS JE. Identification and characterization of SIGIRR, a molecule representing a novel subtype of the IL-1R superfamily. *Cytokine* 1999; **11**: 389–399.
- [26] BORN TL, SMITH DE, GARKA KE, RENSHAW BR, BERTLES JS, SIMS JE. Identification and characterization of two members of a novel class of the IL-1R family. *J Biol Chem* 2000; **275**: .
- [27] ROCK FL, HARDIMAN G, TIMANS JC, KASTELEIN R, BAZAN FJ. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 588–562.
- [28] HASHIMOTO C, HUDSON KL, ANDERSON KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988; **52**: 269–279.
- [29] WILLIAMS MJ, RODRIGUEZ A, KIMBRELL DA, ELDON ED. The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in *Drosophila* host defense. *EMBO J* 1997; **16**: 6120–6130.
- [30] LUO C, ZHENG L. Independent evolution of Toll and related genes in insects and mammals. *Immunogenetics* 2000; **51**: 92–98.
- [31] MEDZHITOV R, PRESTON-HURLBURT P, JANEWAY CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; **388**: 394–397.
- [32] TAKEUCHI O, KAWAI T, SANJO H, COPELAND NG, GILBERT DJ, JENKINS NA, TAKEDA K, AKIRA S. TLR6: a novel member of an expanding Toll-like receptor family. *Gene (Amst)* 1999; **231**: 59–65.
- [33] MIYAKE K, YAMASHITA Y, OGATA M, SUDO T, KIMOTO M. RP105, a novel B Cell surface molecule implicated in B cell activation, is a member of the leucine-rich repeat protein family. *J Immunol* 1995; **154**: 3333–3340.
- [34] LORD KA, HOFFMAN-LIEBERMANN R, LIEBERMANN DA. Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL-6. *Oncogene* 1990; **5**: 1095.

- [35] HULTMARK D. Macrophage differentiation marker MyD88 is a member of the Toll/IL-1 receptor family. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **199**: 144–146.
- [36] WHITHAM S, DINESH-KUMAR SP, CHOI D, HEHL R, CORR C, BAKER B. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to Toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* 1994; **78**: 1101.
- [37] PARKER JE, COLEMAN MJ, SZABO V, FROST LN, SCHMIDT R, VAN DER BIEZEN EA, MOORES T, DEAN C, DANIELS MJ, JONES JD: The *Arabidopsis* downy mildew resistance gene RPP5 shares similarity to the Toll and interleukin-1 receptors with N and L6. *Plant Cell* 1997; **9**: 879–894.
- [38] LAWRENCE GJ, FINNEGAN EJ, AYLIFFE MA, ELLIS JG. The L6 gene for flax resistance is related to the *Arabidopsis* bacterial resistance gene RPS2 and the tobacco viral resistance gene N. *Plant Cell* 1995; **7**: 1195–1206.
- [39] ALCAMI A, SMITH GL. A soluble receptor for interleukin-1 beta encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of virus modulation of the host response to infection. *Cell* 1992; **71**: 153–167.
- [40] KOPP EB, MEDZHITOV R. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1999; **11**: 13–18.
- [41] YANG RB, MARK MR, GRAY A, HUANG A, XIE MH, ZHANG M, GODDARD A, WOOD WI, GURNEY AL, GODOWSKI PJ. *Nature* 1998; **395**: 284–288.
- [42] UNDERHILL DM, OZINSKY A, HAJJAR AM, STEVENS A, WILSON CB, BASSETTI M, ADEREM A. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 1999; **401**: 811–815.
- [43] LEMAITRE B, NICOLAS E, MICHAUT L, REICHHART JM, HOFFMANN JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; **86**: 973–983.
- [44] ELDON E, KOOYER S, DEVELYN D, DUMAN M, LAWINGER P, BOTAS J, BELLEN H. The *Drosophila* 18 wheeler is required for morphogenesis and has striking similarities to Toll. *Development* 1994; **120**: 885–899.
- [45] WESCHE H, KORHERR C, KRACHT M, FALK W, RESCH K, MARTIN MU. The interleukin-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) is essential for IL-1-induced activation of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) and stress-activated protein kinases (SAP kinases). *J Biol Chem* 1997; **272**: 7727–7731.
- [46] GUO C, DOWER SK, HOLOWKA D, BAIRD B. Fluorescence resonance energy transfer reveals interleukin (IL)-1-dependent aggregation of IL-1 type I receptors that correlates with receptor activation. *J Biol Chem* 1995; **270**: 27562–27568.
- [47] CULLIMAN EB, KWEE L, NUNES P, SHUSTER DJ, JU G, MCINTYRE KW, CHIZZONITE RA, LABOW MA. IL-1 receptor accessory protein is an essential component of the IL-1 receptor. *J Immunol* 1998; **161**: 5614–5620.
- [48] LEUNG K, BETTS JC, XU L, NABEL GJ. The cytoplasmic domain of the interleukin-1 receptor is required for nuclear factor- κ B signal transduction. *J Biol Chem* 1994; **269**: 1579–82.
- [49] SLACK JL, SCHOOLEY K, BONNERT TP, MITCHAM JL, QWARSTROM EE, SIMS JE, DOWER SK. Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *J Biol Chem* 2000; **275**: 4670–4678.
- [50] LANG D, KNOP J, WESCHE H, RAFFETSEDER U, KURRLE R, BORASCHI D, MARTIN M. The type II IL-1 receptor interacts with the IL-1 receptor accessory protein: A novel mechanism of regulation of IL-1 responsiveness. *J Immunol* 1998; **161**: 6871–6877.
- [51] WESCHE H, HENZEL WJ, SHILLINGLAW W, LIS, CAO Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 1997; **7**: 837–847.
- [52] MUZIO M, NI J, FENG P, DIXIT VM. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* 1997; **278**: 1612–1615.

- [53] HUANG J, GAO X, LIS, CAO Z. Recruitment of IRAK to the IL-1 receptor complex requires IL-1 receptor accessory protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 12829–12832.
- [54] ITOH N, NAGATA S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* 1993; **268**: 10932–10937.
- [55] CAO Z, HENZEL WJ, GAO X. IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science* 1996; **271**: 1128–1131.
- [56] LI X, COMMANE M, BURNS C, VITHALANI K, CAO Z, STARK GR. Mutant cells that do not respond to interleukin-1 (IL-1) reveal a novel role for IL-1 receptor-associated kinase. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 4643–4652.
- [57] KNOP J, MARTIN M. Effects of IL-1 receptor-associated kinase (IRAK) expression on IL-1 signaling are independent of its kinase activity. *FEBS Lett* 1999; **448**: 81–85.
- [58] VIG E, GREEN M, LIU Y, DONNER DB, MUKAIDA N, GOEBL MG, HARRINGTON MA. Modulation of tumor necrosis factor and interleukin1-dependent NF κ B activity by mPLK/IRAK. *J Biol Chem* 1999; **274**:13077–13084.
- [59] WESCHE H, GAO X, LI X, KIRSCHNING CJ, STARK GR, CAO Z. IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin1 receptor-associated kinase (IRAK) family. *J Biol Chem* 1999; **274**: 19403–19410.
- [60] KANAKARAJ P, SCHAFER P, CAVENDER DE, WU Y, NGO K, GREALISH PF, WADSWORTH SA, PETERSON PA, SIEKIERKA JJ, HARRIS CA, FUNG-LEUNG WP. Interleukin (IL)-1 receptor-associated kinase (IRAK) requirement for optimal induction of multiple IL-1 signaling pathways and IL-6 production. *J Exp Med* 1998; **187**:2073–2079.
- [61] MUZIO M, NATOLI G, SACCANI S, LEVRERO M, MANTOVANI A. The human Toll signaling pathway: divergence of nuclear factor κ B and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF 6). *J Exp Med* 1998; **187**: 2097–2101.
- [62] THOMAS JA, ALLEN JL, TSEN M, DUBNICOFF T, DANA O J, LIAO X C, CAO Z, WASSERMAN SA. Impaired cytokine signaling in mice lacking the IL-1 receptor-associated kinase. *J Immunol* 1999; **163**: 978–984.
- [63] ROTHWALF DM, KARIN M. The NF κ B activation pathway: A paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Science's STKE* 1999; 26.10.1999 Rev1.
- [64] KNOP J, WESCHE H, LANG D, MARTIN MU. Effects of overexpression of IL-1 receptor-associated kinase on NF κ B activation, IL2 production and stress-activated protein kinases in the murine T cell line EL4. *Eur J Immunol* 1998; **28**: 3100–3109.
- [65] CAO Z, XIONG J, TAKEUCHI M, KURAMA T, GOEDDEL DV. TRAF6 Is a Signal Transducer for Interleukin-1. *Nature* 1996; **383**: 443–446.
- [66] ROTHE M, WONG SC, HENZEL WJ, GOEDDEL DV. A Novel Family of Putative Signal Transducers Associated with the Cytoplasmic Domain of the 75 kDa Tumor Necrosis Factor Receptor. *Cell* 1994; **78**: 681–692.
- [67] ROTHE M, SARMA V, DIXIT VM, GOEDDEL DV. TRAF-mediated activation of NF κ B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* 1995; **269**:1424–1427.
- [68] JOBIN C, HOLT L, BRADHAM CA, STREETZ K, BRENNER DA, SARTOR RB. TNF receptor-associated factor-2 is involved in both IL-1 β and TNF α signaling cascades leading to NF κ B activation and IL8 expression in human intestinal epithelial cells. *J Immunol* 1999; **162**: 4447–4454.
- [69] BAUD V, LIU ZG, BENNETT B, SUZUKI N, XIA Y, KARIN M. Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes Dev* 1999; **13**: 1297–1308.
- [70] MALININ, NL, BOLDIN, MP, KOVALENKO, AV, WALLACH D. MAP3K-related kinase involved in NF κ B induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 1997; **385**: 540–544.

- [71] NINOMIYA-TSUJI J, KISHIMOTO K, HIYAMA A, INOUE J, CAO Z, MATSUMOTO K. The kinase TAK1 can activate the NIK-I κ B as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 1999; **398**: 252–256.
- [72] KISHIMOTO K, MATSUMOTO K, NINOMIYA-TSUJI J. TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase is activated by autophosphorylation within its activation loop. *J Biol Chem* 2000; **275**: 7359–7364.
- [73] AWANE M, ANDRES PG, LI DJ, REINECKER HC. NFB-inducing kinase is a common mediator of IL-17-, TNF- and IL-1-induced chemokine promoter activation in intestinal epithelial cells. *J Immunol* 1999; **162**: 5337–5344.
- [74] REGNIER CH, SONG HY, GAO X, GOEDEL DV, CAO Z, ROTHE M. Identification and characterization of an IB kinase. *Cell* 1997; **90**: 373–383.
- [75] WORONICZ JD, GAO X, CAO Z, ROTHE M, GOEDEL DV. I κ B kinase-: NF κ B activation and complex formation with I κ B kinase- α and NIK. *Science* 1997; **278**: 866–869.
- [76] MERCURIO F, ZHU H, MURRAY BW, SHEVCHENKO A, BENNET BL, LI J, YOUNG DB, BARBOSA M, MANN M, MANNING A, RAO A. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF κ B activation. *Science* 1997; **278**: 860–866.
- [77] LING L, CAO Z, GOEDEL DV. NF κ B-inducing kinase activates IKK- α by phosphorylation of Ser-176. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 3792–3797.
- [78] ROTHWARFDM, ZANDIE, NATOLIG, KARIN M. IKK- γ is an essential regulatory subunit if the I κ B kinase complex. *Nature* 1998; **395**: 297–300.
- [79] MERCURIO F, MURRAY BW, SHEVCHENKO A, BENNET BL, YOUNG DB, LI JW, PASCUAL G, MOTIWALA A, ZHU H, MANN M, MANNING AM. I κ B kinase (IKK)-associated protein 1, a common component of the heterogeneous IKK complex. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 1526–1538.
- [80] COHEN L, HENZEL WJ, BAEUERLE PA. IKAP is a scaffold protein of the I κ B kinase complex. *Nature* 1998; **395**: 292–296.
- [81] SHIMADA T, KAWAI T, TAKEDA K, MATSUMOTO M, INOUE J-I, TATSUMI Y, KANAMARU A, AKIRA S. IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to I κ B kinases. *Intl Immunol* 1999; **11**: 1357–1362.
- [82] POMERANTZ JL, BALTIMORE D. NF κ B activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. *EMBO J* 1999; **18**: 6694–6704.
- [83] TOJIMA Y, FUJIMOTO A, DELHASE M, CHEN Y, HATAKEYAMA S, NAKAYAMA K, KANEKO Y, NIMURA Y, MOTOYAMA N, IKEDA K, KARIN M, NAKANISHI M: NAK is an I κ B kinase-activating kinase. *Nature* 2000; **404**: 778–782.
- [84] REDDY SA, HUANG JA, LIAO WS. Phosphatidylinositol 3-kinase in interleukin 1 signaling. *J Biol Chem* 1997; **272**: 29167–29173.
- [85] AURON PE. The interleukin 1 receptor: ligand interactions and signal transduction. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998; **9**: 221–237.
- [86] OZES ON, MAYO LD, GUSTIN JA, PFEFFER SR, PFEFFER LM, DONNER DB. NF κ B activation by tumor necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 1999; **401**: 82–85.
- [87] SIZEMORE N, LEUNG S, STARK GR. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in response to interleukin-1 leads to phosphorylation and activation of the NF κ B p65/RelA subunit. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 4798–4805.
- [88] MADGE LA, POBER JS. A PI-3 kinase/Akt pathway, activated by TNF or IL-1 inhibits apoptosis but does not activate NF κ B in human endothelial cells. *J Biol Chem* 2000; **275**: 15458–15465.
- [89] LEE FS, PETERS RT, DANG LC, MANIATIS T. MEKK1 activates both I κ B kinase α and I κ B kinase β . *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 9319–9324.
- [90] NAKANO H, SHIND M, SAKON S, NISHINAKA S, MIHARA M, YAGITA H, OKUMURA K. Differential regulation of I κ B kinase α and β by two upstream kinases, NF κ B-inducing kinase

- and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 3537–3542.
- [91] JAATTELA M, MOURITZEN H, ELLING F, BASTHOLM L. A20 zinc finger protein inhibits TNF and IL-1 signaling. *J Immunol* 1996; **156**: 1166–1173.
- [92] HEYNINCK K, BEYAERT R. The cytokine-inducible zinc finger protein A20 inhibits IL-1-induced NF κ B activation at the level of TRAF6. *FEBS Lett* 1999; **442**: 147–150.
- [93] HEYNINCK K, DE VALCK D, VAN DEN BERGHE W, VAN CRIEKINGE W, CONTRE-RAS R, FIERIS W, HEAGEMAN G, BEYAERT R. The zinc finger protein A20 inhibits TNF-induced NF κ B-dependent gene expression by interfering with an RIP- or TRAF2-mediated transactivation signal and directly binds to a novel NF κ B-inhibiting protein ABIN. *J Cell Biol* 1999; **145**: 1471–1482.
- [94] CARPENTIER I, BEYAERT R: TRAF1 is a TNF inducible regulator of NF κ B activation. *FEBS Lett* 1999; **460**: 246–250.
- [95] SCHWENZER R, SIEMIENSKI K, LIPTAY S, SCHUBERT G, PETERS N, SCHEURICH P, SCHMID RM, WAJANT H. The human tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 1 gene (TRAF1) is up-regulated by cytokines of the TNF ligand family and modulates TNF-induced activation of NF κ B and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 1999; **274**: 19368–19374.
- [96] MINDEN A, KARIN M. Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochim Biophys Acta* 1997; **1333**: F85–F104.
- [97] PULVERER BJ, KYRIAKIS JM, AVRUCH J, NIKOLAKAKI E, WOODGETT JR. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* 1991; **353**: 670–674.
- [98] KRACHT M, TRUONG O, TOTTY NF, SHIROO M, SAKLATVALA J. Interleukin 1 α activates two forms of p54 α mitogen-activated protein kinase in rabbit liver. *J Exp Med* 1994; **180**: 2017–2025.
- [99] WELSH N. Interleukin-1 β -induced ceramide and diacylglycerol generation may lead to activation of the c-Jun NH $_2$ -terminal kinase and the transcription factor ATF2 in the insulin-producing cell line RINm5F. *J Biol Chem* 1996; **271**: 8307–8312.
- [100] FINCH A, HOLLAND P, COOPER J, SAKLATVALA J, KRACHT M. Selective activation of JNK/SAPK by interleukin 1 in rabbit liver is mediated by MKK7. *FEBS-Lett* 1997; **418**: 144–148.
- [101] KRAUSE A, HOLTSMANN H, EICKEMEIER S, WINZEN R, SZAMEL M, RESCH K, SAKLATVALA J, KRACHT M. Stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase is required for interleukin (IL)-1-induced IL-6 and IL- gene expression in the human epidermal carcinoma cell line KB. *J Biol Chem* 1998; **273**: 23681–23689.
- [102] WHITMARSH AJ, YANG SH, SU MS, SHARROCKS AD, DAVIS RJ. Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complex factors. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 2360–2371.
- [103] MATTHEWS JS, ONEILL LAJ. Distinct roles for p42/p44 and p38 mitogen-activated protein kinases in the induction of IL-2 by IL-1. *Cytokine* 1999; **11**: 643–655.
- [104] GUAN Z, BUCKMAN SY, MILLER BW, SPRINGER LD, MORRISON AR. Interleukin-1 β -induced cyclooxygenase-2 expression requires activation of both c-Jun NH $_2$ -terminal kinase and p38 MAPK signal pathways in rat mesangial cells. *J Biol Chem* 1998; **273**: 28670–28676.
- [105] LA POINTE MC, ISENOVIC E. Interleukin-1 β regulation of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 involves the p42/p44 and p38 MAPK signaling pathways in cardiac myocytes. *Hypertension* 1999; **33**: 276–282.
- [106] LEE JC, LAYDON JT, MCDONNELL PC, GALLAGHER TF, KUMAR S, GREEN D, MCNULTY D, BLUMENTHAL MJ, HEYS JR, LANDVATTER SW, STRICKLER JE, MCLAUGHLIN MM, SIEMENS IR, FISHER S, LIVI G, WHITE J, ADAMS JL, YOUNG PR. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 1994; **372**: 739–746.

- [107] CUENDA A, DOROW DS. Differential activation of stress-activated protein kinase kinases SKK4/MKK7 and SKK1/MKK4 by the mixed-lineage kinase-2 and mitogen-activated protein kinase kinase (MKK) kinase-1. *Biochem J* 1998; **333**(Pt 1): 11–15.
- [108] GUPTA S, BARRETT T, WHITMARSH AJ, CAVANAGH J, SLUSS HK, DERIJARD B, DAVIS RJ. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J* 1996; **15**: 2760–2770.
- [109] YANG DD, KUAN CY, WHITMARSH AJ, RINCON M, ZHENG TS, DAVIS RJ, RAKIC P, FLAVELL RA. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the JNK3 gene. *Nature* 1997; **389**: 865–870.
- [110] YANG DD, CONZE D, WHITMARSH AJ, BARRETT T, DAVIS RJ, RINCON M, FLAVELL RA. Differentiation of CD4+ T cells requires MAP kinase JNK2. *Immunity* 1998; **9**: 575–585.
- [111] DONG C, YANG DD, WYSK M, WHITMARSH AJ, DAVIS RJ, FLAVELL RA. Defective T cell differentiation in the absence of JNK1. *Science* 1998; **282**: 2092–2095.
- [112] BIRD TA, KYRIAKIS JM, TYSHLER L, GAYLE M, MILNE A, VIRCA GD. Interleukin-1 activates p54 mitogen-activated protein (MAP) kinase/stress-activated protein kinase by a pathway that is independent of p21ras, Raf-1, and MAP kinase kinase. *J Biol Chem* 1994; **269**: 31836–31844.
- [113] BAGRODIA S, DERIJARD B, DAVIS RJ, CERIONE RA. Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 1995; **270**: 27995–27998.
- [114] ZHANG S, HAN J, SELLS MA, CHERNOFF J, KNAUS UG, ULEVITCH RJ, BOKOCH GM. Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J Biol Chem* 1995; **270**: 23934–23936.
- [115] YAN M, DAI T, DEAK JC, KYRIAKIS JM, ZON LI, WOODGETT JR. Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1. *Nature* 1994; **372**: 798–800.
- [116] HOLTSMANN H, WINZEN R, HOLLAND P, EICKEMEIER S, HOFFMANN E, WALLACH D, MALININ NL, COOPER JA, RESCH K, KRACHT M. Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 6742–6753.
- [117] BLANK JL, GERWINS P, ELLIOTT EM, SATHER S, JOHNSON GL. Molecular cloning of mitogen-activated protein/ERK kinase kinases (MEKK) 2 and 3. *J Biol Chem* 1996; **271**: 5361–5368.
- [118] WHITMARSH AJ, CAVANAGH J, TOURNIER C, YASUDA J, DAVIS R. A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science* 1998; **281**: 1671–1674.
- [119] ICHIJO H, NISHIDA E, IRIE K, TEN DIJKE PMS, MORIGUCHI T, TAKAGI M, MATSUMOTO K, MIYAZONO K, GOTOH Y. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/INK and p38 signaling pathways. *Science* 1997; **275**: 90–94.
- [120] LIN A, MINDEN A, MARTINETTO H, CLARET FX, LANGE-CARTER C, MERCURIO F, JOHNSON GL, KARIN M. Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2. *Science* 1995; **268**: 286–290.
- [121] NEMOTO S, DIDONATO JA, LIN A. Coordinate regulation of I κ B kinases by mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 and NF κ B-inducing kinase. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 7336–7343.
- [122] MERCURIO F, MANNING AM. Multiple signals converging on NF κ B. *Current Opinion Cell Biol* 1999; **11**: 226–232.
- [123] KOPP E, MEDZHITOV R, CAROTHERS J, XIAO C, DOUGLAS I, JANEWAY CA, GHOSH S. ECSIT is an evolutionarily conserved intermediate in the Toll/IL-1 signal transduction pathway. *Genes Dev* 1999; **13**: 2059–2071.

- [124] ZHAO Q, LEE FS. Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinases 2 and 3 activate nuclear factor- κ B through I κ B kinase- α and I κ B kinase- β . *J Biol Chem* 1999; **274**: 8355–8358.
- [125] MOCHIDA Y, TAKEDA K, SAITOH M., NISHITOH H, AMAGASA T, NINOMIYA-TSUJI J, MATSUMOTO K, ICHIJO H. ASK1 inhibits IL-1-induced NF- κ B activity through disruption of TRAF6-TAK1 interaction. *J Biol Chem* 2000; **275**: 32747–32752.
- [126] CUENDA A, ROUSE J, DOZA YN, MEIER R, COHEN P, GALLAGHER TF, YOUNG PR, LEE JC. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett.* 1995; **364**: 229–233.
- [127] GENG Y, VALBRACHT J, LOTZ M. Selective activation of the mitogen-activated protein kinase subgroups c-Jun NH₂ terminal kinase and p38 by IL-1 and TNF in human articular chondrocytes. *J Clin Invest* 1996; **98**: 2425–30.
- [128] RIDLEY SH, SARFIELD SJ, LEE JC, BIGG HF, CAWSTON TE, TAYLOR DJ, DEWITT DL, SAKLATVALA J. Actions of IL-1 are selectively controlled by p38 mitogen-activated protein kinase: regulation of prostaglandin H synthase-2, metalloproteinases, and IL-6 at different levels. *J Immunol* 1997; **158**: 3165–3173.
- [129] LO YY, LUO L, MCCULLOCH CA, CRUZ TF. Requirements of focal adhesions and calcium fluxes for interleukin-1-induced ERK kinase activation and c-fos expression in fibroblasts. *J Biol Chem* 1998; **273**: 7059–7065.
- [130] MIYAZAWA K, MORI A, MIYATA H, AKAHANE M, AJISAWA Y, OKUDAIRA H. Regulation of interleukin-1 β -induced interleukin-6 gene expression in human fibroblast-like synoviocytes by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1998; **273**: 24832–24838.
- [131] ROVIN BH, WILMER WA, DANNE M., DICKERSON JA, DIXON CL, LU L. The mitogen-activated protein kinase p38 is necessary for interleukin 1 β -induced monocyte chemoattractant protein 1 expression by human mesangial cells. *Cytokine* 1999; **11**: 118–126.
- [132] ALLEN M, SVENSON L, ROACH M, HAMBOR J, MCNEISH J, GABEL CA. Deficiency of the stress kinase p38 α results in embryonic lethality: characterization of the kinase dependence of stress responses of enzyme-deficient embryonic stem cells. *J Exp Med* 2000; **191**: 859–870.
- [133] MATSUMOTO K, HASHIMOTO S, GON Y, NAKAYAMA T, HORIE T. Proinflammatory cytokine-induced and chemical mediator-induced IL-8 expression in human bronchial epithelial cells through p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Allergy Clin Immunol* 1998; **101**: 825–831.
- [134] UCIECHOWSKI P, SAKLATVALA J, VON DER OHRE J, RESCH K, SZAMEL M, KRACHT M. Interleukin 1 activates jun N-terminal kinases JNK1 and JNK2 but not extracellular regulated MAP kinase (ERK) in human glomerular mesangial cells. *FEBS-Lett* 1996; **394**: 273–278.
- [135] BIRD TA, SLEATH PR, DEROOS PC, DOWER SK, VIRCA GD. Interleukin-1 represents a new modality for the activation of extracellular signal-regulated kinases/mitogen-activated protein-2 kinases. *J Biol Chem* 1991; **266**: 22661–22670.
- [136] GUY GR, CHUA SP, WONG NS, NG SB, TAN YH. Interleukin 1 and tumor necrosis factor activate common multiple protein kinases in human fibroblasts. *J Biol Chem* 1991; **266**: 14343–14352.
- [137] LARSEN CM, WADT KAW, JUHL LF, ANDERSEN HU, KARLSEN AE, SU MS-S, SEEDORFK, SHAPIROL, DINARELLO CA. Interleukin-1 β -induced rat pancreatic islet nitric oxide synthesis requires both the p38 and extracellular signal-regulated kinase-1/2 mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 1998; **273**: 15294–15300.
- [138] SINGH R, WANG B, SHIRVAIKAR A, KHAN S, KAMAT S, SCHELLING JR, KONIECZKOWSKI M, SEDOR JR. The IL-1 receptor and Rho directly associate to drive *Cell* activation in inflammation. *J Clin Invest* 1999; **103**: 1561–1570.

- [139] JEFFERIES CA, ONEILL LA. Rac1 regulates interleukin 1-induced nuclear factor κ B activation in an inhibitory protein κ B α -independent manner by enhancing the ability of the p65 subunit to transactivate gene expression. *J Biol Chem* 2000; **275**: 3114–3120.
- [140] BONIZZIGI G, PIETTE J, SCHOONBROODT S, MERVILLE MP, BOURS V. Role of the protein kinase C λ/τ isoform in nuclear factor- κ B activation by interleukin-1 β or tumor necrosis factor- α : cell type specificities. *Biochem Pharmacol* 1999; **57**: 713–720.
- [141] KUMAR A, MIDDLETON A, CHAMBERS TC, MEHTA KD. Differential roles of extracellular signal-regulated lipase-1/2 and p38MAPK in interleukin 1 β - and tumor necrosis factor α -induced low density lipoprotein receptor expression in HepG2 cells. *J Biol Chem* 1998; **273**:15742–15748.
- [142] MENGSHOL JA, VINCETI MP, COON CI, BARCHOWSKY A, BRINCKERHOFF CE. Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum* 2000; **43**: 801–811.
- [143] BONNY C, OBERSON A, STEINMANN M, SCHORDERET DF, NICOD P, WAEBER G. IB1 reduces cytokine-induced apoptosis of insulin-secreting cells. *J Biol Chem* 2000; **275**: 16466–16472.
- [144] FRESHNEY NW, RAWLISON L, GUESDON F, JONES E, COWLEY S, HSUAN J, SAKLATVALA J. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* 1994; **78**: 1039–1049.
- [145] APPEL A, KRACHT M, PETERSEN K, RESCH K, SZAMEL M. Interleukin-1 induced signalling: biphasic activation of mitogen-activated protein kinase kinase and mitogen-activated protein kinases in HeLa cells Involvement of phosphoprotein phosphatases. *Eur Cytokine Netw* 1996; **7**: 775–784.
- [146] GUY GR, PHILP R, TAN YH. Activation of protein kinases and the inactivation of protein phosphatase 2A in tumor necrosis factor and interleukin 1 signal transduction pathways. *Eur J Biochem* 1995; **229**: 503–511.
- [147] GREENE C, O'NEILL L. Interleukin-1 receptor-associated kinase and TRAF6 mediate the transcriptional regulation of interleukin-2 by interleukin-1 via NF κ B but unlike interleukin-1 are unable to stabilise interleukin-2 mRNA. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1451**: 109–121.
- [148] O'NEILL LA, BIRD TA, BEARING AJ, SAKLATVALA J. Interleukin-1 signal transduction. Increased GTP binding and hydrolysis in membranes of a murine thymoma line (EL4). *J Biol Chem* 1990; **265**: 3146.
- [149] CHEDID M, SHIRAKAWA F, NAYLOR P., MIZEL SB. Signal transduction pathway for IL-1: Involvement of a pertussis toxin-sensitive GTP-binding protein in the activation of adenylate cyclase. *J Immunol* 1989; **142**: 4301–4306.
- [150] ZHANG Y, LIN JX, VILCEK J. Enhancement of cAMP levels and protein kinase activity by tumor necrosis factor and interleukin-1 in human fibroblasts: Role in the induction of interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 6802–6805.
- [151] SHIRAKAWA F, YAMASHITA U, CHEDID M., MIZEL SB. Cyclic AMP – an intracellular second messenger for interleukin-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 8201–8205.
- [152] CHEDID M., YOZA BK, BROOKS J.W., MIZEL SB. Activation of AP-1 by IL-1 and phorbol esters in T cells. Role of protein kinases and protein phosphatases. *J Immunol* 1990; **147**: 867–873.
- [153] MATHIAS S, YOUNES A, KAN CC, ORLOW I, JOSEPH C, KOLESNICK RN. Activation of the sphingomyelin signaling pathway in intact EL4 cells and in a cell free system by IL-1 beta. *Science* 1993; **259**: 519–522.
- [154] DOBROWSKY RT, KAMIBAYASHI C, MUMBY MC, HANNUN YA. Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* 1993; **268**: 15523–15530.
- [155] RAINES MA, KOLESNICK RN, GOLDE DW. Sphingomyelinase and ceramide activate mitogen-activated protein kinase in myeloid HL-60 cells. *J Biol Chem* 1993; **268**: 14572–14575.

- [156] BALLOU LR, CHAO CP, HOLNESS MA, BARKER SC, RAGHOW R. Interleukin-1-mediated PGE₂ production and sphingomyelin metabolism. Evidence for the regulation of cyclooxygenase gene expression by sphingosine and ceramide. *J Biol Chem* 1992; **267**: 20044–20050.
- [157] RZYMKIEWICZ DM, TETSUKA T, IKEN DD, SRINIVASTAVA, MORRISON AR. Interleukin-1 β activates protein kinase C ζ in renal mesangial cells. Potential role in prostaglandin E₂ up-regulation. *J Biol Chem* 1996; **271**: 17241–17246.
- [158] SOUTHERN C, SCHUSTER D, GREEN IC. Inhibition of insulin secretion by interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α via an L-arginine-dependent nitric oxide generating mechanism. *FEBS Lett.* 1990; **276**: 42–44.
- [159] BERGMANN L, KRONCKE KD, SUSCHEK C, KOLB H, KOLB-BACHEFERN V. Cytotoxic action of IL-1 β against pancreatic islets is mediated via nitric oxide formation and is inhibited by NG-monomethyl-L-arginine. *FEBS Lett.* 1992; **299**: 103–106.
- [160] CETKOVIC-CVRLJE M, SANDLER S, EIZIRIK DL. Nicotinamide and dexamethasone inhibit interleukin-1 β -induced nitric oxide production by RINm7F cells without decreasing messenger RNA expression for nitric oxide synthase. *Endocrinology* 1993; **133**: 1739–1743.
- [161] BREDT DS, FERRIS SD, SNYDER SH. Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *J Biol Chem* 1992; **267**: 10976–10981.
- [162] GUESDON F, FRESHNEY N, WALLER RJ, RAWLISON L, SAKLATVALA J. Interleukin 1 and tumor necrosis factor stimulate two novel protein kinases that phosphorylate the heat shock protein hsp27 and β -casein. *J Biol Chem* 1993; **268**: 4236–4243.

Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska

Otrzymano: 06.11.2000 r.

Przyjęto: 30.12.2000 r.

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

e-mail: jbigd@amg.gda.pl.

WYKRYWANIE WEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH CYTOKIN METODĄ CYTOMETRII PRZEPLYWOWEJ – ZASTOSOWANIE I PROBLEMY

DETECTION OF INTRACELLULAR CYTOKINES BY FLOW CYTOMETRY: APPLICATION AND PROBLEMS

Nadzieja DRELA

Zakład Immunologii, Uniwersytet Warszawski

Streszczenie: Cytokiny są białkami regulującymi rozwój i czas trwania prawidłowej i patologicznej odpowiedzi immunologicznej. Odpowiedzialne są za przekazywanie informacji pomiędzy komórkami układu odpornościowego oraz zapewniają komunikację między układem odpornościowym a nerwowym i hormonalnym. Uczestniczą w odpowiedzi immunologicznej, biorą udział w hematopoizie, apoptozie, zapaleniu, utrzymaniu homeostazy organizmu. Określone populacje limfocytów charakteryzują się właściwym dla nich spektrum produkowanych cytokin. W stanach chorobowych ich synteza może być zaburzona. Analiza ekspresji cytokin dostarcza informacji na temat stanu funkcjonalnego układu odpornościowego. Cytometria przepływowa jest metodą z wyboru umożliwiającą wieloparametryczną analizę pojedynczych komórek. Antygeny wyznakowane specyficznymi przeciwciałami sprzężonymi z fluorochromami mogą być wykrywane na powierzchni oraz wewnątrz komórek po utrwaleniu i permeabilizacji ich błony. Metoda ta daje duże możliwości badawcze oraz stwarza szereg problemów.

(Postępy Biologii Komórki 2001; 28: 129–146)

Słowa kluczowe: cytometria przepływowa, limfocyty, cytokiny wewnątrzkomórkowe

Summary: Cytokines are proteins regulating the development and duration of normal and pathological immune response. They are responsible for the transduction of informations among immune system cells and are involved in the communication between the immune and neuroendocrine systems. Cytokines play roles in the immune response, hematopoiesis, apoptosis, inflammation and homeostasis. Distinct lymphocyte populations are characterized by the spectrum of synthesized cytokines and their production may be altered in diseases. Analysis of cytokines expression may be helpful in the evaluation of functional status of the immune system. Flow cytometry is the method of choice for the analysis of single cells. Antigens can be detected with specific fluorochrome-labeled antibodies on the cell surface and within the cells, after fixation and permeabilization of the cell membrane. This method offers a wide range of research possibilities, but also creates problems.

(Advances in Cell Biology 2001; 28: 129–146)

Keywords: lymphocyte, intracellular cytokines, flow cytometry

WPROWADZENIE

Prawidłowe funkcjonowanie układu odpornościowego i jego skuteczność w walce z patogenami zależy od właściwego rozróżnienia cząsteczek obcych od własnych i odpowiedniej komunikacji pomiędzy komórkami odpowiedzialnymi za rozwój odpowiedzi immunologicznej. Nośnikami informacji pomiędzy komórkami układu odpornościowego są cytokiny, produkowane i wydzielane głównie przez limfocyty T, limfocyty B, makrofagi, komórki NK, komórki stromalne szpiku kostnego i grasicy. Cytokiny są heterogenną grupą białek, najczęściej glikozylowanych, zwykle o masie cząsteczkowej poniżej 30 kDa. Produkowane są głównie lokalnie i przejściowo, działają w sposób autokryny i parakryny, rzadziej endokryny. Wykazują dużą aktywność biologiczną, działają na komórki docelowe w stężeniach femtomolarnych (10^{-15} M) w wyniku interakcji z powierzchniowymi receptorami o wysokim powinowactwie, specyficznymi dla określonej cytokiny lub grupy cytokin. Cytokiny pełnią zasadniczą rolę w rozwoju komórek układu odpornościowego (hematopoeza, rozwój tymocytów w grasicy), w regulacji odpowiedzi immunologicznej na różnych jej etapach. Regulują intensywność i czas odpowiedzi immunologicznej poprzez stymulację lub hamowanie aktywacji, proliferacji i różnicowania oraz funkcji efektorowych komórek układu odpornościowego. Związanie określonej cytokiny przez receptor komórkowy, stymuluje ekspresję receptorów dla cytokin oraz syntezę innych cytokin działających z kolei na inne komórki docelowe. W konsekwencji dochodzi do aktywacji sieci współpracujących ze sobą komórek oraz sieci oddziałujących pomiędzy sobą cytokin (synergizm, antagonizm, redundancja). Cytokiny regulują rozwój i przebieg prawidłowej i patologicznej odpowiedzi immunologicznej. Wiele z nich, oprócz funkcji regulacyjnej, pełni też bezpośrednią funkcję efektorową. Wszystkie znane cytokiny charakteryzują się aktywnością plejotropową. Ta sama cytokina może być produkowana przez wiele różnych typów komórek, a receptory dla określonej cytokiny mogą występować na wielu różnych komórkach [27].

Jakie są główne przyczyny, dla których analiza produkowanych przez komórki cytokin dostarcza informacji na temat funkcjonowania układu odpornościowego? Procesy przebiegające z udziałem cytokin to między innymi:

- aktywacja limfocytów T [1],
- aktywacja limfocytów B [28],
- aktywacja makrofagów [60],
- wytwarzanie i dojrzewanie komórek krwi (hematopoeza) [5, 12, 53],
- dojrzewanie komórek w centralnych narządach limfatycznych poza szpikiem [3, 13, 34],
- bezpośrednia i pośrednia aktywność cytotoksyczna [7],
- odpowiedź zapalna [48, 58].

Głównymi komórkami regulującymi funkcje efektorowe układu odpornościowego są limfocyty pomocnicze Th CD4⁺. W 1986 roku Mosmann i wsp. [40] wyróżnili u myszy dwie subpopulacje limfocytów Th CD4⁺ różniące się spektrum wydzielanych cytokin. Kilka lat później, w 1991 roku, analogicznego rozróżnienia w populacji limfocytów Th człowieka dokonali del Prete i wsp. Wyodrębnione dwie subpopulacje tych limfocytów: Th1 i Th2 różnią się nie tylko zakresem wydzielanych cytokin, ale również funkcją [40]. Limfocyty Th1 produkujące głównie IL-2 i IFN- γ wspomagają odpowiedź typu komórkowego, biorą udział w reakcjach nadwrażliwości typu późnego, w aktywacji funkcji cytotoksycznych i zapalnych. Limfocyty Th2, produkujące głównie IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, a nie produkujące IL-2 i IFN- γ , wspomagają odpowiedź typu humoralnego, w szczególności syntezę IgE oraz wzmagają proliferację i funkcje eozynofili. Limfocyty T wytwarzają cytokiny w odpowiedzi na obce antygeny. Spektrum produkowanych cytokin decyduje o sposobie regulacji odpowiedzi immunologicznej, o typie odpowiedzi (komórkowa, humoralna) oraz określa poziom odporności lub wrażliwości na określoną chorobę. Limfocyty Th1 i Th2 wzajemnie regulują swoją aktywność poprzez wydzielane cytokiny: IFN- γ hamuje proliferację limfocytów Th2, a IL-10 hamuje syntezę cytokin w limfocytach Th1. Ciągłe nie jest jasne, w jaki sposób układ odpornościowy dokonuje wyboru właściwej odpowiedzi na określony patogen lub grupę patogenów oraz jakie mechanizmy uczestniczą w „odczytaniu” właściwości patogenu i „przetłumaczeniu” tej informacji na język cytokin lub sygnałów indukujących aktywację funkcji efektorowych określonej subpopulacji limfocytów Th. Istnieją dowody, iż określone zestawy cytokin odpowiedzialne są za rozwój odporności na szereg czynników zakaźnych. Z kolei zaburzenie aktywacji jednej z subpopulacji limfocytów Th może stanowić przyczynę zwiększonej wrażliwości na patogen lub pogorszenia stanu chorego. Zatem analiza cytokin produkowanych przez limfocyty Th dostarcza informacji o poziomie aktywacji limfocytów, możliwości pobudzania określonych funkcji efektorowych układu odpornościowego w przebiegu chorób infekcyjnych, nowotworowych, autoimmunizacyjnych i alergicznych.

Oprócz ściśle zdefiniowanych subpopulacji limfocytów Th1 i Th2 istnieją inne subpopulacje limfocytów produkujących określone zestawy cytokin: Th0 produkujące cytokiny charakterystyczne dla Th1 i Th2, Th3 produkujące w dużych ilościach TGF- β . Synteza określonych cytokin nie wydaje się przypadkowa. Zależy z pewnością od rodzaju antygeny, bądź ogólnie stymulatora aktywującego komórki. Nie wielkie jakościowe i ilościowe różnice w ekspresji cytokin mogą być charakterystyczne dla określonego fenotypu komórek produkujących, stadium dojrzewania lub mogą wyrażać przejściową odpowiedź na warunki stymulacji. W populacji limfocytów T CD8⁺ również wyróżniono dwie subpopulacje, Tc1 i Tc2 (zarówno u ludzi, jak i myszy), charakteryzujące się podobnym spektrum produkowanych cytokin co Th1 i Th2. Badany jest udział tych limfocytów w przebiegu różnych chorób, we wspomaganiu odpowiedzi limfocytów B [40].

Układ odpornościowy oprócz funkcji nadzorczej i obronnej, pełni ważną rolę w utrzymaniu homeostazy w organizmie. Współpracuje on z innymi układami odpowiedzialnymi za homeostazę: nerwowym i hormonalnym. Układ odpornościowy wysyła informacje do obu układów za pośrednictwem cytokin i hormonów peptydowych [2, 8, 61]. Niektóre cytokiny, IL-1, IL-6, TNF są aktywnie transportowane przez barierę krew-mózg. Komórki mózgu wykazują ekspresję receptorów dla tych cytokin umożliwiając modulacje przez cytokiny syntezy ACTH, GH, prolaktyny, LH, TRH. Modulowanie syntezy ACTH wpływa na poziom glikokortykosteroidów, co w wypadku wzrostu ich syntezy prowadzi do zahamowania reakcji odpornościowych. Zatem badanie produkcji syntezy w układach doświadczalnych bądź w przebiegu chorób dostarcza informacji o wzajemnych oddziaływaniach pomiędzy układem odpornościowym, nerwowym i hormonalnym. Umożliwia ocenę aktywności układu odpornościowego pod wpływem stresu, w zależności od płci i wieku. Kolejny obszar aktywności biologicznej cytokin to modulacja szeregu funkcji fizjologicznych, takich jak: ciąża i starzenie się [11, 17, 44].

Większość znanych cytokin produkowana jest przez wiele różnych typów komórek. Ponadto pojedyncza komórka rzadko, o ile w ogóle, produkuje jedną cytokinę, zwykle produkuje określone spektrum cytokin. Ważny jest zatem fenotyp komórki produkującej cytokiny, jak i zakres cytokin produkowanych przez pojedynczą komórkę. Produkcję cytokin można oznaczać na poziomie mRNA i białek. Jest oczywiste, iż produkcja cytokin na poziomie populacji nie musi odzwierciedlać jej produkcji na poziomie pojedynczej komórki. Stosowane od dawna metody, umożliwiające wykrywanie komórek produkujących cytokiny (ELISPOT, hybrydyzacja *in situ*, metoda granicznych rozcieńczeń i wykrywanie cytokin produkowanych przez klon komórek) nie dają możliwości oceny produkcji cytokin przez pojedyncze komórki określonego fenotypu. Wykrywanie wewnątrzkomórkowych cytokin metodą cytometrii przepływowej stwarza możliwości wieloparametrycznej analizy komórek zarówno w pełnej krwi, jak i zawiesinie leukocytów izolowanych z krwi bądź narządów limfatycznych [24, 45, 46, 52]. Metoda ta jest powszechnie stosowana w laboratoriach badawczych i ma coraz więcej zwolenników w klinice.

WYKRYWANIE WEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH CYTOKIN W LIMFOCYTACH – PROTOKÓŁ PODSTAWOWY

1. Przygotowanie komórek do znakowania (limfocyty stymulowane i niestymulowane)
2. Znakowanie powierzchniowych markerów badanych komórek,
3. Utrwalanie i permeabilizacja komórek,
4. Znakowanie cytokin znajdujących się wewnątrz komórek,

5. Przygotowanie prób kontrolnych:

- kontrole negatywne, izotypowe (komórki stymulowane i niestymulowane)
- kontrola permeabilizacji (komórki stymulowane i niestymulowane)
- kontrola aktywacji limfocytów,

6. Analiza znakowanych komórek w cytometrze przepływowym.

Ogólne zasady wykrywania wewnątrzkomórkowych cytokin odnoszą się również do innych niż limfocyty komórek produkujących cytokiny (monocyty, komórki NK, bazofile itd.). Różny będzie schemat aktywacji tych komórek.

AKTYWACJA LIMFOCYTÓW

Ekspresja wielu białek powierzchniowych czy też wewnątrzkomórkowych jest konsekwencją aktywacji komórek. Właśnie sposób aktywacji limfocytów jest niezwykle ważny dla późniejszego wykrycia wewnątrzkomórkowych cytokin. Zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* konstytutywna synteza cytokin jest słaba lub wręcz niewykrywalna, a ekspresja genów dla cytokin wymaga selektywnej aktywacji różnych typów komórek produkujących poprzez stymulację przez różne powierzchniowe receptory. Komórki o określonym fenotypie mogą wykazywać ekspresję genów dla cytokin w sposób skoordynowany lub zróżnicowany i jest to zależne od rodzaju stymulatora.

Wybór odpowiedniego stymulatora zależy od typu komórek, w których oznaczane będą cytokiny, od samej cytokiny badanej w układzie doświadczalnym bądź materiale klinicznym oraz od wytyczonego celu badania.

Aby określić możliwość większości limfocytów T do produkcji szerokiego spektrum cytokin, stosowane są zazwyczaj stymulatory poliklonalne:

- powszechnie używane lektyny, ConA i PHA aktywujące limfocyty poprzez krzyżowe wiązanie powierzchniowych receptorów glikoproteinowych [9],
- czynniki indukujące poliklonalną aktywację limfocytów przez indukcję kaskady wewnątrzkomórkowych sygnałów, niezależnie od obecności powierzchniowych receptorów, estry forbolu (PMA) i jonomycyna [36, 46],
- czynniki symulujące zaangażowanie TCR, niezależne jednakże od ich specyficzności: przeciwciała monoklonalne anti-CD3 + anti-CD28 wiążące krzyżowo cząsteczki CD3 i CD28 [10, 16, 57],
- superantygenu aktywujące dużą liczbę klonów w wyniku krzyżowego wiązania TCR i cząsteczki MHC kl. II [4, 37].

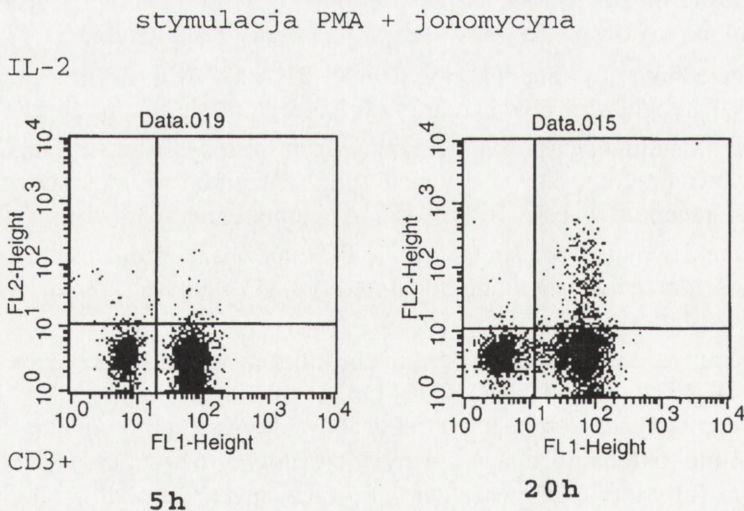
Możliwe jest użycie szeregu innych sposobów aktywacji poliklonalnej z udziałem przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko różnym cząsteczkom kostymulacyjnym (np. anti-CD2) oraz cytokin dodawanych do podłoża hodowlanego w celu indukcji syntezy grupy cytokin bądź jednej określonej cytokiny. Możliwe jest również wykrywanie wewnątrzkomórkowych cytokin w limfocytach T anti-

genowo-specyficznych w wyniku aktywacji limfocytów ze specyficznym TCR przez interakcję TCR-peptyd-MHC [59].

Ważna jest kinetyka syntezy różnych cytokin. Limfocyty produkują cytokiny w fazie G_1 cyklu komórkowego. Różny jest czas optymalnej ekspresji poszczególnych cytokin w zależności od typu komórek produkujących oraz sposobu stymulacji, rodzaju użytego stymulatora lub zestawu stymulatorów. Przykłady:

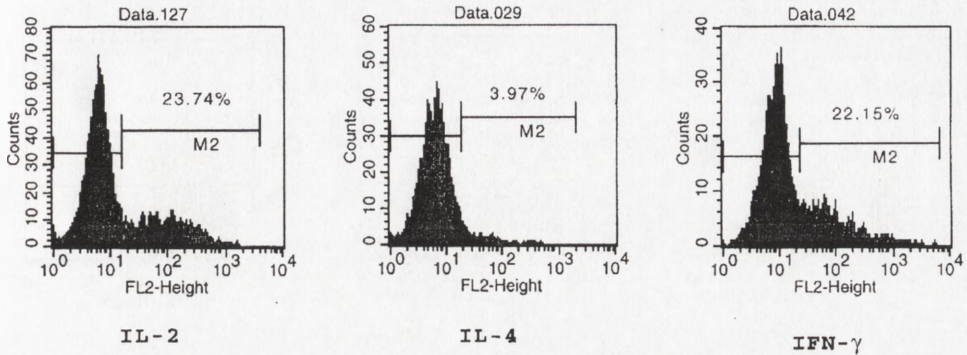
- w hodowlach pierwotnych limfocytów $CD4^+$ izolowanych ze śledziona myszy, stymulowanych superantygenem SEB (enterotoksyna B *Staphylococcus aureus*), najwcześniej wykrywana jest IL-2 (około 1. dnia), następnie IFN- γ (ok. 2. dnia) i IL-10 (około 3. dnia hodowli) [4],
- analiza ekspresji wewnątrzkomórkowych cytokin w hodowlach leukocytów krwi obwodowej człowieka, stymulowanych PMA i jonomycyną, wykazała, iż w populacji limfocytów zarówno $CD4^+$, jak i $CD8^+$ najwięcej komórek z IL-2 i IFN- γ wykrywanych jest pomiędzy 10–12 godziną hodowli, a z IL-4 i IL-5 po 6 godzinach hodowli [46].

Istnieją ciągle kłopoty ze standaryzacją metod. Z prac innych autorów wynika, iż limfocyty krwi obwodowej człowieka stymulowane PMA i jonomycyną już po 2 godzinach wykazują ekspresję wewnątrzkomórkowego TNF- α , po czym następuje szybki spadek odsetka komórek z tą cytokiną. Największy odsetek limfocytów z wewnątrzkomórkową IL-2 i IFN- γ obserwowany jest po 8 godzinach stymulacji. Odsetek limfocytów z IL-2 spada po 8 godzinach, a z IFN- γ pozostaje stabilny do 24 godzin [36]. Na rycinie 1 pokazano obecność limfocytów $CD3^+$ i $CD3^-$ zawierających wewnątrzkomórkową IL-2 w hodowli 5- i 20-godzinnej leukocytów



RYCINA 1. Limfocyty z wewnątrzkomórkową IL-2 w hodowlach leukocytów jednojądrzastych izolowanych z krwi żyłnej człowieka

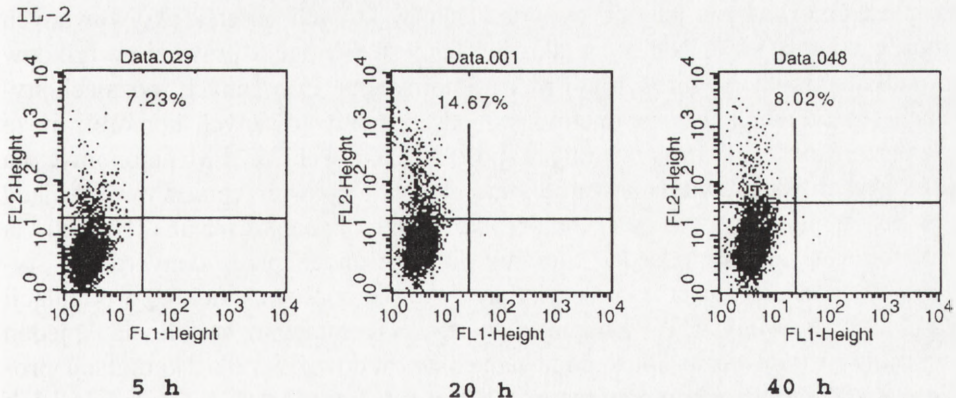
stymulacja PMA + jonomycyna



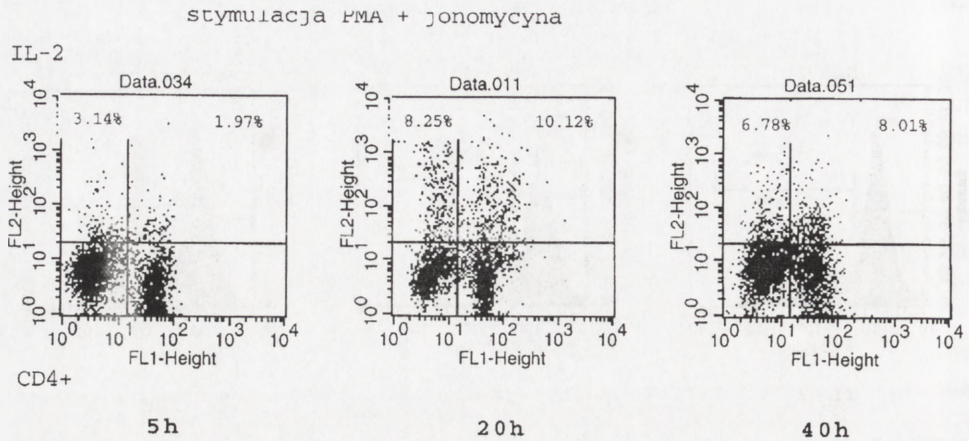
RYCINA 2. Wewnątrzkomórkowe cytokiny w populacji ludzkich limfocytów $CD3^+$ z 20-godzinnej hodowli leukocytów jednojądrzastych izolowanych z krwi żyłnej

jednojądrzastych izolowanych z krwi żyłnej człowieka (odsetek limfocytów z cytokiną zależy również od stężenia użytych stymulatorów). Rycina 2 przedstawia wybrane histogramy ilustrujące odsetek limfocytów $CD3^+$ z wewnątrzkomórkowymi cytokinami w 20-godzinnych hodowlach leukocytów jednojądrzastych izolowanych z krwi żyłnej. Na rycinach 3 i 4 przedstawiono ekspresję wewnątrzkomórkowej IL-2 w tymocytach i limfocytach śledziony myszy BALB/c w stymulowanych hodowlach 5-, 20- i 40-godzinnych. Najwięcej komórek z cytokiną wykrywanych jest po 20 godzinach hodowli. Na rycinie 4 widoczny jest efekt obniżenia ekspresji CD4 w obecności inhibitorów transportu białek w podłożu (w tym przypadku monensyny). Podobnie obniżeniu ulega ekspresja CD8. Większy odsetek limfocytów

stymulacja PMA + jonomycyna



RYCINA 3. Ekspresja IL-2 w stymulowanych tymocytach myszy BALB/c po 5, 20 i 40 godzinach hodowli



RYCINA 4. Ekspresja IL-2 w stymulowanych limfocytach CD4⁺ i CD4⁻ śledziny myszy BALB/c po 5, 20 i 40 godzinach hodowli

z wewnątrzkomórkowymi cytokinami występuje w populacji limfocytów pamięci niż naiwnych.

Z danych pochodzących z różnych źródeł wynika, iż skład podłoża może mieć wpływ na syntezę cytokin. W podłożu zawierającym surowicę obserwowano zahamowanie syntezy IFN- γ , prawdopodobnie przez czynniki wydzielane przez płytki krwi [59].

Przy każdorazowym oznaczaniu wewnątrzkomórkowych cytokin wymagane jest oznaczenie poziomu aktywacji komórek (komórki spoczynkowe nie produkują cytokin). Dobrym i powszechnie stosowanym znacznikiem aktywacji jest ekspresja CD69 (wczesny marker aktywacji limfocytów), który ulega ekspresji na powierzchni komórki już po 4 godzinach aktywacji. Powszechnie zalecane jest oznaczanie cytokin wewnątrzkomórkowych jedynie w hodowlach, w których odsetek aktywowanych komórek wynosi 90%. Należy podkreślić, iż jest to pogląd prawdziwy tylko w przypadku stymulacji limfocytów PMA i jonomycyną. Przy innych rodzajach stymulacji ten warunek nie jest spełniony i odsetek aktywowanych komórek może być znacznie niższy. Warto przy innych sposobach aktywacji niż PMA i jonomycyna wykonywać trójkolorowe znakowanie komórek: marker powierzchniowy wskazujący na określony fenotyp, wewnątrzkomórkowe CD69 i badana cytokina. Umożliwia to jednoczesną analizę odsetka komórek aktywowanych przez dany rodzaj stymulatora i określenie odsetka komórek z wewnątrzkomórkową cytokiną w populacji komórek aktywowanych. W tym miejscu należy wspomnieć, iż brefeldyna A, jeden z inhibitorów transportu białek dodawanych do hodowli w celu akumulacji produkowanych cytokin w komórce (patrz: Blokowanie transportu białek w komórkach – wybór inhibitora transportu białek) całkowicie blokuje ekspresję CD69 na po-

wierzchni komórki. Zatem obecność CD69 na powierzchni komórki aktywowanej można wykryć jedynie przy braku brefeldyny A w podłożu [43].

Na potrzeby diagnostyki klinicznej opracowano metodę oznaczania wewnątrzkomórkowych cytokin w komórkach w pełnej krwi [52, 56]. Zalecana jest wówczas krótka inkubacja, przeważnie 5-godzinna, z PMA i jonomycyną. Ze względu na krótką inkubację ze stymulatorem, możliwe jest wykrycie takich cytokin, które są produkowane szybko i w dużej ilości (IL-2, IFN- γ przez limfocyty T) lub IL-1, IL-6, IL-8 przez monocyty stymulowane LPS. W przypadku oznaczania cytokin w komórkach w pełnej krwi, ważny jest rodzaj używanego antykoagulantu. Krew pobrana na cytrynian zakłóca stymulację PMA i jonomycyną. Zaleca się pobieranie krwi na heparynian sodu.

BLOKOWANIE TRANSPORTU BIAŁEK W KOMÓRKACH – WYBÓR INHIBITORA TRANSPORTU BIAŁEK

Cytokiny syntetyzowane w komórkach są wydzielane na zewnątrz, *in vitro* – do podłoża hodowlanego. W celu zwiększenia wykrywalności cytokin we wnętrzu komórki stosowane są inhibitory transportu białek, które powodują czasową akumulację białek, w tym również cytokin, i zwiększają intensywność fluorescencji pochodzącej od fluorochromu sprzężonego z przeciwciałem przeciwko cytokinie. Inhibitory, zwykle dodawane są na ostatnie 5 godzin hodowli komórek. Jeżeli cytokiny oznaczane są po aktywacji 5-godzinnej, to inhibitor transportu białek dodawany jest na początku inkubacji/hodowli komórek łącznie ze stymulatorem.

Najczęściej używanymi inhibitorami transportu białek są brefeldyna A i monensyna [38, 43]. Monensyna jest jonoforem, niszczy gradient jonowy błon komórkowych. W komórkach traktowanych monensyną, nowo wytworzone białko gromadzi się w wakuolach pochodzących z aparatu Golgiego. Dodatkowo, monensyna blokuje potranslacyjną modyfikację białek (glikozylację, obróbkę proteolityczną). Monensyna jest bardziej toksyczna od brefeldyny A, w szczególności w stosunku do limfocytów CD4⁺. Brefeldyna A jest metabolitem grzybów, wykazującym szereg aktywności biologicznych. Hamuje sekrecję białek równie silnie jak monensyna. Wykazuje inny mechanizm działania, lecz z identycznym efektem końcowym w postaci hamowania sekrecji białek. Brefeldyna A hamuje transport białek z szorstkiej siateczki śródplazmatycznej do aparatu Golgiego. Zahamowanie transportu białek zależne jest od stężenia inhibitorów. Od stężenia zależy również czas działania inhibitora. Jeżeli stosowany jest w niższych dawkach, może wymagać powtórnego dodania do hodowli. Zalecane jest stosowanie brefeldyny A w stężeniach 1–5 $\mu\text{g/ml}$, a monensyny 1–3 $\mu\text{g/ml}$. Wyższe dawki są toksyczne dla komórek. Brefeldyna A w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ znacznie obniża żywotność limfocytów i monocytów. Ponadto na monocytach obniża również ekspresję CD14, a na limfocytach

blokuje całkowicie powierzchniową ekspresję CD69. Z praktycznego punktu widzenia, dodanie do hodowli stymulowanych komórek inhibitora transportu białek umożliwia wyodrębnienie populacji komórek z wewnątrzkomórkową cytokiną. W przypadku wykrywania wewnątrzkomórkowych cytokin, które produkowane są w dużych ilościach (np. IL-2), możliwe jest ich oznaczanie nawet przy braku inhibitorów. Jednakże przy braku inhibitora, wykrywa się mniej komórek z cytokiną wewnątrz, nie tworzą one dobrze wyodrębnionej populacji i analiza wyników jest mniej wiarygodna. Monensyna powoduje lepszą akumulację w limfocytach myszy IL-4, IL-10, brefeldyna A – TNF- α . Oba inhibitory jednakowo skutecznie blokują transport IL-2, IFN- γ . Należy sprawdzić we własnym układzie badawczym przydatność inhibitorów w zależności od cytokiny i komórki produkującej (rodzaj komórki i jej pochodzenie).

UTRWALANIE I PERMEABILIZACJA BŁONY KOMÓRKOWEJ

Oznaczanie wewnątrzkomórkowych cytokin, jak również innych wewnątrzkomórkowych cząsteczek, możliwe jest po utrwaleniu i permeabilizacji komórek. Znakowanie powierzchniowych markerów wykonywane jest przed utrwaleniem błony komórkowej, gdyż dostępne przeciwciała monoklonalne przeciwko markerom powierzchniowym rozpoznają struktury natywne. Utrwalanie komórek, zwykle roztworem paraformaldehydu w PBS (1–4%) zwiększa przepuszczalność błony. Do permeabilizacji komórek powszechnie używa się roztworu saponiny w PBS (0,001–1%, najczęściej 0,1%). Roztwór saponiny w tym zakresie zwykle daje podobny efekt permeabilizacji. 1% roztwór saponiny może obniżać intensywność fluorescencji pochodzącej od wyznakowanych markerów powierzchniowych. Porównywano metody permeabilizacji komórek 0,05% roztworem saponiny, 0,1% roztworem Tritonu X-100 oraz 70% alkoholu [33]. Jedynie permeabilizacja saponiną okazała się procedurą, która nie narusza morfologii komórek określanej przez parametry FSC/SSC, umożliwia ocenę apoptozy limfocytów za pomocą barwienia 7-AAD (7-aminoaktynomycyna D), najmniej zmienia intensywność fluorescencji pochodzącej ze znakowania markerów powierzchniowych i umożliwia jednoczesną detekcję wewnątrzkomórkowych cytokin i wewnątrzkomórkowych antygenów związanych z błonami.

Zalecane jest wykonanie kontroli permeabilizacji. W tym celu można oznaczać wewnątrzkomórkową ekspresję białka CD69. Oznaczanie tego markera może być korzystne z dwóch powodów:

1) informuje o aktywacji, gdyż do syntezy CD69 dochodzi tylko w komórkach aktywowanych, oraz

2) informuje o prawidłowo przeprowadzonej permeabilizacji, gdyż przeciwciało znakujące musiało wnikać do wnętrza komórki, a obecność w podłożu hodowlanym inhibitora transportu białek, uniemożliwia jego pojawienie się na powierzchni komórki.

Jeżeli jednak wynik takiego znakowania będzie negatywny, to oznacza to, iż limfocyty nie uległy aktywacji lub permeabilizacja komórki nie przebiegła prawidłowo. Taki wynik zmusza do oznaczenia obecności CD69 na powierzchni komórki przy braku inhibitora transportu białek w podłożu. Jeżeli wynik znakowania jest negatywny, to już wiemy, że komórka nie uległa aktywacji, ale nadal nie mamy pewności co do skuteczności permeabilizacji. Niektóre firmy produkujące odczynniki oferują przeciwciało sprzężone z FITC stosowane do kontroli permeabilizacji, umożliwiając rozróżnienie komórek całkowicie lub częściowo spermeabilizowanych. Komórki po inkubacji w buforze do permeabilizacji zostają wyznakowane tym przeciwciałem. Wnika ono do wnętrza komórki tylko wówczas, gdy permeabilizacja przebiegła prawidłowo. Na rycinie 5 przedstawiono skutecznie przeprowadzoną permeabilizację limfocytów krwi obwodowej człowieka.

Zalecane podstawowe kontrole. Kontrole powinny być przeprowadzone z użyciem komórek stymulowanych i niestymulowanych.

1. Kontrole negatywne:

- kontrola izotypowa znakowania powierzchniowego,
- kontrola izotypowa znakowania wewnątrzkomórkowego,

2. Kontrola permeabilizacji,

3. Kontrola aktywacji – ekspresja CD69 wewnątrz komórek lub na ich powierzchni,

4. Kontrola lokalizacji cytokiny:

- zewnątrzkomórkowa, niezależna od saponiny,
- wewnątrzkomórkowa, zależna od saponiny.

Możliwości oznaczeń wieloparametrycznych

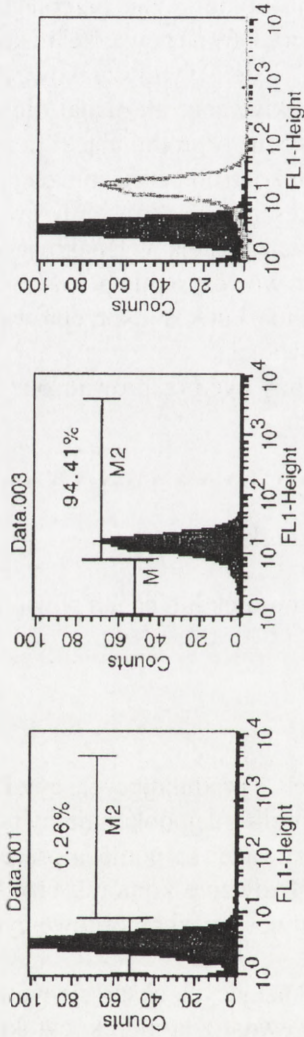
1. Jednoczesne oznaczanie komórek proliferujących i produkujących cytokiny w populacji limfocytów stymulowanych. Pomiaru proliferacji dokonujemy poprzez inkorporację bromodeoksyurudyny (BrdU) wykrywanej za pomocą przeciwciał przeciwko BrdU. Możliwe jest jednoczesne analizowanie komórek proliferujących, aktywowanych (CD69, CD25) i mających wewnątrzkomórkowe cytokiny [37].

2. Jednoczesne oznaczanie apoptozy i komórek wykazujących ekspresję wewnątrzkomórkowych cytokin [62]. Oznaczanie białek wewnątrz komórek: cytokin oraz białek związanych z apoptozą Bcl-2, FADD, aktywne formy kaspazy-3.

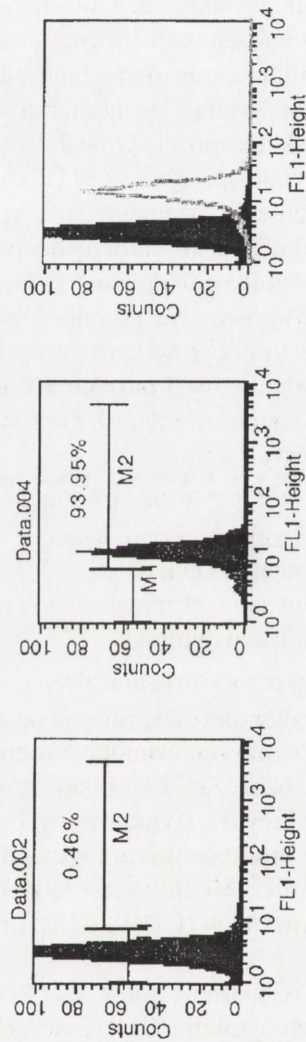
Przykłady zastosowania badania wewnątrzkomórkowych cytokin w klinice.

Wykrywanie cytokin wewnątrzkomórkowych w pojedynczych komórkach łącznie ze znakowaniem markerów powierzchniowych jest coraz powszechniej wykorzystywane do śledzenia zmian zachodzących w układzie odpornościowym w warunkach

limfocyty niestymulowane



limfocyty stymulowane



A

B

C

RYCINA 5. Kontrola permeabilizacji błony komórkowej limfocytów krwi obwodowej człowieka: A – limfocyty niepermeabilizowane (brak limfocytów świecących, <0,5%); B – limfocyty permeabilizowane (limfocytów świecących >90%); C – naniesione na jeden wykres histogramy A i B; na osi X – wartości emisji fluorescencji pochodzącej od fluoresceiny

patologicznych oraz fizjologicznych związanych z rozwojem człowieka (rozwój układu odpornościowego, procesy starzenia, przebieg ciąży).

1. Wykrywanie wewnątrzkomórkowych cytokin w zakażeniach bakteryjnych, wirusowych i pasożytniczych:

- Analizowano ekspresję cytokin w monocytach i limfocytach krwi obwodowej stymulowanych *in vitro* zabitymi paciorkowcami grupy B [32]. Autorzy sugerują istotną rolę TNF- α , IFN- γ i IL-12 w patogenezie i odporności tych zakażeń.
- U pacjentów zakażonych *Helicobacter pylori* wykazano ekspresję wewnątrzkomórkowych cytokin w limfocytach CD4⁺ (przewodu pokarmowego) charakterystyczną dla populacji Th1 [54].
- W zakażeniach wirusem HIV zaobserwowano zmniejszenie odsetka limfocytów CD4⁺CD8⁻ produkujących IL-2 oraz brak zmian w produkcji IFN- γ , IL-4 i IL-5 [55]. Nie oznacza to jeszcze sugerowanej w poprzednich doniesieniach przewagi udziału limfocytów Th2 nad Th1 w zaawansowanym stadium AIDS. U chorych, praktycznie pozbawionych limfocytów T CD4⁺, wykazano produkcję IL-4 przez limfocyty CD3⁺CD8^{dull} oraz CD3⁻CD4⁻CD8⁻CD56⁻CD19⁻CD14⁻ [20].
- Zakażenie wirusami herpes simplex limfocytów krwi obwodowej ludzi dorosłych indukuje w tych komórkach wzrost ekspresji wewnątrzkomórkowej IL-2, IFN- γ i TNF- α , natomiast w przypadku zakażenia limfocytów izolowanych z krwi pępowinowej notowany jest wzrost ekspresji jedynie IL-2 i TNF- α [23].
- Wykazano zróżnicowaną produkcję cytokin typu Th1, Th2 i Th0 w populacji limfocytów CD4⁺CD27⁻ ludzi zdrowych i pacjentów z zakażeniami pasożytniczymi [14].
- Monitorowanie skuteczności szczepionek jest możliwe poprzez śledzenie wytwarzania cytokin przez antygenowo-specyficzne limfocyty T. Szczepionki przeciwko grypie wzmagają produkcję IFN- γ i w małym stopniu IL-4. Cytokiny te wytwarzane są głównie przez limfocyty pamięci CD45 RO⁺. Wzrost ekspresji cytokin wewnątrz limfocytów indukuje również szczepienie toksoidem tężca [25].

2. Ekspresja wewnątrzkomórkowych cytokin w chorobach nowotworowych, autoimmunizacyjnych, alergicznych i w niedoborach odporności:

- Nowotworowo-specyficzne limfocyty T CD4⁺CD69⁺ oraz CD8⁺CD69⁺ pacjentów z adenocarcinoma wykazują ekspresję wewnątrzkomórkowych IL-2, IL-4, IFN- γ , TNF- α . Analiza wytwarzania tych cytokin jest pomocna przy monitorowaniu terapii [26].
- Ekspresja cytokin wewnątrz limfocytów stosowana jest do monitorowania efektów immunoterapii u pacjentów z melanoma [35] i rakiem jajnika [47].

- U pacjentów z zaawansowanymi chorobami nowotworowymi obserwuje się zaburzenie równowagi Th1/Th2 oraz wzmożoną produkcję cytokin przez limfocyty Th2 [51].
 - Wytwarzanie określonego zestawu cytokin może odpowiadać za rozwój chorób autoimmunizacyjnych [29].
 - Limfocyty CD4⁺ u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym wykazują wzmożoną ekspresję IL-2 i TNF- α . Leczenie IFN- γ obniża produkcję tych cytokin [22].
 - Limfocyty CD4⁺ krwi obwodowej i płynu stawowego pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów wykazują zwiększoną produkcję IFN- γ i IL-4. W płynie stawowym pacjentów wykazano obecność limfocytów CD8⁺ produkujących tylko IL-4 lub IL-4 i IFN- γ . Limfocyty CD4⁺ płynu stawowego pacjentów wykazują odmienny profil produkcji cytokin niż limfocyty pamięci CD4⁺ krwi obwodowej [31, 39].
 - W populacji limfocytów CD4⁺ pacjentów z atopową alergią skóry obserwowane jest zmniejszenie odsetka limfocytów wytwarzających IFN- γ oraz obniżenie ilości produkowanego IFN- γ . W populacji limfocytów CD8⁺ notuje się zmniejszenie odsetka limfocytów z ekspresją wewnątrzkomórkowego IFN- γ oraz zwiększenie odsetka komórek produkujących IL-4 przez limfocyty CD3⁺CD8⁻ [15, 41].
 - U pacjentów z astmą oskrzelową zaburzona synteza cytokin przez limfocyty i białek zasadowych produkowanych przez eozynofile stanowi jeden z patofizjologicznych mechanizmów rozwoju choroby [30].
 - U pacjentów z pospolitym zmiennym niedoborem immunologicznym zaburzona jest produkcja cytokin przez limfocyty CD8⁺CD28⁻ i CD8⁺CD28⁺. Ponadto nie dochodzi do rozwoju limfocytów CD4⁺ pamięci antygenowo-specyficznych niezbędnych do dojrzewania limfocytów B [42].
3. Analiza ekspresji cytokin w chorobach o podłożu neurologicznym oraz w badaniach oddziaływania hormonów na funkcjonowanie układu odpornościowego:
- Syntetyczne glikokortykosteroidy stosowane są w terapii astmy, choroby GvH i innych chorób związanych ze stanem zapalnym. Badanie ekspresji wewnątrzkomórkowych cytokin przez limfocyty, monocyty i komórki NK traktowane *in vitro* glikokortykosteroidami wykazało zahamowanie produkcji cytokin prozapalnych i wzmożoną produkcję cytokin przeciwwzapalnych [19].
 - U dzieci autystycznych zaobserwowano zaburzenie równowagi produkcji cytokin przez limfocyty Th1 i Th2 [18].
4. Badanie udziału cytokin w procesie starzenia, w przebiegu ciąży i patologii ciąży:
- W procesie starzenia obserwuje się wzmożoną produkcję IFN- γ i IL-4. IFN- γ produkowany jest głównie przez limfocyty CD8^{high}CD28⁻CD57⁺, których liczebność z wiekiem zwiększa się. Niewykluczone, iż ta populacja komórek pełni funkcję limfocytów Tc1 w populacji ludzi starszych [6].

- Analiza ekspresji wewnątrzkomórkowych cytokin w przebiegu ciąży umożliwia przewidywanie ewentualnych patologii. W błonie śluzowej macicy kobiet nie będących w ciąży przeważają limfocyty Th1, we wczesnym okresie ciąży – limfocyty Th2 [50]. W tym samym czasie nie obserwowano zmian w proporcji tych komórek we krwi obwodowej. Limfocyty Th2 dominują w drugim i trzecim trymestrze normalnej ciąży, zaś Th1 u pacjentek w stanie przedrzucawkowym [49].
5. Zaburzenie funkcjonowania sieci cytokinowej przez czynniki zanieczyszczające środowisko
- Produkcja cytokin zostaje zaburzona przez substancje zanieczyszczające środowisko. Konsekwencje tych zaburzeń prowadzą do upośledzonego funkcjonowania układu odpornościowego. Analiza ekspresji wewnątrzkomórkowych cytokin wykorzystywana jest od niedawna w badaniach immunotoksykologicznych [21].

Zamieszczone w publikacji wykresy powstały na podstawie wyników badań prowadzonych w Zakładzie Immunologii Uniwersytetu Warszawskiego. Badania, w których oznaczano obecność wewnątrzkomórkowych cytokin w limfocytach myszy BALB/c finansowano z grantu KBN nr 6PO4C 078 14.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ALZONA M, JACK HM, FISCHER R, ELLIS TM. IL-12 activates IFN-gamma production through the preferential activation of CD30⁺ T cells. *J Immunol* 1995; **154**: 9–16.
- [2] ARZT E, PEREDA MP, CASTRO CP, PAGOTTO U, RENNER U, STALLA GK. Pathophysiological role of the cytokine network in the anterior pituitary gland. *Frontiers Neuroendocrinol* 1999; **20**: 71–95.
- [3] ASPINALL R, ANDREW D. Thymic atrophy in the mouse is a soluble problem of the thymic environment. *Vaccine* 2000; **18**: 1629–1637.
- [4] ASSENMACHER M, SCHMITZ J, RADBRUCH A. Flow cytometric determination of cytokines in activated murine T helper lymphocytes: expression of interleukin-10 in interferon- and in interleukin-4-expressing cells. *Eur J Immunol* 1994; **24**: 1097–1101.
- [5] BAIRD AM, GERSTEIN RM, BERG JL. The role of cytokine receptor signaling in lymphocyte development. *Curr Opin Immunol* 1999; **11**: 157–166.
- [6] BANDRES E, MERINO J, VAZQUEZ B, INOGES S, MORENO C, SUBIRA ML, SANCHEZ-IBARROLA A. The increase of IFN-gamma production through aging correlates with the expanded CD8(+high) CD28(-)CD57(+) subpopulation. *Clin Immunol* 2000; **96**: 230–235.
- [7] BIRON CA. Initial and innate responses to viral infections – pattern setting in immunity or disease. *Curr Opin Microbiol* 1999; **2**: 374–381.
- [8] BLALOCK JE. Proopiomelanocortin and the immune-neuroendocrine connection. *Ann NY Acad Sci* 1999; **885**: 161–172.
- [9] CARDING SR, WEST J, WOODS A, BOTTOMLY K. Differential activation of cytokine genes in normal CD4-bearing T cells is stimulus dependent. *Eur J Immunol* 1989; **19**: 231–238.
- [10] CHEN H, PAUL WE. Cultured NK1.1⁺ CD4⁺ T cells produce large amounts of IL-4 and IFN-gamma upon activation by anti-CD3 or CD1. *J Immunol* 1997; **159**: 2240–2249.
- [11] COSSARIZZA A, ORTOLANI C, MONTI D, FRANCESCHI C. Cytometric analysis of immunosenescence. *Cytometry* 1997; **27**: 297–313.

- [12] DE BOER ML, MORDVINOV VA, THOMAS MA, SANDERSON CJ. Role of nuclear factor of activated T cells (NFAT) in the expression of interleukin-5 and other cytokines involved in the regulation of hemopoetic cells. *Int J Biochem & Cell Biol* 1999; **31**: 1221–1236.
- [13] DI SANTO JP, RADTE F, RODEWALD HR. To be or not to be a pro-T? *Curr Opinion Immunol* 2000; **12**: 159–165.
- [14] ELSON LH, NUTMAN TB, METCALFE DD, PRUSSIN C. Flow cytometric analysis for cytokine production identifies T helper 1, T helper 2, and T helper 0 cells within the human CD4⁺CD27⁻ lymphocyte subpopulation. *J Immunol* 1995; **154**: 4294–4301.
- [15] FERRY B, ANTROBUS P, HUZICKA I, FARRELL A, LANE A, CHAPEL H. Intracellular cytokine expression in whole blood preparations from normals and patients with atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol* 1997; **110**: 410–417.
- [16] GHIOTTO-RAGUENEAU M, BATLIFORA M, TRUNEH A, WATERFIELD MD, OLIVE D. Comparison of CD28 –B7.1 and B7.2 functional interaction in resting human T cells: phosphatidylinositol 3-kinase association to CD28 and cytokine production. *Eur J Immunol* 1996; **26**: 34–41.
- [17] GLOBERSON A. Hematopoietic stem cells and aging. *Exp Gerontol* 1999; **34**: 137–146.
- [18] GUPTA S, AGGARWAL S, RASHANRAVAN B, LEE T. Th1- and Th2-like cytokines in CD4⁺ and CD8⁺ T cells in autism. *J Neuroimmunol* 1998; **85**: 106–109.
- [19] HODGE S, HODGE G, FLOWER R, HAN P. Methyl-prednisolone up-regulates monocyte interleukin-10 production in stimulated whole blood. *Scand J Immunol* 1999; **49**: 548–553.
- [20] HONDA J, OKUBO Y, TANAKA H, KUSABA M, KUMAGAI M, SARUWATARI N, OIZUMI K. CD3⁻CD4⁻CD8⁺CD56⁻CD19⁻CD14⁻ and CD3⁺CD8⁻ dull-positive cells produce IL-4 in AIDS patients. *Br J Haematol* 1998; **101**: 74–77.
- [21] HOUSE RV. Theory and practice of cytokine assessment in immunotoxicology. *Methods* 1999; **19**: 17–27.
- [22] INOGES S, MERINO J, BANDRES E, DE CASTRO P, SUBIRA ML, SANCHEZ-IBAR-ROLA A. Cytokine flow cytometry differentiates clinical status of multiple sclerosis (MS) patients. *Clin Exp Immunol* 1999; **115**: 521–525.
- [23] ITO M, KOIDE W, SAKURAI M. Changes in intracellular cytokine level in newborn and adult lymphocytes induced by HSV-1. *J Med Virol* 1998; **56**: 145–150.
- [24] JUNG T, SCHAUER U, HEUSSER C, NEUMANN C, RIEGER C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Meth* 1993; **159**: 197–207.
- [25] KALLAS EG, GIBBONS DC, SOUCIERH, FITZGERALD T, TREANOR JJ, EVANS TG. Detection of intracellular antigen-specific cytokines in human T cell populations. *J Inf Dis* 1999; **179**: 1124–1131.
- [26] KARANIKAS V, LODDING J, MAINO VC, MCKENZIE IF. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines detects immune responses in MUC1 immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 829–837.
- [27] KELSO A. Cytokines: principles and prospects. *Immunol Cell Biol* 1998; **76**: 300–317.
- [28] KINDLER V, ZUBLER RH. Memory, but not naive, peripheral blood B lymphocytes differentiate into Ig-secreting cells after CD40 ligation and costimulation with IL-4 and the differentiation factors IL-2, IL-10, IL-3. *J Immunol* 1997; **159**: 2085–2090.
- [29] KRUG N, SCHAUER U, WAGNER TO. Cell biology and bronchial asthma: interesting new methods. Intracellular determination of cytokines in T-cells and basic proteins in eosinophilic granulocytes using flow cytometry. *Pneumologie* 1997; **51**: 381–385.
- [30] KROEMER G, HIRSCH F, GONZALES-GARCIA A, MARTINEZ C. Differential involvement of Th1 and Th2 cytokines in autoimmune diseases. *Autoimmunity* 1996; **24**: 25–33.
- [31] KUSABA M, HONDA J, FUKUDA T, OIZUMI K. Analysis of type 1 and type 2 T cells in synovial fluid and peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1998; **25**: 1466–1471.

- [32] KWAK DJ, AUGUSTINE NH, BORGES WG, JOYNER IL, GREEN WF, HILL HR. Intracellular and extracellular cytokine production by human mixed mononuclear cells in response to group B streptococci. *Inf Imm* 2000; **68**: 320–327.
- [33] LECOEUR H, LEDRU E, GOUGEON ML. A cytofluorometric method for the simultaneous detection of both intracellular and surface antigens of apoptotic peripheral lymphocytes. *J Immunol Meth* 1998; **217**: 11–26.
- [34] MALEK TR, PORTER BO, HE YW. Multiple gamma c-dependent cytokines regulate T-cell development. *Immunol Today* 1999; **20**: 71–76.
- [35] MARAVEYAS A, BABAN B, KENNARD D, ROOK GA, WESTBY M, GRANGE JM, LYDYARD P, STANFORD JL, JONES M, SELBY, DALGLEISH AG. Possible improved survival of patients with stage IV AJCC melanoma receiving SRL 172 immunotherapy: correlation with induction of increased level of intracellular interleukin 2 in peripheral blood lymphocytes. *Ann Oncol* 1999; **10**: 817–824.
- [36] MASCHER B, SCHLENKE P, SEYFARTH M. Expression and kinetics of cytokines determined by intracellular staining using flow cytometry. *J Immunol Meth* 1999; **223**: 115–121.
- [37] MEHTA BA, MAINO VC. Simultaneous detection of DNA synthesis and cytokine production in staphylococcal enterotoxin B activated CD4⁺ T lymphocytes by flow cytometry. *J Immunol Meth* 1997; **208**: 49–59.
- [38] MISUMI J, MISUMI J, MIKI K, TAKATSUKI A, TAMURA G, IKEHARA Y. Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1986; **261**: 11398–11403.
- [39] MORITA Y, YAMAMURA K, KAWASHIMA M, HARADA S, TSUJI K, SHIBUYA K, MARUYAMA K, MAKINO H. Flow cytometric single-cell analysis of cytokine production by CD4⁺ T cells in synovial tissue and peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatism* 1998; **41**: 1669–1676.
- [40] MOSMANN TR, SUBASH S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; **17**: 138–146.
- [41] NAKAGAWA S, AIBA S, TAGAMI H. Decreased frequency of interferon-gamma-producing CD4⁺ cells in the peripheral blood of patients with atopic dermatitis. *Exp Dermatol* 1998; **7**: 112–118.
- [42] NORTH ME, WEBSTER AD, FARRANT J. Primary defect in CD8⁺ lymphocytes in the antibody deficiency disease (common variable immunodeficiency): abnormalities in intracellular production of interferon-gamma (IFN- γ) in CD28⁺ (cytotoxic) and CD28⁻ (suppressor) CD8⁺ subsets. *Clin Exp Immunol* 1998; **111**: 70–75.
- [43] NYLANDER S, KALIES I. Brefeldin A, but not monensin, completely blocks CD69 expression on mouse lymphocytes: efficacy of inhibitors of protein secretion in protocols for intracellular cytokine staining by flow cytometry. *J Immunol Meth* 1999; **224**: 69–76.
- [44] PAWELEC G, EFFRAS RB, CARUSO C, REMARQUE E, BARNETT Y, SOLANA R. T cells and aging. *Frontiers in Bioscience* 1999; **4**: D216–D269.
- [45] PICKER LJ, SINGH K, ZDRAVESKIZ, TREER JR, WALDROP SL, BERGSTRESSER PR, MAINO VC. Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry. *Blood* 1995; **86**: 1408–1419.
- [46] PRUSSIN C, METCALFE DD. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J Immunol Meth* 1995; **188**: 117–128.
- [47] REINARTZ S, BOERNER H, KOEHLER S, VON RUECKER A, SCHLESBUSCH H, WAGNER U. Evaluation of immunological responses in patients with ovarian cancer treated with the anti-idiotype vaccine ACA 125 by determination of intracellular cytokines – a preliminary report. *Hybridoma* 1999; **18**: 41–45.
- [48] RIFFO-VASQUEZ Y, PITCHFORD S, SPINA D. Cytokines in airway inflammation. *Int J Biochem & Cell Biol* 2000; **32**: 833–853.

- [49] SAITO S, SAKAI M, SASAKI Y, TANEBE K, TSUDA H, MICHIMATA T. Quantitative analysis of peripheral blood Th0, Th1, Th2 and the Th1/Th2 ration during normal human pregnancy and preeclampsia. *Clin Exp Immunol* 1999; **117**:55–555.
- [50] SAITOS S, TSUKAGUCHI N, HASEGAWA T, MICHIMATA T, TSUDA H, NARITA N. Distribution of Th1, Th2 and Th0 and the Th1/Th2 cell ratios in human peripheral and endometrial T cells. *Am J Repr Immunol* 1999; **42**:240–245.
- [51] SATO M, GOTO S, KANEKO R, ITO M, SATO S, TAKEUCHI S. Impaired production of Th1 cytokines and increased frequency of Th2 subsets in PBMC from advanced cancer patients. *Anticancer Res* 1998; **18**:3951–3955.
- [52] SEWELL WA, NORTH ME, WEBSTER AD, FARRANT J. Determination of intracellular cytokines by flow cytometry following whole-blood culture. *J Immunol Meth* 1997; **209**: 67–74.
- [53] SMITHGALL TE, BRIGGS SD, SCHREINER S, LERNER EC, CHENG H, WILSON MB. Control of myeloid differentiation and survival by Stats. *Oncogene* 2000; **19**: 2612–2618.
- [54] SOMMER F, FALLER G, KONTUREK P, KIRCHNER T, HAHN EG, ZEUS J, ROLLINGHOFF M, LOHOFF M. Antrum- and corpus-infiltrating CD4(+) lymphocytes in *Helicobacter pylori* gastritis display a Th1 phenotype. *Inf Immun* 1998; **66**: 5543–5546.
- [55] TANAKA M, HIRABAYASHI Y, GATANAGA H, AIZAWA S, HACHIYA A, TAKAHASHI Y, TOSHIRO E, KOHSAKA T, OYAMADA M, IDA S, OKA S. Reduction in interleukin-2 producing cells but not Th1 to Th2 shift in moderate and advanced stages of human immunodeficiency virus type-1-infection: direct analysis of intracellular cytokines concentrations in CD4⁺CD8⁻ cells. *Scand J Immunol* 1999; **50**: 550–554.
- [56] TAYEBI H, LIENARD A, BILLOT M, TIBERGHEN P, HERVE P, ROBINET E. Detection of intracellular cytokines in citrated whole blood or marrow samples by flow cytometry. *J Immunol Meth* 1999; **229**: 121–130.
- [57] THOMPSON CB, LINDSTEN T, LEDBETTER JA, KUNKEL SL, YOUNG HA, EMERSON SG, LEIDEN JM, JUNE CH. CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 1333–1337.
- [58] TREPICCHIO WL, DORNER AJ. Interleukin-11. A gp 130 cytokine. *Ann NY Acad Sci* 1998; **856**: 12–21.
- [59] VIKINGSSON A, PEDERSON K, MULLER D. Enumeration of IFN- γ producing lymphocytes by flow cytometry and correlation with quantitative measurement of IFN- γ . *J Immunol Meth* 1994; **173**: 219–228.
- [60] WILLIAMS MA, RHOADES CJ, NEWLAND AC, KELSEY SM. The potential for monocyte-mediated immunotherapy during infection and malignancy – Part II: *in vivo* activation by exogenous cytokines and clinical applications. *Leukemia&Lymphoma* 1999; **34**: 207–230.
- [61] XIAO BG, LINK H. Immune regulation within the central nervous system. *J Neurol Sci* 1998; **157**: 1–12.
- [62] YOSHINO N, AMI Y, TERAOKA K, TASHIRO F, HONDA M. Upgrading of flow cytometric analysis for absolute counts, cytokines and other antigenic molecules of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) by using anti-human cross-reactive antibodies. *Exp Animals* 2000; **49**: 97–100.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 07.12.2000 r.

Przyjęto: 12.12.2000 r.

Adres autorki: 02-096 Warszawa, ul. Miecznikowa 1

BADANIA NAD PRZEKAŹNICTWEM INFORMACJI W UKŁADZIE NERWOWYM UHONOROWANE NAGRODĄ NOBLA 2000 Z MEDYCZYNY I FIZJOLOGII

NOBEL PRIZE 2000 IN MEDICINE AND PHYSIOLOGY
FOR THE STUDIES ON THE SIGNAL TRANSDUCTION
IN THE NERVOUS SYSTEM

Katarzyna RADWAŃSKA, Leszek KACZMAREK

Pracownia Neurobiologii Molekularnej,
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Warszawa

Streszczenie: Tegorocznymi laureatami nagrody Nobla z medycyny i fizjologii zostali Arvid Carlsson, Paul Greengard oraz Eric Kandel. Dokonali oni przełomowych odkryć dotyczących mechanizmów przekazywania informacji między komórkami nerwowymi oraz w ich wnętrzu. Carlsson stwierdził, że dopamina pełni funkcję aktywnej substancji przekazującej informacje na synapsach. Pokazał, iż obniżenie jej poziomu wywołuje zaburzenia ruchowe przypominające objawy choroby Parkinsona. Zaburzenia te można odwrócić podając prekursor dopaminy – L- dopa. Greengard wykazał, że przyłączenie neuroprzeźniacza do jego specyficznego receptora błonowego włącza kaskadę zjawisk mogących prowadzić do trwałych zmian w funkcjonowaniu komórki poprzez fosforylację białek. Opisał także funkcję białka DARP-32- inhibitora fosfatazy-1 proponując, że DARP-32 pośredniczy w modulowaniu wpływu dopaminy na działanie innych neuroprzeźniaczy (np. glutaminianu) w komórce nerwowej. Na podstawie badań elektrofizjologicznych i eksperymentów biochemicznych Eric Kandel stworzył model molekularnych zmian zachodzących w neuronie presynaptycznym i synapsie podczas tworzenia się pamięci średnio- i długotrwałej. Według Kandela podstawą pamięci średniotrwałej są przejściowe zmiany kowalencyjne białek, zaś pamięć długotrwała wymaga syntezy białek *de novo* oraz zmian w ekspresji genów, a także łączy się z trwałymi zmianami w morfologii zakończeń nerwowych. (*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28: 147–151)

Summary: Nobel laureates '2000 in Physiology and Medicine were Arvid Carlsson, Paul Greengard, and Eric Kandel. Their discoveries have been crucial for our understanding of the mechanisms of signal transduction inside and between neural cells. Carlsson discovered that dopamine is a neurotransmitter – the substance, which actively takes part in the signal transduction in synapses. He showed that its depletion results in movement dysfunction similar to one observed in Parkinson's disease. The symptoms could be treated with the dopamine precursor: L-dopa. Greengard showed that neurotransmitter, when

bound to its specific membrane receptor, turns on the cascade of processes which lead to long-lasting changes in the functioning of the nerve cell. He also provided evidence that phosphorylation of proteins is an important way to change their function and that this phenomenon is not only common in the cell but also crucial for its physiology. Describing the function of DARP-32 protein – the phosphatase-1 inhibitor, he proposed the model according to which DARP-32 could serve as a modulator of the influences of dopamine on other neurotransmitters, i.g., glutamate. Eric Kandel built the molecular model of the changes, in a presynaptic neuron and synapse, which occur during the formation of short- and long-term memory traces. According to Kandel during short-term memory formation some proteins are transiently phosphorylated, whereas the formation of long-term memory demands synthesis of new proteins, changes in gene expression and is followed by morphological changes of neuronal connections. (*Advances in Cell Biology 2001; 28: 147–151*)

Procesy przekazywania informacji od kilkudziesięciu lat stanowią jeden z dominujących kierunków badań biomedycznych. Dotychczas nagromadzona wiedza na temat wpływu substancji sygnałowych na funkcjonowanie komórek eukariotycznych pozwoliła na wyłonienie się nowej dyscypliny naukowej – biologii molekularnej komórki. Powstanie tej dziedziny jest wyrazem akceptacji bardzo ważkiej syntezy wiedzy biologicznej, która zachodzi na naszych oczach. O ile klasyczna komórkowa teoria budowy organizmów podnosiła kwestie strukturalne oraz podkreślała uniwersalne funkcje życiowe wypełniane przez wszystkie komórki, to współczesna biologia molekularna komórki skupia się właśnie na przekazie informacji. Ważnym osiągnięciem tej nowej dyscypliny jest zwrócenie uwagi na to, że bardzo podobny repertuar procesów molekularnych może być podłożem zupełnie różnych zjawisk.

Szczególną wiarę w odrębność swojego obiektu poznania przejawiali badacze mózgu. Do niedawna dość powszechnie uważano, że wyjaśnienia złożoności tak skomplikowanych procesów, jak np. uczenie się i pamięć, nie warto poszukiwać na poziomie molekularno-komórkowym. W tym kontekście należy przyjrzeć się dokonaniom tegorocznych laureatów Nagrody Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii, albowiem położyli oni wielkie zasługi w przełamaniu wspomnianego powyżej poglądu o wyjątkowej specyfice układu nerwowego.

Tegorocznymi laureatami nagrody Nobla z medycyny i fizjologii zostali Arvid Carlsson z Uniwersytetu w Goeteborgu, Paul Greengard z Uniwersytetu Rockefellera w Nowym Jorku oraz Eric Kandel z Uniwersytetu Columbia również w Nowym Jorku. Wszyscy trzej nagrodzeni dokonali przełomowych odkryć dotyczących mechanizmów przekazywania sygnału między komórkami nerwowymi oraz w ich wnętrzu.

Badania Arvida Carlssona przeprowadzone w latach pięćdziesiątych obaliły ówczesne poglądy, że dopamina jest jedynie prekursorem w syntezie noradrenaliny – uznanego już wtedy neuroprzekaźnika. Carlsson pokazał, że dopamina pełni funkcję aktywnej substancji przekazującej informację na synapsach. Dzięki stworzeniu metody pomiaru zawartości dopaminy Carlsson opisał jej lokalizację w mózgu.

Stąd wiemy, że występuje ona w szczególnie wysokim stężeniu w prążkowie – strukturze odpowiedzialnej za koordynację ruchów.

W serii kolejnych eksperymentów pokazał on, że sztucznie obniżony poziom dopaminy można podwyższyć przez obwodowe podanie substancji prekursorowej – L-dopa, która (w przeciwieństwie do dopaminy) może przekraczać barierę krew-mózg. Przez podanie rezerpiny, związku powodującego spontaniczne uwolnienie z pęcherzyków presynaptycznych niektórych neuroprzeźkaźników, jak np. dopaminy, Carlsson wywoływał u zwierząt eksperymentalnych drżenie kończyn, sztywność ruchów i akinezę – zaburzenia ruchowe przypominające objawy choroby Parkinsona. Tegoroczny laureat pokazał, że symptomy te można cofnąć podając zwierzętom L-dopa. Doprowadziło go to do kolejnego odkrycia, że pacjentów z chorobą Parkinsona rzeczywiście charakteryzuje obniżony poziom dopaminy w prążkowie. Poziom ten, jak pokazał Carlsson, można podwyższyć, a zatem cofnąć część objawów choroby podając L-dopa, która stała się w ten sposób pierwszym lekiem zwalczającym objawy choroby Parkinsona.

Carlsson dokonał także istotnych odkryć pozwalających na zrozumienie działania leków antypsychotycznych i antydepresyjnych. Jego odkrycia przyczyniły się do rozwoju produkcji leków przeciwdepresyjnych, których działanie polega na zablokowaniu w synapsie wychwytu zwrotnego, czyli doneuronalnego, monoamin, w tym dopaminy. Pokazał on także, że leki powszechnie stosowane w schizofrenii są antagonistami receptorów dopaminergicznych.

W latach sześćdziesiątych między innymi dzięki odkryciom Carlssona wiadomo było, że dopamina, serotonina czy noradrenalina są ważnymi neuroprzeźkaźnikami w ośrodkowym układzie nerwowym. Paul Greengard odkrył, w jaki sposób te neuroprzeźkaźniki działają i w jaki sposób dopamina może zmieniać stan fizjologiczny komórki nerwowej. Pokazał też, że fosforylacja białek zmienia ich właściwości i że jest to zjawisko częste oraz krytyczne dla ich funkcji fizjologicznych. Fosforylacja zazwyczaj, choć nie zawsze, aktywuje białka. Dzięki jego badaniom wiemy zatem także, że kinazy i fosfatazy mogą zmieniać aktywność komórki nerwowej. Greengard pokazał, że dopamina przyłącza się do receptorów znajdujących się w błonie cytoplazmatycznej. Włącza to całą kaskadę zjawisk, których charakter zależy od typu receptora komórkowego, z którym łączy się dopamina. Na przykład w wyniku działania dopaminy na receptor D1 wzrasta poziom cAMP, a co za tym idzie i aktywność kinazy zależnej od cAMP. Kinaza ta ma zdolność fosforylacji bardzo wielu białek pełniących zasadnicze funkcje w komórkach nerwowych. Wśród tych białek są białka kanałów jonowych i białka regulatorowe, jak np. DARPP-32, któremu to Greengard poświęcił całą serię eksperymentów. Dzięki niemu wiemy, że DARPP-32 występuje w komórkach nerwowych mających receptory dopaminowe D1. DARPP-32, jak wykazał to Greengard, po ufosforylowaniu przez kinazę zależną od cAMP ulega aktywacji i zaczyna działać jako inhibitor fosfatazy pierwszej. Pełni ono zatem istotną funkcję w regulacji poziomu fosforylacji białek w komórce

nerwowej. Greengard zaproponował także model, według którego białko DARPP-32 mogłoby pośredniczyć w modulowaniu wpływu dopaminy na działanie innych neuroprzekaźników (np. glutaminianu) w komórce nerwowej.

Eric Kandel badał tworzenie się pamięci średnio- i długotrwałej u ślimaka *Aplysia californica*. Zastosowanie tego prostego układu modelowego (*Aplysia* ma 20 tys. neuronów, a np. w mózgu człowieka jest ich 100 mld) do badań podstaw molekularnych pamięci stanowi jedną z największych zasług Kandela. Badacz ten skupił się na komórkach zwoju brzuszego, opisując początkowo ich udział w prostych sytuacjach uczenia się (habituaacja, sensytyzacja, warunkowanie). Następnie znakomicie uprościł model badawczy, przenosząc najważniejsze komórki do hodowli *in vitro* i tu analizował ich własności metodami elektrofizjologii i biologii molekularnej. Układ ten pozwolił mu na precyzyjne pomiary zjawisk fizjologicznych zachodzących na jednej określonej synapsie czuciowo-ruchowej. Na podstawie badań elektrofizjologicznych i eksperymentów biochemicznych, Kandel stworzył model molekularnych zmian zachodzących w neuronie presynaptycznym i synapsie podczas tworzenia się pamięci średnio- i długotrwałej. Według jego modelu powstawaniu śladu pamięciowego w synapsie czuciowo-ruchowej towarzyszy wzrost przewodności synaptycznej. Za sprawą serotoniny, uwalnianej przez neuron ułatwiający, następuje aktywacja cykazy adenylanowej w zakończeniu presynaptycznym neuronu czuciowego. To z kolei powoduje wzrost poziomu cAMP w tych zakończeniach. cAMP aktywuje kinazy fosforylujące kanały potasowe lub jedno z białek powiązanych z tym kanałem. Fosforylacja kanału redukuje prąd jonów K^+ przez kanał – istotny składnik repolaryzacji potencjału czynnościowego. Osłabienie prądu jonów potasu wydłuża potencjał czynnościowy – pozwala, aby więcej jonów wapnia napłynęło do zakończeń synaptycznych, czego konsekwencją jest podwyższony poziom uwalniania neuroprzekaźnika do synapsy czuciowo-ruchowej. Procesowi temu towarzyszy krótkotrwała fosforylacja istniejących już białek.

Według Kandela opisane powyżej zdarzenia towarzyszą powstawaniu pamięci średniotrwałej, trwającej parę godzin. Pamięć długotrwała, trwająca dni, powstaje w tym samym *locus* co pamięć średniotrwała, a przejście między tymi dwoma zjawiskami wydaje się mieć charakter ciągły. Pamięć długotrwała wymaga jednak syntezy białek *de novo* oraz zmian w ekspresji genów, a także łączy się z trwałymi zmianami w morfologii zakończeń nerwowych. Pamięć długotrwałą mierzoną jako długotrwałe wzmocnienie synaptyczne na synapsie czuciowo-ruchowej u *A. californica* można zablokować podając inhibitory syntezy mRNA i białek. W ostatnim dziesięcioleciu Kandel i jego współpracownicy poświęcili bardzo wiele uwagi szlakom informacji docierającym od pobudzonej błony cytoplazmatycznej do jądra komórkowego i od jądra do zmienionych synaps. Szczególną rolę przypisują tu czynnikowi transkrypcyjnemu CREB.

Oczywiście nagrodzenie w 2000 r. trójki wymienionych badaczy jest wyrazem pewnego, arbitralnego wyboru. Odkrycia wielu przekaźników nerwowych nie do-

czekały się uhonorowania nagrodą Nobla. Podobnie wielu było badaczy procesów fosforylacji białek w komórkach nerwowych, którzy dokonywali bardzo znaczących odkryć w tym samym czasie co Greengard. Niemniej liczne były i są rzesze uczonych zgłębiających tajniki molekularnych podstaw pamięci. Za wcześnie jest nawet na stwierdzenie, czy mechanizmy, o których uznanie walczy Kandel, są rzeczywiście ważne w tworzeniu śladów pamięciowych u ssaków, w tym i ludzi. Warto tu np. zwrócić uwagę, że Kandel forsuje rolę procesów zachodzących po stronie pre-synaptycznej, które wpływają na zmienne wydzielanie neuroprzekaźnika. Natomiast z tego, co wiemy dotychczas u ssaków, zmiany siły połączeń synaptycznych zależą raczej od strony postsynaptycznej i jej zmodyfikowanej wrażliwości. Wyrażone wątpliwości co do szczegółów rozwiązań molekularnych leżących u podstaw wybranych czynności ośrodkowego układu nerwowego nie umniejszają jednak przełomowego znaczenia opisanych tu dokonań. Przyczyniły się one bowiem w wielkiej mierze do przyjęcia wśród badaczy mózgu poglądu, że wewnątrzneuronalny przekaz informacji jest w zasadzie taki sam jak w innych komórkach i że jego zrozumienie może doprowadzić nas do wyjaśnienia najbardziej złożonych czynności ludzkiego umysłu.

LITERATURA

- ALBRIGHT TD, KANDEL ER, POSNER MI. Cognitive neuroscience. *Curr Opin Neurobiol* 2000; **10**: 612–624.
- ALBRIGHT TD, JESSELL TM, KANDEL ER, POSNER MI. Neural science: a century of progress and the mysteries that remain. *Neuron* 2000; **25** Suppl:S1–55.
- ALLEN PB, HSIEH-WILSON L, YAN Z, FENG J, OUMET CC, GREENGARD P. Control of protein phosphatase I in the dendrite. *Biochem Soc Trans* 1999; **27**: 543–546.
- CARLSSON A, WATERS N, WATERS S, CARLSSON ML. Network interactions in schizophrenia – therapeutic implications. *Brain Res Rev* 2000; **31**: 342–349.
- CARLSSON A, HANSSON LO, WATERS N, CARLSSON M L. A glutamatergic deficiency model of schizophrenia. *Br J Psychiatry* 1999; Suppl. **37**: 2–6.
- CARLSSON A. Thirty years of dopamine research. *Adv Neurol* 1993; **60**: 1–10.
- COWAN WM, HARTER DH, KANDEL ER. The emergence of modern neuroscience: some implications for neurology and psychiatry. *Annu Rev Neurosci* 2000; **23**: 343–391.
- GREENGARD P, ALLEN PB, NAIRN AC. Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Annu Rev Neurosci* 2000; **23**: 435–447.
- KANDEL ER, PITTENGER C. The past, the future and the biology of memory storage. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1999; **354**: 2027–2052.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 10.01. 2001 r.

Przyjęto: 11.01. 2001 r.

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

email: leszek@nencki. gov. pl; <http://neurogene.nencki.gov.pl>

SPRAWOZDANIE ZARZĄDU FUNDACJI BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ ZA ROK 2000

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

W obecnym okresie sprawozdawczym Zarząd działał w niezmiennym składzie: Jerzy Kawiak – prezes, Maciej Nałęcz – v-prezes, 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 Stojałowska, 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.

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. Koedytorami Redakcji są: 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.

Merytoryczna piecza i decyzje o składzie redaktorów należą do Polskiego Towarzystwa 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 „Folia” są indeksowane w: Medline, Biological Abstracts, Excerpta Medica, Index Medicus, SciSearch, Research Alert. Impact Factor podniósł się z IF = 0,289 w roku 1998 do IF = 0,712 w roku 1999. Informacje na ten temat można uzyskać np. pod telefonem 022-660-7300 w Politechnice Warszawskiej.

B. *Postępy Biologii Komórki*

Czasopismo ukazywało się regularnie w nowej formie. Okładka czasopisma, spis artykułów, informacje o redaktorach i czasopiśmie są obecnie w j. polskim i j. angielskim. Założono okno internetowe „Postępów”, gdzie oprócz informacji o czasopiśmie są bieżąco publikowane tytuły artykułów i ich streszczenia. Adres internetowy okna jest: www.mol.uj.edu.pl/pbk.

W dalszym ciągu wydawano suplementy. Suplementy ukazały się pod redakcją: Ryszarda Słomskiego – supl. 14 – Problemy biologii molekularnej 2, Małgorzaty Balińskiej i Janusza A. Siedleckiego – supl. 15 – Nowotwory: biologia, genetyka, immunologia oraz

Zofii Osuchowskiej i Jerzego Kawiaka – 28 Konferencja Biologii Komórki w Warszawie – Różnicowanie komórek Eukaryota.

Merytoryczną pieczę nad „Postępami” ma od 28 lat Polskie Towarzystwo Anatomiczne oraz od 7 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 Spółce z o.o. „Wieś Jutra”, ul. Świętokrzyska 20, pok. 323, Warszawa. Firma „Script” wspomagała współpracę z drukarniami.

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. Fundacja finansuje z własnych dochodów 20–40% kosztów wydawania czasopism. Dochody Fundacji pochodziły 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”. Praca członków Zarządu i Rady Fundacji, redaktorów oraz recenzentów wykonywana jest społecznie. Stan konta na dzień 12.12.2000 jest dodatni i wynosi 9085,18 zł, fundusz stypendialny na dzień 30.11.2000 wynosi 2606,36 zł. Fundusz stypendialny został uzupełniony przekazaniem w dniu 14 lipca 2000 sumy 860,- zł z konta Fundacji celem umożliwienia założenia lokaty.

Warszawa, grudzień 2000

Prezes Fundacji

Sekretarz

Jerzy Kawiak

Maciej Zabel

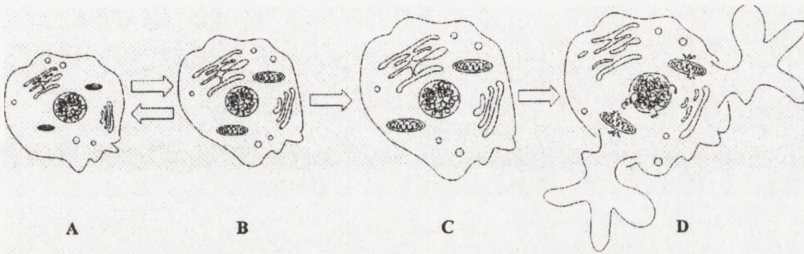
ERRATA

do pracy: D. Sulejczak: Apoptoza i metody jej identyfikacji
(*Post Biol Kom* 2000; 27: 527–568)

na str. 529 tabela 1 i rys. 1 powinny przedstawiać się następująco:

TABELA 1. Zmiany rejestrowane w komórce podczas nekrozy

Zmiany morfologiczne	Zmiany biochemiczne	Odpowiedź tkankowa
<ul style="list-style-type: none"> • utrata integralności błony komórkowej • pęcznienie cytoplazmy i mitochondriów • pęcznienie i dezintegracja organelli komórkowych • liza komórki 	<ul style="list-style-type: none"> • zaburzenia funkcji transporterów, kanałów jonowych • cięcie DNA w miejscach przypadkowych • proces pasywny, niezależny od ATP, przebiega również w 4°C 	<ul style="list-style-type: none"> • wywołwana przede wszystkim przez czynniki patogenne: wirusy wywołujące lizę komórki, hipotermia, • hipoksja, ischemia, trucizny metaboliczne • dotyka całych grup komórek w tkance • fagocytoza przez makrofagi • odczyn zapalny



RYSUNEK 1. Schemat zmian morfologicznych obserwowanych w komórce w przebiegu martwicy: A – komórka prawidłowa; B – pierwsze stadium nekrozy; pęcznienie komórki; na tym etapie jest to proces odwracalny; w sytuacji, gdy uszkodzenia komórki wywołujące uruchomienie procesu nekrotycznego zostaną naprawione, komórka może powrócić do stanu prawidłowego; C – nieodwracalne pęcznienie komórki i organelli komórkowych; morfologia jądra komórkowego i chromatyny pozostaje niezmiennona na tym etapie trwania procesu; D – dezintegracja komórki i jej organelli, w tym również losowe cięcie DNA; przez uszkodzoną błonę komórkową zawartość komórki wydostaje się do przestrzeni międzykomórkowej wywołując stan zapalny

na str. 532 podpis pod rys. 3 powinien brzmieć:

RYSUNEK 3. Schemat elektroforetycznego rozdzielania DNA pozyskanego z komórek apoptycznych i nekrotycznych: A – DNA komórek apoptycznych jest cięte przez specyficzną nukleazę CAD między nukleosomami; miejsca cięcia DNA zaznaczono grotami strzałek; w celu uzyskania większej przejrzystości schematu dokonano pewnych uproszczeń: cząstki rdzeniowe nukleosomów, które w rzeczywistości składają się z 8 cząsteczek białek histonowych owiniętych dwukrotnie nicią DNA, przedstawiono jako jednokrotny splot DNA wokół 4 cząsteczek białek histonowych; pominięto również pojedyncze cząsteczki białek histonowych związane z DNA łączącym sąsiadujące cząstki rdzeniowe; B – w trakcie rozdzielania w żelu elektroforetycznym powstałe odcinki DNA formują prążki tworzące charakterystyczny obraz drabinki; na rysunku przedstawiającym schematycznie komórkę apoptyczną pokazano dwie frakcje DNA: czarne kółka obrazują frakcje znajdującego się wewnątrz jądra komórkowego skondensowanego HMW DNA, natomiast małe, czarne znaczki symbolizują LMW DNA, którego część przez pory w błonie jądrowej przemieszcza się do cytoplazmy komórki apoptycznej; C – dostępny na całej długości dla enzymów nukleolitycznych materiał genetyczny komórek nekrotycznych (prawa część rysunku) ulega całkowitej destrukcji, a powstałe fragmenty DNA tworzą ciągłą smugę w żelu elektroforetycznym

na str. 540 podpis pod rys. 5 wiersz 3 od góry:

jest – regulują wypływ cytochromu do cytozolu znajdującego się...

powinno być – regulują wypływ do cytozolu cytochromu c znajdującego się..

na str. 548 brak końca podpisu pod rys. 9, który brzmi: *Gwiazdki wskazują ciątka apoptotyczne (pow. 340x)*

na str. 556 wiersz 26 od góry: *jest* – (*terminal deoksynukleotydyl transferase mediated d-UTP nick end-labeling*) *powinno być* – (*terminal deoksynucleotidyl transferase mediated d-UTP nick end-labeling*)

na str. 560 tab. 7 powinna przedstawiać się następująco:

TABELA 7. Porównanie wybranych metod wykrywania komórek apoptotycznych

Technika detekcji komórek apoptotycznych	Szybkość przeprowadzenia analizy	Specyficzność wykorzystywanej metody – rozróżnienie między komórkami		Analiza	
		prawidłowymi a apoptotycznymi	nekrotycznymi a apoptotycznymi	całej populacji komórek w badanej próbie lub pre-paracie	konkretnych komórek z populacji
Obserwacja mikroskopowa zmian morfologii komórek	++(szybka, najdłuższym etapem jest przygotowanie materiału do oglądania pod mikroskopem)	++ (jednoznaczna ocena zmian morfologii komórek)	++ (jednoznaczna ocena zmian morfologii komórek)	++	++
Znakowanie komórek barwnikami (w tym fluorochromami)*	++ (kilka minut)	++(dzięki uwidocznieniu morfologii komórki lub jej organelli, pozwala na jednoznaczną ocenę jej stanu)	++(dzięki uwidocznieniu morfologii komórki lub jej organelli, pozwala na jednoznaczną ocenę jej stanu)	++	++
Test przepuszczalności błony komórkowej	++	++	+/-	-	++
Rejestracja zmian w budowie błony komórkowej (translokacja FS)	++ (kilka godzin)	+/- (nieswoista, wymaga dodatkowych testów)	+/- (nieswoista, wymaga dodatkowych testów)	-	++
Pomiar aktywności kaspazy 3	+	++	++	++	-
ISNT	+/- (kilka godzin)	+/- (znakują również komórki dzielące się)	+/- (wymaga dodatkowych testów)	++	++
TUNEL	+/- (kilka godzin)	+(jw., choć metoda bardziej specyficzna)	+(jw., choć metoda bardziej specyficzna, istnieje możliwość rozróżnienia po wielkości jąder komórkowych)	++	++
Detekcja LMW i HMW frakcji DNA w poszczególnych komórkach	++	++	+/-	-	++
Rozdział elektroforetyczny DNA**	- (kilkanaście godzin)	++(wynik jednoznaczny)	++(wynik jednoznaczny)	++	-

*Znakowanie komórek barwnikami fluorescencyjnymi przewyższa czułością znakowanie barwnikami konwencjonalnymi. Daje również możliwość uzyskania większej ilości danych o kwasach nukleinowych oraz pozwala na jednoczesne znakowanie wielu markerów w badanej komórce. Ze względu na nietrwałość znacznika, tzw. wyświecanie się preparatów, minusem znakowania fluorochromami jest często konieczność krótkiego czasu obserwacji materiału.

**Mankamentem tej techniki jest konieczność dysponowania dużą próbą materiału w przypadku heterogennej populacji komórek, z której tylko pewna ich część ulega apoptozie. W sytuacji, gdy komórki apoptotyczne stanowią tylko niewielki procent badanej populacji komórek, typowego dla apoptozy rozdziału elektroforetycznego nie można w ogóle wykryć.

Nr 1

Wykaz recenzentów z 1999 r. tomu 26.	1
W tym Zeszycie	2
KACZANOWSKA J.: Günter Blobel – Nobel 1999	3
MATYSIAK R., LORENC-PLUCIŃSKA G.: Cykl ksantofilowy w warunkach stresu abiotycznego The xanthophyll cycle under abiotic stress	17
MOTYL T., GAJKOWSKA B., PIOSZAJ T., WAREŃSKI P., ORZECZOWSKI A., ZIMOWSKA W., WOJEWÓDZKA U., RYNIWICZ Z., REKIEL A.: Rola Bax i Bcl-2 w regulacji apoptozy komórek nabłonka gruczołu mlekowego Role of Bax and Bcl-2 in regulation of mammary epithelial cells apoptosis	31
KMIĘCIAK D., TRZECIAK W. H.: Efekty cytotoksyczne w infekcji wirusem HIV-1, wywołane za pośrednictwem glikoproteiny 120 Glycoprotein 120-mediated cytopathic effects in HIV-1 infection	53
KMIĘCIAK D., TRZECIAK W. H.: Wykorzystanie produktu białkowego genu <i>env</i> , gp160, do immunizacji przeciwkowsirusowi HIV-1 Application of protein product of the <i>env</i> gene, gp160, in the immunization against HIV-1 virus	69
BRZEZIŃSKA A., BALIŃSKA M.: Rola homocysteiny w procesie rozwoju zmian miażdżycowych na poziomie komórkowym Role of homocysteine in progress of atherosclerosis on cellular level.	81
ZAGÓRSKA-MAREK B.: O przyczynach zmienności planu budowy kwiatu Mechanisms of patterning in flowers	97
LACHOWICZ A., RĘBAS E., ŻYLIŃSKA L., LACHOWICZ L.: Różnorodne aspekty działania kinaz białkowych w apoptozie* Various aspects of protein kinases action in apoptosis	111
ŁAZARCZYK M., GRZELA T.: Rodzina peptydów z domeną koniczyno-podobną Family of trefoil peptides	123
JACKOWSKI G.: Struktura i właściwości funkcjonalne fotosystemu I The structure and functional properties of photosystem I	137
Wskazówki przygotowania rysunów i streszczeń do publikacji w PBK	151
Warunki prenumeraty kwartalnika PBK	151

Nr 2

W tym Zeszycie	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 naczyń 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

Nr 3

W tym Zeszycie	293
ROSZEK K., GNIOT-SZULŻYCKA J. Wielorakie formy pęcherzyków opłaszczonych klatryną zależnym od receptorów transporcie i segregacji makromolekuł Diverse forms of clathrin coated vesicles in receptor mediated transport and segregation of macromolecules	295
WOJTASZEK P. Czym jest komórka roślinna? Miejsce ścian komórkowych What is a plant cell? Position of plant cell walls	315
KOWALCZYK A. Czy zwierzęta z celowaną modyfikacją genomu są wiarygodnym modelem badawczym? Lekcje z neurobiologii Do animals with targeted genomic modification provide reliable research model. Lessons from the neurobiology	325
JUCZEWSKA M., CHYCZEWSKA E., NAUMIK W., NIKLIŃSKA W. Udział komórek tucznych w angioneogenezie The role of mast cells in angiogenesis	343
BOCIAN E. Disomia jednorodzielska (UPD) u człowieka. Mechanizm powstawania i skutki kliniczne Uniparental disomy (UPD) in man. The origin and clinical consequences	359
WÓJCIK C., WÓJCIK M. Niebiałkowe inhibitory kinaz zależnych od cyklin Non-proteinaceous inhibitors of the cyclin-dependent kinases	377
KOWALCZYK S., JAKUBOWSKA A. Gibereliny – Percepcja i transdukcja sygnału Gibberellins – Signal perception and transduction	397
FABCZAK H., FABCZAK S. Mechanizm reakcji fotofobowej u pokrewnych orzęsków <i>Stentor coeruleus</i> i <i>Blepharisma japonicum</i> Mechanism of photophobic response in ciliate <i>Stentor coeruleus</i> and related <i>Blepharisma japonicum</i>	425
KRZEŚLAK A., LIPIŃSKA A. O-Glikozylacja białek jądrowych O-Glycosylation of nuclear proteins	441
Wskazówki przygotowania rysunków i streszczeń do publikacji w PBK	461
Warunki prenumeraty kwartalnika PBK	461

Nr 4

W tym Zeszycie	465
BEDNARSKA E., LENARTOWSKA M.: Rola wapniowego systemu przekazywania sygnałów w regulacji wzrostu łagiewek pyłkowych Role of calcium signalling in the pollen tube growth regulation	467

CISZAK L., WOŁOWIEC D., KOSMACZEWSKA A., BOĆKO D., FRYDECKA I.:	
Białko p27: Budowa, funkcje biologiczne oraz udział w patomechanizmie procesów rozrostowych	
Cyclin-dependent kinase inhibitor p27: Structure, role in cell physiology and in malignancies	481
BRYNIARSKI K.: Makrofagi gonady męskiej	
Testicular macrophages	505
SULEJCZAK D.: Apoptoza i metody jej identyfikacji	
Apoptosis and methods of identification of this phenomenon	527
KUBIAK J. Z.: Cykl komórkowy – dwie konferencje w 30-lecie badań	
Cell cycle – two conferences for 30 th anniversary of studies	569
WIDŁAK P.: Mechanizmy fragmentacji DNA i kondensacji chromatyny w komórkach ulegających apoptozie	
Mechanisms of DNA fragmentation and chromatin condensation in cells undergoing apoptosis	583
ŻEROMSKI J.: Miejsce i rola molekuly CD56/NCAM w biologii i medycynie	
Place and role of CD56/NCAM molecule in biology and medicine	599
JÓZEFOWSKI S.: Detekcja i transdukcja sygnału w reakcjach odpornościowych roślin.	
I. Rozpoznanie i wczesne etapy transdukcji sygnału	
Signal detection and transduction involved in plant disease resistance. I. Recognition and early signal transduction	609
JÓZEFOWSKI S.: Detekcja i transdukcja sygnału w reakcjach odpornościowych roślin. II.	
Aktywacja transkrypcji genów.	
Signal detection and transduction involved in plant disease resistance.	
II. Defense gene activation	623
JAKUBOWSKA A., KOWALCZYK S.: Kwas abscysynowy – Percepcja i transdukcja sygnału	
Abscisic acid – Perception and signal transduction	633
Wskazówki przygotowania rysunków i streszczeń do publikacji w PBK	657
Warunki prenumeraty kwartalnika PBK	657
Komunikat	658
Errata	659

Wskazówki przygotowania rycin 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. Rysunki, schematy zdjęcia i wykresy w podpisach i w powołaniach w tekście powinny nosić nazwę rycina (Ryc.) i być numerowane kolejno.

Streszczenie ma mieć następującą strukturę:

j. polski

Podstawy zagadnienia: jedno zdanie
Podtytuły: do każdego podtytułu 3–5 zdań
Wnioski: 2 zdania
Słowa kluczowe: do 8 słów

j. angielski

Background:
Subtitles:
Conclusions:
Key words:

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

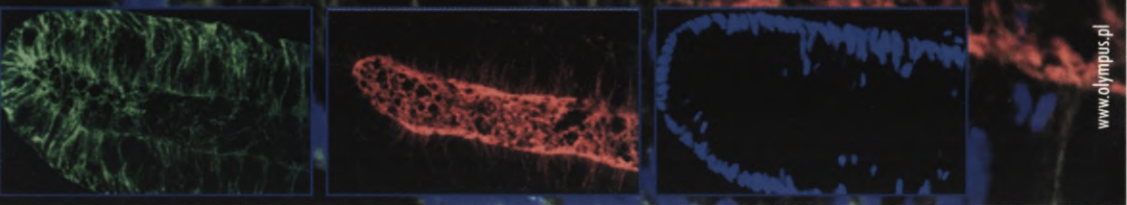
Prosimy również Autorów o podawanie adresów e-mail, o ile je mają.

Cennik odbitek prac dla Autorów w 2001 r.

Liczba odbitek	50	100	200	400
Cena zł	40,00	60,00	80,00	100,00

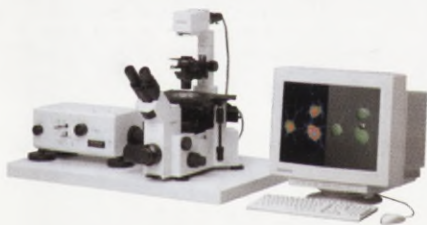
Zamówienie na odbitki musi być złożone wraz z przesłaną korektą pracy.

Seria FLUOVIEW 300/500



www.olympus.pl

NOWOCZESNE ROZWIĄZANIE DLA UŻYTKOWNIKÓW INDYWIDUALNYCH I GRUP BADAWCZYCH



FV300 druga generacja systemu osobistego oferowana w zaawansowanej konfiguracji przy atrakcyjnej cenie. Wyższa jakość obrazu – grafika 12 bitowa, rozdzielczość 2048x2048 pikseli. Wysoka szybkość skanowania – do 4 ramek/sekundę w rozdzielczości 512x512. Łatwe i przyjazne dla użytkownika oprogramowanie.



FV500 w pełni zautomatyzowany system do różnorodnych zastosowań. Możliwość użycia laserów UV, światła widzialnego i podczerwonego poprzez 3 zintegrowane porty. Dostępne aż do 5 detektorów do symultanicznej obserwacji pojedynczych kanałów. W pełni zautomatyzowana akwizycja obrazu z możliwością sterowania wszystkimi funkcjami mikroskopu AX70 PROVIS.

Więcej informacji pod adresem: Olympus Optical Polska sp. z o.o., ul. Świętojerska 5/7, 00-236 Warszawa, tel. +48 (22) 860 00 77, fax +48 (22) 831 04 53, e-mail: mikroskopy.polska@olympus-europa.com, www.olympus.pl



OLYMPUS

THE VISIBLE DIFFERENCE

<http://fcin.org.pl>

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, niepublikowane 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 wysłania do redakcji);
- 3) listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przesyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 w układzie normalnym 1800 znaków na stronie. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki s. 160) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nienumerowana 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 rycin. 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). Następną stroną 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 rycin, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, ryc. 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 *Physarum polycephalum*. *Exptl Cell Res* 1980; 2: 41–48.

Tabele, opisy schematów i rycin 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 blyszczącym papierze. **Barwne ryciny i zdjęcia są płatne.** Wymiary poszczególnych rycin, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmienionej formie. Wszystkie załączniki, np. wykaz skrótów, muszą mieć na odwrocie nazwisko I. autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji. 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 kopie pracy wraz z rycinami na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego		
Jest zgoda osób, których informacje niepublikowane są zamieszczone w tekście artykułu	<i>tak</i>	<i>nie</i>	z komputera IBM	<i>tak</i>	<i>nie</i>
			Odpowiadam za całość pracy opisaną w zał. maszyn.	<i>tak</i>	<i>nie</i>

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

podpisy wszystkich autorów

TREŚĆ – CONTENTS

W tym Zeszycie „Postępów Biologii Komórki”	1
Wykaz recenzentów z tomu 27, 2000 – Referee of the volume 27, 2000	1
BOBIŃSKI R., OLCZYK K., WISOWSKI G., JARCO K.: Gliplikany – The glypicans	3
SIMEONOVA E., MOSTOWSKA A.: Biochemiczne i molekularne aspekty starzenia się liści – Biochemical and molecular aspects of leaf senescence	17
KUKULSKI F., KOMOSZYŃSKI M.: Sygnałowa funkcja ATP w centralnym układzie nerwowym – Signal functions of ATP in the central nervous system	33
MILLER A., JĘDRZEJCZAK W. W.: Komórki dendrytyczne w immunoterapii Dendritic cells for immunotherapy	51
KACZANOWSCY A. i J.: Mechanizmy przestrzennego różnicowania zarodka Embryon spatial differentiation mechanisms	69
DOSZCZAK M. M., PIERZCHAŁSKI A., BIGDA J.: Mechanizmy sygnalizacji interleukiny 1 Mechanisms of interleukin 1 signal transduction	99
DRELA N.: Wykrywanie wewnątrzkomórkowych cytokin metodą cytometrii przepływowej – Zastosowanie i problemy Detection of intracellular cytokines by flow cytometry: Application and problems	129
RADWAŃSKA K., KACZMAREK L.: Badania nad przekaźnictwem informacji w układzie nerwowym uhonorowane nagrodą Nobla 2000 z medycyny i fizjologii Nobel Prize 2000 in Medicine and Physiology for the studies on the signal transduction in the nervous system	147
Sprawozdanie Zarządu Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej za rok 2000	153
Errata	155
Treść tomu 27, 2000 – Contents of the volume 27, 2000	157
Wskazówki przygotowania rycin i streszczeń do publikacji w PBK	160

Warunki prenumeraty kwartalnika PBK

Prenumerata na rok 2001

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 2001 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 W-wa; Bank Polska Kasa Opieki SA, IV O/Warszawa 12401053-40006576-2700-401112-001.
Cena prenumeraty rocznika na rok 2001:

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

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2001 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.