

P2135
PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

Postępy Biologii Komórki

TOM 22 NR-1'95

(1-100)

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatoliznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, Polskiej Sieci UNESCO oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej wydawany z częściową pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych.

Redaguje Kolegium:

Szczepan BILIŃSKI, Jerzy KAWIAK, Maciej KAWALEC, Wincenty 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*

Artykuły nadesłane do Redakcji w 1994 r. recenzowali:

dr hab. **G. Adler**, Warszawa

dr hab. **A. Beręsewicz**, Warszawa

doc. dr hab. **B. Bilińska**, Kraków

prof. dr hab. **S. Biliński**, Kraków

dr **A. Ciechanowicz**, Szczecin

prof. dr hab. **A. Jerzmanowski**, Warszawa

prof. dr hab. **W. Jędrzejczak**, Warszawa

dr **M. Kawalec**, Warszawa

prof. dr hab. **J. Kawiak**, Warszawa

prof. dr hab. **J.S. Knypl**, Łódź

prof. dr hab. **W. M. Krajewska**, Łódź

dr **M. Kwinkowski**, Łódź

prof. dr hab. **A. Lipińska**, Łódź

prof. dr hab. **L. Malendowicz**, Poznań

prof. dr hab. **J. Michejda**, Poznań

prof. dr hab. **M. Olszewska**, Łódź

prof. dr hab. **Z. Osuchowska**, Warszawa

prof. dr hab. **W. Sawicki**, Warszawa

prof. dr hab. **S. Więckowski**, Kraków

prof. dr hab. **L. Wojtczak**, Warszawa

prof. dr hab. **M. Zabel**, Wrocław

Za tę społecznie wykonaną pracę serdecznie dziękujemy.

W tym zeszycie • Postępów Biologii Komórki •

- Hormony steroidowe regulują ekspresję specyficznej sieci genów. Wiązanie ligandu do odpowiedniego receptora uruchamia interakcję tak powstałego kompleksu z charakterystyczną regulatorową sekwencją DNA w genie docelowym. Opis działania receptorów hormonów steroidowych jest zamieszczony na stronach 3–21.
- Terapia genowa to prawdopodobna metoda leczenia zarówno chorób uwarunkowanych genetycznie, jak i wielu nabytych zaburzeń czynności organizmu. W ostatnich latach opracowano liczne metody wprowadzania genów do wnętrza komórek. Metody te można podzielić na wirusowe i niewirusowe. Zostały one omówione w artykule na stronach 23–41.
- Działanie niektórych czynników środowiskowych indukujących stres oksydacyjny na strukturę i funkcję aparatu fotosyntetycznego w komórkach roślin omówiono w artykule na stronie 43. Czynniki indukujące stres oksydacyjny działają niespecyficznie.
- Kortykoliberyna jest neuropeptydem produkowanym w podwzgórzu. Mniej znanym faktem jest, że peptyd ten jest również wydzielany przez komórki Leydiga w jądrze, gdzie miejscowo pełni funkcje regulacyjne. Bliższy opis na ten temat można znaleźć na stronie 65.
- Badania molekularnych aspektów biogenezy rybosomów w jąderku są tematem artykułu na stronie 73.



KOMUNIKATY

Komunikat nr 1

Grupa inicjatywna Polskiego Towarzystwa Cytometrii organizuje w dniach 19–21 czerwca 1995 r. wspólnie z Centrum Onkologii, Centrum Medycznym Kształcenia Podyplomowego i Instytutem Leków **konferencję szkoleniową** na temat **cytometrii w badaniach podstawowych i klinicznych**.

Konferencja składać się będzie z cyklu wykładów i zajęć praktycznych. Wykłady będą prowadzone przez światowej klasy specjalistów z USA i Niemiec w języku angielskim. Zajęcia praktyczne (liczba miejsc ograniczona do 25) będą miały miejsce w Centrum Onkologii w Warszawie, Centrum Medycznym Kształcenia Podyplomowego w Warszawie i w Instytucie Leków w Warszawie. Istnieje możliwość rezerwacji miejsc hotelowych w dniach 18/19, 19/20 i 20/21 czerwca 1995 r. w cenie ok. 40 zł za dobę.

Zgłoszenia prosimy wysłać na adres:

**prof. J. Kawiak Zakład Cytologii Klinicznej CMKP,
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa**

do dnia 1 kwietnia 1995 r. z podaniem, czy osoba zgłaszająca swe uczestnictwo ma chęć uczestniczenia również w zajęciach praktycznych oraz czy chciałaby korzystać z hotelu.

W dniu 19 czerwca 1995 r. o godzinie 14 w sali wykładowej Centrum Onkologii w Warszawie przy ulicy Ciszewskiego (Findera) 101 odbędzie się zebranie założycielskie Polskiego Towarzystwa Cytometrii, na które serdecznie zapraszamy.

*prof. Jerzy Kawiak
prof. Włodzimierz Olszewski
dr Janusz S. Skierski*

Tematy wybranych wykładów

1. **Z. Darżynkiewicz** (Cancer Research Institute at New York Medical College, USA): *Apoptosis and Methods of its evaluation.*
2. **Z. Darżynkiewicz**: *Use of the Acridine Orange in Flow Cytometry.*
3. **Z. Darżynkiewicz**: *Methods for Measurements of Cell Cycle Parameters.*
4. **J. Kunicka** (Miles Inc., USA): *Flow Cytometry Applications in Clinical Hematology and Immunology.*
5. **J. Kunicka**: *Lymphocyte Immunophenotyping – Diagnostic and Prognostic Value.*
6. **G. Valet** (Max-Planck Institut für Biochemie, Niemcy): *Potential of Cytometric Cell Function Measurements for Disease Diagnosis.*
7. **G. Valet**: *Multiparameter Analysis of Cytometric and Other Data for the Evaluation of Individual Patient Prognosis.*
8. **J. Barths et al.** (Becton Dickinson GmbH, Niemcy): *CEQUAL – a Central European Program for Quality Control in Clinical Flow Cytometric Immunophenotyping – Summary of the first 18 months.*

RECEPTORY HORMONÓW STEROIDOWYCH – BUDOWA I FUNKCJA*

STEROID HORMONE RECEPTORS. THE STRUCTURE AND FUNCTION

Maria SŁOMCZYŃSKA

Pracownia Endokrynologii Zwierząt i Hodowli Tkank, Zakład Fizjologii Zwierząt, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie: Hormony steroidowe regulują ekspresję specyficznej sieci genów. Sygnał hormonalny przekazywany jest do genu docelowego przez receptory wewnątrzkomórkowe. Wiązanie ligandu do odpowiedniego receptora uruchamia interakcję tak powstałego kompleksu z charakterystyczną regulatorową sekwencją DNA w genie docelowym, zwaną elementem odpowiedzi hormonalnej (HRE). Receptor ułatwia tworzenie się kompleksu z innymi czynnikami transkrypcyjnymi w miejscu rozpoczęcia transkrypcji i stymuluje transkrypcję.

Słowa kluczowe: receptor hormonów steroidowych, aktywacja transkrypcji, element odpowiedzi hormonalnej.

Summary: Steroid hormones regulate the expression of specific gene network. The hormonal signals are transduced to the target genes through specific, intracellular receptors. Binding of the hormone ligands to the corresponding receptor, triggers an interaction of the receptor-hormone complex with specific enhancer sequence-hormone response elements (HREs) at the target gene. The receptor acts to promote formation of the rapid-start complex and stimulates transcriptional initiation.

Key words: steroid hormone receptor, transcription activation, hormone response element.

Wykaz skrótów: AR – receptor androgenów, D3R – receptor witaminy D3, ER – receptor estrogenów, GR – receptor glukokortykoidów, MR – receptor mineralokortykoidów, PR – receptor progesteronu, RAR – receptor kwasu retinowego, TR – receptor hormonu tarczycy T3, HRE – element odpowiedzi

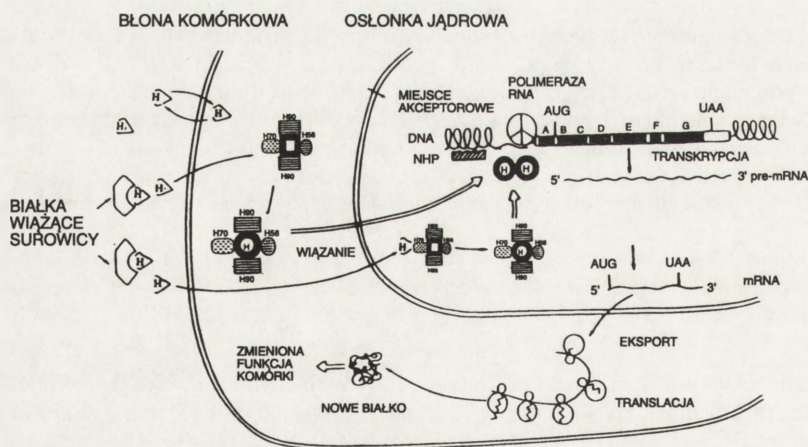
*W artykule zostały wykorzystane czasopisma i wydawnictwa książkowe zakupione dzięki: 1) World Health Organization-SMA Grant, Special Programme of Research Training in Human Reproduction, 2) Z-13/91 KBN Warszawa.

hormonalnej, ERE – element odpowiedzi estradiolu, GRE – element odpowiedzi glukokortykoidu, TRE – element odpowiedzi hormonu tarczycy, MMTV (*mouse mammary tumor virus*) – wirus raka piersi myszy, TFIIA-TFIIF – czynniki transkrypcyjne, Arg – arginina, Glu – kwas glutaminowy, Gly – glicyna, Ser – seryna.

WSTĘP

Hormony steroidowe regulują ekspresję specyficznych genów i dzięki temu mają wpływ na wzrost, rozwój i różnicowanie się komórek u wyższych *Eukaryota* [9, 25, 63]. Od około 15 lat znana jest molekularna droga, jaką przebywają hormony w komórce [47, 51, 62, 70, 89]. We wczesnych latach siedemdziesiątych uważano, że hormony steroidowe działają na poziomie błony komórkowej umożliwiając transport jonów oraz substratów lub katalizując wymianę energii. Doświadczenia ze znakowanym estradiolem przeprowadzone w laboratorium Jensena wykazały, że estradiol wiąże się specyficznym białkiem wewnątrzkomórkowym w komórce docelowej. Białko to zostało nazwane receptorem estrogenów [35, 47]. W następnych latach wykryte zostały również receptory dla pozostałych hormonów steroidowych.

Obecnie wiadomo, że odpowiedź na działanie hormonu rozpoczyna się od tworzenia kompleksu ligand-receptor, który to kompleks następnie wiąże się ze specyficzną sekwencją w promotorze genu docelowego, zwaną elementem odpowiedzi hormonalnej (HRE). Receptor zaktywowany (przez wiązanie z hormonem) reguluje transkrypcję genu poprzez interakcję z układem transkrypcyjnym promotora genu docelowego (rys. 1). Pomimo licznych badań precyzyjny mechanizm regulacji ekspresji genu przez receptory hormonów steroidowych pozostaje wciąż nieznanym.



Rys. 1. Regulacja genu docelowego przez hormony steroidowe: H – hormon, NHP – białko niehistonowe, H56, H70, H90 – białka szoku cieplnego [64]

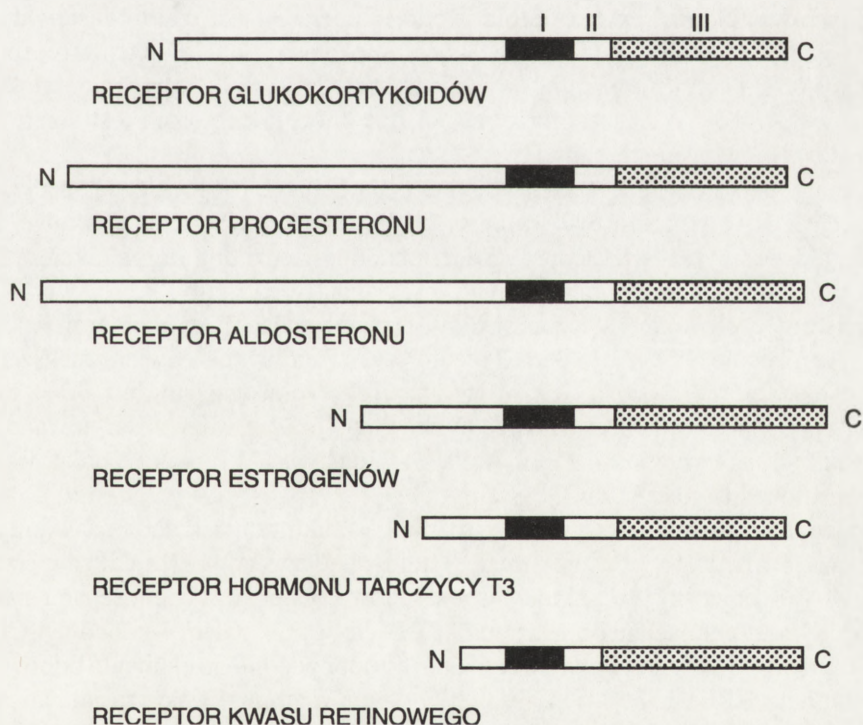
BUDOWA RECEPTORA

W ciągu ostatnich pięciu lat sklonowano i zsekwencjonowano cDNA dla wszystkich receptorów hormonów steroidowych [9, 39]. Zgodnie z oczekiwaniami, receptory okazały się mieć podobną budowę i tworzą nadrodzinę cząsteczek regulatorowych (rys. 2). Nadrodzina receptorów hormonów steroidowych zawiera receptory estradiolu, progesteronu, androgenów, mineralokortykoidów, hormonu tarczycy (T3), witaminy D3, kwasu retinowego, a także, co zaskakujące, niektóre onkogeny, takie jak *v-erb A* (*avian erythroblastosis virus*).

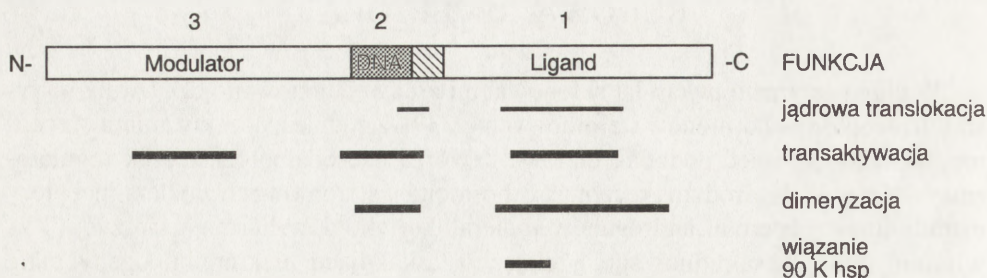
W nadrodzinie receptorów steroidowych wyróżniono trzy charakterystyczne domeny odpowiedzialne za:

- 1) specyficzne wiązanie ligandu,
- 2) specyficzne wiązanie z DNA,
- 3) modulację transkrypcji.

Domeny te przedstawiono na rysunku 3. Domeny 1 i 2 zlokalizowane są w C-końcowym i centralnym fragmencie cząsteczki. Są one ważne funkcjonalnie, ale



Rys. 2. Schematyczna budowa nadrodziny receptorów hormonów steroidowych [12], opis w tekście



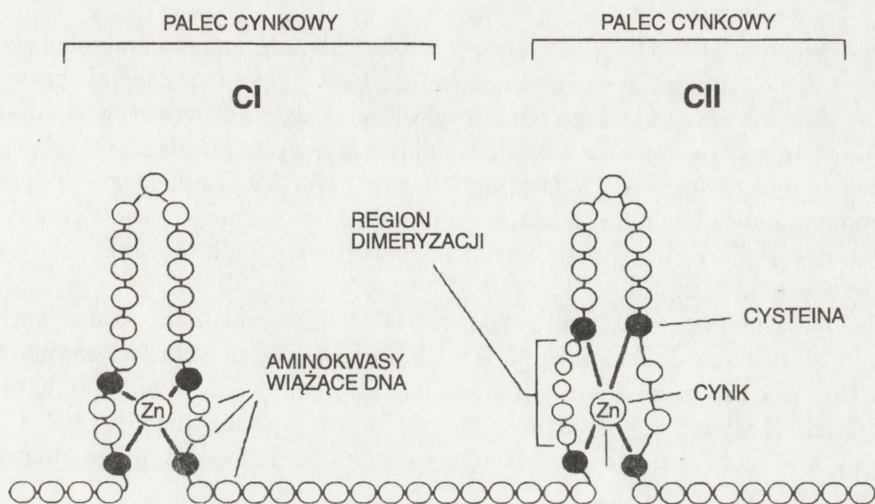
Rys. 3. Strukturalna i funkcjonalna organizacja receptorów jądrowych [9]

nie jest jasne, czy uczestniczą bezpośrednio w wiązaniu ligandu, interakcji białko-białko czy aktywacji transkrypcji. Wiadomo, że receptor kontaktuje się ze swym ligandem w rejonie domeny 1, a badania molekularne wykazały, że cała C-końcowa domena musi pozostać nietknięta, aby ligand wiązał się z dużym powinowactwem. Rejon centralnie położony (domena 2) stanowi bardzo konserwatywną sekwencję, w skład której wchodzi 66 aminokwasów (od cysteiny –185 do metioniny –250). Ten właśnie rejon odpowiedzialny jest za wiązanie z DNA.

N-końcowy rejon receptora steroidowego (domena 3) jest mało konserwatywny tak pod względem długości, jak i sekwencji aminokwasów, np. rejon ten w receptorze witaminy D3 składa się z 25 aminokwasów, podczas gdy w receptorze mineralokortykoidów z 603 [16]. Większość przeciwciał przeciwko receptorom jest skierowana przeciwko temu właśnie rejonowi.

Poznane dotąd czynniki transkrypcyjne mają domenę rozpoznającą specyficzne sekwencje DNA. Mogą to być struktury "helix-turn-helix", "palce cynkowe" oraz "zamek leucynowy". Stwierdzono, że domena odpowiedzialna za interakcję z DNA w receptorach hormonów steroidowych jest bogata w cysteiny, które wiążą jony cynku tworząc charakterystyczne struktury zwane palcami cynkowymi [71, 78]. Wiadomo obecnie, że nadrodzina receptorów steroidowych zawiera zawsze dwa palce cynkowe (rys. 4), przy czym w obu jon cynku wiązany jest przez cztery cysteiny [9]. Warto tu dodać, że palce cynkowe po raz pierwszy obserwowane były w czynniku transkrypcyjnym TF III A płazów. Jon cynku w tym przypadku wiązany jest przez dwie histydyny i dwie cysteiny.

W receptorze estrogenów dwa palce różnią się strukturalnie. Palec CI zawiera kilka aminokwasów hydrofobowych i cztery cysteiny, podczas gdy palec CII zawiera pięć cystein i jest bogatszy w aminokwasy zasadowe. Chociaż obecność obu palców cynkowych jest wymagana do wiązania z DNA, to jednak palec N-końcowy [CI] ma większe znaczenie w specyficznym wiązaniu do odpowiedniego elementu odpowiedzi hormonalnej (HRE) [37, 44]. Palec CII bogaty w aminokwasy zasadowe może stabilizować wiązanie DNA przez kontakt z resztami fosforanowymi w szkieletcie HRE lub co bardziej prawdopodobne przez interakcję białko-białko, co stabilizuje tworzenie dimeru receptora (czyli par takich samych cząsteczek) z HRE [87]. Ostatnio



Rys. 4. Schemat budowy palców cynkowych w domenie wiążącej DNA receptorów steroidowych [71]

wykazano, iż każdy z palców cynkowych jest kodowany przez oddzielny ekson genu receptora [2]. Ze względu na strukturę i funkcję receptory hormonów steroidowych mogą być podzielone na dwie grupy: jedną zawierającą receptor glukokortykoidów (GR), receptor progesteronu (PR), receptor androgenów (AR), receptor mineralokortykoidów (MR) i drugą zawierającą receptor estrogenów (ER), receptor hormonu tarczycy (TR), receptor kwasu retinowego (RAR), receptor witaminy D3 (D3R) [40]. W pierwszej podgrupie między dwoma cysteinami w C-końcowej części pierwszego palca cynkowego występuje zawsze sekwencja Gly-Ser, natomiast w drugiej Glu-Gly [9].

Doświadczenia z prostymi i subtelnymi mutacjami pozwoliły na lepsze scharakteryzowanie rejonu bogatego w cysteiny [11, 19, 87]. Zmiana sekwencji Glu-Gly w pierwszym palcu cynkowym receptora estrogenów (ER) na Gly-Ser, które są obecne w identycznym regionie receptora glukokortykoidów (GR), powoduje, że receptor nie wiąże się z elementem odpowiedzi estrogenów (ERE), lecz z elementem odpowiedzi glukokortykoidów (GRE). Odwrotna zamiana Gly-Ser w GR na Glu-Gly prowadzi do aktywacji genu zawierającego w promotorze sekwencję ERE. Jest to dowód na to, że aminokwasy następujące bezpośrednio po drugiej parze cystein w pierwszym palcu cynkowym odgrywają dodatkowo rolę w wiązaniu do specyficznej sekwencji HRE. Gdy pierwszy palec cynkowy pochodzi z GR, receptor może aktywować GRE niezależnie od tego, czy drugi palec pochodzi z GR czy z ER i odwrotnie [39, 56]. Sztucznie wytworzone lub występujące naturalnie mutacje w drugim palcu powodują słabe wiązanie do DNA [11], ponieważ utrudniają tworzenie dimerów.

Również mutacje na szczytach palców cynkowych mogą blokować funkcję receptora [45]. Dowodów na to dostarczyły badania nad dwiema nie spokrewnionymi ze sobą rodzinami, w których dzieci wykazywały objawy krzywicy odpornej na

leczenie witaminą D3. U dzieci tych wykryto pojedyncze zmiany aminokwasów w rejonie palców cynkowych receptora witaminy D3. W jednej rodzinie mutacja występowała na szczycie pierwszego palca cynkowego, gdzie konserwatywna Arg była zastąpiona przez Gly, podczas gdy w drugiej mutacja występowała na szczycie palca drugiego, gdzie również Arg była zastąpiona przez Glu [79]. Zmiana ta występowała w rejonie odpowiedzialnym za bezpośredni kontakt z guaniną – zasadą charakterystyczną dla wszystkich regulatorowych sekwencji wiążących receptory hormonów steroidowych – HRE [80].

Obecnie wiadomo, że domena wiążąca DNA jest najbardziej konserwatywna spośród wszystkich domen funkcjonalnych receptorów hormonów steroidowych [30]. Tak więc prawdopodobnie struktura palców cynkowych w wielu, o ile nie we wszystkich, receptorach nadrodziny jest podobna do opisanej dla GR i ER. Uważa się, że jest to odzwierciedleniem wspólnego pochodzenia ewolucyjnego omawianej nadrodziny receptorów [9].

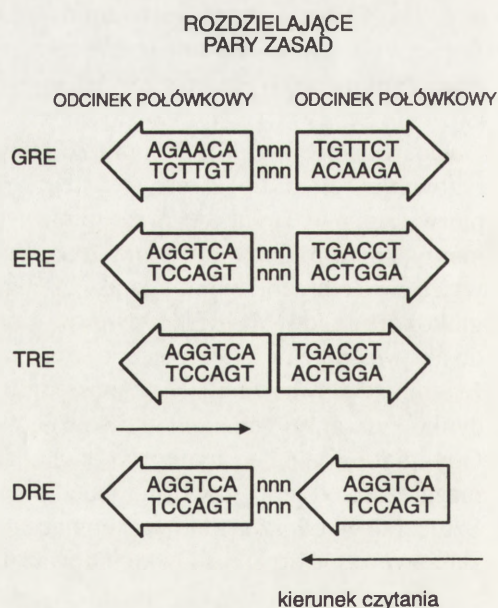
ELEMENT ODPOWIEDZI HORMONALNEJ [HRE]

Jak wcześniej wspomniano, receptory hormonów aktywują specyficzne geny przez wiązanie do elementu odpowiedzi hormonalnej (*hormone response element* – HRE) [22, 89]. Badania nad elementami odpowiedzi hormonalnej (HRE) pozwoliły na odkrycie sekwencji 15 par zasad, które są określane jako "palindrom", ponieważ przy czytaniu w przeciwnych kierunkach (wzdłuż przeciwnych nici DNA) są identyczne (rys. 5). Zbudowane są one z dwu "półmiejsc" (odcinków połówkowych) oddzielonych przez trzy pary zasad [10]. Stwierdzono, że sekwencje takie mogą znajdować się w odległości od stu do kilku tysięcy par zasad od miejsca startu transkrypcji (kodon AUG patrz rys. 1).

Obecnie wyróżnia się 4 klasy HRE:

1. GRE – element odpowiedzi glukokortykoidów. GRE wiąże również receptory androgenów, progesteronu i mineralokortykoidów.

2. ERE – element odpowiedzi estradiolu.



Rys. 5. Budowa elementu odpowiedzi hormonalnej (HRE) [30]

3. TRE – element odpowiedzi hormonu tarczycy, do którego przyłącza się również receptor kwasu retinowego RAR [36].

4. Ostatnią grupę stanowi sekwencja, która wiąże "receptory sieroce" (patrz dalej).

Funkcjonalna sekwencja w ERE różni się od GRE tylko dwoma parami zasad w każdym "pół-miejscu" (nnnTGTTCT / nnnTGACCT) [55].

Ponieważ receptory steroidowe rozpoznają i wiążą się do elementów odpowiedzi hormonalnej zbudowanych z 2 pół-miejsc od odwróconym powtórzeniu lub powtórzeniu bezpośrednim, wydaje się, że ta klasa receptorów wchodzi w interakcję z DNA w postaci dimerów. Wiadomo, że przestrzeń między palcami cynkowymi może wpływać na specyficzność receptora przez ułatwienie lub uniemożliwienie wiązania do DNA. Funkcjonalne i strukturalne oddziaływania pomiędzy domenami wiążącymi DNA i innymi domenami receptora, jak na przykład domeną wiążącą ligand, jest ciekawe ze względu na wpływ ligandu na zmianę struktury receptora i na oddziaływanie z innymi receptorami jądrowymi [29, 34, 54, 57, 91] oraz niereceptorowymi czynnikami jądrowymi [21,90], wpływ na powinowactwo i selektywność wiązania DNA, a także na modulację inicjacji transkrypcji.

Ponieważ fizjologiczne działanie glukokortykoidów i progesteronu jest całkowicie różne, można podejrzewać, że specyficzne efekty komórkowe tych dwu hormonów są zdeterminowane przez zróżnicowaną ekspresję ich receptorów. Wprowadzenie receptora progesteronu (przez wektor ekspresyjny) do komórek wątrobiaka szczura, które zawierają tylko receptor glukokortykoidów, pozwoliło zaobserwować, że geny indukowane przez glukokortykoidy są obecnie aktywowane również przez progesteron [17, 82].

DIMERY

Wiele transaktywujących czynników, w tym receptory hormonów steroidowych, wiąże się z DNA w postaci dimerów. Każda z cząsteczek tworzących parę rozpoznaje jedno z dwu pół-miejsc, z jakich zbudowany jest element odpowiedzi hormonalnej (HRE). Tylko dimer wiąże się powinowactwem [$Kd \sim 10^{-9} M$] wystarczającym do inicjacji transkrypcji. Dimer receptora raz przyłączony do HRE może wiązać się z innymi dimerami (lub innymi czynnikami transkrypcyjnymi), aby utworzyć bardziej stabilny kompleks o dużym powinowactwie [$Kd \sim 10^{-11} M$] [85]. Receptory mogą tworzyć homodimery lub heterodimery, co powoduje różnorodność odpowiedzi komórki [49].

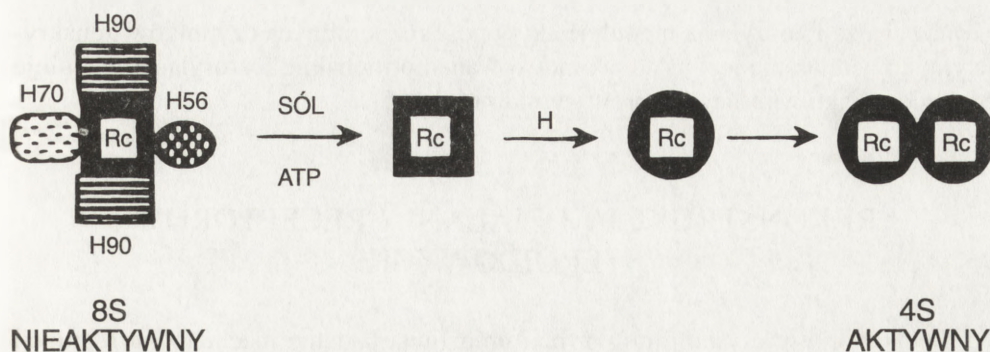
Bezpośrednie i pośrednie dowody wskazują, że generalną zasadą w tej rodzinie jest tworzenie homodimerów [27, 88]. Inne wyniki [31, 59] pokazują, że mogą istnieć odstępstwa od tej zasady. Badania ilościowego wiązania oligonukleotydu zawierającego ERE do receptora estrogenu (ER) pozwoliły stwierdzić, że 1 mol ER tworzy kompleks z 1 molem vitERE (fragment promotora genu witelogeniny zawierający

sekwencję ERE), a nie jak spodziewano się, że dwa mole ER przyłączą się do jednego mola vitERE. Tak więc powyższe badania [31] najlepiej pasują do modelu, w którym aktywny ER jest monomerem lub heterodimerem, ale nie homodimerem, a regulacyjny wpływ estrogenu na ER polega na indukcji interakcji białko-białko, a nie białko-DNA. Receptory hormonu tarczycy i kwasu retinowego działają głównie jako heterodimery podobnie jak inne rodziny transaktywatorów [33, 48]. TRE kilku genów wiąże nie tylko homodimery TR, lecz także homodimery RAR [36] i heterodimery TR-RAR [34].

KOMPLEKSY

W homogenatach tkankowych o niskim stężeniu soli receptory steroidowe występują w kompleksach o masie 8–10 S, związane z kilkoma nie-receptorowymi białkami szoku ciepłego (*heat shock proteins*), jak 90 KDa HSP [HSP90], 70 KDa [HSP70] i 56 KDa [HSP56] [72, 73]. Ostatnio wykryto również inne białko związane bezpośrednio z HSP 90, zasocjowane z nieaktywnym receptorem i nazwane p59 [69]. W tych wysokocząsteczkowych kompleksach receptor jest funkcjonalnie nieaktywny. Uważa się, że ligand indukuje przekształcenie receptora z formy 8–10 S do mniejszej, związanej ściśle z frakcją jądrową, aktywnej formy 4S [67]. Model aktywacji receptora przez ligand (hormon steroidowy) został przedstawiony przez wiele grup [41, 66]. Zgodnie z nimi HSP90 wiąże się do domeny wiążącej hormon (ligand) receptora i utrzymuje go w formie nieaktywnej. Przyłączenie ligandu uwalnia HSP90 z kompleksu z receptorem. Ten model sugeruje, że zasadniczą rolę ligandu jest wpływ na oddysocjowanie HSP. Receptor wolny od HSP będzie odgrywał rolę w aktywacji. Aby stwierdzić, czy uwolnienie białek nie-receptorowych z kompleksu z receptorem jest wystarczające do aktywacji (transformacji) receptora, otrzymano oczyszczony receptor, nie związany z hormonem i pozbawiony HSP90, HSP70, HSP56 [7]. Wykazano, że taki receptor ciągle wymaga hormonu do wiązania z wysokim powinowactwem do elementu odpowiedzi hormonalnej (HRE) (rys. 6). Tak więc odłączenie białek szoku ciepłego (HSP) jest konieczne, ale nie wystarczające do aktywacji receptora. Po oddysocjowaniu HSP potrzebny jest bliżej nie znany dodatkowy krok stymulowany hormonalnie do uzyskania biologicznie aktywnej formy receptora.

Trudno odpowiedzieć jednoznacznie, na jakiej drodze odbywa się aktywacja receptora po odłączeniu białek szoku ciepłego. Można jedynie sugerować, że ponieważ receptory wiążą się bardziej trwale do HRE jako dimery, to wiązanie do DNA może być osłabione, jeżeli interakcja z HSP90 uniemożliwia dimeryzację (rys. 6). Alternatywnie lub dodatkowo HSP90 może maskować domenę wiążącą DNA i w ten sposób uniemożliwiać rozpoznanie HRE [64].



Rys. 6. Rola hormonu w aktywacji receptora steroidów; receptor występuje w formie nieaktywnej związany z białkami szoku cieplnego (HSP56, 70, 90); w wyniku doświadczenia otrzymano receptor oczyszczony, ale nadal nieaktywny; do funkcjonalnej aktywności wymagał obecności hormonu (H), który prawdopodobnie umożliwiał dimeryzację [5]

LIGANDY

Hormony steroidowe (ligandy) decydują o aktywacji genów regulowanych poprzez receptory hormonów steroidowych. Hormon indukuje niewielkie zmiany w kinetyce wiązania i powinowactwie oczyszczonego receptora do HRE [75]. Wydaje się, że wiązanie ligandu wywołuje zmianę allosteryczną receptora, wskutek czego umożliwia dostęp innym czynnikom transkrypcyjnym i/lub polimerazie RNA do rejonu aktywacji transkrypcji w receptorze. To oddziaływanie białko-białko może dać sygnał do rozpoczęcia transkrypcji.

Warto zwrócić uwagę, że w badaniach *in vitro* z receptorem progesteronu udało się wykazać aktywność receptora w nieobecności hormonu [7, 24]. Można przypuszczać, że w tym wypadku receptory uległy zmianom strukturalnym i aktywacji przez różne manipulacje *in vitro*, takie jak traktowanie wysokim stężeniem soli (frakcjonowanie siarczanem amonu) podczas izolacji z tkanki. *In vivo* i w procedurach oczyszczania, receptor nie ulega takim zmianom konformacyjnym i hormon jest absolutnie niezbędny do aktywacji receptora.

FOSFORYLACJA

Receptory steroidowe są fosfoproteinami i pewne dane wskazują, że hormonalnie zależna fosforylacja może wpływać na ich biologiczną aktywność [4, 61]. Udokumentowano, że krótkotrwałe traktowanie hormonem komórek lub skrawków w hodowli prowadzi do zwiększenia ufosforylowania receptora progesteronu (PR) i receptora glukokortykoidów (GR), zwiększenia ich aktywności i akumulacji w jądrze [43].

Uważa się, że fosforylacja moduluje aktywność różnorodnych czynników transkrypcyjnych, jednak nie jest jasne jak indukowana hormonalnie fosforylacja moduluje biologiczną aktywność receptorów steroidowych [65].

REKONSTRUKCJA DZIAŁANIA RECEPTORÓW STEROIDOWYCH

Bezkomórkowy system transkrypcji umożliwia badanie mechanizmu regulacji genów poprzez polimerazę RNA II i III. Wiadomo obecnie, że polimeraza RNA II wymaga podstawowych czynników transkrypcyjnych, takich jak TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF i prawdopodobnie TFIIG, TFIIH dla rozpoczęcia transkrypcji z promotora eukariotycznego [28, 83]. Większość tych głównych czynników dostępna jest obecnie w wysoce oczyszczonej formie, a ostatnio zostały sklonowane geny kodujące TFIID, TFIIB, TFIIE, TFIIF [3, 50, 81]. Przy badaniu bardziej wyspecjalizowanych lub tkankowo specyficznych genów, do systemu należy dodatkowo włączyć czynniki o specyficznej sekwencji regulujące gen, takie jak np: receptory steroidowe [86]. W typowej transkrypcji *in vitro*, matryca DNA zawierająca promotor eukariotyczny jest inkubowana z polimerazą RNA II, głównymi czynnikami transkrypcyjnymi i czynnikami regulującymi transkrypcję, jak np. receptory steroidowe [8]. Wszystkie czynniki pochodzą z nieoczyszczonego ekstraktu jądrowego lub dodawane są w formie oczyszczonej [6]. Carthesy i wsp. [17] po raz pierwszy zrekonstruowali z sukcesem hormono-zależne wzmocnienie transkrypcji w systemie bezkomórkowym. Dodatek estrogenów do nieoczyszczonego ekstraktu jądrowego wątroby *Xenopus* stymulował syntezę RNA z genu kierowanego przez promotor witelogeniny. Ten efekt indukowany przez estrogen był zależny od obecności elementu odpowiedzi estrogenów (ERE) w badanym promotorze, sugerując włączenie endogenego receptora estrogenu w proces indukcji.

Bagchi i współpracownicy [5, 6] przeprowadzili eksperyment, w którym użyli oczyszczonych natywnych form A i B receptora progesteronu kurczenia [cPR], ekstrakt jądrowy z linii komórkowej HeLa i gen reporterowy kierowany przez promotor zawierający TATA box genu ovoalbuminy i wielokrotne kopie GRE/PRE. Wykazano, że obie formy A i B receptora progesteronu stymulują bezbłędnie transkrypcję z badanego promotora. Ilościowo transkrypcja ta była 25 razy wyższa niż w systemie kontrolnym z promotorem nie zawierającym kopii GRE/PRE.

Elementy odpowiedzi hormonalnej (HRE) w eksperymentalnych konstrukcjach umieszczane są zwykle blisko promotora, ale w genie mogą się znajdować kilka tysięcy par zasad w kierunku 5' od miejsca startu transkrypcji (*upstream*) [15] lub nawet w kierunku 3' od miejsca startu (*downstream*) [74]. W wielu wypadkach wymagana jest wielokrotność elementów odpowiedzi (HRE) i ich synergistyczne

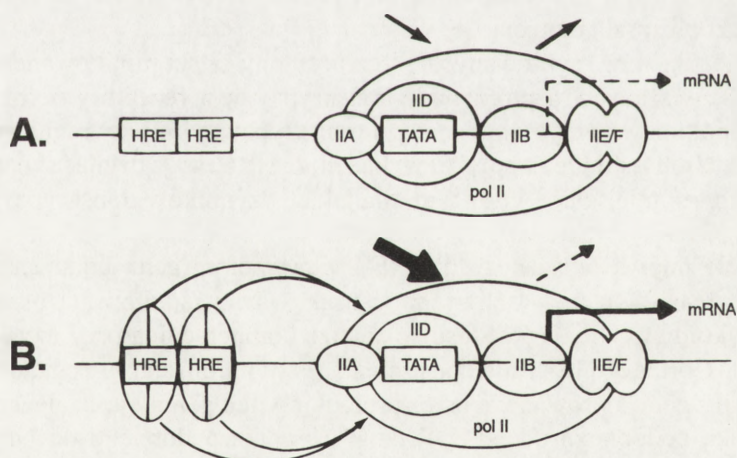
działanie do uzyskania dostatecznej aktywności. Tak więc metody biologii molekularnej pozwalają na przeprowadzenie dokładnych badań i określenie, na jakiej drodze zachodzi regulacja ekspresji genu zależna od hormonów steroidowych.

MECHANIZM TRANSAKTYWACJI, W KTÓREJ UCZESTNICZY RECEPTOR

Wydarzenia następujące po utworzeniu stabilnego kompleksu receptora z HRE, co wzmagają transkrypcję genu docelowego, są słabiej poznane. Sugeruje się, że receptor steroidowy umożliwia interakcję z innymi białkami, a zwłaszcza z uniwersalnymi czynnikami transkrypcyjnymi (polimeraza RNA II i czynnik TFII) i działa stabilizująco na czynniki wiążące w pobliżu promotora [7]. Ten sposób interakcji cząsteczek nazywa się transaktywacją.

Oddziaływanie białko-DNA i białko-białko jest istotne w tym łańcuchu wydarzeń. Uważa się, że pierwszy krok stanowi interakcja TFIID z sekwencją TATA, następnie stabilizacja przez kolejne wiązania TFIIA, TFIIB, polimerazy RNA II, TFIIE.

Nie wiadomo dokładnie, jak sekwencja wzmacniająca (*enhancer*) umieszczona w kierunku 5' od miejsca startu transkrypcji wywiera wpływ na podstawowy kompleks transkrypcyjny. Zakłada się, że TFIID jest docelowym białkiem, które komunikuje



Rys. 7. Proponowany mechanizm regulacji transkrypcji genu przez kompleks hormon - receptor; dimer receptora związany z HRE wchodzi w interakcję z uniwersalnymi czynnikami transkrypcyjnymi (TF IIA, IIB, IID, IIE/F) związanymi w rejonie TATA box: A – schematyczne przedstawienie odwracalnej asocjacji czynników transkrypcyjnych; gdy obecne są wszystkie czynniki polimeraza II rozpoczyna syntezę RNA; B – dimery receptora związane z elementem odpowiedzi hormonalnej (HRE) wywierają stabilizujący efekt na czynniki transkrypcyjne przyłączone w rejonie promotora umożliwiając gwałtowną syntezę RNA [63]

się z czynnikami wiążącymi się do sekwencji wzmacniającej (rys.7). Interakcja między tymi białkami i TFIID może być bezpośrednia lub przebiegać za pośrednictwem koaktywatorów lub adaptatorów [38, 52, 68]. Ostatnie badania [23] sugerują, że koaktywujące białka, różne od tych wiążących się z TATA box, są zasocjowane z kompleksem TFIID i pośredniczą w aktywacji transkrypcji poprzez czynnik transkrypcyjny NTF-1.

SYNERGIZM MIĘDZY RECEPTORAMI STEROIDOWYMI I INNYMI CZYNNIKAMI TRANSKRYPCYJNYMI

Jak już wyżej wspomniano, receptory steroidowe wiążą się do swych elementów odpowiedzi (HRE) w postaci dimerów [58]. Wielokrotne sekwencje HRE zostały zidentyfikowane w kontrolnych rejonach wielu genów regulowanych przez hormony, takich jak promotory genów kodujących MMTV (wirus raka piersi myszy), lizozym kurczaka, aminotransferazę tyrozyny szczura, witelogeninę *Xenopus* itd.

Elementy odpowiedzi hormonalnej wykazują funkcjonalny synergizm w aktywacji genów *in vivo*. W systemie bezkomórkowym porównywano aktywność transkrypcyjną genów zawierających zero, jedną lub dwie kopie PRE [53]. Zależna od receptora synteza RNA z matryc zawierających jedną lub dwie kopie PRE była około 5 i 30 razy większa, w porównaniu z matrycą bez PRE. Synergizm ten zanikał, kiedy w jednej z kopii zaszła mutacja.

Promotory genów regulowanych przez hormony są skomplikowane i zawierają wiele miejsc wiążących różne czynniki transkrypcyjne, a receptory steroidowe działają we współpracy z innymi czynnikami transkrypcyjnymi przy regulacji ekspresji genu [1, 26, 60, 84]. Shule i wsp. [76] wykazali, że HRE mogą działać synergistycznie z różnorodnymi miejscami wiążącymi dla takich czynników transkrypcyjnych, jak: NF-1, Sp1, Oct1.

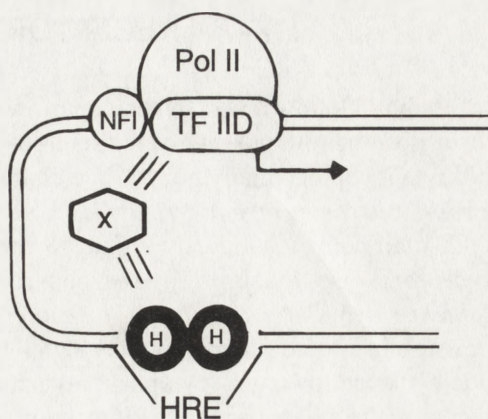
Usunięcie miejsca wiążącego dla NF-1 z promotora genu kodującego MMTV powoduje, że jest on niewrażliwy na transaktywację indukowaną przez receptor glukokortykoidów (GR) [14]. Stosując analizę kompetycyjną przy użyciu oligonukleotydów, Corthesy [18] zademonstrował, że stymulowana estrogenem indukcja transkrypcji z genu kierowanego przez promotor witelogeniny jest zależna od wiązania czynnika podobnego do NF-1. Udział czynnika podobnego do NF-1 nie jest jednakże wymagany do indukcji hormonalnej, gdy ERE eksperymentalnie przesunięto z jego naturalnej odległej pozycji do miejsca położonego bardzo blisko TATA box. Wskazuje to, że w działalności HRE położonego w znacznej odległości od miejsca startowego pośredniczą inne elementy (rys. 8).

Wydaje się obecnie, że funkcjonalny synergizm między receptorami steroidowymi i innymi białkami aktyuatorowymi jest konsekwencją interakcji każdego z tych białek

z hipotetycznymi białkami pośredniczącymi (tak zwane białka "mostowe" lub "adaptorowe") a nie bezpośrednio ze sobą. [68].

Wiadomo, że różne receptory steroidowe mogą rozpoznawać ten sam element odpowiedzi hormonalnej. Jednakże steroidy wpływają na ekspresję genów selektywnie, zależnie od genu i rodzaju komórki. W niektórych wypadkach wyjaśnienie jest proste – komórki nie mają odpowiednich receptorów. W innych wypadkach komórki zawierają receptory kilku hormonów, lecz poszczególne geny odpowiadają tylko na jeden hormon. Jak jest więc możliwa do osiągnięcia taka specyficzność odpowiedzi na hormon?

Jednym z możliwych wytłumaczeń jest różnorodna ekspresja odpowiednich receptorów hormonów w różnych komórkach. Różne wymagania stereo-specyficzne dla każdego receptora lub włączenie odmiennych kombinacji genów prowadzi do syntezy wyspecjalizowanych białek regulatorowych i w konsekwencji do precyzyjnej ekspresji różnych genów [84]



Rys. 8. Współdziałanie hipotetycznych białek mostowych (X) w aktywacji genu przez receptory hormonów steroidowych [42]

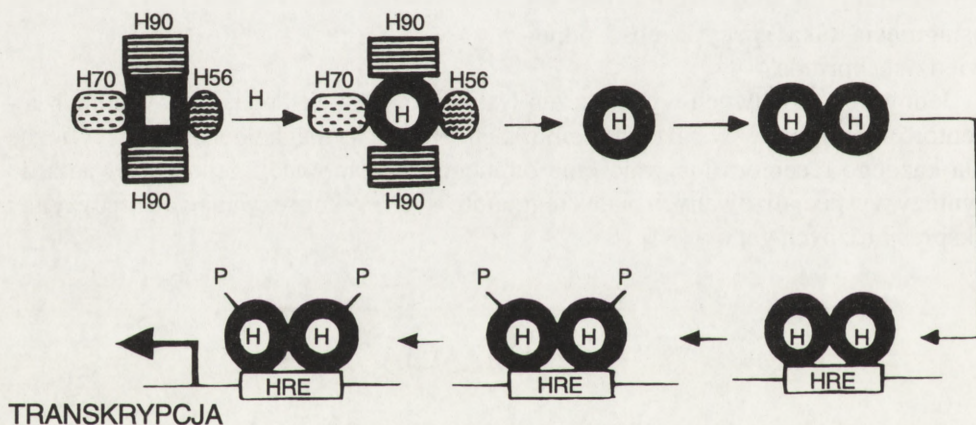
LOKALIZACJA

Subkomórkowa lokalizacja receptorów steroidowych była przedmiotem intensywnych badań. Początkowo uważano, że podczas nieobecności ligandu receptory są zlokalizowane w cytoplazmie, a dopiero kompleks receptor-hormon migruje do jądra, aby modulować ekspresję [35, 46]. Taki model przyjmuje się obecnie dla receptorów estrogenów, progesteronu, androgenów, z tym że niezależnie od obecności hormonu pewna ilość receptorów występuje również w jądrze [77]. Natomiast receptory glukokortykoidów, mineralokortykoidów, hormonu tarczycy T3, kwasu retinowego występują w jądrze niezależnie od obecności hormonu [13].

Ostatnie badania [20] wykazały, że receptor hormonu tarczycy (TR) jest syntetyzowany w stanie zdolnym do wiązania do DNA, nie zasocjowany z białkami szoku cieplnego i dlatego nie wymaga transformacji, jakiej ulegają inne receptory steroidowe.

RECEPTORY SIEROCE

Podczas klonowania cDNA receptorów steroidowych niespodziewanie otrzymano dużą ilość genów pokrewnych z nadrodziną genów receptorów steroidowych. Tak odkryte receptory miały oczywiście charakterystyczne palce cynkowe i nazwano je ERR-1 (*estrogen receptor related*) i ERR-2 [32]. Dotychczas nieznana jest funkcja tych białek ani ich ligandy i dlatego nazwano je receptorami sierocymi (*orphan receptors*). Do rodziny tej zaliczono również czynnik transkrypcyjny COUP-TF (*chicken ovoalbumin upstream promoter-transcription factor*). Białka te pełnią z pewnością istotne funkcje, ponieważ ich ekspresja w komórce wyrażona jest całkowicie ukształtowanym cytoplazmatycznym mRNA. Przypuszcza się obecnie, że receptory te wiążą ligandy, które są produkowane wewnątrz tej samej komórki. Prawdopodobnie są one hydrofobowe i mogą pochodzić z przemian metabolicznych lub składników odżywczych.



Rys. 9. Model aktywacji genu przez hormony przy udziale receptora hormonów steroidowych. [5],

O'Malley i współpracownicy [63, 64] uważają, że receptory sieroce mogą stanowić wierzchołek nowej "wewnątrzkrzywej" góry lodowej, w której można będzie odkryć hormony, aktywujące specyficzne tkanki. Jeżeli hipoteza ta okaże się prawdziwa, ten nowy system wewnątrzkrzywny może okazać się niezwykle interesujący w badaniu akcji hormonów i molekularnej endokrynologii.

PODSUMOWANIE

Przedstawiony w artykule model działania receptorów hormonów steroidowych zawiera najnowsze dane dotyczące mechanizmu ich aktywacji. Uważa się, że niezwiązany receptor występuje w komórce w nieaktywnym czynnościowo kompleksie z

różnorodnymi niereceptorowymi białkami, takimi jak: HSP90, HSP70, HSP56. Dane sugerują, że HSP90 blokuje biologiczną aktywność receptora. Wiązanie hormonu do receptora powoduje oddysocjowanie HSP i bezpośrednią allosteryczną modulację struktury receptora. Tak zaktywowany receptor ulega dimeryzacji, wiąże się do HRE, ulega hormono-zależnej fosforylacji i uczestniczy w aktywacji genu przez rekrutację czynników transkrypcyjnych na promotorze genu docelowego (rys. 9).

PODZIĘKOWANIE

Składam bardzo serdeczne podziękowanie Pani Profesor dr hab. Stanisławie Stokłosowej za przeczytanie manuskryptu i cenne uwagi krytyczne.

LITERATURA

- [1] ADLER S, WATERMAN ML, HE X, ROSENFELD MG. Steroid receptor mediated inhibition of rat prolactin gene expression does not require the receptor DNA-binding domain. *Cell* 1988; **52**: 685–695.
- [2] ARRIZA JL, WEINBERGER C, CERELLI G, GLASER TM, HANDELIN BL, HOUSMAN DE, EVANS RM. Cloning of human mineralo-corticoid receptor cDNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* 1987; **237**: 268–275.
- [3] ASO T, VASAVADA H, KAWAGUCHI T, GERMINO FJ, GANGULY S, KITAJIMA S, WEISSMAN SM, YASUKOCHI Y. Characterization of cDNA for the large subunit of transcription initiation factor TFIIF. *Nature* 1992; **355**: 461–464.
- [4] AURICCHIO F. Phosphorylation of steroid receptors. *J Steroid Biochem* 1989; **32**: 613–622.
- [5] BAGCHI MK, TSAI SY, TSAI M-J, O'MALLEY BW. Identification of a functional intermediate in receptor activation in progesterone-dependent cell-free transcription. *Nature* 1990; **345**: 547–550.
- [6] BAGCHI MK, TSAI SY, WEIGEL NL, TSAI M-J, O'MALLEY BW. Regulation of *in vitro* transcription by progesterone receptor. Characterization and kinetic studies. *J Biol Chem* 1990; **265**: 5129–5134.
- [7] BAGCHI MK, TSAI SY, TSAI M-J, O'MALLEY BW. Progesterone enhances gene transcription by receptor free of heat shock proteins hsp90, hsp56 and hsp70. *Mol Cell Biol* 1991; **11**: 4998–5004.
- [8] BAGCHI MK, TSAI M-J, O'MALLEY BW, TSAI SY. Analysis of the mechanism of steroid hormone receptor-dependent gene activation in cell-free system. *Endocrine Rev* 1992; **13**(3): 525–535.
- [9] BEATO M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 1989; **56**: 335–344.
- [10] BEATO M, CHALEPAKIS G, SCHAUER M, SLATER EP. DNA regulatory elements for steroid hormones. *J Steroid Biochem* 1983; **32**: 737–748.
- [11] BERG JM. Binding specificity of steroid receptors. *Cell* 1989; **57**: 1065–1068.
- [12] BOLANDER FF. Nuclear receptors. W: Molecular Endocrinology. Academic Press Ltd, New York. 1989: str. 77–89.
- [13] BRINK M, HUMBEL BM, DE KLOET ER, VAN DRIEL R. The unliganded glucocorticoid receptor is localized in the nucleus, not in the cytoplasm. *Endocrinology* 1992; **130**: 3575–3581.
- [14] BUETTI E, KUKNEL B, DIGGELMAN H. Dual function of a nuclear factor binding site in MMTV transcription regulation. *Nucleic Acids Res* 1989; **17**: 3065–3078.

- [15] BURCH JBE, FISCHER AH. Chromatin studies reveal that an ERE is located far upstream of a vitellogenin gene and that a distal tissue-specific hypersensitive site is conserved for two coordinately regulated vitellogenin genes. *Nucleic Acids Res* 1990; **18**: 4157–4165.
- [16] CONNEELY OM, KETTELBERGER DM, TSAI MJ, SCHRADER WT, O'MALLEY BW. The chicken progesterone receptor a and b isoforms are products of an alternate translation initiation event. *J Biol Chem* 1989; **264**: 14062–14064.
- [17] CORTHESEY B, HIPSKIND R, THEULAZ I, WAHLI W. Estrogen-dependent *in vitro* transcription from the vitellogenin promoter in liver nuclear extracts. *Science* 1988; **239**: 1137–1139.
- [18] CORTHESEY B, CARDINAUX J-R, CLARET F-X, WAHLI W. A nuclear factor-like activity and liver-specific repressor govern estrogen-regulated *in vitro* transcription from the *Xenopus laevis* vitellogenin B1 promoter. *Mol Cell Biol* 1989; **9**: 5548–5562.
- [19] DAHLMAN-WRIGHT K, WRIGHT A, GUSTAFSSON J-A, CARSTEDT-DUKE J. Interaction of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain with DNA as a dimer mediated by a short fragment of five aminoacids. *J Biol Chem* 1991; **266**: 3107–3112.
- [20] DALMAN FC, KOENIG RJ, PERDEW GH, MASSA E, PRATT WB. In contrast to the glucocorticoid receptor, the thyroid hormone receptor is translated in the DNA binding state and is not associated with hsp90. *J Biol Chem* 1990; **265**: 3615–3618.
- [21] DIAMOND MI, MINER JN, YOSHINAGA SK, YAMAMOTO KR. Transcription factor interactions: selectors for positive or negative regulation from a single DNA element. *Science* 1990; **249**: 1266–1272.
- [22] DINGWALL C, LASKEY RA. Nuclear targeting sequences – a consensus? *Trends Biochem Sci* 1991; **16**: 478–481.
- [23] DYNLACHT BD, HOEY T, TJIAN R. Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell* 1991; **66**: 563–576.
- [24] ELLISTON JF, BEEKMAN H, TSAI SY, TSAY M-J, O'MALLEY BW. Hormone activation of baculovirus expressed progesterone receptors. *J Biol Chem* 1992; **267**: 5193–5198.
- [25] EVANS RM. The steroid and thyroid hormone receptor. *Science* 1988; **240**: 889–895.
- [26] FABER PW, VAN ROOIJ HCJ, SCHIPPER HJ, BRINKMANN AO, TRAPMAN J. Two different, overlapping pathways of transcription initiation are active on the TATA-less human androgen receptor promoter. *J Biol Chem* 1993; **268**: 9296–9301.
- [27] FAWELL SE, LEES JA, WHITE R, PARKER MG. Characterization and colocalization of steroid binding and dimerization activities in the mouse estrogen receptor. *Cell* 1990; **60**: 953–962.
- [28] FLORES O, LU H, REINBERG D. Factor involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: identification and characterization of factor IIIH. *J Biol Chem* 1992; **267**: 2786–2793.
- [29] FORMAN BM, TANG C-R, AU M, CASSANOVA J, GHYSDAEL J, SAMUELS HH. A domain containing leucine zipper-like motifs mediate novel *in vivo* interaction between the thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Mol Endocrinol* 1989; **3**: 1610–1626.
- [30] FREEDMAN LP. Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr Rev* 1992; **13**: 129–145.
- [31] FURLOW JD, MURDOCH FE, GORSKI J. High affinity binding of the estrogen receptor to a DNA response element does not require homodimer formation or estrogen. *J Biol Chem* 1993; **268**: 12519–12525.
- [32] GIGUERE V, YANG N, SEGUI P, EVANS RM. Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature* 1988; **331**: 91–94.
- [33] GIGUERE V. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. *Endocrine Rev* 1994; **15**(1): 61–79.
- [34] GLASS CK, LIPKIN SM, DEVARY O, ROSENFELD MG. Positive and negative regulation of gene transcription by a retinoic acid-thyroid hormone heterodimer. *Cell* 1989; **59**: 697–708.

- [35] GORSKI J, GANNON F. Current models of steroid hormone action: a critique. *Annu Rev Biochem* 1976; **28**: 425.
- [36] GRAUPNER G, WILLS KN, TZUKERMAN M, ZHANG X, PFAHL M. Dual regulatory role for thyroid-hormone receptors allows control of retinoic-acid receptor activity. *Nature* 1989; **340**: 653–656.
- [37] GREEN S, CHAMBON P. Oestradiol induction of a glucocorticoid-responsive gene by a chimeric receptor. *Nature* 1987; **325**: 75–78.
- [38] GREEN S, CHAMBON P. Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet* 1988; **4**: 309–314.
- [39] GREEN S, KUMAR V, THENLAZ I, WAHLI W, CHAMBON P. The N-terminal DNA binding zinc finger of the oestrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity. *EMBO J* 1988; **7**: 3037–3044.
- [40] GRONEMEYER H. Control of transcription activation by steroid hormone receptors. *FASEB J* 1992; **6**: 2524–2529.
- [41] GROYER A, SCHWIZER-GROYER G, CADEPOND F, MARILLER M, BAULIEU EE. Anti-glucocorticosteroid effects suggest why steroid hormone is required for receptor to DNA in vivo but not in vitro. *Nature* 1987; **328**: 624–626.
- [42] HAGER GL, ARCHER TK. The interaction of steroid receptors with chromatin. W: Nuclear Hormone Receptors. Academic Press Ltd. New York 1991; str. 217–232.
- [43] HOEEK W, GRONER B. Hormone-dependent phosphorylation of the glucocorticoid receptor occurs mainly in the amino-terminal transactivation domain. *J Biol Chem* 1990; **265**: 5403–5408.
- [44] HOLLENBERG SM, EVANS RM. Multiple and cooperative trans-activation domain of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 1988; **55**: 899–906.
- [45] HUGHES MR, MALLOY PJ, KIEBACK DG, KESTERSON RA, PIKE JW, FELDMAN D, O'MALLEY BW. Point mutations in the human vitamin D receptor gene associated with hypocalcemic rickets. *Science* 1988; **242**: 1702.
- [46] IKEDA M, OGATA F, CURTIS SW, LUBAHN DB, FRENCH FS, WILSON EM, KORACH KS. Characterization of the DNA-binding domain of the mouse uterine estrogen receptor using site-specific polyclonal antibodies. *J Biol Chem* 1993; **268**: 10296–10302.
- [47] JENSEN EV, JACOBSEN HI, FLESHER JW, SAHA NN, GUPTA GN, SMITH S, COLUCCI V, SHIPLACOFF D, NEUMAN HG, DESOMBRE ER, JUNGBLUT PW. Estrogen receptors in target tissues [w]: Steroid Dynamics. Pincus G, Nakao T, Tait JR [red] Academic Press, New York 1966; 133–156.
- [48] JONAT C, RAHMSDORF HJ, PARK K-K, CATO ACB, GEBEL S, PONTA H, HERRLICH P. Antitumor promotion and anti-inflammation: down-modulation of AP-1 (fos/jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 1990; **62**: 1189–1204.
- [49] JONES N. Transcriptional regulation by dimerization: two sides to an incestuous relationship. *Cell* 1990; **61**: 9–11.
- [50] KAO CC, LIEBERMAN PM, SCHMIDT QZ, PEI R, BERK AJ. Cloning of a transcriptionally active human TATA binding factor. *Science* 1990; **248**: 1646–1650.
- [51] KATZENELLENBOGEN BS. Dynamics of steroid hormone receptor action. *Annu Rev Physiol* 1980; **42**: 17.
- [52] KELLEHER RJ. A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus. *Cell* 1990; **61**: 1209–1215.
- [53] KLEIN-HITPASS L, TSAI SY, WEIGEL NL, RILEY D, RODRIGUEZ R, CSHRADER WT, TSAI MJ, O'MALLEY BW. Native progesterone receptor stimulates cell-free transcription of target gene. *Cell* 1990; **60**: 247–257.
- [54] KLIEWER SA, UMESONO K, MANGELSDORF DJ, EVANS RM. Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D3 signalling. *Nature* 1992; **355**: 446–449.

- [55] KLOCK G, STRAHLE U, SCHUTZ G. Oestrogen and glucocorticoid responsive elements are closely related but distinct. *Nature* 1987; **329**: 7871.
- [56] KUMAR V, CHAMBON P. The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell* 1988; **55**: 145–155.
- [57] LEID M, KASTNER P, LYONS R, NAKSHATRI H, SAUNDERS M, ZACHAREWSKI T, CHEN J-A, STAUBA, GARNIER J-M, MÄDER S, CHAMBON P. Purification, cloning and RXR identity of the HeLa cell factor with RAR or TR heterodimers to bind target sequences. *Cell* 1992; **68**: 377–395.
- [58] MARTINEZ E, WAHLI W. Characterization of hormone responsive elements. W: Parker MG (ed) Nuclear Hormone Receptors. Academic Press Ltd, New York 1991; str. 125–153.
- [59] MEDICIN, NIGRO V, ABBONDANZA C, MONCHARMONT B, MOLINARI AM, PUCA GA. *In vitro* binding of the purified hormone-binding subunit of the estrogen receptor to oligonucleotides containing natural or modified sequences of an estrogen responsive element. *Mol Endocrinol* 1991; **5**: 555–563.
- [60] MEYER ME, GRONEMEYER H, TURCOTTE B, BOCQUEL MT, TASSET D, CHAMBON P. Steroid hormone receptors compete for factors that mediate their enhancer function. *Cell* 1989; **57**: 433–442.
- [61] MIGLIACCIO A, DIDOMENICO M, GREEN S, DEFALCO A, KAJTANIAK EL, BLASI F, CHAMBON P, AURICCHIO F. Phosphorylation on tyrosine of *in vitro* synthesized human estrogen receptor activates its hormone binding. *Mol Endocrinol* 1989; **3**: 1061–1069.
- [62] O'MALLEY BW. Steroid hormone action in eukaryotic cells. *J Clin Invest* 1984; **74**: 207.
- [63] O'MALLEY B. The steroid receptor superfamily; more excitement predicted for the future. *Mol Endocrinol* 1990; **4**: 363–369.
- [64] O'MALLEY BW, TSAI SY, BAGCHI M, WEIGEL N, SCHRADER WT, TSAI MJ. Molecular mechanism of action of a steroid hormone receptor. *Recent Progres Horm Res* 1991; **47**: 1–26.
- [65] ORTIE, HU L-M, MUNCK A. Kinetics of glucocorticoid receptor phosphorylation in intact cells. *J Biol Chem* 1993; **268**: 7779–7784.
- [66] PICARD D, SALSER SJ, YAMAMOTO KR. A movable and regulable inactivation function within the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor. *Cell* 1988; **54**: 1074–1080.
- [67] PRATT WB. Transformation of glucocorticoid and progesterone receptors to the DNA-binding state. *J Cell Biochem* 1987; **35**: 51–68.
- [68] PTASHNE M, GANN AAR. Activators and targets. *Nature* 1990; **346**: 329–331.
- [69] RENOIR J-M, RADANYI C, FABER LE, BAULIEU EE. The non-DNA-binding heterooligomeric form of mammalian steroid hormone receptors contains a hsp90-bound 59-kilodalton protein. *J Biol Chem* 1990; **265**: 10740–10745.
- [70] RINGOLD G. Steroid hormone regulation of gene expression. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1985; **25**: 529–566.
- [71] RHODES A, KLUG A. Palce cynkowe. *Świat Nauki* 1993; **4**: 34–41.
- [72] SANCHEZ ER. Hsp56: a novel heat shock protein associated with untransformed steroid receptor complexes. *J Biol Chem* 1990; **265**: 22067–22070.
- [73] SANCHEZ ER, FABER LE, HENZEL WJ, PRATT WB. The 56-59 kilodalton protein identified in untransformed steroid receptor complexes is a unique protein that exist in cytosol in a complex with both the 70-and 90 kilodalton heat shock proteins. *Biochemistry* 1990; **29**: 5145–5152.
- [74] SAPJ, DE MAGISTRIS L, STUNNENBERG H, VENNSTROM B. A major thyroid hormone response element in the third intron of the rat growth hormone gene. *Embo J* 1990; **9**: 887–895.
- [75] SCHAUER M, CHALEPAKIS G, WILLMANN T, BEATO M. Binding of hormone acetates the kinetics of glucocorticoid and progesterone receptor binding to DNA. *Proc Natl Sci Am* 1989; **86**: 1123.

- [76] SCHULE R, MULLER M, KALTSCHMIDT C, RENKAWITZ R. Many transcription factors interact synergistically with steroid receptors. *Science* 1988; **242**: 1418–1420.
- [77] SCHWABE JWR, NEUHAUSD, RHODES D. Solution structure of the DNA-binding domain of the oestrogen receptor. *Nature* 1990; **348**: 458–461.
- [78] SOKÓŁ-MISIAK W. Jądrowe receptory jako czynniki regulujące transkrypcję. *Postępy Biochemii* 1992; **38(1)**: 12–23.
- [79] SONE T, MARX SJ, LIBERMAN UA, PIKE JW. A unique point mutation in human vitamin D receptor chromosomal gene confers hereditary resistance of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Mol Endocrinol* 1990; **4**: 623–631.
- [80] SONE T, KERNER SA, SAIJO T, TAKEDA E, PIKE JW. Mutations in the DNA binding domain of the vitamin D receptor associated with hereditary resistance of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. [w:] Norman AW, Bouillon R, Thomasset M (red), Vitamin D: Gene regulation, structure-function analysis, and clinical applications. Walter de Gruyter, New York 1991, 84–85.
- [81] SOPTA M, BURTON ZF, GREENBLATT J. Structure and associated DNA-helicase activity of a general transcription initiation factor that binds to RNA polymerase II. *Nature* 1992; **341**: 410–414.
- [82] STRAHLE U, BOSHART M, KLOCK G, STEWART F, SCHUTA G. Glucocorticoid- and progesterone-specific effects are determined by differential expression of the respective hormone receptors. *Nature* 1989; **339**: 629–632.
- [83] SUMIMOTO H, OHKUMA Y, YAMAMOTO T, HORIKOSHI M, ROEDER RG. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: identification of general transcription factor TFIIG. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 9158–9162.
- [84] TRUSS M, BEATO M. Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factor. *Endocr Rev* 1993; **14**: 459–479.
- [85] TSAI SY, TSAI M-J, O'MALLEY BW. Cooperative binding of steroid hormone receptors contributes to transcriptional synergism at target enhancer elements. *Cell* 1989; **57**: 443–455.
- [86] TSAI SY, SRINIVASAN G, ALLAN GF, THOMPSON EB, O'MALLEY BM, TSAI M-J. Recombinant human glucocorticoid receptor induces transcription of hormone response genes in vitro. *J Biol Chem* 1990; **265**: 17055–17061.
- [87] UMESONO K, EVANS R. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 1989; **57**: 1139–1146.
- [88] WRANGE O, ERIKSSON P, PERLMANN T. The purified activated glucocorticoid receptor is a homodimer. *J Biol Chem* 1989; **264**: 5253–5259.
- [89] YAMAMOTO KR. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene network. *Annu Rev Genet* 1985; **19**: 209–252.
- [90] YANG-YEN H-F, CHAMBARD J-C, SUN Y-L, SMEAL T, SCHMIDT TJ, DROUIN J, KARIN M. Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibitor of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 1990; **62**: 1205–1215.
- [91] YU VC, DELSERT C, ANDERSEN B, HOLLOWAY JM, DEVARY OV, NAAR AM, KIM SY, BOUTIN J-M, GLASS CK, ROSENFELD MG. RXR β : a coregulator that enhances binding of retinoic acid thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell* 1991; **67**: 1251–1266.

Otrzymano: 08.08.1994 r.

Przyjęto: 19.12.1994 r.

Adres autora: Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6.

TERAPIA GENOWA – WPROWADZANIE GENÓW DO KOMÓREK

GENE THERAPY – INTRODUCING OF GENES TO THE CELLS

Jakub GOŁĄB, Radosław ZAGOŹDŹON

Zakład Immunologii, Instytut Biostruktury Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie: Terapia genowa to prawdopodobna metoda leczenia zarówno chorób uwarunkowanych genetycznie, jak i wielu nabytych zaburzeń czynności organizmu. W ostatnich latach opracowano liczne metody wprowadzania genów do wnętrza komórek. Metody te można podzielić na wirusowe i niewirusowe. W pierwszych wykorzystuje się zarówno wirusy RNA, jak na przykład retrowirusy, parwovirusy, jak i wirusy DNA, na przykład wirus krowianki. W drugich natomiast stosuje się metody fizyczne i chemiczne.

Summary: Gene therapy has recently become a putative tool in managing both inherited and acquired disorders. Year after year substantial improvements in technical aspects of inserting genes to the cells can be observed. Generally ways of gene insertions may be divided into viral and nonviral. The former take advantage of RNA viruses such as retroviruses and parvoviruses as well as DNA viruses such as vaccinia virus. In the latter both physical and chemical methods are used.

WPROWADZENIE

Do niedawna terapię genową określano jako próby korekcji przez wprowadzenie prawidłowych genów do komórek takich osób, u których te geny były nieaktywne lub zmienione tak, że kodowały nieprawidłowe białka. Obecnie są czynione wysiłki poszerzenia terapii genowej o próby dostarczania do komórek genów produkujących białka mogące wywierać pewien zamierzony efekt leczniczy. W tym ujęciu oznacza to terapię nie tylko chorób wrodzonych (tak zwanych chorób genetycznie uwarunkowanych), ale również nabytych.

Biorąc pod uwagę rodzaj kwasu nukleinowego wprowadzanego do komórki oraz typ modyfikowanego zaburzenia umownie można wyróżnić kilka rodzajów terapii genowej. Pierwszy z nich polega na dodawaniu genów (ang. *gene addition therapy*), a więc proces, w którym gen uszkodzony pozostaje w swoim locus, a gen terapeutyczny jest wprowadzany w inne miejsce chromosomu, zwiększając w ten sposób pulę genów w komórce. Inny rodzaj terapii polega na zamianie genów (ang. *gene replacement therapy*). Polega on wymianie genu zmutowanego (uszkodzonego) na gen prawidłowy w procesie rekombinacji homologicznej. Wreszcie ostatni rodzaj terapii można określić jako "doskonalenie genomu" (ang. *gene augmentation therapy*). Jest to pewna modyfikacja terapii polegającej na dodawaniu genów. W tym przypadku również dodajemy gen komórce, ale ma on zupełnie inne zadanie. Nie zastępuje on bowiem funkcji żadnego genu, ale koduje substancje, które fizjologicznie nie są produkowane przez modyfikowaną komórkę. Mogą to być rybozomy, oligonukleotydy antysensowne, białka wirusowe (na przykład kinaza tymidylanowa wirusa *Herpes simplex*) lub produkty ludzkich komórek, takich jak IL-2, TNF i wiele innych. Zmodyfikowane w ten sposób komórki zaczynają pełnić zupełnie nowe funkcje.

1. METODY WPROWADZANIA GENÓW

Różne sposoby wprowadzania genów do komórek stworzyła natura. Człowiek odkrył je na początku lat siedemdziesiątych badając cykle życiowe wirusów. Zauważono wówczas, że czynnikiem patogennym jest ich kwas nukleinowy. Niektóre z wirusów wywierają swój efekt cytotacyjny w wyniku integracji swojego materiału genetycznego z genomem komórki gospodarza, zmieniając tym samym jej metabolizm. Gwałtowny rozwój technologii rekombinacji, zapoczątkowany również na początku lat siedemdziesiątych umożliwił podjęcie prób naśladowania natury. Opracowano metody inżynierii genetycznej, którymi można klonować geny, poznawać tajniki dotyczące kontroli ich regulacji i wreszcie wykorzystywać wirusy jako nośniki materiału genetycznego. Nie wszyscy byli jednak zwolennikami posługiwania się wektorami tak niebezpiecznymi jak wirusy. Stosowano zatem również inne metody wprowadzania genów do wnętrza komórek. Metody wprowadzania genów generalnie można podzielić na wirusowe i niewirusowe (tab. 1).

Pomimo tego że nadal najczęściej wykorzystuje się wirusy, coraz więcej uwagi poświęca się fizycznym i chemicznym metodom włączania genów do komórek. Wynika to z kilku faktów. Po pierwsze unika się w ten sposób wprowadzania do komórek zbędnego materiału genetycznego wirusa, a zatem zmniejsza się ryzyko powstania mutacji insercyjnej. Ponadto nośniki niewirusowe łatwiej kontrolować pod względem jakości i czystości. Z metod tych największą uwagę przyciągają ostatnio: przenoszenie genów za pośrednictwem receptorów (RMGT– *receptor mediated gene*

TABELA 1. Metody wprowadzania genów do wnętrza komórek

WIRUSOWE	NIEWIRUSOWE
Retrowirusy	koprecypitacja solami wapnia
Parowirusy (AAV)	koprecypitacja z dekstranem DEAE
Adenowirusy	elektroporacja
Wirusy Papova (np. SV 40)	mikroiniekcja
Wirusy krowianki	lipofekcja za pośrednictwem receptorów

transfer) albo za pośrednictwem liposomów (LMGT – *liposome mediated gene transfer*). Ta druga metoda jest obecnie wykorzystywana w badaniach klinicznych.

Inne metody wprowadzania genów do komórek, jak na przykład koprecypitacja solami wapnia, elektroporacja (traktowanie komórek salwami zmiennego pola elektrycznego w celu zwiększenia przepuszczalności błon cytoplazmatycznych) czy też mikroiniekcja (ang. *gene gun*) są zarezerwowane praktycznie do badań *in vitro* na małą skalę.

Niewirusowe metody mają jeszcze jedną istotną wadę, mianowicie nie umożliwiają długoterminowego utrzymania ekspresji wprowadzonego materiału genetycznego.

1.1 WIRUSOWE METODY WPROWADZANIA GENÓW

Idealna metoda wprowadzania genów do wnętrza komórek powinna uwzględniać kilka niezwykle ważnych warunków: powinna być tak wydajna, że każda komórka otrzymywałaby tę samą, ściśle określoną dawkę genów, powinna być prosta, umożliwiająca dostarczenie materiału genetycznego w jednym tylko podaniu, na przykład jako proste wstrzyknięcie dożylnie, "wstrzyknięte" geny powinny dotrzeć tylko do tych miejsc w organizmie, w których są wymagane, a integracja DNA powinna odbyć się na zasadzie rekombinacji homologicznej (wzajemnej wymianie genu terapeutycznego z uszkodzonym genem). Niestety metody takiej nie opracowano mimo wielkiego postępu badań w tej dziedzinie.

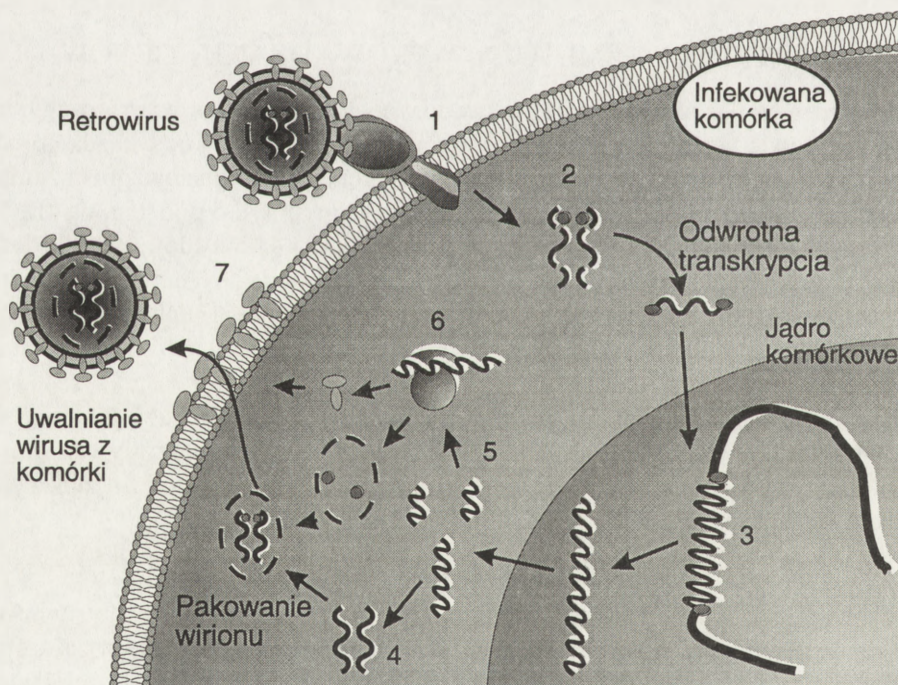
Lista wirusów badanych jako przENOŚniki genów jest bardzo długa. Obejmuje ona zarówno wirusy DNA, jak i RNA. Dotychczas trzy z nich wykorzystywano najczęściej. Są to retrowirusy, adenowirusy i wirusy zależne od adenowirusa, należące do rodzaju *Dependovirus* (AAV – *adeno associated viruses*).

1.1.1. RETROWIRUSY

Najlepiej poznany jest układ przenoszenia genów za pośrednictwem retrovirusów. Nie dziwi zatem fakt, że są one zdecydowanie najczęściej stosowane w zatwierdzonych projektach badań klinicznych. Ogromne zainteresowanie tymi wirusami wynika z wielu ich zalet. Jedną z nich jest zdolność do stabilnej transdukcji prawie 100% komórek docelowych, która umożliwiłaby długotrwałą ekspresję wprowadzonego materiału genetycznego. Trwałość tego procesu jest wynikiem integracji materiału

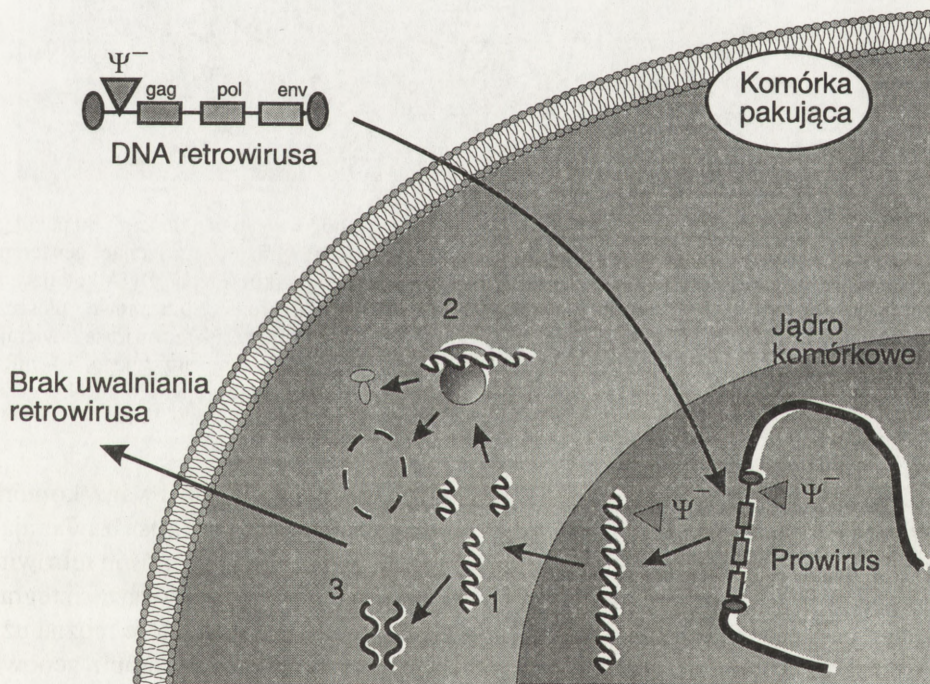
genetycznego wirusa z genomem komórki gospodarza. Wydaje się, iż nie dzielące się komórki, nie ulegają infekcji retrowirusami. Niedawno przedstawiono jednak dowód na to, że retrowirusy potrafią integrować swój materiał genetyczny z DNA niektórych typów komórek znajdujących się w okresie postmitotycznym [19]. Schemat cyklu życiowego retrowirusów przedstawiono na rysunku 1.

Do niedawna sądzono, że wprowadzenie materiału genetycznego wirusa odbywa się w zupełnie przypadkowym fragmencie DNA. Stwarzałoby to ryzyko powstania mutacji insercyjnej i w efekcie mogłoby prowadzić do aktywacji protoonkogenów, czy też inaktywacji antyonkogenów, a w końcu do transformacji nowotworowej. Ostatnio okazało się jednak, iż integracja wirusa nie jest procesem zupełnie przypadkowym. Istnieją dowody na to, że retrowirusy w celu wbudowania swojego genomu wybierają charakterystyczne regiony DNA. Z licznych badań wynika, że na dystrybucję procesów integracji wpływają takie czynniki, jak sekwencje nukleotydów, stan metylacji dinukleotydów CpG, odległość od nukleosomów, aktywność transkrypcyjna chromatyny, a być może także inne właściwości [5,10].

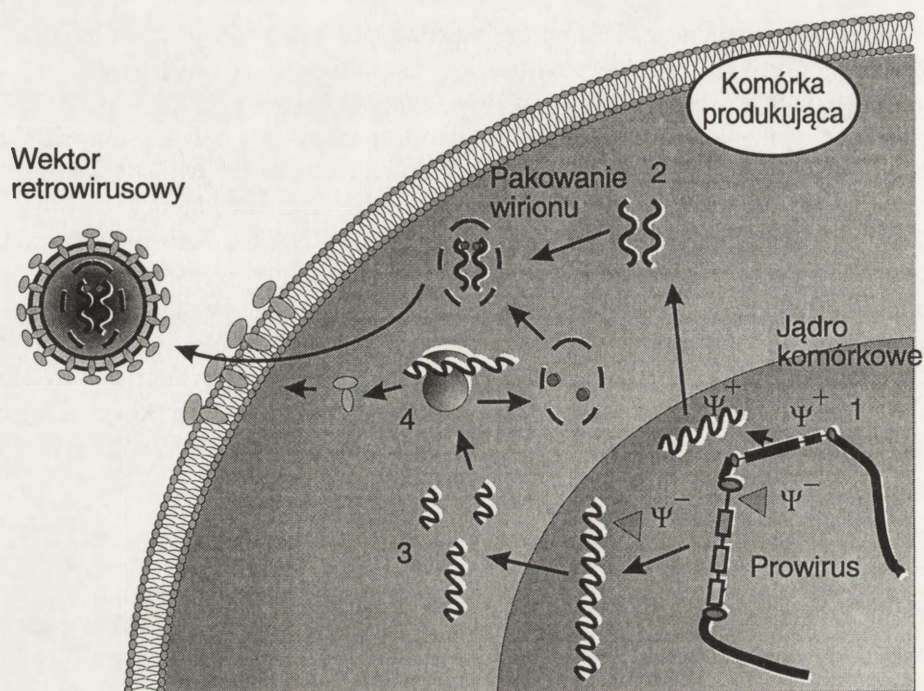


Rys. 1. Schemat cyklu życiowego retrowirusa: 1 – receptor dla retrowirusa, 2 – RNA retrowirusa, 3 – prowirus – DNA retrowirusa wbudowane w genom komórki, 4 – RNA retrowirusa, 5 – mRNA retrowirusa, na bazie którego powstały białka retrowirusa, 6 – produkcja białek retrowirusowych w rybosomach komórki gospodarza, 7 – glikoproteiny otoczki wirusa

Innym zagrożeniem, związanym ze stosowaniem retrowirusów, jest możliwość rozprzestrzeniania się zakaźnego wirusa. Można temu zapobiec konstruując specjalne komórki pakujące wektory retrowirusowe (ang. *packaging cells*), (rys.1, 2, 3). W komórkach tych znajduje się genom retrowirusa pozbawiony pewnej sekwencji nukleotydowej odpowiedzialnej za pakowanie dojrzałych cząstek wirusowych. Jest to tak zwana sekwencja Ψ znajdująca się tuż przed pierwszym kodonem genu *gag* [34]. Sekwencja pakująca działa *in-cis*. Jeśli brakuje jej w RNA retrowirusa, materiał ten nie zostaje opłaszczony białkami kapsydu, produktami genu *env*. Jeśli jednak do takiej komórki pakującej wprowadzony zostanie jakikolwiek gen zawierający sekwencję Ψ , zostanie on opłaszczony i uwolniony z komórki jako retrowirus. Do komórek pakujących można zatem wprowadzać, skonstruowany metodami inżynierii genetycznej, wektor retrowirusowy. Z wektora tego usunięto enzymami restrykcyjnymi geny strukturalne wirusa, a na ich miejsce wprowadzono na przykład gen terapeutyczny.



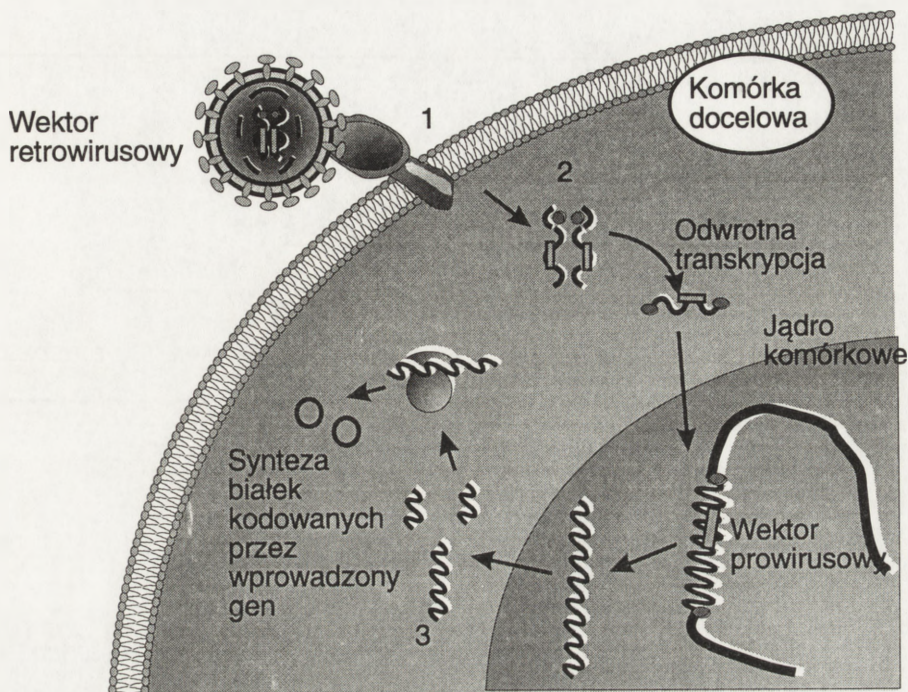
Rys. 2. Przygotowanie komórki pakującej polega na wprowadzeniu do niej defektywnego retrowirusa, to znaczy pozbawionego pewnych niezbędnych dla jego replikacji fragmentów genomu; transfekcję przeprowadza się metodą koprecypitacji solami wapnia; wraz z DNA retrowirusa do komórki pakującej wprowadzany jest selektywny marker, na przykład gen oporności na neomycynę Neo^R ; umożliwia to selektywne zabicie komórek nie-transfekowanych i uzyskanie czystej hodowli komórek pakujących: 1 – mRNA retrowirusa, 2 – produkcja białek retrowirusowych w rybosomach komórki gospodarza, 3 – RNA retrowirusa, Ψ – sekwencja odpowiadająca za opłaszczanie RNA retrowirusa; brak tej sekwencji uniemożliwia uwalnianie dojrzałych retrowirusów



Rys. 3. Wprowadzanie wektora retrowirusowego zawierającego odpowiedni gen do komórki pakującej; komórka produkująca jest komórką uwalniającą dojrzałe wektory retrowirusowe zawierające gen terapeutyczny: obok prowirusa, pozbawionego sekwencji Ψ do komórki tej wprowadzono DNA kodujące gen terapeutyczny, do którego dołączono sekwencję Ψ ; dzięki temu glikoproteiny otoczkowe opłaszczają RNA genu terapeutycznego; w ten sposób z komórki uwalniane są dojrzałe cząstki retrowirusa zawierające gen terapeutyczny: 1 – gen terapeutyczny z sekwencją Ψ , 2 – mRNA genu terapeutycznego, 3 – mRNA powstające z prowirusa, 4 – produkcja glikoprotein otoczkowych opłaszczających mRNA genu terapeutycznego

Komórka pakująca wraz z wektorem retrowirusowym to tak zwana komórka produkująca (ang. *producer cell*), gdyż produkuje ona cząstki wirusa zawierające kopie RNA rekombinowanego wektora. W produkowanych w ten sposób retrowirusach znajdują się ponadto produkty genu *pol*, czyli odwrotna transkryptaza, integraza i proteaza. Są to zatem kompletne nośniki genu terapeutycznego, które można użyć do transdukcji komórek w tkankach docelowych, poddawanych terapii genowej. Ponieważ w nośnikach tych nie ma genów strukturalnych wirusa, są one niezdolne do dalszej replikacji. Okazało się również, iż wydajniej pakowane są sekwencje genów zawierające, oprócz genu *pol*, również fragment 3' genu *gag* [1].

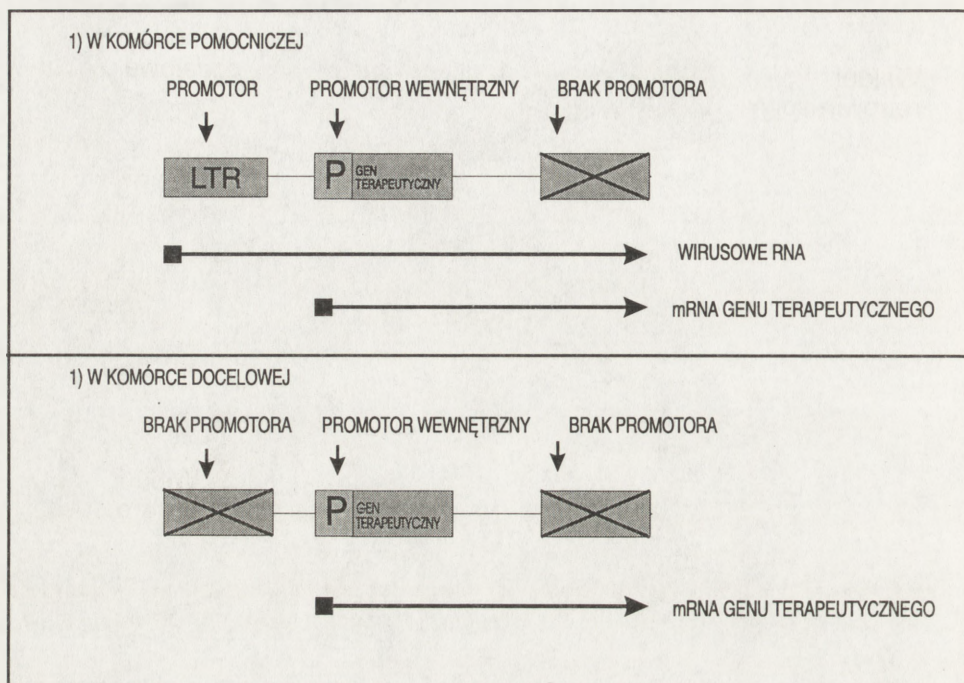
Pierwsze linie komórek pakujących wywodziły się z fibroblastów NIH-3T3 [1,34]. Jednym z problemów związanym z tymi liniami było pojawienie się dzikich, czyli nie zmutowanych form retrowirusowych. Powstawały one w wyniku rekombinacji homologicznych pomiędzy różnymi sekwencjami genowymi. Aby uniknąć tego zagrożenia,



Rys. 4. Transdukcja komórki docelowej; wektor retrowirusowy, zawierający gen terapeutyczny infekuje komórkę docelową; enzymy retrowirusowe przepisują RNA genu na DNA w procesie odwrotnej transkrypcji, a następnie wbudowują go do genomu komórki gospodarza; transdukowana komórka produkuje białka – produkty genu terapeutycznego, ale nie może kontynuować rozprzestrzeniania się retrowirusa, bo we wprowadzonym genie brakuje retrowirusowych sekwencji regulatorowych, np. *gag*, *env*, *pol*: 1 – receptor dla retrowirusa, 2 – RNA genu terapeutycznego, z którego po odwrotnej transkrypcji powstanie DNA wbudowane do genomu komórki, 3 – mRNA genu terapeutycznego, z którego powstają białka

wprowadzono kolejne modyfikacje, między innymi mutacje punktowe w powtarzalnych sekwencjach końcowych (LTR – *long terminal repeats*) [12].

Jeszcze innym zabezpieczeniem przed niekontrolowanym rozprzestrzenianiem się wirusów jest konstruowanie tak zwanych wektorów samobójczych lub inaczej samounieczynnających się (ang. *suicide vectors*, *self inactivating vectors*) [54]. W wektorach tych wywołano delecje fragmentów określonego promotora znajdującego się w 3'-LTR. W trakcie odwrotnej transkrypcji odcinek 3'-LTR używany jest jako matryca dla zarówno 3', jak i 5' LTR prowirusowego DNA, który zostaje wprowadzony do DNA chromosomowego. Delecja odpowiednich fragmentów integrowanego wirusa sprawia, że nie może powstać RNA wirusa. Nie zaburzona jest natomiast ekspresja genu terapeutycznego, gdyż jest on kontrolowany przez inny zestaw sekwencji regulatorowych (rys. 5).



Rys. 5. Schemat przedstawiający zasadę wprowadzania genów do komórek za pośrednictwem samo-nieczynniających się wektorów retrowirusowych (opis w tekście)

Jedną z najnowszych koncepcji wprowadzania genów polega na rozdzieleniu regionów kodujących białka retrowirusa: *gag*, *env* i *pol* na dwa różne wektory plazmidowe, którymi niezależnie transfekuje się komórki pakujące. Aby zatem doszło do powstania wirusa pomocniczego, musiałyby zajść aż trzy procesy rekombinacji. Szansa na to jest tak mała, że można założyć, iż jest to praktycznie niemożliwe [35].

Istnieje wiele typów retrowirusów. Jedne mogą infekować komórki mysie, inne ludzkie, a jeszcze inne zarówno mysie jak i ludzkie. Dlatego retrowirusy podzielono na kilka klas:

wirusy ekotropowe – infekujące tylko komórki mysie,

wirusy ksenotropowe – niezdolne do infekowania komórek mysich, ale infekujące wiele innych gatunków ssaków i

wirusy amfotropowe – zdolne do infekowania zarówno mysich, jak i innych komórek ssaków.

Tropizm wirusów jest uzależniony od rodzaju białka *env* produkowanego przez wirusy i znajdującego się na powierzchni ich kapsydu. Zgodnie z tym konstruuje się odpowiednie linie komórek pakujących, zawierające określone geny *env* wirusa.

Najpowszechniejsze w próbach zastosowań klinicznych są rekombinowane retrowirusy amfotropowe zdolne do transdukcji komórek ludzkich [9].

Z pewnością można sądzić, że kolejne udoskonalenia wektorów retrowirusowych będą pojawiać się równolegle z odkrywaniem nieznanych jeszcze elementów cyklu życiowego retrowirusów. Na pewno pomocne będzie dokładniejsze poznanie reguł rządzących oddziaływaniami między białkami env a ich receptorami na powierzchni komórek. Naprowadzanie (ang. *targeting*) wektorów retrowirusowych na odpowiednie komórki jest ekscytującym kierunkiem badań. Jedną z grup badaczy próbowała naprowadzać wektory na komórki poprzez łączenie białek env z przeciwciałem monoklonalnym rozpoznającym odpowiedni epitop znajdujący się na powierzchni komórki docelowej [45]. Inna grupa chemicznie modyfikowała białka kapsydu dołączając do nich reszty galaktozy i naprowadzając tak zmienione nośniki na hepatocyty. Na powierzchni tych komórek znajdują się bowiem receptory dla asialoglikoprotein [41]. W obu tych próbach uzyskano bardzo ciekawe i zachęcające wyniki. Jak wiadomo hepatocyty w normalnych warunkach nie proliferują (nie nadają się więc do transdukcji retrowirusowej), ale po uszkodzeniu wątroby możliwe jest ich namnażanie w celu zregenerowania funkcji narządu. Aby zatem umożliwić integrację materiału genetycznego wirusów, przeprowadzono częściową hepatektomię. Pomimo że transdukcja była mniej wydajna niż w badaniach *in vitro*, metodę tę będzie można prawdopodobnie wykorzystać *in vivo* [16,24,43,44].

Wydajne, prawie w 100%, wprowadzanie genów do komórek docelowych udaje się jak na razie uzyskać tylko na modelach mysich. W eksperymentach na większych zwierzętach, takich jak na przykład psy i naczelne transdukcja nie jest tak efektywna. W związku z tym poszukuje się metod i czynników usprawniających ten proces. W jednym z badań wykazano, że niektóre czynniki wzrostu, jak na przykład: IL-3, IL-6, czynnik wzrostu komórek macierzystych (*c-kit ligand*) zwiększają transdukcję komórek macierzystych krwi (CD34⁺) dwu-, a nawet czterokrotnie [11]. Inna grupa badaczy odkryła, że proces ten usprawnia zewnątrzkomórkowa macierz szpiku kostnego [36].

Spośród wektorów retrowirusowych największą popularnością cieszy się wirus białaczki mysiej Moloneya (MoMuLV – *Moloney murine leukaemia virus*) [37]. Pewną zagadką, niedawno wyjaśnioną, była bardzo niska ekspresja genów wprowadzanych za pośrednictwem MoMuLV. Prawdopodobnie wynika to z metylacji wektorowych cytozyn w LTR [6,28]. Wiedząc o tym można wprowadzić odpowiednie modyfikacje w LTR, bądź dołączyć do wektorów wewnętrzne promotory.

1.1.2. ADENOWIRUSY

Coraz częściej w terapii genowej wykorzystywane są adenowirusy. W przeciwieństwie do retrowirusów mogą one infekować komórki w fazie G₀. Można zatem używać ich przy wprowadzaniu genów do wnętrza komórek, które przestały się dzielić, na przykład do kardiomiocytów, neuronów, bądź też do komórek dzielących się tylko w odpowiednich warunkach (na przykład po zranieniu), takich jak komórki nabłon-

kowe i śródbłonkowe. Adenowirusy rozszerzają zatem zakres komórek podatnych dla terapii genowej.

Spośród adenowirusów najczęściej stosowane są pozbawione do replikacji adenowirusy należące do serotypu Ad5. Zaletą adenowirusów jest fakt, że nie włączają swojego materiału genetycznego do genomu gospodarza, ale pozostawiają go w postaci episomów, czyli pozachromosomowo. To eliminuje zagrożenie mutacją insercyjną. Ponadto adenowirusy są znacznie pojemniejszymi wektorami od retrowirusów. Mogą przenosić aż 36 kb DNA, a poza tym można je uzyskiwać w bardzo wysokim mianie. Jak dotąd nie udokumentowano działania nowotworowego adenowirusów. Natomiast dość dużym problemem jest indukowanie przez te wirusy silnej odpowiedzi odpornościowej organizmu. Inną niezwykle ważną zaletą adenowirusów jest łatwość konstruowania ich z komponentów plazmidowych. Usunięcie regionu E1 (*early gene region*) z genomu wirusa pozbawia go zdolności do replikacji. Usunięcie E1 nie wyklucza jednak możliwości dalszego rozprzestrzeniania się wirusa. Jeśli w transdukowanej komórce dojdzie do koinfekcji innym adenowirusem, albo w genomie komórki będzie znajdował się już gen E1, możliwe jest wówczas przywrócenie zdolności wirusa do namnażania. Potwierdziły to badania Grahama i współpracowników [20].

1.1.3. WIRUSY ZALEŻNE OD ADENOWIRUSA (AAV) ORAZ PARWOWIRUSY

AAV to grupa wirusów wzbudzających coraz większe zainteresowanie badaczy zajmujących się terapią genową. Należą one do rodziny *Parvoviridae*. Są to jednociowe wirusy DNA [52], szeroko rozpowszechnione w otaczającym nas środowisku, a co najważniejsze nigdy nie wykazano ich związku z żadną chorobą człowieka, nawet mimo tego że aż u 85% ludzi w USA można wykryć swoiste przeciwciała przeciwko tym wirusom. Wirusy te charakteryzują się kilkoma cechami, które stanowią o tym, że można je wykorzystać w terapii genowej. Przede wszystkim mogą one infekować szeroki wachlarz komórek, zarówno dzielących się jak i nie dzielących. Ich wiriony są niezwykle stabilne, odporne na liczne rozpuszczalniki, detergenty, skrajne temperatury i graniczne pH, a wprowadzenie do genomu komórki materiału genetycznego wirusa zawsze odbywa się w określonym miejscu, na 19 chromosomie [25,26,27,46,48]. Za dokładną integrację wirusa odpowiadają dwa białka: rep78 i rep68. Całkiem niedawno opracowano bardzo dobry model doświadczalny umożliwiający dokładne poznanie reguł rządzących integracją wirusów AAV [8]. Z pewnością pomoże to udoskonalić metody wprowadzania genów do wnętrza komórek. Integracja wirusa do DNA komórki gospodarza jest bardzo stabilna i prawdopodobnie nie prowadzi do mutagenyzy insercyjnej [4,38,39,40]. W dodatku wykazano, iż produkty genów AAV mają pewną aktywność antyonkogenną [21]. Cechy te decydują o tym, że AAV mogą być doskonałymi narzędziami w terapii genowej.

Zmodyfikowane wektory AAV, to znaczy sklonowane w postaci plazmidu, nadal zachowują zdolność do infekcji i produkcji cząstek wirusowych. Jest to cecha bardzo korzystna, gdyż umożliwia dowolne manipulowanie materiałem genetycznym wirusa.

W pierwszych rekombinowanych wektorach AAV wymieniano gen *cap* kodujący kapsyd na gen Neo^R. Następnie wektorem tym zakażano linię komórkową uprzednio transfekowaną adenowirusem zawierającym plazmid pomocniczy, czyli uzupełniający brakujący gen *cap*. Tak zmodyfikowana linia komórkowa mogła produkować otoczone kapsydem cząstki wirusa AAV zawierające gen Neo^R.

Do produkcji wektorów pomocniczych wykorzystano dwie metody. Jedna polegała na tym, że do rekombinowanych wektorów AAV wprowadzano fragmenty bakteriofaga lambda uzupełniające funkcje produktu genu *cap*. Gen ten był jednak zbyt duży, aby mógł być spakowany do cząstki produkowanego wirusa. Druga metoda polegała na usunięciu istotnych sekwencji z regionu ITR (ang. *inverted terminal repeats*) wektora AAV. W wyniku modyfikacji niemożliwa była ani replikacja, ani pakowanie wirusa, ale wytwarzane były produkty genów *cap* i *rep* [51]. Tak konstruowane cząstki wirusa miały jednak liczne wady:

- Wydajność transdukcji wynosiła tylko 0,5–5%.
- Obecność genu *rep* sprawiała, że pojemność wirusa była bardzo zmniejszona (zaledwie 2 kb), a ponadto, jak wykazały badania, sam gen *rep* w znaczący sposób zmniejszał wydajność transdukcji.
- W wyniku znacznej homologii między sekwencjami plazmidu AAV a sekwencjami wirusa pomocniczego dochodziło do generacji postaci dzikich wirusa AAV zanieczyszczających uzyskiwany materiał nawet w 50%.

Kolejna generacja wektorów miała usunięte oba geny *cap* i *rep*, co zwiększało pojemność do 4,2 kb [22]. Wreszcie skonstruowano taki system pakujący, z którego usunięto wszystkie sekwencje homologiczne pomiędzy wektorem a uzupełniającym go plazmidem pomocniczym [47]. W układzie tym wektor psub210 zawierał tylko ITR, gen Neo^R i krótki, składający się z 45 par zasad fragment wirusa AAV uzyskany po trawieniu enzymem restrykcyjnym XbaI. Usunięty przez enzym restrykcyjny fragment wirusa AAV został wprowadzony do wektora pomocniczego, do którego dołączono ponadto koniec 5' adenowirusa w celu zwiększenia stopnia ekspresji. Wektor pomocniczy nazwano pAAV/Ad (od plazmid AAV/Adenowirus). Uzyskano w ten sposób całkowity brak sekwencji homologicznych pomiędzy wektorem pomocniczym a wektorem plazmidowym, dzięki czemu produkcja postaci dzikich wirusa jest niemożliwa.

Do tej samej grupy – parwowirusów należą także parwowirus B19 (AAV-2). W przeciwieństwie do AAV wirus ten jest czynnikiem etiologicznym kilku chorób człowieka [2,18]. Wykazano również szczególne powinowactwo tego wirusa do komórek hemopoetycznych [49]. Właściwość tę spróbowano wykorzystać. W tym celu skonstruowano wektor hybrydowy AAV-B19 zakładając, że będzie on szczególnie efektywnie transdukował hematopoetyczne komórki progenitorowe [55]. W hybrydzie tej wykorzystano promotor p6 wirusa B19 i gen Neo^R. Następnie rekombinowanymi wirusami transdukowano komórki CD34⁺ izolowane z krwi pępowinowej. Przeprowadzenie transdukcji nie wymagało prestymulacji komórek progenitoro-

wych ani cytokinami, ani czynnikami wzrostu. Wyraźnie więc widać, iż wektory oparte na parwowirusach mogłyby być alternatywą dla wektorów retrowirusowych, które z powodzeniem wykorzystywane są jak dotąd przy transdukowaniu komórek hematopoetycznych [33]. Przewaga parwowirusów polegałaby na zdolności do infekowania komórek niereplikujących, bądź wolno replikujących, bez uprzedniej ich stymulacji [42].

1.1.4. WIRUS KROWIANKI

Wirus krowianki niejednokrotnie był wykorzystywany przez naukowców. Dzięki szczepionkom, jakie z niego uzyskano, zdołano opanować ospę prawdziwą w takim stopniu, że praktycznie nie istnieje już ona na świecie. Pochodzenie wirusa nie jest znane. Przypuszcza się, że jest to zmieniony wirus ospy bydłowej.

Obecnie istnieje nadzieja, że ponownie dzięki wirusowi krowianki będzie można "szczepić" chorych ludzi, choć w zupełnie innym celu. Z wirusa tego próbuje się bowiem przygotować szczepionki przeciwnowotworowe. Wirus byłby w nich wektorem przenoszącym geny kodujące odpowiednie substancje terapeutyczne. Zainteresowanie tym wirusem jako potencjalnym narzędziem w terapii genowej wynika z kilku jego właściwości, a mianowicie:

- łatwości konstruowania wektorów zawierających długie fragmenty DNA (ponad 25 kb),
- dokładności i wierności ekspresji wprowadzonych obcych sekwencji genów oraz
- możliwości infekowania szerokiego zakresu komórek [15].

Aby docenić unikatowe cechy wirusa krowianki, warto poznać kilka jego właściwości. Wirus ten należy do rodziny *Poxviridae*, która obejmuje również szereg innych wirusów zwierzęcych. Są to największe wirusy zwierzęce, które można uwidocznic nawet w mikroskopie świetlnym. Ich replikacja odbywa się w cytoplazmie infekowanych komórek. Zbudowane są z liniowego dwuniciowego DNA o długości 85–240 x 10⁶ par zasad. Wirusowa polimeraza RNA rozpoznaje tylko własne transkrypcyjne sekwencje regulatorowe, które różnią się od eukariotycznych i prokariotycznych. Dzięki temu synteza białek wirusa nie zakłóca ekspresji genów komórki gospodarza. Tuż po infekcji komórki rozpoczęta zostaje synteza wczesnych mRNA, z których powstają wczesne białka wirusa. Wśród nich są polimerazy DNA i inne enzymy niezbędne do rozpoczęcia replikacji genomu wirusa. Początek replikacji pokrywa się z rozpoczęciem ekspresji późnych genów. Wśród ich produktów znajdują się prawie wszystkie białka strukturalne i enzymy dojrzałego wirusa. W następnym etapie dochodzi do utworzenia gotowych wirionów. Większość z nich pozostaje w infekowanej komórce, ale część uzyskuje lipidową otoczkę z aparatu Golgiego i opuszcza komórkę w procesie pączkowania [15].

Wirus krowianki ma bardzo ciekawą i korzystną właściwość. Otóż tak jak w komórkach eukariotycznych mRNA wirusa ulega licznym modyfikacjom potranslacyjnym, jak na przykład przyłączanie czapeczki z 7-metyloguanozyny do końca 5' oraz ogona poli(A) do końca 3'.

Generowanie rekombinowanych wirusów krowianki polega na wymianie homologicznej pomiędzy DNA wirusa krowianki a wektorem plazmidowym zawierającym wprowadzany gen [23]. Wektory plazmidowe zawierają jeden lub więcej genów połączonych z poxwirusowym promotorem. Po obu stronach wektora znajdują się fragmenty genomu wirusa krowianki, które nic nie kodują, ale są niezbędne do tego, aby zaszła rekombinacja homologiczna. Skonstruowany w ten sposób wektor wprowadza się do komórek, które uprzednio zostały zakażone wirusem krowianki. W efekcie w komórkach powstają odpowiednie rekombinanty wirusa krowianki zawierające wprowadzane geny.

W związku z tym, że promotory komórkowe nie są rozpoznawane przez aparat transkrypcyjny wirusa krowianki, do ekspresji wprowadzonych genów należy użyć natywny lub syntetyczny promotor wirusa. Do tego celu używano bardzo wielu promotorów. Odpowiedni wybór jest uwarunkowany tym, co planuje się uzyskać. Dany promotor określa bowiem, w jakim tempie, w jakiej fazie cyklu życiowego wirusa i w jakiej ilości ma być produkowane białko lub RNA. Na przykład okazało się, że jeśli dochodzi do ekspresji wprowadzonego genu w późnej fazie cyklu wirusa, nie następuje aktywne pobudzanie limfocytów T. Zatem jeśli pierwotnym celem jest skonstruowanie szczepionki, należy użyć promotora wczesnych genów wirusa. Z kolei aby uzyskać ekspresję genów na wysokim poziomie, należy wykorzystać promotory późnych genów. W tym celu Davison i Moss skonstruowali syntetyczny promotor znacznie silniejszy niż jakikolwiek inny występujący naturalnie [13]. Kolejnym sposobem osiągnięcia zamierzonego poziomu ekspresji genu jest przyłączenie promotorów innych wirusów, na przykład bakteriofaga T7 [17]. Aby jeszcze silniej zwiększyć ekspresję genu, wprowadzono fragment wirusa *encephalomyocarditis*, tak zwaną 5'-*untranslated sequence*, co umożliwia translację niezależną od obecności czapeczki z 7-metyloguanozyny [14].

1.2. METODY FIZYCZNE WPROWADZANIA GENÓW

Wprowadzanie genów do komórek za pośrednictwem metod fizycznych jest również wykorzystywane w badaniach, które mają mieć zastosowanie dla celów klinicznych. Metody te mają pewne wady ograniczające ich użycie, ale mają również właściwości decydujące o ich przewadze nad metodami wprowadzania genów za pośrednictwem wirusów.

Precypitacja DNA wraz z fosforanem wapnia po raz pierwszy została zastosowana na początku 1980 roku. Sole wapnia uszkadzając błonę komórkową umożliwiają penetrację materiału genetycznego do wnętrza komórek. Niestety wyklucza to ewentualne zastosowanie tej metody *in vivo*.

Bezpośrednie wstrzyknięcie genu do komórki za pomocą mikropipety, choć jest metodą bardzo produktywną (jedna na pięć komórek dostaje prawidłowo podany gen) i powtarzalną, to jednak również uszkadza błonę komórkową. Ponadto trudno sobie wyobrazić wprowadzenie genów oddzielnie do kilku milionów komórek, a tyle trzeba byłoby transfekować, aby uzyskać zamierzony efekt terapeutyczny.

Kolejną formą wprowadzania genów jest lipofekcja, czyli wprowadzanie materiału genetycznego za pośrednictwem liposomów. Porównanie zalet i wad niektórych metod wprowadzania genów przedstawiono w tabeli 2.

Liposomy początkowo zwane "bangosomami", sporządził na początku lat sześćdziesiątych Alec Bangham. Na początku łączono z nimi wiele nadziei. Miały bowiem służyć jako "magiczne kule" lub "zaadresowane koperty", w których umieszcza się określony lek, a następnie "wysyła" do chorej komórki. Użycie liposomów łączyło się z szeregiem ograniczeń, szczegółowo opisanych w ref. [32]. Przez ponad trzydzieści lat próbowano jednak uporać się z owymi ograniczeniami, co w wielu przypadkach udało się.

Jako nośniki materiału genetycznego zaczęto używać liposomów w latach osiemdziesiątych. Skuteczność procesu wydaje się zależeć od kilku czynników, między innymi od składu lipidów błonowych, stosunku lipidów do DNA, stabilności kompleksu DNA-lipidy, transportu DNA z cytoplazmy do jądra komórkowego. Zanim DNA wniknie do wnętrza komórki, liposomy powinny najpierw dotrzeć do odpowiedniej tkanki. Po drodze jednak muszą unikać komórek fagocytujących, które "wymiatają" wszystko co obce [50]. W tym celu na wzór amerykańskich samolotów wojskowych niewykrywanych przez radary, konstruuje się tak zwane "*stealth liposomes*", którym udaje się ominąć fagocytozę. W tym celu pokrywa się liposomy glikolem polietylenowym [29]. Przypomina to erytrocyty pokryte resztami kwasu sialowego. Inna metoda polega na dodaniu do błony liposomowej gangliozydów GM1, co jak się okazało, również chroni je przed nieswoistą fagocytozą [31]. Takie kompleksy nie docierają jednak wyłącznie do tkanek docelowych, bowiem po drodze są wychwytywane przez inne komórki. Interesujący pomysł na pokonanie tego problemu przedstawili Wang i Huang. Skonstruowali oni immunoliposomy, czyli kompleksy liposomów z przeciwciałami przymocowanymi do zewnętrznej powierzchni błony. Przeciwciała te rozpoznają odpowiednie antygeny znajdujące się na powierzchni komórek docelowych.

Proces transportu DNA z liposomów do wnętrza komórek nie jest jeszcze w pełni poznany. Wiadomo, że liposomy mające ujemnie naładowaną powierzchnię łatwiej reagują z błoną komórkową. Niestety są one wtedy również łatwiej wychwytywane przez makrofagi. Na oddziaływania między komórkami a liposomami wpływa także skład tych ostatnich [30]. Wiadomo, że niektóre fosfolipidy w trakcie kontaktu z błoną komórkową dufundują z błony liposomowej do plazmalemy i *vice versa*. Jeśli w wyniku takiego kontaktu dojdzie do zwiększenia przepuszczalności błony otaczającej komórkę, to zawartość liposomów może przemieścić się do wnętrza komórki. Proces

TABELA 2. Porównanie niektórych technik wprowadzania genów do wnętrza komórek

	Koprecypitacja solami wapnia	Bezpośrednie wstrzyknięcie	Za pośrednictwem retrowirusów	Lipofekcja
Wydajność wprowadzania genów	niska	wysoka	wysoka	wysoka
Uszkodzenie błony	jest	jest	nie ma	nie ma
Kancerogenność	nie	nie	prawdopodobna	nie
Degradacja wprowadzonego genu do komórki	nie ma	nie ma	nie ma	jest
Powtarzalność metody	mała	duża	duża	duża
Możliwość użycia <i>in vivo</i>	nie	nie	prawdopodobna	prawdopodobna
Koszt	niski	niski	wysoki	wysoki
Transfekcja wielu typów komórek	tak	tak	raczej tak	tak

ten nazywany jest uwolnieniem kontaktowym (ang. *contact release*). Liposomy mogą również ulegać internalizacji w wyniku endocytozy lub fuzji dwóch błon. W fuzji pomagają liczne substancje na przykład DOPE [3]. Aby zwiększyć wnikanie DNA do wnętrza komórek, próbuje się łączyć go z licznymi białkami. Jednym z takich białek jest hemaglutynina HA-2 wirusa grypy [53]. W metodzie tej wykorzystuje się zdolność białka do łączenia się z komórkami i uwalniania z endosomów. W endosomach dochodzi bowiem (jak wspomniano wcześniej) do degradacji materiału podlegającego endocytozie. Można zatem powiedzieć, że jest to konstruowanie sztucznych wirusów.

Wyżej opisane metody wprowadzania genów za pośrednictwem liposomów umożliwiają tylko przejściową ich ekspresję, trwającą od kilku dni do najwyżej kilku miesięcy. Wydaje się zatem, że prace badaczy powinny skupić się na opracowaniu metod pozwalających na trwałe utrzymanie się genów w komórkach. Wtedy bowiem możliwa jest skuteczna korekcja określonego zaburzenia genetycznego.

Z innych metod używanych do transfekcji komórek warto wspomnieć o jeszcze jednej, a mianowicie o wprowadzaniu genów za pośrednictwem receptorów. W metodzie tej sprzęga się gen w postaci wysoce zwiniętego (ang. *supercoiled*) plazmidu z ligandem białkowym za pośrednictwem poli-L-lizyny.

W celu wprowadzenia genów do wątroby jako ligandy wykorzystywano transferynę i asialoglikoproteiny, ponieważ na hepatocytach znajdują się receptory dla tych cząsteczek. W jednym z takich badań wykazano, że po podaniu DNA nie połączonego z żadnym ligandem tylko 17% znalazło się w wątrobie. Gdy połączono DNA z odpowiednim ligandem, aż 85% tak podanego materiału znalazło się w wątrobie. Metoda ma jednak wady. Jedną z nich są losy DNA po internalizacji do wnętrza komórki. Materiał ten dostaje się bowiem do endosomów i po połączeniu z lizosomami ulega degradacji. Aby pokonać tę przeszkodę, ponownie wykorzystano właściwości wirusów, a głównie adenowirusów, które potrafią przerywać funkcje endosomów. W badaniu przeprowadzonym przez D. Curiela i współpracowników w trakcie podawania genów połączonych z transferyną przeprowadzono koinfekcję adenowirusami [56]. W znacznym stopniu usprawniło to transfekcję. Pojawiło się zresztą bardzo wiele

pomysłów na pokonanie tego utrudnienia. Próbowano między innymi sprzągać DNA w postaci plazmidu z przeciwciałem specyficznym w stosunku do białek otoczki adenowirusa [56]. Same białka otoczki mają bowiem zdolność przerywania funkcji endosomów. Utworzonym w ten sposób kompleksem DNA-przeciwciało-adenowirus zakażano komórki, a tym samym omijano kilka przeszkód:

- ograniczoną pojemność wektora adenowirusowego,
- rozkład wprowadzonego materiału przez komórkowe enzymy lizosomalne,
- uniknięcie koinfekcji materiałem zakaźnym, jakim są wirusy.

W innym bardzo podobnym podejściu próbowano połączyć DNA z przeciwciałem – agonistą receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu (*epidermal growth factor* – EGF). Pozwoliło to na naprowadzanie genów do komórek wykazujących zwiększoną ekspresję receptora dla EGF, jak na przykład komórki raka kolczystokomórkowego [7].

PODSUMOWANIE

Dotychczas opracowano bardzo wiele metod wprowadzania genów do komórek. Niektóre z nich są już wykorzystywane w badaniach klinicznych. Można przypuszczać, iż w najbliższym okresie pojawią się nowe metody, a metody tradycyjne zostaną udoskonalone. Terapia genowa może być niezwykle skuteczną bronią w walce nie tylko z wrodzonymi anomaliami genetycznymi, ale również z nabytymi chorobami jak na przykład nowotworowymi. Podjęto też pierwsze próby zastosowania terapii genowej w leczeniu AIDS. Można mieć nadzieję, że zainteresowanie tą nową dziedziną wiedzy już wkrótce zaowocuje doskonałymi rezultatami.

LITERATURA

- [1] BENDER MA, PALMER TD, GELINAS RE, MILLER AD. Evidence that the packaging signal of Moloney murine leukemia virus extends into the gag region. *J Virol* 1987; **6**: 1639–1646.
- [2] BERNS KJ. Parvovirus replication. *Microb Rev* 1990; **54**: 316–329.
- [3] BUGELSKI PJ, GENNARO DE, POSTE G, HOFFSTEIN ST. A new cytochemical method for ultrastructural detection of liposomes in tissues in vivo. *J Histochem Cytochem* 1989; **37**: 843–851.
- [4] CARTER BJ. Adeno-associated virus vectors. *Curr Opin Biotechnol* 1992; **3**: 533–540.
- [5] CHALKER DL, SANDMEYER SB. Ty3 integrates within the region of RNA polymerase III transcription initiation. *Genes Dev* 1992; **6**: 117–128.
- [6] CHELITTA PM, KOHN DB. Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic cells is associated with methylation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 2567–2571.

- [7] CHEN J, GAMON S, TAKAYANAGI A, SHIMIZU N. A novel gene delivery using EGF receptor mediated endocytosis. *FEBS-Lett* 1994; **338**: 167–169.
- [8] CHIRIANI JA, WEITZMAN MD, OWENS RA, URCELAY E, SAFER B, KOTIN RM. Biologically active Rep proteins of adeno-associated virustype 2 produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. *J Virol* 1994; **68**: 797–804.
- [9] CORNETTA K, MOEN RC, CULVER K. Amphotropic murine leukemia retrovirus is not an acute pathogen for primates. *Hum Gene Ther* 1990; **1**: 15–30.
- [10] CRAIGER R. Hotspots and warmspots: integration specificity of retroelements. *Trends in Genet* 1992; **8**: 187–189.
- [11] CROOKS GM, KOHN DB. Growth factors increase amphotropic retrovirus binding to human CD34⁺ bone marrow progenitor cells. *Blood* 1993; **82**: 3290–3297.
- [12] DANOS O, MULLIGAN RC. Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 6460–6464.
- [13] DAVISON AJ, MOSS B. New vaccinia virus recombination plasmids incorporating a synthetic late promoter for high level expression of foreign proteins. *Nucleic Acids Res* 1990; **18**: 4285–4286.
- [14] ELROY-STEIN O, FUERST TR, MOSS B. Cap independent sequence improves the performance of the vaccinia virus/bacteriophage T4 hybrid expression system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 6126–6130.
- [15] FENNER F, WITTEK R, DUMBELL KR. The Orthopoxviruses. Academic Press, San Diego, 1989.
- [16] FERRY N, DUPLESSIS O, HOUSSIN D, HEARD JM. Retroviral mediated gene transfer into hepatocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 8377–8381.
- [17] FUERST TR, EARL PR, MOSS B. Use of a hybrid vaccinia virus - T7RNA polymerase system for the expression of target genes. *Mol Cell Biol* 1987; **83**: 614–618.
- [18] FRICKHOFEN N, ABKOWITZ JL, SAFFORD M, BERRY M, ANTUENEZ-DE-MAYOLO JA, ASTROW R, COHEN JC, HALPERIN I, KING L, MINTZER D. Persistent B19 parvovirus infection in patient infected with human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1): a treatable cause of anemia in AIDS. *Ann Intern Med* 1990; **113**: 926–929.
- [19] HAJIHOSEINI M, IAVACHEV L, PRICE J. Evidence that retroviruses integrate into post-replication host DNA. *EMBO J* 1993; **12**: 4669–4674.
- [20] GRAHAM FL, PREVEC L. Manipulations of adenovirus vectors. W MURRAY EJ, Gene transfer and Expression Protocols. Clifton, NJ: Humana; 1991: 109–127.
- [21] HERMONAT PL. Inhibition of Ha-ras expression by the adeno-associatedvirus Rep78 transformation suppressor gene product. *Cancer Res* 1991; **51**: 3373–3379.
- [22] HERMONAT PL, MUZYCZKA N. Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 6466–6470.
- [23] HRUBY E. Vaccinia virus vectors: new strategies for producing recombinant vaccines. *Clin Microbiol Rev* 1990; **3**: 153–170.
- [24] KALEKO M, GARCIA JW, MILLER AD. Persistent gene expression after retroviral gene transfer into liver cells in vivo. *Hum Gene Ther* 1991; **2**: 27–32.
- [25] KOTIN RM, LINDEN RM, BERNS KI. Characterisation of preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non homologous recombination. *EMBO J* 1993; **11**: 5071–5078.
- [26] KOTIN RM, MENNINGER JC, WARD DC, BERNS KI. Mapping and direct visualisation of a region specific viral DNA integration site on chromosome 19q13-qter. *Genomics* 1991; **9**: 831–834.
- [27] KOTIN RM, SINISCALCO M, SAMULSKI RJ, ZHU X, HUNTER L, LAUGHLIN CA, McLAUGHLIN S, MUZYCZKA N, ROCCHI M, BERNS KI. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 2211–2215.

- [28] KRALL WJ, CHALITTA PM, PARLMUTTER LS, SKELTON DC, KOHN DB. *Blood* 1994 (W druku).
- [29] LASIC DD, MARTIN FJ, GABIZON A, HUANG SK, PAPAHADJOPOULOS D. Sterically stabilized liposomes: a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1070**: 187–192.
- [30] LEE S, AOKI R, OISHI O, AOYAGI H, YAMASAKI N. Effect of amphipathic peptides with different alpha helical contents on liposome fusion. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1103**: 157–162.
- [31] LITZINGER DC, HUANG L. Biodistribution and immunotargetability of ganglioside-stabilized dioleoylphosphatidylethanolamine liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1104**: 179–187.
- [32] LITZINGER DC, HUANG L. Phosphatidylethanolamine liposomes: drug delivery, gene transfer and immunodiagnostic implications. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1113**: 201–227.
- [33] LU L, XIAO M, CLAPP DW, LI ZH, BROXMEYER HE. High efficiency retroviral mediated gene transduction into single isolated immature and replatable CD34⁺ hematopoietic stem/progenitor cells from human umbilical cord blood. *J Exp Med* 1993; **178**: 2089–2095.
- [34] MANNRS, MULLIGAN RC, BALTIMORE D. Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* 1983; **33**: 871–879.
- [35] ILLER DG, MILLER AD. Tunicamycin treatment of CHO cells abrogates multiple blocks to retrovirus infection one of which is due to a secreted inhibitor. *J Virol* 1992; **66**: 78–84.
- [36] MORITZ T, PATEL VP, WILLIAMS DA. Bone marrow extracellular matrix molecules improve gene transfer into human hematopoietic cells via retroviral vectors. *J Clin Invest* 1994; **93**: 1451–1457.
- [37] MULLIGAN RC. The basic science of gene therapy. *Science* 1993; **260**: 926–932.
- [38] MURO-CACHO CA, SAMULSKI RJ, KAPLAN D. Gene transfer in human lymphocytes using a vector based on adeno-associated virus. *J Immunother* 1992; **11**: 231–242.
- [39] MUZYCZKAN. Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992; **158**: 98–113.
- [40] NEHREINI P, WOODY MJ, ZHOU SZ, SRIVASTAVA A. Versatile adeno-associated virus-2 based vectors for constructing recombinant virions. *Gene* 1993; **124**: 257–275.
- [41] NEDA H, WU CH, WU GY. Chemical modification of an ecotropic murine leukemia virus results in redirection of its target cell specificity. *J Biol Chem* 1991; **266**: 14143–14146.
- [42] PONNAZHAGAN S, NALLARI ML, SRIVASTAVA A. Suppression of human: α -globin gene expression mediated by the recombinant adeno-associated virus-2 based antisense vector. *J Exp Med* 1994; **179**: 733–738.
- [43] RETTINGER SD, KENNEDY SC, WU X, SAYLORS LR, HAFFENRICHTER DG, FLYE MW, PONDER KP. Liver directed gene therapy: quantitative evaluation of promoter elements by using in vivo retroviral transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 1460–1464.
- [44] RETTINGER SD, PONDER KP, SAYLORS RL, KENNEDY SC, HAFFENRICHTER DG, FLYE MW. In vivo hepatocyte transduction with retrovirus during in-flow occlusion. *J Surg Res* 1993; **54**: 418–425.
- [45] ROUX P, JEANTEUR P, PIECHACZYK M. A versatile and potentially general approach to the major histocompatibility complex class I and II antigens by mouse ecotropic murine leukemia derived viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **86**: 9079–9083.
- [46] SAMULSKI RJ. Adeno-associated virus: integration at specific chromosomal locus. *Curr Opin Genet Dev* 1993; **3**: 74–90.
- [47] SAMULSKI RJ, CHANG LS, SHENK T. Helper free stocks of recombinant-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J Virol* 1989; **61**: 3822–3828.
- [48] SAMULSKI RJ, ZHU X, XIAO X, BROOK JD, HOUSMANN DE, EPSTEIN H, HUNTER LA. Targeted integration of adeno-associated virus into human chromosome 19. *EMBO J* 1991; **10**: 3941–3950.

- [49] SRIVASTRAVA CH, ZHOU SZ, MUNSHI NC, SRIVASTRAVA A. Parvovirus B19 replication in umbilical cord blood cells. *Virology* 1992; **189**: 456–460.
- [50] STEWART MJ, PLAUTZ GE, BUONO LD, YANG ZY, HUANG L, NABE EG, NABEL GJ. Gene transfer in vivo with DNA-liposome complexes: safety and acute toxicity in mice. *Hum Gene Ther* 1992; **3**: 267–275.
- [51] TRATSCHIN JD, MILLER IL, SMITH MG, CARTER BJ. Adeno-associated virus vector for high frequency integration, expression and rescue of genes in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1985; **5**: 3251–3260.
- [52] TSAO J, CHAPMAN MS, AGBANDJE M, KELLER W, SMITH KW, LUO M, SMITH TJ, ROSSMANN MG, COMPENS RW. The three dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science* 1991; **251**: 1456–1464.
- [53] WAGNER E, PLANK C, ZATLOUKAL C, COTTEN M, BRINSTIEL ML. Influenza virus hemmagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferine-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene transfer vehicle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 7934–7938.
- [54] YU SF, KANTOFF PW. Self inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci* 1986; **86**: 3194–3198.
- [55] ZHOU SZ, COPPER S, KANG LY, RUGGIERI L, HEIMFELD S, SRIVASTRAVA A, BROXMEYER HE. Adeno-associated virus-2 mediated high efficiency gene transfer into immature and mature subsets of hematopoietic progenitor cells in human umbilical cord blood. *J Exp Med* 1994; **179**: 1867–1875.
- [56] CURIEL DT. High efficiency gene transfer employing adenovirus-polylysine-DNA complexes. *Nat Immun* 1994; **13**: 141–164.

Otrzymano: 16.08.1994 r.

Przyjęto: 10.01.1995 r.

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

REAKCJE APARATU FOTOSYNTETYCZNEGO NA STRES OKSYDACYJNY

RESPONSES OF PHOTOSYNTHETIC APPARATUS TO OXIDATIVE STRESS

Agnieszka MOSTOWSKA* Edward A. GWÓZDŹ**

*Zakład Fizjologii Roślin II, Uniwersytet Warszawski; **Zakład Ekofizjologii Roślin Uniwersytetu im. A Mickiewicza w Poznaniu

Streszczenie. W artykule omówiono działanie niektórych czynników środowiskowych indukujących stres oksydacyjny na strukturę i funkcję aparatu fotosyntetycznego. Przedstawiono uszkodzenia spowodowane działaniem aktywnych form tlenu (rodników nadadtlenkowych i hydroksylowych, nadtlenu wodoru oraz tlenu singletowego). Omówiono enzymatyczne i nieenzymatyczne mechanizmy ochronne eliminujące aktywne formy tlenu w chloroplastach. Przedstawiono szczegółowo reakcję aparatu fotosyntetycznego na następujące czynniki: światło o wysokim natężeniu, promieniowanie ultrafioletowe, gazowe skażenia atmosfery (ozon, dwutlenek siarki i tlenki azotu) oraz herbicydy. Uszkodzenia struktury i zaburzenia w funkcji chloroplastów są często podobne i niezależne od pierwotnego czynnika stresowego, a polegają głównie na rozdzieleniu tylakoidów, nadmiernej akumulacji plastoglobul i skrobi, a także destrukcji barwników fotosyntetycznych i zmniejszonej zdolności wiązania CO₂. Przedstawione dane pozwalają stwierdzić, że czynniki indukujące stres oksydacyjny działają niespecyficzenie, a rośliny odporne na jeden z czynników są często także odporne na inne źródła stresu oksydacyjnego. W pracy omówiono próby uzyskania roślin transgenicznych o zwiększonej odporności na stres oksydacyjny.

Słowa kluczowe: aparat fotosyntetyczny, dysmutaza nadadtlenkowa, czynniki stresowe, stres oksydacyjny

Summary. The effect of some environmental factors inducing oxidative stress on structure and function of photosynthetic apparatus is presented. Damage of cell caused by superoxide radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide and singlet oxygen is described. Enzymatic and nonenzymatic defence mechanisms, which detoxify and eliminate reactive oxygen species in chloroplasts are presented. A detailed response of photosynthetic apparatus to the following stress factors: high photon flux density, UV irradiation, air pollutants (ozone, sulfur dioxide, nitrogen oxides), and herbicides is described. Damage in structure and function of chloroplasts are often similar, independent of stressing factor and consist in swelling of thylakoids, intensive plastoglobule and starch accumulation, photodestruction of pigments and inhibition

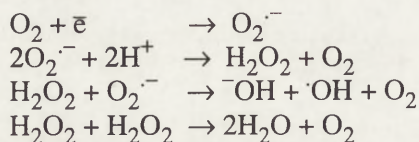
of photosynthesis. Data presented seem to indicate that factors inducing oxidative stress do not act specifically and that plants resistant to one stressing factor are quite often resistant to another oxidative stress inducing factor. Attempts to improve oxidative stress resistance in plants by overproduction of antioxidative enzymes in transgenic plants are described.

Key words: photosynthetic apparatus, oxidative stress, stressing factors, superoxide dismutase

Wykaz skrótów: APX – peroksydaza askorbinianowa, DHAR – reduktaza dehydroaskorbinianowa, GR – reduktaza glutationowa, HSP – białka szoku termicznego, PS I – fotoukład I, PS II – fotoukład II, RuBP – rybulozo-1,5-bisfosforan, SOD – dysmutaza ponadtlenkowa.

WSTĘP

Tlen z jednej strony jest nieodzownym składnikiem życia organizmów tlenowych, z drugiej zaś strony jest źródłem powstawania aktywnych, szkodliwych pochodnych powodujących szereg zaburzeń w procesach fizjologicznych. Zwiększenie w komórce poziomu aktywnych form tlenu określane jest terminem **stresu oksydacyjnego** powodującego uszkodzenia strukturalne i funkcjonalne prowadzące w konsekwencji do śmierci komórki. Tak więc stres oksydacyjny pojawia się wówczas, gdy stężenie aktywnych form tlenu wzrasta w komórce na tyle, że funkcjonujące w komórce mechanizmy ochronne nie są w stanie "zniwelować" toksycznego ich działania i zapobiec szkodliwym zmianom wywołanym przez ten stres. Tlen w stanie podstawowym, jako dwuatomowa cząsteczka, jest mało aktywny. Może jednak pod wpływem różnych czynników przechodzić w znacznie bardziej aktywny stan wzbudzony, w formie wolnych rodników lub ich pochodnych. Do aktywnych biologicznie form tlenu należą: rodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), nadtlenek wodoru (H_2O_2) i rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$) oraz dwuatomowa cząsteczka tlenu w stanie singletowym (1O_2). Droga redukcji tlenu i tworzenie się jego aktywnych form przedstawia się następująco:



Toksyczne działanie aktywnych form tlenu jest powszechnie znane i było przedmiotem licznych badań [49, 50, 71, 73].

Rodnik ponadtlenkowy nie jest tak toksyczny jak inne aktywne formy tlenu. Jest on wytwarzany w wielu przedziałach komórkowych: chloroplastach, mitochondriach, glioksysomach i peroksysomach. W chloroplastach, które są najlepiej poznanym miejscem powstawania $O_2^{\cdot-}$, rodniki ponadtlenkowe tworzą się w trakcie przekazywania elektronów na tlen (z centrum reakcji fotoukładu I - PS I i z ferredoksyny)

zamiast na NADP^+ . Rodnik ponadtlenkowy jest jednym z ogniw reakcji redukcji tlenu prowadzących do wytworzenia nadtlenu wodoru i rodnika hydroksylowego. Toksyczność **nadtlenku wodoru**, głównie ze względu na jego stosunkowo słabą reaktywność, nie jest wysoka. Powstawanie nadtlenu wodoru, który swobodnie penetruje przez błony komórkowe, stwierdzono w mitochondriach, endoplazmatycznym retikulum i chloroplastach. Produkowany jest spontanicznie lub katalitycznie przy współdziałaniu dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). Źródłem nadtlenu wodoru jest także łańcuch transportu elektronów w chloroplastach i mitochondriach oraz procesy oksydacyjne zachodzące w peroksosomach [43].

Rodnik hydroksylowy, jako silny utleniacz, jest bardzo aktywny i reagując z różnymi związkami zawartymi w komórkach, np. enzymami, kwasami nukleinowymi, uszkadza wiele składników komórkowych, powoduje mutacje i metaboliczne dysfunkcje prowadzące do śmierci komórki. Rodniki hydroksylowe powstają głównie w reakcji H_2O_2 z $\text{O}_2^{\cdot-}$ katalizowanej przez jony metali.

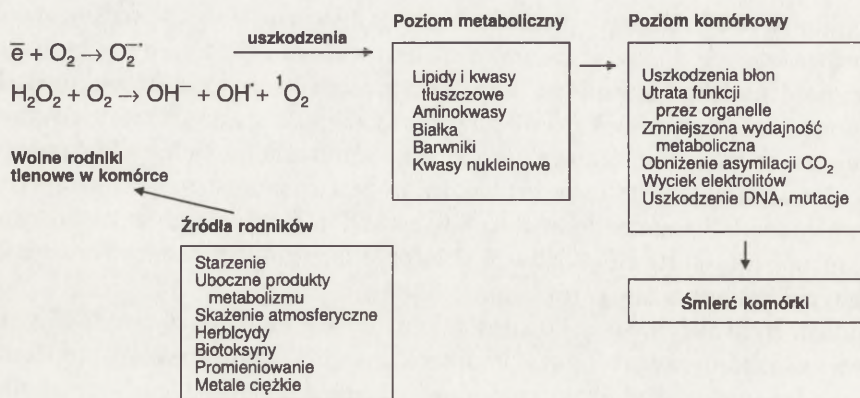
Natomiast **tlen singletowy** wytwarzany jest w wyniku licznych, chemicznych i fotochemicznych reakcji. Ma to miejsce między innymi wówczas, gdy wzbudzone cząsteczki chlorofilu przekazują elektrony na tlen cząsteczkowy. Tlen w stanie singletowym jest silnym utleniaczem i w drodze wieloetapowej, wolnorodnikowej reakcji łańcuchowej powoduje m.in. utlenianie lipoproteinowych składników błon komórkowych. W przypadku uszkodzeń plazmalemy dochodzi do gwałtownego odwodnienia i śmierci komórki.

Wiele czynników środowiskowych, takich jak: skażenia atmosfery (ozon, tlenki i dwutlenki siarki i azotu), promieniowanie UV, jony metali ciężkich, światło o wysokim natężeniu, herbicydy, patogeny czy susza i stres temperaturowy powoduje tworzenie się dużych ilości aktywnych form tlenu. Zwiększony poziom aktywnych form tlenu w komórce jest powszechnym zjawiskiem, co może być konsekwencją działania wielu czynników stresowych, jak i bezpośrednim objawem starzenia się komórek. Rysunek 1 ilustruje czynniki inicjujące stres oksydacyjny oraz dysfunkcje komórkowe spowodowane tym stresem.

W toku ewolucji rośliny wytworzyły szereg systemów obronnych umożliwiających prawidłowe funkcjonowanie w obecności aktywnych form tlenu. Formy te są stale produkowane w różnych przedziałach komórkowych podczas wielu reakcji, również w normalnych, niestresowych warunkach. Mechanizmy zabezpieczające przed ich szkodliwym wpływem funkcjonują w komórkach roślinnych [5].

Taką ochronną rolę przed toksycznym i mutagennym działaniem aktywnych form tlenu pełnią zarówno nieenzymatyczne antyutleniacze, takie jak: barwniki fotosyntetyczne, glutation, askorbinian i tokoferol, jak i enzymatyczne, w tym: dysmutazy, katalazy i peroksydazy.

Wydaje się także, że mechanizmy ochronne przed działaniem różnych stresów są ściśle ze sobą powiązane. Stymulację syntezy białek stresowych pod wpływem silnych utleniaczy, takich jak jony metali ciężkich i jony azotynowe, stwierdzono w



Rys. 1. Czynniki indukujące powstawanie aktywnych form tlenu; uszkodzenia na poziomie metabolicznym i komórkowym spowodowane działaniem aktywnych form tlenu

korzeniach łubinu [68]. W przypadku stresu oksydacyjnego wywołanego różnymi czynnikami środowiska, aktywne formy tlenu indukują również syntezę białek szoku termicznego (HSP) [18]. W tych warunkach HSP zapewniając utrzymanie odpowiedniej konformacji przestrzennej białek ochraniają systemy enzymatyczne i błonowe. Znana jest także rola chloroplastowych HSP w ochronie PS II przed fotoinhibicją w warunkach szoku cieplnego [80]. Rola HSP w komórkach roślinnych została ostatnio szczegółowo przedstawiona w artykule przeglądowym dotyczącym tego zagadnienia [66].

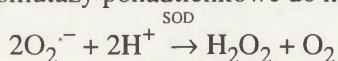
Szkodliwe działanie różnych czynników środowiskowych prowadzących do stresu oksydacyjnego jest zagadnieniem bardzo obszernym podejmowanym przez wielu autorów. Szereg prac poświęcono także mechanizmom ochronnym przed różnego rodzaju stresami indukującym powstawanie aktywnych form tlenu [5, 11, 26, 43, 75, 94].

W tym artykule chcielibyśmy skoncentrować się na oddziaływaniu stresu oksydacyjnego na aparat fotosyntetyczny, który jest jednym z elementów strukturalno-funkcjonalnych komórki roślinnej. Chloroplasty są bowiem organellami najszybciej reagującymi na stres oksydacyjny np. przy ograniczeniu dostępu CO₂ do chloroplastów. W normalnych warunkach część tlenu wydzielanego w procesie fotosyntezy wiązana jest w trakcie fotooddychania przez karboksylazę/oksygenazę rybulozobisfosforanu (RuBP) i w procesie redukcji w łańcuchu transportu elektronów w chloroplastach (reakcja Mehlera) [29]. Chloroplasty są więc największym źródłem utleniaczy w komórce, a zarazem miejscem funkcjonowania różnych mechanizmów eliminujących aktywne formy tlenu [25, 26]. Wysokie stężenie tlenu w chloroplastach, a zwłaszcza wewnątrz tylakoidów sprzyja powstawaniu tlenu singletowego i rodników ponadtlenkowych [34], co może przyczynić się do zahamowania zarówno wiązania CO₂ przez karboksylazę RuBP, jak i rozwoju chloroplastów [99].

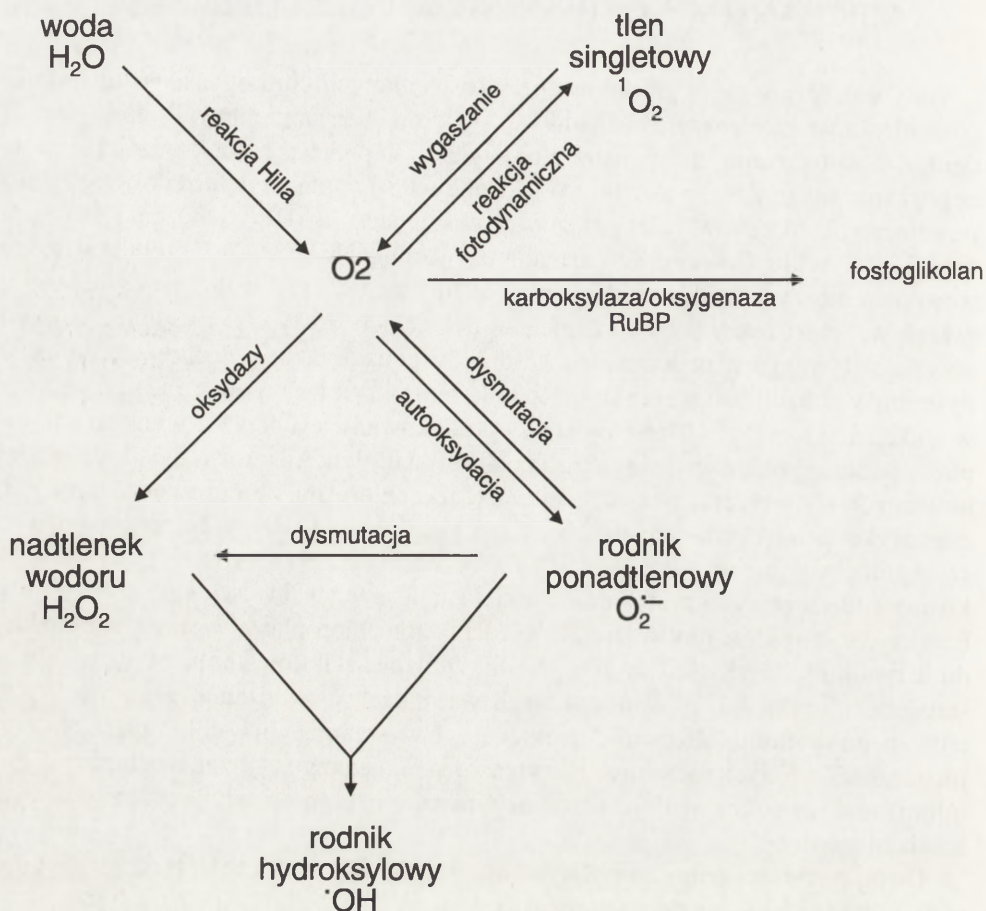
MECHANIZMY OCHRONNE W CHLOROPLASTACH

Aktywne formy tlenu produkowane w oświetlanych chloroplastach to: rodniki ponadtlenkowe i hydroksylowe, nadtlenek wodoru i tlen singletowy. Rodniki ponadtlenkowe wytwarzane są wewnątrz błony tylakoidu podczas autooksydacji pierwotnego, związanego z błoną akceptora elektronów PS I i utleniania ferredoksyny. Ilość powstających rodników zależy od ilości dostępnego NADP^+ , natężenia światła i wydajności cyklu Calvina. W normalnych warunkach 96% O_2^- produkowanego wewnątrz błon tylakoidów jest ponownie utleniana do O_2 w drodze cyklicznego przepływu elektronów lub spontanicznej dysmutacji do H_2O_2 . Nadtlenek wodoru powstaje głównie w reakcji utleniania rodników ponadtlenkowych przy współdziałaniu dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). Rodniki hydroksylowe wytwarzane są natomiast w reakcji H_2O_2 z O_2^- . Tlen singletowy produkowany jest przez oświetlane chloroplasty podczas przekazywania energii z chlorofilu na tlen. Absorbpcja światła prowadzi bowiem do wytworzenia wzbudzonej cząsteczki chlorofilu, która wzbudza następnie cząsteczkę tlenu i powstaje tlen w stanie singletowym. Błony chloroplastowe są szczególnie podatne na peroksydację lipidów indukowaną przez O_2^- , gdyż ok. 90% kwasów tłuszczowych tylakoidów zawiera nienasycony kwas α -linolenowy [34]. Peroksydacja lipidów prowadzi do uszkodzeń błon chloroplastowych, a także rozkładu barwników i dysfunkcji tych organelli. Główne szlaki metabolizmu tlenu przedstawiono na rysunku 2. W normalnych warunkach uszkodzenia aparatu fotosyntetycznego są zminimalizowane dzięki szeregowi występującym w chloroplastach "wymiataczom" wolnych rodników. Enzymatyczne i nieenzymatyczne mechanizmy eliminują reaktywne formy tlenu chroniąc tym samym chloroplasty przed szkodliwym ich działaniem.

Do tej pierwszej grupy należą **dysmutazy ponadtlenkowe (SOD)**, które utleniają rodniki ponadtlenkowe do nadtlenku wodoru. W chloroplastach różnych gatunków występują trzy typy SOD: Fe-SOD, Cu,Zn-SOD i Mn-SOD. Liczba izoenzymów każdego z tych typów SOD jest różna u różnych gatunków roślin i zlokalizowane są one w różnych przedziałach komórkowych. Chloroplastowe i cytozolowe formy Cu,Zn-SOD prawdopodobnie stały się oddzielnymi izoenzymami we wczesnych stadiach ewolucji tego enzymu [42]. Poszczególne formy SOD u różnych gatunków zlokalizowane są w różnych miejscach w obrębie chloroplastów. Na przykład chloroplastowy typ izoenzymu Cu,Zn-SOD u szpinaku zlokalizowany jest w stromie i w przestrzeni wewnątrztylakoidowej, a Mn-SOD związana jest z błonami tylakoidów [38]. Rodniki ponadtlenkowe, utleniane są w oświetlanych chloroplastach przez dysmutazy ponadtlenkowe do nadtlenku wodoru i tlenu:



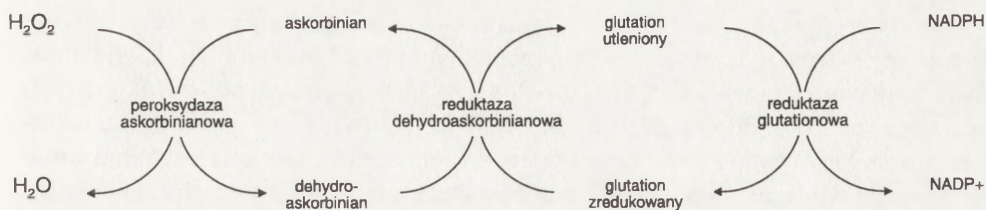
Peroksydaza askorbinianowa (APX), **reduktaza glutationowa (GR)**, zależna od NADPH i **reduktaza dehydroaskorbinianowa (DHAR)** są enzymami, które na



Rys. 2 Metabolizm tlenu w chloroplastach

terenie chloroplastu usuwają H_2O_2 według szlaku Halliwella-Asady [11] (rys. 3). SOD, uczestnicząca w tworzeniu H_2O_2 jest więc bezpośrednio związana z tym mechanizmem. Wiadomo, że w chloroplastach szpinaku $O_2^{\cdot-}$ produkowany wewnątrz błon tylakoidów utleniany jest przez Cu,Zn-SOD do O_2 i H_2O_2 , natomiast H_2O_2 redukowany jest dopiero na terenie stromy przez APX [38]. Występowanie SOD wewnątrz tylakoidów (w lumen), a brak w tym miejscu peroksydazy świadczy o tym, jak istotne jest pozbycie się $O_2^{\cdot-}$ bezpośrednio w miejscu, gdzie jest on tworzony. Rola Mn-SOD związanej z błonami tylakoidów chloroplastów szpinaku nie jest jeszcze poznana [38].

Do nieenzymatycznych antyutleniaczy chloroplastowych należy α -**tokoferol**, syntetyzowany w chloroplastach, występujący w dużych ilościach w membranach tylakoidów i blokujący łańcuchową reakcję utleniania lipidów. Do związków chroniących



Rys. 3. Łańcuch reakcji antyoksydacyjnych w chloroplastach (Szlak Halliwella-Asady) [11]

przed stresem oksydacyjnym w chloroplastach należą także **karotenoidy**, również syntetyzowane w chloroplastach, będące składnikami błon tylakoidów, niekowalencyjnie związane z białkami błon w fotosystemie I i II. Ich ochronna rola w chloroplastach polega zarówno na "wygaszaniu" chlorofilu w tripletowym stanie wzbudzonym, jak i na reakcji z już utworzonym, singletowym tlenem [34]. **Ksantofile** umożliwiają rozproszenie nadmiaru energii w cyklu ksantofilowym (deepoksydacji wiolaksantyny) [17]. **Askorbinian** zlokalizowany jest głównie w stromie chloroplastowej. Jest on substratem w szlaku Halliwella-Asady, gdyż reaguje z rodnikami ponadtlenkowymi oraz uczestniczy w deepoksydacji wiolaksantyny. **Glutation** bierze udział w regeneracji askorbinianu z dehydroaskorbinianu; jest więc również jednym z ogniw szlaku detoksyfikującego. Związek ten reaguje także z tlenem singletowym i rodnikami hydroksylowymi oraz ochrania grupy tiolowe enzymów [26].

W normalnych warunkach, dzięki opisanym mechanizmom ochronnym chloroplasty są przystosowane do zminimalizowania potencjalnych uszkodzeń wynikających z nieprawidłowego przekazywania energii. Jednakże zakłócenia w transporcie elektronów mogą spowodować przeniesienie elektronów na tlen generując powstanie zbyt dużej ilości reaktywnych form tlenu. Jeśli funkcjonujące w chloroplastach mechanizmy ochronne nie "wygaszą" toksycznych form tlenu wystąpi stres oksydacyjny.

CZYNNIKI INDUKUJĄCE STRES OKSYDACYJNY

W rozdziale tym prezentujemy oddziaływanie niektórych czynników indukujących stres oksydacyjny na aparat fotosyntetyczny. Liczba czynników, szczególnie tych związanych z działalnością człowieka, jest o wiele większa i nie sposób omówić ich działania w jednej pracy.

ŚWIATŁO O WYSOKIM NATEŻENIU

Jeżeli energia zaabsorbowanego światła przewyższy określony próg, to obserwuje się znaczny wzrost przepływu elektronów na tlen i proces fotoinhibicji, czyli hamowania fotosyntezy przez światło [67]. Wytwarza się wówczas duża ilość aktywnych form tlenu, co może doprowadzić do fotooksydacji barwników i uszkodzenia membran chloroplastowych. Pierwszym efektem działania silnego światła jest hamowanie transportu elektronów na poziomie drugiego akceptora chinonowego fotoukładu II, Q_B . Przypuszcza się, że silne światło powoduje znaczną redukcję puli plastochinonu, co stymuluje akumulację rodników chinonowych, które następnie ulegają autooksydacji w obecności tlenu z wytworzeniem anionu ponadtlenkowego. Wzrost stężenia rodnika ponadtlenkowego indukuje reakcje wtórne, w których powstają rodniki hydroksylowe. Te aktywne formy tlenu są prawdopodobnie odpowiedzialne za uszkodzenie białka D1 centrum reakcji PS II i w konsekwencji za jego degradację. Proces inaktywacji PS II, przemiany białka D1 oraz mechanizmy ochronne odpowiedzialne za funkcjonowanie PS II w warunkach fotoinhibicji zostały niedawno opisane w pracy przeglądowej przez Aro i współpracowników [3]. Uszkodzenia PS I zależą głównie od przepływu elektronów z PS II i związane są z tworzeniem rodników ponadtlenkowych przy przekazywaniu elektronów z ferredoksyny na tlen. Z drugiej jednak strony wysokie tempo przemian białka D1 (degradacja i resynteza) zmniejsza efekty fotoinhibicji [78, 90], co w dużej mierze umożliwia funkcjonowanie PS II [4]. Jednakże w warunkach szczególnie wysokiego natężenia światła proces degradacji białka D1 jest szybszy niż jego resynteza [7]. Czynnikiem ograniczającym przemiany białka D1 u mchu *Ceratodon purpureus* jest jego synteza [70]. Zjawisko fotoinhibicji występuje także wówczas, gdy oświetlaniu światłem o natężeniu nie powodującym stresu oksydacyjnego towarzyszy działanie innego czynnika stresowego, np. wysokiej lub niskiej temperatury. Fotooksydacja w warunkach niskiej temperatury spowodowała zmiany w strukturze chloroplastów grochu i ogórka, głównie nabrzmienia i uszkodzenia tylakoidów oraz znaczne obniżenie aktywności fotosyntetycznej [96]. Czynnikiem powodującym wystąpienie stresu oksydacyjnego jest tu rodnik ponadtlenkowy wytwarzany w reakcji Mehlera. Aktywności SOD i APX znacznie wzrastały w czasie ekspozycji na silne światło siewek pszenicy i wykazywały korelację z tempem tworzenia się aktywnych form tlenu. Natomiast aktywność katalazy zmniejszała się w miarę oświetlania silnym światłem, co autorzy tłumaczą fotolabilnością enzymu [57].

Fotoinhibicji u poddanego niskiej temperaturze szpinaku towarzyszył wzrost aktywności SOD i wzrost poziomu enzymów szlaku Halliwella-Asady w chloroplastach [79]. W podobnych warunkach Tsang i wsp. [89] stwierdzili wzrost poziomu mRNA jedynie chloroplastowej Fe-SOD. Aklimatyzacja szpinaku do niskiej temperatury spowodowała wzrost aktywności SOD, APX i reduktazy monodehydroaskorbinianowej w chloroplastach, a także wzrost poziomu ksantofili [79]. Wykazano

więc tym samym ochronną rolę tych enzymów i barwników przed aktywnymi formami tlenu w warunkach fotoinhibicji.

PROMIENIOWANIE ULTRAFIOLETOWE

Promieniowanie ultrafioletowe, którego natężenie w otaczającej nas atmosferze zależy od pory dnia i położenia geograficznego, działa niszcząco na organizmy powodując fotochemiczne uszkodzenia. Wiele jest danych dotyczących szkodliwego działania UV, zwłaszcza UV B (280–320 nm) na szereg procesów fizjologicznych i biorących w nich udział enzymów, białek, lipidów, chlorofilu oraz na rozwartość aparatów szparkowych, redukcję powierzchni liści i w końcu na strukturę tkanek [13, 48]. Uszkodzenie spowodowane jest sekwencją kolejnych zdarzeń: absorpcją energii światła UV przez cząsteczkę odpowiedniego fotoreceptora, wzbudzenie tej cząstki ze stanu podstawowego do albo krótkotrwałego stanu singletowego lub do wzbudzonego stanu tripletonowego o dłuższym okresie trwałości. Przekazanie energii na tlen cząsteczkowy powoduje następnie wytworzenie singletowego tlenu ($^1\text{O}_2$). Ta aktywna forma tlenu atakuje niektóre aminokwasy, bądź nienasycone kwasy tłuszczowe tworząc w wyniku takiej reakcji nadtlenki wodoru. Wynikiem utleniania kwasów tłuszczowych są uszkodzenia błon cytoplazmatycznych [48].

Wydaje się jednak, że zahamowanie fotosyntezy jest jedną z pierwszych odpowiedzi aparatu fotosyntetycznego na zwiększenie natężenia UV i nie jest następstwem uszkodzeń błon tylakoidów. Ostatnie doniesienia również wskazują, że już 15% wzrost natężenia UV w stosunku do obecnie występującego w atmosferze powoduje silne zahamowanie fotosyntezy i redukcję zawartości chlorofilu w siewkach fasoli [16].

Pierwotne miejsce działania UV na terenie chloroplastów nie jest dotąd znane. Ostatnio wykazano, że promieniowanie UV-B indukuje degradację obu białek (D1 i D2) centrum reakcji PS II [27]. Obserwowano również destrukcję plastochinonu, zahamowanie transportu elektronów w obrębie PS II, zniszczenie membran tylakoidów oraz fotodestrukcję barwników [13]. Takie zmiany w ultrastrukturze chloroplastów spowodowane UV, jak nabrzmienia błon tylakoidów prowadzące ostatecznie do zniszczenia ich struktury, uszkodzenia błon otoczki chloroplastowej i nadmierna akumulacja skrobi [39], są podobne do zmian zachodzących podczas starzenia się chloroplastów [13].

Chociaż zmiany destrukcyjne spowodowane działaniem światła o wysokim natężeniu i promieniowaniem UV są podobne, jednak kinetyka tych procesów jest inna. Efekt krótkiego naświetlania UV obserwowany jest często dopiero po wielu godzinach, gdyż uszkodzenia aparatu fotosyntetycznego mają charakter kumulatywny. Zmniejszenie fotosyntezy jest również funkcją całkowitej dawki UV otrzymanej przez roślinę [14].

GAZOWE SKAŻENIA ATMOSFERY

Do gazowych zanieczyszczeń powietrza, których działanie wywołuje w roślinie stres oksydacyjny, zaliczyć można: ozon, tlenki i dwutlenki siarki i azotu. Związki te są przedmiotem licznych badań, gdyż powodują niszczenie lasów w Europie i USA od około dwudziestu lat. Różnorodność wyników tych badań spowodowana jest przeprowadzaniem doświadczeń bądź w warunkach naturalnych w środowisku zanieczyszczonym, gdzie trudno wyeliminować działanie innych stresów, bądź w fitotronowych komorach hodowlanych, w których można kontrolować warunki doświadczalne. W przypadku wszystkich gazowych zanieczyszczeń powietrza toksyczny efekt zależy od stężenia gazu i czasu działania [6].

OZON

Ozon jest jednym z trzech gazów, obok dwutlenku węgla i tlenków azotu zanieczyszczających w największym stopniu atmosferę. O ile występowanie ozonu w ochronnej strefie kilkudziesięciu kilometrów nad Ziemią jest korzystne, o tyle jego obecność w niższych warstwach atmosfery jest wybitnie szkodliwa. Stężenie ozonu w dużych miastach dochodzi do 0,3 ppm, natomiast stężenia stosowane w doświadczeniach wahają się od 0,05 do 1,0 ppm. Roślina pobiera ozon przez aparaty szparkowe; stężenie tego gazu w przestrzeniach wewnątrzkomórkowych jest jednak niższe niż w atmosferze zewnętrznej [34]. Ozon powoduje bowiem zamykanie się aparatów szparkowych. Ponad to odbywa się szybki jego rozpad w ścianach komórkowych i plazmalemmie [47]. Toksyczność ozonu spowodowana jest tym, że podczas jego rozpadu w wodzie powstają duże ilości jonów hydroksylowych, nadtlenków i wolnych rodników nadtlenkowych. Następstwem pojawienia się tych aktywnych form tlenu jest oksydacja nienasyconych kwasów tłuszczowych, sulfhydrylowych grup białek, co powoduje uszkodzenie błon komórkowych i zmianę ich przepuszczalności [97]. Wywołane ozonem zmiany w ultrastrukturze chloroplastów, jakie obserwowano w igłach świerka [23, 76], liściach rzodkiewki [59] i u dwóch gatunków porostów [24] polegają głównie na zwiększonej akumulacji plastoglobul i skrobi oraz rozděciu tylakoidów; gaz ten nie ma natomiast wpływu na łączenie się tylakoidów w grana. Niskie stężenia ozonu wydają się uszkadzać strukturalne lipidy tylakoidów, uwolnione zostają następnie reszty acylowe tych lipidów i zrekonstruowane w formie triacylogliceroli kumulujących się w plastoglobulach [59]. W normalnych warunkach plastoglobule są bardzo ciemne, elektronowo gęste ze względu na ich silne powinowactwo do osmu, który wiąże się niemal wyłącznie z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi.

Często obserwowana zmiana barwy plastoglobul z ciemnej na jasną, pod wpływem działania ozonu, spowodowana jest peroksydacją nienasyconych lipidów i wzrostem grup acylowych w plastoglobulach, co prowadzi do utraty ich powinowactwa do osmu. Innym objawem działania ozonu jest zwiększona akumulacja skrobi, co wskazuje na zakłócenie transportu przez otoczkę chloroplastową produktów hydrolizy

skrobi, zahamowanie hydrolizy skrobi albo na zakłócenie w transporcie przez floem [76]. Skutki działania ozonu pojawiają się często z dużym opóźnieniem. Na przykład zmiany w strukturze tylakoidów w igłach świerka, poddanego działaniu ozonu o stężeniu do 1,0 ppm (jest to wyjątkowo wysokie stężenie nie stosowane w żadnych innych pracach) przez 3 tygodnie, pojawiły się dopiero 9 miesięcy później [76]. Stąd efekt działania ozonu nazywany jest często "memory effect". Zmiany w ultrastrukturze pod wpływem ozonu przypominają proces starzenia się chloroplastów w naturalnych warunkach [24, 59]. Rośliny poddane stresowi chłodu, suszy lub innym czynnikom oddziałującym na roślinę pośrednio poprzez tworzenie się etylenu, wzmagają ich wrażliwość na ozon [56]. Indukowane ozonem zmiany ultrastrukturalne skorelowane są z obniżeniem aktywności fotosyntetycznej, co stwierdzono zarówno u soi [83], jak i świerka [28]. U topoli [31] obniżeniu fotosyntezy towarzyszył wzrost poziomu glutationu i SOD. U porostów, w przeciwieństwie do roślin wyższych, ozon wykazuje silniejsze toksyczne oddziaływanie na strukturę i funkcję chloroplastów niż dwutlenek siarki. Podobnie jednak jak w przypadku roślin wyższych wrażliwość na ozon zależy od gatunku [24], a także od warunków oświetlenia [88]. Destrukcja barwników karotenoidowych i chlorofilu *a* spowodowana jest głównie toksycznym działaniem rodnika ponadtlenkowego [72]. Jest ona prawdopodobnie konsekwencją dezintegracji błon tylakoidów; wiadomo bowiem, że barwniki związane z błonami tylakoidów są stabilne, podczas gdy wolne, niezwiązane z błonami są narażone na fotooksydację. Tak więc destrukcja barwników powodowana jest nie tyle reakcją z ozonem, lecz jest następstwem uszkodzenia błon tylakoidów wywołanego przez stres oksydacyjny [72]. Według Volina i wsp. [95] stres oksydacyjny wpływa także na aktywność karboksylazy RuBP.

Ozon stymuluje aktywności niektórych enzymów antyoksydacyjnych chloroplastów np. APX u grochu i fasoli mung [56] oraz GR i APX w liściach pszenicy [10]. Według Karpińskiego [43] istnieje korelacja między stopniem odporności na ozon i inne gazowe zanieczyszczenia powietrza, a aktywnością SOD. Ozon w stężeniu do 0,3 ppm indukował ekspresję genów kodujących cytozolowe Cu/Zn SOD u *Arabidopsis thaliana* [82]. Nie zawsze jednak aktywność tego enzymu wzrastała pod wpływem ozonu [6]. Na przykład zwiększoną aktywność SOD i GX obserwowano u topoli [31], nie stwierdzono jednak wpływu tego gazu na aktywność SOD u soi [83] i kukurydzy [55, 65], a u świerka aktywność Cu/Zn-SOD nawet uległa zmniejszeniu [36]. Zatem SOD nie zawsze stanowi wystarczającą ochronę przed stresem oksydacyjnym wywołanym działaniem ozonu [65]. Trzeba bowiem pamiętać, że zwiększona aktywność tego enzymu powoduje wzrost poziomu H_2O_2 , którego nadmiar jest szkodliwy [43]. Ozon w stężeniu 0,1 ppm również stymulował wzrost zawartości innych antyutleniaczy (α -tokoferolu i askorbinianu) w igłach świerka rosnącego w naturalnym środowisku [77].

DWUTLENEK SIARKI (SO₂)

Dwutlenek siarki jest jednym z głównych gazowych czynników powodujących zanieczyszczenie środowiska. Uszkodzenia w komórkach roślinnych spowodowane działaniem dwutlenku siarki generowane są przez tworzące się jony siarczynowe, rodniki hydroksylowe i ponadtlenkowe. W chloroplastach utlenianie SO₂ inicjowane jest przez O₂⁻ [5]. W chloroplastach szpinaku SO₂ stymulował akumulację H₂O₂, co powodowało inaktywację enzymów fotosyntetycznych, degradację chlorofilu i peroksydację lipidów błon tylakoidów [85, 86]. Wydaje się jednak, że zakłócenie funkcji PS II i zmniejszenie aktywności fotosyntetycznej nie jest następstwem peroksydacji lipidów błon w liściach fasoli traktowanej SO₂, ale wynikiem oddziaływania bezpośrednio na niektóre komponenty PS II [15]. Zmiany w ultrastrukturze chloroplastów igieł sosny [30] i świerka [76], podobnie jak w przypadku działania ozonu, polegały na rozdęciu błon tylakoidów, zwiększeniu się przestrzeni wewnątrztylakoidowej, pojawieniu się dużej liczby plastoglobul (większych niż w chloroplastach kontrolnych i elektronowo przejrzystych). Obserwowano też na terenie cytoplazmy podstawy wejścia ciała lipidowe pochodzące prawdopodobnie z chloroplastów. Podobne zmiany stwierdzono u dwóch gatunków porostów [24], przy czym stopień wrażliwości różnych gatunków porostów na dwutlenek siarki zależy od ich zdolności do utleniania siarczynów [58]. Dwutlenek siarki, w większym stopniu niż ozon hamuje fotosyntezę, co związane jest prawdopodobnie z bardziej toksycznym, w porównaniu z ozonem, działaniem tego gazu na błony tylakoidów [76].

Działanie SO₂ na aktywność fotosyntetyczną porostów, podobnie jak na strukturę chloroplastów jest mniej szkodliwe niż działanie ozonu [24]. Trudno jednak porównywać wyniki doświadczeń przeprowadzanych na różnych obiektach i z użyciem różnych stężeń tych gazów. Podobnie jak w przypadku ozonu działanie SO₂ indukowało wzrost aktywności SOD w liściach topoli [84] i tytoniu [87], a nie obserwowano zmian w aktywności SOD u kukurydzy [55]. Nie stwierdzono również zmian w aktywnościach APX i GR u tytoniu [87]. Natomiast groch odporny na działanie dwutlenku siarki był także mniej wrażliwy na traktowanie herbicydami indukującymi stres oksydacyjny i odporność ta skorelowana była ze wzrostem aktywności GR i SOD oraz zawartością glutationu [52, 53]. Tak więc podobnie jak w przypadku ozonu, działanie dwutlenku siarki nie powoduje jednoznacznej reakcji ze strony enzymów antyoksydacyjnych.

TLENKI AZOTU (NO_x)

Najmniej danych opublikowano na temat działania tlenków azotu. Tlenki azotu same inicjują wolnorodnikowe reakcje w komórce. Wysokie stężenie tlenków azotu powoduje peroksydację kwasów tłuszczowych i w wyniku łańcuchowej reakcji uszkodzenie błon [6]. Podobnie jak w przypadku innych omawianych gazów, dwutlenek azotu powoduje uszkodzenia w strukturze i funkcji chloroplastów w igłach świerka

[76]: liczba ziaren skrobi jest zwiększona, a tylakoidy rozdęte. Istnieje wyraźna korelacja pomiędzy czasem trwania ekspozycji na NO_2 i stopniem uszkodzeń. Najbardziej aktywny i tym samym najbardziej szkodliwy jest tlenek azotu (NO), którego wyjątkowa toksyczność spowodowana jest prawdopodobnie jego reakcją z ferredoksyną. NO może reagować także z enzymami zawierającymi miedź, np. oksydazą cytochromu c [6]. Działanie tlenków azotu, w większym stopniu niż działanie ozonu, wydaje się być uzależnione od czasu ekspozycji i stężenia tego gazu [6].

Jakkolwiek toksyczność poszczególnych gazów zanieczyszczających atmosferę i indukujących stres oksydacyjny często badana jest oddzielnie, jednak w warunkach naturalnych trudno wnioskować o działaniu tylko jednego z tych czynników. Na przykład niszczenie lasów spowodowane jest wypadkową działania kilku szkodliwych gazów, a także działaniem patogenów, zmianami klimatycznymi itp. Z drugiej zaś strony wyniki badań przeprowadzone w laboratoriach stanowią ogromną większość i trudno je ekstrapolować na warunki naturalne. Na przykład w naturalnym środowisku starsze igły drzew są bardziej wrażliwe na uszkodzenia, natomiast w warunkach laboratoryjnych – najmłodsze [30].

Na zakończenie można stwierdzić, że gazowe skażenia atmosfery wywołują szereg podobnych, a więc niespecyficznych zmian w strukturze chloroplastów, które pod wieloma względami przypominają zmiany obserwowane w starzejących się chloroplastach. Stosowanie mieszaniny gazów w niskich dawkach i przez krótki okres nie daje tak silnych efektów toksycznych, jak dłuższa ekspozycja na działanie pojedynczego gazu o wyższym stężeniu [76].

O ile zmiany cytologiczne zachodzące w roślinach pod wpływem różnych gazów są na ogół podobne, o tyle zmiany w zawartości barwników i aktywności fotosyntetycznej są zwykle silniejsze w roślinach traktowanych dwutlenkiem siarki niż ozonem [76]. Wyniki dotyczące rozmiaru toksycznego działania ozonu są najbardziej kontrowersyjne zapewne dlatego, że skutki działania tego gazu obserwuje się po kilku tygodniach, czy miesiącach.

HERBICYDY

Herbicydy mogą w różny sposób oddziaływać na aparat fotosyntetyczny. Grupa herbicydów, do której należy atrazyna, diuron i ioksynil, blokuje transport elektronów w określonych miejscach, co prowadzi do redukcji niewłaściwych akceptorów i powstawanie aktywnych form tlenu wewnątrz chloroplastów. W konsekwencji prowadzi to do zablokowania syntezy ATP, wiązania CO_2 oraz destrukcji barwników, a peroksydacja lipidów błon wydaje się być późniejszym procesem [34].

Inną grupę herbicydów stanowią herbicydy fotodynamiczne. Stymulują one akumulację związków tetrapyrrolowych w ciemności, a po ekspozycji na światło indukują uszkodzenia roślin. Należą do nich związki blokujące na różnych etapach syntezę chlorofilu. Do tej grupy można zaliczyć etery difenylowe, które blokują działanie

oksydazy protoporfirynogenu, co prowadzi do znacznej akumulacji protoporfiryny IX [9, 21, 22], oraz także herbicydy, takie jak: 1.10-fenantrolinę i 2.2-dipirydył, które prawdopodobnie blokują estryfikację chlorofilidu [45, 62].

Mechanizm toksycznego działania tych związków jest następujący: nagromadzone związki tetrapiolowe są aktywowane przez światło, co stymuluje powstawanie singletowego tlenu, który z kolei utlenia lipoproteinowe składniki błon komórkowych i odpowiedzialny jest za peroksydację lipidów błon tylakoidów [20, 21, 22, 62, 69]. Różnicujące się chloroplasty grochu poddane działaniu tych herbicydów nie tworzą gran i mają znacznie obniżony poziom chlorofilu [60], a po traktowaniu dojrzałych chloroplastów herbicydami fotodynamicznymi błony tylakoidów ulegają "rozdeciu", a otoczka chloroplastowa zostaje uszkodzona [61]. Herbicydy te działają chelatująco, z czym związana jest depolaryzacja membran i zmiana przepuszczalności błon oraz uczestniczą one w procesach fotooksydacyjnych.

Kolejną grupą herbicydów uszkadzających aparat fotosyntetyczny są związki generujące wolne rodniki wewnątrz chloroplastów. Jednym z nich jest parakwat, który dodany do naświetlanych chloroplastów uczestniczy w przekazywaniu elektronów z PS I na tlen cząsteczkowy, co prowadzi do powstawania $O_2^{\cdot-}$. Powstawanie $O_2^{\cdot-}$ prowadzi bezpośrednio lub pośrednio poprzez $^{\cdot}OH$ lub 1O_2 , do peroksydacji lipidów i dalej do śmierci komórki [49]. Opisane są w literaturze efekty działania parakwatu na ekspresję genu SOD i aktywność tego enzymu [11]. Parakwat indukował ekspresję genu SOD u tytoniu [89]. Jansen i wsp. [41] oraz Amsellem i wsp. [1] stwierdzili, że *Conyza bonariensis* odporna na działanie parakwatu, ma wysoki, konstytutywny poziom enzymów szlaku Halliwell-Asady w chloroplastach: CuZn-SOD, APX i GR; dzięki temu roślina ta jest odporna na zwiększone natężenie światła. U innych gatunków podwyższony poziom enzymów detoksyfikujących aktywne formy tlenu skorelowany był również z odpornością tych roślin na działanie herbicydów fotooksydacyjnych, SO_2 i ozonu [81]. Wyniki te potwierdzają przypuszczenie, że rośliny odporne na działanie jednego czynnika indukującego oksydację mogą być także odporne na stres oksydacyjny pochodzący z innego źródła.

Często jednak wzrost odporności na działanie parakwatu lub innego czynnika oksydacyjnego spowodowany wzrostem aktywności SOD jest krótkotrwały i po dłuższym działaniu dochodzi do peroksydacji lipidów. Związane jest to prawdopodobnie z niedostateczną zdolnością do detoksyfikacji nadmiernych ilości H_2O_2 [56].

Na wstępie rozdziału zaznaczyliśmy, że będziemy prezentować działanie tylko niektórych czynników środowiskowych indukujących stres oksydacyjny. Inne czynniki, takie jak: metale ciężkie, wysoka i niska temperatura mogą także indukować ten stres. Reakcja aparatu fotosyntetycznego na działanie jonów metali ciężkich została szczegółowo przedstawiona w licznych pracach [8, 19, 46, 51, 98]. Oddziaływanie wysokiej temperatury na strukturę i funkcję aparatu fotosyntetycznego opisano między innymi w pracach [12, 35, 37, 92, 93], a niskiej temperatury w artykułach [40, 63, 64].

BIOTECHNOLOGICZNE ASPEKTY ODPORNOŚCI NA STRES OKSYDACYJNY

Enzymy antyoksydacyjne zlokalizowane w chloroplastach spełniają bardzo ważną funkcję w ochronie aparatu fotosyntetycznego i całych roślin przed skutkami stresu oksydacyjnego. Główną rolę w obronnej reakcji roślin na stres oksydacyjny odgrywa SOD. Jak wynika z wcześniej przytoczonych przez nas danych, synteza SOD jest indukowana m.in. przez gazowe zanieczyszczenia powietrza, wysokie natężenie światła i herbicydy. Nie zawsze jednak występuje prosta korelacja między wzrostem aktywności SOD i zwiększeniem się odporności na stres oksydacyjny. Również różne izoenzymy w odmienny sposób reagują na stres oksydacyjny [54, 74]. Wynika to prawdopodobnie ze zróżnicowanego mechanizmu regulacji ekspresji genów jądrowych kodujących dysmutazy cytozolowe i plastydowe. Przypuszcza się, że w regulację tę zaangażowany jest system transdukcji sygnałów i czynnik plastydowy [44].

Wprawdzie mechanizm regulacji ekspresji genów SOD pozostaje jeszcze niewyjaśniony, lecz pewnym krokiem naprzód w tej dziedzinie są wyniki badań z zastosowaniem roślin transgenicznych.

Postawiono pytanie, czy zwiększenie ekspresji genów kodujących enzymy antyoksydacyjne zwiększy odporność roślin transgenicznych na stres oksydacyjny? W przypadku kilku gatunków roślin, w wyniku wprowadzenia dodatkowych kopii genu dla chloroplastowej formy Cu,Zn-SOD uzyskano rośliny transgeniczne o zwiększonej odporności na stres oksydacyjny. Na przykład tytoń ze zwiększoną ekspresją tego enzymu jest odporny na stres oksydacyjny wywołany chłodem, wysokim natężeniem światła lub pewnymi herbicydami oraz charakteryzuje się wysokim poziomem aktywności fotosyntetycznej [32]. Tsang i wsp. [89] wykazali u tytoniu znaczny wzrost mRNA chloroplastowej Fe-SOD w przypadku stresu oksydacyjnego zlokalizowanego konkretnie na terenie chloroplastów, a poziom tej dysmutazy wzrastał w warunkach fotoinhibicji. Również w przypadku zwiększonej ekspresji genu innego enzymu antyoksydacyjnego – GR transgeniczny tytoń miał zwiększoną tolerancję na działanie parakwatu i SO₂ na świetle [2], a transgeniczna topola – 100-krotnie wyższą odporność na ozon niż rośliny kontrolne [26]. Nie zawsze jednak rośliny transgeniczne charakteryzowały się zwiększoną odpornością na stres oksydacyjny [43]. Prawdopodobnie spowodowane jest to toksycznym działaniem zwiększonej ilości nadtlenu wodoru wytworzonego przez nadmiernie aktywną SOD. Tak więc wzrost aktywności jednego enzymu nie musi powodować wzrostu odporności na określony czynnik indukujący stres oksydacyjny [91]. Natomiast wzrost aktywności dwu antyoksydacyjnych enzymów chloroplastowych: CuZn-SOD i APX wyraźnie zwiększa tolerancję roślin na działanie stresu oksydacyjnego [32, 33]. Według Foyera i wsp. [26] jednoczesne działanie kilku enzymów stanowiących antyoksydacyjny system obrony jest konieczne dla wyraźnego wzrostu tolerancji na stres oksydacyjny. Stopień odporności roślin transgenicznych na stres oksydacyjny zależy od ilości wytworzo-

nego enzymu antyoksydacyjnego kodowanego przez wprowadzony gen, a także od endogennego poziomu innych "wymiataczy wolnych rodników", szczególnie tych zaangażowanych w detoksyfikację H_2O_2 w roślinie [11].

PODSUMOWANIE

Stres oksydacyjny jest inicjowany przez różne czynniki środowiskowe, a wywołany przez zbyt duże stężenie aktywnych form tlenu, zaś zmiany w strukturze i funkcji aparatu fotosyntetycznego spowodowane działaniem tych czynników są często podobne. Wyjaśnia to w pewnym stopniu fakt, że rośliny odporne na jeden z czynników indukujących stres oksydacyjny są także odporne na inne źródła tego stresu. Pozwala to także na stwierdzenie, że czynniki indukujące stres oksydacyjny działają niespecyficycznie prowadząc ostatecznie do powstania nadmiaru aktywnych form tlenu, peroksydacji lipidów błon chloroplastowych, dysfunkcji tych organelli, zmniejszenia zdolności wiązania CO_2 przez rośliny, a w krańcowych warunkach do śmierci komórek i całych roślin. Dlatego tak ważne jest poznanie mechanizmów ochronnych funkcjonujących zarówno w chloroplastach, jak i całej komórce. Wyjaśnienie regulacji ekspresji wielu genów np. w zakresie przekazywania sygnałów stresu oksydacyjnego, sekwencji promotorowych genów cis i czynników trans wymaga jeszcze wielu badań.

LITERATURA

- [1] AMSELLEMZ, JANSEN MAK, DRIESENAAR ARJ, GRESSEL J. Developmental variability of photooxidative stress tolerance in paraquat-resistant *Conyza*. *Plant Physiol* 1993; **103**: 1097–1106.
- [2] AONO M, KUBO A, SAJI H, TANAKA K, KONDO N. Enhanced tolerance to photooxidative stress of transgenic *Nicotiana tabacum* with high chloroplastic glutathione reductase activity. *Plant Cell Physiol* 1993; **34**: 129–135.
- [3] ARO EM, VIRGIN I, ANDERSSON B. Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim Biophys Acta* 1993; **1143**: 113–134.
- [4] ARO EM, MCCAFFERY S, ANDERSON JM. Recovery from photoinhibition in peas (*Pisum sativum* L.) acclimated to varying growth irradiances. *Plant Physiol* 1994; **104**: 1033–1041.
- [5] ASADA K., TAKAHASHI H. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. [w] Kyle DJ, Osmond CB, Arntzen CJ [red.] Topics in photosynthesis, Vol. 9. Photoinhibition Amsterdam, Elsevier 1987: 227–289.
- [6] BAHL A, LOITSCH SM, KAHL G. Air pollution and plant gene expression [w] Gresshoff PM [red.] Plant Responses to the Environment. CRS series of Current Topics in Plant Mol Biol CRC Press Inc. 1993: 71–96.
- [7] BARBER J, ANDERSSON B. Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends in Biochem Sci* 1992; **17**: 61–66.

- [8] BASZYŃSKI T, KRUPA Z. Molekularne aspekty inhibującego działania kadmu na aparat fotosyntetyczny – fakty i przypuszczenia. [w] Mechanizmy regulacji morfogenezy roślin oraz ich funkcjonowania w warunkach stresowych i zanieczyszczenia środowiska. Rogów, Kat. Bot Leśnej SGGW, PTB, Komitet Bot. PAN. 1992: 11–26.
- [9] BECERRIL JM, DUKE SO. Protoporphyrin IX content correlates with activity of photo-bleaching herbicides. *Plant Physiol* 1989; **90**: 1175–1181.
- [10] BENDER J, WEIGEL HJ, WEGNER U, JÄGER HJ. Response of cellular antioxidants to ozone in wheat flag leaves at different stages of plant development. *Environ Pollut* 1994; **84**: 15–21.
- [11] BOWLER C, van MONTAGU M, INZE D. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1992; **43**: 83–116.
- [12] BURKE JJ. Photosynthetic responses to heat stress. [w] Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms Wiley-Liss, Inc., 1990: 301–309.
- [13] CALDWELL MM. Plant response to solar ultraviolet radiation [w] Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H [red.] Physiological Plant Ecology 1. Encyclopedia of Plant Ecology, New Series, Vol. 12A. Berlin, Springer-Verlag 1981: 170–195.
- [14] CHOW WS, STRID A, ANDERSON JM. Short-term treatment of pea plants with supplementary ultraviolet-B radiation: recovery time-courses of some photosynthetic functions and components. [w] Murata M [red.] Research in Photosynthesis, Vol. IV, Dordrecht, Kluwer Acad. Publ. 1992: 361–364.
- [15] COVELLO PS, CHANG A, DUMBROFF EB, THOMPSON JE. Inhibition of photosystem II precedes thylakoid membrane lipid peroxidation in bisulfite-treated leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol* 1989, **90**: 1492–1497.
- [16] DECKMYN G, MARTENS C, IMPENS I. The importance of the ratio UV-B/ photosynthetic active radiation (PAR) during leaf development as determining factor of plant sensitivity to increased UV-B irradiance: effects on growth, gas exchange and pigmentation of bean plants (*Phaseolus vulgaris* cv. Label). *Plant, Cell Environ* 1994; **17**: 295–301.
- [17] DEMMIG-ADAMS B, ADAMS WW III, Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Ann Rev Plant Physiol* 1992, **43**: 599–626.
- [18] DONATI ZRA, SLOSMAN DO, POLLA BS. Oxidative injury and the heat shock response. *Biochem Pharmacol* 1990, **40**: 2571–2577.
- [19] DROPPA M, HORVATH G. The role of copper in photosynthesis. *Crit Rev Plant Sci* 1990; **9**: 111–123.
- [20] DUKE S.O. Overview of herbicide mechanisms of action. *Env Health Persp* 1990; **87**: 263–271.
- [21] DUKE SO, BECERRIL JM, SHERMAN TD, LYDON J, MATSUMOTO H. The role of protoporphyrin IX in the mechanism of action of diphenyl ether herbicides. *Pestic Sci* 1990, **30**: 367–378.
- [22] DUKE SO, BECERRIL JM, SHERMAN TD, MATSUMOTO H. Photosensitizing porphyrins as herbicides. [w]: A.Hedin [red.] Naturally occurring pest bioregulators. American Chemical Society, 1991: 371–386.
- [23] EBEL B, ROSENKRANZ J, SCHIFFGENS A, LÜTZ C. Cytological observations on spruce needles after prolonged treatment with ozone and acid mist. *Environmental Pollution* 1990; **64**: 323–335.
- [24] EVERSMAAN S, SIGAL L. Effects of SO₂, O₃, and SO₂ and O₃ in combination on photosynthesis and ultrastructure of two lichen species. *Can J Bot* 1987; **65**: 1806–1818.
- [25] FOYER CH, HALL DO. Oxygen metabolism in the active chloroplast. *TIBS* 1980: 188–190.
- [26] FOYER CH, DESCOURVIERES P, KUNERT KJ. Protection against oxygen radical: an important defence mechanism studies in transgenic plants. *Plant Cell Env* 1994; **17**: 507–523.
- [27] FRISO G, BARBATO R, GIACOMETTI GM, BARBER J. Degradation of D2 protein due to UV-B irradiation of the reaction centre of photosystem II. *FEBS Lett* 1994; **339**: 217–221.

- [28] FÜHRER G, PAYER HD, PFANZ H. Effects of air pollutants on the photosynthetic capacity of young Norway spruce tree. Response of single needle age classes during and after different treatments with O₃, SO₂, or NO₂. *Trees* 1993; **8**: 85–92.
- [29] FURBANK RT. Photoreduction of oxygen in higher plants: mechanisms and physiological functions. *What's New in Plant Physiology* 1984; **15**: 33–36.
- [30] GONZALEZ R, SEGURA A, GONZALEZ ML. Ultrastructure of chloroplasts of pine needles exposed to industrial environment. *Biol Plant* 1993; **35**: 407–416.
- [31] GUPTA AS, ALSCHER RG, MCCUNE D. Response of photosynthesis and cellular antioxidants to ozone in *Populus* leaves. *Plant Physiol* 1991; **96**: 650–655.
- [32] GUPTA A SL, HEINEN JL, HOLADAY AS, BURKE JJ, ALLEN RD. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993a; **90**: 1629–1633.
- [33] GUPTA AS, WEBB RP, HOLADAY S, ALLEN RD. Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. Induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase-overexpressing plants. *Plant Physiol* 1993b; **103**: 1067–1073.
- [34] HALLIWELL B. Oxygen radicals: their formation in plant tissues and their role in herbicide damage. [w] Baker NR, Percival MP [red.] *Herbicides*, Amsterdam, Elsevier Science Publ. 1991: 87–123.
- [35] HARDING SA, GUIKEMA JA, PAULSEN GM. Photosynthetic decline from temperature stress during maturation of wheat. *Plant Physiol* 1990; **92**: 654–658.
- [36] HAUSLADEN A, MADAMANCHI NR, FELLOWS S, ALSCHER RG, AMUNDSON RG. Seasonal changes in antioxidants in red spruce as affected by ozone. *New Phytol* 1990; **115**: 447–458.
- [37] HAVAUX M. Rapid photosynthetic adaptation to heat stress triggered in potato leaves by moderately elevated temperatures. *Plant, Cell Env* 1993; **16**: 461–467.
- [38] HAYAKAWA T, KANEMATSU S, ASADA K. Occurrence of Cu,Zn-superoxide dismutase in the intrathylakoid space of spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 1984; **25**: 883–889.
- [39] HE J, HUANG L-K, WHITECROSS MI. Chloroplast ultrastructure changes in *Pisum sativum* associated with supplementary ultraviolet (UV-B) radiation. *Plant Cell Env* 1994; **17**: 771–775.
- [40] HUNER NPA, OQUIST G, HURRY VM, KROL M, FALK S, GRIFFITH. Photosynthesis, photoinhibition and low temperature acclimation in cold tolerant plants. *Photosynth Res* 1993; **37**: 19–39.
- [41] JANSEN MAK, SHAALTIEL Y, KAZZES D, CANAANI O, MALKIN S, GRESSEL J. Increased tolerance to photoinhibitory light in paraquat-resistant *Conyza bonariensis* measured by photoacoustic spectroscopy and ¹⁴C₂-fixation. *Plant Physiol* 1989; **91**: 1174–1178.
- [42] KANEMATSU S, ASADA K. Cu,Zn-superoxide dismutases from the fern *Equisetum arvense* and the green alga *Spirogyra* sp.: occurrence of chloroplast and cytosol types of enzyme. *Plant Cell Physiol* 1989; **30**: 717–727.
- [43] KARPÍŃSKI S. Copper-zinc superoxide dismutases in scots pine (*Pinus sylvestris* L.) PhD Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Umea 1994a.
- [44] KARPÍŃSKI S, KARPÍŃSKA B, WINGSLE G, HALLGREN JE. Molecular responses to photooxidative stress in *Pinus sylvestris*. I. Differential expression of nuclear and plastid genes in relation to recovery from winter stress. *Physiol Plant* 1994b; **90**: 358–366.
- [45] KITTSTEINER U, MOSTOWSKA A, RÜDIGER W. The greening process in cress seedlings I. Pigment accumulation and ultrastructure after application of 5-aminolevulinic acid and complexing agents. *Physiol Plant* 1991; **81**: 139–147.
- [46] KRUPA Z, SIEDLECKA A, MAKSYMIEC W, BASZYŃSKI T. In vivo response of photosynthetic apparatus of *Phaseolus vulgaris* L. to nickel toxicity. *J Plant Physiol* 1993; **142**: 664–668.
- [47] LAISK A, KULIO, MOLDAU H. Ozone concentration in leaf intercellular air spaces is close to zero. *Plant Physiol* 1989; **90**: 1163–1167.

- [48] LARSON R. The antioxidants of higher plants. *Photochemistry* 1988, **27**: 969–978.
- [49] LICZMAŃSKI AE. Oxygen toxicity. I. Damage of living cells. *Post Biochem* 1988a; **34**: 273–291.
- [50] LICZMAŃSKI AE. Oxygen toxicity. II. Defence mechanisms. *Post Biochem* 1988b; **34**: 291–310.
- [51] LUNA CM., GONZALEZ CA, TRIPPI VS. Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves. *Plant Cell Physiol* 1994; **35**: 11–15.
- [52] MADAMANCHI NR, ALSCHER RG. Metabolic bases for differences in sensitivity of two pea cultivars to sulfur dioxide. *Plant Physiol* 1991; **97**: 88–97.
- [53] MADAMANCHI NR, YU X, DOULIS A, ALSCHER RG, HATZIOS KK, CRAMER CL. Acquired resistance to herbicides in pea cultivars through pretreatment with sulfur dioxide. *Pestic Biochem Physiol* 1994; **48**: 31–40.
- [54] MATTERS GL, SCANDALIOS JG. Changes in plant gene expression during stress. *Developmental Genetics* 1986; **7**: 167–175.
- [55] MATTERS GL, SCANDALIOS JG. Synthesis of isoenzymes of Superoxide Dismutase in Maize leaves in Response to O₃, SO₂ and Elevated O₂. *J Exp Bot* 1987; **38**: 842–852.
- [56] MEHLHORN H. Ethylene-promoted ascorbate peroxidase activity protects plants against hydrogen peroxide, ozone and paraquat. *Plant Cell Env* 1990; **13**: 971–976.
- [57] MISHRA NP, MISHRA RK, SINGHAL GS. Changes in the activities of anti-oxidant enzymes during exposure of intact wheat leaves to strong visible light at different temperatures in the presence of protein synthesis inhibitors. *Plant Physiol* 1993; **102**: 903–910.
- [58] MISZALSKI Z, NIEWIADOMSKA E. Comparison of sulphite oxidation mechanisms in three lichen species. *New Phytol* 1993; **123**: 345–349.
- [59] MIYAKE H, MATSUMURA H, FUJINUMA Y, TOTSUKA T. Effects of low concentration of ozone on the fine structure of radish leaves. *New Phytol* 1989; **111**: 187–195.
- [60] MOSTOWSKA A, KITTEINER U, RÜDIGER W. Effect of 1,10-phenanthroline on ultrastructure of pea leaves. *Protoplasma* 1991a; **161**: 23–30.
- [61] MOSTOWSKA A, FIETT D, PARYS E. Influence of 1,10-phenanthroline, a photodynamic herbicide on the ultrastructure of mesophyll cells and photosynthetic activity in greening pea seedlings. *Env Exp Bot* 1991b; **31**: 385–395.
- [62] MOSTOWSKA A. Photodynamic herbicides: their influence on the development and structure of photosynthetic apparatus. *Photosynthetica* 1992; **26**: 19–31.
- [63] OQUIST G, HUNER NPA. Effects of cold acclimation on the susceptibility of photosynthesis to photoinhibition in Scots pine and winter and spring cereals: a fluorescence analyses. *Funct Ecol* 1991; **5**: 91–100.
- [64] OQUIST G, HURRY VM, HUNER NPA. Low-temperature effects on photosynthesis and correlation with freezing tolerance in spring and winter cultivars of wheat and rye. *Plant Physiol* 1993; **101**: 245–250.
- [65] PITCHER LH, BRENNAN E, HURLEY A, DUNSMUIR P, TEPPERMAN JM, ZILINSKAS B. Overproduction of *Petunia* chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase does not confer ozone tolerance in transgenic tobacco. *Plant Physiol* 1991; **97**: 452–455.
- [66] PORANKIEWICZ J, GWÓŹDŹ EA. Białka szoku termicznego i ich rola w komórkach roślinnych. *Post Biol Kom* 1993; **20**: 155–170.
- [67] POWLES SB. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annu Rev Plant Physiol* 1984; **35**: 15–44.
- [68] PRZYMUSIŃSKI R, GWÓŹDŹ EA. Increased accumulation of the 16x10³ M, polypeptide in lupin roots exposed to lead, copper and nitrite ions. *Env Exp Bot* 1994; **34**: 63–68.
- [69] REBEIZ CA, MONTAZER-ZOUHOOR A, HOPEN HJ, WU SM. Photodynamic herbicides: 1. Concept and phenomenology. *Enzyme Microbiol Technol* 1984; **6**: 390–401.

- [70] RINTAMÄKI E, SALO R, ARO EW. Rapid turnover of the D1 reaction-center protein of photosystem II as a protection mechanism against photoinhibition in a moss, *Ceratodon purpureus* (Hedw.) *Brid Planta* 1994; **193**: 520–529.
- [71] ROBINSON JM. Does O₂ photoreduction occur within chloroplasts in vivo? *Physiol Plant* 1988; **72**: 666–680.
- [72] SAKAKI T, KONDO N, SUGAHARA K. Breakdown of photosynthetic pigments and lipids in spinach leaves with ozone fumigation: Role of active oxygens. *Physiol Plant* 1983; **59**: 28–34.
- [73] SALIN ML. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiol Plant* 1987; **72**: 681–689.
- [74] SCANDALIOS JG. Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress [w] *Advances in Genetics*, Vol. 28: Genomic Responses to Environmental Stress. Academic Press. 1990: 1–41.
- [75] SCANDALIOS JG. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol* 1993; **101**: 7–12.
- [76] SCHIFFGENS-GRUBER A, LÜTZ C. Ultrastructure of mesophyll cell chloroplasts of spruce needles exposed to O₃, SO₂, and NO₂ alone and in combination. *Env Exp Bot* 1992; **32**: 243–254.
- [77] SCHMIEDEN U, WILD A. Changes in levels of α -tocopherol and ascorbate in spruce needles at three low mountain sites exposed to Mg²⁺-deficiency and ozone. *Z Naturforsch* 1993; **49c**: 171–180.
- [78] SCHNETTGER B, CRITCHLEY C, SANTORE UJ, GRAF M, KRAUSE GH. Relationship between photoinhibition of photosynthesis, D1 protein turnover and chloroplast structure: effects of protein synthesis inhibitors. *Plant Cell Environ* 1994, **17**: 55–64.
- [79] SCHÖNER SI, KRAUSE GH. Protective systems against active oxygen species in spinach: response to cold acclimation in excess light. *Planta* 1990; **180**: 383–389.
- [80] SCHUSTER G, EVEN D, KLOPPSTECH K, OHAD I. Evidence for protection by heat-shock proteins against photoinhibition during heat-shock. *EMBO J* 1988; **7**: 1–6.
- [81] SHAALTIEL Y, GLAZER A, BOCION PF, GRESSEL J. Cross tolerance to herbicidal and environmental oxidants of plant biotypes tolerant to paraquat, sulfur dioxide and ozone. *Pestic Biochem Physiol* 1988; **31**: 13–23.
- [82] SHARMA YK, DAVIS KR. Ozone-induced expression of stress-related genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 1994; **105**: 1089–1096.
- [83] SHENG WS, CHEVONE BI, HESS JL. Photosynthetic inhibition and superoxide dismutase activity in soybean cultivars exposed to short-term ozone fumigations. *Environ Pollut* 1993; **80**: 45–52.
- [84] TANAKA K, SUGAHARA K. Role of superoxide dismutase in defense against SO₂ toxicity and an increase in superoxide dismutase activity with SO₂ fumigation. *Plant and Cell Physiol* 1980; **21**: 601–611.
- [85] TANAKA K, KONDO N, SUGARA K. Accumulation of hydrogen peroxide in chloroplasts of SO₂-fumigated spinach leaves. *Plant Cell Physiol* 1982a; **23**: 999–1007.
- [86] TANAKA K., OTSUBO T, KONDO N. Participation of hydrogen peroxide in inactivation of Calvin-cycle SH enzymes in SO₂-fumigated spinach leaves. *Plant and Cell Physiol* 1982b; **23**: 1009–1018.
- [87] TANAKA K, FURUSAWA I, KONDO N, TANAKA K. SO₂ tolerance of tobacco plants regenerated from paraquat-tolerant callus. *Plant Cell Physiol* 1988; **29**: 743–746.
- [88] TJOELKER MG, VOLIN JC, OLEKSYN J, REICH PB. Light environment alters response to ozone stress in seedlings of *Acer saccharum* Marsh. and hybrid *Populus L. I*. In situ net photosynthesis, dark respiration and growth. *New Phytol* 1993; **124**: 627–636.
- [89] TSANG EWT, BOWLER C, HEROUART D, van CAMP W, VILLARROEL R, GENETELLO C, van MONTAGU M, INZE D. Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. *Plant Cell* 1991; **3**: 783–792.
- [90] TYYSTJÄRVI E. Photoinhibition-struggle between damage and repair of photosystem II, PhD Thesis, University of Turku, Finland, 1993.

- [91] Van den BULCKE M. Engineering stress-resistant plants through biotechnological approaches. [w] *Mechanisms of Plant Growth and Improved Productivity: Modern Approaches*. Ser: Books in Soils, Plants and the Environment, New York: Marcel Dekker, Inc. 1994: 435–460.
- [92] VELITCHKOVA MY, IVANOV AG, CHRISTOV AM. Ultrastructural and fluorescence properties of granal and stromal membranes of pea chloroplasts exposed to heat stress. *Photosynthetica* 1989; **23**: 360–363.
- [93] VELITCHKOVA MY, IVANOV AG. Effect of short-time heat stress on the parameters of cation induced increased of chlorophyll fluorescence in pea thylakoid membranes. *J Plant Physiol* 1993; **142**: 144–150.
- [94] VIERLING E, KIMPEL JA. Plant responses to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology*, 1992, **3**: 164–170.
- [95] VOLIN JC, TJOELKER MG, OLEKSYN J, REICH PB. Light environment alters response to ozone stress in seedlings of *Acer saccharum* Marsh. and hybrid *Populus L. II*. Diagnostic gas exchange and leaf chemistry. *New Phytol* 1993; **124**: 637–646.
- [96] WISE RR, NAYLOR AW. Chilling-enhanced photooxidation. *Plant Physiol* 1987; **83**: 272–277.
- [97] WOZNY A. The effects of ozone on the plant cell. *Acta Soc Bot Pol* 1989, **58**: 625–639.
- [98] WOZNY A, STROIŃSKI A, GWÓŹDŹ EA. Plant cell responses to cadmium. 1990, Wyd. Nauk. UAM, Poznań.
- [99] WRÓBLEWSKA B, MOSTOWSKA A, POSKUTA J. The effect of oxygen concentration on chloroplast development, chlorophyll synthesis and starch accumulation in etiolated bean seedlings upon illumination. *Env Exp Bot* 1994; **34**: 153–163.

Otrzymano: 03.11.1994 r.

Przyjęto: 05.01. 1995 r.

Adres autora: 00-927 Warszawa, ul. Krakowskie Przedmieście 26/28.

KORTYKOLIBERYNA (CRF) LOKALNYM REGULATOREM FUNKCJI KOMÓREK LEYDIGA SSAKÓW

CORTICOTROPIN-RELEASING FACTOR (CRF):
A LOCAL REGULATOR OF MAMMALIAN
LEYDIG CELL FUNCTION

Barbara BILIŃSKA

Pracownia Endokrynologii Zwierząt i Hodowli Tkanek, Zakład Fizjologii Zwierząt, Instytut Zoologii UJ, Kraków

Streszczenie. CRF jest kluczowym neuropeptydem w kaskadowej reakcji stresu. Działanie tego białka określane jest jako antyrozrodcze na poziomie podwzgórza, poprzez hamowanie wydzielania LH i osłabienie funkcji gonady męskiej. Równocześnie hormon ten jest negatywnym, autokrynowym regulatorem funkcji komórek Leydiga. Sekrecja CRF przez te komórki zależna jest od LH i podlega wpływowi uwalnianej serotoniny (5HT). Układ LH-5HT-CRF służy stałemu buforowaniu poziomu androgenów stymulowanemu przez gonadotropiny. Działanie 5HT-CRF w jądrze stanowi jeszcze jeden dowód na istotną rolę lokalnych czynników w regulacji steroidogenezy.

Słowa kluczowe: CRF, serotonina, LH, komórki Leydiga, regulacja autokrynowa

Summary. Corticotropin-releasing factor is the key neuropeptide in the stress cascade. It has major inhibitory actions on testicular function and is known as antireproductive at the central level through inhibition of sexual behavior and LH secretion. Additionally, this hormone is a negative, autocrine regulator of Leydig cell function. CRF production is LH-dependent and stimulated by serotonin (5HT) secreted. The LH-5HT-CRF inhibitory system serves to continuously buffer the stimulation of androgen production by gonadotropin. The action of serotonin-CRF within the testis shows the significant role of local factors in the regulation of steroidogenesis.

Key words: CRF, serotonin, LH, Leydig cells, autocrine regulation

WSTĘP

W ostatnich latach Tahka [22], Sharpe [18], Saez i wsp. [17], Skinner [20], Bilińska [3] i Verhoeven [29] wykazują istotną rolę lokalnych regulatorów w gonadzie męskiej.

Trzy typy komórek somatycznych jądra

(1) komórki Leydiga znajdujące się w gruczole interstycjalnym,

(2) okołokanalikowe, czyli mioidalne otaczające kanalik oraz

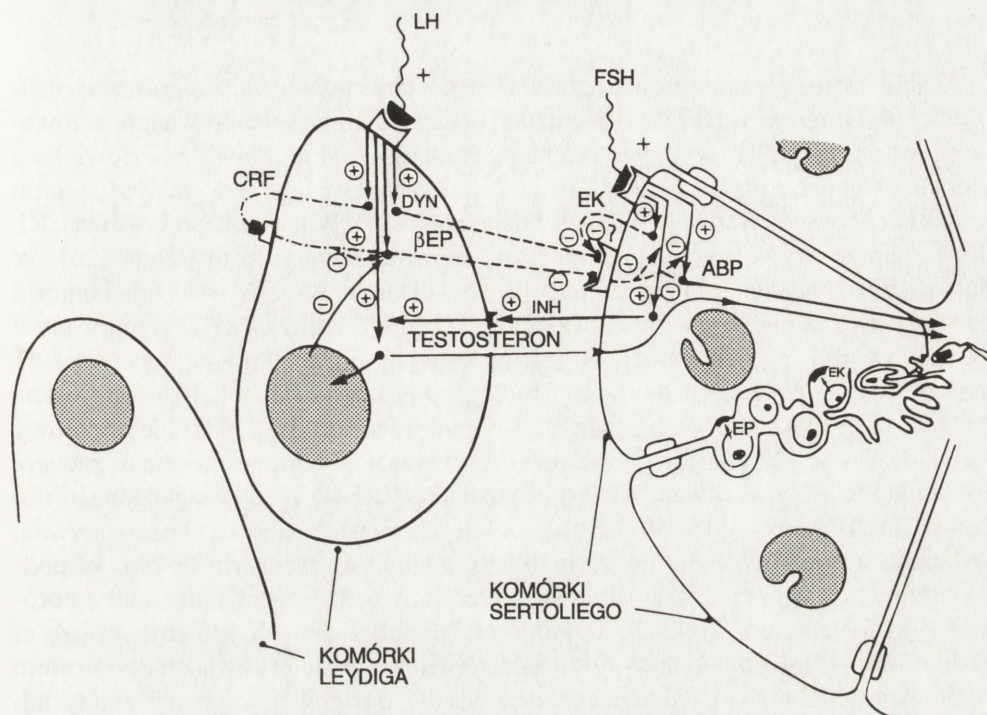
(3) komórki Sertoliego, leżące wewnątrz kanalika, odpowiedzialne są za utrzymanie stałego poziomu hormonów i czynników białkowych, niezbędnych do prawidłowego wzrostu, rozwoju i dojrzewania komórek rozrodczych. Jak wiadomo, centralna regulacja funkcji gonady męskiej opiera się na współdziałaniu czynności układu nerwowego i endokrynnego, a złożone działanie gonadotropin (LH i FSH) utrzymuje funkcje komórek Leydiga i Sertoliego głównie przez produkcję androgenów oraz syntezę lokalnych czynników będących auto- i parakrynowymi regulatorami [19]. Regulatory te działają poprzez wiązanie się ze specyficznymi receptorami obecnymi w danej komórce.

Wiadomo również, że produkowane przez komórki Leydiga hormony, takie jak: androgeny, β -endorfina, dynorfiny, oksytocyna czy aktywina, modulują funkcję kanalika nasiennego (rys.1). Pozostałe natomiast, takie jak: estrogeny, angiotensyna, kortykoliberyna (CRF) czy wazopresyna, mają wpływ na uwalnianie LH z przysadki mózgowej. Analogiczne działania wykazują inhibina czy transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β), hormony produkowane przez komórki Sertoliego [12, 21].

PODWZGÓRZOWE I POZAPODWZGÓRZOWE WYSTĘPOWANIE CRF

Kortykoliberyna jest hormonem działającym w wielu regionach centralnego układu nerwowego: w przysadce mózgowej oraz w ośrodkach podkorowych podwzgórza związanych z regulacją funkcji autonomicznych [16].

W ostatnich latach dzięki rozwojowi technik biochemicznych i immunocytochemicznych z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych poznano także lokalne działanie kortykoliberyny (tzn. poza podwzgórzem), np. w komórkach przewodu pokarmowego i płuc oraz gruczołów dokrewnych, takich jak: trzustka, nadnercza, łożysko, jajnik i jądra, gdzie CRF pojawia się i jest włączony w regulacyjne funkcje związane z odpowiedzią komórek na stres [1,9].



Rys. 1. Model interakcji między komórkami Leydiga i Sertoliego poprzez kortykoliberynę i peptydy opiatowe [9]: komórki Leydiga syntetyzują β -endorfina (β EP) i dynorfiny (DYN), które mają miejsca wiążące w komórkach Sertoliego, w ten sposób dochodzi do obniżenia produkcji białka wiążącego androgeny (ABP), i uwalniania inhibiny (INH) z tych komórek, inhibina natomiast ułatwia steroidogenezę w komórkach Leydiga; opiatowy receptor w komórkach Sertoliego rozpoznaje także produkowane przez nie enkefaliny (EK), głównym regulatorem syntezy opiatów w komórkach Leydiga jest hormon luteinizujący (LH) oraz CRF jako stymulator produkcji β -endorfiny

CRF I JEGO DZIAŁANIE

CRF jest kluczowym neuropeptydem w kaskadowej reakcji stresu. Działanie tego białka w podwzgórzu określane jest jako antyreprodukcyjne, tzn. hamujące funkcję gonady męskiej oraz wpływające na zachowanie seksualne samca [6].

CRF bowiem wywiera hamujący wpływ już na poziomie podwzgórza, poprzez zmniejszenie uwalniania gonadoliberyny (GnRH). Zaburzenie jej sekrecji stanowi przyczynę obniżenia wydzielania gonadotropin, szczególnie LH, z komórek przedniego płata przysadki mózgowej.

Podwzgórzowy CRF działa także jako główny, fizjologiczny regulator osi podwzgórze-przysadka mózgowa-nadnercza [16].

BUDOWA CRF I JEGO LOKALNE ODDZIAŁYWANIE

Dzięki zastosowaniu chromatografii wysokociśnieniowej (*high performance liquid chromatography*, HPLC) stwierdzono obecność immunoreaktywnego, eluowanego w czasie, CRF w jądrze szczura, świnki morskiej, owcy i człowieka i zlokalizowano go przede wszystkim w komórkach Leydiga, a w małym stopniu komórkach rozrodczych i plemnikach z najdłuższymi [6,24]. W komórkach Leydiga CRF działa bardzo szybko, wywołując znaczną supresję sekrecji testosteronu [26]. W najnowszych badaniach Tinajero i wsp. [23] oraz Dufau i wsp. [6] wskazują komórki Leydiga jako miejsce syntezy i uwalniania kortykoliberyny. CRF wyizolowany z ekstraktów podwzgórza owiec [28] jest białkowym łańcuchem zbudowanym z 41 aminokwasów. Większość aktywności biologicznej cząsteczki zlokalizowana jest na końcu COOH. Wypadnięcie pierwszych 6 aminokwasów z NH_2 końca daje stopniowy zanik aktywności biologicznej cząsteczki. U człowieka prekursor hormonu zawiera 196 aminokwasów, a sekwencja właściwego białka CRF-41 została znaleziona blisko końca COOH w pozycji 154–194. Strukturalnie, CRF jest cząsteczką konserwatywną, wykazującą podobieństwo między białkiem ludzkim a szczurzym (94%). W podwzgórzu, CRF jest przed wszystkim syntetyzowany w neuronach jądra nadkomorowego, które zawiera 2000–3000 komórek zlokalizowanych głównie w części grzbietowej [16]. Komórki te w odpowiedzi na neurotransmitery związane ze stresem wydzielają CRF do krążenia wrotnego przysadki mózgowej w sposób ciągły lub pulsacyjny. Uwalniany hormon oddziałuje na komórki przedniego i pośredniego płata przysadki mózgowej przez specyficzne receptory błonowe. Rezultatem działania kortykoliberyny w przysadce mózgowej jest wzrost transkrypcji i ekspresji genu proopiomelanokortyny (POMC) z równoczesnym uwolnieniem aktywnych peptydów, najpierw ACTH i innych produktów z β -endorfiną i α -MSH z przedniego płata przysadki mózgowej, oraz synteza i sekrecja peptydów opiatowych z części środkowej przysadki [2]. Endogenne opiaty generowane w obu płatach przysadki wywierają hamujące działanie na poziomie podwzgórza poprzez blokowanie uwalniania GnRH będącej przyczyną zmian częstotliwości i nasilenia pulsów LH [6,8].

RECEPTORY CRF – PRZENOSZENIE SYGNAŁU

W ostatnich kilku latach rola kortykoliberyny jądrowej została częściowo wyjaśniona [23]. CRF uwalniany z komórek Leydiga wywiera autokrynowy wpływ poprzez receptory własne, zlokalizowane w błonie komórkowej płodowych i dorosłych populacji tych komórek. Receptory te zostały wykryte poprzez wiązanie znakowanego jodem hormonu do błony komórek lub do wyodrębnionej i oczyszczonej frakcji błon

komórkowych [5]. Wykazują one wysokie powinowactwo do hormonu, który obniża poziom cAMP i stężenie testosteronu w tych komórkach [1].

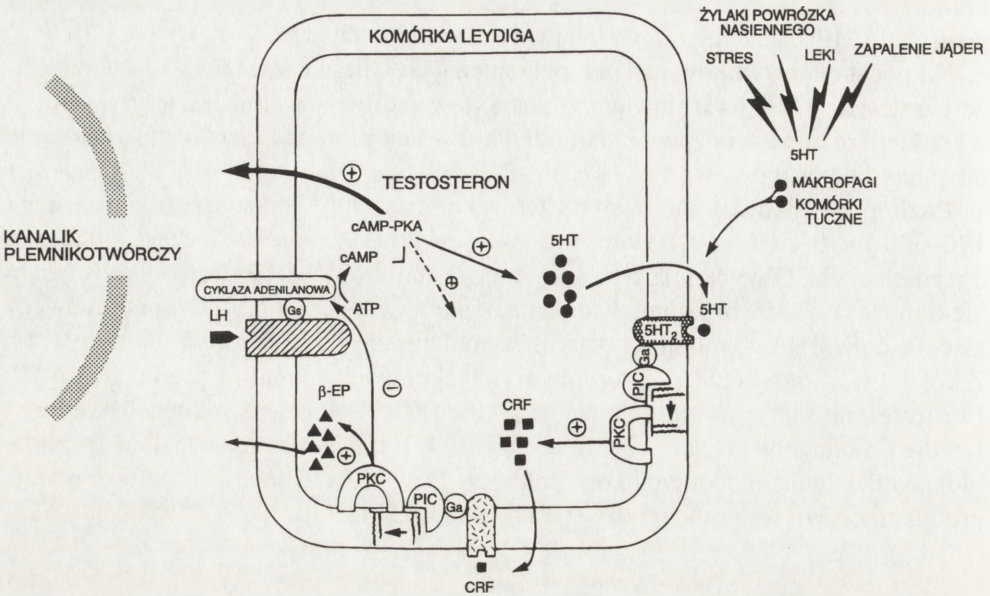
Na podstawie wyników badań biochemicznych Ulisse i wsp. [26,27] stwierdzili, że cząsteczka CRF wyizolowana z ekstraktów jądrowych i scharakteryzowana, z wyjątkiem różnicy w pozycji 39 aminokwasu w łańcuchu, ma identyczną sekwencję jak peptyd podwzgórzowy.

Poziom wewnątrzkomórkowego CRF w komórkach Leydiga jest znaczny i sięga $170\text{--}300\text{ pg}/10^7$ komórek. Bazalna produkcja wynosi ok. $3\text{ pg}/10^7$ w czasie 30 minut, a stymulacja hCG wywołuje wzrost jego poziomu do $25\text{ pg}/10^7$ komórek. Ten sam efekt można uzyskać przez inkubację z analogami cAMP, podczas gdy forskolina czy estry forbolu (TPA) są mniej aktywnymi stymulatorami sekrecji kortykoliberyny [23]. Z kolei wykazano [26,27], że norepinefryna jakkolwiek stymuluje produkcję cAMP i testosteronu, nie wywołuje zmian w sekrecji CRF. W czasie inkubacji komórek Leydiga z antagonistą CRF (α -helical CRF [9-41]) lub jego przeciwciałem zachodzi blokada działania endogennej kortykoliberyny i w efekcie dochodzi do wzmożenia produkcji cAMP i steroidogenezy stymulowanej LH/hCG.

REGULACJA SEKRECJI CRF W KOMÓRKACH LEYDIGA

W regulacji sekrecji CRF znaczną rolę przypisuje się serotoninie (5HT). Jest ona głównym modulatorem produkcji CRF w mózgu i stymuluje jego sekrecję z fragmentów podwzgórza. Uwalniana z centralnych i obwodowych zakończeń nerwowych może działać na receptory w gonadzie i wywoływać hamowanie produkcji testosteronu pod wpływem stresu [13].

5HT jest także obecna w płytkach krwi oraz w narządach, głównie w szyszynce, trzustce, płucach, grasicy, tarczycy i jądrze [4]. Dzięki badaniom *in vitro* stwierdzono zdolność komórek Leydiga do sekrecji serotoniny oraz syntetyzowania jej *de novo* [24]. Makrofagi i komórki tuczne tkanki interstycjalnej także mogą być jej źródłem. Produkcja serotoniny stymulowana jest gonadotropinami (rys. 2). Do uzyskania maksymalnego efektu działania serotoniny w komórkach Leydiga niezbędne jest wysycenie jej receptorów o wysokim i niskim powinowactwie. Ilość miejsc wiążących o wysokim powinowactwie jest w komórkach Leydiga bardzo mała (200 miejsc/komórkę), dlatego jej działanie oparte jest w dużej mierze na miejscach o niskim powinowactwie (100 000 miejsc/komórkę), które funkcjonują jako autoreceptory w regulacji uwalniania CRF [13]. Tinajero i wsp. [24] uważają, że propranolol, prototyp blokera β -adrenergicznego wiąże się do receptorów 5HT₂ o niskim powinowactwie i w ten sposób czyni serotoninę dostępną dla receptorów o wysokim powinowactwie. Preinkubacja z chlorowodorkiem 1-[2,5-dwumethoksy-4-jodofyryl]-2-amino propa-
nu (DOI), który jest antagonistą receptorów o wysokim powinowactwie i agonistą tych o niskim, zabezpiecza komórki Leydiga przed hamującym działaniem proprano-



Rys. 2. Układ LH-5HT-CRF w komórkach Leydiga, opracowano wg [6]: LH stymuluje sekrecję serotoniny (5HT) w komórkach Leydiga; 5HT dostaje się do komórek także z innych źródeł i działa na syntezę CRF poprzez receptor 5HT₂ i aktywację kinazy białkowej C (PKC); CRF obniża produkcję cAMP, aktywność kinazy białkowej A (PKA) i w konsekwencji prowadzi do redukcji poziomu testosteronu, równocześnie CRF przez receptor własny wiążąc się z białkami G (G_q), i poprzez fosfatydyloinozytyle (PIC) i PKC pobudza sekrecję β-endorfiny

lolu, który wywołuje wzrost uwalniania CRF, hamuje bazalną i stymulowaną przez LH produkcję cAMP i tym samym steroidogenezę [24].

Mechanizm działania serotoniny przez receptor 5HT₂ został opisany przez Hartiga [11] oraz Fabbri i wsp. [9], którzy obserwowali wpływ selektywnego antagonisty receptora 5HT₂, ketanseryny. Wstrzymuje ona znaczne uwalnianie CRF i blokuje hamujące działanie serotoniny. Natomiast α-adrenergiczny antagonist, prazosyna, nie wywołuje żadnego z wymienionych efektów, wskazując, że serotonina działa na komórki Leydiga przez wiązanie z receptorem 5HT₂. Traktowanie komórek ketanseryną powoduje ich uwrażliwienie na hormony gonadotropowe oraz wzrost produkcji cAMP i testosteronu. Co więcej, Hartig [11] wykazał, że w komórkach Leydiga istnieją podtypy receptorów 5HT różniące się od receptorów obecnych w mózgu. Działają one przez różne systemy przekaźników. I tak receptory 5HT_{1A}, 5HT_{1B}, 5HT_{1D} wiążą się z białkiem G i działają przez cyklazę adenilanową i dalej przez kinazę białkową A, podczas gdy 5HT_{1C} i 5HT₂ aktywują fosfolipazę C i kinazę białkową C, natomiast 5HT₃ należą do receptorów uruchamiających kanały jonowe.

Zgodnie z wynikami badań Maddocksa i wsp. [14] w czasie zapalenia jąder (*orchitis*) serotonina jest uwalniana do przedziału interstycjalnego z komórek Leydi-

ga, komórek tucznych i płytek krwi pod wpływem interleukiny produkowanej przez makrofagi tego przedziału.

Wysoka koncentracja serotoniny wykryta w jądrach pacjentów z żylakami powrózka nasiennego (*varicocele*) może być przyczyną osłabienia sekrecji testosteronu i w konsekwencji zmian klinicznych prowadzących do bezpłodności u mężczyzn [10]. Na tej podstawie Rajfer i wsp. [15] zalecają podawanie antagonistów serotoniny w celu leczenia tego typu bezpłodności.

PODSUMOWANIE

Sekrecja CRF przez komórki Leydiga jest stymulowana przez LH *via* mechanizm polegający na uwalnianiu serotoniny i autokrynowej aktywacji jej receptorów obecnych na powierzchni komórek Leydiga. Układ LH-5HT-CRF służy stałej kontroli (buforowaniu) poziomu androgenów przez gonadotropiny. CRF działa jako autokrynowy inhibitor produkcji androgenów i stymulator sekrecji β -endorfiny [24]. Ta zaś wywiera hamujący wpływ na nabłonek plemnikotwórczy przez receptory o wysokiej specyficzności zlokalizowane w komórkach Sertoliego [7].

Te zależności wskazują nie tylko na zaangażowanie CRF serotoniny i opiatów w lokalnej kontroli funkcji gonady męskiej, ale rzucają nowe światło na patogenezę zmian w układzie rozrodczym wywołanych między innymi stresem.

LITERATURA

- [1] AUDHYA T, HOLLANDER CS, SCHLESINGER DH, HUTCHINSON B. Structural characterization and localization of corticotropin-releasing factor in testis. *Biochim Biophys Acta* 1989; **995**: 10–19.
- [2] BARDIN CW, CHEN CCL, MORRIS PL, GERENDAI I, BOITANI C, LIOTTA AS, MARGIORIS A, KRIEGER DT. Proopiomelanocortin-derived peptides in testicular interstitial fluid: characterization and changes in secretion after human chorionic gonadotropin of luteinizing hormone-releasing hormone analog treatment. *Rec Progr Horm Res* 1987; **43**: 1–28.
- [3] BILIŃSKA B. Współczesne poglądy na interakcje międzykomórkowe w gonadzie męskiej ssaków. *Post Biol Kom* 1992; **19**: 205–221.
- [4] CAMPOS MB, VITALE ML, CALANDRA RS, CHIOCCHIO SR. Serotonergic innervation of the rat testis. *J Reprod Fertil* 1990; **88**: 475–479.
- [5] CLAYTON RN. The molecular biology of the ovary and testis. *Clin Endocrinol Metab* 1992; **6**: 521–537.
- [6] DUFAU ML, TINAJERO JC, FABBRI A. Corticotropin-releasing factor: an antireproductive hormone of the testis. *FASEB J* 1993; **7**: 299–307.
- [7] ESKELAND NL, MOLONEAUX CJ, SCHACHTER BS. Regulation of β -endorfin secretion by corticotropin-releasing factor in the intact rat testis. *Endocrinology* 1992; **130**: 1172–1179.

- [8] FABBRI A. The role and regulation of testicular opioids. *Trends Endocrinol Metab* 1990; **1**: 117–120.
- [9] FABBRI A, TINAJERO JC, DUFAU ML. Corticotropin-releasing factor is produced by rat Leydig cells and has a major local antireproductive role. *Endocrinology* 1990; **127**: 1541–1543.
- [10] HARRISON KL, CALLAN VJ, HENNESSEY JF. Stress and semen quality in an *in vitro* fertilization program. *Fertil Steril* 1987; **48**: 633–636.
- [11] HARTIG PR. Molecular biology of 5HT receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1989; **10**: 64–69.
- [12] HEINDEL JJ, TREINEN KA. Physiology of the male reproductive system: endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Toxicol Pathol* 1989; **17**: 411–445.
- [13] KALLA NR. Demonstration of direct effect of serotonin on rat Leydig cells. *Andrologia* 1979; **4**: 259–262.
- [14] MADDOCKS S, PARVINEN M, SODER O, PUNNONEN J, POLLANEN P. Regulation of the testis. *J Reprod Immunol* 1990; **18**: 33–50.
- [15] RAJFER J, TURNER TT, RIVERA F, HOWARD SS, SIKKA SC. Inhibition of testicular testosterone biosynthesis following experimental varicocele in rats. *Biol Reprod* 1987; **36**: 933–937.
- [16] RIVIER C, RIVIER J, VALE W. Stress-induced inhibition of reproductive functions: role of endogenous corticotropin-releasing factor. *Science* 1986; **231**: 607–609.
- [17] SAEZ JM, AVALLET O, LEJEUNE H, CHATELAIN PG. Cell-cell communication in the testis. *Horm Res* 1991; **36**: 104–115.
- [18] SHARPE RM. Intratesticular control of steroidogenesis. *Clin Endocrinol* 1990; **33**: 787–807.
- [19] SHARPE RM, MADDOCKS S, KERR JB. Cell-cell interactions in the control of spermatogenesis as studied using Leydig cell destruction and testosterone replacement. *Am J Anat* 1990; **188**: 3–20.
- [20] SKINNER MK. Cell-cell interactions in the testis. *Endocr Rev* 1991; **12**: 45–77.
- [21] SPITERI-GRECH J, NIESCHLAG E. Paracrine factors relevant to the regulation of spermatogenesis – a review. *J Reprod Fertil* 1993; **98**: 1–14.
- [22] TAHKA KM. Local control mechanisms in the testis. *Int J Dev Biol* 1989; **33**: 141–148.
- [23] TINAJERO JC, FABBRI A, DUFAU ML. Regulation of corticotropin-releasing factor secretion from Leydig cells by serotonin. *Endocrinology* 1992; **130**: 1780–1788.
- [24] TINAJERO JC, FABBRI A, DUFAU ML. Serotonergic inhibition of rat Leydig cell function by propranolol. *Endocrinology* 1993; **133**: 257–264.
- [25] TSAGARAKIS S, NAVARRA P, REES LH, BESSER M, GROSSMAN A. Morphine directly modulates the release of stimulated corticotropin-releasing factor-41 from rat hypothalamus *in vitro*. *Endocrinology* 1989; **124**: 2330–2335.
- [26] ULISSE S, FABBRI A, DUFAU ML. Corticotropin releasing factor receptors and action in the rat Leydig cell. *J Biol Chem* 1989; **264**: 2156–2163.
- [27] ULISSE S, FABBRI A, DUFAU ML. A novel mechanism of action of corticotropin releasing factor in rat Leydig cell. *J Biol Chem* 1990; **265**: 1964–1971.
- [28] VALE W, SPIESS J, RIVIER C, RIVIER J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 1981; **213**: 1394–1397.
- [29] VERHOEVEN G. Local control systems within the testis. *Clin Endocrinol Metab* 1992; **6**: 313–333.

Otrzymano: 10.12.1994 r.

Przyjęto: 19.01.1995 r.

Adres autora: Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6

ULTRASTRUKTURALNE I MOLEKULARNE ASPEKTY EKSPRESJI JĄDERKOWYCH GENÓW rRNA

ULTRASTRUCTURAL AND MOLECULAR ASPECTS OF THE NUCLEOLAR rRNA GENES EXPRESSION

Grzegorz WILCZYŃSKI

Zakład Histologii i Embriologii Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie: W ostatnich latach osiągnięto znaczny postęp w badaniach molekularnych aspektów biogenezy rybosomów w jąderku: 1) wyizolowano i określono własności czynników biorących udział w inicjacji, elongacji i terminacji transkrypcji przez RNA polimerazy I, 2) wyjaśniono funkcję U3 i U8 snRNA w obróbce pre-rRNA, 3) odkryto nową grupę jąderkowych snRNA - kodowanych w intronach. Nie udało się natomiast, pomimo wielu prób, stworzyć jednego powszechnie akceptowanego modelu ultrastrukturalnej lokalizacji transkrypcji rDNA.

Słowa kluczowe: jąderko, rybosomalne DNA, rybosomalne RNA, czynniki transkrypcyjne, małe jąderkowe RNA

Summary: Recent progress in understanding the ribosome biogenesis in the nucleolus at the molecular level is a consequence of: 1) isolation and characterization of RNA polymerase I transcription initiation, elongation and termination factors, 2) unraveling the function of U3 and U8 snRNA in pre-rRNA processing, 3) the discovery of novel intron-encoded nucleolar snRNA species. In contrast the precise location of the transcription of rRNA genes at the ultrastructural level, despite considerable effort, have not been established unambiguously.

Key words: cell nucleolus, ribosomal DNA, ribosomal RNA, transcription factors, small nuclear RNA

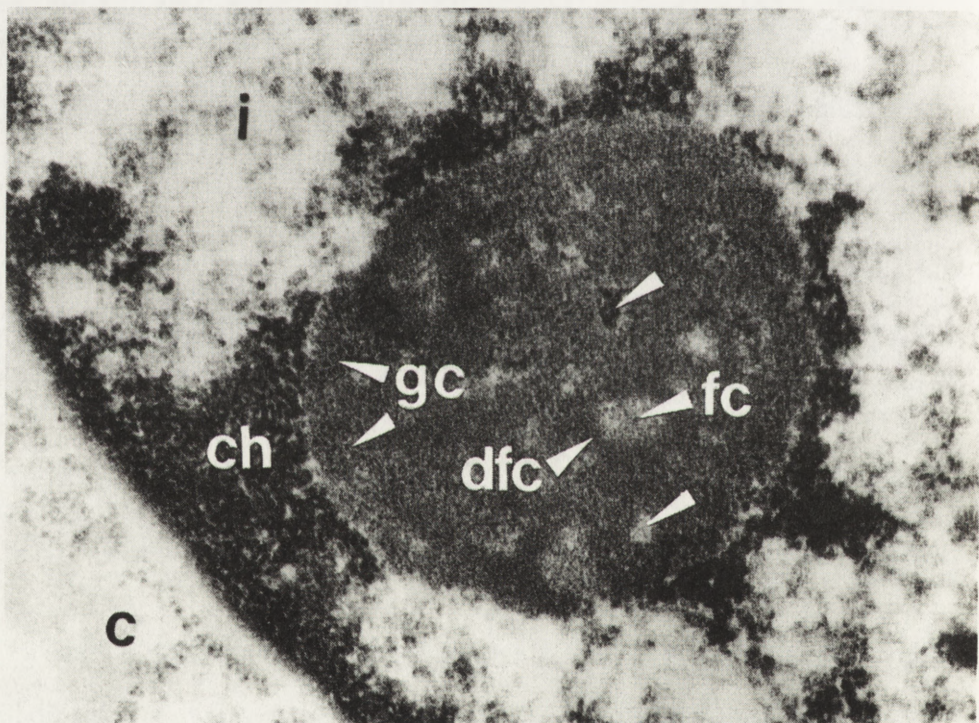
Miejscem biogenezy rybosomów w komórkach eukariotycznych jest jąderko [85, 86, 28, 20]. W jąderku zachodzi transkrypcja genów kodujących 18S, 5,8S i 28S rRNA, obróbka pierwotnych transkryptów oraz wiązanie powstających cząsteczek rRNA ze składnikami pochodzącymi spoza jąderka: białkami rybosomalnymi i 5S rRNA. Utworzone w ten sposób podjednostki rybosomów są transportowane do cytoplazmy,

gdzie prawdopodobnie mają miejsce ostatnie etapy ich dojrzewania. W niniejszym artykule zostaną przedstawione niektóre z nowych wiadomości na temat ultrastrukturalnej lokalizacji jąderkowych genów rRNA, jak również na temat molekularnych i ultrastrukturalnych aspektów transkrypcji tych genów i obróbki pierwotnych transkryptów w komórkach kręgowców.

Na poziomie ultrastrukturalnym, w typowym jąderku ssaków, można wyróżnić następujące składniki morfologiczne (rys. 1) [20,28]:

1) ośrodki włókniste (ang. *fibrillar centers*, FC), zbudowane z włókienek o średniej gęstości elektronowej i o średnicy ok. 5 nm;

2) gęsty składnik włóknisty (ang. *dense fibrillar component*, DFC), zbudowany z elektronowo gęstych włókienek o średnicy 4–10 nm, otaczający w postaci nieciągłej warstwy poszczególne ośrodki włókniste:



Rys. 1. Jąderko w komórce Panetha w jelicie cienkim człowieka, zdjęcie z mikroskopu elektronowego (preparat acetylowany), powiększenie 40 000 razy: fc – ośrodek włóknisty; dfc – gęsty składnik włóknisty; gc – składnik ziarnisty; ch – chromatylna okołojąderkowa; strzałki (bez podpisu) wskazują grudkę chromatylną wewnątrzjąderkową (elektronowo gęsta) i wakuolę jąderkową (elektronowo jasna);

3) składnik ziarnisty (ang. *granular component*, GC), zbudowany z elektronowo gęstych ziaren o średnicy ok. 20 nm; w składniku ziarnistym zatopione są ośrodki włókniste wraz z gęstym składnikiem włóknistym; o ile budowa molekularna i procesy zachodzące w FC i DFC są do tej pory przedmiotem sporów (patrz niżej), o tyle zgodnie przyjmuje się, że ziarna tworzące GC są prekursorami podjednostek rybosomów [28,20];

4) chromatynę jąderkową, która otacza jąderko (chromatyna okołojąderkowa) i tworzy wnikać do jego wnętrza wypustki (chromatyna wewnątrzjąderkowa); wypustki te często stykają się z ośrodkami włóknistymi; chromatyna jąderkowa pod względem morfologicznym nie różni się od reszty chromatyny;

5) wakuole jąderkowe (ang. *nucleolar vacuoles* albo *interstices*) będące niewielkimi, okrągłymi obszarami o małej gęstości elektronowej. Obszary te występują wewnątrz składnika ziarnistego oraz w sąsiedztwie ośrodków włóknistych i zawierają nierzadko grudki chromatyny jąderkowej. Termin wakuole jąderkowe, przyjęty w piśmiennictwie polskim, niezbyt dobrze określa naturę tych struktur, bowiem w przeciwieństwie do innych rodzajów wakuoli komórkowych nie są one otoczone błoną.

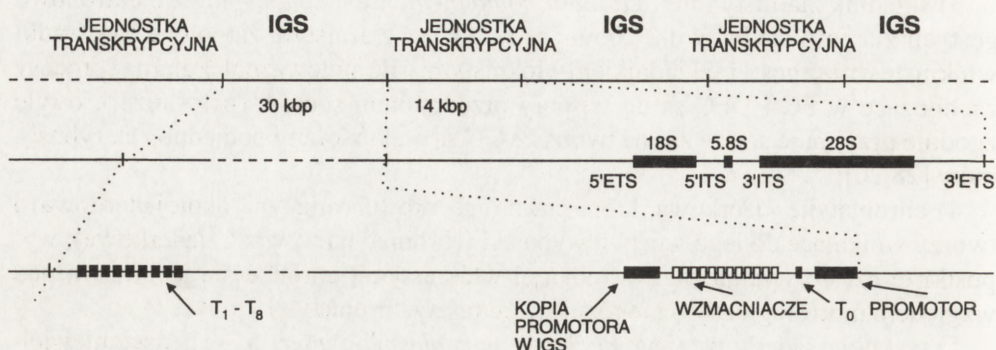
Rozmieszczenie składników w jąderku zależy od typu komórki i jej stanu czynnościowego i niekiedy znacznie odbiega od podanego powyżej opisu. Odróżnienie poszczególnych składników, a zwłaszcza DFC i GC, nie zawsze jest łatwe. W tym celu przydatne może być stosowanie specjalnych technik obróbki materiału (rys. 1).

1. GENY rRNA (rDNA)

U wszystkich organizmów eukariotycznych geny rRNA występują w wielu kopiach. Fenomen ten odzwierciedla wysokie zapotrzebowanie komórki na rRNA. W większości przypadków liczba kopii w haploidalnym genomie waha się w granicach od 50 do 10000. Człowiek ma ok. 200, mysz ok. 100, a *Xenopus laevis* ok. 600 kopii [28,93].

Geny rRNA są zgrupowane w jednym lub w kilku chromosomach, w miejscach zwanych organizatorami jąderka (ang. *nucleolus organizer region*, NOR) [28,86]. Miejsca te można zidentyfikować za pomocą hybrydyzacji *in situ* lub barwienia płytek metafazalnych przy użyciu soli srebra. W prawidłowych diploidalnych komórkach ludzkich geny rRNA występują w pięciu parach chromosomów: 13, 14, 15, 21, 22.

Geny rRNA mają charakterystyczny układ (rys. 2), wspólny dla większości eukariotów [93]. Odcinki transkrybowane są ułożone regularnie, na przemian z odcinkami nietranskrybowanymi. Te drugie zwane są IGS (ang. *intergenic spacers*) albo NTS (ang. *non-transcribed spacers*). Odcinek transkrybowany zawiera po jednej kopii każdej z trzech sekwencji kodujących rRNA (18S, 5,8S i 28S). Między sekwencjami kodującymi, a także na pograniczu z IGS, znajdują się sekwencje transkrybowane, lecz nie występujące w dojrzałych cząsteczkach rRNA: ITS oraz ETS (ang. *internal*



Rys. 2. Schemat organizacji rDNA u myszy [93,71]; T₁-T₈ i T₀, sekwencje terminatorowe

and external transcribed spacers). Są one wycinane i degradowane podczas obróbki pre-rRNA. Sekwencje kodujące rRNA wraz z ITS i ETS tworzą wspólną jednostkę transkrypcyjną. Sekwencje kodujące są wysoce konserwatywne ewolucyjnie, natomiast pozostałe sekwencje wykazują u różnych gatunków jedynie ograniczoną homologię i mogą różnić się znacznie długością [93].

Wewnątrz IGS zlokalizowano szereg sekwencji regulacyjnych (rys. 2). Znaczenie tych sekwencji bada się zazwyczaj w transkrypcji zrekonstruowanej *in vitro* (w ekstraktach komórkowych), albo *in vivo*, po transfekcji do odpowiednich komórek [98]. Układ elementów regulacyjnych oraz ich funkcja są podobne, nawet u tak odległych ewolucyjnie organizmów, jak ssaki i płazy, mimo że sekwencje nukleotydowe są zupełnie różne. Najważniejszą sekwencją regulacyjną jest promotor. Na promotorze dochodzi do utworzenia kompleksu pomiędzy RNA polimerazą I a czynnikami transkrypcyjnymi i do inicjacji transkrypcji [93]. W promotorze wyróżnia się dwie zasadnicze domeny: promotor główny (ang. *core promoter*) oraz UCE (ang. *upstream control element*). Mutacje promotora głównego drastycznie upośledzają transkrypcję *in vitro* i *in vivo*, podczas gdy mutacje UCE wywierają efekt głównie *in vivo* [40,98]. Dwa inne rodzaje sekwencji regulacyjnych: kopie promotora położone wewnątrz IGS (ang. *spacer promoter*) oraz wzmacniacze (ang. *enhancers*) stymulują transkrypcję genów rRNA, lecz mechanizm tego efektu nie jest jasny [71,97,98,110]. Kopie promotora mogą być miejscem inicjacji transkrypcji *in vitro* i *in vivo*, jednak w warunkach naturalnych powstające transkrypty są prawdopodobnie nietrwałe [110]. Kolejnym typem sekwencji regulacyjnej jest terminator. Liczne sekwencje terminatorowe są położone w kierunku 3' od końca sekwencji kodującej 28S rRNA, a jedna w sąsiedztwie promotora [26,48,93] (rys. 2). U ssaków terminacja transkrypcji zachodzi zazwyczaj w pobliżu pierwszego terminatora (licząc od końca sekwencji kodującej 28S rRNA). W analogicznym miejscu u *Xenopus laevis* dochodzi do uwolnienia pierwotnego transkrypty, natomiast wydaje się, że polimeraza przemiesz-

cza się dalej, syntetyzując nietrwały transkrypt, aż do miejsca położonego w sąsiedztwie promotora [48,93]. Terminator znajdujący się w pobliżu promotora blokuje również cząsteczki polimerazy, dla których miejscem inicjacji są kopie promotora w IGS [93]. Wykazano, że obecność tej sekwencji stymuluje inicjację transkrypcji na promotorze [26].

1.1. LOKALIZACJA rDNA

Odpowiednikiem reakcji Feulgena na poziomie mikroskopii elektronowej jest metoda wybiórczego kontrastowania DNA za pomocą kompleksu aminowo-osmowego. Powyższa metoda, podobnie jak niektóre z innych tradycyjnych metod cytochemicznych, ujawnia obecność DNA w trzech ultrastrukturalnych składnikach jąderka: w chromatynie jąderkowej, w ośrodkach włóknistych (FC) oraz w gęstym składniku włóknistym (DFC) [13,14,20,64].

Rozwój immunocytochemii oraz wykorzystanie osiągnięć biologii molekularnej do badań ultrastrukturalnych umożliwiły w ostatnich latach opracowanie nowych metod wykrywania DNA. Metody te, pod względem specyficzności i zdolności rozdzielczej, znacznie przewyższają tradycyjne procedury cytochemiczne. Duże znaczenie wydaje się mieć zastosowanie żywic hydrofilowych do zatapiania tkanek oraz złota koloidalnego jako znacznika przeciwciał. Nowe żywice zapewniają efektywną reakcję antygenów z przeciwciałami przy dobrym zachowaniu ultrastruktury, natomiast ziarna złota koloidalnego umożliwiają uzyskanie wysokiej rozdzielczości. Zastosowanie nowych metod znacznie wzbogaciło wiedzę o budowie jąderka, jednakże ze względu na sprzeczne wyniki, uzyskiwane za pomocą różnych technik, nawet w komórkach jednego typu (np. w komórkach Sertoliego, patrz niżej), rozmieszczenie DNA (w tym rDNA) w jąderku jest ciągle zagadnieniem kontrowersyjnym.

Badania immunocytochemiczne z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych przeciwko DNA, w różnych rodzajach komórek, przyniosły wyniki częściowo rozbieżne. Podczas gdy w mysich komórkach raka Ehrlicha wykazano obecność DNA w chromatynie jąderkowej oraz w FC [108], to w ludzkich komórkach Sertoliego [64] oraz w hepatocytach szczura [39] wykryto DNA w chromatynie jąderkowej oraz w DFC.

Jedną z nowych metod detekcji DNA łączy immunocytochemię z użyciem enzymu, terminalnej transferazy dezoksynukleotydów (TdT) [102]. Podstawą tej metody jest fakt, że w wyniku skrawania komórek i tkanek zatopionych w żywicy, ponad powierzchnię skrawków wystają wolne końce przeciętych nici DNA. Terminalna transferaza dezoksynukleotydów dodaje do tych wolnych końców trójfosforan bromodezoksyurydyny. W następnym etapie cząsteczki bromodezoksyurydyny są wykrywane za pomocą przeciwciał monoklonalnych w dwustopniowej reakcji immunocytochemicznej, z ziarnami złota koloidalnego jako znacznikiem [102]. Przygotowanie materiału (utrwalanie, żywice) jest takie, jak w rutynowej mikroskopii elektronowej. Metoda ta jest czuła, a jednocześnie zapewnia wysoką rozdzielczość i doskonałe

zachowanie ultrastruktury. W komórkach eukariotycznych poza jądrem komórkowym, stosując tę metodę, można wykazać obecność DNA w mitochondriach i plastydach komórek roślinnych; można również uwidocznić DNA w komórkach prokariotycznych i w kapsydach wirusów [102]. W jąderku, za pomocą reakcji z TdT, wykazano obecność DNA w chromatynie jąderkowej oraz w FC, natomiast nie wykryto go w DFC i GC. Wyniki identyczne, pomimo znacznych różnic w budowie jąderka, uzyskano zarówno w komórkach stransformowanych (ludzkie komórki HeLa, K562, Hep-2 [109]; małpie komórki COS [102]; mysie komórki raka Ehrlicha [102,104,109], L1210 [109]; chemiczne komórki CHO [109]), jak i w prawidłowych komórkach ludzkich tkanek np. w spoczynkowych limfocytach [114] i w komórkach Sertoliego [103]. Gęstość znakowania (liczba ziaren złota koloidalnego na μm^2 powierzchni) nad chromatyną jąderkową jest, w metodzie z TdT, średnio o rząd wielkości większa niż nad FC [103,109,114]. W niektórych przypadkach obserwuje się większą gęstość znakowania na obrzeżach niż wewnątrz ośrodków włóknistych [102,109].

W przeciwieństwie do wyżej przedstawionych technik *in situ* hybrydyzacja na poziomie ultrastrukturalnym umożliwia specyficzną lokalizację rDNA. Metoda ta opiera się na immunocytochemicznej detekcji hybryd, utworzonych pomiędzy sondą (fragment DNA komplementarny do określonej sekwencji w obrębie rDNA) a rDNA znajdującym się na powierzchni ultracienkich skrawków. Hybrydyzacja *in situ* wymaga specjalnego przygotowania materiału i ścisłego ustalenia optymalnych warunków reakcji. Podobnie jak w przypadku innych metod, wyniki hybrydyzacji *in situ*, uzyskane w różnych laboratoriach, są rozbieżne. Za pomocą sond komplementarnych do różnych odcinków w obrębie rDNA stwierdzono, że w komórkach HeLa [74] oraz w komórkach raka Ehrlicha myszy [106,107] geny rRNA występują w ośrodkach włóknistych oraz w chromatynie jąderkowej. W obu typach komórek sygnał otrzymany za pomocą sondy komplementarnej do IGS był silniejszy nad chromatyną jąderkową niż nad FC. Wynik odwrotny uzyskano za pomocą sond komplementarnych do sekwencji transkrybowanych. W cytowanych pracach [74,106,107] nie stwierdzono obecności rDNA w DFC ani w GC. Eksperymenty przeprowadzone z użyciem ludzkich komórek Sertoliego [117] i ludzkich limfocytów spoczynkowych [116] sugerują odmienną dystrybucję rDNA: sygnał hybrydyzacji zarejestrowano w nich głównie nad DFC, zarówno w przypadku sond komplementarnych do sekwencji transkrybowanych [116,117] jak i sond komplementarnych do IGS [117]. Gęstość znakowania pozostałych składników jąderka (FC,GC) nie różniła się w sposób istotny od tła [117]. Nie uwzględniono obecności chromatyny wewnątrzjąderkowej [116,-117]. Powyższe wyniki są sprzeczne z wynikami uzyskanymi, w obu typach komórek, za pomocą metody z TdT (patrz wyżej). Rezultaty hybrydyzacji zgodne z otrzymanymi w normalnych komórkach ludzkich, uzyskano także w hepatocytach szczura [39], stosując sondę komplementarną do części transkrybowanej rDNA.

Podsumowując: większość przedstawionych powyżej wyników jest zgodna co do obecności DNA (a także specyficznie rDNA) w skupieniach chromatyny jąderkowej. Większość danych wskazuje na brak DNA w GC. Jeśli zaś chodzi o pozostałe składniki jąderka, to niektórzy autorzy lokalizują rDNA głównie w FC, inni głównie w DFC, a jeszcze inni zarówno w FC jak i w DFC. Możliwych jest kilka przyczyn tych rozbieżności:

1) Stosowane metody mogą różnić się znacznie czułością, chociaż brak jest danych ilościowych na ten temat. W ludzkich komórkach Sertoliego metoda z kompleksem aminowo-osmowym [64] oraz metoda z TdT [103] wykazują obecność DNA w ośrodkach włóknistych, w przeciwieństwie do immunocytochemii [64] i hybrydyzacji *in situ* [117]. Być może zatem, stężenie DNA w FC, w tym typie komórek, jest poniżej czułości dwóch ostatnich metod. Z drugiej jednak strony, również w komórkach Sertoliego, metoda z kompleksem aminowo-osmowym, immunocytochemia i hybrydyzacja *in situ* ujawniają obecność DNA w DFC [64,117], w przeciwieństwie do metody z TdT [103]. W przypadku hybrydyzacji *in situ* szczegóły procedur stosowanych w różnych laboratoriach odbiegają od siebie. Dotyczy to zwłaszcza wstępnego przygotowywania skrawków (np. [74] i [39]). Niewykluczone, że rzutuje to w istotny sposób na otrzymywane wyniki.

2) Poszczególne metody w różnym stopniu zachowują ultrastrukturę jądra komórkowego. Najwyższą jakość obrazów morfologicznych daje metoda z TdT, zwłaszcza gdy połączy się ją z acetylacją materiału [103,109,114]. W tych warunkach rozpoznanie poszczególnych składników jąderka nie sprawia trudności. Przeciwnie, obrazy otrzymywane w hybrydyzacji *in situ* często nie pozwalają na rozróżnienie DFC i chromatyny jąderkowej albo DFC i GC (zdjęcia publikowane w [117] i [74]). Zastrzeżenia te dotyczą także metody z kompleksem aminowo-osmowym [14]. Immunocytochemia z przeciwciałami antyDNA wydaje się zajmować pod tym względem miejsce pośrednie. W związku z powyższym wydaje się, że różna interpretacja morfologii składników jąderka może być w znacznej mierze przyczyną rozbieżności w otrzymywanych wynikach. Ilustracją tego wydają się być cytowane wcześniej badania ludzkich komórek Sertoliego i limfocytów za pomocą hybrydyzacji *in situ* [116,117]. Możliwe, że sygnał otrzymany w tych doświadczeniach nad DFC był wynikiem błędnej interpretacji i pochodził w istocie od chromatyny jąderkowej, której obecności nie uwzględniono [105].

3) Nie można wykluczyć możliwości, że w różnych typach komórek geny dla rRNA są rozmieszczone odmiennie. Wśród badanych komórek były bowiem zarówno komórki nowotworowe, jak i komórki normalnych tkanek, i to różnych gatunków.

2. TRANSKRYPCJA

Geny kodujące 18S, 5.8S i 28S rRNA są transkrybowane przez RNA polimerazę I [93]. Enzym ten jest kompleksem polipeptydowym, o masie ponad 500 kD, składającym się u ssaków (w zależności od źródła i metody izolacji) z 4 do 8 podjednostek [93,97,101]. Szacuje się, że w jądrze komórkowym (wątroba szczura) występuje ok.

$2,5 \times 10^4$ cząsteczek RNA polimerazy I [28]. Aktywność polimeryzacyjna enzymu wynosi w przybliżeniu 30 nukleotydów/s [97]. Szersze omówienie budowy i funkcji RNA polimerazy I można znaleźć w [101].

W transkrypcji rDNA, oprócz enzymu polimeryzującego, bierze udział szereg białkowych czynników transkrypcyjnych. Izolowanie i badanie własności poszczególnych czynników stało się możliwe dzięki opracowaniu układów doświadczalnych odtwarzających prawidłową inicjację, elongację i terminację transkrypcji *in vitro*, w ekstraktach komórkowych [98]. Niektórych czynników do tej pory nie wyizolowano w stanie czystym, jako pojedynczych polipeptydów lub kompleksów polipeptydowych o znanym składzie i stechiometrii. Powyższe czynniki definiuje się nadal jako frakcje, podając procedurę wyodrębniania oraz sposób badania ich aktywności. Nie istnieje jednolita nomenklatura czynników transkrypcyjnych. Poszczególne laboratoria, badające różne gatunki i stosujące odmienne procedury oczyszczania, nadają własne nazwy wyizolowanym przez siebie czynnikom. Do czynników inicjacji transkrypcji należą:

- 1) czynnik UBF (patrz podrozdział 2.1).
- 2) czynnik SL1 (patrz podrozdział 2.2).
- 3) czynniki TIF-IA, TFIC i C^* .

Mają one podobne właściwości, jednak nie jest pewne, czy są tym samym białkiem (każdy z nich pochodzi z innego typu komórek mysich) [7,21,55,56,88,91]. Wyniki doświadczeń sugerują, że TIF-IA, TFIC i C^* biorą udział w regulacji transkrypcji. Zahamowanie syntezy rRNA w komórkach będących w fazie stacjonarnej oraz w komórkach poddanych działaniu hormonów czy inhibitorów syntezy białek jest w znacznej mierze związane z drastycznym obniżeniem aktywności wyżej wymienionych czynników [7,56,88,91]. Wspólną cechą wszystkich trzech frakcji jest też ścisły związek z RNA polimerazą I. Oddzielenie ich aktywności od transferazy nukleotydów jest żmudne i wymaga wieloetapowej chromatografii [7,56,88]. Wydaje się, że czynnik C^* , a być może również dwa pozostałe czynniki, ulegają inaktywacji podczas transkrypcji [7,56,91].

4) Czynnik TIF-IC. Jak dotąd, został on zidentyfikowany wyłącznie u myszy, przez jedną grupę badaczy [87,89]. Podobnie jak TIF-IA (TFIC, C^*), jest on ściśle związany z RNA polimerazą I [89]. Wykazano, że czynnik ten uczestniczy zarówno w inicjacji transkrypcji jak i w elongacji [89].

In vitro, pierwszym etapem inicjacji transkrypcji genów rRNA u wszystkich badanych gatunków jest utworzenie na promotorze kompleksu pomiędzy UBF a czynnikiem SL1 [4,63,87]. Z kompleksem tym wiąże się następnie RNA polimeraza I. W ekstraktach z komórek mysich utworzenie pełnego kompleksu inicjacyjnego wymaga przyłączenia w dalszej kolejności czynników TIF-IC i TIF-IA (TFIC, C^*) [87]. Możliwe że *in vivo* czynniki te są związane z polimerazą. Nie jest pewne, czy ich odpowiedniki występują również u innych gatunków.

Czynnik terminacji: TTF I, występujący u myszy i u człowieka, wiąże się specyficznie z sekwencjami terminatorowymi (w tym również z terminatorem znajdującym się w sąsiedztwie promotora) i warunkuje zakończenie elongacji oraz uwolnienie pre-rRNA poprzez oddziaływanie z polimerazą [45,70,94].

Charakterystyczną cechą ekspresji rDNA, w odróżnieniu od innych genów, jest jej specyficzność gatunkowa. Oznacza to, że ekstrakty komórkowe nie są zdolne do prawidłowej transkrypcji obcogatunkowych genów rRNA. Zasada ta nie obowiązuje w przypadku blisko spokrewnionych gatunków.

2.1 UBF

W szeregu eksperymentów wykazano, że czynnik UBF (ang. *upstream binding factor*) stymuluje transkrypcję rDNA przez RNA polimerazę I *in vitro* [4,37,44,63] i *in vivo* [47]. Mechanizm tego efektu jest najprawdopodobniej złożony:

1) UBF uczestniczy w formowaniu się kompleksu inicjacyjnego na promotorze genów rRNA, oddziałując z czynnikiem SL1 [4,37,63,87] i prawdopodobnie także z polimerazą I [90].

2) UBF znosi działanie białkowych inhibitorów transkrypcji rDNA: autoantygeny Ku [46,44], topoizomerazy II [6] oraz histonu H1 [47,44].

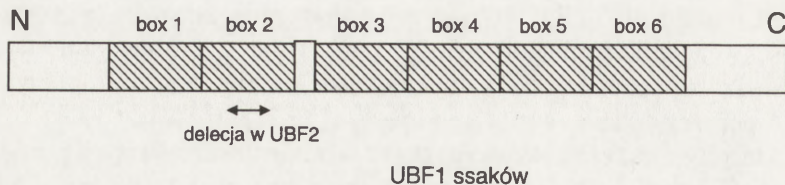
Pomimo że wyżej wymienione własności zostały dobrze udokumentowane *in vitro*, obecnie nie jest pewne, które z nich odpowiadają rzeczywistej roli UBF w komórce.

Czynnik UBF wyizolowano z komórek człowieka (hUBF) [4,37], myszy (mUBF) [71], szczura (rUBF) [72,95] i *Xenopus laevis* (xUBF) [63]. W komórkach ssaków UBF występuje w postaci dwóch polipeptydów o masach ok. 97 kD (UBF1) i ok. 94 kD (UBF2). UBF1 i UBF2 powstają w wyniku translacji dwóch różnych cząsteczek mRNA [33,67]. U myszy, a prawdopodobnie także u innych ssaków, oba mRNA są produktami jednego genu, powstałymi wskutek alternatywnej obróbki pierwotnego transkryptu [67]. U *Xenopus laevis*, za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym, można zidentyfikować trzy prążki odpowiadające UBF o masach w granicach 82–85 kD [63]. Analiza cDNA wykazała jednak, że w komórkach *Xenopus laevis* UBF występuje w co najmniej czterech różnych formach molekularnych, będących najprawdopodobniej produktami trzech genów [27]. Liczba cząsteczek UBF w komórce wynosi u ssaków ok. 10^4 [4].

2.1.1 . STRUKTURA UBF

Analiza cDNA UBF u różnych gatunków wykazała, że jest on białkiem wysoce konserwatywnym. Stopień homologii sekwencji aminokwasowej wynosi ok. 98% wśród ssaków [33,67] i ok. 73% pomiędzy człowiekiem a *Xenopus laevis* [2].

Głównym elementem strukturalnym w cząsteczce UBF są domeny wykazujące homologię do niehistonowych białek chromatyny, HMG1 i HMG2 [2,33,37,67]. HMG1 i HMG2 są prototypem rodziny białek, zawierających wspólny motyw strukturalny (ang. *HMG box*) o długości ok. 80 aminokwasów [25]. Do rodziny tej, oprócz



Rys. 3. Schemat budowy czynnika UBF; objaśnienia w tekście

UBF, należą m.in.: mitochondrialny czynnik transkrypcyjny mtTF-1, czynnik determinujący płeć SRY oraz czynnik wiążący się ze wzmacniaczami genu TCR α w limfocytach (LEF-1) [25]. Wszystkie powyższe białka wiążą się z DNA.

UBF ssaków zawiera 6 domen HMG, homologicznych w 20–30% do odpowiednich domen w białkach HMG1/2 (rys. 3) [8,33,67]. Różnica pomiędzy UBF1 a UBF2 polega na delecji fragmentu HMG box 2 w cząsteczce UBF2. Delecja ta występuje w tej samej pozycji u wszystkich ssaków. UBF *Xenopus laevis* zawiera 5 domen typu HMG box. Brak w nim odpowiednika domeny czwartej ssaków [2]. Drugim charakterystycznym elementem w cząsteczce UBF jest fragment C-końcowy, w którym ponad połowa reszt aminokwasowych ma charakter kwaśny [2,33,37,67]. Obecność HMG box 4 jak również HMG box 1 i odcinka C-terminalnego warunkuje (u myszy) transport UBF do jądra komórkowego i jąderka [54].

Ocinek N-końcowy zawiera fragment odpowiedzialny za tworzenie dimerów [62]. Fragment ten składa się z dwóch, prawdopodobnie helikalnych domen oddzielonych odcinkiem nieistotnym dla dimeryzacji. Na poziomie sekwencji aminokwasowej domena dimeryzacyjna UBF nie wykazuje znaczącej homologii z żadnym znanym motywem tego typu. Nie wykazano tworzenia kompleksów UBF o liczbie podjednostek większej niż dwa [62].

2.1.2. WIĄZANIE Z DNA

Czynnik UBF wiąże się z promotorem głównym oraz z UCE, u wszystkich badanych gatunków [4,49,71,72]. Wykazano także wiązanie się UBF z innymi sekwencjami regulacyjnymi (kopie promotora, wzmacniacze [71,72]). Poszczególne miejsca wiązania UBF charakteryzują się tylko ograniczoną homologią. Co więcej, wiązanie UBF z wyżej wymienionymi elementami nie jest specyficzne gatunkowo. Na przykład xUBF wiąże się w tych samych miejscach ludzkiego promotora co hUBF [5] oraz w tych samych miejscach mysiego promotora co mUBF [71]. W związku z powyższym nie jest możliwe jednoznaczne określenie sekwencji nukleotydowej, z którą wiąże się UBF, czyli tzw. sekwencji konsensusu (ang. *consensus sequence*). Zostało to potwierdzone w badaniach interakcji UBF z dużą liczbą oligonukleotydów o przypadkowo dobranych sekwencjach (4^{15} różnych sekwencji) [11]. Stałą dysocjacji kompleksu xUBF z promotorem oszacowano na 15–20 nM [35,49]. Wydaje się, że UBF oddziałuje z rowkiem większym DNA [11]. Głównym elementem odpo-

wiedzialnym za wiązanie UBF-u z DNA są domeny HMG [35,37,49,54,62]. Poszczególne HMG box różnią się między sobą siłą wiązania z DNA, jednak nie jest jasne, jaki wpływ mają one na powinowactwo UBF jako całości i czy któraś z nich pełni dominującą rolę [35,37,54].

Rezultaty niektórych doświadczeń sugerują, że czynnik UBF rozpoznaje raczej strukturę przestrzenną DNA niż sekwencję nukleotydową. UBF wiąże się preferencyjnie, w stosunku do formy liniowej lub kolistej, z superspiralną formą DNA o takiej samej sekwencji [35,47]. Ponadto, w przypadku krótkich, liniowych odcinków DNA, UBF prawdopodobnie nie tworzy kompleksu z jedną helisą, lecz przynajmniej z dwiema [35]. Czynnik ten wiąże się także z tzw. krzyżowym DNA (ang. *cruciform DNA*) [11]. Wysłunięto hipotezę, że podstawową formą strukturalną DNA rozpoznawaną przez UBF jest skrzyżowanie podwójnych helis obecne zarówno w węzłach superspirali, jak i w ułożonych pod kątem dwóch odcinkach liniowych oraz w krzyżowym DNA. Obserwacje w mikroskopie elektronowym sugerują, że UBF aktywnie uczestniczy w tworzeniu powyższych struktur [35]. Wykazano również, że UBF może wiązać się z tRNA [11]. Jakie znaczenie mogą mieć powyższe własności dla funkcji tego czynnika *in vivo*, trudno obecnie rozstrzygnąć.

2.1.3. UDZIAŁ W INICJACJI TRANSKRYPCJI rDNA

Istnieją rozbieżności, czy UBF jest *in vitro* absolutnie niezbędny dla transkrypcji. Niektóre dane wskazują, że u myszy i szczura SL1 może sam tworzyć funkcjonalny kompleks z promotorem, chociaż o mniejszej trwałości [87,95]. W związku z tym obserwuje się pewien poziom transkrypcji bez UBF, tzw. poziom podstawowy. Według niektórych autorów, funkcja tego czynnika (przynajmniej u gryzoni) w inicjacji transkrypcji *in vitro* (a częściowo także *in vivo*) polega na wzmacnianiu oddziaływania SL1 z promotorem [44]. Odmienne jest w przypadku ekstraktów z komórek ludzkich [4,37] i *Xenopus laevis* [63]. Wykazano, że u tych gatunków SL1 samodzielnie nie tworzy funkcjonalnego kompleksu z promotorem (być może nawet nie wiąże się samodzielnie z DNA) [4,37,63], a bez UBF poziom podstawowy transkrypcji jest niski [37] lub niemal zerowy [63]. Wysłunięto hipotezę, że u człowieka i *Xenopus laevis*, UBF jest niezbędny dla transkrypcji *in vitro*, a jego funkcja polega prawdopodobnie na zakotwiczeniu czynnika SL1 na promotorze, w wyniku czego tworzy się trwały, funkcjonalny kompleks.

Wydaje się, że w cząsteczce UBF wszystkie fragmenty są istotne z punktu widzenia aktywności transkrypcyjnej. Delecja którejkolwiek z trzech pierwszych domen HMG box w xUBF znosi całkowicie aktywność transkrypcyjną *in vitro*, natomiast utrata domen 4 i 5 (łącznie) zmniejsza ją dwukrotnie [62]. Duplikacja jednej z domen również znosi aktywność transkrypcyjną. Kolejnym fragmentem niezbędnym dla prawidłowego funkcjonowania UBF jest domena dimeryzacyjna. U *Xenopus laevis* wszelkie mutacje, które interferują z dimeryzacją, całkowicie pozbawiają UBF aktywności [62]. Co ciekawe delecja odcinka rozdzielającego motyw dimeryzacyjny również znosi aktywność transkrypcyjną, mimo że nie upośledza zdolności do dime-

ryzacji. Natomiast utrata całego końca karboksylowego cząsteczki (do granicy z ostatnią domeną HMG box) powoduje u płazów czterokrotne obniżenie aktywności transkrypcyjnej [62], a u ssaków znosi ją całkowicie [115].

Nie stwierdzono prostej korelacji pomiędzy wiązaniem z DNA a aktywnością transkrypcyjną. Mysi UBF2, naturalny mutant pozbawiony fragmentu HMG box 2, który jest praktycznie nieaktywny, w transkrypcji *in vitro* i *in vivo* oddziałuje znacznie słabiej z homologicznym promotorem i wzmacniaczami [47]. Rekombinowany xUBF, pozbawiony jednej z domen HMG lub tylko motywu dimeryzacyjnego, chociaż nieaktywny transkrypcyjnie, wiąże się prawie tak samo dobrze z promotorem jak naturalny UBF [62]. Powyższe obserwacje sugerują, że wiązanie z DNA jest warunkiem koniecznym, ale nie wystarczającym dla prawidłowej inicjacji transkrypcji. Podkreślają one również znaczenie prawidłowej konformacji UBF, to znaczy zachowania układu domen i zdolności do tworzenia dimerów. Można przypuszczać, że inicjacja transkrypcji wymaga wzajemnego dopasowania się czynnika białkowego i promotora w kompleks o unikatowym kształcie przestrzennym, do czego niezbędne jest współdziałanie różnych elementów cząsteczki UBF [49].

Przypuszcza się, że niektóre fragmenty UBF bezpośrednio oddziałują z innymi składnikami aparatu transkrypcyjnego polimerazy I. Taką funkcję przypisuje się fragmentowi C-końcowemu, który ze względu na silny ładunek ujemny miałby wiązać się z dodatnio naładowaną cząsteczką SL1 [37]. Z kolei domeny HMG (u myszy) uczestniczą w oddziaływaniu z podjednostką RNA polimerazy I o masie 62 kD [90]. Stwierdzono, że do wiązania z podjednostką enzymu niezbędne jest zachowanie przynajmniej dwóch HMG box, natomiast fragmenty N- i C-końcowy są zbędne [90]. Mysi UBF oddziałuje również z podjednostką o masie 34,5 kD RNA polimerazy I drożdży oraz, co zupełnie nieoczekiwane, z podjednostką o masie 53 kD RNA polimerazy III tych organizmów.

Pewne dane wskazują, że UBF może odgrywać istotną rolę w regulacji transkrypcji rDNA. Wykazano, że aktywność czynnika jest znacznie wyższa w komórkach intensywnie dzielących się niż w komórkach znajdujących się w fazie stacjonarnej [115]. Efekt ten może być, przynajmniej częściowo, wynikiem fosforylacji końca karboksylowego UBF przez kinazę kazeinową II [115]. Na sumaryczną aktywność transkrypcyjną UBF może również wpływać stosunek pomiędzy UBF1 (aktywnym) a UBF2 (nieaktywnym). W komórkach ssaków znajdujących się w fazie stacjonarnej (linie NIH3T3 i MH134 myszy) ilość mRNA UBF1 jest niemal dwukrotnie mniejsza niż mRNA UBF2 [33]. W wyniku stymulacji podziałów ilości mRNA obu czynników wyrównują się. W normalnych tkankach mysich stosunek mRNA UBF1/ mRNA UBF2 zawiera się w granicach od 0,2 dla płuc do 0,91 dla trzustki. W mózgu wartość ta wynosi 0,86 [33]. U płazów zawartość poszczególnych form UBF jest różna w różnych tkankach i zmienia się w kolejnych stadiach rozwoju zarodkowego [27]. Znaczenie tego jest obecnie niejasne, gdyż nie wiadomo, jakie są różnice funkcjonalne pomiędzy poszczególnymi wariantami UBF u płazów.

2.2. SL1

W ekstraktach komórek kręgowców zidentyfikowano frakcję, która u różnych gatunków charakteryzuje się podobnymi właściwościami fizykochemicznymi (m.in. elucja z kolumn heparynowych przy stężeniu KCl ok. 600 nM.) i jest niezbędna dla transkrypcji rDNA *in vitro* [87]. Czynnikiem ten został nazwany SL1 u człowieka [4] i szczura [95], TIF-IB [87] lub czynnikiem D [97] u myszy, a Rib1 u *Xenopus laevis* [63]. W niniejszym opracowaniu będzie on określany jako SL1. Czynnikiem SL1 jest uważany, przynajmniej u ssaków, za główny składnik odpowiedzialny za selektywność gatunkową aparatu transkrypcyjnego RNA polimerazy I [82]. Oddziaływanie czynnika SL1 z DNA i z UBF jest ciągle zagadnieniem kontrowersyjnym (patrz podrozdział 2.1.3).

W komórkach ssaków czynnikiem SL1 jest kompleksem kilku polipeptydów o łącznej masie 200–250 kD [9,16]. Jednym ze składników tego kompleksu jest białko wiążące sekwencję TATA, czyli TBP (ang. *TATA binding protein*) o masie 38 kD [9,16]. TBP zostało początkowo scharakteryzowane jako składnik czynnika TFII-D, który jest jednym z podstawowych czynników transkrypcyjnych polimerazy II [24,31]. Sekwencja TATA występuje w pozycji ok. –30 (względem punktu startu transkrypcji: +1), w promotorach wielu genów kodujących białka [24,31]. Obecnie wiadomo, że TBP jest wspólnym elementem aparatu transkrypcyjnego wszystkich trzech polimeraz RNA, u wszystkich dotychczas zbadanych organizmów eukariotycznych [23,24]. Oprócz SL1 i TFIID, TBP wchodzi w skład czynnika TFIIB polimerazy III i czynnika SNAP_c, który współdziała z polimerazą III i II. We wszystkich powyższych przypadkach TBP jest związane z kilkoma polipeptydami: tzw. TAF (ang. *TATA binding protein associated factor*) [23,24]. SL1 zawiera 3 TAF, których masy cząsteczkowe wynoszą u człowieka 48, 63 i 110 kD [9], a u myszy 48, 68 i 95 kD [16]. Dwa mniejsze TAF u obu gatunków są podobne. Wydaje się, że to one a nie TBP mogą być odpowiedzialne za wiązanie się SL1 z promotorem [82]. Wszystkie trzy polipeptydy są prawdopodobnie specyficzne dla SL1 [16]. Liczba cząsteczek SL1 w komórce wynosi w przybliżeniu 500 [16]. Model struktury czynnika SL1 został potwierdzony poprzez rekonstrukcję w pełni funkcjonalnej frakcji SL1, przy użyciu rekombinowanego TBP i wysoko oczyszczonych TAF [9,16].

2.3. TRANSKRYPCJA *IN SITU*

Transkrypcję *in situ* można badać pośrednio: poprzez lokalizację rDNA, pre-rRNA lub polimerazy I i związanych z nią białek, albo bezpośrednio: poprzez detekcję znakowanych nukleotydów wbudowywanych do pre-rRNA. Do niedawna jedyną bezpośrednią metodą była autoradiografia [20]. Na podstawie wyników uzyskanych za pomocą metod pośrednich (tradycyjne techniki cytochemiczne) oraz autoradiografii przyjęto model, według którego miejscem syntezy pre-rRNA jest DFC [20]. Wobec niskiej rozdzielczości autoradiografii, powyższy pogląd był w ostatnich latach inten-

sywnie weryfikowany za pomocą nowych, dokładniejszych metod. Wyniki eksperymentów nadal nie rozstrzygają jednak definitywnie, który z trzech najbardziej prawdopodobnych modeli jest właściwy: według pierwszego transkrypcja zachodzi w FC, według drugiego w DFC, natomiast według trzeciego na pograniczu tych dwóch składników. Obszerną dyskusję innych, teoretycznie możliwych scenariuszy można znaleźć w [41].

2.3.1. LOKALIZACJA rRNA

Nowa metoda cytochemiczna służąca do wykrywania RNA na poziomie ultrastrukturalnym polega na zastosowaniu transferazy nukleotydów poliadenylowych (PnT) [104]. Opiera się ona na podobnej zasadzie co metoda z TdT służąca do lokalizacji DNA (patrz podrozdział 1.1). Podstawową różnicą pomiędzy tymi metodami jest użycie odmiennych enzymów, modyfikujących odpowiednio wolne końce RNA albo DNA. Transferaza nukleotydów poliadenylowych dodaje biotynylowany ATP do wolnych końców łańcuchów RNA. Za pomocą powyższej techniki wykazano, w komórkach raka Ehrlicha i w komórkach HeLa, obecność RNA we wszystkich składnikach jąderka (z wyjątkiem chromatyny) [104]. Podobne wyniki uzyskano badając ludzkie komórki Sertoliego [103]. W tych ostatnich gęstości znakowania nad FC i DFC były podobne i w przybliżeniu dwukrotnie większe niż nad GC. Obraz identyczny jakościowo, jak za pomocą poprzedniej metody, uzyskano w komórkach raka Ehrlicha przy użyciu przeciwciał monoklonalnych przeciw RNA, w dwustopniowej immunocytochemii z przeciwciałami znakowanymi złotem koloidalnym [104].

Swoiste wykrywanie rRNA jest możliwe dzięki hybrydyzacji *in situ*. Za pomocą powyższej metody stwierdzono, że w komórkach raka Ehrlicha [104,107], w komórkach 3T3 oraz w komórkach HeLa [74,76] rRNA występuje w GC, DFC oraz w FC. W zależności od typu komórki, metodyki oraz zastosowanej sondy, rRNA zlokalizowano albo wyłącznie na obrzeżach [74,76,107], albo zarówno na obrzeżach jak i wewnątrz ośrodków włóknistych (FC) [104]. Wydaje się, że na wyniki hybrydyzacji nad FC może mieć wpływ sposób znakowania sondy [104]. Niewielkie ilości rRNA wykryto także w nukleoplazmie [104,107]. Zastosowanie kilku sond, komplementarnych do różnych fragmentów w obrębie pre-rRNA (w tym również do odcinków usuwanych w procesie dojrzewania rRNA), umożliwia badanie ultrastrukturalnej lokalizacji kolejnych etapów obróbki pierwotnego transkrypty [74,76]. Przy interpretacji wyników takich eksperymentów należy uwzględnić fakt, że uzyskana w danym miejscu gęstość znakowania zależy nie tylko od stężenia pre-rRNA, lecz także od jego dostępności dla hybrydyzacji z sondą oraz od tzw. potencjału znakowania danej sondy [74]. Potencjał znakowania jest proporcjonalny do liczby biotynylowanych nukleotydów w odcinku sondy komplementarnym do docelowego pre-rRNA. Dlatego, nawet przy założeniu jednakowej dostępności, stosunek gęstości znakowania dwóch różnych rodzajów pre-rRNA nie jest równy stosunkowi ich stężeń, jeżeli potencjały znakowania odpowiednich sond są różne [74]. Wyniki hybrydyzacji *in situ*, w komórkach HeLa [74,76] i w komórkach 3T3 [76], przy użyciu sond komplementarnych do 28S, 18S oraz do 5'ETS, 5'ITS i 3'ITS są zgodne (po analizie uwzględniającej przytoczone wyżej zastrzeżenia) z modelem, według którego DFC (a być

może także brzeg FC) zawiera rosnące transkrypty oraz pre-rRNA na wczesnych etapach obróbki, natomiast GC jest miejscem dalszych etapów obróbki pre-rRNA [74,76]. Wyniki te potwierdzają również pogląd (oparty na wynikach badań biochemicznych), że w stanie równowagi w jąderku jest znacznie więcej 28S niż 18S rRNA.

2.3.2. LOKALIZACJA RNA POLIMERAZY I I UBF

Najbardziej powszechną metodą lokalizacji białek związanych z transkrypcją na poziomie ultrastrukturalnym jest immunocytochemia z zastosowaniem złota koloidalnego [14]. Specyficzne przeciwciała (względem polimerazy I albo UBF) uzyskuje się zwykle poprzez immunizację zwierząt laboratoryjnych albo z surowic ludzi chorych na niektóre choroby autoimmunologiczne, głównie sklerodermię [77,79,81]. Za pomocą immunolokalizacji stwierdzono, że w hepatocytach szczura polimeraza I występuje niemal wyłącznie w ośrodkach włóknistych [79]. Nieco inny obraz uzyskano w komórkach nowotworowych: HeLa oraz w szczurzych liniach PC12 i RV [77]. Obecność polimerazy stwierdzono w nich głównie w FC i w mniejszym stopniu także w DFC. Inny ważny składnik aparatu transkrypcyjnego polimerazy I, czynnik UBF, występuje zarówno w obrębie FC, jak i DFC w kurzych chondrocytach, komórkach PTK1 i TG [81]. Wczesne doniesienia o występowaniu polimerazy I wyłącznie w FC stanowiły poważny argument wspierający model transkrypcji wewnątrz tego składnika. Badania immunocytochemiczne nie mówią jednak nic o aktywności białek. Obecnie nie wydaje się, aby powyższe wyniki miały decydujące znaczenie w kwestii lokalizacji transkrypcji.

2.3.3. METODY BEZPOŚREDNIE

Poważną wadą autoradiografii, jako bezpośredniej metody lokalizacji transkrypcji, jest niska rozdzielczość otrzymywanych obrazów. Rozmiary struktur wewnątrzjąderkowych (FC,DFC) są tego samego rzędu wielkości co długość drogi cząstek, powstałych w wyniku rozpadu promieniotwórczego, w emulsji. Co więcej, stosowane czasy inkubacji komórek ze znakowanymi prekursorami nukleotydów (2–6 min) są zbliżone do czasu syntezy cząsteczki pre-rRNA [14]. Oznacza to że rozmieszczenie znacznika może odpowiadać zarówno miejscom transkrypcji, jak i miejscom akumulacji nowo zsyntetyzowanych transkryptów. Ostatnio podjęto próby przezwyciężenia wyżej wymienionych ograniczeń przez zastosowanie znaczników nieizotopowych: BrUTP lub bromourydyny, wykrywanych za pomocą immunocytochemii na skrawkach ultracienkich [15,34]. Technika ta zapewnia znacznie lepszą rozdzielczość niż autoradiografia (średnica ziaren złota koloidalnego, którymi znakowane są przeciwciała wynosi 5–10 nm). Tempo transkrypcji w obecności nukleotydów znakowanych nieizotopowo jest ponad dwukrotnie mniejsze niż w warunkach naturalnych [34]. Zatem przy krótkich czasach inkubacji (1–5 minut [15,34]) uważa się, że dystrybucja znacznika będzie odzwierciedlać raczej miejsca transkrypcji niż akumulacji pre-rRNA. BrUTP jest lepszym znacznikiem niż bromourydyna, gdyż po dyfuzji do komórki może być natychmiast wykorzystywany w procesie transkrypcji. Niestety, w normalnych warunkach błona komórkowa jest praktycznie nieprzepuszczalna dla

trójfosforanów nukleozydów. Dlatego aby zwiększyć tempo pobierania BrUTP, komórki poddaje się działaniu streptolizyny O, która tworzy w błonie komórkowej pory, przez które związek ten może swobodnie dyfundować [15,34]. W odpowiednio dobranym środowisku, komórki poddane działaniu streptolizyny zachowują zdolność do syntezy kwasów nukleinowych. Jednocześnie ultrastruktura jądra komórkowego (a zwłaszcza jąderka) jest dość dobrze zachowana. Zastosowanie powyższej metody na komórkach HeLa przez dwie grupy badaczy dało częściowo podobne wyniki. Przy krótkich czasach inkubacji występowanie znacznika stwierdzono w DFC i na obrzeżach ośrodków włóknistych [15] albo niemal wyłącznie w DFC [34]. Charakterystyczną cechą otrzymanych obrazów, w obu eksperymentach, była nierównomierna dystrybucja (drobne skupienia) ziaren złota koloidalnego. Według jednych badaczy, ich własne wyniki potwierdzają lokalizację transkrypcji (lub przynajmniej inicjacji transkrypcji) na pograniczu DFC i FC [15], natomiast według innych stanowią dowód na to, że wyłącznie DFC jest miejscem syntezy pre-rRNA [34]. Ci ostatni wiążą to z modelem, w którym gęsty składnik włóknisty jest w istocie nicią rDNA wraz z rosnącymi transkryptami, wędrującą po powierzchni ośrodka włóknistego, gdzie zlokalizowane są nieruchome cząsteczki polimerazy [34]. Według tego modelu, FC stanowiłoby magazyn polimerazy i czynników transkrypcyjnych oraz wewnętrzne rusztowanie jąderka. Dyskusja powyższego modelu w świetle wyników badań biochemicznych jest zawarta w [10].

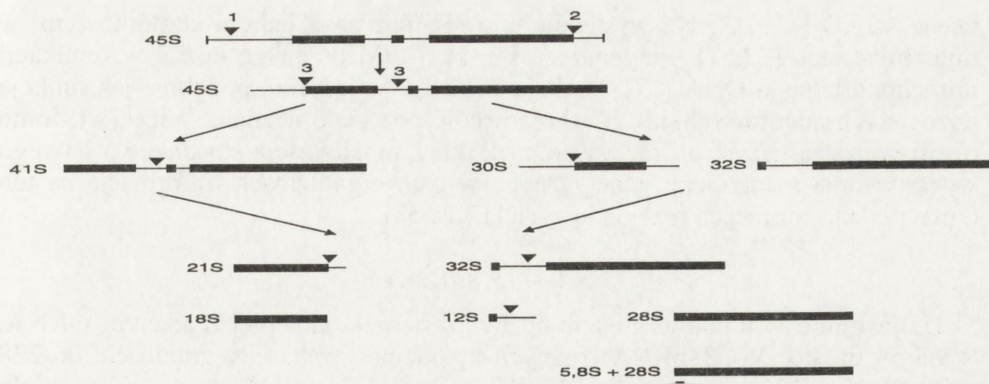
3. OBRÓBKA pre-rRNA

Formowanie się podjednostek rybosomów rozpoczyna się jeszcze przed zakończeniem transkrypcji [28]. Jednym z elementów tego procesu jest intensywna obróbka pre-rRNA:

1) W specyficznych miejscach łańcucha dochodzi do metylacji i pseudourydylacji nukleotydów [28]. Uważa się, że modyfikacje te poprzedzają dalsze etapy obróbki. Prawdopodobnie są one niezbędne dla utworzenia prawidłowej konformacji pre-rRNA lub dla wiązania z białkami.

2) W wyniku serii cięć endonukleolitycznych w obrębie pierwotnego transkryptu zostają uwolnione dojrzałe cząsteczki rRNA, a pozostałe odcinki ulegają degradacji [28,29,30,84]. Wydaje się, że sekwencja cięć jest podobna u wszystkich kręgowców (rys. 4). Alternatywne drogi obróbki mogą współistnieć u jednego osobnika, a nawet w pojedynczej komórce [28,84].

Mechanizmy obróbki pre-rRNA są słabo poznane. Wydaje się, że podobnie jak w obróbce pre-mRNA [61], w procesie tym zaangażowane są małe cząsteczki RNA: snRNA (ang. *small nuclear RNA*). Rolę tę przypisuje się snRNA zlokalizowanym w jąderku [17,18] (tab. 1). Do chwili obecnej, w komórkach kręgowców, zidentyfikowano kilkanaście jąderkowych snRNA (tab. 1). Ich długość wynosi od kilkudziesięciu do ponad dwustu nukleotydów, a liczba w komórce zawiera się w granicach od tysiąca do kilkuset tysięcy. Jąderkowe snRNA tworzą kompleksy z białkami: cząstki rybonukleoproteinowe (ang. *small nuclear ribonucleoprotein particle*, *snRNP*) o stałej sedymentacji 10-90 S [17,18]. Ewolucyjnie konserwatywne białko: fibrylaryna [1], wy-



Rys. 4. Schemat obróbki pre-rRNA w komórkach HeLa (wg [29], zmodyfikowany); strzałki wskazują miejsca cięć endonukleolitycznych; zaznaczono kolejność trzech pierwszych cięć; w niektórych typach komórek cięcie na pograniczu 18S i 5' ITS (w 41S lub jego odpowiedniku) poprzedza cięcie na pograniczu 5' ITS i 5,8S [28,84]; niektóre miejsca nie pokrywają się z granicami dojrzałych cząsteczek rRNA (odpowiednie prekursorzy muszą być dodatkowo przycinane) [29,30]

stępuje w kilku różnych snRNP (tab. 1). Jąderkowe snRNA mogą być kodowane przez oddzielne geny i syntetyzowane przez polimerazę II (U3, U8, U13) lub polimerazę III (7-2/MRP) [17], mogą być również kodowane w intronach genów białek (patrz niżej). Te trzy grupy snRNA mają różną strukturę końca 5' cząsteczki: grupa pierwsza 2,2,7-trimetyloguanozynę, 7-2/MRP trójfosfonukleotydy, grupa trzecia monofosfonukleotydy [17]. Bezpośrednie dowody na udział dwóch snRNA: U3 i U8 w obróbce pre-rRNA u kręgowców istnieją dopiero od niedawna (patrz niżej). Wyjątkową pozycję wśród jąderkowych snRNA zajmuje 7-2/MRP (związane z antygenem To, o

TABELA 1. Jąderkowe snRNA; dane dotyczą snRNA człowieka z wyjątkiem U14 (mysz) oraz U16 i U18 (*Xenopus laevis*); ¹ dotyczy jednej z form molekularnych; bd, brak danych

RNA	Długość [nt]	Liczba kopii w komórce	box	Wiązanie fibrylaryny	Źródło
U3	217	2·10 ⁵	A,B,C',D	+	[68,78,96]
U8	136	4·10 ⁴	C,D	+	[113]
U13	105	10 ⁴	C,D	+	[113]
U14	87	2·10 ⁴	C,D	+	[52,96]
U15	148 ¹	1-3·10 ⁴	C',D	+	[112]
U16	106	bd	C,D	+	[19]
U17/E1	207 ¹	10 ³	-	-	[43,83]
U18	68 ¹	bd	C,D	+	[73]
U19	200	bd	-	-	[17]
U20	80	7·10 ³	C,D	+	[66]
Y	125	1-3·10 ⁴	C',D	+	[112]
E2	154	10 ³	-	-	[80,83]
E3	135	10 ³	-	-	[80,83]
7-2/MRP	268	3·10 ⁴	-	-	[17,22]

masie 40 kD [119]), gdyż występuje ono również poza jądrem komórkowym: w mitochondriach [22,51]. Przypuszcza się, że 7-2/MRP bierze udział w replikacji mitochondrialnego DNA [17]. Funkcja 7-2/MRP w jąderku, podobnie jak funkcja pozostałych jąderkowych snRNA u kręgowców, pozostaje nieznana. Więcej wiadomo o roli tych cząsteczek u drożdży, w związku z możliwością stosunkowo łatwego wykonywania manipulacji genetycznych w tych organizmach. Informacje na ten temat podano w pracach przeglądowych [17,18,58].

3.1. U3 snRNA

U3 jest głównym pod względem liczby cząsteczek, najlepiej zbadanym snRNA. Wielkość cząsteczki U3 snRNA u różnych organizmów waha się w granicach 206-228 nukleotydów [17] (u człowieka 217 [68]). Geny U3 snRNA występują w wielu kopiach, kodujących jedną lub kilka odmian molekularnych [59,118]. W komórkach ludzkich występuje tylko jeden rodzaj U3 snRNA [118]. Całkowita liczba genów U3 snRNA u człowieka nie jest znana. Dotychczas zidentyfikowano 4 funkcjonalne geny (występujące na chromosomie 17 [60]) oraz kilka pseudogenów [118]. Analiza sekwencji nukleotydowych U3 snRNA różnych gatunków wykazała istnienie pięciu konserwatywnych odcinków (ang. *box*), oznaczonych A,B,C,C' i D (rys. 5) [36, 38,112]. Box A i B są specyficzne dla U3 snRNA, natomiast box C (lub C') i D występują również w innych jąderkowych snRNA (tab. 1). Analiza dostępności poszczególnych fragmentów cząsteczki U3 dla modyfikacji kowalencyjnych lub dla trawienia rybonukleazami pozwoliła na opracowanie modelu jej II-rzędowej struktury w komórkach człowieka (rys. 5) [68] i *Xenopus laevis* [38]. Podobną (choć nie identyczną) strukturę II-rzędową przewidziano dla U3 snRNA u innych gatunków opierając się na wynikach modelowania komputerowego [17,68].

U3 tworzy z białkami kompleksy wyższego rzędu, o stałej sedimentacji ok. 15S i 70S [113]. Dotychczas zidentyfikowano 9 białek wchodzących w skład tych kompleksów. Są to białka o masach: 74, 59, 55, 50, 36 (fibrylaryna), 30, 15, 13 i 12,5 kD [53,68]. Białka o masach 74 i 59 kD to fosfoproteiny [68]. Wydaje się, że fibrylaryna oraz białka 74, 59, 30, 13 i 12,5 kD są słabo związane z U3 snRNA (prawdopodobnie pośrednio), gdyż oddysocjują od niego w pod działaniem roztworów o dużym stężeniu soli (300 mM NaCl) [53,68,113]. W przeciwieństwie do nich białka 55, 50 i 15 kD pozostają związane z U3 snRNA nawet wtedy, gdy stężenie NaCl w roztworze sięga 500 mM [53]. Sugeruje to istnienie stosunkowo silnych oddziaływań (prawdopodobnie bezpośrednich) pomiędzy tymi białkami a RNA. Na podstawie różnic w dostępności nukleotydów dla trawienia enzymatycznego lub kowalencyjnych modyfikacji, jakie występują pomiędzy "nagim" U3 snRNA a U3 snRNP oraz na podstawie badań rekombinowanych cząsteczek U3 zlokalizowano przypuszczalne miejsca interakcji U3 snRNA z białkami [3,68]. Miejsce wiązania z fibrylaryną znajduje się prawdopodobnie pomiędzy pozycją 79 a 204 ludzkiego U3 (box B,C',C)[3]. Fragment 5' zawierający m.in. box A oraz fragment 3' zawierający box D nie biorą udziału w wiązaniu fibrylaryny. Zamiana nawet jednego nukleotydu w obrębie box C pozbawia U3 snRNA zdolności do wiązania fibrylaryny. Nie jest jasne, czy interakcja pomiędzy U3 a fibrylaryną jest bezpośrednia, czy też odbywa się za pośrednictwem innego

Przy użyciu specyficznych metod wykazano, że istotnie U3 snRNP bierze udział w obróbce pre-rRNA przynajmniej w dwóch miejscach: w obrębie 5'ETS oraz na pograniczu 5'ITS i 5,8S rRNA.

Eliminacja U3 snRNA z ekstraktów S100 (odtworzących pierwszy etap obróbki pre-rRNA), za pomocą RNazy H i komplementarnych oligonukleotydów, blokuje cięcie pre-rRNA w obrębie 5'ETS w ekstraktach z komórek HeLa [42] i w ekstraktach z komórek nerki *Xenopus laevis* [65]. Specyficzne wiązanie się kompleksów zawierających U3 snRNA z 5'ETS *in vitro*, można wykazać za pomocą elektroforezy lub precypitacji z przeciwciałami przeciwko fibrylarynie. Wiązanie się U3 z 5'ETS w sąsiedztwie miejsca obróbki wykazano również *in vivo* (w komórkach HeLa [57] i w komórkach wątrobiaka Novikoffa u szczura [100]) oraz *in vitro* (w ekstraktach z mysich komórek L1210 [111]), wykorzystując metodę tworzenia wiązań krzyżowych w miejscach interakcji cząsteczek kwasów nukleinowych, pod wpływem światła UV i przy udziale psoralenu. W cząsteczce U3 snRNA, w tworzeniu wiązań krzyżowych biorą udział nukleotydy znajdujące się w sąsiedztwie box A [100,111].

Podobnie jak z ekstraktów komórkowych, również z oocytów *Xenopus laevis* można wyeliminować (w ok. 80%) cząsteczki U3 snRNA (przy udziale endogennej RNazy H), wstrzykując komplementarne do nich oligonukleotydy do jądra komórkowego oocytu. Powoduje to zaburzenia w obróbce pre-rRNA w oocycie wskazujące na udział U3 snRNA w cięciu pierwotnego transkryptu na pograniczu 5'ITS i 5,8S rRNA [84].

Ultrastrukturalna lokalizacja U3 snRNA została zbadana za pomocą hybrydyzacji *in situ* [75,76]. W komórkach HeLa oraz w mysich komórkach 3T3 U3 snRNA występuje niemal wyłącznie w jąderku (sygnał otrzymany z nad nukleoplazmy był bardzo słaby, natomiast poza jądrem komórkowym nie stwierdzono hybrydyzacji). Największą gęstość znakowania zarejestrowano nad DFC i na pograniczu DFC z FC, mniejszą nad GC. Wewnątrz ośrodków włóknistych nie stwierdzono obecności U3. Biorąc pod uwagę, że objętość GC jest znacznie większa niż DFC (5 do 15 razy w obu typach komórek), ocenia się, że znaczna część jąderkowej puli U3 snRNA (prawdopodobnie ok. połowy) jest zawarta w GC. Fibrylaryna występuje głównie w DFC [75,76,77].

3.2. U8 snRNA

U8 snRNA zajmuje drugie miejsce pod względem liczby cząsteczek jąderkowych snRNA w komórce. Sekwencja U8 zawiera konserwatywne odcinki C i D [113]. Model II-rzędowej struktury cząsteczki U8 snRNA oparty jest na symulacji komputerowej (rys. 5) [113]. *In vivo* U8 snRNA tworzy z białkami dwa rodzaje kompleksów: o stałej sedymentacji 10S i 80S [113]. Skład białkowy tych kompleksów (poza fibrylaryną) nie jest znany.

Obecnie istnieją dane wskazujące na udział U8 snRNA w obróbce pre-rRNA. W pozbawionych U8 oocytach *Xenopus laevis* (w sposób analogiczny jak w opisanym powyżej doświadczeniu z U3 snRNA) ulega zahamowaniu powstawanie dojrzałych cząsteczek 5,8S oraz 28S rRNA, jak również dochodzi do gromadzenia się niepra-

widłowych prekursorów [69]. Efekty te sugerują, że przy braku U8 całkowicie zablokowane zostają cięcia na pograniczu 5,8S i 3'ITS oraz 28S i 3'ETS, natomiast obróbka na pograniczu 5'ITS i 5,8S jest w znacznym stopniu zahamowana.

3.3. GENY DLA JĄDERKOWYCH snRNA W INTRONACH GENÓW BIAŁEK

Występowanie sekwencji kodujących cząsteczki jąderkowych snRNA wewnątrz intronów genów dla białek jest nowo odkrytym mechanizmem genetycznym. Introny zawierają zawsze po jednej pełnej sekwencji snRNA. Gen może kodować (w kilku intronach) różne warianty jednego rodzaju lub kilka rodzajów snRNA. W pierwszym przypadku poszczególne kopie różnią się nieznacznie. Nie jest pewne, czy wszystkie warianty ulegają ekspresji. W ostatnich latach poznano szereg takich genów:

1) gen białka szoku cieplnego *hsc70* u myszy, szczura i człowieka, w którym introny 5, 6 i 8 zawierają warianty U14 snRNA [52];

2) ludzki gen białka rybosomalnego S3 (intron 1) kodujący jedną z dwóch odmian U15 [112];

3) gen kodujący rybosomalne białko L1 w komórkach *Xenopus laevis*; intron 3 zawiera sekwencję U16 snRNA [19], natomiast introny 2,4,7,8 zawierają warianty U18 [73];

4) ludzki gen kodujący białko RCC1, które uczestniczy w regulacji cyklu komórkowego (funkcja RCC1 jest opisana w pracy przeglądowej [12]); gen ten, w intronach 1 i 2, zawiera odcinki kodujące dwie odmiany U17 snRNA (jedna z odmian U17 odpowiada prawdopodobnie E1 snRNA [80,83]) [43];

5) gen nukleoliny, która jest głównym białkiem jąderkowym w komórkach aktywnie proliferujących [32,99]; u człowieka i u gryzoni, w intronie 11 tego genu, znajduje się sekwencja U20 snRNA [66,92]; dwa inne introny tego genu u wyżej wymienionych gatunków zawierają konserwatywne (niehomologiczne w stosunku do siebie) sekwencje, które mogą stanowić geny dla dwóch jeszcze nie poznanych snRNA [92];

6) mysi gen czynnika inicjacji transkrypcji eIF-4A1; w intronie 8 tego genu znajduje się sekwencja homologiczna w 90% do E3 snRNA wyizolowanego z komórek ludzkich [92].

Ponieważ wszystkie snRNA, dla których udowodniono, że są kodowane w intronach, nie mają na końcu 5' 2,2,7-metyloguanozyny, można przypuszczać, że inne znane snRNA nie mające 5' m₃G (U19, E2, Y) także mogą być kodowane w intronach [17]. Większość genów zawierających sekwencje snRNA koduje białka związane z rybosomami lub jąderkiem (z wyjątkiem RCC1). Biologiczne znaczenie tego faktu i jego ewentualny związek z regulacją biogenezy rybosomów lub regulacją cyklu komórkowego pozostają nieznane. Wiadomo, że wymienione wyżej geny są intensywnie transkrybowane. Być może jest to mechanizm zapewniający jąderkowym snRNA wysoki poziom ekspresji [96].

Mechanizm powstawania cząsteczek snRNA kodowanych w intronach genów dla białek nie jest znany. Dostępne dane sugerują, że cząsteczki te nie są niezależnie transkrybowane, lecz powstają poprzez wycięcie odpowiednich sekwencji podczas obróbki pre-mRNA. Nie został jednak całkowicie wykluczony alternatywny mechanizm polegający na niezależnej transkrypcji intronowych snRNA.

Jednym z dowodów na to, że omawiane tu snRNA powstają podczas obróbki pre-mRNA (ang. *splicing*) jest fakt, że cząsteczki snRNA: U14 [50], U16 [19] i U18 [73] zostają dokładnie wycięte z odcinków RNA odpowiadających intronom i fragmentom sąsiednich egzonów, wstrzykniętych do jąder oocytów *Xenopus laevis*. Równocześnie łączone są ze sobą fragmenty egzonów. Podobne doświadczenie przeprowadzono *in vitro* (z U17), w ekstrakcie z komórek HeLa [43]. Proces wycinania snRNA z substratu stanowiącego pre-mRNA może zachodzić w warunkach, w których normalna obróbka tego substratu (*splicing*) jest zablokowana. Cząsteczka snRNA jest wówczas jedynym produktem takiego procesu [19,50]. Wycinanie małych cząsteczek RNA z intronów może być procesem konkurencyjnym w stosunku do formowania dojrzałego mRNA, tzn. z jednej cząsteczki pre-mRNA powstawałoby albo snRNA (1 cząsteczka lub więcej) albo mRNA [19]. Alternatywnie snRNA może powstawać z cząsteczki pre-mRNA równolegle z dojrzałym mRNA. Nie zidentyfikowano dotychczas czynników biorących udział w wycinaniu snRNA. Wyniki doświadczeń wskazują, że mogą to być zarówno enzymy endo-, jak i egzonukleolityczne. Za przedstawionym powyżej mechanizmem powstawania snRNA świadczy również brak samodzielnej ekspresji genów U16 (w formie plazmidów wstrzykniętych do jąder oocytów *Xenopus laevis* [19]) i U17 (*in vitro* [43]). W sąsiedztwie sekwencji U17 snRNA nie stwierdzono występowania jakichkolwiek znanych sygnałów transkrypcyjnych polimerazy II lub III [43].

Spośród przedstawionych w powyższym artykule kierunków badań nad ekspresją jąderkowych genów rRNA, najbardziej dynamicznie rozwijają się badania molekularnych aspektów tego procesu. Zdaniem autora, w bliskiej przyszłości można oczekiwać m.in. sklonowania innych niż UBF czynników transkrypcyjnych RNA polimerazy I, poznania mechanizmów regulacji transkrypcji oraz poznania mechanizmów obróbki pre-rRNA i roli, jaką odgrywają w niej jąderkowe snRNA. Można oczekiwać również wyizolowania nowych rodzajów jąderkowych snRNA. Badania ultrastrukturalnych aspektów biogenezy rybosomów przynoszą, jak dotąd, w znacznej mierze wyniki niejednoznaczne. Trudno przewidzieć, czy przedstawione powyżej zagadnienia dotyczące rozmieszczenia rDNA czy lokalizacji transkrypcji znajdą w najbliższym czasie ostateczne rozwiązanie.

LITERATURA

- [1] ARIS JP, BLOBEL G. cDNA cloning and sequencing of human fibrillarin, a conserved nucleolar protein recognized by autoimmune sera. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 931-935.

- [2] BACHVAROV D, MOSS T. The RNA polymerase I transcription factor xUBF contains 5 tandemly repeated HMG homology boxes. *Nucl Acid Res* 1991; **19**: 2331–2335.
- [3] BASERGA SJ, YANG XW, STEITZ JA. An intact box C sequence in the U3 snRNA is required for binding of fibrillar. *EMBO J* 1991; **10**: 2645–2651.
- [4] BELL SP, LEARNED RM, JANTZEN HM, TJIAN R. Functional cooperativity between transcription factors UBF1 and SL1 mediates human ribosomal RNA synthesis. *Science* 1988; **241**: 1192–1197.
- [5] BELL SP, PIKAARD CS, REEDER RH, TJIAN R. Molecular mechanisms governing species-specific transcription of ribosomal RNA. *Cell* 1989; **59**: 489–497.
- [6] BROU C, KUHN A, STAUB A, CHAUDHARY S, GRUMMT I, DAVIDSON I, TORA L. Sequence specific transactivators counteract topoisomerase II-mediated inhibition of transcription by RNA polymerases I and II. *Nucl Acid Res* 1993; **21**: 4011–4018.
- [7] BRUN RP, RYAN K, SOLLNER-WEBB B. Factor C*, the specific initiation component of mouse RNA polymerase I holoenzyme is inactivated early in the transcription process. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 5010–5021.
- [8] CHAN EKL, IMAI H, HAMEL JC, TAN EM. Human autoantibody to RNA polymerase I transcription factor hUBF, molecular identity of nucleolus organizer region autoantigen NOR-90 and ribosomal RNA transcription Upstream Binding Factor. *J Exp Med* 1991; **174**: 1239–1244.
- [9] COMAI L, TANESE M, TJIAN R. The TATA-binding protein and associated factors are integral components of the RNA Polymerase I transcription factor SL1. *Cell* 1992; **68**: 965–976.
- [10] COOK PR. RNA polymerase: structural determinant of the chromatin loop and the chromosome. *Bioessays* 1994; **16**: 425–430.
- [11] COPENHAVER GP, PUTNAM CD, DENTON ML, PIKAARD CS. The RNA polymerase I transcription factor UBF is a sequence-tolerant HMG-box protein that can recognize structured nucleic acids. *Nucl Acid Res* 1994; **22**: 2651–2657.
- [12] DASSO M. RCC1 in the cell cycle: the regulator of chromosome condensation takes on new roles. *Trends Biochem Sci* 1993; **18**: 96–101.
- [13] DERENZINI M, FARABEGOLI F, TRERE D. Localization of DNA in fibrillar components of the nucleolus: a cytochemical and morphometric study. *J Histochem Cytochem* 1993; **41**: 829–836.
- [14] DERENZINI M, THIRY M, GOESSENS G. Ultrastructural cytochemistry of the mammalian cell nucleolus. *J Histochem Cytochem* 1990; **38**: 1237–1256.
- [15] DUNDR M, RASKA I. Nonisotopic ultrastructural mapping of transcription sites within nucleolus. *Exp Cell Res* 1993; **208**: 275–281.
- [16] EBERHARD D, TORA L, EGLY JM, GRUMMT I. A TBP-containing multiprotein complex (TIF-IB) mediates transcription specificity of murine RNA polymerase I. *Nucl Acid Res* 1993; **21**: 4180–4186.
- [17] FILIPOWICZ W, KISS T. Structure and function of nucleolar snRNPs. *Mol Biol Rep* 1993; **18**: 149–156.
- [18] FOURNIER MJ, MAXWELL ES. The nucleolar snRNAs: catching up with the spliceosomal snRNAs. *Trends Biochem Sci* 1993; **18**: 131–135.
- [19] FRAGPANE P, PRISLEI S, MICHENZI A, CAFFARELLI E, BOZZONI I. A novel small nucleolar RNA (U16) is encoded inside a ribosomal protein intron and originates by processing of the pre-mRNA. *EMBO J* 1993; **12**: 2921–2928.
- [20] GOESSENS G. Nucleolar structure. *Int Rev Cytol* 1984; **87**: 107–152.
- [21] GOKAL PK, MAHAJAN PB, THOMPSON AE. Hormonal regulation of transcription of rDNA, formation of initiated complexes by RNA polymerase I *in vitro*. *J Biol Chem* 1990; **265**: 16234–16243.

- [22] GOLD HA, TOPPER JN, CLAYTON DA, CRAFT J. The RNA processing enzyme RNase MRP is identical to the ThRNP and related to RNase P. *Science* 1989; **245**: 1377–1380.
- [23] GOODRICH JA, TJIAN R. TBP-TAF complexes: selectivity factors for eukaryotic transcription. *Curr Opin Cell Biol* 1994; **6**: 406–409.
- [24] GOŹDZICKA-JÓZEFIAK A. Składanie kompleksu preinicjującego transkrypcję genów eukariotycznych. *Post Biol Kom* 1993; **20**: 373–388
- [25] GROSSCHEDL R, GIESE K, PAGEL J. HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet* 1994; **10**: 94–100.
- [26] GRUMMT I, KUHN A, BARTSCH I, ROSENBAUER H. A transcription terminator located upstream of the mouse rDNA initiation site affects rRNA synthesis. *Cell* 1986; **47**: 901–911.
- [27] GUIMOND A, MOSS T. Variants of the *Xenopus laevis* ribosomal transcription factor xUBF are developmentally regulated by differential splicing. *Nucl Acid Res* 1992; **20**: 3361–3366.
- [28] HADJIOLOV AA. The nucleolus and ribosome biogenesis. Wien, New York: Springer-Verlag 1985.
- [29] HADJIOLOVA KV, NICOLSO M, MAZAN S, HADJIOLOV AA, BACHELLERIE JP. Alternative pre-rRNA processing pathways in human cells and their alteration by cycloheximide inhibition of protein synthesis. *Eur J Biochem* 1993; **212**: 211–215.
- [30] HADJIOLOVA KV, NORMANN A, CAVAILLE J, SOUPENE E, MAZAN S, HADJIOLOV AA, BACHELLERIE JP. Processing of truncated mouse or human rRNA transcribed from ribosomal minigenes transfected into mouse cells. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 4044–4056.
- [31] HAM H. How do eukaryotic activator proteins stimulate the rate of transcription by polymerase II. *FEBS Lett* 1992; **307**: 81–86.
- [32] HERNANDEZ-VERDUN D. The nucleolus today. *J Cell Sci* 1991; **99**: 465–471.
- [33] HISATAKE K, NISHIMURA T, MAEDA Y, HANADA K, SONG C, MURAMATSU M. Cloning and structural analysis of cDNA and the gene for mouse transcription factor UBF. *Nucl Acid Res* 1991; **19**: 4631–4637.
- [34] HOZAK P, COOK PR, SCHOFFER C, MOSGOLLER W, WACHTLER F. Site of transcription of ribosomal RNA and intranucleolar structure in HeLa cells. *J Cell Sci* 1994; **107**: 639–648.
- [35] HU CH, MCSTAY B, JEONG SW, REEDER RH. xUBF, an RNA polymerase I transcription factor, binds crossover DNA with low sequence specificity. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 2871–2882.
- [36] HUGHES JMX, KONINGS DAM, CESARENI G. The yeast homologue of U3 snRNA. *EMBO J* 1987; **6**: 2145–2155.
- [37] JANTZEN HM, ADMON A, BELL SP, TJIAN R. Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins. *Nature* 1990; **344**: 830–836.
- [38] JEPPESEN C, STEBBINS-BOAZ B, GERBI SA. Nucleotide sequence determination and secondary structure of *Xenopus* U3 snRNA. *Nucl Acid Res* 1988; **16**: 2127–2148.
- [39] JIMENEZ-GARCIA LF, SEGURA-VALDEZ ML, OCHS RL, ECHEVERRIA OM, VAZQUEZ-NIN GH, BUSCH H. Electron microscopic localization of ribosomal DNA in rat liver nucleoli by nonisotopic *in situ* hybridization. *Exp Cell Res* 1993; **207**: 220–225.
- [40] JONES MH, LEARNED RM, TJIAN R. Analysis of clustered point mutations in the human ribosomal RNA gene promoter by transient expression *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 669–673.
- [41] JORDAN EG. Interpreting nucleolar structure: where are the transcribing genes? *J Cell Sci* 1991; **98**: 437–442.
- [42] KASS S, TYC K, STEITZ JA, SOLLNER-WEBB B. The U3 small nucleolar ribonucleoprotein functions in the first step of preribosomal RNA processing. *Cell* 1990; **60**: 897–908.
- [43] KISS T, FILIPOWICZ W. Small nucleolar RNAs encoded by introns of the human cell cycle regulatory gene RCC1. *EMBO J* 1993; **12**.
- [44] KUHN A, GRUMMT I. Dual role of the nucleolar transcription factor UBF: trans-activator and antirepressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 7340–7344.

- [45] KUHN A, BARTSCH I, GRUMMT I. Specific interaction of the murine transcription termination factor TTFI with class I RNA polymerases. *Nature* 1990; **344**: 559–562.
- [46] KUHN A, STEFANOVSKY V, GRUMMT I. The nucleolar transcription activator UBF relieves Ku antigen-mediated repression of mouse ribosomal gene transcription. *Nucl Acid Res* 1993; **21**: 2057–2063.
- [47] KUHN A, VOIT R, STEFANOVSKY V, EVERS R, BIANCHI M, GRUMMT I. Functional differences between the two splice variants of the nucleolar transcription factor UBF: the second HMG box determines specificity of DNA binding and transcriptional activity. *EMBO J* 1994; **13**: 416–424.
- [48] LABHART P, REEDER RH. Characterization of three sites of RNA 3' end formation in the *Xenopus* ribosomal gene spacer. *Cell* 1986; **45**: 431–443.
- [49] LEBLANC B, READ C, MOSS T. Recognition of the *Xenopus* ribosomal core promoter by the transcription factor xUBF involves multiple HMG box domains and leads to an xUBF interdomain interaction. *EMBO J* 1993; **12**: 513–525.
- [50] LEVERETTE RD, ANDREWS MT, MAXWELL ES. Mouse U14 snRNA is a processed intron of the cognate hsc70 heat shock pre-messenger RNA. *Cell* 1992; **71**: 1215–1221.
- [51] LI K, SMAGULA CS, PARSONS WJ, RICHARDSON JA, GONZALEZ M, HAGLER HK, WILLIAMS RS. Subcellular partitioning of MRP RNA assessed by ultrastructural and biochemical analysis. *J Cell Biol* 1994; **124**: 871–882.
- [52] LIU J, MAXWELL ES. Mouse U14 snRNA is encoded in an intron of the mouse cognate hsc70 heat shock gene. *Nucl Acid Res* 1990; **18**: 6565–6571.
- [53] LUBBEN B, MARSHALLSAY C, ROTTMANN N, LUHRMANN R. Isolation of U3 snoRNP from CHO cells: a novel 55 kDa protein binds to the central part of U3 snoRNA. *Nucl Acid Res* 1993; **21**: 5377–5385.
- [54] MAEDA Y, HISATAKE K, KONDO T, HANADA K, SONG C, NISHIMURAT, MURAMATSU M. Mouse rRNA gene transcription factor mUBF requires both HMG-box1 and an acidic tail for nucleolar accumulation: molecular analysis of the nucleolar targeting mechanism. *EMBO J* 1992; **11**: 3695–3704.
- [55] MAHAJAN PB, GOKAL PK, THOMPSON A. Hormonal regulation of transcription of rDNA, the role of TFIC in formation of initiation complexes. *J Biol Chem* 1990; **265**: 61244–61247.
- [56] MAHAJAN PB, THOMPSON EA. Hormonal regulation of transcription of rDNA, purification and characterization of the hormone-regulated transcription factor IC. *J Biol Chem* 1990; **265**: 16225–16233.
- [57] MASER RL, CALVET JP. U3 small nuclear RNA can be psoralen-cross-linked *in vivo* to the 5' external transcribed spacer of pre-ribosomal-RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 6523–6527.
- [58] MATTAJ IW, TOLLERVEY D, SERAPHIN B. Small nuclear RNAs in messenger RNA and ribosomal RNA processing. *FASEB J* 1993; **7**: 47–53.
- [59] MAZAN S, GULLI MP, JOSEPH N, BACHELLERIE JP. Structure of the differentially expressed mouse U3A gene. *Eur J Biochem* 1992; **205**: 1033–1041.
- [60] MAZAN S, MATTEI MG, ROECKEL N, QU LH, BACHELLERIE JP. In humans all U3 genes map to chromosome 17p12-p11, but in mouse the U3A and U3B genes are located on different chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 1993; **62**: 203–206.
- [61] McKEOWN M. The role of small nuclear RNAs in mRNA splicing. *Curr Opin Cell Biol* 1993; **5**: 448–454.
- [62] McSTAY B, FRAZIER MW, REEDER RH. xUBF contains a novel dimerization domain essential for RNA polymerase I transcription. *Genes Dev* 1991; **5**: 1957–1968.
- [63] McSTAY B, HWA HU C, PIKAARD CS, REEDER RH. xUBF and Rib 1 are both required for formation of a stable polymerase I promoter complex in *X.laevis* *EMBO J* 1991; **10**: 2297–2303.

- [64] MOSGOLLER W, SCHOFFER C, DERENZINI M, STEINER M, MAIER U, WACHTLER F. Distribution of DNA in human Sertoli cell nucleoli. *J Histochem Cytochem* 1993; **41**: 1487–1493.
- [65] MOUGEY EB, PAPE LK, SOLLNER-WEBB B. A U3 small nuclear ribonucleoprotein-requiring processing in the 5' external transcribed spacer of *Xenopus* precursor rRNA. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 5990–5998.
- [66] NICOLSO M, CAIZERGUES-FERRER M, MICHOT B, AZUM MC, BACHELLERIE JP. U20, a novel small nucleolar RNA, is encoded in an intron of the nucleolin gene in mammals. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 5766–5776.
- [67] O'MAHONY D, ROTHBLUM LI. Identification of two forms of the RNA polymerase I transcription factor UBF. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 3180–3184.
- [68] PARKER KA, STEITZ JA. Structural analyses of the human U3 ribonucleoprotein particle. *Mol Cell Biol* 1987; **7**: 1899–2913.
- [69] PECULIS BA, STEITZ JA. Disruption of U8 nucleolar snRNA inhibits 5.8S and 28S rRNA processing in the *Xenopus* oocyte. *Cell* 1993; **73**: 1233–1245.
- [70] PFLEIDERER C, SMID A, BARTSCHI, GRUMMT I. An undecamer DNA sequence directs termination of human ribosomal gene transcription. *Nucl Acid Res* 1990; **18**: 4727–4736.
- [71] PIKAARD CS, PAPE LK, HENDERSON SL, RYAN K, PAALMAN MH, LOPATA MA, REEDER RH, SOLLNER-WEBB B. Enhancers for RNA polymerase I in Mouse Ribosomal DNA. *Mol Cell Biol* 1990; **10**: 4816–4825.
- [72] PIKAARD CS, SMITH SD, REEDER RH, ROTHBLUM L. rUBF, an RNA polymerase I transcription factor from rats produces DNase I footprints identical to those produced by xUBF, its homolog from frogs. *Mol Cell Biol* 1990; **10**: 3810–3812.
- [73] PRISLEI S, MICHIEZI A, PRESUTTI C, FRAGPANE P, BOZZONI I. Two different snRNAs are encoded in introns of amphibian and human ribosomal protein genes. *Nucl Acid Res* 1993; **21**: 5824–5830.
- [74] PUVION-DUTILLEUL F, BACHELLERIE JP, PUVION E. Nucleolar organization of HeLa cells as studied by *in situ* hybridization. *Chromosoma* 1991; **100**: 359–409.
- [75] PUVION-DUTILLEUL F, MAZAN S, NICOLSO M, CHRISTENSEN ME, BACHELLERIE JP. Localization of U3 RNA molecules in nucleoli of HeLa and mouse 3T3 cells by high resolution *in situ* hybridization. *Eur J Cell Biol* 1991; **56**: 178–186.
- [76] PUVION-DUTILLEUL F, MAZAN S, NICOLSO M, PICHARD E, BACHELLERIE JP, PUVION E. Alterations of nucleolar ultrastructure and ribosome biogenesis by actinomycin D. Implications for U3 snRNP function. *Eur J Cell Biol* 1992; **58**: 149–162.
- [77] RASKA I, REIMER G, JARNIK M, KOSTROUCH Z, RASKA, JR K. Does the synthesis of ribosomal RNA take place within nucleolar fibrillar centers or dense fibrillar component. *Biol Cell* 1989; **65**: 79–82.
- [78] REDDY R, BUSCH H. Small nuclear RNAs: RNA sequence, structure, and modifications. [w] Birnstiel ML (red.) Structure and function of major and minor small nuclear ribonucleoprotein particles Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag 1988: 1–37.
- [79] REIMER G, ROSE KM, SCHEER U, TAN EM. Autoantibody to RNA polymerase I in scleroderma sera. *J Clin Invest* 1987; **79**: 65–72.
- [80] RIMOLDI OJ, RAGHU B, NAG MK, ELICEIRI GL. Three new small nucleolar RNAs that are psoralen cross-linked *in vivo* unique regions of pre-rRNA. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 4382–4390.
- [81] RODRIGO RM, RENDON MC, TORREBLANCA J, GARCIA-HERDUGO G, MORENO FJ. Characterization and immunolocalization of RNA polymerase I transcription factor UBF with anti-NOR serum in protozoa, higher plant and vertebrate cells. *J Cell Sci* 1992; **103**: 1053–063.

- [82] RUDLOFF U, EBERHARD D, TORAL, STUNNENBERG H, GRUMMT I. TBP-associated factors interact with DNA and govern species specificity of RNA polymerase I transcription. *EMBO J* 1994; **13**: 2611–2616.
- [83] RUFFEA, RIMOLDI OJ, RAGHU B, ELICEIRI GL. Three small nucleolar RNAs of unique nucleotide sequences. *Proc Natl Acad Sci* 1993; **90**: 635–638.
- [84] SAVINO R, GERBI SA. *In vivo* disruption of *Xenopus* U3 snRNA affects ribosomal RNA processing. *EMBO J* 1990; : 2299–2308.
- [85] SCHEER U, THIRY M, GOESSENS G. Structure, function and assembly of the nucleolus. *Trends Cell Biol* 1993; **3**: 236–241.
- [86] SCHEER U, WEISENBERG D. The nucleolus. *Curr Opin Cell Biol* 1994; **6**: 354–359.
- [87] SCHNAPP A, GRUMMT I. Transcription complex formation at the mouse rDNA promoter involves the stepwise association of four transcription factor and RNA polymerase I. *J Biol Chem* 1991; **266**: 24588–24595.
- [88] SCHNAPP A, PFLEIDERER C, ROSENBAUER H, GRUMMT I. A growth-dependent transcription initiation factor (TIF-IA) interacting with RNA polymerase I regulates mouse ribosomal RNA synthesis. *EMBO J* 1990; **9**: 2857–2863.
- [89] SCHNAPP G, SCHNAPP A, ROSENBAUER H, GRUMMT I. TIF-IC, a factor involved in both transcription and elongation of RNA polymerase I. *EMBO J* 1994; **13**: 4028–4035.
- [90] SCHNAPP G, SANTORI F, CARLES C, RIVA M, GRUMMT I. The HMG box-containing nucleolar transcription factor UBF interacts with a specific subunit of RNA polymerase I. *EMBO J* 1994; **13**: 190–199.
- [91] SCHNAPP A, SCHNAPP G, ERNY B, GRUMMT I. Function of the growth-regulated transcription initiation factor TIF-IA in initiation complex formation at the murine ribosomal gene promoter. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 6723–6732.
- [92] SERAPHIN B. How many intronic snRNAs ?. *Trends Biochem Sci* 1993; **18**: 330–331.
- [93] SINGER M, BERG P. Genes and genomes. Mill Valley California: University Science Books 1991.
- [94] SMID A, FINSTERER M, GRUMMT I. Limited proteolysis unmasks specific DNA-binding of the murine RNA polymerase I-specific transcription termination factor TTFI. *J Mol Biol* 1992; **227**: 635–647.
- [95] SMITH SD, ORIAHI E, LOWE D, YANG-YEN HF, OMAHONY D, ROSE K, CHEN K, ROTHBLUM LI. Characterization of factors that direct transcription of rat ribosomal DNA. *Mol Cell Biol* 1990; **10**: 3105–3116.
- [96] SOLLNER-WEBB B. Novel intron encoded small nucleolar RNAs. *Cell* 1993; **75**: 403–405.
- [97] SOLLNER-WEBB B, MOUGEY EB. News from the nucleolus: rRNA gene expression. *Trends Biochem Sci* 1991; **16**: 58–62.
- [98] SOLLNER-WEBB B, TOWER J. Transcription of cloned eukariotic ribosomal RNA genes. *Ann Rev Biochem* 1986; **55**: 801–829.
- [99] SRIVASTAVA M. Cloning and sequencing of the human nucleolin cDNA. *FEBS Lett* 1989; **250**: 99–105.
- [100] STROKE IL, WEINER AM. The 5' end of U3 snRNA can be crosslinked *in vivo* to the external transcribed spacer of rat ribosomal RNA precursors. *J Mol Biol* 1989; **210**: 497–512.
- [101] SWAT W, BUŁAJ G, SZOPA J. Ekspresja eukariotycznych genów rDNA. *Post Biochem* 1990; **36**: 4–13.
- [102] THIRY M. Ultrastructural detection of DNA within the nucleolus by sensitive molecular immunocytochemistry. *Exp Cell Res* 1992; **200**: 135–144.
- [103] THIRY M. Ultrastructural distribution of DNA and RNA within the nucleolus of human Sertoli cells as seen by molecular immunocytochemistry. *J Cell Sci* 1993; **105**: 33–39.
- [104] THIRY M. New data concerning the functional organization of the mammalian cell nucleolus: detection of RNA and rRNA by *in situ* molecular immunocytochemistry. *Nucl Acid Res* 1992; **20**: 6195–6200.

- [105] THIRY M, GOESSENS G. Where, within the nucleolus, are the rRNA genes located?. *Exp Cell Res* 1992; **200**: 1–4.
- [106] THIRY M, THIRY-BLAISE L. Locating transcribed and non-transcribed rDNA spacer sequences within the nucleolus by *in situ* hybridization and immunoelectron microscopy. *Nucl Acid Res* 1990; **19**: 11–15.
- [107] THIRY M, THIRY-BLAISE L. *In situ* hybridization at the electron microscope level: an improved method for precise localization of ribosomal DNA and RNA. *Eur J Cell Biol* 1989; **50**: 235–243.
- [108] THIRY M, SCHEER U, GOESSENS G. Localization of DNA within Ehrlich tumour cell nucleoli by immunoelectron microscopy. *Biol Cell* 1988; **63**: 27–34.
- [109] THIRY M, PLOTON D, MENAGER M, GOESSENS G. Ultrastructural distribution of DNA within the nucleolus of various animal cell lines or tissues revealed by terminal deoxynucleotidyl transferase. *Cell Tissue Res* 1993; **271**: 33–45.
- [110] TOWER J, HENDERSON SL, DOUGHERTY KM, WEJKSNORA PJ, SOLLNER-WEBB B. An RNA polymerase I promoter located in the CHO and mouse ribosomal DNA spacers: functional analysis and factor and sequence requirements. *Mol Cell Biol* 1989; **9**: 1513–1525.
- [111] TYC K, STEITZ JA. A new interaction between the mouse 5' external transcribed spacer of pre-rRNA and U3 snRNA detected by psoralen crosslinking. *Nucl Acid Res* 1992; **20**: 5375–5382.
- [112] TYC TYCOWSKI K, SHU M, STEITZ JA. A small nucleolar RNA is processed from an intron of the human gene encoding ribosomal protein S3. *Genes Dev* 1993; **7**: 1176–1190.
- [113] TYC K, STEITZ JA. U3 U8 and U13 comprise a new class of mammalian snRPS localized in the nucleolus. *EMBO J* 1989; **8**: 3113–3119.
- [114] VANDELAER M, THIRY M, GOESSENS G. Ultrastructural distribution of DNA within the ring-shaped nucleolus of human resting T lymphocytes. *Exp Cell Res* 1993; **205**: 430–432.
- [115] VOITR, SCHNAPP A, KUHN A, ROSENBAUER H, HIRSCHMANN P, STUNNENBERG HG, GRUMMT I. The nucleolar transcription factor mUBF is phosphorylated by casein kinase II in the C-terminal hyperacidic tail which is essential for transactivation. *EMBO J* 1992; **11**: 2211–2218.
- [116] WACHTLER F, MOSGOLLER W, SCHWARZACHER HG. Electron microscopic *in situ* hybridization and autoradiography: localization and transcription of rDNA in human lymphocyte nucleoli. *Exp Cell Res* 1990; **187**: 346–348.
- [117] WACHTLER F, SCHOFER C, MOSGOLLER W, WEIPOLTSHAMMER K, SCHWARZACHER HG, GUICHAOUA M, HARTUNG M, STAHL A, BERGE-LEFRANC JL, GONZALEZ I, SYLVESTER J. Human ribosomal RNA gene repeats are localized in the dense fibrillar component of nucleoli: light and electron microscopic *in situ* hybridization in human Sertoli cells. *Exp Cell Res* 1992; **198**: 135–143.
- [118] YUAN Y, REDDY R. Genes for human U3 small nucleolar RNA contain highly conserved flanking sequences. *Biochim Biophys Acta* 1989; **1008**: 14–22.
- [119] YUAN Y, TAN E, REDDY R. The 40-kilodalton To autoantigen associates with nucleotides 21 to 64 of human Mitochondrial RNA Processing/7-2 RNA *in vitro*. *Mol Cell Biol* 1991; **11**: 5266–5274.

Otrzymano: 16.12.1994 r.

Przyjęto: 20.01.1995 r.

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

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 wysłania do redakcji).

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

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

Nadesłanie tekstu pracy, poprawionego po recenzjach, na dyskietce przyspieszy publikację.

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 (numcrowanej) 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 nadbłki, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona 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, a 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 niezmienionej formie. Wszystkie załączniki muszą być opatrzone na odwrocie nazwiskiem pierwszego autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji.

Stosowane jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

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

TREŚĆ

W tym zeszycie • Postępów Biologii Komórki •	1
Komunikaty	2
SŁOMCZYŃSKA M.: Receptory hormonów steroidowych – budowa i funkcja	3
GOŁĄB J., ZAGOŹDŹON R.: Terapia genowa – wprowadzanie genów do komórek	23
MOSTOWSKA A., GWÓŹDŹ E.A.: Reakcje aparatu fotosyntetycznego na stres oksydacyjny	43
BILIŃSKA B.: Kortykoliberyna (CRF) lokanym regulatorem funkcji komórek Leydiga ssaków	65
WILCZYŃSKI G.: Ultrastrukturalne i molekularne aspekty ekspresji jąderkowych genów rRNA	73

**Warunki prenumeraty kwartalnika
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI**

Prenumerata na rok 1995

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1995 na konto:

FUNDACJA POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 501 132-40006576-2701-3-1110.

Cena prenumeraty rocznika (4 zeszyty + ew. 2 suplementy) na rok 1995:

dla instytucji (bibliotek) wynosi 400 000 zł,

a dla odbiorców indywidualnych 160 000 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 501 132-40006576-2701-3-1110.

Price per year 40 dolars USA.

Indeks 369705