

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE

**TOM 18-NR 2'91**  
(77-152)

# Postępy Biologii Kórnórki

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego wydawany z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

**Redaguje Kolegium:**

Szczepan BILIŃSKI, Jerzy KAWIAK, Maciej KAWALEC, Wicenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA, Maciej ZABEL

**Rada Redakcyjna:**

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

---

Fundacja ● ROZWÓJ SGGW-AR ●

---

Ark. wyd. 6,1 Ark. druk. 4,75

Oddano do składu w maju 1991 r. Podpisano do druku w czerwcu 1991 r. Druk ukończono w lipcu 1991 r.

Wykonano w Zakładach Graficznych Wydawnictw Naukowych, Łódź, ul. Żwirki 2

---

# ONKOGEN JĄDROWY *JUN* JAKO PRZYKŁAD REGULATORA EKSPRESJI GENÓW PRZEZ BIAŁKA SPECYFICZNIE WIĄŻĄCE DNA

## NUCLEAR ONCOGEN *JUN* AS AN EXAMPLE OF GENE EXPRESSION REGULATOR BY DNA BINDING PROTEINS

Mariusz ŻMIJEWSKI

Zakład Histologii i Embriologii, Instytut Biostruktury Akademii Medycznej  
w Warszawie

*Streszczenie.* W artykule przedstawiono poglądy na temat onkogeny jądrowego *jun*. Opisano jego odkrycie, postaci, lokalizację chromosomalną w genomie ludzkim oraz mechanizm działania produktu onkogeny w komórce.

*Słowa kluczowe:* onkogeny jądrowe, białka wiążące DNA.

*Summary.* In this paper a review of literature on *jun* oncogen has been presented. Discovery, forms, chromosomal localisation of the *jun* in the human genom and mechanism in which the *jun* product act has been described.

*Key words:* nuclear oncogen *jun*, DNA binding proteins.

### WSTĘP

Badania nad transformacją nowotworową, retrowirusami i onkogenami doprowadziły do odkrycia, że onkogeny stanowią odmianę genów struktury (genów kodujących określone białka). Znajdują się one w genomie każdej komórki, gdzie podlegają umiarkowanej i kontrolowanej ekspresji. Dopiero nadmierna lub nieprawidłowa ich ekspresja doprowadza do nabycia przez komórki cech nowotworowych. Komórkowymi odpowiednikami onkogenów wirusowych: v-onkogenów są onkogeny komórkowe: c-onkogeny, a ściślej rzecz biorąc protoonkogeny. Jakkolwiek są one homologiczne z onkogenami wirusowymi, to jednak nie są z nimi identyczne. To co odróżnia v-onkogeny od protoonkogenów to:

- ◆ brak intronów,
- ◆ obecność punktowych mutacji obejmujących 1–2% długości genu,
- ◆ obecność delecji lub inwersji odcinków kwasu nukleinowego w stosunku do odpowiednich protoonkogenów,
- ◆ obecność fragmentów genomu nie występujących w *c-onc* [19].

Produkty protoonkogenów zaliczane są do białek. Pełnią kluczową rolę w aktywności życiowej komórek regulując ich wzrost, namnażanie i różnicowanie. W zależności od rodzaju tkanki oraz stopnia jej dojrzałości różne jest stężenie produktów poszczególnych protoonkogenów.

Wśród białek kodowanych przez protoonkogeny i onkogeny znajdują się:

- czynniki wzrostu: białko *p28* będące produktem onkogeny *c-sis*, identyczne z łańcuchem B płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGF) [44], produkty onkogenów: *int-2* oraz *kfgf/hst* pokrewne czynniki wzrostu fibroblastów [28, 49], białka kodowane przez onkogeny: *abl*, *fes*, *yes*;

- receptory dla hormonów i czynników wzrostu oraz kinazy związane z tymi receptorami: onkogen *c-erbB*, oraz *c-neu/erbB-2* koduje receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu [44,48], *c-fms* receptor dla hemopoetycznego czynnika wzrostu CSF-1 [44], onkogen *mas* koduje receptor dla angiotensyny [18], *c-erbA* receptor dla hormonów tarczycy; onkogen *c-src* kinazę białkową związaną z receptorem dla PDGF;

- kinazy białkowe modulujące przemiany informatorów II rzędu: kinaza treoninowa kodowana przez onkogen *ras* mająca zdolność cyklicznego wiązania i hydrolizy GTP, kinaza tyrozynowa kodowana przez onkogen *src* modulująca cykl przemian fosfatydyloinozytolu [19].

Wymienione powyżej czynniki zaliczane są do grupy informatorów I i II rzędu. Regulują one czynności życiowe komórki na poziomie błony komórkowej i cytoplazmy. Czas trwania efektów ich działania nie przekracza godzin. Jednak do wywołania trwałej zmiany aktywności komórki trwającej dni i tygodnie wymagana jest zmiana w funkcjonowaniu aparatu genetycznego komórki, polegająca na aktywacji jednych i represji innych genów [20, 21].

Odkąd stało się wiadome, że czynniki wzrostu wiążą się ze swoimi receptorami aktywują kaskadę wewnątrzkomórkowych przekaźników, a aktywacja ta prowadzi do modulacji ekspresji genów, powstały uzasadnione przypuszczenia o możliwym fizjologicznym współdziałaniu między produktami poszczególnych protoonkogenów w komórce [3].

Regulacja ekspresji genów dokonywana jest przez białka znajdujące się na terenie jądra komórkowego. Białka te wg jednej z teorii [21] zaliczane są do informatorów III rzędu. Są one produktem "genów zależnych od aktywacji" lub "natychmiastowych" (*immediate early genes*). Geny te aktywowane są w przeciągu minut od zadziałania na komórkę czynników wzrostowych (PDGF) lub niektórych substancji mitogennych, takich jak: estry forbolu, surowica. Produkty aktywacji tych genów wchodzi w skład puli białek jądrowych i biorą udział w regulowaniu transkrypcji genów.

W połowie lat osiemdziesiątych odkryto klasę onkogenów, których produkty białkowe znalezione zostały na terenie jądra komórkowego. Sugerowało to udział tych produktów w funkcjonowaniu genomu. Tę klasę onkogenów nazwano onkogenami jądrowymi. Należą do nich geny: *fos*, *myb*, *myc*, *rel*, *erbA*, *ski*, *B-lym*, *jun* [1, 5]. Produkty niektórych z tych genów mają zdolność łączenia się z DNA: niespecyficznego – *myc* lub specyficznego – *fos*, *jun*. Mechanizm działania produktów tych onkogenów nie został do tej pory całkowicie poznany. Rozważa się ich wpływ na ekspresję innych genów poprzez: metylację i hipome-

tylację DNA, zmianę wrażliwości DNA na działanie DNAazy, wiązanie się z promotorami lub wzmacniaczami określonych genów oraz działanie w roli trans i cis aktywatorów transkrypcji [19].

## ONKOGEN JĄDROWY JUN

Onkogen *jun* odkryty został podczas badań kurzych wirusów onkogennych. W genomie tej grupy wirusów znaleziono wiele onkogenów: *src*, *myb*, *myc*, *fps*, *yes*, *erb-A*, *erb-B*, *ros* [45]. Stanowiło to silny bodziec do poszukiwania nowych genów w tej grupie wirusów. W 1987 r. Yoshio Maki badał genom wyizolowanego z mięsaków kur retrowirusa ptasiego ASV17 (*avian sarcoma virus 17*). Wirus ten wykazuje cechy świadczące o obecności w jego genomie onkogeny:

- Zdolny jest do szybkiej indukcji włóknakomięsaków u kur.
- Wywołuje transformację nowotworową kurzych fibroblastów w hodowli.
- Jest wirusem defektywnym w replikacji, którą to cechę ma większość wirusów zawierających w swym genomie onkogeny.

Mały genom wirusa ASV17 nie zawiera sekwencji homologicznych do genu *pol*, kodującego u retrowirusów odwrotną transkryptazę. Do replikacji ASV17 wymaga obecności innego wirusa tzw. pomocniczego, np. ALHV (*avian helper leukosis virus*), zawierającego w swym genomie gen odwrotnej transkryptazy *pol*. Dopiero równoczesne zakażenie komórek wirusami ASV17 i pomocniczym wirusem powoduje uwolnienie z zakażonych komórek cząstek wirusa ASV17 zdolnych do zainfekowania innych komórek [27].

Aby uzyskać informację, czy hipotetyczny onkogen wirusa ASV17 wykazuje podobieństwo do znanych onkogenów, wyizolowano DNA z zakażonych wirusem komórek i pocięto je na fragmenty za pomocą enzymów restrykcyjnych. Otrzymane w ten sposób fragmenty DNA sklonowano w bakteriofagu  $\lambda$ , a następnie namnożono w szczepie bakteryjnym *E. coli*. Skonstruowana w ten sposób biblioteka genów służyła jako rezerwuuar materiału genetycznego wirusa, potrzebnego do dalszych badań. Stosując technikę hybrydyzacji molekularnej, wykazano brak homologii pomiędzy sekwencją genomu ASV17 a próbkami znanych onkogenów: *erbA*, *erbB*, *myc*, *myb*, *fps*, *rel*, *yes*, *src*, *Ha-ras*, *Ki-ras*, *fes*, *fms*, *sis*, *mos*, *abl* [27, 46]. Stało się to bodźcem do dalszych badań zmierzających do ustalenia sekwencji i właściwości nowego onkogeny.

Sekwencjonując aktywne biologicznie klony wirusa [27] ustalono mapę genetyczną wirusa ASV17 oraz potencjalnego onkogeny. Genom długości 3,5 kb zawierał sekwencje *gag* i *env* otaczające przypuszczalny onkogen długości 935 nukleotydów. Nowy onkogen od innych onkogenów obecnych w genomach ptasich retrowirusów odróżniał brak domen specyficznych dla genów kodujących kinazę tyrozyny, którą to cechę wykazywały wszystkie poznane dotychczas onkogeny tej grupy wirusów.

Nowo odkryty onkogen wirusa ASV17 został nazwany przez swego odkrywcę słowem – *jun*, wywodzącym się z japońskiego *ju-nana* oznaczającego liczbę 17 [27].

Stosując skonstruowaną sondę DNA, specyficzną dla sekwencji *jun*, przebadano DNA pochodzące od różnych gatunków kręgowców. Homologiczne do *jun* sekwencje znaleziono w genomach: kur, myszy, szczurów, przepiórki japońskiej i człowieka [27]. Obecność sekwencji *jun* w genomie różnych, niespokrewnionych ze sobą gatunków kręgowców

wskazuje na komórkowe pochodzenie onkogenu, który został wtórnie nabyty przez wirus ASV17 drogą zakażenia komórek (prawdopodobnie kurzych) przez wirus [27].

## PRODUKT ONKOGENU

Określenie sekwencji onkogenu stało się pierwszym krokiem do ustalenia budowy i właściwości kodowanego przez ten gen białka. Gdy zna się sekwencję genu, łatwo jest ją przetłumaczyć na sekwencję aminokwasową białka. Okazało się, że otwarta ramka odczytu dla kodowanego produktu genu rozciąga się począwszy od kodonu inicjującego – "p19" genu *gag* do końca genu *jun*. Próby odczytywania innych sekwencji białkowych z ramki odczytu zakończyły się niepowodzeniem, natrafiały bowiem na nonsensowne kodony w obrębie genu *jun* zatrzymujące czytana informację.

W związku z powyższym, białko transformujące wirusa ASV17 wywodzi się z mRNA, w którym informacje genu *jun* i części genu *gag* uległy fuzji. Przetłumaczenie sekwencji nukleotydów na sekwencję aminokwasów pozwoliło określić niektóre cechy kodowanego białka.

Przypuszczalny produkt onkogenu jest białkiem długości 296 aminokwasów, jego przewidywana masa wynosiła 55 kilodaltonów [27]. Oznaczony został symbolem  $p55^{gag-jun}$ , gdzie "p" oznacza białko (*protein*), "55" masę białka w kilodaltonach, indeks "gag-jun" związek kodowanego białka z określonymi sekwencjami wirusa. Wykrycie białka  $p65^{gag-jun}$  w transformowanych wirusem ASV17 komórkach potwierdziło jego rolę w indukcji transformacji. Pozwoliło jednocześnie na weryfikację masy białka – masa wykrytego w transformowanych komórkach białka wynosiła 65 kDa [6]. Wpłynęło to na zmianę symbolu kodowanego przez v-jun produktu:  $p65^{gag-jun}$ . Cechą odróżniającą białko  $p65^{gag-jun}$  od produktów kodowanych przez inne onkogeny ptasich retrowirusów jest brak aktywności kinazy tyrozynowej [27]. Również w komórkach zainfekowanych ASV17 nie wykryto zwiększonego poziomu fosforylowanej tyrozyny. Największym jednak zaskoczeniem było wykazanie niespodziewanej homologii pomiędzy  $p65^{gag-jun}$  a białkiem GCN4.

Białko GCN4 o długości 281 aminokwasów należy do grupy białek kontrolujących ekspresję genów w komórkach drożdży [32]. Spełnia ono dwie funkcje zależne od dwóch odmiennych domen białka. Po pierwsze, wiąże się specyficznie z określoną, scharakteryzowaną sekwencją DNA: TGA<sub>2</sub>CTCA, która to funkcja ograniczona jest do domeny położonej przy karboksylowym końcu białka. Po drugie, aktywuje transkrypcję grupy genów (30–50 genów) kodujących enzymy biorące udział w syntezie aminokwasów w komórkach drożdży. Domena aktywująca położona jest w środkowej części białka i składa się z 19 aminokwasów znajdujących się w pozycjach 106–125 licząc od aminowego końca białka [24, 67].

Podobieństwo strukturalne obu białek zostało ustalone przez komputerowe porównywanie ich sekwencji. Sekwencję nowego białka wprowadza się do pamięci komputera, a następnie komputer porównuje ją ze znajdującymi się w jego pamięci sekwencjami innych, znanych dotychczas białek.

Nieoczekiwana homologia dotyczyła końca karboksylowego porównywanych białek, który w białku GCN4 jest domeną wiążącą specyficzne DNA. Konserwatywny region obejmuje swym zasięgiem grupę 66 aminokwasów końca karboksylowego GCN4, z których

31 ma identyczną lokalizację w porównaniu z produktem *v-jun*. Daje to 47% homologii. Podobieństwo sekwencji nukleotydów kodujących ten region białek sięga 37% [46].

Analiza struktury drugorzędowej karboksylowych końców białka GCN4 i produktu onkogeny *v-jun* wykazała podobieństwo również na tym poziomie. Końce karboksylowe obydwu białek mają strukturę  $\alpha$  helisy. Podobną budowę mają również inne białka mające zdolność łączenia się z DNA [46].

Prócz znacznego podobieństwa do GCN4 produkt *v-jun* wykazuje również, choć w mniejszym stopniu homologię z produktami onkogenów jądrowych: *fos* i *c-myc*, które to produkty mają zdolność wiązania DNA (tab. 1). Przedstawione dane mogą sugerować pokrewieństwo ewolucyjne wymienionych białek [46].

TABELA 1. Homologia końców karboksylowych produktów genów: GCN4, *jun*, *v-fos* i *c-myc* pod względem identyczności występujących aminokwasów, oznaczenia: *n* – ilość porównywanych aminokwasów, wartości liczbowe w tabeli – liczba identycznych aminokwasów w porównywanym odcinku sekwencji, wartości procentowe w tabeli – procent identycznych aminokwasów w porównywanym odcinku sekwencji

	<i>jun</i> <i>n</i> = 86	GCN4 <i>n</i> = 71	<i>v-fos</i> <i>n</i> = 83	<i>c-myc</i> <i>n</i> = 85
<i>jun</i>		31	18	11
GCN4	14%		20	11
<i>v-fos</i>	22%	28%		17
<i>c-myc</i>	13%	15%	20%	

Znacząca homologia pomiędzy *v-jun* a fragmentem GCN4 wiążącym specyficznie sekwencję TGACTCA wskazywała na możliwość istnienia podobieństw w funkcjonowaniu obu białek. Komórkowy odpowiednik onkogeny *v-jun* występujący w komórkach ssaków mógł kodować produkt mający zdolność wiązania się w sposób specyficzny z DNA i zdolność regulacji ekspresji genów.

## LUDZKI PROTOONKOGEN *JUN* KODUJE AKTYWATOR TRANSKRYPCJI – AP1

W 1987 r. podczas badań regulacji ekspresji ludzkiego genu metalotioneiny (hMTIIA), indukowanego metalami ciężkimi oraz hormonami sterydowymi, zidentyfikowano nowy aktywator transkrypcji białko AP1 (*activation protein 1*) [25]. Białko to miało zdolność selektywnego wiązania się z regionem wzmacniacza genu hMTIIA oraz genów małpiego wirusa SV40 [25]. AP1 łącząc się ze wzmacniaczem rozpoznaje w sposób selektywny sekwencję: TGACTCA oraz stymuluje transkrypcję genu hMTIIA i genów wirusa SV40 [26].

Zdolność rozpoznawania przez AP1 specyficznej sekwencji nukleotydów pozwoliła na zakwalifikowanie tego białka do klasy białek wiążących DNA (*DNA binding protein*), takich jak: Sp1, AP2, CREB i inne [29].

Z komórek linii HeLa wyizolowano i oczyszczono frakcję kilku białek o masach 40–47 kDa (z główną frakcją 47 kDa) o zdolnościach wiązania się z DNA analogicznych do AP1 [26]. Może to być rezultatem zmian potranslacyjnych, jakim podlega pojedyncze białko

AP1, lub każde z białek frakcji kodowane jest przez różne mRNA lub różne formy genów [6].

Sekwencja rozpoznawana przez AP1 odpowiada sekwencji rozpoznawanej przez aktywator transkrypcji dożdży – białko GCN4 [3, 26]. Sekwencje rozpoznawane przez wymienne białka to: TGACTCA i ATGACTCAT.

Homologia pomiędzy karboksylowym końcem GCN4, wiążącym specyficznie DNA, a karboksylowym końcem produktu onkogeny *v-jun* oraz doniesienia, że *v-jun* może kodować białko specyficznie wiążące DNA [46], stanowiły podstawę do wysunięcia hipotezy, że AP1 jest produktem ludzkiego odpowiednika *v-jun*: protoonkogeny *c-jun* (JUN) [6].

Stosując sondę molekularną cDNA o sekwencji komplementarnej do *v-jun* (między 720. a 1601. nukleotydem) wykazano w bibliotece genów ludzkich obecność sekwencji homologicznej do *v-jun* [27]. Z fragmentów DNA zawierających homologiczną do *v-jun* sekwencję wyizolowano klon ludzkiego *c-jun* i porównano jego sekwencję ze znaną sekwencją *v-jun* [6]. Następnie otrzymany klon *c-jun* poddano ekspresji w komórkach bakterii, a otrzymany produkt porównano z białkami: AP1 i p65<sup>gag-jun</sup> [6, 27]. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały identyczność AP1 z produktem ludzkiego protoonkogeny *c-jun* [6].

◊ Po pierwsze, monospecyficzne przeciwciała przeciwko dwóm regionom *jun*, otrzymane w wyniku immunizacji królika syntetycznymi białkami pochodzącymi z domen: karboksylowej i aminowej p65<sup>gag-jun</sup> reagowały krzyżowo z AP1 (zarówno z frakcją częściowo oczyszczoną o masach 40–47 kDa, jak i wysoce oczyszczoną o masie 47 kDa). Próbkki kontrolne, zawierające różne od AP1 białka specyficznie wiążące DNA: AP2 i Adf1, nie wykazywały reakcji krzyżowej [1, 6].

◊ Po drugie, sekwencja aminokwasowa AP1 określona przez trawienie białka trypsyną jest identyczna z sekwencją aminokwasów odczytaną z otwartej ramki odczytu ludzkiego *c-jun* [6].

◊ Po trzecie, produkt ludzkiego protoonkogeny *JUN* poddanej ekspresji w komórkach bakterii wykazywał tę samą zdolność wiązania DNA co AP1 [1,6].

◊ Po czwarte, sekwencja *JUN* badana metodami hybrydyzacji molekularnej kwasów nukleinowych jest ściśle pokrewna sekwencji nukleotydowej oznaczonej dla *v-jun*. Stwierdzone różnice nie odbiegają od tych, które spotyka się w przypadku porównywania sekwencji onkogenów z odpowiadającymi im protoonkogenami. Tożsamość AP1 i produktu protoonkogeny *JUN* potwierdzona została niezależnie od siebie przez kilku badaczy [1, 6, 8].

AP1 odgrywa centralną rolę w przekazywaniu sygnałów w komórce, regulując ekspresję wielu genów w odpowiedzi na traktowanie komórek estrami forbolu lub innymi mitogennami będącymi fizjologicznymi aktywatorami kinazy białkowej C [1, 17, 26]. Wśród genów zawierających sekwencję wiążącą się z białkiem c-Jun/AP1 prócz genu metalotioneiny znajdują się geny kodujące: kolagenazę,  $\alpha$ 1-antytrypsynę, transtyreinę i mysy MHC-H2D<sup>d</sup> [6].

Fakt kodowania aktywatora transkrypcji przez onkogen *JUN* stanowi poparcie tezy o bezpośrednim wpływie onkoprotein jądrowych na funkcjonowanie aparatu genetycznego komórki.



## LOKALIZACJA CHROMOSOMALNA LUDZKIEGO PROTOONKOGENU *JUN*

Czynniki regulujące transkrypcję, do których zaliczany jest również produkt onkogenu *JUN*, białko AP1, są podstawowymi elementami regulującymi aktywność komórki. Zaburzenia w ich funkcjonowaniu mogą zmieniać ekspresję genów i prowadzić do onkogenezy.

W wielu nowotworach człowieka dochodzi do zaburzeń chromosomalnych, takich jak: delecje (np. w nowotworze wywodzącym się z siatkówki – retinoblastoma) czy translokacje (np. w przypadku ludzkich białaczek i chłoniaków). Jakkolwiek potencjał transformacyjny *v-jun* w komórkach ptaków został dobrze udokumentowany [27], to związek aktywacji protoonkogenu *JUN* oraz kodowanego przezeń aktywatora transkrypcji w powstawaniu nowotworów u ludzi, protoonkogen *JUN* nadal pozostaje domeną przypuszczeń. W celu lepszego zrozumienia funkcjonowania protoonkogenu *JUN* oraz ewentualnej jego roli w powstawaniu nowotworów u ludzi, protoonkogen *JUN* kodujący aktywator transkrypcji AP1 [1, 6, 8] został wyizolowany z komórek linii HeLa w postaci klonu genomycznego oraz klonu komplementarnego cDNA [6, 14, 15]. Określona została jego sekwencja [3] oraz lokalizacja w genomie ludzkim. Porównanie sekwencji obydwu klonów ujawniło zaskakującą cechę protoonkogenu *JUN*, mianowicie brak intronów. Wśród genów obecnych w genomie komórki cechę tę mają tzw. pseudogeny. *JUN* nie jest jednak pseudogenem, gdyż prócz braku intronów nie ma on innych cech pozwalających zakwalifikować go do tej grupy genów. Po pierwsze jest on genem aktywnym, kodującym funkcjonalnie czynny produkt (pseudogeny nie mają tych właściwości), po drugie *JUN* nie ma poliadenylowych końców, będących częścią struktury pseudogenów [15].

Lokalizacja chromosomalna *JUN* została określona niezależnie od siebie przez dwie grupy badaczy. Stosując metodę hybrydyzacji molekularnej DNA typu *southern* Haluska i wsp. [15] zlokalizowali *JUN* w chromosomie 1, następnie stosując metodę hybrydyzacji *in situ* [14, 15] określono dokładną lokalizację protoonkogenu *JUN* w genomie ludzkim. Zlokalizowany on jest w krótkim ramieniu chromosomu 1, w regionie 3, podregionach 1 i 2 (1p31–32).

Region ten ulega często delecji w ok. 70% neuroblastom, szczególnie w stanach zaawansowanych tego nowotworu oraz w liniach komórkowych wywodzących się z komórek tego nowotworu. Dane te sugerują, że utrata krytycznych sekwencji DNA prowadząca do homozygotyczności allelu recesywnego może odgrywać ważną rolę w mechanizmie powstawania tego nowotworu. Mechanizm ten podobny jest do mechanizmu opisanego w przypadku retinoblastoma, co sugeruje, że eliminacja AP1 może grać ważną rolę w patogenezie tej choroby.

Pośród genów zlokalizowanych w tym regionie chromosomu: "1p" lub w jego pobliżu znajdują się również inne protoonkogeny: *BLYM*, *MYCL* – 1p32; *LCK* – 1p32–35; *NRAS* i *NGFB* – 1P22; *FGR* – 1p36 [31]. Protoonkogen *JUN* jest jedynym z tej grupy kodującym regulator transkrypcji. Dlatego też możliwe jest, że utrata czynności tego genu może prowadzić do deregulacji wzrostu komórek.

## RODZINA ONKOGENÓW *JUN*

Prócz opisanych dotychczas postaci onkogenu *jun* mianowicie: wirusowego *v-jun* i jego komórkowego odpowiednika w genomie ludzkim – protoonkogenu *JUN*, w komórkach linii 3T3 pochodzących od myszy szczepu BALB/c zidentyfikowano trzy inne postaci onkogenu: *junB*, *junA*, *junD*. Pozwala to na wyodrębnienie rodziny onkogenów *jun* (tab. 2).

TABELA 2. Rodzina onkogenów *jun*

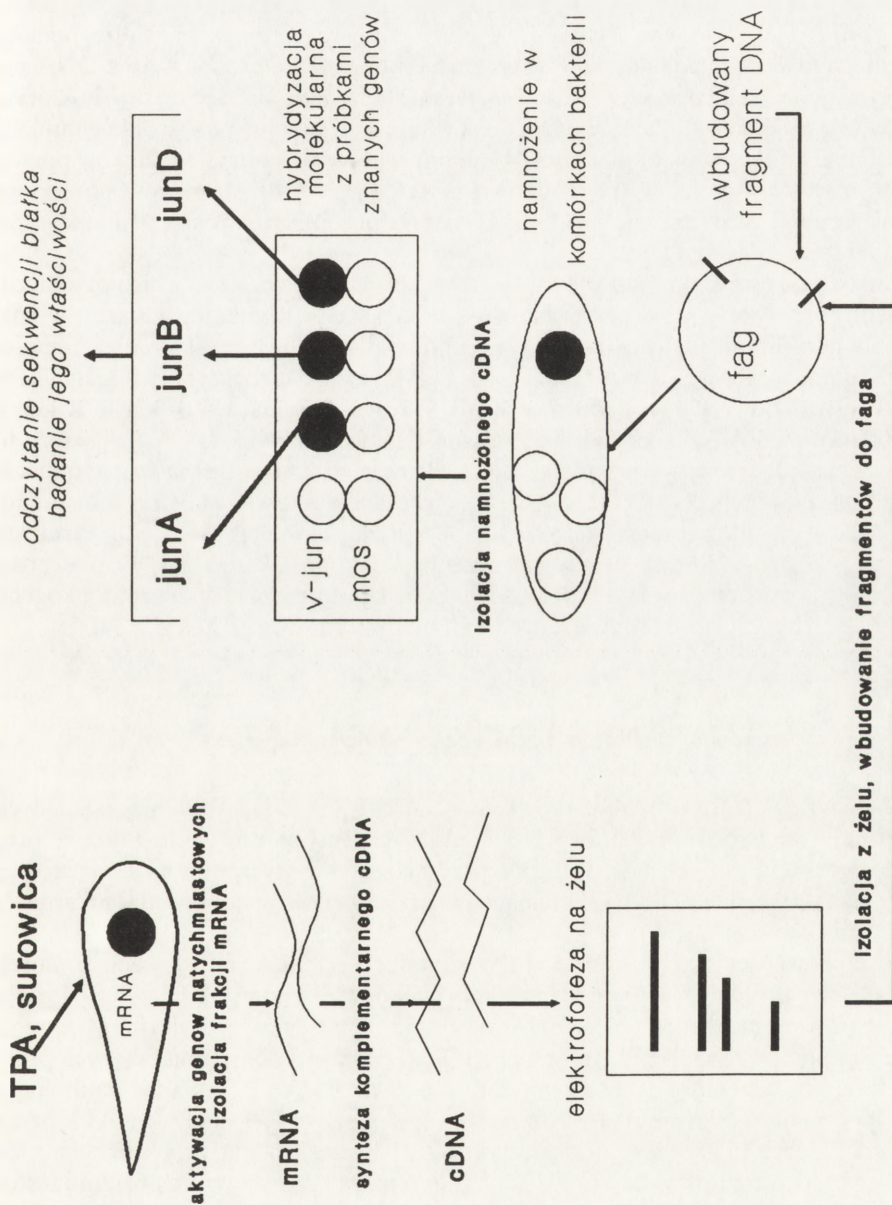
	Produkt	Występowanie	Lokalizacja w genomie ludzkim
<i>v-jun</i>	białko p65 <sup>gag-jun</sup> 296 aminokwasów	wirus ptasi ASV17	
<i>JUN</i>	białko AP1	komórki człowieka komórki linii HeLa	ramię krótkie chromosomu pierwszego 1p31–32
<i>junA</i>	białko 334 aminokwasy masa ok. 40 kDa	komórki myszy: – nerka – jelito	
<i>junB</i>	białko, 344 aminokwasy masa ok. 40 kDa	– mózg  – łożysko komórki lini 3T3	
<i>junD</i>	białko 341 aminokwasów masa ok. 40 kDa	komórki szczura: – mózg	

Onkogeny: *junA*, *junB*, *junD* odkryto podczas badania ekspresji genów aktywowanych mitogenami, takimi jak: surowica, płytkopochodny czynnik wzrostu, czynnik wzrostu fibroblastów, estry forbolu (np. TPA). W kilka do kilkunastu minut po aktywacji komórki mitogenami dochodzi do wzrostu ekspresji części genów, tzw. genów natychmiastowych. Geny te jako pierwsze przejawiają swoją aktywność w komórce po działaniu na komórkę mitogenami. Pierwsze też ulegają dezaktywacji, tracą bowiem swą aktywność w ciągu kilku godzin [24]. Wśród genów tych znajdują się również protoonkogeny: *fos*, *myc*, a także *jun*, o czym świadczy indukcja *JUN* przez surowicę i TPA [22] oraz interakcja AP1 ze wzmacniaczami genów indukowanych przez TPA [26]. Wynikiem aktywacji tej grupy genów jest wzrost poziomu ich transkryptu (mRNA) w komórce.

W badaniu różnych postaci onkogenu *jun* posłużono się następującymi technikami. Frakcja różnych rodzajów mRNA odpowiadających aktywowanym genom została wyizolowana z komórek. Następnie zsyntetyzowano cDNA komplementarne do poszczególnych mRNA. Frakcje cDNA rozdzielono elektroforetycznie, wbudowano do bakteriofaga i klonowano w komórkach bakterii. Otrzymane klonów cDNA porównano ze znanymi genami stosując metodę hybrydyzacji molekularnej ze znakowanymi próbkami znanych genów lub drogą sekwencjonowania cDNA i porównywania sekwencji poszczególnych klonów z sekwencjami znanych genów (rys. 1). Odczytano również sekwencję kodowanych przez poszczególne klonów białek oraz zbadano ich właściwości.

Trzy spośród badanych klonów wykazywały pokrewieństwo z *v-jun* [3, 38], a kodowane przez te klonów produkty miały wiele cech wspólnych z AP1 [33, 38, 39].

Protoonkogen *junB* koduje białko długości 344 aminokwasów. Koniec karboksylowy białka bogaty jest w aminokwasy zasadowe: lizynę i argininę oraz wykazuje wysoki stopień



Rys. 1. Schemat ilustrujący techniki i kolejność ich stosowania podczas badania różnych postaci onkogenu *jun*

homologii z karboksylowym końcem produktu onkogenu *v-jun* [30] i protoonkogenu *fos* [38]. Homologia sięgająca ok. 65% obejmuje 100 aminokwasów końca karboksylowego produktu *junB*. Drugi region homologiczny do *v-jun* znajduje się przy aminowym końcu białka. Region ten obejmuje swoim zasięgiem 50 aminokwasów i wykazuje 59% identyczności.

Stosując jako kryterium stopień homologii pomiędzy produktami poszczególnych klonów a produktami onkogenu *v-jun* i *JUN* porównano wymienione białka za pomocą techniki hybrydyzacji molekularnej. Hybrydyzacja molekularna próbek *junB* z DNA pochodzącym z komórek człowieka oraz myszy wykazała, że *junB* nie jest mysim, komórkowym odpowiednikiem *v-jun*, lecz stanowi obok *v-jun* i *JUN* kolejną postać onkogenu [38]. Również *junD* kodujący białko długości 341 aminokwasów nie spełniał warunków pozwalających zakwalifikować go jako mysi odpowiednik *JUN* [3, 37, 38]. Mysią wersją ludzkiego protoonkogenu *JUN* okazał się *junA*, którego produkt miał sekwencję aminokwasów prawie identyczną jak AP1 [39].

Produkty białkowe genów *jun* wykazują wiele cech wspólnych. Kilka z nich ograniczonych jest do konserwatywnego regionu karboksylowego białek. Koniec ten wykazuje wysoki stopień homologii pomiędzy poszczególnymi produktami [6, 33, 38], jest również homologiczny do domeny wiążącej DNA białka GCN4 [46]. Koniec karboksylowy bogaty jest w aminokwasy zasadowe [38] i leucynę oraz ma II-rzędową strukturę  $\alpha$ -helisy. Każda z onkoprotein ma zdolność specyficznego wiązania sekwencji TGACTCA [29], która to sekwencja jest miejscem wiążącym AP1 [6, 25], oraz wykazuje powinowactwo (choć mniejsze) do sekwencji TGACGTCA [38]. Onkoproteiny Jun tworzą między sobą homodimery i pod tą postacią wiążą się ze specyficzną sekwencją DNA [33]. Produkty kodowane przez rodzinę onkogenów *jun* reagują z onkoproteinami Fos. W obecności onkoproteiny Fos znacznie wzrasta zdolność wiązania DNA przez produkt protoonkogenu *jun* [8, 13, 33]. Kompleks białek związanych z DNA zawiera również Fos [33, 34].

## DZIAŁANIE PROTOONKOGENU *JUN*

Mechanizm działania produktu protoonkogenu *jun* jest jednym z lepiej poznanych mechanizmów funkcjonowania onkoprotein jądrowych. Jest on dowodem na to, że produkty onkogenów jądrowych mogą funkcjonować jako aktywatory transkrypcji, wiążące się ze specyficzną sekwencją DNA i regulujące ekspresję genów w odpowiedzi na sygnały zewnątrzkomórkowe.

Wzrost aktywności oraz poziomu AP1 w komórce następuje po aktywacji komórek sztucznymi lub naturalnymi aktywatorami kinazy białkowej C, takimi jak TPA [2, 8]. Proces ten regulowany jest na dwóch poziomach: potranslacyjnym i transkrypcyjnym

Bezpośrednio po stymulacji komórek przez TPA dochodzi do potranslacyjnych przemian istniejących w komórce, nieaktywnych cząsteczek AP1 [3, 9]. Dokładna natura tego procesu pozostaje wciąż nieznana. Rozważana jest możliwość fosforylacji AP1 przez aktywowaną kinazę białkową C oraz aktywacji AP1 przez produkt protoonkogenu *fos* aktywowany w drodze fosforylacji przez kinazę. Przemawia za tym wzrost poziomu fosforylowanego produktu protoonkogenu *fos* (Fos) w komórce obserwowany po jej stymulacji estrami forboleu [4]. Następnie dochodzi do aktywacji protoonkogenu *jun* i syntezy nowych

cząsteczek AP1. Aktywacja genu następuje po przyłączeniu się zaktywowanych wcześniej cząsteczek AP1 do promotora genu *jun* zawierającego sekwencję TGACATCA [2] (rys. 2).

Analiza sekwencji promotora *jun* ujawniła dodatkowo w jego obrębie miejsca wiążące dla innych niż AP1 aktywatorów transkrypcji: Sp1, CTF [2]. Wydaje się jednak, że wiązanie AP1 przez promotor odgrywa główną rolę zarówno w indukcji genu przez TPA, jak i autoregulacji. Sekwencja promotora, do której przyłącza się AP1: TGACATCA, mimo że różni się nieznacznie od klasycznej sekwencji wiążącej AP1: TGACTCA, ma równie wysokie powinowactwo do AP1 jak sekwencja klasyczna. Ponadto wymieniona sekwencja promotora jest odpowiedzialna za aktywowanie onkogeny *jun* zarówno przez AP1, jak i TPA [2]. Sekwencja TGACGTCA rozpoznawana jest również przez inne białko wiążące specyficznym DNA: białko CREB [29, 30]. Aktywność tego czynnika transkrypcji jest jednak regulowana przez cAMP, co wyklucza jego udział w aktywacji protoonkogeny *jun* po stymulacji komórek TPA. Interesujący jest fakt, że mutacja punktowa w obrębie sekwencji DNA wiążącej AP1 nie tylko zapobiega wiązaniu AP1 przez promotor genu *jun*, lecz wpływa również na zmianę powinowactwa sekwencji TATTTTATA (tzw. *TATA box*), leżącej w pobliżu miejsca wiążącego AP1, do czynników specyficznym ją rozpoznających. Sugeruje to istnienie współdziałania między białkiem AP1 a czynnikami rozpoznającymi tę sekwencję [2].

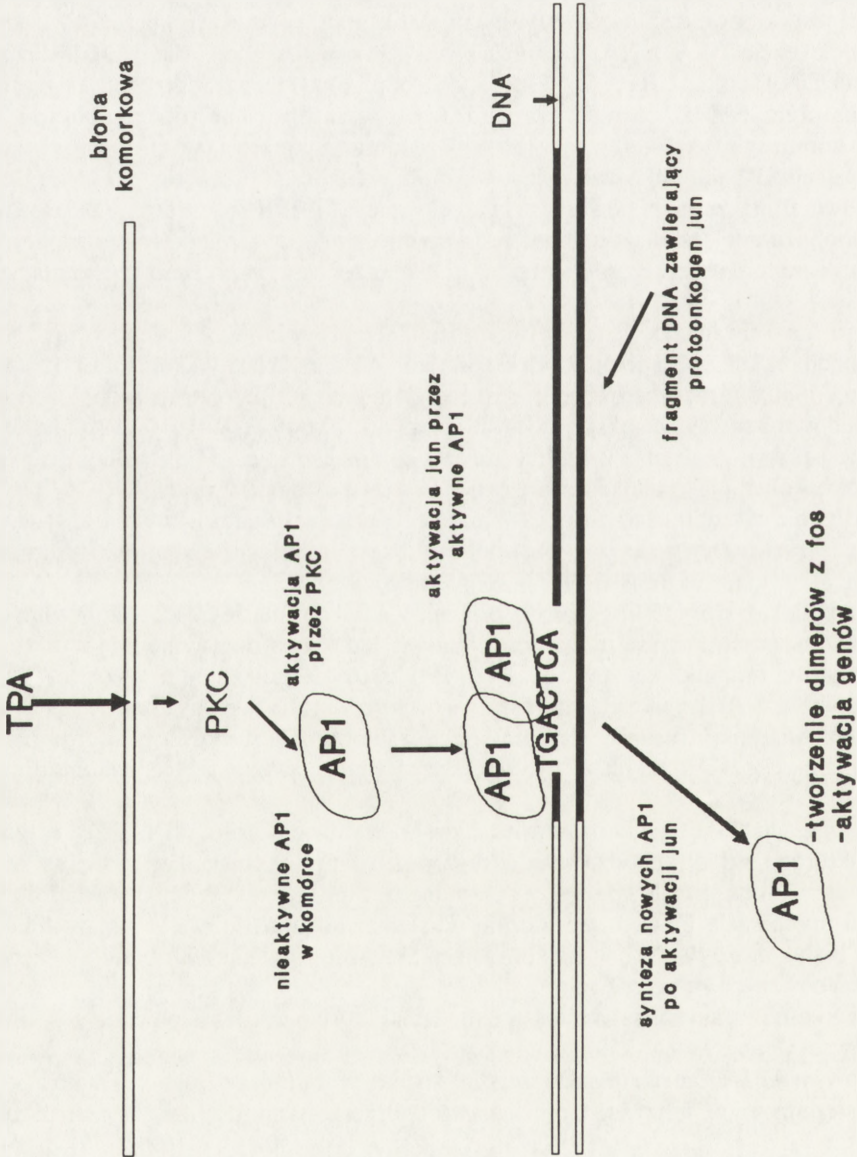
Ostatnio dużo uwagi poświęca się współdziałaniu produktów onkogeny *jun* i *fos*. Protoonkogen *fos* ulega ekspresji w większości komórek na relatywnie niskim poziomie [11]. Koduje białko o masie 55 kDa. Białko to działa jako regulator transkrypcji genów, hamując lub wzmacniając ich ekspresję [40]. Ten plejotropowy efekt działania białka Fos związany jest prawdopodobnie z właściwościami kompleksów, jakie Fos tworzy z innymi białkami określonymi jako białka towarzyszące Fos (*Fos associated protein*).

Białko Fos nie ma zdolności rozpoznawania specyficznym sekwencji DNA [8]. Aktywacja genów przez Fos odbywa się prawdopodobnie dzięki interakcji tego białka z innymi czynnikami aktywującymi transkrypcję w sposób specyficzny [8].

Jedno z białek, z którymi Fos tworzy kompleksy, białko o masie 39 kDa, zaliczane do białek towarzyszących Fos jest identyczne z Jun/AP1 zarówno pod względem struktury, jak i właściwości immunologicznych [35, 41]. Produkt protoonkogeny *fos* wchodzący w skład kompleksu z AP1 znacznie zwiększa zarówno zdolność aktywowania transkrypcji genów przez AP1, jak i trwałość wiązania kompleksu obu białek z DNA [41]. Kompleks złożony z białek Fos i AP1 ma ok. 25 razy większe powinowactwo do DNA niż homodimer AP1 [11].

Dzięki regulacji ekspresji genów, zawierających sekwencję wiążącą AP1, przez heterodimer, w którego skład wchodzi produkty dwóch różnych protoonkogenów, wzrasta złożoność kontroli ekspresji. Synteza i ewentualne potranslacyjne przemiany składników kompleksu przebiegają bowiem niezależnie od siebie. Ponadto formując heterodimery mała ilość białek może tworzyć wiele kombinacji aktywnym działających czynników transkrypcyjnych o różnych swoistościach.

Osobnego omówienia wymaga mechanizm, dzięki któremu AP1 rozpoznaje w sposób specyficzny sekwencję DNA. Zdolność ta ograniczona jest do domeny leżącej na końcu karboksylowym AP1. Domena ta ma szczególną strukturę aminokwasową: co 7 aminokwas w niej występujący jest leucyną. Umożliwia to tworzenie struktury  $\alpha$ -helisy. Struktura

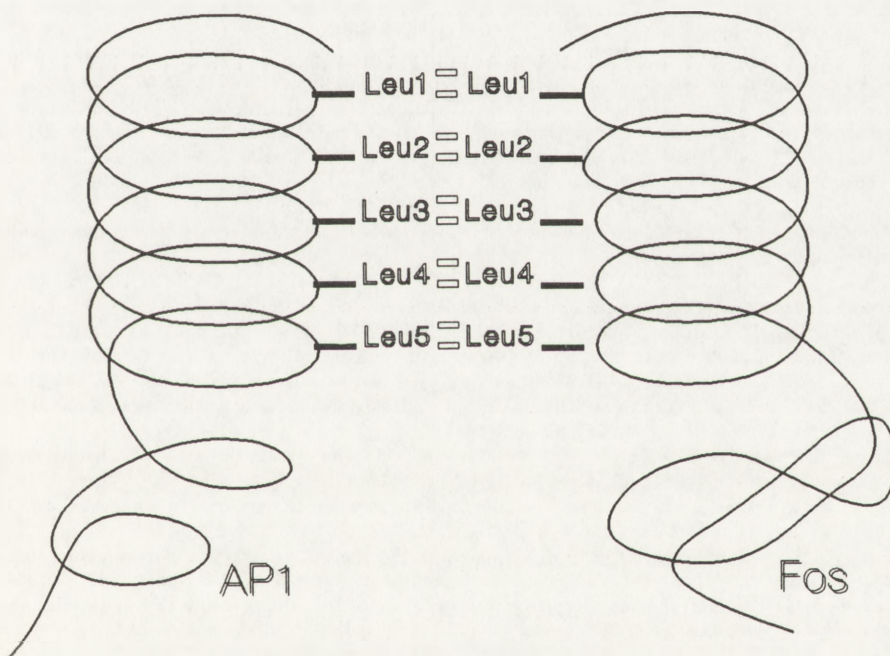


Rys. 2. Schemat przedstawiający jedną z hipotez aktywacji protoonkogenu *jun* przy udziale kinazy białkowej C i estru forbolu; TPA – ester forbolu (*12-tetradecanoylphorbol 13-acetate*), PKC – kinaza białkowa C (*protein kinase C*), AP1 – białko aktywujące (*activation protein 1*), produkt protoonkogeny *jun*, TGACTCA – sekwencja nukleotydów wiążąca specyficznie AP1, obecna również w promotorze genu *jun*

$\alpha$ -helikalna wspólna jest dla wielu białek wiążących DNA, takich jak: C/EBP; GCN4; Myc; Jun; Fos; OTF-2; Fra1 [7, 10, 23, 34].

Struktura  $\alpha$ -helisy odgrywa główną rolę w aktywności biologicznej tych białek. Dzięki niej onkoproteiny Jun i Fos łączą się ze sobą tworząc funkcjonujący dimer [27]. Przylegające do siebie  $\alpha$ -helikalne fragmenty Jun i Fos tworzą strukturę, zwaną leucynowym zamkiem błyskawicznym (*leucine zipper*) [12, 16] {rys. 3}. Leucynowy zamek błyskawiczny odpowiedzialny jest nie tylko za dimeryzację Jun i Fos, lecz również za zdolność łączenia się dimeru z DNA. Zastąpienie reszt leucyny innymi aminokwasami hydrofobowymi (co uniemożliwia wytworzenie *leucine zipper*) uniemożliwia zarówno formowanie dimerów Jun-Fos, jak i ich wiązanie się z DNA [16]. Ze względu na swój przestrzenny, spiralny kształt  $\alpha$ -helisy tworzące leucynowy zamek błyskawiczny mogą przylegać w określonej konfiguracji do wybranych odcinków DNA.

Działanie produktów rodziny onkogenów *jun* oraz ich współdziałanie w regulacji transkrypcji genów z produktami innych protoonkogenów jądrowych, takich jak *fos* i *c-ets* [47], jest ciągle przedmiotem intensywnych badań.



Rys. 3. Leucynowy "zamek błyskawiczny"

## LITERATURA

- [1] ANGEL P, ALLEGRETTO EA, OKINO ST, HATTORI K, BOYLE WJ, HUNTER T, KARIN M. Oncogene *jun* encodes a sequence specific trans-activator similar to AP1. *Nature* 1988; 332:166-171.
- [2] ANGEL P, HATTORI K, SMEEAL T, KARIN M. The *jun* protooncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP1. *Cell* 1988; 55: 875-885.

- [3] ANGEL P., IMAGAWA M, CHIU R, STEIN B, IMBRA RJ, RHAMSDORF HJ, JONAT C, HERRLICH P, KARIN M. Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factors. *Cell* 1987; **49**: 729–739.
- [4] BARBER IR, VERMA IM. Modification of fos proteins: phosphorylation of c-fos but not v-fos is stimulated by 12-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *Mol Cell Biol* 1987; **7**: 2201–2211.
- [5] BISHOP JM. The molecular genetics of cancer. *Science* 1987; **235**: 305–311.
- [6] BOHMANN D, BOS TJ, ADMON A, NESHIMURA T, VOGT PK, TJIAN R. Human protooncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP1. *Science* 1987; **238**: 1386–1392.
- [7] BRANDT-RAUF PW, PINCUS MR, CHEN JM, LEE G. Conformational energy analysis of the leucine repeat region of C/EBP, GCN4, and the proteins of the myc, jun, and fos oncogenes. *J Protein Chem* 1989; **8**: 679–688.
- [8] CHIU R, BOYLE WJ, MEEK J, SMEAL T, HUNTER T, KARIN M. The c-fos protein interacts with c-jun/AP1 to stimulate transcription of AP1 responsive genes. *Cell* 1988; **54**: 541–552.
- [9] CHIU R, IMAGAWA M, IMBRA RJ, BOCKOVEN JR, KARIN M. Multiple cis- and trans-acting elements mediate the transcriptional response to phorbol esters. *Nature* 1987; **329**: 648–651.
- [10] COHEN DR, CURRAN T. fra-1: a serum inducible, cellular immediate-early gene that encodes a fos-related antigen. *Mol Cell Biol* 1988; **8**: 2063–2069.
- [11] FRANZA BR, RAUSCHER FJ, JOSEPHS SF, CURRAN T. The fos complex and fos-related antigens recognize sequence elements that contain AP1 binding sites. *Science* 1988; **239**: 1150–1153.
- [12] GENTZ R, RAUSCHER III FJ, ABATE C, CURRAN T. Parallel association of fos and jun leucine zippers juxtaposes DNA binding domains. *Science* 1989; **234**: 1695–1699.
- [13] HALAZONETIS TD, GEORGOPOULOS K, GREENBERG ME, LEDER P. c-jun dimerizes with itself and with c-fos forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell* 1988; **55**: 917–924.
- [14] HALUSKA FG, HUEBNER K, ISOBE M, NISHIMURA T, CROCE CM, VOGT PK. Localization of the human JUN protooncogene to chromosome region 1p31–32. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 2215–2218.
- [15] HATTORI K, ANGEL P, LE BEAU M, KARIN M. Structure and chromosomal localization of the functional intronless human JUN protooncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 9148–9152.
- [16] HORST A. Regulacja ekspresji genów eukaryotów. *Post Biol Kom* 1990; **17**, 2: 161–196.
- [17] IMBRA RJ, KARIN M. Metallothionein gene expression is regulated by serum factors and activators of protein kinase C. *Mol Cell Biol* 1987; **7**: 1358–1363.
- [18] JACKSON TR, BLAIR LAC, MARSCHALL J, GOEDERT M, HANLEY MR. The mas oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature* 1988; **335**: 437.
- [19] JAKOBISIAK M. Onkogeny. *Post Biol Kom* 1985; **12**: 289–334.
- [20] KACZMAREK L. Protooncogene expression during the cell cycle. *Lab Invest* 1986; **54**: 365–376.
- [21] KACZMAREK L, KAMIŃSKA B. Molecular biology of cell activation. *Exp Cell Res* 1989; **183**(1): 24–25.
- [22] LAMPH WW, WAMSLEY P, SASSONE-CORSI P, VREMA IM. Induction of proto-oncogene JUN/AP1 by serum and TPA. *Nature* 1988; **334**: 629–631.
- [23] LANDSCHULTZ WH, JOHNSON PF, MCKNIGHT SL. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 1988; **240**: 1759–1763.
- [24] LAU LF, NATHANS D. Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: coordinate regulation with c-fos or c-myc. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 1182–1186.
- [25] LEE W, HASLINGER A, KARIN M, TJIAN R. Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. *Nature* 1987; **325**: 368–372.
- [26] LEE W, MITCHEL R, TJIAN R. Purified transcription factor AP1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* 1987; **49**: 741–752.
- [27] MAKI Y, BOSTJ, DAVIS C, STARBUCK M, VOGT PK. Avian sarcoma virus 17 carries the jun oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 2848–2852.
- [28] MANSOUR SL, THOMAS KR, CAPECCLI MR. The int-2 gene codes for a protein with significant similarity to the fibroblast, growth factor family. *Nature* 1988; **336**: 348.
- [29] MITCHELL PJ, TJIAN R. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 1989; **245**: 371–378.
- [30] MONTMINY MR, BILEZSIKJIAN LM. Binding of a nuclear protein to the cyclic AMP response element of the somatostatin gene. *Nature* 1987; **328**: 174–178.
- [31] MORTON NE, BRUNS GA. Report of the committee of the genetic construction of chromosomes 1 and 2. *Cytogenet Cell Genet* 1987; **46**: 102–130.



- [32] MUELLER PP, HARASHIMA S, HINNEBUSCH AG. A segment of GCN4 mRNA containing the upstream AUG codons confers translational control upon a heterologous yeast transcript. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 2863–2867.
- [33] NAKABEPPU Y, RYDER K, NATHANS D. DNA binding activities of three murine jun proteins: stimulation by fos. *Cell* 1988; **55**: 907–915.
- [34] PTASHNE M. How eucaryotic transcriptional activators work. *Nature* 1988; **335**: 683–686.
- [35] RAUSCHER FJ, COHEN DR, CURRAN T, BOS TJ, VOGT PK, BOHMAN D, TJIAN R, FRANZA BR. Fos-associated protein p39 is the product of the jun proto-oncogene. *Science* 1988; **240**: 1010–1016.
- [36] ROBERTSON M. Specificity and flexibility. *Nature* 1987; **327**: 464–466.
- [37] RYDER K, LANAHAN A, PEREZ-ALBUERNE E, NATHANS D. JunD; a third number of the jun gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 1500–1503.
- [38] RYDER K, LAU LF, NATHANS D. A gene activated by growth factors is related to the oncogene v-jun. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 1487–1491.
- [39] RYDER K, NATHANS D. Induction of protooncogene c-jun by serum growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 8464–8467.
- [40] SASSONE-CORSI P, SISSON JC, VERMA IM. Transcriptional autoregulation of protooncogene fos. *Nature* 1988; **334**: 314–319.
- [41] SASSONE-CORSI P, LAMPH WW, KAMPS M, VERMA IM. fos-associated cellular p39 is related to nuclear transcription factor AP1. *Cell* 1988; **54**: 553–560.
- [42] SCHUERMANN M, NEUBERG M, HUNTER JB, JENUWEIN T, RYSECK RP, BRAVO R, MULLER R. The leucine repeat motif in fos protein mediates complex formation with jun/AP1 and is required for transformation. *Cell* 1989; **56**: 507–516.
- [43] SETOYAMA C, FRUNZIO R, LIAU G, MUDRYJ M, DE CROMBRUGGHE B. Transcriptional activation encoded by the v-fos gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 3213–3217.
- [44] STUDZINSKI GP. Oncogenes, growth, and the cell cycle: an overview. *Cell Tissue Kinet* 1989; **22**: 405–424.
- [45] VARMUS H. Oncogenes and transcriptional control. *Science* 1987; **238**: 1337–1339.
- [46] VOGT PK, BOS TJ, DOOLITTLE RF. Homology between the DNA-binding domain of the GCN4 regulatory protein of yeast and the carboxyl-terminal region of a protein coded for by the oncogene jun. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 3316–3319.
- [47] WASYLYK B, WASYLYK C, FLORES P, BEGUE A, LEPRINCE D, STEHELIN D. The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. *Nature* 1990; **346**: 191–193.
- [48] YAMAMOTO T, IKAWA S, AKIYAMA T. Similarity of protein encoded by the human c-erbB-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 1986; **319**: 230–234.
- [49] YOSHIDA T, MIYAGAWA K, ODAGIRI H. Genomic sequence of hst, transforming gene encoding a protein homologous to fibroblast growth factors and the int-2-encoded protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 7305–7309.

Otrzymano 5 lutego 1991 r.

Przyjęto: 21 marca 1991 r.

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



## WPŁYW ACETYLOCHOLINY NA WZROST I ROZWÓJ ROŚLIN\*

### INFLUENCE OF ACETYLCHOLINE ON PLANT GROWTH AND DEVELOPMENT

Andrzej TRETYN

Uniwersytet M. Kopernika, Instytut Biologii, Zakład Botaniki Ogólnej

*Streszczenie.* We wszystkich analizowanych gatunkach roślin wykryto obecność acetylocholiny (ACh). Wykazano, że ACh może naśladować działanie światła czerwonego (R) w regulowanych przez fitochrom (P) procesach wzrostu i rozwoju roślin. Substancja ta wpływa na kiełkowanie nasion i wzrost roślin. Ponadto ACh może modyfikować aktywność enzymów roślinnych i przebieg procesów metabolicznych. Przypuszcza się, że podobnie jak u zwierząt pierwotny mechanizm działania ACh w komórkach roślinnych polega na regulacji przepuszczalności błon dla  $H^+$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$  i  $Ca^{2+}$ .

*Summary.* Acetylcholine (ACh) has been detected in all plant species so far examined. It has been shown that exogenous ACh mimicks the action of red light in phytochrome-mediated processes of plant growth and development. It affects seed germination and plant growth. Moreover, ACh can modify enzymes activity and course of some metabolic processes in plants. It is proposed that the primary mechanism of action of ACh in plant cells is via the regulation of membrane permeability to ions,  $H^+$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$  and  $Ca^{2+}$ .

*Wykaz stosowanych skrótów:* ACh – acetylocholina; AChE – acetylocholinoesteraza, AChR – receptory acetylocholiny; ATCh – acetylotransferaza cholinowa; CCC – chlorek chlorocholiny; CCh – karbamylecholina (karbachol); Ch – cholina; FR – światło dalekiej czerwieni (730 nm); IAA – kwas 3-indoliloctowy; P – fitochrom; R – światło czerwone (660 nm).

## HISTORIA BADAŃ NAD ROLĄ ACh U ROŚLIN

Obecność ACh wykryto u przedstawicieli kilkudziesięciu gatunków roślin niższych i wyższych [15, 24, 25, 78]. Bennet-Clark [4] jako jeden z pierwszych postulował możliwość udziału ACh w stymulowanej przez auksynę akumulacji jonów w komórkach roślinnych. W 1962 r. Dettbarn [11] wykrył obecność enzymu, który podobnie jak AChE izolowana z

\*Praca finansowana z funduszy RP II.12.15.

komórek zwierzęcych hydrolizował acetylo- $\beta$ -metylocholinę. Choć szybkość propagacji impulsu elektrycznego w komórkach *Nitella* była ok. tysiąc razy wolniejsza niż w komórkach nerwowych, poziom aktywności AChE u tego glonu był jedynie 10 razy niższy [11]. W 1965 r. Košťir i wsp. [47] wykazali, że egzogenna ACh wpływa na kiełkowanie i pierwsze fazy wzrostu niektórych gatunków roślin uprawnych. Tung i Raghavan [81] opisali wpływ substancji cholinowych na wzrost izolowanych korzeni *Dolichos lablab*. Cumming i Wagner [9] stwierdzili, że u roślin, podobnie jak u zwierząt, w odpowiedzi na bodźce świetlne powstają impulsy elektryczne. Zasugerowali oni, że mechanizm kontroli przepuszczalności membran przez P może być podobny do regulacji tego procesu przez ACh w komórkach zwierzęcych. W 1968 r. Tanada [75] odkrył, że zjawiska elektryczne w wierzchołkach korzeni fasoli mogą być kontrolowane przez P. W doświadczeniach prowadzonych na wierzchołkach korzeni wspomnianej rośliny wykazał on, że R stymuluje ich przyleganie, a FR uwalnianie z ujemnie naładowanych powierzchni szklanych [75]. Jaffe [30] posługując się podobnym jak Tanada modelem wykrył, że wiązanie bądź uwalnianie wierzchołków korzeni z powierzchni szkła jest wynikiem kontrolowanych przez P zmian potencjałów powierzchniowych komórek badanych organów. W kolejnej pracy Jaffe [31] wykazał, że w łańcuchu przemian metabolicznych wzbudzanych przez P uczestniczy również ACh. W późniejszych latach pojawiło się szereg publikacji potwierdzających odkrycie Jaffego [12, 21, 27, 29]. Jednocześnie opublikowano dane wskazujące na brak korelacji w działaniu ACh i P [39, 73, 76].

## WPLÝW ACh NA FIZJOLOGICZNE I METABOLICZNE PROCESY U ROŚLIN

W minionych kilkunastu latach przeprowadzono badania nad wpływem egzogennej ACh na przebieg wielu procesów wzrostu i rozwoju roślin. Badano zwłaszcza te zjawiska, których przebieg kontrolowany jest przez P.

### KIEŁKOWANIE NASION

Po raz pierwszy wpływ substancji cholinowych na proces kiełkowania nasion roślin uprawnych stwierdzony został przez Košťir i wsp. [47]. W latach siedemdziesiątych Lees i wsp. [51, 52], Kasturi [40, 41] oraz Kasturi i Vasantharajan [42] uzyskali dowody wskazujące na udział systemu ACh-AChE w kontroli kiełkowania i wzrostu fasoli i grochu. Lees i Thompson [51] stwierdzili obecność AChE w liścieniach kiełkujących nasion fasoli. Całkowita aktywność tego enzymu wzrastała pomiędzy 2. a 3. dniem kiełkowania, utrzymywała się na tym poziomie do 6. dnia, a następnie spadała wraz z pojawieniem się pierwszych oznak starzenia się liścienia [51]. Opisanym zmianom aktywności AChE towarzyszyły zmiany poziomu ACh. W pierwszych 2 dniach doświadczenia odnotowano niskie stężenie ACh. Po tym czasie zawartość ACh w liścieniach szybko wzrastała, aby osiągnąć maksimum (ok. 11 ng/2 liścienie) w czwartym dniu kiełkowania, z następnym spadkiem do aktywności zerowej [52]. Neostygmina (10 mM) hamowała wzrost siewek fasoli i wpływała, w porównaniu do kontroli, na 10-krotny wzrost zawartości ACh (z 1,29 do 11,98 ng/2 liścienie) w liścieniach badanych siewek [52]. Lees i wsp. [52] sugerowali, że obecna

w liścieniach ACh uczestniczy w kontroli transportu substancji zapasowych z liścieni do szybko rozwijających się części roślin.

Obecność AChE wykryto również w suchych nasionach grochu [40]. W pierwszych dwu dniach kiełkowania nasion następował całkowity spadek aktywności enzymu. W trzecim dniu tego procesu ponownie odnotowano pojawienie się aktywności AChE, będącej wynikiem syntezy enzymu *de novo* [40]. Synteza *de novo* powstających cząsteczek AChE kontrolowana była przez P, przy czym FR stymulowało, a R hamowało ten proces [41]. Zarówno R, jak i FR nie wpływały na katalityczne właściwości enzymu. Wg Kasturi i Vasantharajana [42] występująca w nasionach i siewkach grochu AChE bierze udział w regulacji poziomu endogennej ACh.

Dane dotyczące wpływu ACh na kiełkowanie nasion są rozbieżne. Holm i Miller [27] wykazali, że 0,1 mM ACh, podobnie jak R, przyspiesza lub inicjuje kiełkowanie nasion *Agropyron repens*, *Echinochloa crusgalli*, *Chenopodium album*, *Brassica kaber* i *Sateria viridis*. Eseryna (inhibitor AChE) w stężeniu 0,1 mM uwrażliwiała użyte nasiona na działanie ACh [27]. Badania prowadzone przez Gupta [cyt. za 24] oraz Briggsa [cyt. za 54] nie potwierdziły udziału ACh w regulacji kiełkowania nasion fotoblastycznych. O braku wpływu ACh i atropiny (antagonista AChR) na kiełkowanie fotoblastycznie pozytywnych nasion *Rumex obtusifolius* i fotoblastycznie negatywnych nasion *Cucumis anguria* donosili Ledeira i wsp. [50]. Jedynie eseryna hamowała kiełkowanie *R. obtusifolius* nie wywierając przy tym żadnego wpływu na nasiona *C. anguria* [50].

Ostatnio Tretyń i wsp. [79] przebadali wpływ pochodnych choliny (ACh, CCh) oraz inhibitorów AChE (eseryny i neostygminy) na kiełkowanie nasion charakteryzujących się odmienną wrażliwością na działanie światła. Wszystkie użyte substancje, nawet w bardzo wysokim stężeniu (od 1 do 10 mM), nie wpływały na kiełkowanie fotoblastycznie neutralnych nasion pszenicy i owsa (*Triticum vulgare* i *Avena sativa*) tak w ciemności, jak i przy ciągłym naświetlaniu światłem białym. Na świetle ACh przyspieszała tempo kiełkowania fotoblastycznie pozytywnych nasion szczawiu (*Rumex obtusifolius*) i hamowała kiełkowanie fotoblastycznie negatywnych nasion babki (*Plantago lanceolata*). Cholina była nieaktywna w badanym procesie bez względu na warunki świetlne, w jakich prowadzono doświadczenia. Pozostałe substancje, tj.: karbamylcholina (CCh), eseryna i neostygmina działały podobnie, lecz nie tak skutecznie, jak ACh [79]. Tretyń i wsp. stwierdzili, że ACh wykazuje swoją aktywność jedynie we współdziałaniu ze światłem. Autorzy przypuszczają, że światło może hamować aktywność obecnej we wszystkich stosowanych nasionach AChE [80]. Dzięki temu możliwe jest dotarcie ACh do miejsc jej docelowego działania [79].

### WPLYW ACh NA WZROST ROŚLIN

Od dawna wiadomo było, że czwartorzędowe aminy, takie jak np. AMO-1618, są silnymi inhibitorami wzrostu roślin [55]. Również pochodna czwartorzędowej aminy choliny, chlorek chlorocholiny (CCC), silnie hamuje wzrost wielu roślin [6]. Zbieżność budowy chemicznej CCC, Ch i ACh zainspirowała badania nad wpływem tych substancji na wzrost roślin [81].

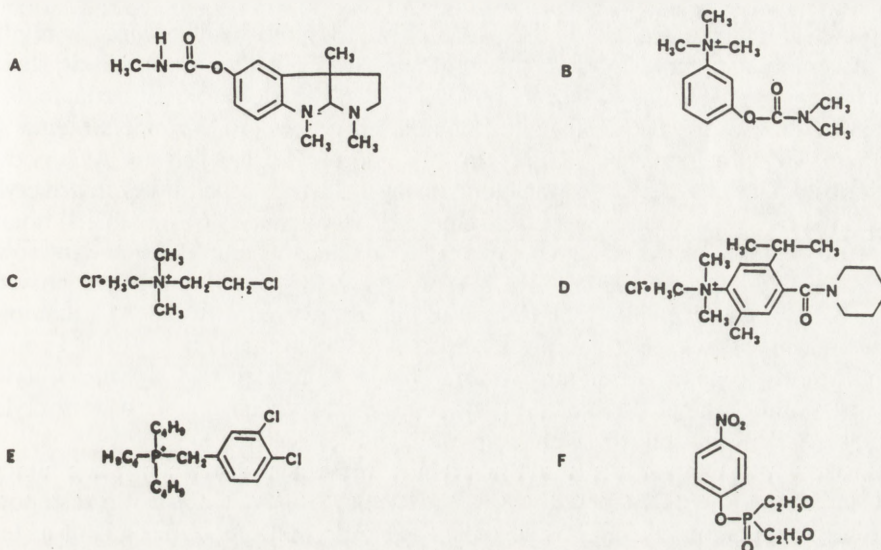
ACh, podobnie jak R hamowała tworzenie się korzeni bocznych siewek fasoli [31]. CCh, analog ACh, w niewielkim stopniu podwyższała stymulowane FR powstawanie korzeni bocznych u siewek gorczycy, nie wpływając na wydłużanie korzeni i hypokotyli tej rośliny [39].

Dekhuijzen [10] wykazał, że dolistne i dokorzeniowe podanie CCC (0,1 mM) hamuje wzrost siewek pszenicy. To inhibicyjne działanie CCC było zmniejszane w wyniku dodania do pożywki, w której uprawiano rośliny, 10 mM ACh. Substancja ta, w tym samym stężeniu dodana do pożywki bez CCC, powodowała w ok. 30% stymulację wzrostu siewek pszenicy i podobnej wielkości przyrost suchej masy. Wpływ ACh na obydwa wymienione procesy był najskuteczniejszy w pożywce o pH 6 [10].

ACh w zróżnicowany sposób wpływała na wzrost izolowanych organów i tkanek roślinnych. Substancja ta w stężeniu 10  $\mu$ M podwyższała tempo elongacji izolowanych segmentów koleoptyli owsa [12]. ACh była aktywna, zwłaszcza w przypadku eksplantatów, u których stymulowany auksyną wzrost wydłużeniowy zahamowano dodaniem do roztworu inkubacyjnego wysokiego stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  [12]. ACh podwyższała tempo wzrostu segmentów hypokotyli ogórka, a jej działanie najsilniej ujawniało się w przypadku segmentów pozbawionych liścieni [82].

W warunkach naturalnego oświetlenia (dzień/noc) ACh w stężeniu 10 mM stymulowała wzrost izolowanych hypokotyli soi [57]. W odmienny sposób działała ona na wydłużanie hypokotyli *Vigna sesquipedalis* [29]. Wzrost siewek tej rośliny regulowany jest przez P. R powoduje, w porównaniu z kontrolą, tj. roślinami rosnącymi w ciemności, podwyższenie tempa wzrostu epikotyli i zahamowanie wzrostu hypokotyli [29]. ACh podana w ciemności na liścieniu *Vigna* (w stężeniu 10  $\mu$ M) podobnie jak R hamowała wzrost hypokotyli i stymulowała wydłużanie epikotyli. Ch nie wywierała żadnego wpływu na wzrost badanych organów. Neostygmina natomiast działała podobnie, a atropina przeciwnie do ACh. Atropina ponadto częściowo znosiła wpływ R na opisany wzorzec wzrostu siewek *Vigna* [29].

Doświadczenia, których wyniki przedstawiono powyżej, prowadzone były na różnych gatunkach roślin, różnych organach roślinnych i w odmiennych warunkach eksperymentalnych. Mechanizm działania ACh u roślin wydaje się być związany z warunkami świetlnymi, w jakich prowadzono doświadczenia [21, 31, 45], a jej najwyższą aktywność obserwuje się w kwasowym zakresie pH [23]. Nie we wszystkich cytowanych badaniach stosowano się do tych zastrzeżeń, stąd trudno wyciągnąć z nich ogólniejsze wnioski dotyczące wpływu ACh na wzrost roślin. Hamujące działanie ACh na ten proces tłumaczono posiadaniem przez omawianą substancję właściwości retardanta wzrostu. Jaffe [32] stwierdził, że ACh podobnie jak AMO-1618, hamuje wzrost etiolowanych siewek ogórka. W siewkach traktowanych AMO-1618, w porównaniu do roślin kontrolnych, Jaffe wykazał w 50% podwyższenie zawartości endogennej ACh. Wpływ AMO-1618 na wzrost roślin był prawdopodobnie wynikiem hamującego działania tej substancji na aktywność AChE [66, 69]. Fosforoorganiczny pestycyd Fensulfation [42], jak również Fosfon [20] mają podobne właściwości jak AMO-1618. Fensulfation w tkankach korzeni grochu drastycznie hamował aktywność AChE, co prowadziło do ponad 50-procentowego wzrostu ACh w tych tkankach. Szereg glikozydów naturalnie występujących u roślin, takich jak eseryna (fizostygmina) i neostygmina, jak i syntetycznych herbicydów (pestycydów) (rys. 1) hamuje aktywność AChE izolowanych z tkanek roślinnych [42, 68, 72]. Można przypuszczać, że molekularny mechanizm działania tych związków polega na podwyższaniu endogennego poziomu ACh w roślinie [32, 42], co prowadzi do zahamowania jej wzrostu. Najwyższą aktywność AChE obserwuje się w młodych, rosnących organach roślinnych [15, 16], tj. w tych miejscach, gdzie zachodzi synteza ACh [31, 78]. Wszystkie czynniki modulujące aktywność AChE mogą prawdopodobnie wpływać, przez zmiany stężenia ACh, na tempo wzrostu roślin.



Rys. 1. Struktura chemiczna wybranych inhibitorów cholinoesteraz roślin: A – eseryna (fizostygmina); B – neostygmina; C – chlorek chlorocholiny (CCC); D – AMO-1618; E – fosforan D; F – fosforan S (na podstawie [6, 67, 68])

Przedstawiona hipoteza tłumaczy hamujący wpływ ACh na wzrost roślin. W wielu doświadczeniach wykazano jednak, że substancja ta stymuluje ten proces. W tych przypadkach działanie ACh tłumaczono jej współdziałaniem z regulatorami wzrostu: auksyną [12], gibereliną [57, 82] lub etylenem [57]. Verbeek i Vendrig [82] oraz Lees i wsp. [52] stwierdzili, że w przypadku roślin dwuliściennych ACh syntetyzowana jest w liściach [52, 82], skąd transportowana do niżej położonych organów może stymulować wzrost hypokotyła ogórka [82] lub hamować wydłużanie hypokotyła, a podwyższać tempo wzrostu epikotyła *Vigna* [29]. Przypuszczano również, że ACh może kontrolować wzrost roślin poprzez regulację przepuszczalności błon dla jonów [10, 12]. Evans [12] sugerował, że stymulujące działanie ACh na wydłużanie segmentów koleoptyli owsa polega na przemieszczaniu pod jej wpływem jonów  $\text{Ca}^{2+}$  ze ściany i błony komórkowej do miejsc działania tych jonów.

#### WSPÓLDZIAŁANIE ACh Z REGULATORAMI WZROSTU

Egzogenna ACh w wielu przypadkach oddziaływała na kontrolowane przez hormony roślinne procesy wzrostu i rozwoju roślin. ACh podobnie jak IAA stymulowała wzrost wycinków koleoptyli owsa [12] i pszenicy [48] oraz hamowała wzrost korzeni *Lens culinaris* [63]. Hoshino [28] odnotował hamujący wpływ ACh i IAA na zakwitanie *Lemna gibba* G3 rosnącej w warunkach ciągłego oświetlenia. Parpus [60] wskazał na istnienie współdziałania pomiędzy ACh a metabolizmem IAA i etylenu. Stosując jako materiał badawczy

wycinki etiolowanych hypokotyli fasoli autor ten stwierdził, że IAA ( $1 \mu\text{M}$  do  $1 \text{mM}$ ) stymuluje syntezę etylenu i hamuje otwieranie się kolanka hypokotyli. ACh, w stężeniu od  $0,1$  do  $1 \text{mM}$ , nie wpływała na obydwa procesy, natomiast podana równolegle z IAA w ponad  $50\%$  obniżała stymulowaną auksyną syntezę i znosiła hamujący jej wpływ na otwieranie się kolanka hypokotyli [60]. ACh i etylen współdziałały również w regulacji wzrostu komórek przedroślowych paproci *Athyrium filix-femina* (1–2). Niskie stężenia etylenu stymulowały wzrost wydłużeniowy komórek *Athyrium*, natomiast dodanie do pożywki ACh znosiło opisane działanie etylenu na ten proces [1]. Wysokie stężenia ACh powodowały wyraźne obniżenie tempa wzrostu komórek. Z drugiej strony, ACh podwyższała wzrost komórek *Athyrium* w ponadoptymalnych dla tego procesu stężeniach etylenu [1]. ACh wspólnie z antyauksyną, kwasem chlorofenoksyizobutyrylowym (PCIB) obniżały wrażliwość komórek przedroślowych paproci na działanie etylenu. PCIB podany równolegle z ACh lub pilokarpiną (agonista AChR) przyspieszały stymulowaną R zmianę wzorca wzrostu komórek *Athyrium* z wydłużeniowego na dwuwymiarowy [2]. ACh hamowała syntezę etylenu w tkankach izolowanych z liści soi [35]. Substancja ta ( $11 \text{mM}$ ) i neostygmina ( $5,5 \text{mM}$ ) podane w ciemności działały jak R obniżając tempo syntezy etylenu. Atropina, w porównaniu do kontroli, trzykrotnie podwyższała tempo syntezy etylenu, natomiast ACh i R obniżały jej stymulacyjne działanie [35].

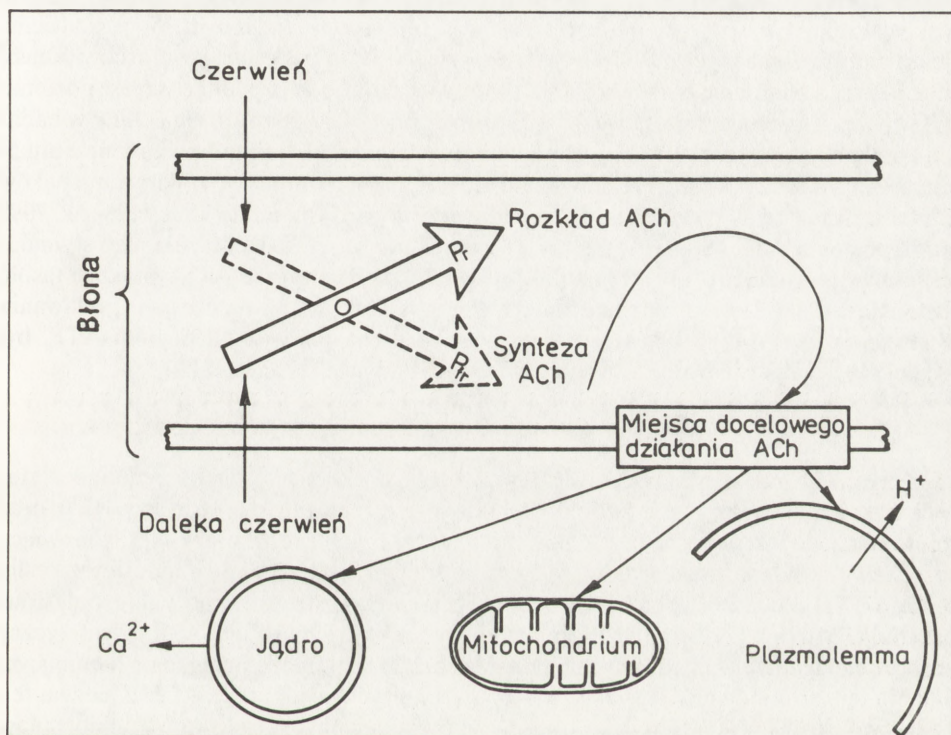
ACh może oddziaływać u roślin z gibereliną. Substancja ta redukowała inhibicyjny wpływ antygibereliny (CCC) na wzrost siewek pszenicy [10]. ACh częściowo zastępowała giberelinę w procesie indukcji wzrostu hypokotyli ogórka [82]. Obszerne badania na temat współdziałania ACh i gibereliny w siewkach sosny przeprowadzili Kopcewicz i wsp. [44–46]. Autorzy ci wykazali, że naświetlaniu etiolowanych siewek sosny R towarzyszy wzrost zawartości ACh i wolnych giberelin [45]. W porównaniu do roślin kontrolnych, rośliny traktowane ACh zawierały wyższy poziom wolnych giberelin [46]. Stymulacyjny wpływ ACh na zawartość giberelin u *Pinus silvestris* nie był odwracany przez FR [46], natomiast był znoszony przez atropinę [44].

### WPLYW ACh NA PROCESY ODDECHOWE

Jednym ze związków niezbędnych do zajścia efektu Tanady jest ATP [75, 84]. Przy użyciu aparatu Warburga oraz tlenowej elektrody Clarka wykazano, że ACh i R podwyższają zużycie  $\text{O}_2$  przez tkanki korzeni fasoli, natomiast FR odwraca efekt R [85]. W zbliżony sposób reagowały izolowane z korzeni mitochondria, z tym że do uzyskania podobnego efektu jak w przypadku wierzchołków tych organów potrzebne było niższe stężenie ACh. W izolowanych wierzchołkach korzeni fasoli R oraz ACh 10-krotnie obniżały poziom ATP oraz 14-krotnie podwyższały zawartość  $\text{P}_i$ . Spadek poziomu ATP nie był spowodowany wzrostem aktywności ATP-azy, gdyż zarówno R, jak i ACh nie wpływały na aktywność tego enzymu [85]. Spadek stężenia ATP mógł natomiast wynikać z rozsprzęgającego wpływu ACh i R na powiązanie fosforylacji oksydacyjnej z transportem elektronów poprzez ogniwa łańcucha oddechowego bądź z podwyższonego tempa zużycia ATP. Za tą pierwszą możliwością przemawiały wyniki badań przeprowadzonych nad wpływem substancji rozsprzęgających proces fosforylacji z transportem elektronów na efekt Tanady. Takie substancje, jak: gramicydyna, oligomycyna, digitoksyna oraz walinomycyna, działały podobnie do ACh, tj. nie wywierały żadnego wpływu na indukowane R przywieranie wierzchołków korzeni do szkła oraz hamowały stymulowane FR ich uwalnianie z jego powierzchni [85].



Na podstawie przedstawionych danych, jak również wyników badań wskazujących na wpływ ACh na sekrecję  $H^+$  i wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie  $Ca^{2+}$  [33], Jaffe zaproponował następujący model działania ACh w komórkach korzeni fasoli (rys. 2).



Rys. 2. Model Jaffego (1972) przedstawiający współdziałanie fitochromu i systemu acetylocholina – acetylocholinoesteraza (na podstawie [33])

W modelu tym postuluje się zróżnicowany wpływ R i FR na poziom endogennej ACh. Powstająca pod wpływem nasświetlania R aktywna forma fitochromu ( $P_{fr}$ ) wpływa na wzmoczoną syntezę ACh [34]. W wyniku wzrostu jej wewnątrzkomórkowego stężenia ACh dociera do miejsc jej docelowego działania. Następuje podwyższenie sekrecji  $H^+$  poza plazmolemmę [33], wzrost zużycia  $O_2$  i katabolizmu ATP [85]. Wewnątrz mitochondrium procesom tym towarzyszy podwyższenie błonowego transportu jednowartościowych kationów, a uwalniane z błony jądrowej jony wapnia przyczyniają się do uaktywniania wielu procesów wewnątrzkomórkowych [33].

W kolejnych latach Hartmann [22], Burcky i Kauss [5], White i Pike [83] oraz Kirshner i wsp. [43] zakwestionowali wyniki uzyskane przez Yughansa i Jaffego [85]. Burcky i Kauss wykazali, że choć 4-minutowemu nasświetlaniu wierzchołków korzeni fasoli R towarzyszy ich przywieranie do szkła, to poziom zawartego w nich ATP nie maleje, jak to wykazali Yughans i Jaffe [85], lecz ulega podwyższeniu.

Stosując jako materiał badawczy kallus z mieszańca uzyskanego ze skrzyżowania dwu gatunków mchów (*Phuscomitrium piriforme* x *Funaria hygrometrica*) Hartmann [22] odkrył stymulujący wpływ R na proces pobierania O<sub>2</sub>. Działanie R znoszone było przez FR. ACh podana w ciemności nie wywierała żadnego wpływu na badany proces. Jej aktywność ujawniała się jedynie, gdy podawano ją w trakcie lub po zakończeniu naświetlania kallusa R lub FR. Światło oraz obecność kwasu askorbinowego i ATP były niezbędne do ujawnienia się aktywności ACh w użytym przez Hartmanna [22] systemie roślinnym. W przeciwieństwie do danych uzyskanych przez Yughansa i Jaffego [85], a podobnie jak Burcky i Kauss, Withe i Pike, a następnie Kirshner i wsp. [43] stwierdzili, że R stymuluje wzrost poziomu ATP w pąkach etiolowanych siewek *Phaseolus vulgaris*. Najwyższe stężenie ATP w badanych tkankach zarejestrowano w 4. minucie naświetlania [43] i minutę po zakończeniu 5-minutowego impulsu R [83]. FR odwracało efekt R. Sześciominutowe traktowanie pąków ACh (w stężeniu od 10 pM do 1 mM) powodowało, w porównaniu do kontroli, w ok. 70% spadek poziomu ATP [43, 83]. ACh podawana równocześnie z R obniżała jego stymulacyjny wpływ. Atropina (0,1 mM) kilkukrotnie podwyższała stężenie ATP w pąkach fasoli. Substancja ta działała znacznie skuteczniej w ciemności niż przy równoczesnym podawaniu z R. Przeciwnie, AMO-1618, który równie jak atropina podwyższał poziom ATP, był bardziej aktywny przy równoczesnym naświetlaniu badanych tkanek R [43].

#### WPLYW ACh NA CHLOROPLASTY

Do kryteriów, na których podstawie stwierdza się obecność aktywności cholinioesterazowej u zwierząt, należy m.in. zdolność badanego preparatu do hydrolizy ACh oraz hamowanie jego aktywności przez związki fosforoorganiczne. Związki te, stanowiące podstawowy składnik insektycydów, są również silnymi inhibitorami cholinioesteraz roślin [20, 42, 67, 71]. Ponadto wpływają one na procesy zachodzące wewnątrz chloroplastów. Roshchina i Mukhin [71] stwierdzili, że hamujący wpływ trichlorofonu na fotosyntetyczny transport elektronów w izolowanych chloroplastach grochu może polegać na hamującym działaniu tej substancji na aktywność występującej w tych strukturach AChE. Enzym ten występował zarówno w całych, jak i osmotycznie uszkodzonych, izolowanych chloroplastach grochu [71]. Jego aktywność poza trichlorofonem, hamowana była również przez wysokie stężenia substratu (ACh) oraz neostygminy. Poza AChE w liściach grochu wykryto również ACh [71]. Egzogenna ACh w stężeniu 10 mM hamowała w 80–100% syntezę ATP nie wpływając przy tym na transport elektronów [71]. Ponadto stwierdzono, że ACh w zależności od stężenia stymuluje ( $> 0,1 \mu\text{M}$ ) bądź hamuje ( $< 0,1 \mu\text{M}$ ) fosforylację niecykliczną nie wywierając jednocześnie żadnego wpływu na fotoredukcję  $\text{NADP}^+$  [71]. Trichlorofon w równym stopniu hamował zarówno fotoredukcję  $\text{NADP}^+$ , jak i syntezę ATP [71]. Oprócz tego związku również muskaryna (agonista AChR) i atropina hamowały fotoredukcję  $\text{NADP}^+$  oraz fosforylację niecykliczną [70]. Poza wpływem na syntezę ATP [71] i fosforylację niecykliczną [70] ACh, w zależności od stężenia, podwyższała lub obniżała zużycie tlenu przez izolowane chloroplasty grochu [72], hamowała zależne od światła pęcznienie chloroplastów [72] i stymulowała wypływ  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  z tych struktur do środowiska inkubacyjnego [70]. Na podstawie przeprowadzonych badań Roshchina i Mukhin [72] przypuszczają, że akumulowana i hydrolizowana wewnątrz chloroplastów ACh może regulować przepuszczalność błon tych organelli oraz wpływać na stopień sprzężenia transportu elektronów z syntezą ATP.

## WPLYW ACh NA AKTYWNOŚĆ ENZYMÓW

Penel i wsp. [63] odkryli, że hamowaniu wzrostu korzeni *Lens culinaris* przez wysokie stężenia ACh towarzyszą zmiany aktywności peroksydazy. ACh podwyższała aktywność 11 izoperoksydaz, a obniżała 2 innych [63]. W tkankach jęczmienia R stymulowało aktywność amoniako-liazy fenyloalaninowej (PAL) i syntezę flawonoidów [74]. Inkubowanie tkanek w 0,1 mM roztworze ACh nie wpływało na aktywność PAL i poziom flawonoidów, natomiast częściowo znosiło stymulacyjny wpływ R na wymienione procesy [74]. W korzeniach grochu ACh nieznacznie hamowała syntezę de novo cząsteczek AChE [41]. Z drugiej strony omawiana substancja nie wywierała żadnego wpływu na regulowaną przez P syntezę antocyjanin w wycinkach hypokotyli *Sinapis alba* [39] oraz na stymulowaną światłem niebieskim biosyntezę karotenoidów u *Funarium aqueductum* [65]. W siewkach grochu Jones i Sheard [36] odnotowali brak wpływu ACh na regulowaną przez P aktywność reduktazy azotanowej.

## WPLYW ACh NA ROZWÓJ GENERATYWNY ROŚLIN

ACh współdziałając ze światłem wpływała na rozwój generatywny *Trichoderma* i kilku gatunków roślin wyższych. Substancja ta w obecności 5  $\mu\text{M}$  stężenia eseryny, naśladując działanie światła niebieskiego, indukowała wytwarzanie zarodników konidialnych u rosnącej w ciemności *Trichoderma viride* [19]. U szpinaku proces indukcji zakwitania związany jest z kontrolowanymi przez P zmianami aktywności peroksydazy [62]. ACh naśladując działanie R hamowała stymulowaną FR aktywność peroksydazy. Regulowane przez światło i ACh zmiany aktywności omawianego enzymu mogą stanowić pierwsze etapy indukcji kwitnienia szpinaku [61].

Kendeler [37], Hoshino i Oota [28] oraz Oota i Hoshino [59] stwierdzili, że ACh wpływa na zakwitanie rzęsy wodnej (*Lemna*). W warunkach ciągłego oświetlenia I24/O/I ACh (10  $\mu\text{M}$ ) hamowała zakwitanie *Lemna gibba* G1 i stymulowała kwitnienie *Lemna perpusilla*. ACh wpływała na kwitnienie obu gatunków rzęsy jedynie w obecności kwasu askorbinoowego w pożywce [37]. Kwitnienie *Lemna gibba* G3 hodowanej przy ciągłym świetle i w temperaturze 26°C hamowane jest wskutek obniżenia temperatury środowiska do 21°C w okresie pomiędzy 12. a 48. godziną od rozpoczęcia pierwszego cyklu świetlnego I24/O/I. U rzęsy hodowanej na długim fotoperiodzie I16/8/I wrażliwość na przechładzanie ujawniała się jedynie w okresie ciemności [59]. Rośliny trzymane na ciągłym świetle w pożywce zawierającej 10  $\mu\text{M}$  ACh wykazywały podobną wrażliwość na przechładzanie jak rośliny rosnące na długim fotoperiodzie. Oota i Hoshino [59] stwierdzili również, że obniżenie temperatury z 26 do 21°C podczas drugiego cyklu świetlnego I24/O/I powoduje zahamowanie kwitnienia roślin kontrolnych przy jednoczesnym braku wpływu na rośliny hodowane w pożywce z ACh. Z drugiej strony ACh lub eseryna (w stężeniu 10  $\mu\text{M}$ ) hamowały w ok. 40% zakwitanie *Lemna* hodowanej przy ciągłym świetle i w stałej temperaturze 26°C. Hamujący wpływ ACh na kwitnienie rzęsy znoszony był przez cAMP (58–59). Podobny do ACh mechanizm działania na omawiany proces wykazywał IAA. Syntetyczne auksyny, takie jak NAA i 2,4-D, były nieaktywne w tym procesie [58]. Atropina hamowała, natomiast

kuraryna (agonista AChR) nie wywierała żadnego wpływu na zakwitanie *Lemna gibba* G3 hodowanej przy ciągłym świetle i poddanej 12-godzinnemu okresowi przechładzania. Atropina znosiła ponadto stymulacyjny wpływ ACh i IAA na kwitnienie *Lemna* rosnącej w wymienionych warunkach świetlnych i temperaturowych [28]. Działanie ACh na kwitnienie rzęsy mogło wynikać z jej wpływu na występujące w błonach tej rośliny odpowiedniki zwierzęcych muskarynowych receptorów ACh. Struktury te mogłyby regulować przepuszczalność błon rzęsy dla jonów. Jednakże Hoshino [28] nie przedstawił żadnych bezpośrednich dowodów potwierdzających istnienie AChR w komórkach *Lemna*. Poza Hoshino również Greppin i wsp. [18] sugerowali możliwość wpływu ACh na proces kwitnienia roślin w drodze regulacji przepuszczalności błon dla jonów. Autorzy ci wykazali, że ACh wpływa na potencjały bioelektryczne liści towarzyszące fotoperiodycznej indukcji kwitnienia *Spinacia oleracea* i *Perilla nankinensis* [17–18].

Zmiany potencjałów błonowych towarzyszyły również regulowanej przez P indukcji kwitnienia *Lemna paucicostata* [53] i *L. gibba* G1 [38], tj. u tych gatunków rzęsy, których zakwitanie było odpowiednio indukowane i hamowane przez ACh [37]. Przypuszcza się, że pierwotny mechanizm działania ACh na kwitnienie roślin wynika z wpływu tej substancji na przepuszczalność błon dla jonów [17–18, 28, 37, 62]. Przejściu rośliny z fazy wegetatywnej do generatywnej nie muszą jednakże towarzyszyć zmiany poziomu ACh [49].

## UDZIAŁ ACh W INTERAKCJACH MIĘDZYGATUNKOWYCH I MIĘDZYKOMÓRKOWYCH

ACh może uczestniczyć w reakcjach pomiędzy bakteriami a roślinami wyższymi. Substancja ta działa chemotaktycznie na bakterie *Pseudomonas fluorescens* [13–14], jak również może pełnić pewną, bliżej nieokreśloną funkcję w symbiozie *Rhizobium* sp. z roślinami motylkowymi [15]. W brodawkach korzeni *Glycine max* zainfekowanych *Rhizobium* odkryto aktywność AChE, której szczyt przypadał na okres najintensywniejszego wiązania azotu przez te struktury (Fluck i Reporter, cyt. za 15).

Przy użyciu histo- i biochemicznych metod w plechach porostu *Parmelia caperota* Raineri i Modenesi wykryli aktywność AChE. Enzym ten prawdopodobnie występował na powierzchni błon komórkowych obu symbiontów wchodzących w skład porostu. Jego aktywność wzrastała się w trakcie wytwarzania sorediów, struktur służących do bezpłciowego rozmnażania się porostu. Początkowo aktywność AChE obserwowano w komórkach glonów wytwarzających aplanospory, a następnie w wierzchołkowych partiach rosnących szczytowo strzępków grzybni otaczających dzielące się glony. Nowopowstałe soredia zbudowane są z "jąder", w których skład wchodzi dzielące się glony oraz "otoczki" zbudowanej ze strzępków grzybni. W obu wymienionych warstwach sorediów, a zwłaszcza w strefie ich kontaktu, stwierdzono podwyższoną aktywność AChE. Raineri i Modenesi [64] przypuszczają, że system ACh-AChE uczestniczy w kontroli interakcji międzykomórkowych obu symbiontów wchodzących w skład *Parmelia*. Działanie tego systemu dotyczyłoby kontroli przepuszczalności błon dla jonów i byłoby regulowane przez warunki świetlne otoczenia [64].

System ACh-AChE może uczestniczyć w regulacji interakcji słupek-pyłek. Przy użyciu mikroskopu elektronowego Bednarska i Tretyn [3] wykryli aktywność AChE na powierz-

chni znamienia słupek *Pharbitis nil*. Obecność tego enzymu odkryto również w ziarnach i na wierzchołkach rosnących łagiewek pyłkowych *Pharbitis* (Bednarska, dane niepublikowane). Okazało się ponadto, że substancje modulujące aktywność AChR (atropina, kuryryna, karbachol) oraz inhibitory AChE (eseryna i neostygmina) wpływają na kiełkowanie ziaren i wzrost łagiewek pyłkowych *Pharbitis* oraz kilku innych gatunków roślin (Bednarska, dane niepublikowane). Martin [56] wykazał, że eseryna hamuje wzrost łagiewek pyłkowych *Crinum asiaticum*. Substancja ta oraz ACh hamowały [Gharal, cyt za 24], natomiast neostygmina nie wywierała żadnego wpływu [15] na wzrost łagiewek pyłkowych *Lathyrus sativus* i *L. latifolia*. Wzrost łagiewek pyłkowych orzecha ziemnego (*Arachis hypogea*) kontrolowany jest przez P i światło niebieskie. R stymuluje, a światło niebieskie hamuje ten proces. ACh, w stężeniu 55  $\mu\text{M}$ , naśladowała działanie R [8]. Z drugiej strony zarówno R, jak i ACh nie wpływały na kiełkowanie ziaren pyłkowych *Pisum sativum*, *Cajanus cajan* i *Lathyrus odorata* [Gharal, cyt. za 24].

## POBIERANIE ACh PRZEZ ROŚLINY

Jak dotąd niewiele uwagi poświęcono pobieraniu ACh przez rośliny. Przy użyciu znakowanych  $\text{I}^3\text{HI}$  i  $\text{I}^{14}\text{CI}$  cząsteczek ACh Hartmann [23] wykazał, że pobieranie tej substancji przez izolowane segmenty kolanek hypokotyli fasoli (*Phaseolus vulgaris*) modyfikowane jest przez światło i odczyn środowiska inkubacyjnego. Podczas jej pobierania przez badane tkanki, w ciemności, ok. 90% ACh ulegało hydrolizie. R stymulowało, a FR hamowało tempo pobierania ACh przez tkanki wspomnianych organów. Nie udało się ustalić, czy P reguluje tempo pobierania, czy też kontroluje syntezę lub/i hydrolizę ACh wewnątrz komórek hypokotyli. Oznaczając zawartość znakowanej ACh w środowisku inkubacyjnym Hartmann [23] wykazał, że optimum pH dla pobierania tej substancji przez segmenty hypokotyli fasoli leży w zakresie od 7,1 do 8,5. Jednocześnie okazało się, że w tym właśnie zakresie pH najszybciej przebiega hydroliza ACh wewnątrz tkanek. Jej degradację można było ograniczyć naświetlając tkanki R lub w wyniku dodania do medium inkubacyjnego eseryny, inhibitora AChE [23]. Zarówno światło [79], jak i eseryna [77] hamując aktywność cholinesteraz roślin mogą podwyższać tempo pobierania ACh przez komórki roślinne. Należy jednakże pamiętać, że inhibitory AChE, w tym eseryna, mogą poza AChE hamować aktywność innych enzymów roślinnych [26].

## ZAKOŃCZENIE

Z dokonanego przeglądu literatury dotyczącej wpływu ACh na metabolizm oraz wzrost i rozwój roślin trudno wyciągnąć ogólniejsze wnioski na temat mechanizmu jej działania w komórkach roślinnych. W większości dotąd prowadzonych badań stosowano wysokie stężenia ACh, jak i też długie czasy ekspozycji tkanek roślinnych na działanie tego związku. U zwierząt tego typu postępowanie prowadzi do spadku wrażliwości AChR na działanie ACh oraz zaniku ich fizjologicznej funkcji [7]. Podobne zjawisko może również występować w tkankach roślinnych poddanych działaniu wysokich stężeń ACh [35]. Wydaje się, że

konieczność stosowania wysokich stężeń tej substancji w badaniach prowadzonych na materiale roślinnym wynika z obecności w ścianach komórkowych i w plazmolemie AChE [77, 80]. Ta bariera metaboliczna stanowić może rodzaj mechanizmu obronnego zabezpieczającego komórki roślinne przed przedostawaniem się do ich wnętrza egzogennej ACh. Nie można jednakże wykluczyć, że podobnie jak w komórkach zwierzęcych, AChE uczestniczy w usuwaniu i degradacji cząsteczek ACh po ich połączeniu się z receptorami. Czy w ogóle AChR występują u roślin, i czy pełnią one u tych organizmów podobną funkcję jak u zwierząt, jak dotąd nie ustalono. Być może u roślin działanie ACh ograniczone jest do komórek, w których substancja ta jest syntetyzowana [24].

## LITERATURA

- [1] BÄHRE R. Zur Regulation des Protonemawachstums von *Athyrium filix-femina* (L.). II. Acetylcholine als Äthylenantagonist. *Z Pflanzenphysiol* 1975; 76: 248–251.
- [2] BÄHRE R. Zur Regulation des Protonemawachstums von *Athyrium filix-femina* (L.) Roth. Wirkung cholinergischer Substanzen in Gegenwart eines Antiauxins (PCIB). *Z Pflanzenphysiol* 1977; 81: 278–282.
- [3] BEDNARSKA E, TRETYN A. Ultrastructural localization of acetylcholinesterase in the stigma of *Pharbitis nil*. *Cell Biol Inter Rep* 1989; 13: 275–282.
- [4] BENNET-CLARK TA. Salt accumulation and mode of action of auxin: A preliminary hypothesis. [red] Wain RR, Wightman F. Butterworths, London, 1956: 284–291.
- [5] BÜRCKY K, KAUSS H. Veränderung im Gehalt an ATP und ADP in Wurzelspitzen der Mungobohne nach Hellrotbelichtung. *Z Pflanzenphysiol* 1974; 73: 184–186.
- [6] CATHEY HM. Physiology of growth retarding chemicals. *Ann Rev Plant Physiol* 1964; 15: 271–302.
- [7] CHANGEAUX JP, DEVILLERS-THIERY A, CHEMOUILLI P. Acetylcholine receptor: An allosteric protein *Science* 1984; 225: 1335–1345.
- [8] GHABRA N, MALIK CP. Influence of spectral quality of light on pollen tube elongation in *Arachis hypogea*. *Ann Bot* 1978; 42: 1109–1117.
- [9] CUMMING BG, WAGNER E. Rhythmic processes in plants. *Ann Rev Plant Physiol* 1966; 19: 381–416.
- [10] DEKHUIJZEN HM. The effect of acetylcholine on growth and on growth inhibition by CCC in wheat seedlings. *Planta* 1973; 111: 149–156.
- [11] DETTBARN WD. Acetylcholinesterase activity in *Nitella*. *Nature* 1962; 194: 1175–1176.
- [12] EVANS ML. Promotion of cell elongation in *Avena* coleoptiles by acetylcholine. *Plant Physiol* 1972; 50: 414–416.
- [13] FITCH WM. Studies on a cholinesterase of *Pseudomonas fluorescens*. I. Enzyme induction and the metabolism of acetylcholine. *Biochemistry* 1963; 2: 1217–1221.
- [14] FITCH WM. Studies on a cholinesterase of *Pseudomonas fluorescens*. II. Purification and properties. *Biochemistry* 1963; 2: 1221–1227.
- [15] FLUCK RA, JAFFE MJ. The acetylcholine system in plants. [w] Current Advances in Plant Science. [red] Smith H. Vol. 5, Sciences, Engineering, Medical and Data Ltd., Oxford, 1974: 1–22.
- [16] FLUCK RA, JAFFE MJ. Cholinesterases from plant tissues. III. Distribution and subcellular localization in *Phaseolus aureus* Roxb. *Plant Physiol* 1974; 53: 752–758.
- [17] GREPPIN H, HOROWITZ BA, HOROWITZ PL. Light-stimulated bioelectric response of spinach leaves and photoperiodic induction. *Z Pflanzenphysiol* 1973; 68: 336–345.
- [18] GREPPIN H, HOROWITZ BA. Floral induction and the effect of red and far-red preillumination on the light-stimulated bioelectric response of spinach leaves. *Z Pflanzenphysiol* 1975; 75: 243–249.
- [19] GRESSEL J, STRAUSBAUCH L, GALUN E. Photomimetic effect of acetylcholine on morphogenesis in *Trichoderma*. *Nature* 1971; 232: 648–649.
- [20] GUPTA R, MAHESHWARI SC. Preliminary characterization of a cholinesterase from roots of Bengal gram *Cicer arietinum* L. *Plant Cell Physiol* 1980; 21: 1675–1679.
- [21] HARTMANN E. Über den Nachweis eines Neurohormones beim Laubmooskallus und seine Beeinflussung durch das Phytochrom. *Planta* 1971; 101: 159–165.

- [22] HARTMANN E. Über die Wirkung des Phytochrome beim Laubmooskallus. II. Sauerstoffmetabolismus und Acetylcholinwirkung. *Z Pflanzenphysiol* 1974; 71: 349–365.
- [23] HARTMANN E. Uptake of acetylcholine by bean hypocotyl hooks. *Z Pflanzenphysiol* 1978; 86: 303–311.
- [24] HARTMANN E., GUPTA R. Acetylcholine as a signaling system in plants. [w] *Second Messengers in Plant Growth and Development* [red] Boss WE, Marre DJ, AR Liss. 1989: 257–287.
- [25] HARTMANN E, KILBINGER K. Occurrence of light-dependent acetylcholine concentrations in higher plants. *Experientia* 1974; 30: 1387–1388.
- [26] HARTMANN E, SCHLEICHER W. Isolierung und Charakterisierung einer Cholin kinase aus *Phaseolus vulgaris* L. Keimlingen. *Z Pflanzenphysiol* 1977; 83: 69–80.
- [27] HOLM RF, MILLER MR. Hormonal control of weed seed germination. *Weed Sci* 1972; 20: 209–212.
- [28] HOSHINO T. Stimulation of acetylcholine action by  $\alpha$ -indole-acetic acid in inducing diurnal change of floral response to chilling under continuous light in *Lemna gibba* G3. *Plant Cell Physiol* 1979; 20: 43–50.
- [29] HOSHINO T. Effects of acetylcholine on the growth of the *Vigna* seedling. *Plant Cell Physiol* 1983; 24: 551–556.
- [30] JAFFE MJ. Phytochrome-mediated bioelectric potentials in mung seedlings. *Science* 1968; 162: 1016–1017.
- [31] JAFFE MJ. Evidence for the regulation of phytochrome-mediated processes in bean roots by the neurohumor, acetylcholine. *Plant Physiol* 1970; 46: 768–777.
- [32] JAFFE MJ. On the molecular mode of action of the growth retardant, AMO-1618. *Plant Physiol (Supplement)* 1971; 47: 49.
- [33] JAFFE MJ. Acetylcholine as a native metabolic regulator of phytochrome-mediated processes in bean roots. [w] *Structural and Functional Aspects of Phytochemistry*, Vol. 5, [red] Runeckles VC, Tso TC. Academic Press, New York-London, 1972: 80–104.
- [34] JAFFE MJ, FLUCK RA. The mediation of bean root acetylcholinesterase activity by phytochrome and photochromic pigments. *Plant Physiol (Supplement)* 1972; 49: 53.
- [35] JONES RS, STUTIE CA. Acetylcholine and red-light influence of ethylene evolution from soybean leaf tissues. *Ann Bot* 1986; 57: 887–900.
- [36] JONES RW, SHEARD RW. Phytochrome, nitrate movement, and induction of nitrate reductase in etiolated pea terminal buds. *Plant Physiol* 1975; 55: 954–959.
- [37] KANDELER R. Die Wirkung von Acetylcholin auf die photoperiodische Steuerung der Blütenbildung der Lemnaceen. *Z Pflanzenphysiol* 1972; 67: 86–92.
- [38] KANDELER R., LÖPPERT H, ROTTENBERG T, SCHARFETTER K. Early effects of phytochrome in *Lemna* [w] *Photoreceptors and Plant Development* [red] De Greef J. Antwerpen Univ. Press, Antwerpen, 1980: 485–492.
- [39] KASEMIR H, MOHR H. Involvement of acetylcholine in phytochrome-mediated processes. *Plant Physiol* 1972; 49: 453–454.
- [40] KASTURI R. De novo synthesis of acetylcholinesterase in roots of *Pisum sativum*. *Phytochemistry* 1978; 17: 647–649.
- [41] KASTURI R. Influence of light, phytochrome and acetylcholine on the de novo synthesis of acetylcholinesterase in roots of *Pisum sativum*. *Indian J Biochem Biophys* 1979; 16: 14–17.
- [42] KASTURI R, VASANTHARAJAN VN. Properties of acetylcholinesterase from *Pisum sativum*. *Phytochemistry* 1976; 15: 1345–1347.
- [43] KIRSHNER RL, WHITE JM, PIKE CS. Control of bean bud ATP levels by regulatory molecules and phytochrome. *Physiol Plant* 1975; 34: 373–377.
- [44] KOPCEWICZ J, CYMERSKI M. On the involvement of acetylcholine in phytochrome-mediated changes of gibberellin content in scots pine seedlings. *Bull Acad Polon Sci* 1980; 28: 247–252.
- [45] KOPCEWICZ J, CYMERSKI M, PORAZIŃSKI Z. Influence of red and far-red irradiation on the acetylcholine and gibberellin content in scots pine seedlings. *Bull Acad Polon Sci* 1977; 25: 114–117.
- [46] KOPCEWICZ J, CYMERSKI M, PORAZIŃSKI Z. The effect of acetylcholine on gibberellins content in scots pine seedlings. *Bull Acad Polon Sci* 1979; 27: 295–302.
- [47] KOSTIR J, KLENHA J, JIRACEK V. The effect of choline and acetylcholine on seed germination in agricultural plants. *Rost Vyroba* 1965; 12: 1239–1279.
- [48] LAWSON VR, BRADY RM, CAMPBELL A, KNOX BG, KNOX GD, WALLS RL. Interaction of acetylcholine chloride with IAA, GA<sub>3</sub>, and red light in the growth of excised apical coleoptile segments. *Bull Torr Bot Club* 1978; 105: 187–191.
- [49] LEDEIRA A, DIETRICH SMC, FELIPPE GM. Acetylcholine and flowering of photoperiodic plants. *Rev Brasil Bot* 1982; 5: 21–24.

- [50] LEDEIRA A, FELIPPE GM, DIETRICH SMC. Detection of acetylcholine and effects of exogenous ACh on *Rumex* and *Cucumis* photoblasticity. *Rev Brasil Bot* 1982; **5**: 17–19.
- [51] LESS GL, THOMPSON JE. The effects of germination on the subcellular distribution of cholinesterase in cotyledons of *Phaseolus vulgaris*. *Physiol Plant* 1975; **34**: 230–237.
- [52] LEES GL, LAHUE R, THOMPSON JE. Changes in the acetylcholine titre of senescing cotyledons. *J Exp Bot* 1978; **29**: 1117–1124.
- [53] LÖPERT H, KRONBERGER W, KANDELER R. Phytochrome-mediated changes in the membrane potential of subepidermal cells of *Lemna paucicostata* 6746. *Planta* 1978; **138**: 133–136.
- [54] MARMÉ D. Phytochrome: Membranes as possible site of primary action. *Ann Rev Plant Physiol* 1977; **28**: 173–198.
- [55] MARTH PC, PRESTON WH, MITCHELL JW. Growth controlling effects of some quaternary ammonium compounds on various species of plants. *Bot Gaz* 1953; **115**: 200–204.
- [56] MARTIN FW. In vitro measurement of pollen tube growth inhibition. *Plant Physiol* 1972; **49**: 924–925.
- [57] MUKHERJEE I. The effect of acetylcholine on hypocotyl elongation in soybean. *Plant Cell Physiol* 1980; **21**: 1657–1660.
- [58] OOTA Y. Removal by chemicals of photoperiodic light requirements of *Lemna gibba* G3. *Plant Cell Physiol* 1977; **18**: 95–105.
- [59] OOTA Y, HOSHINO T. Diurnal change in temperature sensitivity of *Lemna gibba* G3 induced by acetylcholine in continuous light. *Plant Cell Physiol* 1974; **15**: 1063–1072.
- [60] PARPUS EV. Acetylcholine and synthesis of ethylene in etiolated bean tissues. *Physiol Plant* 1976; **36**: 154–156.
- [61] PENEL C, GREPPIN H. Action des lumieres rouge et infrarouge sur l'active peroxidase des feuilles d'épinards avant et apres l'induction florale. *Ber Schweiz Bot Ges* 1973; **83**: 253–261.
- [62] PENEL C, GREPPIN H. Variation de la photostimulation de l'activite des peroxidases basiques chez l'épinard. *Plant Sci Lett* 1974; **3**: 75–80.
- [63] PENEL C, DARIMONT E, GREPPIN H, GASPARD T. Effect of acetylcholine on growth and isoperoxidases of the lentil (*Lens culinaris*) root. *Biol Plantarum* 1976; **18**: 293–298.
- [64] RAINERI M, MODENESI P. Preliminary evidence for a cholinergic-like system in lichen morphogenesis. *Histochem J* 1986; **18**: 647–657.
- [65] RAU W. Blue light-induced carotenoid biosynthesis in microorganisms. [w] The Blue Light Syndrome. [red] Senger H, Springer-Verlag, Berlin, 1980: 283–298.
- [66] RIOV J, JAFFE MJ. Cholinesterase activity in bean roots. *Physiol (Supplement)* 1971; **47**: 49.
- [67] RIOV J, JAFFE MJ. A cholinesterase from bean roots and its inhibition by plant growth retardants. *Experientia* 1973; **29**: 264–265.
- [68] RIOV J, JAFFE MJ. Cholinesterases from plant tissues. I. Purification and characterization of a cholinesterase from mung bean roots. *Plant Physiol* 1973; **51**: 520–528.
- [69] RIOV J, JAFFE MJ. Cholinesterases from plant tissues. II. Inhibition of bean cholinesterase by 2-isopropyl-4-dimethyl-amino-5-methyl-phenyl-1-piperidine carboxylate methyl chloride (AMO-1618). *Plant Physiol* 1973; **52**: 233–235.
- [70] ROSHCINA VV. Action of acetylcholine agonists and antagonists on reactions of photosynthetic membranes. *Photosynthetica* 1987; **21**: 296–300.
- [71] ROSHCINA VV, MUKHIN EN. Acetylcholine action on the photochemical reactions of pea chloroplasts. *Plant Sci* 1985; **42**: 95–98.
- [72] ROSHCINA VV, MUKHIN EN. Acetylcholinesterase activity in chloroplasts and acetylcholine effects on photochemical reactions. *Photosynthetica* 1985; **19**: 164–171.
- [73] SATTER RL, APPLEWHITE PB, GALSTON AW. Phytochrome-controlled nyctinasty in *Albizia julibrissin*. *Plant Physiol* 1972; **50**: 523–525.
- [74] SAUNDERS JA, MCCLURE JW. Acetylcholine inhibition of phytochrome-mediated increase in a flavonoid and in phenylalanine ammonia-lyase activity of etiolated barley plumules. *Plant Physiol* 1973; **51**: 407–408.
- [75] TANADA TA. Substances essential for a red, far-red light reversible attachment of mung bean root tips to glass. *Plant Physiol* 1968; **43**: 2070–2071.
- [76] TANADA TA. On the involvement of acetylcholine in phytochrome-action. *Plant Physiol* 1972; **49**: 860–861.
- [77] TRETYN A, KWIATKOWSKA K. Charakterystyka roślinnego systemu cholinergicznego. Cholinoesterazy roślin. *Post Biol Kom* 1987; **14**: 83–96.
- [78] TRETYN A, TRETYN M. Charakterystyka roślinnego systemu cholinergicznego. Acetylcholina. *Post Biol Kom* 1988; **15**: 477–494.



- [79] TRETYN A, KOPCEWICZ J, LESAK E. Interaction of light and the cholinergic system in the regulation of seed germination. *Biol Plantarum* 1988; **30**: 338–342.
- [80] TRETYN A, ŚLESAK E, KWIATKOWSKA K. Cytochemical localization of AChE in plant cells in LM/TEM/SEM. *Folia Histochem Cytobiol* 1986; **24**: 328–329.
- [81] TUNG HF, RAGHAVAN V. Effects of growth retardants on the growth of excised roots of *Dolichos lablab* L. in culture. *Ann Bot* 1968; **32**: 509–519.
- [82] VERBEEK M, VENDRIG JC. Are acetylcholine-like cotyledon factors involved in the growth of cucumber hypocotyl? *Z Pflanzenphysiol* 1977; **83**: 335–340.
- [83] WHITE JM, PIKE CS. Rapid phytochrome-mediated changes in adenosine 5-triphosphate content of etiolated bean buds. *Plant Physiol* 1974; **53**: 76–79.
- [84] YUNGHANS H, JAFFE MJ. Phytochrome controlled adhesion of mung bean root tips to glass: a detailed characterization of the phenomenon. *Physiol Plant* 1970; **23**: 1004–1016.
- [85] YUNGHANS H, JAFFE MJ. Rapid respiratory changes due to red light or acetylcholine during the early events of phytochrome-mediated photomorphogenesis. *Plant Physiol* 1972; **49**: 1–7.

Otrzymano: 14 września 1989 r.

Przyjęto: 7 listopada 1989 r.

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



# FOSFORANY INOZYTOLU I ICH ROLA W PROCESIE TRANSDUKCJI SYGNAŁÓW

## INOSITOL PHOSPHATES AND THEIR ROLE IN SIGNAL TRANSDUCTION

Hanna WIKIEŁ, Joanna STROSZNAJDER

Zakład Neurochemii, Instytut-Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,  
Warszawa

*Streszczenie.* W pracy omówiono rodzaje inozytlofosforanów i ich znaczenie jako wtórnych przekaźników informacji. Przedstawiono udział inozytolo-1,4,5-trisfosforanu w mobilizacji jonów wapnia z wewnątrzkomórkowych magazynów, jak również poprzez kanały w błonie plazmatycznej zwracając uwagę na współdziałanie w tym procesie inozytolo-1,3,4,5-tetrakisfosforanu.

*Słowa kluczowe:* Inozytolo-fosforany, jony wapnia, przekazywanie informacji.

*Summary.* This paper describes different types of inositol phosphates and their role as second messengers. Inositol-1,4,5-trisphosphate [Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>] is a second messenger which regulates the intracellular calcium level by mobilizing Ca<sup>2+</sup> ions from internal stores and perhaps by stimulating Ca<sup>2+</sup> entry through ion channels in plasma membranes. In these actions of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> interactions with phosphorylated metabolite inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate occur.

*Key words:* inositolphosphates, calcium ions, signal transduction.

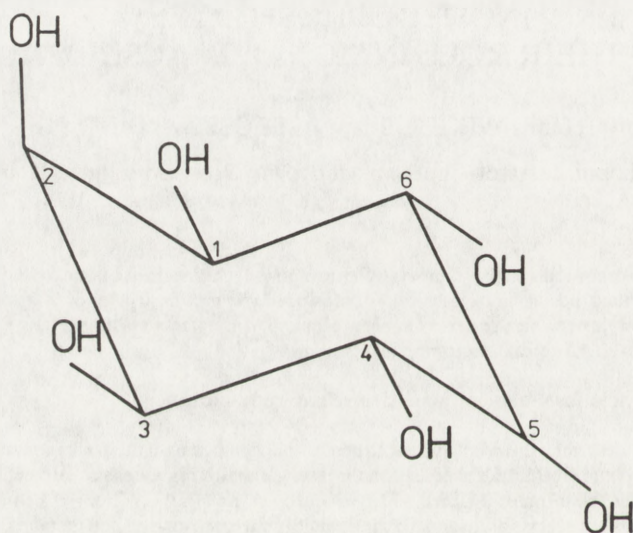
*Stosowane skróty:* KF – kwas fosfatydowy, glukoza-6-P – glukoza-6-fosforan, PtdIns(1)P – fosfatydyloinozytol, PtdIns(3)P – fosfatydyloinozytol-4,5-bisfosforan, Ins(n)P – inozytlofosforany.

## WSTĘP

Inozytol (heksahydroksycykloheksan) może występować w postaci dziewięciu różnych cis-trans izomerów. W komórkach organizmów żywych spotykany jest głównie mio-inozytol [2]. Związek ten występuje w postaci wolnej, pochodnych fosforanowych oraz specyficznie wbudowywany jest do fosfolipidów, zwanych inozytydami. Tylko jedna z grup hydroksylowych mioinozytolu jest grupą aksjonalną mającą wiązania równoległe do osi

symetrii cząsteczki cykloheksanu, pozostałe grupy hydroksylowe są ekwatorialne, tzn. nieco ponad lub poniżej płaszczyzny "równika" cząsteczki cykloheksanu. Dla odróżnienia atom węgla w pierścieniu, do którego przyłączona jest aksjonalna grupa hydroksylowa oznaczono nr 2, pozostałe atomy węgla położone różnie względem C-2 ponumerowano zgodnie z zasadami konwencji IUPAC [2] (rys. 1). Konsekwencją wyżej opisanej budowy cząsteczki mioinozytoli jest ogromna różnorodność stereochemiczna fosforanów tego związku, przedstawiona na schemacie 1.

Związkiem najbardziej interesującym jest inozytolo-1,4,5-trisfosforan [Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>] oraz inozytolo-1,3,4,5,-tetrakisfosforan [Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>].



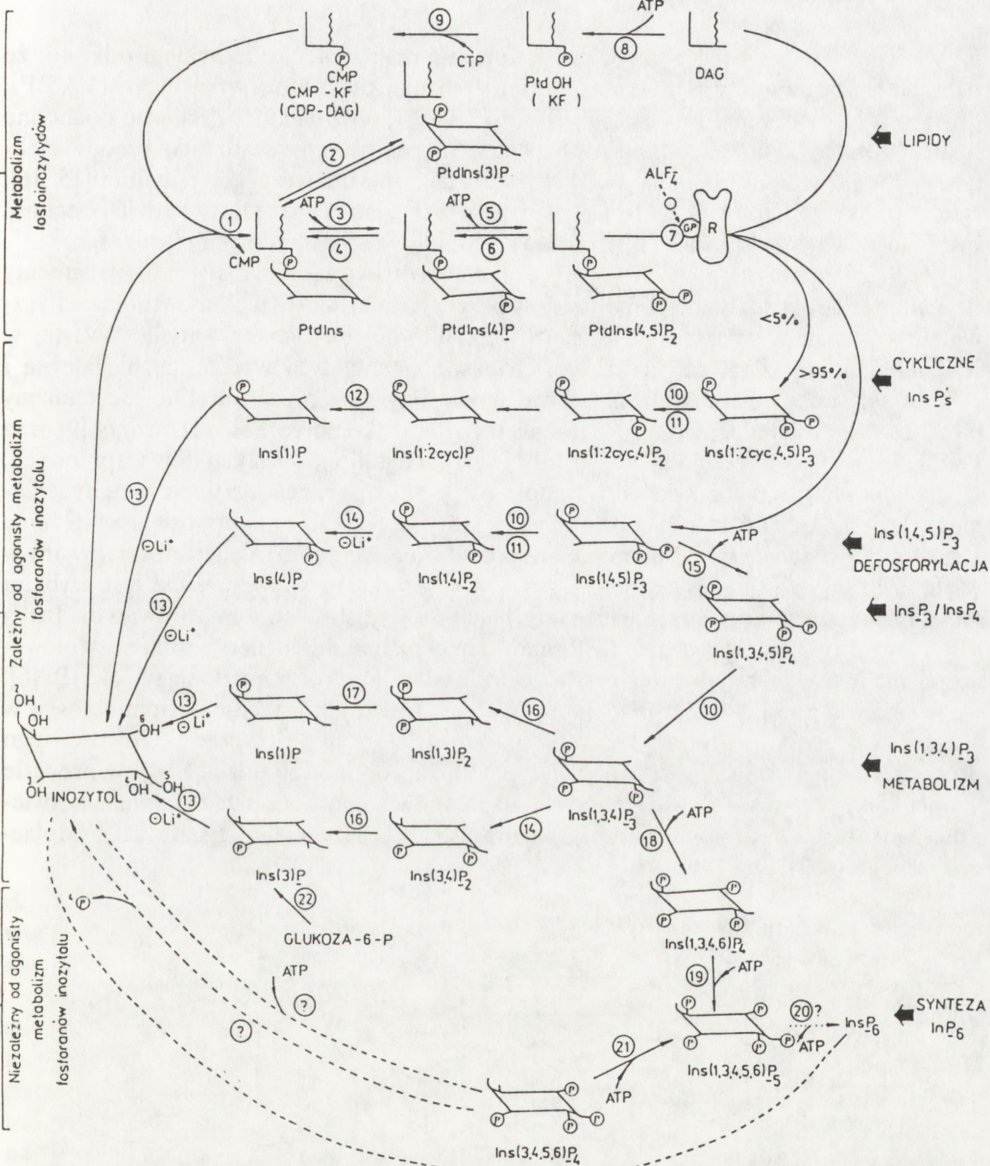
Rys. 1. Struktura krzesłkowa D-mioinozytoli, płaszczyzna symetrii biegnie przez atomy węgla 2 i 5 (wg Berridge'a i Irvine'a [2])

## INOZYTOLOFOSFORANY W PROCESIE MOBILIZACJI JONÓW WAPNIA W KOMÓRCIE

Zwiększenie stężenia jonów wapnia w cytozolu w odpowiedzi na hormony lub neurotransmitery odgrywa znaczącą rolę w regulacji wielu procesów komórkowych.

Pobudzenie niektórych receptorów błonowych doprowadza do aktywacji fosfolipazy C i hydrolizy fosfatydylo-inozytoli-4,5-bisfosforanu [Ptd Ins(4,5)P<sub>2</sub>]. W wyniku tej degradacji powstają 2 związki o charakterze wtórnych przekaźników informacji: inozytolo-trisfosforan [Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>] oraz diacylglicerol (DAG). Wszyscy badacze są zgodni, co do tego, że czynnikiem uwalniającym jony wapnia z wewnątrzkomórkowych, pozamitochondrialnych magazynów komórki jest Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>. Do chwili obecnej pozostaje niewyjaśniony całkowicie mechanizm tego procesu [14].

W drugiej połowie lat osiemdziesiątych stwierdzono występowanie receptorów dla InsP<sub>3</sub> w endoplazmatycznym retikulum połączonym bezpośrednio lub pośrednio z kanała-

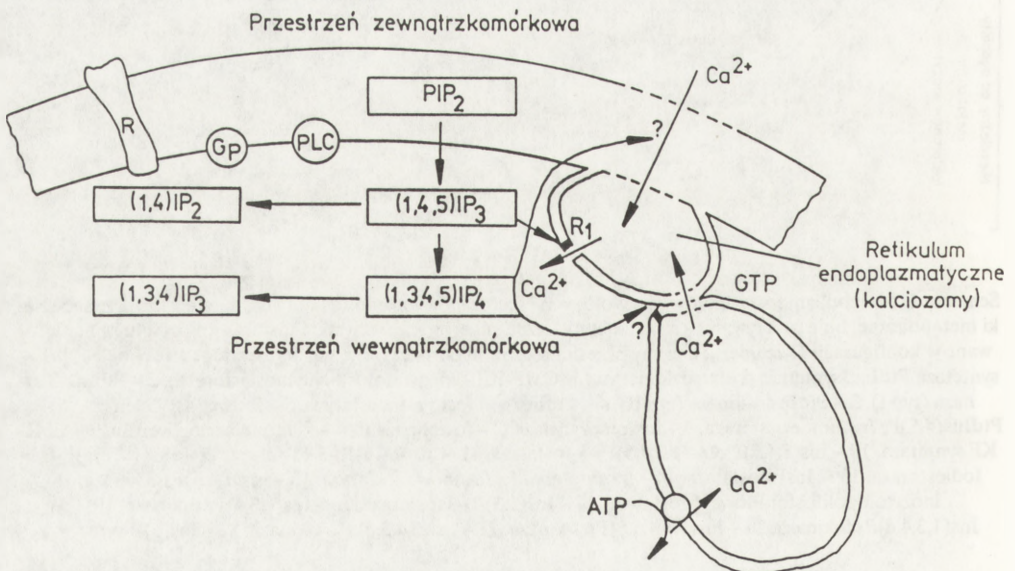


Schemat 1. Metabolizm fosfolipidów inozytowych i fosforanów inozytoli; linia ciągła przedstawia znane szlaki metaboliczne, linia przerywana – szlaki metaboliczne sugerowane; wszystkie fosforany inozytoli są numerowane w konfiguracji D-izomeru; enzymy określono cyframi od 1–22 (schemat wg Berridge'a i Irvine'a [2]): 1 – syntetaza PtdIns, syntetaza fosfatydyloinozytoli (CMP-KF – inozytofosfatydylotransferaza), 2 – PtdIns-3-kinaza (typ I), 3 – PtdIns-4-kinaza (typ II), 4 – PtdIns(4)P fosfomonoesteraza, 5 – PtdIns(4)P-5 kinaza, 6 – PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> fosfomonoesteraza, 7 – fosfoinozytydaza C – fosfolipaza C, 8 – kinaza diacyloglicerolu, 9 – CMP-KF syntetaza, 10 – Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>/Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>-5-fosfatyza, 11 – Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-5-fosfatyza, 12 – Ins(1:2 cyc)P-fosfodiesteraza, 13 – InsP-fosfatyza, 14 – inozytolopolifosforanowa fosfatyza, 15 – Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3 kinaza, 16 – inozytolopolifosforanowa-4-fosfatyza, 17 – Ins(1,3)P<sub>2</sub>-3 fosfatyza, 18 – Ins(1,3,4)P<sub>3</sub>-6-kinaza, 19 – Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub>-5-kinaza, 20 – Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>-2-kinaza, 21 – Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>-1-kinaza, 22 – Ins(3)P-syntetaza

mi wapniowymi. Stosując występujące naturalnie oraz syntetyczne analogi odkryto, że największe powinowactwo do stereospecyficznego miejsca receptora wykazuje  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ . Fosforany inozytolu, np.  $\text{Ins}(2,4,5)\text{P}_3$  czy  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ , oraz niektóre cykliczne pochodne wykazują znacznie mniejsze powinowactwo, a tym samym mniejszą o kilka rzędów efektywność w procesie uwalniania jonów wapnia z endoplazmatycznego retikulum [15, 16]. Należy podkreślić, że  $\text{Ins}(1,2,4,5)\text{P}_4$  towarzyszy  $\text{InsP}_3$ . Ishii i wsp. [7] stwierdzili obecność  $\text{Ins}(1,2,4,5)\text{P}_4$  we frakcji  $\text{InsP}_3$  otrzymanej z płytek krwi stymulowanych trombiną.

Według badań ostatnich lat najwięcej receptorów wiążących  $\text{InsP}_3$  mają fragmenty retikulum endoplazmatycznego położone w bezpośredniej bliskości błony cytoplazmatycznej.  $\text{InsP}_3$  uwalnia tylko część, tj. 30–50%, całkowitej puli jonów wapnia zawartej w retikulum endoplazmatycznym. Z danych eksperymentalnych wynika, że niezależna i zależna od  $\text{InsP}_3$  pula wapnia może być wykorzystywana przez odrębne mechanizmy biorące udział w regulacji poziomu stężenia tego jonu w komórce. Kuno i Gardner [9] oraz Penner i wsp. [12] wskazują na udział  $\text{InsP}_3$  w regulacji błonowych kanałów wapniowych. Uwalnianie wewnątrzkomórkowego wapnia jest gwałtowne i zachodzi wówczas, gdy stężenie  $\text{InsP}_3$  jest rzędu mikromoli. Poziom  $\text{InsP}_3$ , który teoretycznie mógłby osiągnąć stężenie  $15 \mu\text{M}$  w ciągu dwóch minut od momentu pobudzenia receptora, nie jest obserwowany w warunkach *in vivo* i waha się od  $0,1\text{--}0,5 \mu\text{M}$ . Zjawisko to spowodowane jest szybkim metabolizmem wtórnego przekaźnika informacji.  $\text{InsP}_3$  jest substratem zarówno dla  $\text{InsP}_3$  fosfatazy hydrolizującej wiązanie fosforanowe przy piątym węglu pierścienia inozytowego, jak dla  $\text{InsP}_3$  kinazy powodującej dalszą fosforylację trisfosforanu do  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  [6].

Kosztowna energetycznie przemiana  $\text{InsP}_3$  w  $\text{InsP}_4$ , jak i wzrost poziomu  $\text{InsP}_4$  w czasie pobudzenia niektórych receptorów, nasunęła pytanie dotyczące celowości tego procesu. Irvine i wsp. [5] oraz Morris i wsp. [10] zaproponowali udział  $\text{InsP}_4$  w procesie uzupełniania w jony  $\text{Ca}^{2+}$  wewnętrznych magazynów komórki poprzez ułatwienie otwierania kanałów  $\text{Ca}^{2+}$  w błonie komórkowej oraz w różnych fragmentach siateczki śródplazmatycznej (rys. 2).



Rys. 2. Regulacja komórkowej homeostazy  $\text{Ca}^{2+}$  przez  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  i  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  (schemat wg Nahorskiego [11])

Pierwszą obserwacją efektu biologicznego  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  była jego zdolność do aktywacji jaja jeżowca morskiego. Wpływ  $\text{InsP}_4$  obserwowano tylko w obecności  $\text{InsP}_3$ , gdy środowisko zewnętrzne jaja zawierało jony wapnia. W wielu przypadkach zdolność uwalniania jonów wapnia przez  $\text{InsP}_3$  zanika w wyniku braku  $\text{InsP}_4$ .

Ponadto zaobserwowano, że pula  $\text{Ca}^{2+}$ , którą może uwolnić  $\text{InsP}_3$ , jest niewielka i całkowicie zależna od  $\text{InsP}_4$ . Efekt synergistyczny obu omawianych fosforanów na proces uwalniania wapnia z retikulum endoplazmatycznego w wyniku pobudzenia receptorowego, wykazano również w badaniach szeregu innych komórek i tkanek [2].

W badaniach dotyczących wewnątrzkomórkowych magazynów jonów wapnia Volpe i wsp. [18] przedstawili dane świadczące o istnieniu osobnych, oddzielonych od retikulum endoplazmatycznego wewnątrzkomórkowych organeli – kalciosomów, które biorą udział w utrzymaniu homeostazy jonów wapnia w komórce.

Dokładny mechanizm udziału  $\text{InsP}_4$  w procesie przemieszczania się jonów wapnia między wewnętrznymi przedziałami w komórce i uzupełnianiu ich kosztem zewnątrzkomórkowego wapnia ciągle nie jest całkowicie jasny. Obecnie zwraca się uwagę na udział białek wiążących GTP w regulacji poziomu jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w komórce. GTP kontroluje międzybłonowe przejścia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  oraz uwalnianie wapnia prawdopodobnie poprzez aktywację odpowiednich kanałów jonowych. GTP aktywuje uwalnianie  $\text{Ca}^{2+}$  zarówno z puli niezależnej, jak i zależnej od  $\text{InsP}_3$ . Stwierdzono, że uwalnianie to może być blokowane przez mechanizmy nie związane z działaniem  $\text{InsP}_3$ . Wydaje się, że *in vivo* szereg czynników jest odpowiedzialnych za to zjawisko, a obecność GTP raczej spełniałoby rolę jednego ogniwa w całym tym skomplikowanym procesie.

## WPŁYW INOZYTOŁOFOSFORANÓW NA KANAŁY JONOWE

Wskutek stymulacji receptorowej lub mikroiniekcji  $\text{InsP}_3$  do komórek nerwowych dochodzi do przejściowej hiperpolaryzacji błony komórkowej. Na wielu przykładach wykazano, iż taka odpowiedź jest rezultatem otwarcia błonowych kanałów potasu zależnych od jonów wapnia [1,4,8].

Jak już zostało przedstawione,  $\text{InsP}_3$  uwalniając wapń z wewnątrzkomórkowych magazynów powoduje zwiększenie stężenia jonów wapnia w cytoplazmie, co w konsekwencji mogłoby prowadzić do aktywacji kanałów  $\text{K}^+$ . Nie jest jednak jasne, jak długi czasowo puls wapnia jest wymagany do takiej aktywacji. Stwierdzono ponadto, że  $\text{InsP}_4$  ma również udział w elektrofizjologicznej odpowiedzi niektórych komórek. Badania przeprowadzone na komórkach gruczołów łzowych wykazały wpływ acetylocholiny na aktywację kanałów potasowych. Efekt ten jest zależny od wapnia zewnątrzkomórkowego i jest blokowany przez EGTA. Kolejne badania wykazały, że wewnętrzna perfuzja  $\text{InsP}_3$  w nieznacznym stopniu wpływa na prąd jonów potasu, natomiast efekt samego  $\text{InsP}_4$  jest prawie niezauważalny. Natomiast jednoczesne zwiększenie stężenia obu omawianych związków w cytozolu komórkowym wywołuje dramatyczny wzrost prądu potasowego podobny jak po podaniu acetylocholiny. Doświadczenia te sugerują, że zarówno  $\text{InsP}_3$ , jak i  $\text{InsP}_4$  są wymagane dla całkowitej elektrofizjologicznej odpowiedzi komórki [11].

Nie jest dotychczas jasne, czy inozytolopolifosforany działają bezpośrednio na kanały jonowe, czy są one włączone w bardziej skomplikowany mechanizm regulacji tych kanałów.

## InsP<sub>5</sub> ORAZ InsP<sub>6</sub> I ICH ZNACZENIE BIOLOGICZNE

Wiadomo od wielu lat, iż inozytolopentakisfosforan [Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>] oraz inozytoloheksakisfosforan [Ins(1,2,3,4,5,6)P<sub>6</sub>] występują w komórkach roślin i w erytrocytach ptasich [3, 6]. W komórkach ssaków ich istnienie potwierdzono dopiero niedawno [13]. Stężenie tych związków w komórkach hodowli tkankowej waha się od 5–15 μM. Droga ich syntezy w komórce nie jest w pełni określona. Prawdopodobnie InsP<sub>5</sub> powstaje poprzez kolejne ufosforylowanie Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> (schemat 1). Związek ten byłby zatem jednym z produktów działania fosfolipazy C i kolejno odpowiednich kinaz i fosfataz. Badacze nie są zgodni co do tego, iż InsP<sub>5</sub> jest substratem dla 2-inozytolokinazy [2, 13]. Być może InsP<sub>6</sub> powstaje niezależnie od InsP<sub>5</sub> wskutek fosforylacji innych pośrednich inozytolo fosforanów. Należy jednak uznać, iż zarówno InsP<sub>5</sub>, jak InsP<sub>6</sub> są syntetyzowane we wnętrzu komórki [17]. Ze względu na ładunek ich cząsteczki, trudno sobie wyobrazić, aby swobodnie przenikały przez błonę komórkową. Ich funkcja powinna realizować się wyłącznie wewnątrz komórki, natomiast mogą działać zewnątrzkomórkowo, jeżeliby funkcjonował mechanizm sekrecji tych związków.

Polifosforany inozytolu mogą stanowić poza tym magazyn grup fosforanowych oraz ewentualnie brać udział w modulowaniu czwartorzędowej struktury białek, InsP<sub>6</sub> przypisuje się ponadto właściwości antyoksydacyjne [6].

Mikroiniekcja InsP<sub>5</sub> razem z InsP<sub>6</sub> do odpowiedzialnego za funkcje naczyniowo-sercowe jądra pasma samotnego (*nucleus tractus solitarius*) u szczura, powoduje zmiany w ciśnieniu krwi i pracy serca. Podobny efekt wywołuje iniekcja glutaminianu do tego jądra [17]. Inozytolo fosforan InsP<sub>5</sub> i InsP<sub>6</sub> podany oddzielnie powoduje znaczne pobudzenie omawianych neuronów. Zjawisko to okazało się specyficzne. Inne fosforany m.in. InsP<sub>4</sub> nie wykazywały tego typu aktywności. Można zatem, sugerować że InsP<sub>5</sub> oraz InsP<sub>6</sub> działają podobnie do niektórych zewnątrzkomórkowych przekaźników (neurotransmitterów) aktywując lub modulując kanały jonowe błony plazmatycznej. Wraz z rozwojem metod chromatograficznych badacze odkryli bardzo wiele różnych izomerów inozytolo fosforanów. Do roku 1988 liczba ich przekroczyła 20. W wielu przypadkach drogi ich syntezy nie są jeszcze dokładnie poznane (schemat 1).

W niektórych tkankach inozytolo fosforany wydają się spełniać rolę źródła inozytolu dla cyklu lipidów inozytolo wych. W cyklu przemian glukozy-6-fosforanu powstaje ufosforylowany inozytol. Jednakże utworzony w ten sposób Ins(1) występuje w formie enancjomerycznej L. Z badań wynika, iż 90% Ins(1)P w mózgu szczura to izomer D, musi on zatem pochodzić z cyklu lipidów inozytolo wych, a nie z syntezy de novo.

## PODSUMOWANIE

W tym krótkim artykule, zarysowaliśmy bardzo ważną regulacyjną funkcję inozytolo fosforanów w procesach życiowych komórek. Zwrócono szczególną uwagę na różnorodność dróg w regulacji poziomu jonów wapnia w komórce przez te związki.



## LITERATURA

- [1] BERRIDGE MJ. Regulation of ion channels by inositol trisphosphate and diacylglycerol. *J Exp Biol* 1986; **124**: 323–335.
- [2] BERRIDGE MJ, IRVINE RF. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 1989; **341**: 197–204.
- [3] COSGRAVE DJ. Studies in organic chemistry: inositol phosphates – their chemistry, biochemistry and physiology. Amsterdam Elsevier, 1980.
- [4] FINK LA, KACZMAREK LK. Inositol polyphosphates regulate excitability. *TINS* 1988; **11** (8): 338.
- [5] IRVINE RF, LETCHER AJ, HESLOP JP, BERRIDGE MJ. The inositol tris/tetrakisphosphate pathway – demonstration of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-3 kinase activity in animal tissues. *Nature (London)*, 1986; **320**: 631–634.
- [6] IRVINE RF, MOOR RM, POLLOCK WK, SMITH PM, WREGGETT KA. Inositol phosphates: proliferation, metabolism and function. *Phil Trans R Soc Lond* 1988; **320**: 281–298.
- [7] ISHII H, CONNOLLY TM, BROSS TE, MAJERUS PW. Inositol cyclic trisphosphate inositol 1,2-(cyclic)4,5-trisphosphate is formed upon thrombin stimulation of human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 6397–6401.
- [8] KACZMAREK LK. Phorbol esters, protein phosphorylation and the regulation of neuronal ion channels. *J Exp Biol* 1986; **124**: 375–392.
- [9] KUNO M, GARDNER P. Ion channels activated by inositol 1,4,5-trisphosphate in plasma membrane of human T-lymphocytes. *Nature* 1987; **326**: 301–304.
- [10] MORRIS AP, GALLACHER DV, IRVINE RF, PETERSEN OH. Synergism of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate with inositol 1,4,5 trisphosphate in mimicking muscarinic receptor activation of Ca<sup>2+</sup> dependent K<sup>+</sup> channels. *Nature (London)* 1987; **330**: 653–655.
- [11] NAHORSKI SR. Inositol polyphosphates and neuronal calcium homeostasis. *TINS* 1988; **11**: 444–448.
- [12] PENNER R, MATTHEWS G, NEHER E. Regulation of calcium influx by second messenger in rat mast cells. *Nature* 1988; **334**: 499–504.
- [13] RANA RS, HOKIN LE. Role of phosphoinositide in transmembrane signal. *Physiol Rev* 1990; **70**: 115–143.
- [14] SHAH J, COHEN RS, PANT HC. Inositol trisphosphate-induced calcium release in brain microsomes. *Brain Res* 1987; **419**: 1–6.
- [15] STRUPISH J, COOKE AM, POTTER BVL, GIGG R, NAHORSKI SR. Stereospecific mobilization of intracellular Ca<sup>2+</sup> by inositol 1,4,5-trisphosphate. Comparison with inositol 1,4,5-trisphosphorothioate and inositol 1,3,4-trisphosphate. *Biochem J* 1988; **253**: 901–905.
- [16] THEIBERT AB, SUPATTAPONE S, WORLEY PF, BARABAN JM, MEEK JL, SNYDER SH. Demonstration of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptor binding. *Bioch Biophys Res Commun* 1987; **148**: 1283–1289.
- [17] VALLEJO M, JACKSON T, LIGHTMAN S, HANLEY MR. Occurrence and extracellular actions of inositol pentakis- and hexakisphosphate in mammalian brain. *Nature* 1987; **330**: 656.
- [18] VOLPE P, KRAUSE KH, SADOMITSU H, ZORZATO F, POZZON T, MELDOLESI J, LEW PD. Calciosome a cytoplasmic organelle: the inositol 1,4,5 trisphosphate-sensitive Ca<sup>2+</sup> store of non-muscle cells? *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 1091–1095.

Otrzymano: 10 lutego 1991 r.

Przyjęto: 7 maja 1991 r.

Adres autora: ul Dworkowa 3, 00-784 Warszawa



## MATCZYNY RNA – JEGO SYNTEZA I ZNACZENIE WE WCZESNYCH STADIACH ROZWOJU EMBRIONALNEGO ZWIERZĄT

### MATERNAL RNA – SYNTHESIS AND ROLE IN EARLY EMBRYONIC DEVELOPMENT OF ANIMALS

Urszula STĘPIŃSKA

Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Jastrzębiec

*Streszczenie.* Matczyny RNA jest to RNA syntetyzowany w trakcie oogenezy z genomu matczynego i gromadzony w cytoplazmie oocytów. Służy on jako matryca do syntezy białek we wczesnych stadiach rozwoju embrionalnego zwierząt. W skład matczynego RNA wchodzi: informacyjny RNA (mRNA), rybosomalny RNA (rRNA), transportujący RNA (tRNA) oraz mały jądrowy RNA (snRNA). Matczyny mRNA występuje w jaju w połączeniu z białkami głównie w postaci nieczynnych translacyjnie, wolnych, cytoplazmatycznych cząsteczek rybonukleoproteidowych (mRNP), tzw. informosomów. Po zapłodnieniu, a częściowo w trakcie dojrzewania oocytów, matczyny mRNA przechodzą w formę mRNP polisomalnych stając się aktywne translacyjnie. Mechanizm aktywacji matczynego mRNA nie jest w pełni poznany. Prawdopodobnie w tej aktywacji biorą udział liczne procesy, m.in.: wymiana składnika białkowego w mRNP, usunięcie inhibitorów translacji, zmiana organizacji matczynego mRNA, zwiększenie wydajności aparatu translacyjnego, deadenyłacja i ponowna poliadenylacja matczynego mRNA prowadząca do wzmożonej poliadenylacji aktywowanej puli matczynego mRNA.

*Summary.* Maternal RNA synthesized and accumulated in the oocyte cytoplasm is used as a template for protein synthesis during early embryonic development of animals. Maternal RNA consists of: messenger RNA (mRNA), ribosomal RNA (rRNA), transfer RNA (tRNA) and small nuclear RNA (snRNA). Maternal mRNA in eggs is associated with proteins in the translationally inactive form of free cytoplasmic ribonucleoprotein particles (mRNPs) so-called informosomes. After fertilization and partially during meiotic maturation maternal mRNAs enter polysomes acquiring translational activity. Mechanism of maternal mRNA activation is not entirely elucidated. Probably in the activation several processes take part, such as: exchange of protein components in mRNP, removal of translational inhibitors, changes in the organization of maternal mRNA, increase of the activity of translational apparatus, deadenylation and readenylation of maternal mRNA which ultimately lead to the intensive polyadenylation of the activated part of maternal mRNA.



Matczyny RNA jest to RNA zawarty w jaju, syntetyzowany na genomie matczynym i gromadzony podczas oogenezy. Służy on jako matryca do syntezy białek we wczesnej embriogenezie aż do czasu rozpoczęcia translacji już na matrycy embrionalnego mRNA.

## OOGENEZA

Oogeneza prowadzi do powstania dojrzałych gamet żeńskich zdolnych po zapłodnieniu do podjęcia rozwoju embrionalnego (tab. 1). Zaczyna się ona jeszcze w okresie rozwoju embrionalnego osobnika, kiedy to z pierwotnych komórek płciowych powstają oogonia dzielące się mitotycznie. Ostatnie pokolenie oogoniów wchodzi w profazę I podziału mejotycznego stając się oocytami I rzędu.

TABELA 1. Schemat oogenezy u kręgowców z uwzględnieniem syntezy kwasów nukleinowych

Stadium rozwojowe	Stadium komórkowe	DNA	RNA
Oogonia	mitozy	2C DNA, synteza DNA	synteza RNA
Oocyty I rzędu	rozpoczęcie mejozy leptoten zygoten pachyten wczesny diploten	4C DNA brak syntezy DNA czasami replikacja rDNA np. u płazów	początek syntezy RNA
Wzrost oocytów I rzędu (prewitellogeneza i witellogeneza)	przerwanie mejozy w stadium późnego diplotenu (diktiotenu)	4C DNA brak syntezy DNA	intensywna synteza RNA
Oocyty I rzędu w pełni wyrośnięte	podjęcie mejozy – dojrze- wanie oocytów (dokoń- czenie I podziału mejot.)	brak syntezy DNA	ustanie syntezy RNA
Oocyty II rzędu + I ciałko kierunkowe	przerwanie mejozy (w metafazie II podziału mejot.)	2C DNA brak syntezy DNA	brak syntezy RNA
Owulacja i zapłodnienie (+ II ciałko kier.)	dokończenie II podziału mejotycznego	1C DNA (przedjądrze żeńskie)	brak syntezy RNA
Zarodek	mitozy	synteza DNA	synteza RNA

Pierwsze etapy profazy I podziału mejotycznego (od leptotenu do wczesnego diplotenu) zachodzą stosunkowo szybko. W stadium późnego diplotenu (tzw. diktiotenu) profaza I podziału mejotycznego zostaje przerwana, chromosomy ulegają despiralizacji i w tym stadium mogą pozostawać długo, np. u człowieka do ponad 40 lat. W diktiotenie oocyt wchodzi w fazę wielkiego wzrostu, trwającego u ssaków stosunkowo krótko (u myszy ok. 2 tygodni) lub dosyć długo u gatunków nie będących ssakami (u płazów kilka miesięcy).

Jądro rosnących oocytów ulega znacznemu powiększeniu i nosi nieprawidłową, ale przyjętą w literaturze nazwę pęcherzyka zarodkowego, a chromosomy większości zwierząt przybierają postać chromosomów szczołeczkowych świadczących o wzmożonej syntezie RNA.

W czasie trwania wzrostu oocytu można wyróżnić 2 etapy, szczególnie wyraźnie u gatunków o jajach bogatych w żółtko: prewitellogenezę, kiedy to głównie gromadzi się RNA oraz witellogenezę, w której trakcie gromadzi się początkowo RNA, a później materiał zapasowy – żółtko.

Po zakończeniu wzrostu w pełni wyrosnięty oocyt I rzędu zostaje zatrzymany w późnej profazie I podziału mejotycznego aż do czasu, gdy oocyt wchodzi w okres dojrzewania, w którego trakcie ponownie podejmuje przerwany proces mejozy, chromosomy ulegają ponownie spiralizacji, a otoczka jądrowa rozpada się. W wyniku I podziału mejotycznego powstaje duży oocyt II rzędu i mała komórka, tzw. pierwsze ciało kierunkowe. Następnie oocyt II rzędu szybko przystępuje do drugiego podziału dojrzewania. U kręgowców ten podjęty proces mejozy zostaje zatrzymany, gdy oocyt II rzędu osiąga stadium metafazy II podziału mejotycznego. W tym stadium oocyt kręgowców jest owulowany i dopiero po zapłodnieniu zostaje dokończony II podział mejotyczny.

Nie u wszystkich zwierząt oocyt jest owulowany i zapładniany w metafazie II podziału mejotycznego. Na przykład u jeźowców gameta żeńska jest zapładniana już po zakończeniu II podziału mejotycznego, podczas gdy u mięczaków (*Spisula*) czy pierścienic (*Urechis*) jeszcze przed rozpadem otoczki jądrowej, gdy oocyt I rzędu znajduje się w stadium diakinezy I podziału mejotycznego.

## ZAWARTOŚĆ MATCZYNego RNA W JAJACH ZWIERZĄT

Ilości całkowitego matczynego RNA są różne w różnych grupach zwierząt (tab. 2). Jaja organizmów rozwijających się poza organizmem matki (np. płazy, ptaki) są na ogół bogatsze pod względem zawartości matczynego RNA aniżeli jaja ssaków rozwijających się w ścisłym kontakcie z organizmem matki.

TABELA 2. Ilości matczynego RNA w jajach różnych organizmów

Gatunek	Całkowity RNA [ng]	rRNA [ng]	poli(A) + RNA [pg]	Bibliografia
<i>Strongylocentronus purpuratus</i>	3,3	2,7	50–100	[30]
<i>Lytechinus pictus</i>	4,3			[9]
<i>L. pictus</i>			65–112	[135]
<i>Xenopus laevis</i>	4300	4000	40 ng	[105]
<i>X. laevis</i>	4300–6000		84 ng	[15]
<i>X. laevis</i>			86 ng	[39]
Przepiórka	1000			[8]
Kura	2700			[8]
Mysz	0,3		24	[3]
Mysz	0,35	0,22	23	[97]
Mysz	0,45			[61]
Mysz	0,6			[124]
Mysz	0,63			[8]
Królik	15			[8]
Królik	16			[113]
Królik	20			[70]
Owca	0,75			[8]
Świnia	0,8			[8]
Krowa	1			[8]

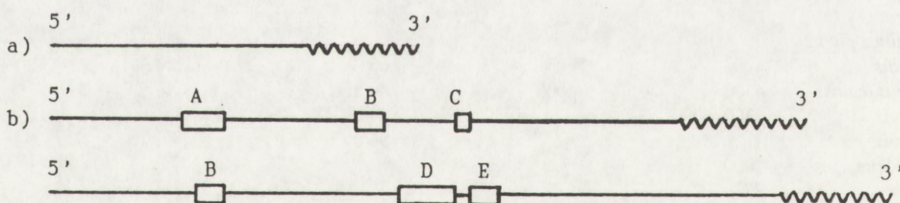
W skład matczynego RNA wchodzi: informacyjny RNA (mRNA), na ogół zawierający na końcu 3' odcinek poli(A) (poli(A) + RNA), rybosomalny RNA (28S, 18S i 5S rRNA), transportujący RNA (4S tRNA) oraz mały jądrowy RNA (4–8S snRNA).

Matczyny mRNA w jajach występuje w połączeniu z białkami tworząc cząsteczki rybonukleoproteidowe (mRNP), głównie w postaci translacyjnie nieczynnych, wolnych cytoplazmatycznych mRNP nazwanych przez Spirina informosomami [122]. Po zapłodnieniu, a częściowo także w trakcie dojrzewania jaja, matczyny mRNA ulega aktywacji, przechodząc w formę aktywną translacyjnie, na polisomy.

Wczesne prace świadczące o istnieniu matczynego mRNA w jajach wykazywały, że mimo zahamowania transkrypcji, wczesny rozwój zarodkowy i synteza białek zachodzi w sposób prawidłowy. W doświadczeniach tych stosowano usuwanie jąder komórkowych z jaj i sztuczną ich aktywację, bądź też inhibitory transkrypcji (aktynomycyna D,  $\alpha$ -amanityna) [11, 30]. Wykazano również, że mRNA wyizolowany z nieczynnych translacyjnie, wolnych cytoplazmatycznych mRNP z oocytów ma zdolność do syntezy białek w układzie *in vitro* [15, 27, 52].

## BUDOWA MATCZYNEGO POLI(A) + RNA

Poli(A) + RNA nagromadzony w cytoplazmie oocytów różni się zasadniczo od cytoplazmatycznego poli(A) + RNA z późniejszych stadiów rozwojowych (rys. 1). Jedyne ok. 30% matczynego poli(A) + RNA w jajach jeźowców [24] i płazów [1] zbudowane jest wyłącznie z sekwencji unikalnych, a aż ok. 70% stanowi tzw. "rozproszony RNA", w którym krótkie (liczące na ogół 150–200 nukleotydów), rozproszone sekwencje powtarzające się są przemieszczane z dłuższymi, liczącymi nawet do kilku tysięcy nukleotydów sekwencjami unikalnymi [1, 24] (rys. 1).



Rys. 1. Proponowany schemat budowy matczynego poli(A) + RNA: a – 30% transkryptów zbudowanych z sekwencji unikalnych, b – 70% transkryptów zbudowanych z sekwencji unikalnych przemieszczanych z sekwencjami powtarzającymi się, czyli tzw. rozproszony matczyny poli(A) + RNA, — – sekwencje unikalne, A, B, C, D, E – sekwencje powtarzające się rozproszone, wwww – odcinek poli(A)

Pojęcie rozproszonego matczynego RNA zostało wprowadzone w laboratorium Davidsona (California Institute of Technology, USA) [30], które od wielu lat zajmuje się budową matczynego RNA. Ocenia się, że poli(A) + RNA z jaj jeźowców zawiera kilkaset rodzin rozproszonego RNA, z których każda zawiera inną sekwencję powtarzającą się [24]. Stwierdzono, że jeden rodzaj sekwencji powtarzającej się występuje co najmniej w 10–50 różnych rodzajach cząsteczek poli(A) + RNA reprezentujących rozproszony matczyny RNA [24, 98], a wiele rodzajów poli(A) + RNA zawiera więcej niż 1 sekwencję powtarzającą się [1, 24]. Sekwencje powtarzające się stanowią tylko niewielką część długości

transkryptów – 10% w jajach jeźowców [24], 20% w jajach *Xenopus* [1] – i na ogół są rozmieszczone wewnątrz długich regionów sekwencji unikalnych [1, 24] (rys. 1).

Cząsteczki rozproszonego matczynego poli(A) + RNA w jajach są na ogół o wiele dłuższe aniżeli cząsteczki matczynego mRNA znajdowanego na polisomach wczesnych zarodków [98]. Budową (sekwencje powtarzające się, wielkość) rozproszony matczyny poli(A) + RNA, stanowiący większość matczynego poli(A) + RNA z jaj jeźowców i płazów, przypomina raczej niedojrzały mRNA występujący w jądrach aniżeli mRNA znajdujący się na polisomach w późniejszych stadiach rozwojowych [16, 98].

Być może pewne unikalne sekwencje RNA występują w jajach jeźowców głównie w postaci rozproszonego RNA, podczas gdy inne w postaci RNA nie zawierającego odcinków powtarzających się [24].

Występowanie matczynego poli(A) + RNA głównie w postaci rozproszonego RNA w dwóch tak filogenetycznie odległych od siebie grupach zwierząt jak jeźowce i płazy wydaje się wskazywać na to, że jest to zjawisko powszechne w przyrodzie.

## SYNTEZA POSZCZEGÓLNYCH RODZAJÓW MATCZYNEGO RNA U PŁAZÓW

Synteza matczynego RNA została najlepiej poznana u płazów, a klasycznym obiektem badań jest żaba afrykańska – płatanina (*Xenopus*).

W oogenezie płazów różne rodzaje RNA nie są syntetyzowane w stałych proporcjach. Dominującym transkryptem (80%) w prewitellogenezie są 5S rRNA i tRNA [34, 68]. Są one produkowane w olbrzymim nadmiarze w stosunku do potrzeb i gromadzone w postaci rybonukleoproteidów, co przedłuża ich trwałość i redukuje ich stężenie w cytoplazmie [33, 34, 96]. W oocytach prewitellogenicznych zdecydowana większość 5S rRNA znajduje się w postaci cząsteczek rybonukleoproteidowych o stałej sedymentacji 42S [33, 34] i 7S [34, 96], a tylko 1% znajduje się w rybosomach [33]. W prewitellogenezie ponad 90% tRNA jest gromadzona w postaci cząsteczek rybonukleoproteidowych 42S razem z 5S rRNA [33, 34], a tylko mała część tRNA występuje w cytoplazmie w postaci niezwiązanej [96]. Synteza 5S rRNA i tRNA jest nadal kontynuowana w witellogenezie [34, 69], ale te rodzaje RNA przestają być dominującym transkryptem ze względu na rozpoczynającą się w tym okresie intensywną syntezę 28S i 18S rRNA [68]. Obserwowane olbrzymie tempo syntezy 28S i 18S rRNA jest możliwe ze względu na to, że geny kodujące te rRNA (rDNA) są selektywnie amplifikowane (wielokrotnie replikowane) podczas wczesnej oogenezy [30]. Przejawia się to zwielokrotnieniem liczby jąderek, które są miejscem syntezy 28S i 18S rRNA. Amplifikację rDNA stwierdzono też u innych zwierząt (piersienic, mięczaków, owadów), ale nie tak intensywną jak u płazów [30].

Nagromadzone podczas oogenezy rodzaje rRNA są w okresie witellogenezy włączane do szybko tworzących się rybosomów [62, 69], wykorzystywanych potem do syntezy białek we wczesnej embriogenezie [13, 30], aż do czasu wytworzenia rybosomów zarodkowych.

Po podjęciu przez oocyt przerwanej mejozy (tab. 1) jąderka zanikają i po dojrzaniu oocyt II rzędu traci zdolność do syntezy rRNA [139, 140].

Większość matczynego mRNA (w zasadzie rozumianego jako poli(A) + RNA) jest u płazów syntetyzowana i gromadzona w oocytach prewitellogenicznych. W trakcie witello-

genezy nie obserwuje się dalszej akumulacji mRNA, chociaż jego synteza zachodzi w dalszym ciągu [37, 51, 105]. Również poszczególne rodzaje mRNA uzyskują maksymalny poziom akumulacji w okresie prewitellogenezy i poziom ich pozostaje stały podczas witellogenezy [39, 51]. Poli(A) + RNA syntetyzowane w trakcie prewitellogenezy charakteryzuje się bardzo długim okresem półtrwania (ponad 2 lata), co wykazano doświadczalnie przy zastosowaniu znakowanych prekursorów RNA [46]. Poli(A) + RNA z oocytów prewitellogenicznych zawiera większość sekwencji obecnych w jajach, co wykazano przy użyciu techniki hybrydyzacji [92]. Również białka uzyskane w wyniku translacji poli(A) + RNA z różnych stadiów oogenezy w układzie *in vitro* były zasadniczo identyczne [27]. Stały poziom poli(A) + RNA obserwowany w trakcie witellogenezy [37] można tłumaczyć istnieniem równoczesnych procesów syntezy i degradacji [37]. W pełni wyrośniętych oocytach płazów istnieją 2 frakcje poli(A) + RNA różniące się kinetyką obrotu; jedna syntetyzowana bardzo wcześnie w prewitellogenezie, bardzo trwała i przechowywana przez całą fazę wzrostu oocytu, przeżywająca dojrzewanie i stanowiąca pulę matczynego mRNA wykorzystywanego do syntezy białek po zapłodnieniu oraz druga, ulegająca metabolicznemu obrotowi (polegającemu na syntezie i degradacji tej puli mRNA), prawdopodobnie zużywana do syntezy białek podczas oogenezy [58].

Mały jądrowy RNA (U1 i U2 snRNA) jest gromadzony w olbrzymiej ilości w prewitellogenicznych oocytach płazów i przechowywany przez cały okres oogenezy w postaci rybonukleoproteidów (snRNP) wewnątrz pęcherzyka zarodkowego [47]. Ten snRNA bierze udział w procesie dojrzewania prekursorów matczynego mRNA, poprzez usuwanie z nich intronów [111]. Prawdopodobnie matczyne snRNA nie funkcjonuje już w rozwoju embrionalnym płazów [111]. Rozwój embrionalny płazów odbywa się do stadium blastuli pod kontrolą nagromadzonego w olbrzymiej ilości matczynego mRNA, a transkrypcja genomu embrionalnego rozpoczyna się od syntezy dużej ilości snRNA [45]. Sugeruje to, że w dojrzewaniu mRNA syntetyzowanego we wczesnej embriogenezie płazów bierze już udział zarodkowy snRNA [111].

## SYNTEZA MATCZYNEGO RNA U SSAKÓW

U myszy różne rodzaje matczynego RNA są syntetyzowane w stałych proporcjach przez całą fazę wzrostu oocytów. Synteza tRNA i 5S rRNA nie dominuje w początkach wzrostu oocytu [3, 30], jak to się obserwuje u płazów [30, 34, 68]. Podczas fazy wzrostu u myszy akumulacja RNA wykazuje dwufazowość, większość (ok. 95%) całkowitego RNA, jak również i poli(A) + RNA, gromadzona jest ze stałą szybkością do czasu osiągnięcia przez oocyt ok. 65% wielkości [124]. W trakcie dalszego wzrostu oocytu myszy zasadniczo już nie obserwuje się dalszej akumulacji RNA [124], mimo iż jego synteza jest dalej kontynuowana. Stwierdzono, że rRNA i tRNA są bardzo stabilne i przeżywają cały okres wzrostu oocytów, podczas gdy poli(A) + RNA ulega częściowej degradacji w tym okresie i okres jego półtrwania wynosi ok. 10 dni [65].

Oocyty mysie gromadzą również snRNA (U1 snRNA) [67]. Ilość tego RNA w oocytach myszy nie jest jednak tak duża jak u płazów, i jest tylko nieco większa niż w komórkach somatycznych [67]. Rozwój embrionalny ssaków, których oocyty gromadzą stosunkowo mało mRNA, jest bardzo krótko uzależniony od genomu matczynego. Wkrótce po zapłod-



nieniu następuje degradacja dużej części mRNA i już w stadium 2-komórkowym myszy rozpoczyna się synteza mRNA na genomie zarodkowym. Ponieważ do tego czasu nie stwierdzono syntezy snRNA, to najprawdopodobniej w tym początkowym okresie embriogenezy matczynej snRNA bierze udział w dojrzewaniu zarodkowego mRNA [67, 111, 114]. Potwierdzeniem tego może być fakt, że do stadium 2-komórkowego w rozwoju zarodkowym myszy obserwowanej degradacji poli(A) + RNA nie towarzyszy rozkład snRNA [32].

## METABOLIZM RNA W OKRESIE DOJRZEWANIA OOCYTU I PO ZAPŁODNIENIU

W okresie dojrzewania oocyta, po rozpadzie otoczki jądrowej, synteza RNA u płazów [63] i ssaków [104] ustaje i zostaje podjęta dopiero po zapłodnieniu – już na genomie zarodkowym (tab. 4). W okresie dojrzewania oocyta obserwuje się duży spadek ilości RNA całkowitego i poli(A) + RNA u płazów [28, 110] i ssaków [3, 4, 91, 97] (tab. 3). Powyżsi autorzy uważają, że w okresie dojrzewania oocytów zachodzi regulacja ilości i jakości mRNA macierzystego, część – być może zbyteczna – zostaje usunięta [3, 28, 91, 97, 110].

TABELA 3. Ilości RNA całkowitego, poli(A) + RNA w jajach i zarodkach myszy [4, 97]

Stadium	RNA całkowity [ng]	poli(A) + RNA [pg]	poli(A) [pg]
Oocyt wyrośnięty	0,43	85	0,95
Jajo niezapłodnione	0,35	35	0,70
Zygota	0,22		0,83
Zarodek 2-kom. późny	0,24		0,26
Zarodek 8–16-kom.	0,69		0,44
Wczesna blastocysta	1,47		1,42

Wkrótce po zapłodnieniu ilość poli(A) + RNA nie zmienia się np. u płazów [110] lub początkowo nieco rośnie np. u jeźowców [135] czy myszy [21, 97] na skutek poliadenylacji uprzednio niespoliadenylowanego RNA. Następnie, w stadium 2-komórkowym u myszy ilość jego zmniejsza się ok. 70% [49, 97], kiedy to również ok. 40% matczynej całkowitego RNA jest degradowana [3, 97] (tab. 3).

## NIERÓWNOMIERNE ROZMIESZCZENIE MATCZYNego mRNA W CYTOPLAZMIE OOCYTÓW I JAJ

Klasyczne eksperymenty wykazują, że za zróżnicowanie komórkowe podczas rozwoju embrionalnego prowadzące do powstania wyspecjalizowanych linii komórkowych odpowiedzialne są specyficzne regiony jaja – cytoplazmatyczne determinanty morfogenetyczne o niezidentyfikowanym podłożu fizykochemicznym [30, 60]. Byłyby one syntetyzowane i nierównomiernie akumulowane podczas oogenezy w cytoplazmie jaja, a – przechodząc podczas bruzdkowania do określonych blastomerów – determinowałyby kierunek ich różnicowania.

Przy użyciu technik histochemicznych barwienia i trawienia rybonukleazami oraz hybrydyzacji *in situ* ze znakowanym poli(U) stwierdzono, że szereg struktur cytoplazmatycznych w oocytach i jajach, które mogą być uważane za cytoplazmatyczne determinanty różnicowania, jest bogate w poli(A) + RNA [60].

W. Jeffery (University of Texas, USA) w licznych pracach z zastosowaniem wymienionych technik wykonanych w głównie na owadach (*Oncopeltus*), osłonicach (*Styela*) i płazach (*Xenopus*) wykazywał ilościowo zróżnicowaną lokalizację matczynego poli(A) + RNA w trakcie oogenezy oraz zmianę tej lokalizacji po zapłodnieniu [60]. W oocytach prewitellogenicznych tych zwierząt poli(A) + RNA był rozmieszczony na ogół równomiernie, podczas gdy w trakcie witellogenezy jego rozmieszczenie stawało się nierównomierne w obrębie oocytu [60]. W dojrzałych oocytach i wczesnych zarodkach owadów (*Oncopeltus*) i płazów (*Xenopus*) stwierdzano zanik zróżnicowanej lokalizacji poli(A) + RNA. U osłonicy (*Styela*) poli(A) + RNA w dojrzałym jaju gromadziło się głównie w jądrze i jego okolicach; po zapłodnieniu przemieszczało się do bieguna animalnego, a następnie w trakcie bruzdkowania do blastomerów dających początek linii komórek ektodermalnych [60].

W oocytach i wczesnych zarodkach jeżowca [2] oraz myszy [97, 124] poli(A) + RNA wykazywało równomierne rozmieszczenie.

Tak więc ilościowo zróżnicowana lokalizacja mRNA w cytoplazmie oocytów i jaj nie wydaje się być zjawiskiem powszechnym podczas wczesnego rozwoju zwierząt, co nie wyklucza jednak nierównomiernego rozmieszczenia pewnych specyficznych mRNA. Za pomocą hybrydyzacji *in situ* z odpowiednimi sondami wykazano nierównomierne rozmieszczenie niektórych mRNA w dojrzałych jajach i zygocie *Xenopus*, podczas gdy całkowity poli(A) + RNA wykrywany poprzez hybrydyzację ze znakowanym poli(U) nie wykazywał ilościowo zróżnicowanej lokalizacji [94, 141]. W dojrzałym jaju *Xenopus* mRNA aktywny występuje głównie na obrzeżu, mRNA tubulinowy przeważa w centrum, a histonowy mRNA jest rozmieszczony równomiernie [94]. Po zapłodnieniu wszystkie te mRNA obserwowano na obrzeżu zygoty [94].

Również w jajach i zarodkach osłonicy (*Styela*) wykazano nierównomierne rozmieszczenie mRNA aktywnego [60]. Region jaja osłonicy zwany półksiężycem żółtym, preferencyjnie przemieszczający się podczas bruzdkowania do blastomerów dających początek linii komórek mezodermalnych, aczkolwiek ubogi w mRNA całkowity, jest bardzo bogaty w mRNA aktywny.

Z kolei mRNA cykliny A i mRNA małej podjednostki reduktazy rybonukleotydomy wykazywały równomierne rozmieszczenie w cytoplazmie oocytów *Spisula* [126].

Wydaje się, że RNA może zawierać pewne sygnały odpowiedzialne za specyficzne jego rozmieszczenie w poszczególnych regionach jaja. Wskazują na to m.in. doświadczenia, w których globinowy mRNA królika nastrzyknięty do zapłodnionego jaja *Xenopus* sytuował się w trakcie rozwoju głównie w części animalnej zarodka [48].

Z kolei poli(A) + RNA z bieguna wegetatywnego jaja *Xenopus* wprowadzony do zapłodnionej zygoty gromadził się głównie na biegunie wegetatywnym zarodka, podczas gdy RNA z bieguna wegetatywnego nie zawierający poli(A) wykazywał względnie homogenne rozmieszczenie w zarodku [18]. Autorzy sugerują, że poli(A) + RNA z bieguna wegetatywnego jaja jest zdolny do znajdowania specyficznych dla bieguna wegetatywnego miejsc wiążących w cytoplazmie (np. elementów cytoszkieletu).

Ostatnio proces przemieszczania się matczynego mRNA do określonych regionów jaja doczekał się pewnego wyjaśnienia [142]. W oocytach *Xenopus* obserwowano, że mRNA oznaczony jako Vg1, rozmieszczony równomiernie w początkowym okresie witellogenety, zajmował część korową wegetatywnej półkuli w pełni wyrośniętych oocytów [141]. Stosując odpowiednie inhibitory stwierdzono, że w procesie przemieszczania się tego mRNA zaangażowane są w jakiś sposób mikrotubule, a z kolei za proces związania tego mRNA w części wegetatywnej odpowiedzialny jest system mikrofilamentów [142].

## OKRES UZALEŻNIENIA ROZWOJU EMBRIONALNEGO OD MATCZYNEGO mRNA

Synteza białek we wczesnej embriogenezie zachodzi tylko na matrycy matczynego mRNA, aż do czasu rozpoczęcia translacji na matrycy mRNA syntetyzowanego już na genomie zarodkowym. Okres uzależnienia syntezy białek od matczynego mRNA jest różny w różnych grupach zwierząt, stosunkowo długi u jeźowców i płazów, a bardzo krótki u ssaków, u których obejmuje zaledwie kilka pierwszych podziałów brudkowania (tab. 4).

W celu wykazania momentu, w którym rozpoczyna się synteza poszczególnych rodzajów RNA stosowano inhibitory transkrypcji oraz znakowane prekursorzy RNA. Na ogół po zapłodnieniu najpierw rozpoczyna się synteza mRNA, a później rRNA.

TABELA 4. Okres rozpoczynania transkrypcji na genomie zarodkowym

Gatunek	mRNA	Bibliografia	rRNA	Bibliografia
Jeżowiec	blastulacja	[53]	gastrulacja	[30]
<i>Xenopus</i>	blastulacja	[85]	gastrulacja	[14, 30]
Przepiórka	brudkowanie	[89]	blastulacja	[89]
Mysz	2 komórki	[11, 21, 97, 114]	2-4 komórki	[20]
Człowiek	4-8 komórek	[10]	8 komórek	[130]
Królik	8-16 komórek	[115]	64-128 komórek	[71]
Owca	8-16 komórek	[26]		
Krowa	8-16 komórek	[17]	8-16 komórek	[17]

Okres przedstawienia translacji z mRNA matczynego na zarodkowy można śledzić na podstawie pojawiania się w embriogenezie izoenzymów – strukturalnie różnych (rozdzielalnych elektroforetycznie) form jednego enzymu, warunkowanych przez różne allele tego samego genu. Na przykład u przepiórki poznano 4 alleliczne formy dehydrogenazy fosfoglukonianowej (EC 1.1.1.43). Przy skrzyżowaniu osobników różniących się formami tego enzymu, jego forma matczyzna wyczerpuje się w ciągu 24 godzin inkubacji, kiedy to zaczynają pojawiać się 2 formy enzymu (matczyzna i ojcowiska) na skutek aktywacji alleli rodzicielskich [87].

Z kolei u myszy stwierdzono, że formy matczyne enzymu izomerazy glukozofosforanowej (EC 5.3.1.9.) pozostają na stałym poziomie w ciągu 2,5 dnia rozwoju embrionalnego, następnie ilość ich zaczyna się zmniejszać i stają się niewykrywalne do 5,5 dnia rozwoju. Formy embrionalne tego enzymu zaczynają się pojawiać w 3,5 dniu rozwoju [134].

Okres przestawienia transkrypcji z genomu matczynego na zarodkowy jest okresem krytycznym we wczesnej embriogenezie i być może obserwowany u myszy i innych ssaków

blok w rozwoju zarodka *in vitro* odpowiada właśnie temu okresowi. Zarodki myszy z większości linii hodowane *in vitro* są niezdolne do rozwoju do stadium blastocysty i na ogół rozwój ich jest zatrzymany w stadium 2-komórkowym. Defekt ten jest uzależniony od genomu matki [50] i można go przezwyciężyć przez mikroiniekcję niewielkiej ilości cytoplazmy z zarodka 2-komórkowego z linii nie ulegającej takiemu zablokowaniu rozwoju [80]. Prawdopodobne więc jest, że wiele przypadków wczesnego zamierania zarodków może być spowodowane nieprawidłowościami w matczynym RNA – wadami letalnymi w budowie, rozmieszczeniu, metabolizmie lub jego zmniejszoną ilością.

## AKTYWACJA MATCZYNEGO mRNA

Większość syntetyzowanego podczas oogenezy mRNA nie ulega translacji aż do momentu dojrzewania lub zapłodnienia, kiedy to mRNA ulega aktywacji przechodząc z frakcji wolnych cytoplazmatycznych mRNP nieczynnych translacyjnie, do frakcji mRNP polisomalnych, już aktywnych w procesie syntezy białek.

U wielu organizmów obserwuje się olbrzymi wzrost szybkości syntezy białek na matrycy matczynego mRNA po zapłodnieniu; np. u jeźowców szybkość syntezy białek jest kilkadziesiąt razy większa niż przed zapłodnieniem [30, 57]. Zmianom ilościowym w syntezie białek u jeźowców po zapłodnieniu towarzyszą tylko niewielkie zmiany w jakości syntetyzowanych białek [44, 107, 123, 125].

U płazów w okresie dojrzewania oocyty obserwuje się dwukrotny wzrost szybkości syntezy białek [133], z drobnymi jedynie zmianami w ich jakości [75, 116, 133], po zapłodnieniu następuje już tylko niewielki wzrost szybkości syntezy [118]. Szereg białek przestaje być syntetyzowane wkrótce po zapłodnieniu, a z kolei wiele pojawia się po raz pierwszy i jest nadal syntetyzowane na matrycy matczynego mRNA w późniejszych etapach embriogenezy [75].

U myszy w okresie dojrzewania oocyty obserwuje się lekki spadek w szybkości syntezy białek [132], co może być związane z zahamowaniem syntezy i degradacją mRNA w tym okresie [4] lub też z deadenylacją mRNA [91], o czym szczegółowiej będzie mowa poniżej. W tym okresie zanotowano liczne zmiany w jakości syntetyzowanych białek [132], a po zapłodnieniu obserwuje się tylko niewielki wzrost szybkości ich syntezy [137], jak również pewne zmiany w jakości syntetyzowanych białek [11, 137]. Zmiany te były takie same w zapłodnionych zygotach, jak i w partenogenetycznie aktywowanych jajach [95], co wyklucza możliwość syntezy białek na matrycy mRNA zarodkowego.

Aktywacja zapasowego mRNA wydaje się być głównie spowodowana zwiększeniem ilości mRNA dostępnej do translacji, jak również zmianą rodzajów mRNA ulegających translacji. Zanotowano liczne rodzaje matczynego mRNA ulegające po raz pierwszy translacji w okresie dojrzewania oocytów lub po zapłodnieniu, lub przeciwnie przestające syntetyzować białka w tym okresie. U *Xenopus* podczas dojrzewania oocytów obserwowano przejście mRNA kodującego białko G10 do puli czynnej translacyjnie [74], podobnie mRNA aktywatora plazminogenu u myszy [55, 56] oraz dużej ilości bliżej niezidentyfikowanych mRNA w oocytach *Xenopus* [39]. Po zapłodnieniu również zanotowano liczne mRNA przechodzące do puli polisomalnej w zarodkach *Xenopus* [41]. Podobnie mRNA kodujący cyklinę A czy mRNA dla małej podjednostki reduktazy rybonukleotydowej

przemieszczają się do puli polisomalnej wkrótce po zapłodnieniu u jeźowców i *Spisula* [44, 107, 123, 125], czemu towarzyszy rozpoczęcie intensywnej syntezy tych białek.

Z kolei inne mRNA (dla białek rybosomalnych, aktyny,  $\alpha$ -tubuliny) w tym czasie przechodziły z puli polisomalnej do puli wolnych, cytoplazmatycznych mRNP tracąc aktywność translacyjną [58, 59, 91, 107].

Po zapłodnieniu u jeźowców i płazów przemieszczaniu poli(A) + RNA z frakcji informosomów do frakcji polisomalnej [38, 105] towarzyszy kilkukrotny wzrost liczby rybosomów włączanych w polisomy [57, 138].

## MECHANIZMY AKTYWACJI MATCZYNEGO mRNA

Wzmóżona synteza białek na matrycy matczynego mRNA w okresie dojrzewania oocytu lub wkrótce po zapłodnieniu wydaje się być spowodowana zarówno zwiększeniem dostępności mRNA do translacji, jak również wzrostem aktywności aparatu translacyjnego.

Jak już wspomniano, matczyny mRNA występujący w oocytach w postaci wolnych cytoplazmatycznych mRNP jest nieczynny translacyjnie prawdopodobnie z powodu związania z określonymi białkami [30, 40, 52, 84, 99, 122], gdyż mRNA z tych mRNP uwolniony od białek jest czynny translacyjnie w układzie *in vitro* [27, 52]. U *Xenopus* stwierdzono istnienie specyficznych dla oocytów białek związanych z mRNA we frakcji wolnych cytoplazmatycznych mRNP [25, 29, 35, 100]. Białka z tych mRNP oprócz funkcji represyjnej w stosunku do translacji najprawdopodobniej chronią zawarty w nich mRNA przed rozkładem, gdyż mRNA w mRNP jest bardzo odporny na działanie rybonukleazy A [29]. Niektóre z tych białek zanikają stopniowo w trakcie wzrostu oocytów [29, 100] i być może, wynikiem tego jest, stopniowe zwiększanie się tempa syntezy białek w miarę zaawansowania oogenezy u *Xenopus* [127]. Świadczy to, że aktywacja mRNA jest procesem ciągłym i niekoniecznie wymaga bodźca, np. zapłodnienia. W układzie translacyjnym *in vitro* i *in vivo* zawierającym czynny translacyjnie mRNA globinowy dodanie białek wiążących mRNA z informosomów oocytów *Xenopus* wywoływało odwracalne zahamowanie syntezy globiny [101].

Również wyizolowana z mRNP niezapłodnionych jaj jeźowców frakcja białek wykazywała cechy inhibitora translacji [52]. Mogą one być odpowiedzialne za zahamowanie translacji mRNA zawartego w oocytarnym mRNP, a odłączenie ich od matczynego mRNA po zapłodnieniu powodowałoby aktywację syntezy białek na jego matrycy.

Istnieje przypuszczenie, że niezdolność do translacji poszczególnych rodzajów matczynego mRNA w oocytach jest spowodowana tworzeniem kompleksów z określonymi białkami. I tak funkcję inhibitora translacji trzech rodzajów mRNA w oocytach *Xenopus* być może pełni białko p56, tworzące z tymi RNA specyficzne kompleksy [25]. Stwierdzono, że w oocytach prewitellogenicznych, kiedy ilość białka p56 jest bardzo duża, te trzy rodzaje mRNA występują głównie we frakcji nieczynnych translacyjnie informosomów, podczas gdy w oocytach witellogenicznych, kiedy ilość białka p56 zmniejsza się, te mRNA znajdują się we frakcji polisomalnej [25].

Powyższe dane oraz różnice w składzie białek związanych z mRNA w wolnych cytoplazmatycznych mRNP i w polisomalnych mRNP [77, 78, 130, 131] wydają się wskazywać na

to, że jednym z ważniejszych elementów aktywacji matczynego mRNA może być wymiana składnika białkowego w matczynych mRNP.

Wydaje się, że również organizacja matczynego mRNA w oocytach może być odpowiedzialna za jego niezdolność do translacji. Jak już wspomniano wcześniej, poli(A) + RNA nagromadzony w cytoplazmie jaj jeźowców i płazów jest zbudowany w ok. 70% z rozproszonego RNA [1, 24]. Większość (90%) tego rozproszonego matczynego poli(A) + RNA wyizolowanego z oocytów *Xenopus* jest niezdolna do syntezy białek zarówno w układzie translacyjnym *in vitro*, jak i *in vivo* [102]. W okresie wczesnej embriogenezy większość rozproszonego poli(A) + RNA zanika [1, 24, 98] i np. u płazów w stadium kijanki zaledwie 15% cytoplazmatycznego poli(A) + RNA wykazuje cechy rozproszonego RNA [1].

Mimo że rozproszony RNA stanowi większość matczynego poli(A) + RNA, to jednak, jak do tej pory, funkcja jego nie jest poznana i jest przedmiotem licznych dyskusji [1, 24, 98]. Nie jest nawet pewne, czy w przebiegu embriogenezy podlega dojrzewaniu i staje się czynny translacyjnie. Calzone wyizolował z jaj jeźowców (i oznaczył sekwencję nukleotydową) określony poli(A) + RNA, oznaczony jako ISp1, zawierający rozproszone sekwencje powtarzające się, reprezentujący rozproszony matczyny RNA [16]. Cechy budowy tego transkryptu (brak otwartej ramki odczytu o odpowiedniej długości umożliwiającej syntezę peptydu dłuższego niż 30 aminokwasów) wyizolowanego zarówno z jaj, jak i zarodków jeźowców wydają się wskazywać na jego niezdolność do syntezy białek zarówno w oogenezie, jak i podczas embriogenezy. Oczywiście nie wyklucza to, że w przebiegu embriogenezy inny macierzysty rozproszony poli(A) + RNA mógłby się stawać zdolny do translacji.

Wykrycie możliwości tworzenia kompleksów pomiędzy rozproszonym poli(A) + RNA a U1 snRNA z jaj jeźowców mogłoby być potwierdzeniem hipotezy, że matczyny rozproszony poli(A) + RNA może stanowić pulę niedojrzałych prekursorów mRNA [109].

Wydaje się, że jednym z czynników ograniczających translację w oocytach, oprócz inaktywacji mRNA w informosomach, jest zbyt niska wydajność aparatu translacyjnego oocytów. Wskazują na to doświadczenia, w których translacyjnie czynny mRNA nastrzyknięty do oocytów jeźowców [22], płazów [64, 101], owcy [79], myszy [42] wprawdzie ulegał translacji, ale jednocześnie powodował spadek syntezy endogennych białek syntetyzowanych przez oocyt. Tak więc wprowadzenie dodatkowego mRNA do oocytów nie powodowało wzmoczonej syntezy białek. Natomiast wprowadzenie do oocytów *Xenopus* polisomów z retikulocytów królika powodowało zwiększenie ogólnej syntezy białek [64].

Niski poziom translacji w oocytach spowodowany może być też brakiem czynnika eIF2 inicjującego translację, gdyż dodanie go do translacyjnego układu z jaj jeźowców stymulowało syntezę białek, aczkolwiek nie w takim stopniu jak dodanie całego lizatu retikulocytów zawierającego cały układ translacyjny [136].

## METABOLIZM ODCINKA POLI(A) W OOGENEZIE I WE WCZESNEJ EMBRIOGENEZIE ORAZ JEGO ROLA W AKTYWIZACJI MATCZYNEGO mRNA

Jak już wspomniano, matczyne mRNA ma odcinek poli(A) na końcu 3' [15, 27, 30, 74] tak zresztą jak większość mRNA z organizmów eukariotycznych. Odcinek poli(A), zbudowany z kilkudziesięciu do kilkuset nukleotydów adenylowych [66], dodawany jest do mRNA postranskrypcyjnie [43, 73, 94, 129].

Wydaje się, że segment poli(A), w połączeniu ze specyficznym białkiem p75 wiążącym poli(A) może mieć wpływ na trwałość mRNA [6, 7, 12, 66, 82, 131] lub też mieć znaczenie w translacji [54, 90].

W trakcie wczesnego rozwoju zwierząt obserwowano zarówno długie, liczące ponad 100 nukleotydów odcinki poli(A), jak również odcinki krótsze, liczące 10 lub 20–40 reszt adenylowych. Stwierdzono to w oocytach i po zapłodnieniu jaja u *Spisula* [107], w oocytach *Xenopus* [15], w brudzkujących zarodkach przepiórki [89], w zarodkach myszy do stadium dwukomórkowego [21].

W prewitellogenicznych oocytach *Xenopus* intensywnie syntetyzujących mRNA obserwowano przeważnie poli(A) + RNA z dłuższymi odcinkami poli(A) zbudowanymi z 60–80 adenylowych [15] i wówczas 70% poli(A) + RNA znajdowano we frakcji polisomalnej [27]. W dojrzałych oocytach *Xenopus* występuje głównie poli(A) + RNA z krótszymi odcinkami poli(A) liczącymi 20–40 reszt adenylowych [15] i większość (70–90%) tego poli(A) + RNA występuje w formie nieczynnych translacyjnie informosomów [15, 27, 105].

Jak już wspomniano, podczas dojrzewania oocytów obserwowano zaprzestanie syntezy matczynego RNA [63, 104] i spadek ilości poli(A) + RNA zarówno u *Xenopus* [28, 110], jak i ssaków [4, 91]. Ostatnio stwierdzono, że w dojrzałych oocytach myszy ten spadek ilości poli(A) + RNA jest spowodowany nie tylko przez jego degradację, ale po prostu przez jego deadenylację [91]. U *Xenopus* spadkowi ilości poli(A) + RNA podczas dojrzewania oocytów towarzyszyło z jednej strony zmniejszenie ogólnej ilości poli(A) [28, 110], a z drugiej wydłużenie odcinka poli(A) w pozostałych poli(A) + RNA [58, 110], co można tłumaczyć deadenylacją jednych a adenylacją innych mRNA. W trakcie dojrzewania oocytów obserwowano poliadenylację pewnych mRNA u *Xenopus* [23, 39, 74, 120] i u myszy [55, 56, 91]. Należały do nich m.in. mRNA kodujące białko G10 i D7 u *Xenopus* [74, 120], aktywator plazminogenu u myszy [55, 56]. Poliadenylacja tych mRNA poprzedzała lub towarzyszyła ich przejściu do puli polisomalnej. Z kolei w okresie dojrzewania oocytów inne sekwencje ulegały deadenylacji (np. mRNA kodujące aktynę u *Xenopus* [58] i myszy [4], białka rybosomalne u *Xenopus* [59]) i traciły zdolność do syntezy białek.

Po zapłodnieniu, wspomnianej uprzednio wzmoczonej syntezie białek na matrycy matczynego mRNA towarzyszyła jego poliadenylacja u *Urechis* [31], u jeźowców [36, 76, 117, 135], u płazów [110] i u ssaków [21, 97]. Wzrost ilości poli(A) po zapłodnieniu jest spowodowany zarówno zwiększeniem liczby cząsteczek mRNA zawierających poli(A), jak i wydłużaniem odcinka poli(A) [117, 135]. Oprócz poliadenylacji po zapłodnieniu obserwowano również obrót odcinka poli(A) u jeźowców [36, 135] i ptaków [89]. Obrót (*turn-over*) odcinka poli(A) polega na jego degradacji i ponownej szybkiej syntezie w tej samej cząsteczce mRNA. W rezultacie, po zapłodnieniu, dominuje proces wydłużania odcinków poli(A) w mRNA i stąd obserwowana wzmoczona poliadenylacja matczynego mRNA. I tak

po zapłodnieniu obserwowano poliadenylację pewnych rodzajów mRNA u *Spisula* [106, 107], u *Urechis* [108] i ich włączanie do puli polisomalnej aktywnej translacyjnie. Ale również obserwowano, że pewne mRNA ulegają deadenylacji i zaprzestają syntetyzować białka na skutek wyłączenia ich z puli polisomalnej; np. w taki sposób zachowuje się mRNA kodujący  $\alpha$ -tubulinę u *Spisula* [107].

Z wszystkich tych powyższych danych wynika, że zarówno w okresie dojrzewania oocytów, jak i po zapłodnieniu istnieje silna korelacja pomiędzy stopniem adenylacji danego mRNA a jego zdolnością translacyjną. Na ogół mRNA podlegający poliadenylacji był włączany do puli polisomalnych mRNP, podczas gdy te mRNA, które podlegały deadenylacji, przestawały syntetyzować białka. Jest to zgodne z obserwacjami dotyczącymi zachowania mRNA w innych systemach biologicznych. I aczkolwiek w układzie translacji *in vitro* segment poli(A) w mRNA nie wydaje się konieczny do syntezy białka [83, 121], to jednak szereg doświadczeń wskazuje, że istnieje zależność między stanem poliadenylacji cząsteczek mRNA a ich zdolnością do translacji w układzie *in vivo* [19, 90, 103], jak również że cząsteczki mRNA globinowego w mRNP polisomalnych zawierają dłuższe odcinki poli(A) niż cząsteczki mRNA w wolnych cytoplazmatycznych mRNP [72].

Zależność zdolności translacyjnej mRNA od stopnia jego adenylacji nie jest jednak bezwzględna. Na przykład zablokowanie poliadenylacji poprzez dodatek kordycepiny nie miało wpływu na normalny olbrzymi wzrost szybkości syntezy białek w zapłodnionych jajach jeżowca [76]. Z kolei, u *Spisula* z czterech cząsteczek mRNA poliadenylowanych wkrótce po zapłodnieniu tylko 2 były włączane całkowicie do puli polisomalnej, a 2 pozostałe mRNA, mimo że ulegały poliadenylacji w tym samym czasie, to jedynie częściowo przemieszczały się z puli wolnych cytoplazmatycznych mRNP do puli polisomalnych mRNP [107].

Wydaje się, że uzyskiwanie przez mRNA zdolności translacyjnej związane jest nie z samą długością odcinka poli(A), ale raczej jest regulowane przez proces poliadenylacji mRNA [74]. Wykazano mianowicie, że wprowadzony do dojrzewających oocytów *Xenopus* mRNA oznaczony jako XBG10, nie zawierający odcinka poli(A) był poliadenylowany i przemieszczał się do puli polisomalnej, aktywnej translacyjnie, podczas gdy wprowadzony ten sam transkrypt o uprzednio już wydłużonym odcinku poli(A) nie podlegał dalszej poliadenylacji i nie przemieszczał się do puli polisomalnej. Przy zablokowaniu możliwości poliadenylacji działaniem kordycepiny transkrypt ten również pozostawał we frakcji infor-mosomów.

Jak już wspomniano, szereg danych wskazuje, że segment poli(A) bierze udział w kontroli stabilności mRNA w komórce i aczkolwiek nie obserwowano ścisłej korelacji pomiędzy długością odcinka poli(A) a trwałością mRNA, to wydaje się, że istnieje pewna krytyczna długość odcinka poli(A) – ok. 25 nukleotydów – poniżej której odcinek ten nie pełni swojej stabilizującej roli [86]. Prawdopodobnie pewna minimalna długość odcinka poli(A) jest potrzebna do związania się z białkiem wiążącym poli(A) [7]. Białko to, po przyłączeniu do poli(A) w mRNA, może chronić odcinek poli(A) przed degradacją [6, 7, 82, 131], jak również brać udział w przyłączaniu mRNA do rybosomów i być pozytywnym regulatorem translacji [54, 131].

Zachowanie matczynego mRNA – jego stabilność – w zależności od stopnia adenylacji jest specyficzna dla poszczególnych sekwencji. Na przykład mRNA oznaczony jako XOC 2–7, który był deadenylowany po zapłodnieniu u *Xenopus*, ulegał natychmiastowej degradacji [23, 58], podczas gdy deadenylacji mRNA aktynowego i mRNA białek rybosomalnych



podczas dojrzewania oocytów *Xenopus* towarzyszyła jedynie utrata przez nie zdolności translacyjnej, a degradacja tych mRNA miała miejsce dopiero w okresie bruzdkowania [5, 58, 59, 139]. Tak więc deadenyłacja macierzystego mRNA nie musi być koniecznie związana z natychmiastową jego degradacją, ale może być sposobem usuwania danego mRNA z puli czynnej translacyjnie [91]. Sagata [110] sugeruje, że mRNA deadenyłowany podczas dojrzewania oocytów u *Xenopus* może ulegać powtórnej poliadenylacji po zapłodnieniu i być włączany do puli matczynego mRNA syntetyzującego białka we wczesnej embriogenezie.

Olszańska [88] wysunęła koncepcję, że proces uruchamiania matczynego mRNA może być związany z obrotem odcinka poli(A) podczas przechodzenia mRNA z matczynych, zapasowych mRNP do mRNP polisomalnych. W wyniku badań prowadzonych w naszej pracowni okazało się, że w oocytach witellogenicznych, a w mniejszym stopniu we wczesnych zarodkach, istnieje znaczna aktywność enzymatyczna rozkładająca poli(A) na odcinki długości A10; jest ona zlokalizowana głównie w jądrach oocytów. Być może enzym ten jest identyczny z endorybonukleazą IV (EC 3.1.26.6), którą wykryto uprzednio w jądrach komórkowych jajowodów kury i przepiórki, specyficznie rozkładającą poli(A) na odcinki długości A10 [81, 83].

Po rozpadzie otoczki jądrowej podczas dojrzewania oocytów i kolejnych podziałów bruzdkowania enzym ten mógłby przenikać do cytoplazmy i rozkładać częściowo nieosłonięte odcinki poli(A) w matczynym mRNA, w trakcie jego uwalniania się z matczynych, zapasowych mRNP.

Po odtworzeniu otoczki jądrowej odcinki poli(A) byłyby ponownie odbudowywane w procesie cytoplazmatycznej poliadenylacji [94, 118] dzięki działaniu polimerazy poli(A) (EC 2.7.7.19), enzymu powszechnie występującego u wszystkich organizmów prokariotycznych i eukariotycznych [43].

Szybkie podziały bruzdkowania u jeźowców i ptaków oraz towarzyszący temu zanik i odbudowa otoczki jądrowej stwarzałyby warunki do działania enzymów odpowiedzialnych za degradację i ponowną syntezę odcinka poli(A) w matczynym mRNA, czego objawem był obserwowany obrót odcinka poli(A) po zapłodnieniu u jeźowców [36, 135] i ptaków [89].

U myszy, u których podziały bruzdkowania zachodzą bardzo powoli (co kilkanaście i więcej godzin), nie obserwowano obrotu odcinka poli(A) (patrz tab. 3). Po niewielkim wzroście ilości poli(A) (o ok. 20%) wkrótce po zapłodnieniu spowodowanego poliadenylacją matczynego mRNA [21, 97] ilość poli(A) spada o ponad 70% po I podziale bruzdkowania [97], a jednocześnie obserwuje się zmniejszenie całkowitej ilości RNA o ok. 40% [3, 97]. Prawdopodobnie mechanizm taki pozwala na eliminację dużej części matczynego mRNA zbędnego do dalszego rozwoju.

Nie jest wykluczone, że w degradacji odcinka poli(A) w matczynym mRNA oprócz endorybonukleazy IV mogą brać udział również inne enzymy nukleolityczne, np. endorybonukleaza V (EC 3.1.27.8) czy 2',3'-egzorybonukleaza specyficzna dla poli(A) (EC 3.1.13.4) [112]. Jednakże jak do tej pory enzymy te wyizolowano jedynie z komórek somatycznych i wykazują one znacznie niższą specyficzność w stosunku do poli(A) aniżeli endorybonukleaza IV [112].

## LITERATURA

- [1] ANDERSON DM, RICHTER JD, CHAMBERLIN ME, PRICE DH, BRITTEN RJ, SMITH LD, DAVIDSON EH. Sequence organization of the poly(A) RNA synthesized and accumulated in lampbrush chromosome stage *Xenopus laevis* oocytes. *J Mol Biol* 1982; 155: 281–309.
- [2] ANGERER LM, ANGERER RC. Detection of poly(A) + RNA in sea urchin eggs and embryos by quantitative in situ hybridization. *Nucl Acids Res* 1981; 9: 2819–2840.
- [3] BACHVAROVA R, DE LEON V. Polyadenylated RNA of mouse ova and loss of maternal RNA in early development. *Dev Biol* 1980; 74: 1–8.
- [4] BACHVAROVA R, De LEON V, JOHNSON A, KAPLAN G, PAYNTON BV. Changes in total RNA polyadenylated RNA and actin mRNA during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* 1985; 108: 325–331.
- [5] BAUM EZ, WORMINGTON WM. Coordinate expression of ribosomal protein genes during *Xenopus* development. *Dev Biol* 1985; 111: 488–498.
- [6] BERNSTEIN P, ROSS J. Poly(A), poly(A)-binding protein and the regulation of mRNA stability. *Trends Biochem Sci* 1989; 14: 373–377.
- [7] BLOBEL G. A protein of molecular weight 78 000 bound to the polyadenylate region of eucaryotic messenger RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70: 924–928.
- [8] BORGUL A, OLSZAŃSKA B. Zawartość RNA macierzystego w oocytach wybranych gatunków ssaków i ptaków. Materiały z XXVI Zjazdu P T Bioch 1990, Gdańsk.
- [9] BRANDHORST BP. Simultaneous synthesis, translation and storage of mRNA including histone mRNA in sea urchin eggs. *Dev Biol* 1980; 79: 139–148.
- [10] BRAUDE P, BOLTON V, MOORE S. Humane gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 1988; 332: 459–461.
- [11] BRAUDE P, PELHAM H, FLACH G, LOBATTO R. Post-transcriptional control in the early mouse embryo. *Nature* 1979; 282: 102–105.
- [12] BREWER G, ROSS J. Poly(A) shortening and degradation of the 3' A + U- rich sequences of human c-myc mRNA in a cell free system. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 1697–1708.
- [13] BROWN DD, GURDON JB. Absence of rRNA synthesis in the anucleolate mutant of *X. laevis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1964; 51: 139–146.
- [14] BROWN DD, LITTNAE. RNA synthesis during development of *Xenopus laevis* the South African clawed toad. *J Mol Biol* 1964; 8: 669–687.
- [15] CABADA MO, DARNBROUGH C, FORD PJ, TURNER PC. Differential accumulation of two classes of poly(A) associated with messenger RNA during oogenesis in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 1977; 57: 427–439.
- [16] CALZONE FJ, LEE JJ, LE NGA, BRITTEN RJ, DAVIDSON EH. A long nontranslatable poly(A)RNA stored in the egg of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Genes Dev* 1988; 2: 305–318.
- [17] CAMOUS S, KOPECNY V, FLECHON JE. Autoradiographic detection of the earliest stage of (<sup>3</sup>H)-uridine incorporation into the cow embryo. *Biol Cell* 1986; 58: 195–200.
- [18] CAPCO DG, JEFFERY WR. Regional accumulation of vegetal pole poly-(A) + RNA injected into fertilized *Xenopus* eggs. *Nature* 1981; 294: 255–257.
- [19] CARRAZANA EJ, PASIEKA KB, MAJZOUBJA. The vasopressin mRNA poly(A) is unusually long and increases during stimulation of vasopressin gene expression in vivo. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 2267–2274.
- [20] CLEGG KB, PIKO L. RNA synthesis and cytoplasmic polyadenylation in the one-cell mouse embryos. *Nature* 1982; 295: 342–345.
- [21] CLEGG KB, PIKO L. Poly(A) length, cytoplasmic adenylation and synthesis of poly(A) + RNA in early mouse embryo. *Dev Biol* 1983; 95: 331–341.
- [22] COLIN AM, HILLE MB. Injected mRNA does not increase protein synthesis in unfertilized, fertilized and ammonia-activated sea urchin eggs. *Dev Biol* 1986; 115: 184–194.
- [23] COLOT HV, ROSBASH M. Behavior of individual maternal pA + RNAs during embryogenesis of *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 1982; 94: 79–86.
- [24] COSTANTINI FD, BRITTEN RJ, DAVIDSON EH. Message sequences and short repetitive sequences are interspersed in sea urchin egg poly(A) + RNAs. *Nature* 1980; 287: 111–117.
- [25] CRAWFORD DR, RICHTER JD. An RNA-binding protein from *Xenopus* oocytes is associated with specific message sequences. *Development* 1987; 101: 741–749.
- [26] CROSBY M, GANDOLFI F, MOOR RM. The control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *J Reprod Fertil* 1988; 82: 769–775.

- [27] DARNBROUGH C, FORD PJ. Cell-free translation of messenger RNA from oocytes of *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 1976; **50**: 285–301.
- [28] DARNBROUGH C, FORD PJ. Turnover and processing of poly(A) in full-grown oocytes and during progesterone-induced oocyte maturation in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 1979; **71**: 323–340.
- [29] DARNBROUGH C, FORD PJ. Identification of a class of oocyte-specific proteins bound to messenger RNA. *Eur J Biochem* 1981; **113**: 415–424.
- [30] DAWIDSON EH. Gene activity in early development. 3rd ed. Orlando: Academic Press, 1986.
- [31] DAVIS FC, DAVIS RW. Polyadenylation of RNA in immature oocytes and early cleavage of *Urechis caupo*. *Dev Biol* 1978; **66**: 86–96.
- [32] DEAN WL, SEUFERT AC, SCHULTZ GA, PRATHER RS, SIMERLY C, SCHATTEN G, PILCH DR, MARZLUFF WF. The small nuclear RNAs for pre-mRNA splicing are coordinately regulated during oocyte maturation and early embryogenesis in the mouse. *Development* 1989; **106**: 325–334.
- [33] DENIS H, MAIRY M. Recherches biochimique sur l'oogenese. 1. Distribution intracellulaire du RNA dans les petits oocytes de *Xenopus laevis*. *Eur J Biochem* 1972; **25**: 524–534.
- [34] DENIS H, LE MAIRE M. Biochemical research on oogenesis: distribution of tRNA-linked peptides and proteins in premitotic oocyte of *Xenopus laevis*. *Biochimie* 1987; **69**: 495–509.
- [35] DIXON LK, FORD PJ. Regulation of protein synthesis and accumulation during oogenesis in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 1982; **93**: 478–497.
- [36] DOLECKI GJ, DUNCAN RF, HUMPHREYS T. Complete turnover of poly(A) on maternal mRNA of sea urchin embryos. *Cell* 1977; **11**: 339–344.
- [37] DOLECKI GJ, SMITH LD. Poly(A) + RNA metabolism during oogenesis in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 1979; **69**: 217–236.
- [38] DUNCAN R, HUMPHREYS T. Most sea urchin maternal mRNA sequences in every abundance class appear in both polyadenylated and nonpolyadenylated molecules. *Dev Biol* 1981; **88**: 201–210.
- [39] DWORKIN MB, DWORKIN-RASTL E. Changes in RNA titers and polyadenylation during oogenesis and oocyte maturation in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 1985; **112**: 451–457.
- [40] DWORKIN MB, DWORKIN-RASTL E. Functions of maternal mRNA in early development. *Mol Reprod Dev* 1990; **26**: 261–297.
- [41] DWORKIN MB, SHRUTKOWSKI A, DWORKIN-RASTL E. Mobilization of specific maternal RNA species into polysomes after fertilization in *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 7636–7640.
- [42] EBERT KM, BRINSTER RL. Rabbit  $\alpha$ -globin messenger RNA translation by the mouse ovum. *J Embryol Exp Morphol* 1983; **74**: 159–168.
- [43] EDMONDS M, WINTERS MA. Polyadenylate polymerase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1976; **17**: 149–179.
- [44] EVANS T, ROSENTHAL ET, YOUNGBLOM J, DISTEL D, HUNT T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that destroyed at each cleavage division. *Cell* 1983; **33**: 389–396.
- [45] FORBES DJ, KORNBERG TB, KIRSCHNER MW. Small nuclear RNA transcription and ribonucleoprotein assembly in early *Xenopus* development. *J Cell Biol* 1983; **97**: 62–72.
- [46] FORD PJ, MATHIESON T, ROSBASH M. Very long lived messenger RNA in ovaries of *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 1977; **57**: 417–426.
- [47] FRITZ A, PARISOT R, NEWMAYER D, DE ROBERTIS EM. Small nuclear U-ribonucleoproteins in *Xenopus laevis* development. Uncoupled accumulation of protein and RNA components. *J Mol Biol* 1984; **178**: 273–285.
- [48] FROELICH JP, BROWDER LW, SCHULTZ GA. Translation and distribution of rabbit globin mRNA in separated cell types of *Xenopus laevis* gastrulae. *Dev Biol* 1977; **56**: 356–371.
- [49] GIEBELHAUS DH, WEITLAUF HM, SCHULTZ GA. Changes in actin mRNA content in normal and delayed implanting mouse embryos. *Dev Biol* 1985; **107**: 407–413.
- [50] GODDARD MJ, PRATT HPM. Control of events during early cleavage of the mouse embryo: an analysis of the "2-cell block". *J Embryol Exp Morphol* 1983; **73**: 111–133.
- [51] GOLDEN L, SCHAFFER U, ROSBASH M. Accumulation of individual pA + RNA during oogenesis of *Xenopus laevis*. *Cell* 1980; **22**: 835–844.
- [52] GRAINGER JL, WINKLER MM. Fertilization triggers unmasking of maternal mRNAs in sea urchin eggs. *Mol Cell Biol* 1987; **7**: 3947–3954.
- [53] GROSS PR, MALKIN JL, MOYER WA. Templates for the first proteins of embryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1964; **51**: 407–414.

- [54] GROSSI DE SA M, STANDART N, MARTINS DE SA C, AKHAYAT O, SCHERRER K. The poly(A)-binding protein facilitates in vitro translation of poly(A)-rich mRNA. *Eur J Biochem* 1988; 176: 521–526.
- [55] HUARTE J, BELIN D, VASSALI JD. Plasminogen activator in mouse and rat oocytes: induction during meiotic maturation. *Cell* 1985; 43: 551–558.
- [56] HUARTE J, BELIN D, VASSALI A, STRICKLAND S, VASSALI J. Meiotic maturation of mouse oocytes triggers the translation and polyadenylation of dormant tissue-type plasminogen activator mRNA. *Genes Dev* 1987; 1: 1201–1211.
- [57] HUMPHREYS T. Measurements of messenger RNA entering polysomes upon fertilization of sea urchin eggs. *Dev Biol* 1971; 26: 210–218.
- [58] HYMAN LE, COLOT HV, ROSBASH M. Accumulation and behavior of mRNA during oogenesis and early embryogenesis of *Xenopus laevis*. [w] Malaciński GM, Klein WH. [red] Molecular aspects of early development. New York, Plenum Press 1984: 253–256.
- [59] HYMAN LE, WORMINGTON WE. Translational inactivation of ribosomal protein mRNA during *Xenopus* oocyte maturation. *Genes Dev* 1988; 2: 598–605.
- [60] JEFFERY WR. Maternal RNA and the embryonic localization problem. [w] Siddiqui MAQ [red] Control of embryonic gene expression. Boca Raton, Florida: CRC Press 1983: 73–114.
- [61] KAPLAN G, SERGIO LA, BACHVAROVA R. rRNA accumulation and protein synthetic patterns in growing mouse oocytes. *J Exp Zool* 1982; 220: 361–370.
- [62] KORN LJ, GURDON JB. The reactivation of developmentally inert 5S RNA genes in somatic nuclei injected into *Xenopus* oocytes. *Nature* 1981; 289: 461–465.
- [63] LAMARCA MJ, STROBEL-FIDLER MC, SMITH LD, KEEM K. Hormone effects on RNA synthesis by stage 6 oocytes of *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 1975; 47: 384–393.
- [64] LASKEY RR, MILLS AD, GURDON JB, PARTINGTON GA. Protein synthesis in oocytes of *Xenopus laevis* is not regulated by supply of messenger RNA. *Cell* 1977; 11: 345–351.
- [65] LEIBFRIED-RUTLEDGE ML, FLORMAN HM, FIRST NL. The molecular biology of mammalian oocyte maturation. [w] Schatten H, Schatten G. [red] The molecular biology of fertilization. San Diego: Academic Press 1989: 259–301.
- [66] LITTAUER UZ, SOREQ H. The regulatory function of poly(A) and adjacent 3' sequences in translated RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1982; 27: 53–83.
- [67] LOBO SM, MARZLUFF WF, SEUFERT AC, DEAN WL, SCHULTZ GA, SIMERLY C, SCHATTEN G. Localization and expression of U1RNA during early mouse embryo development. *Dev Biol* 1988; 127: 649–661.
- [68] MAIRY M, DENIS H. Recherches biochimiques sur l'oogenese 1. Synthèse et accumulation du RNA pendant l'oogenese du crapaud sud-africain *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 1971; 24: 143–165.
- [69] MAIRY M, DENIS H. Recherches biochimiques sur l'oogenese 2. Assemblage des ribosomes pendant le grand accroissement des oocytes de *Xenopus laevis*. *Eur J Biochem* 1972; 25: 535–543.
- [70] MANES C. Nucleic acid synthesis in preimplantation rabbit embryos. I. Quantitative aspects, relationship to early morphogenesis and protein synthesis. *J Exp Zool* 1969; 133: 303–310.
- [71] MANES C. Nucleic acid synthesis in preimplantation rabbit embryos. II Delayed synthesis of ribosomal RNA. *J Exp Zool* 1971; 176: 87–96.
- [72] MARBAIX G, HUEZ G, NOKIN P, CLEUTER Y. Free cytoplasmic  $\alpha$ -globin messenger RNA appears during maturation of rabbit reticulocytes. *FEBS Lett* 1976; 66: 269–272.
- [73] MCDEVITT MA, GILMARTIN GM, REEVES WH, NEVINS JR. Multiple factors are required for poly(A) addition to a mRNA 3' end. *Genes Dev* 1988; 2: 588–597.
- [74] MCGREW LL, DWORKIN-RASTL E, DWORKIN MB, RICHTER JD. Poly(A) elongation during *Xenopus* oocyte maturation is required for translational recruitment and is mediated by short sequence element. *Genes Dev* 1989; 3: 803–815.
- [75] MEULER DC, MALACIŃSKI GM. Protein synthesis pattern during early amphibian embryogenesis. [w] Malaciński GM, Klein WH [red] Molecular aspects of early development. New York: Plenum Press 1984: 267–288.
- [76] MESCHER A, HUMPHREYS T. Activation of maternal mRNA in the absence poly(A) formation in fertilized sea urchin eggs. *Nature* 1974; 249: 138–139.
- [77] MOON RT. Poly(A) containing messenger ribonucleoprotein complexes from sea urchin eggs and embryos: polypeptides associated with native and UV-crosslinked mRNP. *Differentiation* 1983; 24: 13–23.
- [78] MOON RT, MOE KD, HILLE MB. Polypeptides of nonpolyribosomal messenger ribonucleoprotein complexes of sea urchin eggs. *Biochemistry* 1980; 19: 2723–2730.

- [79] MOOR RM, POWELL DJ. Translational capacity of sheep oocytes microinjected with messenger RNA. *J Reprod Fertil* 1989; **86**: 289–295.
- [80] MUGGLETON-HARRIS A, WITTINGHAM DG, WILSON L. Cytoplasmic control of preimplantation development in vitro in the mouse. *Nature* 1982; **299**: 460–462.
- [81] MULLER WEG. Endoribonuclease IV. A poly(A)-specific ribonuclease from chick oviduct 1. Purification of the enzyme. *Eur J Biochem* 1976; **70**: 241–248.
- [82] MULLER WEG, ARENDS J, ZAHN RK, SCHRODER HC. Control of enzymic hydrolysis of polyadenylate segment of messenger RNA: role of polyadenylate-associated proteins. *Eur J Biochem* 1978; **86**: 283–290.
- [83] MULLER WEG, SEIBERT G, STEFFEN R, ZAHN RK. Endoribonuclease IV. 2. Further investigation on the specificity. *Eur J Biochem* 1976; **70**: 249–258.
- [84] MURRAY MT, KROHNE G, FRANKE WW. Different soluble cytoplasmic mRNA binding proteins and particles in *Xenopus laevis* oocytes and embryos. *J Cell Biol* 1991; **112**: 1–11.
- [85] NEWPORT J, KIRSCHNER M. A major developmental transition in early *Xenopus* embryos. II: Control of the onset of transcription. *Cell* 1982; **30**: 687–696.
- [86] NUDEL U, SOREQ H, LITTAUER UZ, MARBAIX G, HUEZ G, LECLERCQ H, HUBERT E, CHANTRENNE H. Globin mRNA species containing poly(A) segments of different lengths. Their functional stability in *Xenopus* oocytes. *Eur J Biochem* 1976; **64**: 115–121.
- [87] OHNO S, STENIUS S, CHRISTIAN LC, HARRIS C. Synchronous activation of both parental alleles at the 6-PGD locus of Japanese quail embryos. *Bioch Genet* 1968; **2**: 197–204.
- [88] OLSZAŃSKA B. Rola segmentów poliadenylowych i poliadenylacji RNA w rozwoju embrionalnym. *Post Biochem* 1985; **31**: 365–384.
- [89] OLSZAŃSKA B, KŁUDKIEWICZ B, LASSOTA Z. Transcription and polyadenylation processes during early development of quail embryo. *J Embryol Exp Morphol* 1984; **79**: 11–24.
- [90] PALATNIK CM, WILKINS C, JACOBSON A. Translational control during early *Dictyostelium* development: Possible involvement of poly(A) sequences. *Cell* 1984; **36**: 1017–1025.
- [91] PAYNTON BV, REMPEL R, BACHVAROVA R. Changes in state of adenylation and time course of degradation of maternal mRNA during oocyte maturation and early embryonic development in the mouse. *Dev Biol* 1988; **129**: 304–314.
- [92] PERLMAN S, ROSBASH M. Analysis of *Xenopus laevis* ovary and somatic cell polyadenylated RNA by molecular hybridization. *Dev Biol* 1978; **63**: 197–212.
- [93] PERRY BA, CAPCO DG. Spatial reorganization of actin, tubulin and histone mRNAs during meiotic maturation and fertilization in *Xenopus* oocytes. *Cell Differ Dev* 1988; **25**: 99–108.
- [94] PERRY RP, KELLY DE, LA TORRE J. Synthesis and turnover of nuclear and cytoplasmic polyadenylic acid in mouse L cells. *J Mol Biol* 1974; **82**: 315–331.
- [95] PETZOLDT U, HOPPE PC. Spontaneous parthenogenesis in *Mus musculus*: Comparison of protein synthesis in parthenogenetic and normal preimplantation embryos. *Mol Gen Genet* 1980; **180**: 547–552.
- [96] PICKARD B, WEGNEZ M. Isolation of 7S particles from *Xenopus laevis* oocytes: A 5S RNA-protein complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; **76**: 241–245.
- [97] PIKO L, CLEGG KB. Quantitative changes in total RNA, total poly(A) and ribosomes in early mouse embryos. *Dev Biol* 1982; **89**: 362–378.
- [98] POSAKONY JW, FLYTZANIS CN, BRITTEN RJ, DAVIDSON EH. Interspersed sequence organization and developmental representation of cloned poly(A)RNAs from sea urchin eggs. *J Mol Biol* 1983; **167**: 361–389.
- [99] RICHTER JD. Molecular mechanism of translational control during early development of *Xenopus laevis*. [w] Ilan J [red] Translational regulation of gene expression. New York: Plenum Publish Corp 1987: 111–139.
- [100] RICHTER JD, SMITH LD. Developmentally regulated RNA binding proteins during oogenesis in *Xenopus laevis*. *J Biol Chem* 1983; **258**: 4864–4869.
- [101] RICHTER JD, SMITH LD. Reversible inhibition of translation by *Xenopus* oocyte-specific proteins. *Nature* 1984; **309**: 378–380.
- [102] RICHTER JD, SMITH LD, ANDERSON DM, DAVIDSON EH. Interspersed poly(A)RNAs of amphibian oocytes are not translatable. *J Mol Biol* 1984; **173**: 227–241.
- [103] ROBINSON BG, FRIM DM, SCHWARTZ WJ, MAJZOUB JA. Vasopressin mRNA in the suprachiasmatic nuclei: daily regulation of polyadenylic tail length. *Science* 1988; **241**: 342–344.
- [104] RODMAN TC, BACHVAROVA R. RNA synthesis in preovulatory mouse oocytes. *J Cell Biol* 1976; **70**: 251–257.

- [105] ROSBASH M, FORD PJ. Polyadenylic acid-containing RNA in *Xenopus laevis* oocytes. *J Mol Biol* 1974; **84**: 87–101.
- [106] ROSENTHAL ET, RUDERMAN JV. Widespread changes in the translation and adenylation of maternal messenger RNAs following fertilization of *Spisula* oocytes. *Dev Biol* 1987; **121**: 237–246.
- [107] ROSENTHAL ET, TANSEY TR, RUDERMAN JV. Sequence-specific adenylations and deadenylations accompany changes in the translation of maternal messenger RNA after fertilization of *Spisula* oocytes. *J Mol Biol* 1983; **166**: 309–327.
- [108] ROSENTHAL ET, WILT FH. Patterns of maternal messenger RNA accumulation and deadenylation during oogenesis in *Urechis caupo*. *Dev Biol* 1986; **117**: 55–63.
- [109] RUZDIJIC S, PEDERSON T. Evidence for an association between U1RNA and interspersed repeat single-copy RNA in the cytoplasm of sea urchin eggs. *Development* 1987; **101**: 107–116.
- [110] SAGATA N, SHIOKAWA K, YAMAN K. A study on the steady state population of poly(A) + RNA during development of *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 1980; **77**: 431–448.
- [111] SANTIAGO CL, MARZLUFF WF. Changes in gene activity early after fertilization. [w] Schatten H, Schatten G [red] The molecular biology of fertilization. San Diego: Academic Press 1989: 303–322.
- [112] SCHRODER HC, BACHMAN M, MESSER R, MULLER WEG. Nucleotide-specific ribonuclease from Eukaryotes. Their possible roles during poly(A) + mRNA maturation and degradation. *Prog Mol Subcell Biol* 1985; **9**: 53–103.
- [113] SCHULTZ GA. Polyadenylic acid-containing RNA in unfertilized and fertilized eggs of rabbit. *Dev Biol* 1975; **44**: 270–277.
- [114] SCHULTZ GA. Utilization of genetic information in the preimplantation mouse embryo. [w] Rossant J, Pedersen R [red] Experimental approaches to mammalian embryonic development. New York, Cambridge: Univ Press 1986: 239–265.
- [115] SCHULTZ G, MANES C, HAHN WE. Synthesis of RNA containing polyadenylic acid sequences in preimplantation rabbit embryos. *Dev Biol* 1973; **30**: 418–426.
- [116] SHIH RJ, O'CONNOR CM, KENN K, SMITH LD. Kinetic analysis of amino acid and protein synthesis in amphibian oocytes and embryos. *Dev Biol* 1978; **66**: 172–182.
- [117] SLATER DW, SLATER I, GILLESPIE D. Post fertilization synthesis of polyadenylic acid in sea urchin embryos. *Nature* 1972; **240**: 33–337.
- [118] SLATER DW, SLATER L, BOLUM FJ. Cytoplasmic poly(A) polymerase from sea urchin eggs. *Dev Biol* 1978; **63**: 94–110.
- [119] SMITH RC. Synthesis of 180 kDa protein is molecular marker of *Xenopus* oocyte meiotic maturation. *Cell Differ Dev* 1990; **31**: 97–104.
- [120] SMITH RC, DWORKIN MB, DWORKIN-RASTL E. Destruction of a translationally controlled mRNA in *Xenopus* oocytes delayed progesterone-induced maturation. *Genes Dev* 1988; **2**: 1296–1306.
- [121] SOREQ H, NUDEL U, SALOMON R, REVEL M, LITTAUER UZ. In vitro translation of polyadenylic acid-free rabbit globin messenger RNA. *J Mol Biol* 1974; **88**: 233–245.
- [122] SPIRIN AS. On "masked" forms of messenger RNA in early embryogenesis and in other differentiating systems. *Curr Top Dev Biol* 1966; **1**: 1–38.
- [123] STANDART NM, BRAY SJ, GEORGE EL, HUNT T, RUDERMAN JV. The small subunit of ribonucleotide reductase is encoded by one of the most abundant translationally regulated maternal RNAs in clam and sea urchin eggs. *J Cell Biol* 1985; **100**: 1968–1976.
- [124] STERNLICHT AL, SCHULTZ RM. Biochemical studies of mammalian oogenesis: kinetics of accumulation of total and poly(A)-containing RNA during growth of the mouse oocyte. *J Exp Zool* 1981; **215**: 191–200.
- [125] SWENSON KI, FARREL KM, RUDERMAN JV. The clam embryonic protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. *Cell* 1986; **47**: 861–870.
- [126] SWENSON K, BORGESE N, PEITRINI G, RUDERMAN JV. Three translationally regulated mRNA are stored in the cytoplasm of clam oocytes. *Dev Biol* 1987; **123**: 110–116.
- [127] TAYLOR MA, SMITH LD. Quantitative changes in protein synthesis during oogenesis in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 1985; **110**: 230–237.
- [128] TESARIK J, KOPEČNY V, PLACHOT M, MANDELBAUM J. Early morphological signs of embryonic genome expression in human preimplantation development as revealed by quantitative electron microscopy. *Dev Biol* 1988; **128**: 15–20.
- [129] TSIAPALIS CM. Regulation of mRNA polyadenylation-adenylation. *Mol Biol Rep* 1987; **12**: 291–298.

- [130] VINCENT A, GOLDENBERG S, SCHERRER K. Comparison of protein associated with duck-globin mRNA and its polyadenylated segment in polyribosomal and repressed free messenger ribonucleoprotein complexes. *Eur J Biochem* 1981; **114**: 179–193.
- [131] VINCENT A, CIVELLI O, MAUNDRELL K, SCHERRER K. Identification and characterization of translationally repressed cytoplasmic globin messenger ribonucleoprotein particles from duck erythroblasts. *Eur J Biochem* 1980; **112**: 617–633.
- [132] WASSARMAN PM. Oogenesis: Synthetic events in the developing mammalian egg. [w] Hartman JF [red] Mechanism and control of animal fertilization. New York, London: Academic Press 1983: 1–54.
- [133] WASSERMAN WJ, RICHTER JD, SMITH LD. Protein synthesis during maturation promoting factor- and progesterone-induced maturation in *Xenopus* oocytes. *Dev Biol* 1982; **89**: 152–158.
- [134] WEST JD, FLACKHART JH. Genetic differences in glucose phosphate isomerase activity among mouse embryos. *Development* 1989; **107**: 465–472.
- [135] WILT FH. The dynamics of maternal poly(A)-containing mRNA in fertilized sea urchin eggs. *Cell* 1977; **11**: 673–681.
- [136] WINKLER MM, NELSON EM, LASHBROOK C, HERSHEY JWB. Multiple levels of regulation of protein synthesis at fertilization in sea urchin eggs. *Dev Biol* 1985; **107**: 290–300.
- [137] WOLGEMUTH DJ. Synthetic activities of the mammalian early embryo: Molecular and genetic alterations following fertilization. [w] Hartman JF [red] Mechanism and control of animal fertilization. New York: Academic Press 1983: 415–452.
- [138] WOODLAND HR. Changes in the polisome content of developing *Xenopus laevis* embryos. *Dev Biol* 1974; **40**: 90–101.
- [139] WORMINGTON WM. Expression of ribosomal protein genes during *Xenopus* development. [w] Browder LW [red] Developmental Biology. Plenum Publish Corp 1988; **5**: 227–240.
- [140] WORMINGTON HM, BROWN DD. Onset of 5S RNA gene regulation during *Xenopus* embryogenesis. *Dev Biol* 1983; **99**: 248–257.
- [141] YISRAELI JK, MELTON DA. The maternal mRNA Vg1 is correctly localized following injection into *Xenopus* oocytes. *Nature* 1988; **336**: 592–595.
- [142] YISRAELI JK, SOKOL S, MELTON DA. A two-step model for the localization of maternal mRNA in *Xenopus* oocytes: Involvement of microtubules and microfilaments in the translocation and anchoring of Vg1 mRNA. *Development* 1990; **108**: 289–298.

Otrzymano: 15 marca 1991 r.

Przyjęto: 23 kwietnia 1991 r.

Adres Autorki: Jastrzębiec, 05-551 Mroków





## STRATEGIE ADAPTACJI ANTEN ENERGETYCZNYCH FOTOSYNTETY DO NATĘŻENIA ŚWIATŁA

### LONG-TERM ADAPTATIONS OF THE THYLAKOID ANTENNA APPARATUS TO LIGHT INTENSITY

Grzegorz JACKOWSKI

Zakład Fizjologii Roślin Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu

*Streszczenie.* Chloropląsty wykazują zdolność przystosowywania się do warunków środowiskowych, w szczególności do natężenia światła. Poza szybkimi, odwracalnymi migracjami peryferycznej subpopulacji LHC II do rejonu tylakoidów stromy istnieją adaptacje długoterminowe, obejmujące daleko idące zmiany składu, struktury i funkcji membran tylakoidowych. Posługując się pojęciami koncepcji jednostki fotosyntetycznej (PSU) omówiono długoterminowe adaptacje tylakoidowego aparatu anten energetycznych do natężenia światła i możliwe mechanizmy tych adaptacji. Ponadto przedstawiono metody stosowane do badań wielkości jednostki fotosyntetycznej.

*Summary.* Chloroplasts are able to adapt to environmental stimuli, including growth light intensity. Apart from short-term, reversible, lateral movements of LHC II peripheral pool between appressed and non-appressed thylakoids there are long-term adaptations embracing modulations of membrane composition, structure and function. Using the terms of the concept of photosynthetic unit (PSU), long-term adaptations of the thylakoid antenna apparatus to growth light intensity are presented as well as possible mechanisms of the adaptations. Additionally several approaches used for photosynthetic unit size measurements are discussed.

*Wykaz skrótów:* CF<sub>1</sub> – czynnik sprzęgający tylakoidowej syntetazy ATP; chl – chlorofil, DCMU – 3-(3,4-dichlorofenilo)-1,1-dimetylomocznik; DMBQ – dimetylobenzochinon; LHC I i LHC II – kompleks chlorofil a/b-białko zbierający energię świetlną, odpowiednio PS 1 i PS 2; LHCP I i LHCP II – białka kompleksów, odpowiednio LHC I i LHC II; PS 1, PS 2 – fotosystem 1 i 2; P-680 – pierwotny donor elektronów w centrum reakcji PS 2; P-700 – pierwotny donor elektronów w centrum reakcji PS 1; PSU – jednostka fotosyntetyczna; PQ – plastochinon; QA – pierwszy stabilny akceptor elektronów w PS 2.

## WSTĘP

Stan badań nad tylakoidowymi kompleksami antenowymi oraz ich komponentami polipeptydowymi został ostatnio obszernie omówiony w dwóch pracach przeglądowych

[29, 30]. Prace te relacjonowały statyczny obraz anten, wyłaniający się z doświadczeń prowadzonych na roślinach hodowanych w określonych warunkach środowiskowych. Tymczasem istnieje szereg dowodów wskazujących na zdolność chloroplastów do przystosowywania się warunków środowiskowych, w szczególności do natężenia światła, która to zdolność nadaje składowi (w tym antenom energetycznym), strukturze i funkcjonowaniu błon tylakoidowych charakter dynamiczny. W zależności od skali czasowej, w jakiej realizowane są adaptacje do natężenia światła, można mówić o adaptacjach krótkoterminowych (szybkich) i długoterminowych (wolnych). Szybkie adaptacje polegają na odwracalnej fosforylacji LHCP II i prowadzą do migracji peryferycznej subpopulacji LHC II do rejonu tylakoidów stromy i asocjacji tej subpopulacji z PS 1 [33]. Ze względu na to, iż aktualny stan poglądów na temat szybkich adaptacji został ostatnio omówiony w innym polskojęzycznym opracowaniu przeglądowym [18], nie będą one przedmiotem zainteresowania w niniejszym artykule.

Na długoterminowe adaptacje składają się znacznie głębiej sięgające zmiany składu i struktury, a także funkcjonowania tylakoidów, wynikające z modyfikacji tempa biosyntezy i degradacji wielu komponentów strukturalnych [1]. Zmiany struktury dotyczą m.in. wielkości chloroplastów, objętości tylakoidów, ilości tylakoidów zespolonych w stopy granowe. Adaptacje składu błon tylakoidowych dotyczą zawartości chlorofilu w przeliczeniu na chloroplast, stosunku ilościowego chl a/chl b, wielkości i gęstości rozmieszczania anten energetycznych oraz zawartości cytochromu f i czynnika CF<sub>1</sub>. Konsekwencją adaptacji struktury i składu błon tylakoidowych są adaptacje funkcjonalne, dotyczące aktywności fotochemicznej PS 1 i PS 2, aktywności kompleksu syntetazy ATP i przebiegu krzywych świetlnych fotosyntezy [1]. Umożliwiają one prowadzenie wydajnej fotosyntezy roślinom środowisk bardzo zróżnicowanych co do natężenia światła, od pustyni po głęboko cieniste podszycie gęstych lasów tropikalnych.

W opracowaniu niniejszym skupiono uwagę na długoterminowych adaptacjach anten energetycznych PS 1 i PS 2 do natężenia światła i próbach wyjaśnienia mechanizmów tych adaptacji.

## WIELKOŚĆ ANTENY ENERGETYCZNEJ I SPOSOBY JEJ MIERZENIA

### DEFINICJA WIELKOŚCI ANTENY ENERGETYCZNEJ

Tylakoidową antenę energetyczną definiuje się jako zespół kompleksów barwnikowo-białkowych uczestniczących w procesie przechwytywania energii promienistej światła i przekazywania energii ekscytacji do centrów reakcji fotochemicznych PS 1 i PS 2 [37]. Wielkość anteny energetycznej natomiast definiuje się jako liczbę cząsteczek barwników związanych ze strukturą anteny energetycznej, zaangażowanych w transfer energii ekscytacji. Pojęcia anteny energetycznej i wielkości anteny energetycznej są ostatnio często zastępowane nazewnictwem nawiązującym do koncepcji jednostki fotosyntetycznej (PSU), tzn. jednostki funkcjonalnej tylakoidów obejmującej centrum reakcji PS 1 lub PS 2 oraz współpracujące z nim: antenę energetyczną i zespół przENOŚNIKÓW elektronów. Wielkość PSU jest w tej koncepcji pojęciem tożsamym z wielkością anteny energetycznej. Pojęcie

PSU stworzono (już w 1932 r., tzn. na długo przed wykryciem PS 1 i PS 2) w celu opisanego zespołu barwników współpracujących w fotosyntetycznej produkcji 1 cząsteczki  $O_2$  (jednostka Emersona-Arnolda), a wielkość PSU oceniano na 2500 chl/ $O_2$  na podstawie analizy przebiegu produkcji  $O_2$  w warunkach pulсового naświetlania komórek *Chlorella* [39]. Relacja między wielkością jednostki Emersona-Arnolda a wielkością PSU w jej współczesnym rozumieniu jest nieco skomplikowana w związku z wykryciem w międzyczasie istnienia PS 1 i PS 2. Wielkość jednostki Emersona-Arnolda wyraża mianowicie wielkość PSU dla PS 2, ale dopiero po podzieleniu przez 4, co wynika z faktu, iż 4 akty transportu elektronu są niezbędne do zależnego od PS 2 fotolitycznego uwolnienia 1 cząsteczki  $O_2$  z  $H_2O$  [3]. Odkrycie i opanowanie umiejętności oznaczania ilościowego  $Q_A$  i białka  $D_1$ , tj. komponentów PS 2 ściśle związanych z jego centrum fotochemicznym (P-680) stworzyło możliwość alternatywnego (wobec tempa produkcji  $O_2$ ) sposobu oznaczania wielkości PSU dla PS 2 jako ilości chl związanego z tymi komponentami. Natomiast odkrycie i opanowanie umiejętności oznaczania ilościowego P-700 stworzyło możliwość oznaczania wielkości PSU dla PS 1. Zarówno wielkość jednostki Emersona-Arnolda podzieloną przez 4, jak i ilości chl związanego z  $Q_A$ ,  $D_1$  czy P-700 można jednak uważać tylko za względne wielkości PSU odpowiednich PS, sposób bowiem ich obliczania nie uwzględnia funkcjonalnej asocjacji chl z PS 1 i PS 2. Tylko wielkość PSU znalezioną przy zastosowaniu technik uwzględniających funkcjonalną dystrybucję chl traktować można jako absolutną wielkość PSU. Względna wielkość PSU jest jednak pojęciem bardzo użytecznym przy opisie zmian aparatu antenowego fotosyntezy towarzyszących zmianom natężenia światła [39]. Prawie wszystkie doświadczenia nad adaptacjami anten do natężenia światła były wykonane technikami umożliwiającymi tylko ocenę względnej wielkości PSU.

Opierając się na współczesnej postaci koncepcji PSU, której nazewnictwo stosowane będzie w dalszej części pracy, zaproponowano istnienie dwóch typów strategii adaptacyjnych aparatu fotosyntetycznego do natężenia światła – zmian wielkości PSU oraz zmian gęstości rozmieszczenia PSU dla PS 1 i PS 2 [43]. Opis wyników eksperymentów potwierdzających te sugestie wymaga jednak uprzedniej bardziej szczegółowej prezentacji technik stosowanych do określenia względnej i absolutnej wielkości PSU.

#### TECHNIKI STOSOWANE DO POMIARÓW WZGLĘDNEJ WIELKOŚCI PSU DLA PS 2

Techniki te pozwalają na oznaczenie w sposób pośredni stężenia P-680 w zawiesinie chloroplastów, tzn. oznaczenie na podstawie pomiarów stężenia innych komponentów centrum reakcji PS 2 lub szybkości powstawania produktów aktywności fotochemicznej PS 2. Oznaczenie stężenia P-680 przez bezpośrednie pomiary kinetyczne indukowanej światłem zmiany absorbancji zawiesiny chloroplastów przy 680 nm jest niemożliwe ze względu na silną fluorescencję kompleksów antenowych przy tej długości fali [38]. Wielkość PSU oblicza się dzieląc całkowite stężenie chl w badanej próbce przez stężenie P-680:

a. **Metoda  $\Delta A_{320}$**  – pozwala na oznaczenie stężenia  $Q_A$  na podstawie indukowanych światłem zmian absorbancji tego związku przy 320 nm (pomiar wymaga pracy spektrofotometru w wariacie *split-beam*). Ponieważ w ogólnie akceptowanych modelach struktury centrum reakcji PS 2 przyjmuje się, że P-680 i  $Q_A$  występują w stosunku ilościowym 1:1 [5], stężenie  $Q_A$  jest równe stężeniu P-680.

**b. Metoda wiązania herbicydów** – pozwala na oznaczenie stężenia białka  $D_1$  na podstawie analizy krzywych nasycenia wiązania radioaktywnych herbicydów do zawiesiny chloroplastów: Przyjmuje się [5], że  $D_1$  i P-680 występują w stosunku ilościowym 1:1, wobec czego stężenie  $D_1$  jest równe stężeniu P-680. Najczęściej używanymi herbicydami są atrazyna [14] i ioksynil [4].

**c. Metoda  $O_2/4$**  – polega na polarograficznym pomiarze poziomu produkcji  $O_2$  w trakcie pulsowego naświetlania badanej zawiesiny chloroplastów, w obecności sztucznych akceptorów elektronów (najczęściej używana jest para  $K_3Fe(CN)_6 + DMBQ$  [31, 34]. Czas trwania pulsów światła wynosi kilka us i jest dobrany tak, aby umożliwić tylko pojedynczy obrót metaboliczny P-680, tzn. pojedynczy akt transportu elektronów [31]. W takich bowiem warunkach tempo produkcji  $O_2$  jest funkcją wielkości PSU. Równocześnie z właściwymi impulsami światła chloroplasty naświetlane są słabymi impulsami w zakresie dalekiej czerwieni (700–730 nm), co umożliwia obrót metaboliczny PS 1 w trakcie doświadczenia i zapobiega "zatykaniu" się strumienia elektronów na odcinku  $Q_A - P_Q$  [8, 10]. Wielkość PSU oblicza się dzieląc stosunek stężenia chl w próbce do tempa produkcji  $O_2$  przez 4, co jest konsekwencją ogólnie akceptowanej tezy, iż powstanie jednej cząsteczki  $O_2$  z  $H_2O$  wymaga czterech aktów przeniesienia elektronu [3].

**d. Metoda uwalniania  $H^+$**  – polega na pomiarze za pomocą pH-metru poziomu produkcji  $H^+$  w trakcie pulsowego naświetlania badanej zawiesiny chloroplastów, w obecności sztucznych akceptorów elektronów [23]. Zasada obliczania wielkości PSU i warunki doświadczenia są takie same jak w przypadku techniki  $O_2/4$ .

#### TECHNIKI STOSOWANE DO POMIARU ABSOLUTNEJ WIELKOŚCI PSU DLA PS 2

**a. Metoda indukcji fluorescencji** – polega na analizie krzywych indukcji fluorescencji (przy 685 nm) w badanych próbkach (uprzednio adaptowanych do ciemności) pod działaniem światła w obecności DCMU. Herbicyd ten blokuje transport elektronów pomiędzy  $Q_A$  i  $Q_B$  – kinetyka wzrostu fluorescencji towarzyszącego ekscytacji wyraża zatem stan utlenienia/redukji  $Q_A$  [27]. Z kolei analiza zależności (w skali półlogarytmicznej) między powierzchnią ponad krzywą wzrostu fluorescencji a czasem wzbudzenia fluorescencji pozwala na obliczenie współczynnika pochłaniania światła przez PS 2. Absolutna wielkość PSU może być następnie – na podstawie znajomości współczynnika pochłaniania światła – obliczona przy zastosowaniu wzorów opracowanych przez Melisa i Anderson [40]. Obliczenie absolutnej wielkości PSU dla PS 2 wymaga także znajomości stężeń  $Q_A$  i P-700 w próbce, czyli względnej wielkości PSU [19, 21, 40].

**b. Metody biochemiczne** – polegają na przeprowadzeniu, którąkolwiek z metod wymienionych w podrozdziale poprzednim, oznaczeń wielkości PSU na oczyszczonych cząstkach PS 2, wyizolowanych w sposób zapewniający utrzymanie chl w kompleksie z polipeptydami. Użycie oczyszczonych i nienaruszonych cząstek PS 2 pozwala traktować oznaczoną wielkość PSU jako absolutną.

### TECHNIKI STOSOWANE DO POMIARÓW WZGLĘDNEJ WIELKOŚCI PSU DLA PS 1

Techniki te pozwalają na bezpośrednie oznaczenie stężenia P-700 w badanej próbce. Wielkość PSU oblicza się dzieląc całkowite stężenie chl w próbce przez stężenie P-700.

**Metoda  $\Delta A_{700}$**  – pozwala na oznaczenie stężenia P-700 na podstawie indukowanych światłem lub chemicznie zmian absorbancji tej formy chl przy 700 lub 430 nm [27, 40].

### TECHNIKI STOSOWANE DO POMIARU ABSOLUTNEJ WIELKOŚCI PSU DLA PS 1

**Metoda kinetyki fotoutlenienia P-700** – polega na analizie krzywych kinetyki zmian absorbancji badanej próbki przy 700 nm, spowodowanych fotoutlenieniem P-700 w obecności KCN. KCN uniemożliwia transport elektronów od plastocyaniny do P-700 [21]. Analiza zależności (w skali półlogarytmicznej) między powierzchnią nad krzywą zmian  $A_{700}$  a czasem fotoutlenienia pozwala na obliczenie współczynnika pochłaniania światła przez PS 1 i związanej z nim wzorem Melisa i Anderson [40] wielkości PSU.

Określenie gęstości rozmieszczenia PSU polega na oznaczeniu, przy zastosowaniu któregośkolwiek z omówionych powyżej sposobów, stężenia P-680 lub P-700 i odniesieniu go do ilości komórek lub powierzchni lub świeżej masy fragmentu tkanki, z której przygotowano próbkę.

## WIELKOŚĆ I GĘSTOŚĆ ROZMIESZCZENIA PSU JAKO FUNKCJA NATĘŻENIA ŚWIATŁA

### PSU DLA PS 2

Istnieje szereg danych wskazujących na zależność względnej wielkości i gęstości rozmieszczenia PSU dla PS 2 od natężenia światła. W tabeli 1 i tabeli 2 podsumowano wyniki najważniejszych doświadczeń wykonywanych na glonach i roślinach wyższych. Wyniki prac wykonanych na aparacie fotosyntetycznym glonów wskazują na istnienie strategii adaptacyjnych PSU zgodnych z wcześniejszymi przewidywaniami Ramusa [43].

Strategia reprezentowana przez *Chlorella* i *Chlamydomonas* polega na zmniejszaniu PSU wraz ze wzrostem natężenia światła. Natomiast u zielenicy *Dunaliella tertiolecta* i okrzemki *Skeletonema costatum* wielkość PSU wydaje się względnie niezależna od natężenia światła. Wzrost natężenia światła wiąże się u tych glonów z wyraźnym spadkiem gęstości rozmieszczenia PSU [16, 45]. Podobne wyniki uzyskano dla *Scenedesmus obliquus* przy zastosowaniu uproszczonej interpretacji krzywych indukcji fluorescencji, nie pozwalającej na obliczenie absolutnej wielkości PSU.

Wyniki uzyskane dla roślin wyższych (tab. 1) są przez autorów prawie wszystkich przytoczonych prac uważane za potwierdzenie istnienia strategii zmniejszania PSU wraz ze wzrostem natężenia światła. Szczególnie znaczne zmiany stwierdzili Leong i Anderson [32] – 20-krotny wzrost natężenia światła powodował ok. 2,8-krotne zmniejszenie PSU szpinaku. Jednocześnie we wszystkich uwzględnionych w tabeli 1 przypadkach oraz w

szeregu innych prac [7, 30] stwierdzono wyraźne zmiany stosunku ilościowego chl a/ chl b towarzyszące zmianom natężenia światła. Tylakoidy roślin adaptowanych do wysokich natężeń światła cechował wysoki stosunek chl a/ chl b i odwrotnie, np. wzrostowi natężenia światła w przedziale  $70\text{--}725 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  towarzyszył wzrost stosunku chl a/chl b tylakoidów grochu z 2,4:1 do 2,9:1 [35]. Chl b jest barwnikiem występującym wyłącznie w strukturze anten energetycznych, można zatem przyjąć, że zmiany stosunku chl a/chl b mogą wyrażać przybliżone tendencje zmian wielkości PSU PS 2 – im wyższy ten stosunek, tym mniejsza PSU. Wyniki pomiarów zmian stosunku chl a/chl b stanowią więc potwierdzenie wyników pomiarów bezwzględnej wielkości PSU.

TABELA 1. Względna wielkość PSU dla PS 2 glonów i roślin wyższych jako funkcja natężenia światła

Gatunek	Natężenie światła	Jednostka miary	Wielkość PSU dla PS 2 [ $\text{mol chl} \cdot \text{mol}^{-1} \text{P-680}$ ]			
			wiązanie herbicydu	uwalnianie $\text{H}^+$	$\text{O}_2/4$	$\Delta\text{A}_{320}$
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,1	$\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$	–	–	390 [24]	–
	8		–	–	240	–
	200–300		–	–	140	–
<i>Chlamydomonas reinhardii</i>	47	$\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	–	–	–	672 [42]
	400		–	–	–	380
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	45	$\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	–	–	830 [16]	–
	600		–	–	710	–
<i>Skeletonema costatum</i>	30	$\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	–	–	605[16]	–
	600		–	–	590	–
Groch	100	$\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	552[34]	613[34]	–	–
	350		–	570	–	–
	700		–	500	–	–
	1050		–	472	–	–
	1800		–	463	–	–
	42		424[35]	–	–	–
	93		283	–	–	–
	215		193	–	–	–
	440		177	–	–	–
	840		151	–	–	–
Szpinak	15	%	515 [48]	–	–	–
	30		światła	485	–	–
	100		dziennego	373	–	–
	15		–	–	444 [7]	–
	30		–	–	344	–
	100		–	–	323	–

Powszechnie uważa się, że zdolność do długoterminowej regulacji wielkości PSU, zarówno u glonów jak i u roślin wyższych, umożliwi efektywniejsze przechwytywanie fotonów w przypadku niskich natężeń światła, a w przypadku wysokich natężeń światła pozwala zmniejszyć ryzyko fotodegradacji aparatu fotosyntetycznego [47]. Byłaby to realizacja na poziomie organizacji PSU ogólniejszej strategii osiągania maksymalnej wydajności fotosyntezy przy zaangażowaniu możliwie najmniejszej ilości komponentów strukturalnych, dla zaoszczędzenia energii i substratów niezbędnych do ich utrzymania [34].

Wyniki zawarte w tabeli 1 są jednak inaczej interpretowane przez Lee i Whitmarsha [34]. Ich zdaniem, gdyby regulacja wielkości PSU rzeczywiście wyrażała zasadę maksymalizacji wydajności fotosyntezy przy zaangażowaniu minimalnej ilości komponentów struk-

turalnych, to różnice wielkości PSU między roślinami adaptowanymi do poszczególnych natężeń powinny być znacznie większe niż opisywane dla grochu i szpinaku w różnych laboratoriach (tab. 1). Ponadto autorzy ci uważają, że część wyników innych autorów obarczona jest poważnym błędem, a wyniki uzyskane dla najniższych natężeń światła (poniżej świetlnego punktu kompensacyjnego) całkowicie niewiarygodne ze względu na "wejście do gry" dodatkowych czynników regulacyjnych poza natężeniem światła. Ponieważ Lee i Whitmarsh [34] nie stwierdzili jednocześnie żadnych zmian gęstości rozmieszczenia PSU w przeliczeniu na jednostkę powierzchni liścia (w przedziale natężeń wynoszącym 100–1800  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), wysuwają oni kontrowersyjną tezę o dużej stabilności aparatu fotosyntetycznego na poziomie tylakoidów i ich aparatu antenowego. Długoterminowe adaptacje do natężenia światła miałyby ograniczać się do reorientacji chloroplastów wewnątrz komórek i reorientacji liści względem kierunku padania światła.

TABELA 2. Gęstość rozmieszczenia PSU dla PS 2 w komórkach glonów i roślin wyższych jako funkcja natężenia światła

Gatunek	Natężenie światła $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	Gęstość rozmieszczenia PSU dla PS 2 cząsteczek P-680	
		$\cdot 10^{-3} \cdot \text{A}^{-2}$	$\cdot 10^{-3} \cdot \text{komórka}^{-1}$
<i>Dunaliella</i> <i>tertiolecta</i>	80	174 [45]	–
	200	115	
	700	81	
	1200	61	
	1500	41	
<i>Skeletonema</i> <i>costatum</i>	30	6,6 [16]	–
	600	4,4	
Groch	100	–	302 [34]
	350	–	320
	700	–	425
	1050	–	437
	1800	–	425

Próbę wyjaśnienia mechanizmów zmian wielkości PSU dla PS 2 stanowią doświadczenia pochodzące z pracowni Anderssona [33, 36]. Na podstawie dokładnej analizy składu polipeptydowego LHC II izolowanego z tylakoidów szpinaku lub grochu wysunięto tezę, iż różnica wielkości PSU między roślinami hodowanymi w warunkach wysokiego i w warunkach niskiego natężenia światła wynika z różnic zawartości peryferycznej subpopulacji LHC II. Tylakoidy szpinaku adaptowanego do niskiego natężenia światła miały ok. 1,4 raza większą PSU niż rośliny adaptowane do wysokich natężeń światła, a udział peryferycznej subpopulacji LHC II wzrastał 1,2 raza [33, 36]. Autorzy wspomnianych prac przyjmują zatem, iż peryferyczna subpopulacja LHC II jest "jednostką regulacyjną" długoterminowych adaptacji PSU do natężenia światła. Teza ta znajduje potwierdzenie w wynikach wcześniejszych porównawczych badań ultrastrukturalnych (technika kriorytonictwa) nad tylakoidami roślin adaptowanych do różnych natężeń światła [22].

Istotne informacje na temat mechanizmów regulacji wielkości PSU przynoszą także badania nad mutantami charakteryzującymi się obniżoną zawartością chl b. Dawno już zauważono istnienie licznych podobieństw co do składu tylakoidów między takimi mutantami a roślinami adaptowanymi do wysokich natężeń światła. Najistotniejsze z tych podobieństw polega na tym, że rośliny adaptowane do wysokich natężeń także cechuje – o czym już pisaliśmy – znaczna przewaga ilościowa chl a w stosunku do chl b. Greene i wsp. [26] wysunęli przypuszczenie, iż prawdopodobieństwo adaptacji ma swoje podłoże w fakcie, iż

mutanty przystosowują się w gruncie rzeczy do wysokiego natężenia światła, jakie dociera do wnętrza liścia w sytuacji obniżonej zdolności pochłaniania światła (chl b jest barwnikiem antenowym !) i znacznie niższej zawartości całkowitego chl. Wydaje się więc uzasadniona możliwość wykorzystania wyników badań nad mutantami o obniżonej zawartości chl b do rozważań nad mechanizmami regulacji wielkości PSU jako adaptacji do zmian natężenia światła. Szczególnie interesująca w tym kontekście jest seria prac wykonanych na tzw. warunkowych mutantach soi (odm. yyy) w pracowni Melisa [12, 19, 41]. Siewki soi tej odmiany mają wysoki stosunek chl a/chl b i niską zawartość LHCP II, ale mają zdolność stopniowej akumulacji chl b w trakcie rozwoju, osiągając w ciągu 12–28 dni (w zależności od natężenia światła) stosunek chl a/chl b identyczny z roślinami dzikiego typu [19]. Serię roślin odmiany yyy reprezentującą różne stadia rozwojowe, a tym samym różne wartości stosunku chl a/chl b, można traktować jako odpowiednik serii roślin soi adaptowanych do różnych natężeń światła. Analizując wielkość PSU tylakoidów roślin o stosunku chl a/chl b mieszczącym się w przedziale od 5,1 do 3,1 Morrissey i wsp. [41] doszli do wniosku, że regulacja wielkości PSU odbywa się przez powiększanie rozmiarów subpopulacji peryferycznej LHC II, podczas gdy wielkość subpopulacji wewnętrznej LHC II pozostaje jednakowa na wszystkich stadiach rozwojowych. Powiększanie subpopulacji peryferycznej nie ma charakteru ciągłego dodawania nowych cząsteczek barwników do preegzystujących cząsteczek LHCP II, lecz polega na domontowywaniu, w miarę zmniejszania się stosunku chl a/chl b, do już istniejących konfiguracji PSU całych cząstek subpopulacji peryferycznej LHC II. W rezultacie wielkość PSU wzrasta każdorazowo o 40 lub 80 cząsteczek chl(a + b).

Koncepcja subpopulacji peryferycznej LHC II jako "jednostki regulacyjnej" PSU [33] wydaje się więc mieć mocną podbudowę eksperymentalną. Nie oznacza to jednak, że koncepcja ta stanowi pełne wyjaśnienie mechanizmów regulacji wielkości PSU, otwartymi bowiem pozostają pytania:

1. Czy pierwotnym miejscem regulacji jest komponenta chlorofilowa, czy polipeptydowa czy może montaż tych komponentów LHC II?
2. Czy regulowana jest degradacja, synteza czy może redystrybucja komponentów LHC II?

Badacze zajmują w tych kwestiach różne stanowiska. Już w 1980 r. [15] sugerowano, że wysokie natężenie światła powoduje zahamowanie syntezy chlorofilu na poziomie glutaminianu i że stanowi to pierwotny mechanizm zmniejszania PSU towarzyszącego u okrzemek wzrostowi natężenia światła (zmniejszenie PSU okrzemek dotyczy PS 1, o czym będzie mowa w dalszej części pracy, natomiast wielkość PSU dla PS 2 jest względnie niezależna od natężenia światła [16]). Z kolei Fujita i wsp. [17] badając zmiany stosunku chl a/chl b u *Chlorella pyrenoidosa* hodowanej w świetle o natężeniu 7,5 lub 300 W · m<sup>-2</sup> stwierdzili, że wielkość PSU wzrasta nawet przy wysokim natężeniu światła pod warunkiem inkubacji komórek *Chlorella* z chloramfenikolem. Wzrost wielkości PSU spowodowany chloramfenikolem można było powstrzymać zarówno gabakuliną (inhibitor syntezy chlorofilu), jak i cykloheksimidem (inhibitor biosyntezy białek kodowanych przez genom jądrowy); jednak działanie gabakuliny było efektywniejsze w przypadku hodowli *Chlorella* w świetle 300 W · m<sup>-2</sup>. Autorzy sugerują, że regulacja wielkości PSU jest kombinacją zmian syntezy chlorofilu i zróżnicowanego powinowactwa chl do centrum reakcji PS 2 i LHC II. Z tym ostatnim efektem, opisywanym także przez innych badaczy [13, 44, 49] miałyby być związana możliwość przemieszczania się puli chl pomiędzy kompleksami chlorofilo-białkowymi, wśród których centrum reakcji PS 2 miałyby najwyższą zdolność zatrzymywania chl, a



LHC II najniższą. W warunkach wysokiego natężenia światła i ogólnego zahamowania syntezy chl, jego podaż na potrzeby montażu LHC II byłaby dodatkowo ograniczana preferencyjnym wiązaniem się chl z białkami centrum reakcji PS 2, co prowadziłoby do zmniejszania się PSU. Montaż byłby więc, obok syntezy chl, drugim poziomem regulacji wielkości PSU. Taka sugestia znajduje potwierdzenie w wynikach pracy dotyczącej mutantu *y99 soi* [12]. W tylakoidach roślin *y99* stwierdzono obecność polipeptydów 12 i 15 kDa, których ilość spada wraz ze wzrostem siewek i spadkiem stosunku chl a/chl b. Autorzy uważają te polipeptydy za produkty częściowej proteolizy LHCP II, które nie mogą być u mutantów użyte do montażu LHC II lub za "assembly proteins", tzn. białka ułatwiające inkorporację nowo zsyntetyzowanych LHCP II do funkcjonalnych PSU. Opierając się na wspomnianym już, wysoce prawdopodobnym prawdopodobieństwie strategii adaptacji PSU roślin hodowanych przy wysokim natężeniu światła i mutantów o obniżonej zawartości chl b [26], można sugerować, że wysokie natężenie światła obniża sprawność montażu funkcjonalnego LHC II.

Wyjątkowy przypadek strategii adaptacyjnej opisano u zielenicy *Dunaliella tertiolecta*. Glony te należą do wspomnianej, nielicznie reprezentowanej grupy organizmów zdolnych do długoterminowej regulacji gęstości rozmieszczenia PSU w komórkach w odpowiedzi na zmiany natężenia światła [47], podczas gdy wielkość PSU {mierzona techniką  $O_2/4$ } pozostaje względnie niezmienną [16, 46]. Jednocześnie stwierdza się znaczne zmiany stosunku chl a/chl b (5,4:1 przy  $70 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  i 8,1:1 przy  $1200 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$ ), co winno być interpretowane jako świadectwo istotnych zmian wielkości PSU [45]. Strategia adaptacyjna polega na modyfikowaniu, stosownie do natężenia światła, względnej zawartości poszczególnych LHCP II różniących się składem zasocjowanych z nimi chl a i chl b, przy zachowaniu prawie niezmiennionej wielkości PSU. Zmiany stosunku chl a/chl b towarzyszące zmianom natężenia wynikają więc z montażu cząsteczek LHC II różniących się istotnie tym stosunkiem [46]. Pierwotnym poziomem regulacyjnym jest najprawdopodobniej synteza białka (LHCP II), a nie synteza chl lub montaż PSU, jak to opisywano w innych przypadkach [15, 17]. Niejednakowe zdolności poszczególnych LHCP II *Dunaliella tertiolecta* do asocjowania chl a i chl b stanowią właściwość zasadniczo różniącą je od LHCP II innych glonów i roślin wyższych, gdzie białka te (podobnie jak białka innych kompleksów chlorofilowo-białkowych) cechuje identyczna zdolność asocjacji chl (tylko w odniesieniu do 28 kDa LHCP II jęczmienia sugeruje się, że ma obniżoną zdolność wiązania chl b lub wcale się z nim nie wiąże [11]). Stąd brak doniesień o analogicznych strategiach adaptacyjnych u innych gatunków roślin.

Mechanizmy adaptacji PSU do natężenia światła poprzez zmianę gęstości rozmieszczenia PSU pozostają niewyjaśnione. Nawet autorzy nielicznych prac, w których opisywano tę strategię adaptacyjną (wyłącznie u glonów) nie podejmują prób wyjaśnienia [28, 47].

#### PSU DLA PS 1

W tabeli 3 podsumowano wyniki najważniejszych doświadczeń dotyczących zmian względnej wielkości PSU dla PS 1 i gęstości ich rozmieszczenia jako funkcji natężenia światła, przy którym hodowano rośliny. U glonów sytuacja wydaje się bardziej skomplikowana niż w przypadku PSU dla PS 2, np. strategia adaptacyjna stwierdzona u *Chlorella fusca* [50] nie stanowi czystej postaci żadnego z modeli Ramusa [43]. Wysokie natężenie światła powoduje zarówno zmniejszenie PSU, jak i spadek gęstości rozmieszczenia PSU.

U okrzemki *Skeletonema costatum* PSU ulega wyraźnemu zmniejszeniu wraz ze wzrostem natężenia światła, podczas gdy gęstość rozmieszczenia PSU pozostaje stała [16]. Natomiast u *Chlamydomonas reinhardii* 9-krotny wzrost natężenia światła (w przedziale 47–400  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) nie powoduje wyraźnych zmian wielkości PSU.

TABELA 3. Względna wielkość i gęstość rozmieszczenia PSU dla PS 1 w komórkach glonów i roślin wyższych jako funkcja natężenia światła

Gatunek	Natężenie światła	Wielkość PSU dla PS 1 [mol chl $\cdot \text{mol}^{-1}$ P-700]	Gęstość rozmieszczenia PSU dla PS 1	
			cząsteczek P-700 $\cdot 10^3 \cdot \text{komórka}^{-1}$	$\cdot 10^{-3} \cdot \text{A}^{-2}$
<i>Chlorella fusca</i>	5 W $\cdot \text{m}^{-2}$	1000 [50]	60,0 [50]	–
	26	699	21,6	–
<i>Chlamydomonas reinhardii</i>	47 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	905 [42]	–	–
	400	1008	–	–
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	45	730 [14]	–	–
	80	–	240 [45]	–
	200	–	200	–
	600	610	–	–
	700	–	105	–
	1200	–	72	–
<i>Skeletonema costatum</i>	30	1360 [16]	3,0 [16]	–
	600	623	4,2	–
Groch	100	585 [34]	–	390 [34]
	350	500	–	379
	700	481	–	442
	1050	481	–	427
	1800	481	–	407
	42	446 [35]	–	–
	93	437	–	–
	215	428	–	–
	440	398	–	–
	840	388	–	–
Szpinak	15% światła	543 [48]	–	–
	30 dziennego	571	–	–
	100 dziennego	613	–	–

Bardziej ujednoczona wydaje się sytuacja u roślin wyższych – wszystkie przytoczone w tabeli 3 przykłady wskazują na znaczny stopień stabilności aparatu antenowego PS 1. Bardzo znacznym przyrostom natężenia światła towarzyszy stosunkowo niewielkie zmniejszanie PSU i gęstości ich rozmieszczenia w komórkach grochu i szpinaku. U mutantów jęczmienia, soi i kukurydzy o obniżonej zawartości chl b są PSU dla PS 1 mniejsze niż u form dzikich, lecz różnice mutant – forma dzika są znacznie słabsze niż w przypadku PSU dla PS 2 [19, 20, 26]. Nie wiadomo jednak, o jaki fragment PSU mutantów jest uboższe od PSU roślin typu dzikiego, a więc który fragment pełni rolę "jednostki regulacyjnej". Ostatnio uzyskano w pracowni Albertssona [2] wyniki wskazujące na istnienie w tylakoidach szpinaku dwóch wariantów PS 1 różniących się względną wielkością PSU, nie wiadomo jednak, jakiego fragmentu PSU dotyczy heterogeniczność. Interesujące wydaje się pytanie, czy niewielkie zmiany wielkości PSU dla PS 1 realizowane są skokowo (jak to się postuluje w przypadku PS 2 [41]), czy w sposób ciągły. Wyniki zawarte w tabeli 3 nie pozwalają na jednoznaczne wnioskowanie, lecz doświadczenia prowadzone na mutantach y9y9 soi [38] i serii mutantów ryżu o zróżnicowanym stopniu deficytu chl b [32] wskazują, że wielkość PSU zmienia się skokowo przez domontowywanie do istniejących konfiguracji

cząstek zawierających 40–60 cząsteczek chl. Byłaby to daleko posunięta analogia do mechanizmów regulacji wielkości PSU dla PS 2, co pozwalałoby sądzić, że podobnie jak w przypadku PS 2, pierwotnym poziomem regulacyjnym może być synteza chl lub/i montaż funkcjonalny PSU warunkowany dodatkowo zróżnicowanym powinowactwem chl do poszczególnych kompleksów chlorofilowo-białkowych. Istnieją dowody, iż powinowactwo LHCP I do chl jest większe niż powinowactwo LHCP II do chl [25] i w tej okoliczności należy zapewne upatrywać przyczyn większej stabilności PSU dla PS 1 wobec długoterminowych zmian natężenia światła docierającego do roślin.

## STOSUNEK ILOŚCIOWY PS 2/PS 1 JAKO FUNKCJA NATĘŻENIA ŚWIATŁA

Niejednakowa podatność na — wywołane długoterminowymi zmianami natężenia światła — modyfikacje wielkości PSU dla PS 1 i PS 2 prowadzi do zmian stosunków ilościowych PS 2/PS 1 (mierzonych jako stosunek stężeń centrów reakcji obu PS). Liczne dane wskazują na istnienie tendencji do wzrostu stosunku PS 2/PS 1 wraz ze wzrostem natężenia światła, w którym hodowano rośliny [1, 6, 9]. Porównanie z kolei, stosunku PS 2/PS 1 dla tylakoidów roślin światło- i ceniolubnych [8] wskazuje, iż osiąga on wyższe wartości dla roślin światłolubnych. Adaptacyjny charakter zmian stosunku PS 2/PS 1 potwierdzają wyniki doświadczeń nad mutantami o obniżonej zawartości chl b. Mutanty soi [48], kukurydzy [26] i jęczmienia [19] cechuje znacznie wyższy stosunek PS 2/PS 1 niż formy dzikie tych gatunków. Istnieją dowody, iż w tym przypadku na efekt niejednakowych zmian wielkości PSU dla PS 1 i PS 2 nakłada się efekt preferencyjnego wzrostu gęstości rozmieszczenia PS 2 [26]. Sugeruje się, że wysoka zawartość PS 2 stanowi okoliczność umożliwiającą utrzymanie równowagi wykorzystania światła przez oba PS, tzn. pozwala skompensować efekt znacznego spadku wielkości PS 2.

## LITERATURA

- [1] ANDERSON JM, CHOW WS, GOODCHILD DJ. Thylakoid membrane organization in sun/shade acclimation. *Aust J Plant Physiol* 1980; 15: 11–26.
- [2] ANDREASSON E, SVENSSON P, WEIBULL C, ALBERTSSON PA. Separation and characterization of stroma and grana membranes — evidence for heterogeneity in antenna size of both photosystem I and photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1988; 936: 339–350.
- [3] BABCOCK GT. The photosynthetic oxygen-evolving process. [w] Amesz J [red] Photosynthesis. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier 1987: 125–158.
- [4] BARBATO R, RIGONI R, GIARDI MT, GIACOMETTI MT. The minor antenna complexes of an oxygen evolving photosystem II preparation: purification and stoichiometry. *FEBS Lett* 1987; 231: 147–154.
- [5] BARBER J, MARDER JB. Photosynthesis and the application of molecular genetics. [w] Russel GE [red] Biotechnology and genetic engineering Reviews. Newcastle-upon-Tyne: Intercept 1986: 355–404.
- [6] CHOW WS, ANDERSON JM. Photosynthetic responses of *Pisum sativum* to an increase in irradiance during growth. II. Thylakoid membrane components. *Aust J Plant Physiol* 1987; 14: 9–19.
- [7] CHOW WS, HOPE AB. The stoichiometries of supramolecular complexes in thylakoid membranes from spinach chloroplasts. *Aust J Plant Physiol* 1987; 14: 21–28.

- [8] CHOW WS, HOPE AB, ANDERSON JM. Oxygen per flash from leaf disk quantifies photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1989; **973**: 105–108.
- [9] CHOW WS, QIAN L, GOODCHILD DJ, ANDERSON JM. Photosynthetic acclimation of *Allocasia macrorrhiza* (L.) Don to growth irradiance: structure, function and composition of chloroplasts. *Aust J Plant Physiol* 1988; **15**: 107–122.
- [10] CHYLLA RA, GARAB G, WHITMARSH J. Evidence for slow turnover in a fraction of photosystem II complex in thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1986; **894**: 562–571.
- [11] DARR SC, SOMERVILLE SC, ARNTZEN CJ. Monoclonal antibodies to the light-harvesting chlorophyll a/b protein complex of photosystem II. *J Cell Biol* 1986; **103**: 733–740.
- [12] DROPPA M, GHIRARDI ML, HORVATH G, MELIS A. Chlorophyll b deficiency in soybean mutants. II. Thylakoid membrane development and differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1988; **932**: 138–145.
- [13] DUYSEN ME, HUCKLE LL, MOGEN K, FREEMAN TP. Chloramphenicol effects on chlorophyll degradation and photosystem I assembly in the chlorina CD3 wheat mutant. *Photosynth Res* 1987; **14**: 159–169.
- [14] EVANS JR, TERASHIMA I. The effects of nitrogen nutrition on electron transport components and photosynthesis in spinach. *Aust J Plant Physiol* 1987; **14**: 59–68.
- [15] FALKOWSKI PG. Light-shade adaptation in marine phytoplankton. [w] Falkowski PG [red] Primary productivity in the sea. New York: Plenum Press 1980: 99–119.
- [16] FALKOWSKI PG, OWENS TG, LEY AC, MAUZERALL DC. Effects of growth irradiance levels on the ratio of reaction centres in two species of marine phytoplankton. *Plant Physiol* 1981; **68**: 969–973.
- [17] FUJITA Y, IWAMA Y, OHKI K, MURAKANI A, HAGIWARA N. Regulation of the size of light-harvesting antennae in response to light intensity in the green alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Plant Cell Physiol* 1989; **30**: 1029–1037.
- [18] GEMEL J. Kinazy białkowe a aktywność fotosyntetyczna chloroplastów. *Post Biol Kom* 1989; **16**: 337–345.
- [19] GHIRARDI M, MC CAULEY SW, MELIS A. Photochemical apparatus organization in the thylakoid membrane of *Hordeum vulgare* wild type and chlorophyll b-less mutant chlorina f2. *Biochim Biophys Acta* 1986; **851**: 331–339.
- [20] GHIRARDI M, MELIS A. Chlorophyll b deficiency in soybean mutants. I. Effects on photosystem stoichiometry and chlorophyll antenna size. *Biochim Biophys Acta* 1988; **932**: 130–137.
- [21] GLICK RE, MELIS A. Minimum photosynthetic unit size in system I and system II of barley chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 1988; **934**: 151–155.
- [22] GOODCHILD DJ, BJORKMAN O, PYLIOTIS AA. Chloroplast ultrastructure – leaf anatomy and soluble protein in rainforest species. *Carnegie Inst Wash Year Book* 1972; **71**: 102–107.
- [23] GRAAN T, ORT DR. Detection of oxygen-evolving photosystem II complexes inactive in plastoquinone reduction. *Biochim Biophys Acta* 1986; **852**: 320–330.
- [24] GREENBAUM NL, LEY AC, MAUZERALL DC. Use of light-induced respiratory transient to measure the optical cross-section of photosystem I in *Chlorella*. *Plant Physiol* 1987; **84**: 879–882.
- [25] GREENE BA, ALLRED DR, MORISHIGE DT, STAEHELIN LA. Hierarchical response of light-harvesting chlorophyll-proteins in a light-sensitive chlorophyll b-deficient mutant of maize. *Plant Physiol* 1988; **87**: 357–364.
- [26] GREENE BA, STAEHELIN LA, MELIS A. Compensatory alterations in the photochemical apparatus of a photoregulatory, chlorophyll b-deficient mutant of maize. *Plant Physiol* 1988; **87**: 365–370.
- [27] HIPKINS MF, BAKER NR. Spectroscopy. [w] Hipkins MF, Baker NR [red] Photosynthetic energy transduction, a practical approach. Oxford: IRL Press 1986: 51–101.
- [28] HUMBECK K, HOFFMANN NR, SENGELER H. Influence of energy flux and quality of light on the molecular organization of the photosynthetic apparatus in *Scenedesmus*. *Planta* 1988; **173**: 205–212.
- [29] JACKOWSKI G, SCHNEIDER J. Kompleksy anten energetycznych tylakoidów. *Post Biol Kom* 1990; **17**: 288–299.
- [30] JACKOWSKI G, SCHNEIDER J. Immunochemiczne właściwości białek tylakoidowych anten energetycznych. *Post Biol Kom* 1991; **18**: 31–45.
- [31] JURŠINIC A, DENNENBERG RJ. Enhanced oxygen yields caused by double turnovers of photosystem II induced by dichlorobenzoquinone. *Biochim Biophys Acta* 1988; **934**: 177–185.
- [32] KANO H. Photosynthetic unit size and the efficiency of photoreactions in intact leaves of rice chlorina mutants. *Plant Physiol (Life Sci Adv)* 1987; **6**: 259–264.
- [33] LARSSON UK, ANDERSON JM, ANDERSSON B. Variations in the relative content of the peripheral and inner light-harvesting chlorophyll a/b – protein complex (LHC II) subpopulations during thylakoid light adaptation and development. *Biochim Biophys Acta* 1987; **894**: 69–75.

- [34] LEE WJ, WHITMARSH J. Photosynthetic apparatus of pea thylakoid membranes. Response to growth light intensity. *Plant Physiol* 1989; **89**: 932–940.
- [35] LEONG TY, ANDERSON JM. Light-quality and irradiance adaptation of the composition and function of pea thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1986; **850**: 57–63.
- [36] MAENPAA P, ANDERSSON B. Photosystem II heterogeneity and long-term acclimation of light-harvesting. *Z Naturforsch* 1989; **140**: 403–406.
- [37] MARDER JB, BARBER J. The molecular anatomy and function of thylakoid membrane proteins. *Plant Cell Environment* 1989; **12**: 595–614.
- [38] MATHIS P, RUTHERFORD AW. The primary reactions of photosystems I and II of algae and higher plants. [w] Amesz J [red] Photosynthesis. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier 1987: 63–96.
- [39] MAUZERALL D, GREENBAUM NL. The absolute size of photosynthetic unit. *Biochim Biophys Acta* 1989; **974**: 119–140.
- [40] MELIS A, ANDERSON JM. Structural and functional organization of the photosystems in spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 1983; **724**: 473–484.
- [41] MORRISEY PJ, GLICK RE, MELIS A. Supramolecular assembly and function of subunits associated with chlorophyll a/b light-harvesting complex II (LHC II) in soybean chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 1989; **30**: 531–538.
- [42] NEALE PJ, MELIS A. The effect of irradiance levels on the ratio of reaction centers in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Phycol* 1986; **22**: 531–538.
- [43] RAMUS J. The capture and transduction of light energy. [w] Lobban CC, Wynne MJ [red] The biology of seaweeds. Oxford: Blackwell 1981; 458–492.
- [44] SARVARI E, NYITRAI P, KERESZTES A. Relative accumulation of LHCP II in mesophyll plastids of intermittently illuminated maize seedlings under lincomycin treatment. *Biochimie Physiol Pflanzen* 1989; **184**: 37–47.
- [45] SUKENIK A, BENNETT J, FALKOWSKI P. Light-saturated photosynthesis – saturation by electron transport or carbon fixation? *Biochim Biophys Acta* 1987; **891**: 205–215.
- [46] SUKENIK A, BENNETT J, FALKOWSKI P. Changes in the abundance of individual apoproteins of light-harvesting chlorophyll a/b protein complexes of photosystems I and II with growth irradiance in the marine chlorophyte *Dunaliella tertiolecta*. *Biochim Biophys Acta* 1988; **932**: 206–215.
- [47] SUKENIK A, WYMAN KD, BENNETT J, FALKOWSKI P. A novel mechanism for regulating the excitation of photosystem II in a green alga. *Nature* 1987; **327**: 704–707.
- [48] TERASHIMA I, EVANS JR. Effects of light and nitrogen nutrition on the organization of the photosynthetic apparatus in spinach. *Plant Cell Physiol* 1988; **29**: 143–155.
- [49] TZINAS G, ARGYROUDI-AKOUYUNOGLU JH. Chloramphenicol-induced stabilization of light-harvesting complexes in thylakoids during development. *FEBS Lett* 1988; **229**: 135–141.
- [50] WILHELM C, WILD A. The variability of the photosynthetic unit in *Chlorella*. *Plant Physiol* 1984; **115**: 125–135.

Otrzymano: 8 marca 1991 r.

Przyjęto: 7 maja 1991 r.

Adres autora: Al. Niepodległości 14, 61-713 Poznań.

## THE IXTH EUROPEAN ANATOMICAL CONGRESS

The IXth European Anatomical Congress will be held in Krakow, Poland, September 14–18, 1992. Call for abstracts will be sent in November 1991 to all those preregistered at Organizing Committee. Dead-line for abstract is April 1, 1992.

For detailed information please contact President of the Congress:

**professor Tadeusz Cichocki**

Department of Histology, Jagiellonian University Medical College,  
ul. Kopernika 7, PL-31-034 KRAKOW, Poland,  
Phone (48) (12) 22-70-27, Fax (48) (12) 21-46-64

*prof. dr hab. Tadeusz Cichocki*  
*President of Congress*

## INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

1. Artykuły przeglądowe nie przekraczające 20 stron maszynopisu i do 100 pozycji bibliograficznych w zasadzie z ostatnich 5 lat (do 10% pozycji bibliograficznych starszych).

2. Artykuły przeglądowe ze wskazaniem kierunków przyszłych badań o objętości do 15 stron maszynopisu i bibliografii z ostatnich 3 lat (do 35 pozycji). Każda pozycja bibliograficzna powinna zawierać dodatkowo 1 zdanie streszczenia, a szczególnie ważne pozycje powinny być oznaczone gwiazdką.

3. Doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach maszynopisu z kilkoma pozycjami bibliograficznymi ostatniego roku (licząc od daty wystąpienia do redakcji).

4. Listy do redakcji ( do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przysłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 z podwójną interlinią i marginesem 4 cm po lewej stronie. Strony powinny być kolejno numerowane. W tekście nie należy robić podkreśleń.

Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona jest dla redakcji i powinna zawierać: imiona i nazwiska autorów oraz ich tytuły naukowe, adresy pracy i domowe wraz z telefonem, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rysunków. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję i wysyłającego nadbitki, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następną stroną powinna zawierać streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile słowa te są tam zawarte. Streszczenie i słowa kluczowe powinny być przedstawione także w języku angielskim. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rysunków, lecz jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację ( np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na rozdziały tytułowane i numerowane (1, 2 itd.) oraz podrozdziały (1.1, 1.2 itd.). Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym ( np. [5]). Spis literatury należy zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

[1] HNILICA LS, McLURE ME, SPELTZBERG TC. Histone biosynthesis and the cell cycle. [w] Philips MP, Schwartz E, red. Histone and Nucleohistones. London, New York: Philips, Plenum Press 1977: 60–64.

[2] SACHSENMAJER W, REMY V, PLATTNER R. Initiation of synchronous mitosis in *Physarium polycephalum*. *Exptl Cell Res* 1980; 2: 41–48.

Tabele, opisy schematów i rysunków powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie prosimy zastępować raczej rysunkami, ale jeżeli są niezbędne, powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. Wymiary poszczególnych rysunków, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmiennionej formie. Wszystkie załączniki muszą być opatrzone na odwrocie nazwiskiem pierwszego autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji

Stosowane jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

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

## TREŚĆ

ŻMIJEWSKI M.: Onkogen jądrowy <i>jun</i> jako przykład regulatora ekspresji genów przez białka specyficznje wiążące DNA	77
TRETYN A.: Wpływ acetylocholino na wzrost i rozwój roślin	93
WIKIEŁ H., STROSZNAJDER J.: Fosforany inozytolu i ich rola w procesie transdukcji sygnałów	109
STĘPIŃSKA U.: Matczyny RNA – jego synteza i znaczenie we wczesnych stadiach rozwoju embrionalnego zwierząt	117
JACKOWSKI G.: Strategie adaptacji anten energetycznych fotosyntezy do natężenia światła	139
The IXth European Anatomical Congress – IX Europejski Kongres Anatomiczny	152

*Warunki prenumeraty kwartalnika*  
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

*Prenumerata na rok 1991*

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1991 r na nowe konto:  
FUNDACJA POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa;  
Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 5.01132-40006576-132-1110.  
Cena prenumeraty rocznika (4 zeszyty) dla instytucji (bibliotek) wynosi 180 000 zł, a dla odbiorców indywidualnych 80 000 zł.

*Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI is through the local press distributors or directly – Editorial Board of POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland, account No:*

FUNDACJA POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa;  
Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 5.01132-40006576-132-1110.  
*Price per year 20 dolars USA.*

Indeks 369705