

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

TOM 25 NR-1'98
(1–152)

Postępy Biologii Komórki

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

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

Redaguje Kolegium – Editors:

Szczepan BILIŃSKI (biologia rozwoju, embriologia, cytoszkielet, połączenia międzykomórkowe – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),

Jerzy KAWIAK (immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów – *Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*),

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

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

Jan MICHEJDA (szlaki informacyjne, błony komórek, energetyka komórki – *Zakład Bioenergetyki UAM, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*),

Maria OLSZEWSKA (komórki roślinne, informacja genetyczna w komórkach roślinnych i zwierzęcych – *Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin Instytutu Fizjologii i Cytologii UŁ, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*),

Maciej ZABEL (histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek – *Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chalubińskiego 6a*)

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHOŁA, Leszek KUŹNICKI,

Olgierd NARKIEWICZ, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA,

Lech WOJTCZAK

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

Recenzenci rocznika PBK są publikowani w zeszycie 4.

Referees of the volume are published in issue 4.

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

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

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

Ark. wyd. 12,0 Ark. druk. 9,5. Podpisano do druku w grudniu 1997 r. Druk ukończono w styczniu 1998 r.

W tym Zeszytcie

- Czytelnik znajdzie w tym zeszycie na stronie 3 artykuł o chorobach prionowych. Został on napisany w związku z tegoroczną nagrodą Nobla w dziedzinie medycyny, którą otrzymał amerykański uczonej prof. Stanley Prusiner za odkrycie prionów.
- Białka rodziny 14-3-3 są wysoce konserwatywne. Białka te w cytoplazmie oddziałują z fosfatydyloseryną wielu białek wiążąc je i sekwestrując. Funkcję białek 14-3-3 może zilustrować następujący przykład. Rodzina białek Bcl-2 bierze udział w „decyzji” przeżycia komórki. Bcl-2 i Bcl_{xL} hamują apoptozę. Inni członkowie tej rodziny – Bad i Bax mogą zablokować aktywność Bcl-2 i Bcl_{xL} wiążąc się z nimi w niefunkcjonalne heterodimery. Czynniki zewnątrzkomórkowe konieczne do przeżycia komórek, takie jak IL3 dla pewnych linii komórkowych, powodują fosforylację seryny w białkach Bad i Bax oraz dysocjację z kompleksu Bcl-2/Bad bądź Bcl-2/Bax. Oddysocjowane, ufosforylowane na serynie Bad i Bax są wiązane i sekwestrowane przez białka 14-3-3. Więcej o białkach 14-3-3 znajdzie Czytelnik na stronie 9.
- Wzmiankę o apoptozie u roślin można znaleźć w artykule poświęconym starzeniu się roślin na stronie 63.
- Poliaminy mogą tworzyć kompleksy z białkami i kwasami nukleinowymi oraz stymulować podstawowe procesy komórkowe. Informacje na temat syntezy i mechanizmów działania poliamin w komórce roślinnej znajdzie Czytelnik na stronie 33.
- Rysbazy są to rybonukleazy o specjalnym działaniu biologicznym. Zabijają one komórki docelowe przez specyficzną hydrolizę rRNA i blokowanie syntezy białka. Rysbazy biorą udział w zapobieganiu samozapyleniu niektórych gatunków roślin. O tych i innych funkcjach rysbaz można przeczytać na stronach 51 i 75.
- O dodatkowym sygnale w procesie aktywacji limfocytów T napisano na stronie 111. Sygnał ten jest wynikiem interakcji receptorów CD28 i CTLA-4 na limfocytach z ligandami B 7.1 i B 7.2 na komórkach prezentujących antygen. Nieprawidłowościom ekspresji genów CD28 i CTLA-4 przypisuje się istotne znaczenie w patogenezie zaburzeń o podłożu immunologicznym, w tym w chorobach autoimmunologicznych.
- Znakowanie sond molekularnych digoksygeniną i ich wykorzystanie opisano na stronach 125 i 135.

WŚCIEKŁE KROWY I INNE CHOROBY PRIONOWE A NAGRODA NOBLA 1997 Z MEDYCYNY

Kazimierz OSTROWSKI

Instytut Biostruktury AM, Warszawa

Popłoch, jaki wywołało zjawisko wściekłych krów, spowodował poważne zaburzenia zarówno w sferze politycznej, jak i ekonomicznej. Należałoby się temu zjawisku przyjrzeć od strony biomedycznej. Sprawa nie jest prosta, nie jest do końca wyjaśniona i co gorsza nie jest łatwa do zrozumienia, bez pewnych podstawowych wiadomości z dziedziny biologii komórki. Choroba wściekłych krów należy do chorób prionowych, a objawia się zmianami degeneracyjnymi w mózgowiu, które pod mikroskopem przybiera wygląd gąbki. Stąd zaliczamy to schorzenie do gąbczastego zwyrodnienia mózgowia, występującego zarówno u niektórych gatunków zwierząt, jak i u człowieka. Schorzenia prionowe nazwane zostały w międzynarodowej nomenklaturze akronimem TSE -- *transmissible spongiform encephalopathies*.

Priony są białkami normalnie występującymi w neuronach całego mózgowia, a gen kodujący priony, zwany genem *PrP*, jest normalnym składnikiem genomu myszy i ludzi. Nie znamy zupełnie roli, jaką białko to spełnia w komórce. Natomiast wiadome jest, że spontaniczna zmiana konformacji tego białka albo zmiana indukowana wtargnięciem z zewnątrz zakaźnej postaci prionu powoduje lawinowe przekształcenia konformacyjne tego białka, jego gromadzenie się w komórce i jej obumieranie.

Prion, czyli zakaźne białko, jest fenomenem biologicznym, który stał się przedmiotem gorączkowych, aby nie powiedzieć burzliwych badań i dyskusji ogólnobiologicznych. Prion jest czynnikiem zakaźnym, ale nie zawiera informacji genetycznej w postaci kwasów nukleinowych. W postaci zwykłej białko prionowe występuje w komórkach jako białko związane z błoną komórkową neuronów. Nie jest to jednak białko przezbłonowe i nie ma żadnej części wystającej ponad powierzchnię

komórki. Nie bardzo wiemy jaka jest jego rola, natomiast w niektórych okolicznościach białko to zmienia konformację, przybierając inny kształt. Jego cechą zasadniczą po dokonanej zmianie konformacyjnej jest oporność na hydrolizę przez enzymy proteolityczne oraz to, że swą obecnością wpływa na zmiany konformacyjne normalnych cząsteczek białka prionowego. Choroby prionowe przechodzą z osobnika na osobnika, o czym najdobitniej świadczy schorzenie kuru-kuru, które występowało na Melanezji tak długo, jak długo istniało rytualne spożywanie mózgow zmarłych przodków. Wściekłe krowy w Anglii, pojawiły się na skutek dodawania do ich pokarmu mózgow owiec padłych na *scrapie*, będącą również chorobą prionową.

Współczesne metody biologii molekularnej, zwane metodą *knock-outu* genetycznego, pozwoliły na stworzenie szczepu myszy pozbawionych genu białka PrP. Zwierzęta pozbawione tego białka rodzą się zdrowe i nie chorują na choroby prionowe, nawet po zakażeniu ich aktywnym preparatem zakaźnym tego białka. Za ten immunitet drogo jednak płacą, ponieważ pozbawienie ich tego genu i jego produktu ujawnia się po kilku tygodniach życia w postaci narastającej silnej ataksji. Niezborność ruchów spowodowana jest masowym zanikaniem komórek Purkiniego w ich mózgdzłkach. Myszy te chorują na choroby powodowane prionami dopiero wtedy, gdy wprowadzi się im za pomocą manipulacji genetycznej ten gen z powrotem do ich genomu. Nie znamy dzisiaj żadnego sposobu leczenia tych chorób neurodegeneracyjnych. Istnieją projekty przyszłej terapii opartej na wprowadzeniu oligonukleotydów antysensowych celem blokowania syntezy białka prionowego.

Uważa się obecnie, że trzy dziedziczne schorzenia degeneracyjne układu nerwowego typu TSE są powodowane przez priony, a mianowicie rodzinna postać choroby Creutzfeldta-Jakoba (CJD), syndrom GSS, czyli Gerstmannia-Strausslera-Scheinkera i rodzinna postać śmiertelnej bezsenności (FFI – *fatal familial insomnia*).

Dziedziczenie tych schorzeń nie jest sprzeczne z zakaźnością. Jak już powiedziano powyżej, białko prionowe jest normalnym białkiem występującym w każdej komórce zwierząt i ludzi. Białka te czasem spontanicznie ulegają zmianom konformacyjnym. Ta chorobotwórcza postać prionów może przenosić się z komórki do komórki, a także z organizmu do organizmu. Gąbczastym zwyrodnieniem mózgowia krów (tzw. chorobą wściekłych krów) może zapewne zakażać się człowiek w wyniku spożywania ich mięsa. Dowodem pośrednim, ponieważ nikt takich doświadczeń świadomie nie wykonał i nie wykona, jest nowa postać schorzenia Creutzfeldta-Jakoba, dotycząca ludzi młodych. To schorzenie zostało opisane w ostatnich latach i jest postacią odmienną od klasycznego przebiegu CJD (*Creutzfeldt-Jakob Disease*), dotyczącego ludzi w wieku ponad 60 lat. Istnieją także podejrzenia, że priony odgrywają rolę w powstaniu choroby Alzheimera.

Chociaż ostatnio ukazało się sporo publikacji na temat prionów i zagrożenia nowym rodzajem epidemii, to warto może dorzucić kilka nowych informacji, pochodzących głównie z źródeł brytyjskich, ostatnio najbardziej tym problemem zainteresowanych [1–8].

Choroba wściekłych krów – BSE (*bovine spongiform encephalopathy*) i schorzenie dotyczące ludzi – *Creutzfeld-Jakob disease* (CJD) należą do tej samej grupy schorzeń degeneracyjnych, polegających na zaniku neuronów w mózgowiu i bardzo jednoznacznym obrazie histopatologicznym tkanki mózgowej, wykazującej liczne ogniska rozpadu, stwarzające wrażenie struktury gąbczastej.

W zeszycie *Nature* [214;746, 1967] wydanym 29!!! lat temu ukazała się praca na temat czynnika zakaźnego, który powoduje gąbczaste zwyrodnienie mózgowia, a który – jak już wówczas stwierdzono – nie zawiera kwasów nukleinowych. Istota tego czynnika zakaźnego stanowi nadal, po niemalże 30 latach intensywnych badań – nierozwiązaną zagadkę. Początkowo sądzono, że jest to wirus. Ale niezwykła odporność tego czynnika na promieniowanie jonizujące, w tym także promieniowanie UV, oraz fakt, że jego zakaźność można zmniejszyć jedynie działaniem bardzo wysokiej temperatury lub przez przeprowadzenie czynnika zakaźnego w stan rozproszenia przy użyciu detergentów, uznano, że czynnik ten nie jest wirusem.

Ostatnio opisano w Anglii 10 przypadków odmiany schorzenia CJD, dotychczas nieznaną. To skłoniło rząd Wielkiej Brytanii do oficjalnego stwierdzenia, że może istnieć zależność pomiędzy pojawieniem się tych przypadków, a gąbczastym zwyrodnieniem mózgowia u tzw. wściekłych krów. Te 10 przypadków zostało ujawnionych w ciągu ostatnich dwóch lat, przy czym średnia wieku chorych wynosiła 26–27 lat, a wśród nich było 2 chorych w wieku lat kilkunastu. Z tych 10 chorych dwóch jeszcze żyje. Objawy schorzenia u tych chorych różnią się od spontanicznie i sporadycznie występującego CJD (1 przypadek/rok/milion populacji) tym, że przypominają raczej schorzenie kuru-kuru z silniejszymi objawami ataksji, czyli niezdolności ruchowej niż demencji, czyli otępienia psychicznego.

Nie jest nadal jasne, czy ta nowa odmiana CJD jest w istocie spowodowana zakażeniem BSE. Przemawia jednak za tym fakt, że odmiany tej nigdy przedtem nie obserwowano oraz że schorzenie to wystąpiło u bardzo młodych ludzi, czego dotychczas również nie stwierdzono. Powołana przez Rząd Brytyjski Komisja specjalistów od zwyrodnienia gąbczastego mózgu doszła do wniosku, że ujawnił się nowy czynnik ryzyka zachorowania na to schorzenie.

Obecnie powszechnie przyjęta jest hipoteza zakażenia białkiem zakaźnym – prionami. Priony zakaźne są cząsteczkami białka normalnie występującego w komórkach ssaków, ale zmienionego pod względem konformacji. Białko to, które normalnie niczym nie zagraża, ulega zmianie w prion zakaźny, który jest odporny na trawienie proteazami i który powoduje lawinowe zmiany konformacyjne w normalnych cząsteczkach tego białka. Tak zmienione białko nie ulega proteolizie i stąd gromadzi się w komórce powodując jej obumarcie.

Normalne białko prionowe jest niezbędne do zaistnienia zakażenia. U myszy, u których białko prionowe nie występuje na skutek manipulacji genetycznej, zwanej *knock-outem* genu białka prionowego, nie dochodzi do zakażenia prionami, albowiem nie ma substratu dla następowych zmian konformacyjnych.

Mechanizm komórkowy działania prionów schematycznie wygląda następująco. Na skutek spontanicznej mutacji w genomie komórki, najczęściej nerwowej, dochodzi do punktowej zmiany w genie białka prionowego, dotyczącej jednego tylko kodonu. Do dziś poznano kilka lokalizacji takich mutacji z dokładną lokalizacją w genie białka prionowego. Na skutek takiej mutacji dochodzi do syntezy białka nieco odmiennego od białka normalnego, które nie różni się w zasadzie od białka normalnego sekwencją aminokwasową, ale ma inne właściwości fizyko-chemiczne. Zmutowane białko jest odporne na trawienie enzymami proteolitycznymi, jego cząsteczki zbijają się w agregaty wypełniające cytoplazmę komórki. Gdy agregaty te nagromadzą się także w jądrze komórkowym, komórka obumiera, a agregaty białka prionowego pojawiają się w substancji międzykomórkowej. Białko prionowe ma odmienną od normalnej strukturę przestrzenną. Jej obecność powoduje, że normalne cząsteczki tego białka zawarte w cytoplazmie ulegają konwersji i zmieniają się w białko prionowe. Nie istnieje jasne wyjaśnienie tego mechanizmu.

Ostatnio podano drugą informację o normalnej funkcji niezmiennego białka kodowanego przez gen *PrP*. U myszy pozbawionych tego genu stwierdzono wyraźne zaburzenia rytmu okołodobowego, polegające głównie na zaburzeniach snu. Zaburzenia te polegające m.in. na fragmentacji okresu snu, przypominają schorzenie o genezie prionowej, występujące u ludzi. Jest to występująca spontanicznie w niektórych rodzinach bezsenność kończąca się śmiercią, tzw. bezsenność rodzinna śmiertelna – FFI – *fatal familial insomnia*.

Co do zakaźnego charakteru zmienionego konformacyjnie białka prionowego nie ma dziś wątpliwości. Zakażenie można doświadczalnie przekazywać z myszy na mysz preparatami nie zawierającymi żadnych elementów komórkowych. Nawet pewne właściwości przebiegu schorzenia charakterystyczne dla poszczególnych szczepów myszy zostają w ten sposób przekazywane. Zwiększenie ilości zmienionego konformacyjnie zakaźnego białka opornego na działanie proteaz można uzyskać przez zmianę konformacji *in vitro*, w warunkach, w których nie ma żadnych komórek w naczynku hodowlanym.

Probleatów oczekujących rozwiązania jest mnóstwo. Nie wiemy mianowicie, jak wędruje czynnik zakaźny u krów karmionych pożywieniem zawierającym priony (domieszka mózgow owiec padłych na kołowaciznę – *scrapie*) z przewodu pokarmowego do mózgowia. Istnieje uzasadniona hipoteza, że zakaźne białko jest resorbowane i przenika przez ścianę jelita, a następnie jest przenoszone naczyniami limfatycznymi do śledziony, skąd przez nerwy unerwiające śledzionę do rdzenia kręgowego i mózgowia. Istnieje możliwość, że układ immunologiczny odgrywa rolę w zakażeniu, ponieważ stwierdza się aktywność komórek mikrogleju.

Podstawowym zagadnieniem jest jednak to, czy człowiek może się zakazić schorzeniem BSE po zjedzeniu zakażonego mięsa, a więc czy ostatnio odkryte zmodyfikowane postaci CJD powstały w ten właśnie sposób. Zaplanowane jest przeprowadzenie doświadczenia, polegającego na wstrzyknięciu materiału uzyska-

nego od pacjentów chorych na CJD myszom. Jeżeli myszy zachorują, porówna się ich objawy z dobrze opisanymi objawami schorzenia myszy po wstrzyknięciu prionów BSE.

Oczywistym problemem jest znalezienie sposobu leczenia zakażonych chorych. Próby użycia leków grzybobójczych i polianionów wymagały użycia dużych stężeń do leczenia chorych myszy, ale dały tak silne objawy uboczne, że ich przydatność w terapii człowieka okazała się nierealna.

Nie istnieje też żadna sprawdzona metoda diagnostyczna świadcząca o zakażeniu. Metoda *Western blotting* próbowana na myszach okazała się mało przydatna ze względu na słabą czułość. Bariera międzygatunkowa wymaga wstrzyknięcia myszy dawki białka 10 000 razy większej niż dawka powodująca zakażenie krwi. Poszukiwania nowych technik diagnostycznych są w toku.

Prowadzi się usilne badania, których celem jest stwierdzenie, czy wzmiankowane na początku 10 przypadków CJD są rzeczywiście związane z zakażeniem BSE, co pomoże w przewidywaniu pojawienia się większej ilości takich przypadków w przyszłości.

Istnieje filogenetyczna mapa struktury biochemicznej białka prionowego uzyskanego od 33 gatunków kręgowców. Drzewo genealogiczne tych białek jest ułożone na podstawie różnic w sekwencjach aminokwasowych. Zaledwie u 6 gatunków (w tym u człowieka) z wymienionych 33 występują choroby prionowe spontanicznie. Nie wiemy, czy nie stoimy u progu pojawienia się na Ziemi łańcucha nowych dotąd nie znanych schorzeń, do których zwalczania nie jesteśmy zupełnie przygotowani.

Odkrycie prionów indukuje poszukiwania sposobu ewentualnego leczenia chorób degeracyjnych układu nerwowego. Ukazała się praca doświadczalna [2] wykonana na myszach pozbawionych genu białka prionowego. Są one oznakowane jako myszy *Prnp -/-*. Myszy takie są odporne na zakażenie prionami. Gdy myszom takim wprowadzi się do tkanki mózgowej przeszczep fragmentu mózgu pobranego od myszy *Prnp +/+* i zakazi się domózgowo prionami kołowacizny owiec (*priony scrapie*), to przeszczep ulegnie zakażeniu, ale otaczająca go tkanka mózgowa pozostaje odporna na zakażenie. Okazuje się, że w tym modelu doświadczalnym przeszczep *Prnp +/+* nie ulegnie zakażeniu, gdy priony wprowadzi się zwierzęciu dożylnie lub dootrzewnowo. Jeśli takim myszom wprowadzono dożylnie komórki szpiku od zwierzęcia wykazującego ekspresję genu prionowego, to po zakażeniu prionami drogą dożylną lub dootrzewnową, znajdowano ich znaczne stężenie w śledzionie, ale nie w przeszczepie *Prnp +/+* w mózgu. Wydaje się, że ekspresja normalnego białka prionowego w tkankach zwierzęcia jest niezbędna dla zaistnienia infekcji. Brak tego białka w tkankach peryferyjnych nie pozwala na zakażenie przeszczepu tkanki nerwowej w mózgu, nawet po podaniu prionów drogą dożylną czy dootrzewnową. Rozważane są możliwości wykorzystania tej informacji w zapobieganiu, a może nawet leczeniu chorób neurodegeneracyjnych.

Można mieć nadzieję, że nagroda Nobla za priony nie jest pomyłką. W każdym razie odkrycie zakaźnego białka uruchomiło lawinę badań i stworzyło cień nadziei na leczenie nieuleczalnych dotąd schorzeń degeneracyjnych układu nerwowego.

W niewielu przypadkach zagadnienia ekonomiczne i polityczne tak ściśle powiązały się z problemami czysto medycznymi. Można mieć pewność, że problem prionów wielokrotnie jeszcze powróci na łamy prasy i to nie tylko fachowej.

LITERATURA

- [1] AGUZZI A, WEISSMANN C. Spongiform encephalopathies: a suspicious signature. *Nature* 1996; **383**: 666–667.
- [2] BLATTLER T, BRANDNER S, RAEBER AJ, KLEIN MC, VOIGTLANDER T, WEISSMANN C, AGUZZI A. PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain. *Nature* 1997; **389**: 69–73.
- [3] COLLINGE J, SIDLE KC, MEADS J, IRONSIDE J, HILL AF. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of new variant CJD. *Nature*. 1996; **383**: 685–690.
- [4] HUNTER N, CAIRNS D, FOSTER JD, SMITH G, GOLDMANN W, DONNELLY K. Is scrapie solely a genetic disease? *Nature* 1997; **386**: 137.
- [5] MASTERS CL, BEYREUTHER K. Spongiform encephalopathies. Tracking turncoat prion proteins. *Nature* 1997; **388**: 228–229.
- [6] PARCHI P, CAPELLARI S, CHEN SG, PETERSEN RB, GAMBETTI P, KOPP N, BROWN P, KITAMOTO T, TATEISHI J, GIESE A, KRETZSCHMAR H. Typing prion isoforms. *Nature* 1997; **386**: 232–234.
- [7] RAYMOND GJ, HOPE J, KOCISKO DA, PRIOLA SA, RAYMOND LD, BOSSERS A, IRONSIDE J, WILL RG, CHEN SG, PETERSEN R., GAMBETTIP, RUBENSTEIN R, SMITS MA, LANSBURY PT, jr. CAUGHEY B. Molecular assessment of the potential transmissibilities of BSE and scrapie to humans. *Nature* 1997; **388**: 285–288.
- [8] SCHELLEKENS H. Spending on BSE research. *Nature* 1996; **383**: 211.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 24.10. 1997 r.

Przyjęto: 04.11. 1997 r.

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

BIAŁKA RODZINY 14-3-3, WYSTĘPOWANIE I WŁAŚCIWOŚCI*

THE 14-3-3 FAMILY OF PROTEINS, DISTRIBUTION AND PROPERTIES

Grzegorz WILCZYŃSKI, Ewa MARKIEWICZ, Anna KULMA, Jan SZOPA

Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław

Streszczenie: Licznie reprezentowane, wysoce konserwatywne białka rodziny 14-3-3 po raz pierwszy wyizolowano z mózgów bydłych jako grupę kwaśnych białek o masie cząsteczkowej około 30 kDa i punkcie izoelektrycznym około 5. Od czasu odkrycia, wiele homologicznych białek o zróżnicowanej funkcji wydzielono z licznych organizmów włączając ssaki, owady, drożdże i rośliny. Ostatnie doniesienia wskazują na udział tych białek w kontroli cyklu komórkowego i regulacji ekspresji genów. Poszczególne izoformy białek 14-3-3 aktywują syntezę neurotransmiterów i ADP-rybozylację białek, regulują aktywność kinazy C i endonukleazy macierzy jądrowej, asocjują z produktami protoonkogenów, onkogenów i genu *cdc25*. Szerokie spektrum aktywności sugeruje, że białka 14-3-3 mają wiele izoform i każda izoforma wykazuje unikalną funkcję. Zidentyfikowano co najmniej siedem izoform białka 14-3-3 ssaków i wiele takich izoform odnaleziono w większości komórek. Chociaż liczba ostatnio publikowanych prac na temat białek 14-3-3 zwiększa się niemal eksponencjalnie, to jednak ich funkcja pozostaje nadal nie w pełni wyjaśniona. W tej pracy podkreślono ważniejsze funkcje białek 14-3-3 i szczególnie skupiono się na ich roślinnych homologach.

Słowa kluczowe: białka 14-3-3, ekspresja genu, roślinne homologu 14-3-3

Summary: The abundant, highly conserved 14-3-3 family of proteins were originally isolated from bovine brain as a series of acidic proteins that had molecular masses of around 30 kDa and an isoelectric point of around 5. Since discovery several related proteins with different functions have been found in a wide variety of organisms including mammals, insects, yeast and plants. Recent findings point to a participation of these proteins in the control of the cell cycle and the regulation of gene expression. Members of the 14-3-3 protein family activate neurotransmitter synthesis and ADP-ribosylation of proteins, regulate protein kinase C and nuclear matrix endonuclease, associate with the products of proto-oncogenes, oncogenes and *cdc25* gene. The broad spectrum of activities suggests that the 14-3-3 proteins have several isoforms and that each isoform has its own unique function. At least seven mammalian isoforms of 14-3-3

*Praca finansowana z grantu KBN nr 6P04A04310 oraz badań własnych.

have been identified, and multiple isoforms are present in most cells. Although the number of recent publications on 14-3-3 proteins increase near exponentially their biological function is as yet far from clear. Here, we highlight most important functions of the 14-3-3 proteins, and in particular discuss plant 14-3-3 homologs.

Key words: 14-3-3 proteins, gene expression, plants homologs 14-3-3

WPROWADZENIE

Polipeptydy 14-3-3 zostały po raz pierwszy zidentyfikowane przez Moora i Pereza w wyniku systematycznej analizy białek mózgu wołu w elektroforezie dwukierunkowej jako grupa kwaśnych białek o masach cząsteczkowych od 27 kDa do 30 kDa i punkcie izoelektrycznym w przedziale 4,3–4,9. Oznakowanie symbolem 14-3-3 pochodzi od pozycji, jaką białka te przyjmują po zakończeniu rozdziału dwukierunkowego [61].

Dotychczas z mózgu ssaków wyizolowano osiem izoform białka 14-3-3 oznaczonych kolejnymi literami alfabetu greckiego na podstawie ich rozdziału podczas HPLC [37]. Występowanie białek 14-3-3 jest powszechne. Ich homologi zidentyfikowano w wielu organizmach eukariotycznych, takich jak: drożdże (*Saccharomyces cerevisiae* [34] i *Saccharomyces pombe* [24]), nicienie, owady (*Drosophila melanogaster*) [78], płazy (*Xenopus laevis*) [75], ryby, ptaki oraz ssaki. Obecne są również w wielu organizmach roślinnych, w tym w *Arabidopsis thaliana* [51, 71] i *Solanum tuberosum* [88].

Wydzielono i scharakteryzowano kilkanaście, pochodzących z różnych źródeł, białek 14-3-3. Wiele z nich zostało sklonowanych i zsekwencjonowanych. Porównanie sekwencji zarówno nukleotydowej, jak i aminokwasowej pozwala stwierdzić wysoki stopień podobieństwa (60–90%) występujący pomiędzy różnymi homologami. W poszczególnych izoformach zidentyfikowano wysoce konserwatywne, identyczne regiony niezmiennie w całej rodzinie tych polipeptydów.

Białkom tym przypisywano szereg różnorodnych funkcji, np: aktywacja hydroksylaz tyrozyny i tryptofanu, regulacja aktywności kinaz białkowych Raf-1, Bcr oraz kinazy białkowej C, udział w egzocytozie i cyklu komórkowym. Obecnie wydaje się, że białka te pełnią raczej rolę adaptacyjną w stosunku do białek biorących udział w przenoszeniu sygnałów wewnątrzkomórkowych modulując ich aktywność [3, 43].

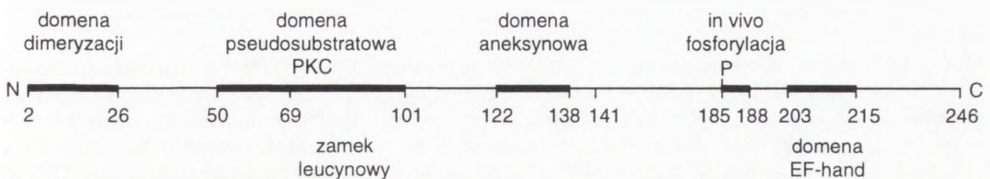
STRUKTURA DRUGORZĘDOWA BIAŁEK 14-3-3

Analizą mieszaniny izoform polipeptydów 14-3-3 z owiec metodą dichroizmu kołowego stwierdzono, że białka te zawierają 63,7% α -helisy i tylko 5,3% β -struktury [69]. Badaniami krystalograficznymi wykazano, że białka 14-3-3 występują w formie dimerycznej. Monomer stanowi układ dziewięciu antyrównoległych α -helis.

zorganizowanych w dwie domeny. C-końcowa domena ma charakter kwaśny, natomiast cechą charakterystyczną domeny N-końcowej jest jej wysoka konserwatywność. Domena N-terminalna bierze udział w dimeryzacji białka, aminokwasy od 5 do 21 jednego monomeru oddziałują z resztami aminokwasowymi Ser58 i Glu89 drugiego monomeru [89, 49]. Możliwe jest także tworzenie się heterodimerów wszędzie tam, gdzie następuje ekspresja więcej niż jednej izoformy [43], a ich skład może odgrywać kluczową rolę w fizjologicznej funkcji tych białek. Ponieważ reszty aminokwasowe od 9 do 16 domeny dimeryzacji są wysoce zmienne (rys. 1 i 2), to prawdopodobnie jest ograniczona liczba możliwych homo- lub heterodimerów, co może być przyczyną pewnej swoistości ich tworzenia. Dimeryzacja prowadzi do utworzenia dużego kanału, w którego skład wchodzi niezmiennie, negatywnie naładowane, reszty aminokwasowe N-końca polipeptydu, podczas gdy jego powierzchnię zewnętrzną budują aminokwasy zmienne. Fakt, że większość aminokwasów budujących kanał jest konserwatywna oraz że drożdżowy 14-3-3 może regulować aktywność białek ssaków, sugeruje, że jest to miejsce wiązania wielu różnorodnych białek regulowanych przez 14-3-3. W konserwatywnym kanale rozpoznawane są wspólne cechy strukturalne oddziałujących z 14-3-3 białek, natomiast specyficzność tych oddziaływań przypuszczalnie jest regulowana przez zewnętrzną powierzchnię kanału lub/i skład dimerów [39].

BIAŁKA 14-3-3 ULEGAJĄ FOSFORYLACJI

Występujące w mózgu ssaków izoformy α i δ są fosforylowanymi formami izoform β i ζ . Kinaza białkowa fosforylująca mózgowie izoformy 14-3-3 na reszcie Ser185 w motywie Ser-Pro-Glu-Lys (SPEK) nie jest jeszcze dokładnie scharakteryzowana, aczkolwiek najbardziej prawdopodobnymi enzymami wydają się być MAPK kinaza i kinaza zależna od cyklin [5]. Struktura krystaliczna białka 14-3-3 wskazuje, że miejsce fosforylacji w dystalnym regionie C-końcowej pętli jest ekspozowane do środowiska zewnętrznego [89]. U ssaków głównym miejscem występowania fosfoizoform jest tkanka mózgowa, w innych tkankach ich poziom jest znacznie niższy [5]. Białka 14-3-3 są fosforylowane nie tylko na reszcie Ser 185 i nie tylko przez MAPK kinazę i kinazę zależną od cyklin. Izofорма τ z limfocytów



Rys. 1. Struktura domenowa białek 14-3-3

T jest fosforylowana przez serynowo-treoninową kinazę Bcr. Sfingozyno-zależna kinaza może fosforylować izoformy 14-3-3 β , ζ oraz τ [59]. Postuluje się również fosforylację 14-3-3 przez kinazę inną niż ta, która fosforyluje motyw SPEK, ponieważ w nerkowej izoformie w miejscu motywu SPEK występuje fosforylowany motyw NPEL [3].

LOKALIZACJA KOMÓRKOWA I TKANKOWA

Badania nad lokalizacją mózgowych białek rodziny 14-3-3 pozwoliły stwierdzić, że pomimo zdecydowanie cytosolowego występowania znaczna ich część (40%) wykazuje silną i selektywną asocjację z błonami. Za wiązanie z błonami odpowiedzialny jest N-końcowy fragment izoformy τ o masie cząsteczkowej 12 kDa [44]. Udokumentowano oddziaływanie niektórych izoform białka 14-3-3 z fosfolipidami [73]. Kotwiczenie w błonach mogłoby nadawać tym białkom nową lub modyfikować posiadaną funkcję. Błonowe izoformy ulegają ekspresji w zróżnicowany sposób w różnych typach neuronów i rozłożone są w swoistych kompartmentach błonowych. Izofomy ϵ , η , γ , β i ζ są obecne w błonach synaptycznych, brak ich natomiast w błonach mitochondrialnych i otoczkach mielinowych. Dodatkowo izofomy η , ϵ , γ są związane z połączeniami synaptycznymi, a izofomy β i ζ wykazują lokalizację presynaptyczną. Te różnice w dystrybucji izoform sugerują, że pełnią one odrębne funkcje w różnych regionach synapsy. Taka lokalizacja białek 14-3-3 wskazuje na ich możliwy udział w kontrolowaniu przekazywania nerwowego [57].

Udział 14-3-3 w procesie syntezy neurotransmiterów

Pierwszą funkcją przypisaną białkom 14-3-3 była aktywacja hydroksylaz tyrozyny i tryptofanu, enzymów biorących udział w syntezie neurotransmiterów, odpowiednio katecholamin i serotoniny [37]. Enzymy te są aktywowane w wyniku fosforylacji przez kinazy białkowe: cAMP-zależną, cGMP-zależną i zależną od jonów wapnia i diacyloglicerolu. Pełną aktywność osiągają jednak dopiero po związaniu się z białkami 14-3-3. Region zawierający reszty aminokwasowe od 171 do 213 w izoformie η 14-3-3 oraz sekwencje aminokwasowe od 167 do 209 izoform τ i ζ oddziałują z ufosforylowaną hydroksylazą tryptofanu [38]. Hydroksylazy są strukturalnymi homologami składającymi się z dwóch domen, C-końcowej – katalitycznej i N-końcowej – regulatorowej. Prawdopodobnie 14-3-3 wiąże się do regulatorowej domeny hydroksylazy i aktywuje enzym przez indukcję zmiany konformacji. Tworzenie kompleksu hydroksylaza - 14-3-3 możliwe jest dopiero po uprzedniej fosforylacji hydroksylazy na reszcie seryny. Formowanie kompleksu nie ma jednak wpływu ani na zakres, ani na swoistość fosforylacji hydroksylazy [28, 37].

MODULACJA AKTYWNOŚCI KINAZY BIAŁKOWEJ C (PKC)

Ostatnio wykazano, że polipeptydy 14-3-3 oddziałują z konserwatywnym motywem znajdującym się w wielu białkach biorących udział w wewnątrzkomórkowym przenoszeniu sygnałów, co w pewnym stopniu wyjaśnia tak szerokie spektrum funkcji przypisywanych tym polipeptydom. Motyw ten o sekwencji R(S)X1,2S(P)X(P), gdzie S(P) oznacza fosfoserynę, funkcjonuje prawdopodobnie na zasadzie podobnej do domen SH2 (ang. *Src homology2*) wiążących się w sposób zależny od sekwencji do reszt fosfotyrozynowych. Głównym składnikiem motywu R(S)X1,2S(P)X(P) jest reszta fosfoseryny z Arg w pozycjach -3 lub -4 oraz Pro w pozycji +2 i Ser w pozycjach -2 lub -3 [65]. Niezbędność takiego motywu w oddziaływaniu i aktywacji białek przez polipeptydy 14-3-3 może tłumaczyć sprzeczne doniesienia dotyczące regulacji aktywności PKC przez 14-3-3. Wykazano zarówno stymulujący, jak i hamujący wpływ 14-3-3 na aktywność enzymatyczną PKC, zależnie od izoform PKC i 14-3-3 użytych do eksperymentów [1, 6, 40, 41, 44, 81, 83, 89]. Rodzina kinaz białkowych C składa się co najmniej z 10 izoenzymów, a ich rozmieszczenie w różnych tkankach ssaków pokrywa się z dystrybucją 14-3-3 [1]. Izoforma τ hamuje PKC w nieobecności klasycznych jej stymulatorów, takich jak diacylglicerol i estry forbolu [44]. Obecność tych czynników może obniżyć hamujący efekt polipeptydu 14-3-3 do ok. 60%, co sugeruje, że region wiążący diacylglicerol i estry forbolu w PKC (bogata w cysteinę domena palców cynkowych) odgrywa istotną rolę w oddziaływaniu z 14-3-3. Fosforylacja reszty Ser185 w 14-3-3 wzmacnia jego powinowactwo do PKC *in vitro* [6]. Izoforma 14-3-3 wydzielona z mózgu owcy (KCIP1) ma domenę pseudosubstratową dla PKC (rys. 1) pomiędzy aminokwasami od 54 do 57 i wykazuje zdolność hamowania aktywności kinazy C. Domena ta o sekwencji Gly-Ala-Arg-Arg jest rozpoznawana przez PKC [34], ale nie ulega fosforylacji, ponieważ w miejsce Ser lub Thr, znajdujących się w prawidłowym fosforylowanym substracie znajduje się reszta Ala [4, 82].

Fragment N-końcowy białka 14-3-3 (rys. 1) wykazuje wysoki stopień homologii do konserwatywnego, C-końcowego odcinka zależnych od jonów wapnia i DAG białek rodziny aneksyn [4]. Aneksyna V jest inhibitorem PKC [74]. Syntetyczny peptyd identyczny z tym regionem aneksyn hamuje wiązanie się PKC do białek RACK (ang. *RACK – receptors for activated C kinase*) [60]. We wszystkich 14-3-3 sekwencja KGDY domeny aneksynowej jest całkowicie konserwatywna (rys. 2). Mutacje w tej sekwencji nie miały jednak wpływu na aktywność PKC. Być może, ważniejsza jest tu dalsza, C-końcowa sekwencja domeny lub hydrofobowość otoczenia tego motywu [7].

Białka rodziny 14-3-3 mogą również aktywować kinazę białkową C [4, 40]. Homolog 14-3-3, ExoI, z wydzielniczych komórek gruczołu przytarczycznego wpływa za pośrednictwem kinazy C na Ca^{2+} -zależną egzocytozę [63, 72]. Izoforma 14-3-3 ζ aktywuje około pięciokrotnie izoformę PKC ϵ , około dwukrotnie izoformy

PKC α , β i γ izolowane z mózgu szczura, myszy oraz wołu, nie wykazuje żadnego wpływu na aktywność PKC δ . Zaobserwowano, że aktywacja kinazy C zachodzi niezależnie od obecności stymulatorów PKC, takich jak fosfatydyloseryna (PS) i estry forboleu (PMA), wymaga jednak obecności jonów wapnia i fosfolipidów [1].

Porównanie sekwencji wszystkich izoenzymów PKC z konserwatywnym motywem R(S)X1,2S(P)X(P) białka 14-3-3 wykazało, że najbliższy tej sekwencji motyw ma izoforma ϵ PKC w swojej domenie regulatorowej, prawdopodobnie więc izoforma ta najsilniej asocjuje z 14-3-3. Wyjaśnia to również największy wpływ izoformy ζ 14-3-3 na aktywność ϵ PKC [1, 6]. Izofory PKC α , β , γ i δ zawierają sekwencje o mniejszej homologii do tego motywu, natomiast izoforma ζ w ogóle nie ma sekwencji homologicznej do omawianego motywu białka 14-3-3. Zgodnie z oczekiwaniami polipeptyd 14-3-3 nie wywierał lub miał niewielki wpływ na aktywność izoform α , β , γ i δ kinazy C [3]. Nie wiadomo jednak, czy homolog motywu 14-3-3 w kinazie C (ϵ PKC) jest fosforylowany.

UDZIAŁ W WEWNĄTRZKOMÓRKOWYM PRZENOSZENIU SYGNAŁÓW

Izofory 14-3-3 β i ζ oddziałują i prawdopodobnie aktywują kinazę białkową Raf. Ekspresja drożdżowego homologu 14-3-3 o symbolu BMH1 w komórkach ssaków stymuluje aktywność Raf zarówno w cytosolu, jak i błonie cytoplazmatycznej. Asocjacja Raf z 14-3-3 jest niezbędna w jego aktywacji przez Ras [25, 26, 39]. Zwiększona ekspresja 14-3-3 w oocytach *Xenopus* przyspiesza ich dojrzewanie w reakcji zależnej od Raf [23,75]. Wykazano, że 14-3-3 oddziałuje z regulatorową domeną Raf w regionie CR1 zawierającym palce cynkowe, a także z bogatą w reszty Ser/Thr domeną CR2 oraz z domeną CR3 o właściwościach kinazowych [25, 39]. Przypuszcza się, że stymulacja aktywności Raf przez 14-3-3 wynika raczej ze stabilizacji Raf przez 14-3-3 niż z bezpośredniej stymulacji aktywności kinazowej Raf [2]. Duży wpływ ma najprawdopodobniej stopień fosforylacji obu składników, który jednak nie został jeszcze dokładnie poznany. Polipeptyd 14-3-3 i białko szoku termicznego hsp60 blokują defosforylację Raf, a przez to jego inaktywację. Natomiast stwierdzono, że dimer 14-3-3 wiąże się do N-końca (region CR1 i CR2) i C-końca (region CR3) kinazy Raf i może ją utrzymywać w nieaktywnej konformacji [47, 70]. Model aktywacji Raf przez Ras z udziałem polipeptydu 14-3-3 polega prawdopodobnie na tym, że zaktywowany Ras (Ras-GTP) zwalnia 14-3-3 z N-terminalnej domeny CR2 Raf, przy czym 14-3-3 ciągle jeszcze oddziałuje z C-końcową domeną Raf prawdopodobnie przez motyw zawierający fosfoserynę w pozycji 621. Następnie Ras powoduje przemieszczenie się rozwiniętej formy Raf do błony, gdzie może ulegać dalszej fosforylacji i aktywacji. Szybka zmiana formy aktywnej enzymu do nieaktywnej możliwa jest dzięki temu, że 14-3-3 jest wciąż związany do C-końca

kinazy Raf. Model ten sugeruje, że 14-3-3 nie jest bezpośrednio regulatorem kinazy białkowej Raf, ale stabilizuje pewną jej konformację [70].

Aktywacja Raf i transport do błony cytoplazmatycznej umożliwia jego oddziaływanie z innymi białkami funkcjonującymi również jako przekaźniki wewnątrzkomórkowe. Serynowo-treoninowa kinaza białkowa c-Bcr tworzy przez dimer 14-3-3 kompleks z aktywnym, związanym z błoną Raf, co umożliwia ich właściwą orientację w błonie względem siebie i ich substratów [13]. Ludzka izoforma 14-3-3 τ , specyficzna dla limfocytów T, wiąże się i jest fosforylowana na reszcie Ser przez kinazę Bcr. Kinaza Bcr ma w swej sekwencji regiony podobne do domen CR1 i CR2 kinazy Raf.

Powstające w wyniku transformacji nowotworowej białko fuzyjne Bcr-Abl (gen kodujący Bcr jest miejscem dwóch możliwych pęknięć chromosomu i wzajemnej translokacji z protoonkogenem c-abl) może fosforylować 14-3-3 na reszcie Tyr [68].

Izoformy 14-3-3 asocjują z antygenem T (MT) wirusa polyoma (*polyoma virus middle T antigen*), który z kolei oddziałuje z innymi białkami związanymi z regulacją proliferacji komórki. MT wiąże się do czynników Shc i Grb2, białek wiążących GTP i regulujących aktywność Ras, nadto do białek SOS, a także do kinazy 3-fosfoinozytolu (PI3-kinaza), która modyfikuje aktywność kinazy Raf [67]. Dalsze badania wykazały bezpośrednie oddziaływanie izoformy τ 14-3-3 z katalityczną podjednostką PI3-kinazy w stymulowanych antygenem MT limfocytach T. MT antygen asocjuje z domenami SH2 i SH3 regulatorowej podjednostki PI3-kinazy. Sugeruje to obecność dużego kompleksu sygnałowego, w którym białko 14-3-3 stanowi platformę (*scaffold*) dla interakcji domen SH2 i SH3 [11]. Bardzo podobne jest działanie izoform 14-3-3 ϵ i ζ , które asocjują z konstruktem rekombinacyjnym zawierającym C-terminalne domeny SH2 i SH3 onkoproteiny Vav. Onkoproteina działa prawdopodobnie jako swoisty dla komórek hematopoetycznych czynnik aktywujący wymianę GDP na GTP w białkach rodziny Ras. Izoformy 14-3-3 nie wiążą się jednak z pełną cząsteczką rekombinacyjnego Vav, prawdopodobnie więc białka te nie oddziałują *in vivo* [77].

Dalsze powiązanie 14-3-3 z komórkowym przekazywaniem sygnałów wykazują badania, w których stwierdzono, że eukariotycznym czynnikiem, który aktywuje exoenzym S z *Pseudomonas aeruginosa*, jest izoforma ζ 14-3-3. Exoenzym S ma zdolność ADP-rybozylacji białek Ras i innych białek wiążących GTP. ADP-rybozylacja Ras-podobnych, białek wiążących GTP zaburza transport pęcherzykowy podczas infekcji przez patogeny. Ponadto wykazano, że nie istnieje bezpośrednio oddziaływanie pomiędzy ADP-rybozylotransferazą a 14-3-3 [27].

Zidentyfikowano u drożdży *S. cerevisiae* dwa homologii 14-3-3, a mianowicie BMH1 i BMH2, biorące udział w transporcie pęcherzykowym. BMH2 i w mniejszym stopniu BMH1 przywracają cechy szczepu dzikiego mutantom drożdżowym mającym delecję w genie kodującym ciężki łańcuch klatryny [31]. Roślinne 14-3-3

z *Arabidopsis* uzupełniają mutanty drożdżowe, w których wprowadzono zmiany w genach kodujących BMH1 i BMH2 [35]. Sugeruje to albo nieswoistość izoform 14-3-3 w ich oddziaływaniu z innymi białkami, albo że ich szerokie spektrum aktywności związane jest z obecnością motywu R(S)X1,2S(P)X(P).

KONTROLA CYKLU KOMÓRKOWEGO

W komórkach drożdżowych obok homologów 14-3-3 opisanych symbolami BMH1 i BMH2 (*S. cerevisiae*) zidentyfikowano dwa kolejne homologi rad24 i rad25 (*S. pombe*). Delecja obu izoform 14-3-3 w wymienionych szczepach drożdży jest letalna. Oporność komórek drożdżowych na promieniowanie UV jest zależna od ekspresji homologów 14-3-3, rad24 i rad25. Białka te są również zaangażowane w kontrolę cyklu komórkowego, a dokładniej w naprawę DNA. Mutanty ze zmianami w genach rad24 i rad25 wchodzi wcześniej w mejozę [24].

Fosfatazy cdc25 pełnią kluczową rolę w kontroli cyklu komórkowego przez wybiórczą defosforylację i następującą aktywację kinaz zależnych od cyklin. Wykazano oddziaływanie ludzkich fosfataz cdc25A i cdc25B z dwiema izoformami 14-3-3, a mianowicie z ϵ oraz β zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Polipeptyd 14-3-3 nie wpływa jednak na aktywność fosfatazową cdc25A. Kinaza Raf, oddziałująca z 14-3-3, wiąże się również z cdc25A i stymuluje jej aktywność fosfatazową. Dodać należy, że białko 14-3-3 nie zmienia aktywności kinazowej Raf względem cdc25A. Prawdopodobnie polipeptyd 14-3-3 ułatwia asocjację Raf z cdc25 *in vivo* biorąc udział w połączeniu między komórkowym przenoszeniem sygnałów a cyklem komórkowym. Należy również dodać, że podobnie jak w przypadku kinazy Raf-1, fosfataza cdc25 nie wiąże się bezpośrednio z białkiem 14-3-3 w warunkach *in vitro* [18, 29].

W komórkach ssaków wykazano udział 14-3-3 w kontroli cyklu komórkowego przez jego oddziaływanie z keratynami K8 i K18 filamentów pośrednich tkanek nabłonkowych. Oddziaływanie to jest regulowane przez fosforylację. Białko 14-3-3 oddziałuje preferencyjnie z K18 podczas fazy S i w czasie przejścia komórek z fazy G2 do M. Wprowadzenie mutacji w regionie K18 ulegającym fosforylacji uniemożliwia powstanie tetramerycznych filamentów keratynowych K8-K18 w komórkach zatrzymanych na granicy faz G2/M. Znanymi białkami asocjującymi z K8-K18 jest katalityczny fragment domeny PKC ϵ i dwa polipeptydy (hsp70) z rodziny białek szoku cieplnego [48].

INNE FUNKCJE

Białka 14-3-3 kompleksują z histonami i regulują ich fosforylację i defosforylację. Zdolność wiązania się kwaśnych białek 14-3-3 z histonami wykazano przy pomocy

czynnika sieciującego (ang. *dimethyl suberimide*) i chromatografii na złożu z immobilizowanymi histonami. Konsekwencją tworzenia się takich kompleksów mogłaby być regulacja ekspresji genów. Polipeptyd 14-3-3 stymuluje fosforylację histonów przez PKC, hamuje natomiast ich defosforylację katalizowaną przez Ser/Thr-specyficzne fosfatazy 1 (PP1) i 2A (PP2A). Hamowanie defosforylacji histonów przez 14-3-3 może być konsekwencją zarówno interakcji z fosfatazą, jak i z histonami [16]. Wykazano również zahamowanie defosforylacji, a zatem inaktywacji, związanego z błoną Raf przez fosfatazy PP1 i PP2A i tyrozynowo-specyficzną PTP1B w obecności 14-3-3 ζ [21].

W proliferujących fibroblastach poziom jednej z izoform 14-3-3 jest znacznie obniżony w porównaniu do komórek transformowanych wirusem *SV40* [15].

Wykazano również oddziaływanie *in vitro* 14-3-3 z białkiem NS2 parwowirusa myszy (ang. *minute virus of mice*) związanego z prowirusową amplifikacją DNA, jak i efektywną produkcją wirusa w komórkach gospodarza [14].

Izoformy 14-3-3 asocjują z ATP-zależnym białkowym czynnikiem(ami) wątroby szczura, który stymuluje import białek prekursorowych do izolowanych mitochondriów [8].

Izoformie ζ 14-3-3 przypisywano również aktywność fosfolipazy A2 [92], ale ostatnie badania z zastosowaniem białek rekombinacyjnych wykazały brak tej aktywności [64, 69].

Udokumentowano oddziaływanie 14-3-3 z łożyskową glikoproteiną GPIb-IX (receptor czynnika von Willebranda) pośredniczącą w adhezji łożyska do naczyń krwionośnych [22, 87].

Białka 14-3-3 biorą udział w programowanej śmierci komórki (apoptozie). Czynniki promujące wejście komórki w apoptozę – BAD, po fosforylacji przez inne czynniki wewnątrzkomórkowe (IL-3) na reszcie Ser wiąże się z 14-3-3 w cytosolu, uniemożliwiając wejście komórki w stan apoptozy. Niefosforylowany BAD tworzy dimery w błonie z BCL-XL i aktywuje wejście komórki na drogę apoptozy [91]. Białko 14-3-3 jest fosforylowane przez sfingozyno-zależną kinazę białkową [59]. W cyklu sfingomielinowym, zaktywowana sfingomielinaza przekształca błonową sfingomielinę w ceramidy, będące znanymi czynnikami hamującymi wzrost komórki oraz indukującymi apoptozę [32].

Ostatnio metodą screeningu dwuhybrydowego (ang. *two hybrid screening system*) wykazano oddziaływanie 14-3-3 z białkiem A20 – inhibitorem apoptozy wywołanej czynnikiem martwicy nowotworu. W immunoprecypitacie ekstraktu komórek nowotworu zidentyfikowano białka: 14-3-3, c-Raf i A20. Współimmunoprecypitacja c-Raf i A20 zależy od obecności 14-3-3, co sugeruje jego adaptorową funkcję w oddziaływaniu kinazy Raf i białka A20 [86].

Analizą białek ekstraktu mózgu szczura precypitowanych za pomocą poliklonalnych przeciwciał skierowanych przeciw transferazie sjałowej wykazano obecność białka 14-3-3. Biorąc pod uwagę, że aktywność transferazy jest regulowana przez

kinazę białkową C oraz że 14-3-3 wpływa na aktywność PKC, można przypuszczać, że polipeptyd 14-3-3 ma również regulatorowy wpływ na aktywność transferazy sialowej [30].

Pomimo że aktywności przejawiane przez rodzinę białek 14-3-3 są dobrze zdefiniowane, to jednak zasób informacji o sposobie regulacji tych aktywności, np. w rozwoju organizmu czy przez warunki środowiskowe jest dość skąpy. U *Drosophila melanogaster* poszczególne izoformy 14-3-3 ulegają ekspresji w tkankowo-specyficzny sposób. Gen kodujący 14-3-3 charakteryzuje się zróżnicowanym wzorem ekspresji, syntetyzowany jest mRNA o trzech różnych długościach, z których każdy pojawia się w ściśle określonym przedziale czasowym w rozwoju organizmu. mRNA o długości 1 kb jest intensywnie produkowany w zapłodnionym jajku i dziedziczony matczynie, mRNA o długości 1,9 kb pojawia się w embrionach i utrzymuje się na wysokim poziomie podczas embriogenezy, a 2,9 kb mRNA ulega specyficznej ekspresji w tkance nerwowej głowy. Trudno jest jednak połączyć te informacje ze sposobem, w jaki poszczególne izoformy są regulowane oraz z funkcją, jaką pełnią w ściśle określonych przedziałach czasowych [78]. Mutanty *Drosophila* ze zmianą w genie kodującym 14-3-3 w tzw. *mushroom bodies* miały obniżoną zdolność uczenia się i rozpoznawania zapachów. Mutacja nie miała wpływu na anatomię mózgu. Wysunięto przypuszczenie o uczestnictwie białek 14-3-3 w procesach uczenia się i zapamiętywania [76].

ROŚLINNE BIAŁKA 14-3-3

Białka 14-3-3 zostały również zidentyfikowane w wielu organizmach roślinnych, w tym u *Arabidopsis* [51, 71], w ryżu [54], pomidorze [46], kukurydzy [84], dyni patison [79, 80] i ziemniaku [88]. Polipeptydy roślinne wykazują wysoki, około 60% stopień homologii do izoform ssaczych zarówno w sekwencji nukleotydowej, jak i aminokwasowej (rys. 2). Roślinne 14-3-3 mają właściwości analogiczne do ich homologów zwierzęcych. Izofornie izolowane z *Arabidopsis*, szpinaku, grochu i ryżu hamują aktywność PKC z mózgu owcy [33]. Rekombinacyjna izoforma ω 14-3-3 z *Arabidopsis* aktywuje enzym *exoS* oraz pochodzące z mózgu szczurzego hydroksylazę tryptofanu i PKC w sposób podobny do wołowej 14-3-3. Jak wspomniano wcześniej, rekombinacyjne białko 14-3-3 pochodzące z *Arabidopsis* przywraca cechy typu dzikiego szczepom drożdżowym o zmutowanych białkach 14-3-3 [53].

Roślinna izoforma 14-3-3 ω wiąże jeden jon Ca^{2+} . Roślinne homologi mają konserwatywną resztę Gly w C-końcowym regionie [52]. Region ten przypomina motyw „EF-hand” wiążący Ca^{2+} . Reszta ta jest ważna dla funkcji tego motywu i nie występuje w ssaczych izoformach, nie wykazano również wiązania jonów Ca^{2+} przez te izoformy [7].

14-3-3 a regulacja transkrypcji. Jako jedne z pierwszych zostały sklonowane i wydzielone homologi 14-3-3 z *Arabidopsis* i kukurydzy i nazwane „GF14” z powodu ich zdolności wiązania się do G boxów (*G-box Factor*, *14-3-3 homolog*) [50]. Regulacja ekspresji genów na poziomie transkrypcji zależy od interakcji sekwencji regulatorowych genu z elementami cis oraz czynnikami trans. Motywy sekwencji DNA, tzw. „G-boxy” (5'-CCACGTGG-3') są ważnym elementem obecnym w wielu genach, w tym w kodującym dehydrogenazę alkoholową i genach indukowanych czynnikami środowiska, takich jak geny dla syntazy chalkonu i małej podjednostki RuBisCo [51]. Dalsze badania wykazały jednak, że GF14 nie oddziałuje bezpośrednio z DNA, a wiązanie do sekwencji „G-box” odbywa się przez inne białko o nazwie *G-box Binding Factor* (GBF). GF-14 nie ma bowiem motywu palców cynkowych, charakterystycznego dla białek klasy bZIP wiążących DNA. Ma natomiast powtórzony motyw Ileu-Leu (niepełny motyw zamka leucynowego) odpowiedzialny za oddziaływanie białko-białko, oraz kwaśny N-końcowy fragment mogący tworzyć amfipatyczną α -helisę charakterystyczną dla czynników aktywujących transkrypcję [85]. Równie istotną domeną obecną w GF14 jest motyw „EF-hand”, zlokalizowany w C-końcowym fragmencie białka i odpowiedzialny za wiązanie jonów wapnia dzięki obecności kwaśnych reszt aminokwasowych zlokalizowanych wewnątrz pętli strukturalnej domeny: helisa-pętla-helisa. Motyw „EF-hand” jest wysoce konserwatywny we wszystkich 14-3-3 zarówno roślinnych, jak i zwierzęcych. Rekombinacyjny GF14 z *Arabidopsis* wiąże jony wapnia *in vitro* w warunkach fizjologicznych (1 atom na monomer) i jest fosforylowany w warunkach fizjologicznych na reszcie Ser przez endogenną kinazę białkową. Poprzez wiązanie się do motywów „G-box” białka 14-3-3 biorą udział w regulacji transkrypcji, jak również stanowią połączenie pomiędzy szlakami przenoszenia sygnału i czynnikami trans wiążącymi DNA. Jako część kompleksu białkowego wiążącego się do elementów promotora licznych genów, GF14 może stanowić ważny regulator wzrostu, rozwoju i odpowiedzi środowiskowej roślin [52].

Ostatnio zidentyfikowano gen kodujący GF14 określony jako GRF-GF14_χ. Porównanie sekwencji tego genu z sekwencjami cDNA kodującymi inne białka 14-3-3 wykazało, że najbardziej konserwatywne domeny kodowane są przez pierwsze trzy eksony, a charakteryzujący się dużą różnorodnością C-koniec przez zmienny czwarty ekson specyficzny dla danej izoformy. Ekspresja genu β -glukuronidazy, znajdującej się pod kontrolą promotora genu GRF-GF14_χ w transgenicznych *Arabidopsis* wykazała jego najwyższą aktywność w korzeniach zarówno dojrzałych, jak i młodych roślin. W młodych kwiatach najsilniejszą ekspresję zlokalizowano w pąkach, w dojrzałych kwiatach – w znamieniu, pręcikach i pyłku. W niedojrzałych owocach aktywność promotora GF14_χ początkowo obserwowano w podstawie słupka, a następnie w całych dojrzałych owocach. Hybrydyzacja *in situ* antysensem RNA/RNA wykazała najwyższą ekspresję mRNA w tkance epidermalnej korzeni, okwiacie, płatkach kwiatowych, pączkach kwiatowych, komórkach papillarnych kwiatów, owo-

cach i endospermie dojrzałych nasion. Dane te wskazują, że ekspresja 14-3-3 jest komórkowo- i tkankowo-specyficzna [20], podobnie jak to obserwowano dla ssaczjej tkanki mózgowej.

Udział 14-3-3 w przenoszeniu sygnałów ze środowiska zewnętrznego. Białka 14-3-3 mogą też być czynnikami zamieniającymi sygnał zewnętrzny w stymulację specyficjnej transkrypcji. Podczas infekcji jęczmienia przez patogenny grzyb (*Erysiphe graminis*) znacznie wzrasta poziom mRNA kodującego białko 14-3-3. Indukowane nagromadzenie 14-3-3 w komórkach jęczmienia koreluje się z innymi formami odpowiedzi na infekcję, np: z nabytą odpornością na następną infekcję czy tworzeniem się wtórnych struktur ściany komórkowej. Sugeruje się, że podwyższony poziom 14-3-3 w odpowiedzi rośliny na patogen może być związany z jego wpływem na aktywność kinaz białkowych. Badania nad komórkami roślinnymi wskazują, że ich odpowiedzią na inwazję patogenu są zmiany w fosforylacji białek [12]. Udział 14-3-3 w zmianie wzoru fosforylacji białek w roślinach pod wpływem patogenu nie jest jednak udokumentowany, opiera się raczej na analogii z komórkami zwierzęcymi i znanymi aktywnościami tych polipeptydów. Niedawno stwierdzono, że roślinny receptor toksyny grzybowej – fusikoksyny (FCBP) należy do rodziny białek 14-3-3 [45, 58, 66]. Związany z błoną receptor FCBP wiąże fusikoksynę (FC) i kompleks ten aktywuje H^+ -zależną ATP-azę. Przypuszcza się, że zmiany metaboliczne wywołane przez fusikoksynę i aktywację FCBP, mogą przebiegać przez swoiste reakcje fosforylacji angażujące kinazy białkowe. Odcinek C-końcowy roślinnej H^+ -ATPazy ma kilka miejsc potencjalnej fosforylacji, a defosforylacja enzymu prowadzi do zwiększonej jego aktywności. Kinaza zależna od jonów wapnia i fosfolipidów, fosforylująca H^+ -ATPazę została częściowo oczyszczona z korzeni owsa. Proponuje się model, w którym wiązanie FC do FCBP wpływa na aktywność kinazy białkowej, tak że ATPaza nie ulega fosforylacji. Białko 14-3-3 pełni tu funkcję nie tylko receptora, wiążąc fusikoksynę, ale również reguluje kinazę białkową swoistą dla ATPazy [62] w sposób podobny do regulacji PKC w komórkach zwierzęcych [45].

Zaobserwowano, że białka 14-3-3 biorą także udział w procesach adaptacji roślin do warunków środowiska. Z biblioteki cDNA etiolowanych i zaaklimatyzowanych do niskiej temperatury kiełków *Arabidopsis* wyizolowano dwa klony RCI1 i RCI2 (ang. *Rare Cold-Inducible*), wykazujące wysoki stopień homologii do rodziny białek 14-3-3. Ekspresja obu genów jest indukowana niską temperaturą, niezależnie od organu rośliny (w równych ilościach w liściach, łodygach i kwiatach) oraz jej stadium rozwojowego (w etiolowanych kiełkach i w dorosłych roślinach). Chociaż oba geny kodują bardzo podobne białka, ich ekspresja wydaje się być regulowana w sposób zróżnicowany. Kodujący RCI1 mRNA nagromadza się szybciej i w większej ilości niż mRNA dla RCI2, co świadczy o zróżnicowanej odpowiedzi tych genów na stres zimna. Po przeniesieniu roślin do temperatury pokojowej ilość mRNA dla RCI1 zmniejsza się szybciej, osiągając prawidłowy poziom po 24 godzinach,

a dla RCI2 po 7 dniach. W porównaniu do innych opisanych do tej pory białek regulowanych niską temperaturą, indukcja RCI następuje wolniej, osiąga niższy poziom końcowy oraz wolniej wraca do stanu wyjściowego po usunięciu induktora. Ta zróżnicowana ekspresja może stanowić odzwierciedlenie zmian w regulacji transkrypcji albo w stabilności mRNA. W przeciwieństwie do większości innych aktywowanych niską temperaturą genów roślinnych ekspresja RCI nie jest indukowana kwasem absycynowym (ABA) i stresem wodnym, co wskazuje na uczestnictwo polipeptydów 14-3-3 w niezależnym od kwasu absycynowego szlaku przenoszenia sygnałów [42].

Również zwiększone zasolenie środowiska powoduje wzrost ekspresji genu kodującego 14-3-3. Z biblioteki cDNA tytoniu zaadaptowanego do ekstremalnych stężeń NaCl wyizolowano klon cDNA kodujący białko 14-3-3 stymulujące ADP-rybozylującą aktywność ExoS *in vitro*. Poziom transkryptu mRNA jest znacznie podwyższony u roślin zaadaptowanych do wysokich stężeń NaCl. Krótkoterminowe traktowanie NaCl, ABA lub etylenem nie wywołuje takiego efektu. Ekspresja jest tkankowo swoista. Najwyższy poziom transkryptu obserwuje się w korzeniach i kwiatach. Rekombinacyjny polipeptyd wykazuje aktywność hamującą PKC *in vitro*. Podobnie jak 14-3-3 z kukurydzy, izoforma z tytoniu asocjuje z motywem „G-box” promotora genu osmotyny, którego ekspresja jest regulowana stężeniem soli w środowisku [17].

14-3-3 regulują metabolizm wewnątrzkomórkowy. U roślin wyższych pierwszym enzymatycznym etapem w asymilacji azotu jest redukcja azotanów do azotynu katalizowana przez NADH:reduktazę azotanową (NR). Regulacja aktywności tego enzymu odbywa się przez kontrolę poziomu jego ekspresji oraz fosforylację i defosforylację białka enzymatycznego. Fosforylacja NR nie jest wystarczającym czynnikiem kontrolującym aktywność enzymu. Wyizolowano białkowy inhibitor (IP) z liści szpinaku, który oddziałuje i hamuje fosforylowaną aktywną formę NR w obecności jonów Mg^{2+} lub Ca^{2+} . Oddziaływanie fosfo-NR z IP swoiście hamuje przepływ elektronów pomiędzy hemem a domeną kofaktora molibdenowego, najprawdopodobniej przez zmiany konformacyjne. Wykazano, że IP należy do rodziny białek 14-3-3. Rekombinacyjny GF14 również hamuje aktywność NR [10]. Regulacja NR przez fosforylację na reszcie Ser-543 jest procesem dwustopniowym: najpierw Ser-543 w NR (ze szpinaku) jest fosforylowana przez Ca^{2+} -zależną NR-kinazę, a następnie fosfo-NR oddziałuje z IP tworząc nieaktywny kompleks. Jak wspomniano wcześniej, 14-3-3 są białkami oddziałującymi specyficznie w sposób zależny od sekwencji z motywem RSXS(P)SXP. Motyw ten jest podobny do fosforylowanego i regulatorowego motywu NR o sekwencji RTAS(P)TP. 14-3-3 wiąże się do fosforylowanego miejsca regulatorowego NR i chroni je przed atakiem endogenych fosfataz [9, 62]. Wykazano, że fusikoksyna może blokować aktywność 14-3-3 jako inhibitora fosfo-NR [62].

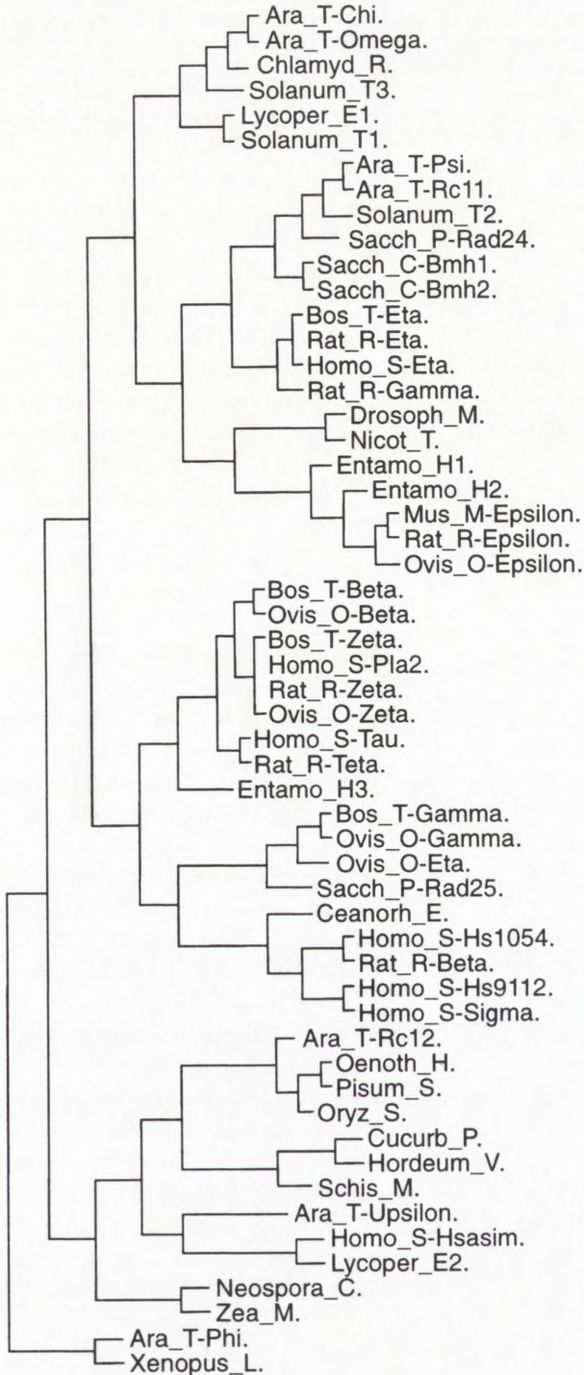
Ostatnio zasugerowano funkcję 14-3-3 w kontroli obumierania komórek bakteryjnych i roślinnych. W badaniach modelowych zademonstrowano, że nadekspresja cDNA kodującego 14-3-3 z *Cucurbita pepo* i jego skróconej wersji Δ N-14-3-3, pozbawionej domen dimeryzacji i pseudosubstratowej dla PKC powoduje zmiany we wzroście i przeżywalności komórek bakteryjnych *E. coli* (XL-1). Bakterie zawierające pełny klon proliferują szybciej i przeżywają dłużej niż te z nadekspresją klonu Δ N-14-3-3. Nadekspresja 14-3-3 lub jego fragmentu z delecją ma również wpływ na integralność bakteryjnego chromosomu. Nadekspresja Δ N-14-3-3 powoduje szybką degradację genomowego DNA, natomiast w komórkach z pełnym klonem proces ten jest znacznie opóźniony w porównaniu do komórek zawierających pusty plazmid [56]. Rekombinacyjny 14-3-3 z *C. pepo* oddziałuje w warunkach *in vitro* i *in vivo* z roślinną endonukleazą 32 kDa. Sugeruje to udział 14-3-3 w kontroli obumierania komórek roślinnych [55]. Podobnie do komórek bakteryjnych, rośliny transgeniczne (ziemniaki) ekspresjonujące 14-3-3 z *C. pepo* w orientacji sensowej lub antysensowej mają odpowiednio wydłużony bądź skrócony okres wegetacji w stosunku do roślin kontrolnych [55, 88].

W warunkach indukowanego ciemnością starzenia, liście ziemniaków kontrolnych obumierają znacznie szybciej niż liście roślin transgenicznych z nadekspresją 14-3-3. W warunkach ciemności w liściach roślin kontrolnych znacznie szybciej spadał poziom 14-3-3, a wzrastał poziom nukleaz w porównaniu do ziemniaków z nadekspresją, korelując się z poziomem dezintegracji genomowego DNA. Hodowane w ciemności rośliny kontrolne znacznie szybciej traciły chlorofil i wykazywały objawy starzenia niż rośliny z nadekspresją 14-3-3. Sugeruje to, że poziom 14-3-3 może być markerem starzenia u roślin [55].

W liściach ziemniaka zidentyfikowano i sklonowano 6 izoform białka 14-3-3, również analiza w *western blot* ekstraktów liściowych pokazuje obecność 5 pasm reagujących z przeciwciałami anty-rekombinacyjne białko 14-3-3. W ekstraktach z liści obserwuje się zmienny poziom całkowitej ilości wszystkich izoform 14-3-3, jak i stosunek ilości tych izoform względem siebie w zależności od piętra rośliny, z którego liście zostały pobrane. Świadczy to o regulacji poziomu ekspresji poszczególnych izoform w trakcie rozwoju organizmu. Prawdopodobnie więc geny białek 14-3-3 podlegają różnorodnej kontroli w trakcie wzrostu i rozwoju organizmu [88].

PODSUMOWANIE

W pracy dokonano przeglądu aktualnych doniesień na temat nowej rodziny białek opisanych symbolem 14-3-3, ich występowania i właściwości ze szczególnym uwzględnieniem polipeptydów pochodzących z roślin. Białka rodziny 14-3-3 występują w wielu izoformach we wszystkich tkankach organizmów, z wyjątkiem prokariotycznych, z wyraźnie zaznaczającą się ewolucyjną zależnością pomiędzy spe-



Rys. 3. Drzewo ewolucyjne rodziny białek 14-3-3

Tabela 1. Białka wiążące się do białek 14-3-3 i ich funkcje

Białka wiążące 14-3-3	Funkcje
Hydroksylaza tyrozyny	enzym biorący udział w syntezie dopaminy
Hydroksylaza tryptofanu	enzym biorący udział w syntezie serotoniny
N-acetylo transferaza serotoninowa	enzym biorący udział w syntezie melanin [19]
Kinaza białkowa C (PKC)	zależna od fosfolipidów Ser/Thr kinaza białkowa
c-Raf-1, B-Raf	Ser/Thr kinaza białkowa; bierze udział w Ras-zależnym mitogennym przekazywaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych
Bcr (<i>breakpoint cluster region protein</i>)	aktywuje GTP-azową aktywność p21 ^{Rac} ; ma również aktywność Ser/Thr kinazy białkowej,
Antygen T (MT) wirusa polyoma	mysi antygen wirusa polyoma, oddziałuje z białkami związanymi z regulacją proliferacji komórki
Onkoproteina Vav	swoisty dla komórek hematopoetycznych czynnik aktywujący wymianę GDP na GTP w białkach rodziny Ras,
Enzym exoS	ADP-rybozylacja białek wiążących GTP
cdc25 fosfatazy	Thr specyficzne fosfatazy biorące udział w cyklu komórkowym aktywujące kinazy zależne od cyklin
K8/K18 składniki nabłonkowych filamentów pośrednich	biorą udział w cyklu komórkowym
Histony	białka stabilizujące strukturę DNA
Białko NS2	białko wirusa myszy, związane z prowirusową amplifikacją DNA i namnażaniem wirusa
ATP-zależny czynnik białkowy	pochodzący z wątroby szczura czynnik stymuluje import białek prekursorowych do mitochondrii
Glikoproteina GPIb-IX	receptor czynnika vonWillebranta, pośredniczy w adhezji łożyska do naczyń krwionośnych
BAD	czynnik biorący udział w apoptozie
Białko A20	czynnik hamujący apoptozę indukowaną TNF- α
Transferaza sialowa	modyfikacja glikoprotein [30],
Kinaza fosfoinozitolowa	enzym biorący udział w wewnątrzkomórkowym przenoszeniu sygnałów [90]
Kinaza białkowa <i>weel</i>	mysia kinaza białkowa współczyszczająca się z mik1, fosforyluje p34 na Tyr15 [36]
Roślinne czynniki stymulujące transkrypcję	białka wiążące się do G boksów, cis-działających elementów promotorów indukowalnych genów
Roślinna H ⁺ -ATPaza	błonowa pompa protonowa aktywowana przez kompleks fusikoksyna/14-3-3
Roślinna reduktaza azotynowa	enzym biorący udział w asymilacji azotu; redukuje azotany do azotynów
Roślinna nukleaza 32 kDa	degraduje komórkowy DNA; bierze udział w starzeniu się roślin

cyficznymi izoformami w różnych gatunkach roślin i zwierząt (rys. 3). Ustalono, że polipeptydy 14-3-3 oddziałują z wieloma białkami (tab. 1) uczestniczącymi w wewnątrzkomórkowym przenoszeniu sygnałów, takimi jak Raf, kinaza 3-fosfatydylinozytolu, Bcr-Abl, glikoproteina GPIb-IX, fosfataza cdc 25, białko A20, endonukleaza 32 kDa. Lista białek oddziałujących z 14-3-3 stale się powiększa. Niestety nie udało się, jak dotychczas, rozpoznać funkcjonalnych konsekwencji takiego oddziaływania. Biorąc pod uwagę powszechność występowania 14-3-3, mnogość izoform i ogromną ilość różnorodnych białek, z którymi oddziałują, jedyną przekonującą, potencjalną funkcją białek 14-3-3 jest funkcja adaptorowa polegająca na ułatwianiu składania się wieloskładnikowych kompleksów uczestniczących w przekazywaniu sygnałów komórkowym. Ta potencjalna funkcja jest aktualnie weryfikowana na roślinach najskuteczniejszą, jak dotychczas, technologią „sense-antisense”, w której eliminowana lub wzmacniana jest ekspresja poszczególnych izoform i analiza biochemiczno-morfologiczna organizmów transgenicznych winna dostarczyć przekonujących danych odnośnie procesów regulowanych przez poszczególne izoformy białka 14-3-3.

LITERATURA

- [1] ACS P, SZALLASI Z, KAZANIETZ MG, BLUMBERG PM. Differential activation of PKC isozymes by 14-3-3 proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **216**: 103–109.
- [2] AITKEN A. 14-3-3 proteins on the MAP. *Trends Biochem Sci* 1995; **20**: 95–97.
- [3] AITKEN A. 14-3-3 and its possible role in co-ordinating multiple signalling pathways. *Trends Cell Biol* 1996; **6**: 34–347.
- [4] AITKEN A, ELLIS CA, HARRIS A, SELLERS LA, TOKER A. Kinase and neurotransmitters. *Nature* 1990; **344**: 594.
- [5] AITKEN A, HOWELL S, JONES D, MADRAZO J, PATEL Y. 14-3-3 α and δ are the phosphorylated forms of Raf-activating 14-3-3 β and ζ . *J Biol Chem* 1995; **270**: 5706–5709.
- [6] AITKEN A, HOWELL S, JONES D, MADRAZO J, MARTIN H, PATEL Y, ROBINSON K. Post-translationally modified 14-3-3 isoforms and inhibition of protein kinase C. *Mol Cell Biochem* 1995; **149/150**: 41–49.
- [7] AITKEN A, JONES D, SONEJI Y, HOWELL S. 14-3-3 proteins: biological function and domain structure. *Biochem Soc Trans* 1995; **23**: 605–611.
- [8] ALAM R, HACHIYA N, SAKAGUCHI M, KAWABATA SI, IWANAGA S, KITAJIMA M, MIHARA K, OMURA T. cDNA cloning and characterization of mitochondrial import stimulation factor (MSF) purified from rat liver cytosol. *J Biochem* 1994; **116**: 416–425.
- [9] BACHMANN M, HUBER JL, ATHWAL GS, WU K, FERL RJ, HUBER SC. 14-3-3 proteins associate with the regulatory phosphorylation site of spinach leaf nitrate reductase in an isoform-specific manner and reduce dephosphorylation of Ser-543 by endogenous protein phosphatases. *FEBS Lett* 1996; **398**: 26–30.
- [10] BACHMANN M, HUBER JL, LIAO PC, GAGE DA, HUBER SC. The inhibitor protein of phosphorylated nitrate reductase from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves is a 14-3-3 protein. *FEBS Lett* 1996; **387**: 127–131.

- [11] BONNEFOY-BERARD N, LIU YC, VON WILLEBRAND M, SUNG A, ELLY C, MUSTELIN T, YOSHIDA H, ISHIZAKA K, ALTMAN A. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity by association with 14-3-3 proteins in T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 10142–10146.
- [12] BRANDT J, THORDAL-CHRISTENSEN H, VAD K, GREGERSEN PL, COLLINGE DB. A pathogen-induced gene of barley encodes a protein showing high similarity to a protein kinase regulator. *Plant J* 1992; **2**: 815–820.
- [13] BRASELMANN S, McCORMICK F. BCR and RAF form a complex *in vivo* via 14-3-3 proteins. *EMBO J* 1995; **14**: 4839–4848.
- [14] BROCKHAUS K, PLAZA S, PINTEL DJ, ROMMELAERE J, SALOME N. Nonstructural proteins NS2 of minute virus of mice associate *in vivo* with 14-3-3 protein family members. *J Virology* 1996; **70**: 7527–7534.
- [15] CELIS JE, GESSER B, RASMUSSEN HH, MADSEN P, LEFFERS H, DEJGAARD K, HONORE B, OLSEN E, RATZ G, ET AL. Comprehensive two-dimensional gel protein databases offer a global approach to the analysis of human cells the transformed amnion cells ama master database and its link to genome DNA sequence data. *Electrophoresis* 1990; **11** (12): 989–1071.
- [16] CHEN F, WAGNER PD. 14-3-3 proteins bind to histone and affect both histone phosphorylation and dephosphorylation. *FEBS Lett* 1994; **347**: 128–132.
- [17] CHEN Z, FU H, LIU D, CHANG PFL, NARASIMHAN M, FERI R, HASEGAWA PM, BRESSAN RA. A NaCl-regulated plant gene encoding a brain protein homolog that activates ADP ribosyltransferase and inhibits protein kinase C. *Plant J* 1994; **6**: 729–740.
- [18] CONKLIN DS, GALAKTIONOV K, BEACH D. 14-3-3 proteins associate with cdc25 phosphatases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 7892–7896.
- [19] COON SL, ROSEBOOM PH, BALER R, WELLER JL, NAMBOODIRI MAA, KOONIN EV, KLEIN DC. Pineal serotonin N-acetyltransferase: Expression cloning and molecular analysis. *Science* 1995; **270**: 1681–1683.
- [20] DAUGHERTY CJ, ROONEY MF, MILLER PW, FERL RJ. Molecular organisation and tissue-specific expression of an *Arabidopsis* 14-3-3 gene. *Plant Cell* 1996; **8**: 1239–1248.
- [21] DENT P, JELINEK T, MORRISON DK, WEBER MJ, STURGILL TW. Reversal of Raf-1 activation by purified and membrane-associated protein phosphatases. *Science* 1995; **268**: 1902–1906.
- [22] DU X, FOX JE, PEI S. Identification of a binding sequence for the 14-3-3 protein within the cytoplasmic domain of the adhesion receptor, platelet glycoprotein Ib-alpha. *J Biol Chem* 1996; **271**: 7362–7376.
- [23] FANTL WJ, MUSLIN AJ, KIKUCHI A, MARTIN JA, MacNICOL AM, GROSS RW, WILLIAMS LT. Activation of Raf-1 by 14-3-3 proteins. *Nature* 1994; **371**: 612–614.
- [24] FORD JC, AL-KHODAIRY F, FOTOU E, SHELDRIK KS, GRIFFITHS DJF, CARR AM. 14-3-3 Protein homologs required for the DNA damage checkpoint in fission yeast. *Science* 1994; **265**: 533–537.
- [25] FREED E, SYMONS M, MACDONALD SG, McCORMICK F, RUDDIERI R. Binding of 14-3-3 proteins to the protein kinase Raf and effects on its activation. *Science* 1994; **265**: 1713–1716.
- [26] FU H, XIA K, PALLAS DC, CUI C, CONROY K, NARSIMHAN RP, MAMON H, COLLIER J, ROBERTS TM. Interaction of the protein kinase Raf-1 with 14-3-3 proteins. *Science* 1994; **266**: 126–128.
- [27] FU H, COBURN J, COLLIER RJ. The eucaryotic host factor that activates exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is a member of the 14-3-3 protein family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 2320–2324.

- [28] FURUKAWA Y, IKURA N, OMATA S, YAMAUCHI T, ISOBE T, ICHIMURA T. Demonstration of the phosphorylation-dependent interaction of tryptophan hydroxylase with the 14-3-3 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **194**: 144–149.
- [29] GALAKTIONOW K, JESSUS C, BEACH D. Raf1 interaction with cdc25 phosphatase ties mitogenic signal transduction to cell cycle activation. *Genes Dev.* 1995; **9**: 1046–1058.
- [30] GAO L, GU XB, YU DS, YU RK, ZENG G. Association of a 14-3-3 protein with CMP-Neu-Ac:GM1 α 2,3-Sialyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **224**: 103–107.
- [31] GELPERIN D, WEIGLE J, NELSON K, ROSEBOOM P, IRI K, MATSUMOTO K, LEMON S. 14-3-3 proteins: potential roles in vesicular transport and Ras signaling in *S. cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 11539–11543.
- [32] HANNUN YA, OBEID LM. Ceramide: An intracellular signal for apoptosis. *Trends Biochem Sci* 1995; **20**: 73–77.
- [33] HIRSCH S, AITKEN A, BERTSCH U, SOLL J. A plant homologue to mammalian brain 14-3-3 protein and protein kinase C inhibitor. *FEBS Lett* 1992; **296**: 222–224.
- [34] van HEUSDEN GPH, WENZEL TJ, LAGENDIJK EL, de STEENSMA HY, van den BERG JA. Characterization of the yeast *BMH1* gene encoding a putative protein homologous to mammalian protein kinase II activators and protein kinase C inhibitors. *FEBS Lett* 1992; **302**: 145–150.
- [35] van HEUSDEN GPH, van der ZANDEN AL, FERL RJ, de STEENSMA HY. Four *Arabidopsis thaliana* 14-3-3 protein isoforms can complement the lethal yeast *bmh1 bmh2* double disruption. *FEBS Lett* 1996; **391**: 252–256.
- [36] HONDA R, OHBA Y, YASUDA H. 14-3-3 zeta protein binds to the carboxyl half of mouse *wee1* kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **230(2)**: 262–265.
- [37] ICHIMURA T, ISOBE T, OKUYAMA T, TAKAHASHI N, ARAKI K, KUWANO R, TAKAHASHI Y. Molecular cloning of cDNA coding for brain-specific 14-3-3 protein, a protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; **85**: 7084–7088.
- [38] ICHIMURA T, UCHIYAMA J, KUNIHITO O, ITO M, HORIGOME T, OMATA S, SHINKAI F, KAJI H, ISOBE T. Identification of the site of interaction of the 14-3-3 protein with phosphorylated tryptophan hydroxylase. *J Biol Chem* 1995; **270(48)**: 28515–28518.
- [39] IRIE K, GOTOHY Y, YASHAR BM, ERREDEB, NISHIDA E, MATSUMOTO K. Stimulatory effects of yeast and mammalian 14-3-3 proteins on the Raf protein kinase. *Science* 1994; **265**: 1716–1719.
- [40] ISOBE T, HIYANE Y, ICHIMURA T, OKUYAMA T, TAKAHASHI N, NAKAJO S, NAKAYA K. Activation of protein kinase C by the 14-3-3 proteins homologous with Exo1 protein that stimulates calcium-dependent exocytosis. *FEBS Lett* 1992; **308**: 121–124.
- [41] ISOBE T, ICHIMURA T, SUNAYA T, OKUYAMA T, TAKAHASHI N, KUWANO R, TAKAHASHI Y. Distinct Forms of the Protein Kinase-dependent Activator of Tyrosine and Tryptophan Hydroxylases. *J Mol Biol* 1991; **217**: 125–132.
- [42] JARILLO JA, CAPEL J, LEYVA A, MARTINEZ-ZAPATER JM, SALINAS J. Two related low-temperature-inducible genes of *Arabidopsis* encode proteins showing high homology to 14-3-3 proteins, a family of putative kinase regulators. *Plant Mol Biol* 1994; **25**: 693–704.
- [43] JONES DH, LEY S, AITKEN A. Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers *in vivo* and *in vitro*: implications for function as adapter proteins. *FEBS Lett* 1995; **368**: 55–58.
- [44] JONES DHA, MARTIN H, MADRAZO J, ROBINSON KA, NIELSEN P, ROSEBOOM PH, PATEL Y, HOWELL SA, AITKEN A. Expression and structural analysis of 14-3-3 proteins. *J Mol Biol* 1995; **245**: 375–384.
- [45] KORTHOUT HAAAJ, de BOER AH. A fusicoccin binding protein belongs to the family of 14-3-3 brain protein homologs. *Plant Cell* 1994; **6**: 1681–1692.
- [46] LAUGHNER B, LAWRENCE SD, FERL RJ. Two tomato fruit homologs of 14-3-3 mammalian brain proteins. *Plant Physiol* 1994; **105**: 1457–1458.

- [47] LI S, JANOSCH P, TANJI M, ROSENFELD GC, WAYMIRE JC, MISCHAK H, KOLCH W, SEDIVY JM. Regulation of Raf-1 kinase activity by the 14-3-3 family of proteins. *EMBO J* 1995; **14**: 685–696.
- [48] LIAO J, OMARY MB. 14-3-3 associated with phosphorylated simple epithelial keratins during cell cycle progression act as a solubility cofactor. *J Cell Biol* 1996; **133**: 345–357
- [49] LIU D, BIENKOWSKA J, PETOSA C, COLLIER RJ, FU H, LIDDINGTON R. Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature* 1995; **376**: 191–194.
- [50] LU G, DeLISLE AJ, De VETTEN NC, FERL RJ. Brain proteins in plants: An *Arabidopsis* homolog to neurotransmitter pathway activators is part of a DNA binding complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 11490–11494.
- [51] LU G, ROONEY MF, WU K, FERL RJ. Five cDNAs encoding *Arabidopsis* GF14 proteins. *Plant Physiol* 1994; **105**: 1459–1460.
- [52] LU G, SEHNKE PC, FERL RJ. Phosphorylation and calcium binding properties of an *Arabidopsis* GF14 brain protein homolog. *Plant Cell* 1994; **6**: 501–510.
- [53] LU G, de VETTEN NC, SEHNKE PC, ISOBE T, ICIMURA T, FU H, van HEUSDEN GPH, FERL RJ. A single *Arabidopsis* GF14 isoform possesses biochemical characteristics of diverse 14-3-3 homologues. *Plant Mol Biol* 1994; **25**: 659–667.
- [54] KIDOU S, UMEDA M, KATO A, UCHIMIYA H. Isolation and characterization of a rice cDNA similar to the bovine brain-specific 14-3-3 protein gene. *Plant Mol Biol* 1993; **21**: 191–194.
- [55] MARKIEWICZE, WILCZYŃSKI G, RZEPECKI R, KULMA A, SZOPA J. The 14-3-3 binds to the nuclear matrix endonuclease and has a possible function in the control of plant senescence. *Cell Mol Biol Lett* 1996; **1**: 391–417.
- [56] MARKIEWICZ E, WILCZYŃSKI G, FILIPSKI J, SZOPA J. Modification of the apoptotic-like effects of MBP protein overexpression in *E. coli* by fusion with 14-3-3 derived polypeptides. *Cell Death and Differ.* 1997; **4**: 1–4.
- [57] MARTIN H, ROSTAS J, PATEL Y, AITKEN A. Subcellular localisation of 14-3-3 isoforms in rat brain using specific antibodies. *J Neurochem* 1994; **63**: 2259–2265.
- [58] MARRA M, FULLONE MR, FOGLIANO V, PEN J, MATTEI M, MASI S, ADUCCI P. The 30-kilodalton protein present in purified fusicoccin receptor preparations is a 14-3-3-like protein. *Plant Physiol* 1994; **106**: 1497–1501.
- [59] MEGIDISH T, WHITE T, TAKIO K, TITANI K, IGARASHI Y, HAKOMORI SI. Signal modulator protein 14-3-3 is a target of sphingosine- or N,N-dimethylsphingosine-dependent kinase in 3T3 (A31) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **216**(3): 739–747.
- [60] MOCHLY-ROSEN D, KHANER H, LOPEZ J, SMITH BL. Intracellular receptors for activated protein kinase C identification of a binding site for the enzyme. *J Biol Chem* 1991; **266**: 14866–14868.
- [61] MOORE, B. W. AND PEREZ, V. J. Specific acidic proteins of the nervous system. In *Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration* (Carlson, F. D., ed.) 1968; 343–359, Prentice-Hall.
- [62] MOORHEAD G, DOUGLAS P, MORRICE N, SCARABEL M, AITKEN A, MacKINTOSH C. Phosphorylated nitrate reductase from spinach leaves is inhibited by 14-3-3 proteins and activated by fusicoccin. *Curr Biol* 1996; **6**: 1104–1113.
- [63] MORGAN A, BURGOYNE RD. Exo1 and Exo2 proteins stimulate calcium-dependent exocytosis in permeabilized adrenal chromaffin cells. *Nature* 1992; **355**: 833–836.
- [64] MORGANA, ROTH D, MARTIN H, AITKEN A, BURGOYNE RD. Identification of cytosolic protein regulators of exocytosis. *Biochem Sci Trans* 1993; **21**: 401–405.
- [65] MUSLIN AJ, TANNER JW, ALLEN PM, SHAW AS. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* 1996; **84**: 889–897.
- [66] OECKING C, ECKERSKORN C, WEILER EW. The fusicoccin receptor of plants is a member of the 14-3-3 superfamily of eukaryotic regulatory proteins. *FEBS Lett* 1994; **352**: 163–166.

- [67] PALLAS DC, FU H, HAEHNEL LC, WELLER W, COLLIER RJ, ROBERTS TM. Association of Polyomavirus Middle Tumor Antigen with 14-3-3 Proteins. *Science* 1994; **265**: 535–537.
- [68] REUTHER GW, FU H, CRIPE LD, COLLIER RJ, PENDERGAST AM. Association of the Protein Kinases c-Bcr and Bcr-Abl with Proteins of the 14-3-3 Family. *Science* 1994; **266**: 129–133.
- [69] ROBINSON K, JONES D, PATEL Y, MARTIN H, MADRAZO J, MARTIN S, HOWELL S, ELMORE M, FINNEN MJ, AITKEN A. Mechanism of inhibition of protein kinase C by 14-3-3 isoforms. *Biochem J* 1994; **299**: 853–861.
- [70] ROMMEL C, RADZIWILL G, LOVRIĆ J, NOELDEKE J, HEINICKE T, JONES D, AITKEN A, MOELLING K. Activated Ras displaces 14-3-3 protein from the amino terminus of c-Raf-1. *Oncogene* 1996; **12**: 609–619.
- [71] ROONEY MF, FERL RJ. Sequences of three *Arabidopsis* general regulatory factor encoding GF14 (14-3-3) proteins. *Plant Physiol.* 1995; **107**: 283–284.
- [72] ROTH D, MORGAN A, BURGOYNE RD. Identification of a key domain in annexin and 14-3-3 proteins that stimulate calcium-dependent exocytosis in permeabilized adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett* 1993; **320**: 207–210.
- [73] ROTH D, MORGAN A, MARTIN H, JONES D, MARTENS GJM, AITKEN A, BURGOYNE RD. Characterization of 14-3-3 proteins in adrenal chromaffin cells and demonstration of isoform-specific phospholipid binding. *Biochem J* 1994; **301**: 305–310.
- [74] SCHLAEFFER DD, JONES J, HAIGLER HT. Inhibition of protein kinase C by annexin V. *Biochemistry* 1992; **31**: 1886–1891.
- [75] SCHIMIZU K, KURODA S, YAMAMORIB. Synergistic activation by Ras and 14-3-3 protein of a mitogen-activated protein kinase kinase named Ras-dependent extracellular signal-regulated kinase kinase stimulator. *J Biol Chem* 1994; **269**: 22917–22920.
- [76] SKOULAKIS EMC, DAVIS RL. Olfactory learning in mutants for leonardo, a *Drosophila* gene encoding a 14-3-3 protein. *Neuron* 1996; **17**: 931–944.
- [77] SUEND K, BUSTELO XR, BARBACID M. Lack of evidence of the activation of the Ras-Raf mitogenic pathway by 14-3-3 proteins in mammalian cells. *Oncogene* 1995; **11**: 825–831.
- [78] SWANSON KD, GANGULY R. Characterization of a *Drosophila melanogaster* gene similar to the mammalian genes encoding the tyrosine/tryptophan hydroxylase activator and protein kinase C inhibitor protein. *Gene* 1992; **113**: 183–190.
- [79] SZOPA J. Cloning of a cDNA encoding a 32 kDa nuclear matrix endonuclease from *Cucurbita pepo* which is highly similar to a family of a mammalian neurotransmitter activators. *J Plant Physiol* 1994; **144**: 617–619.
- [80] SZOPA J. Expression analysis of a *Cucurbita* cDNA encoding endonuclease. *Acta Biochim Polon* 1995; **42**: 183–190.
- [81] TANJI M, HORWITZ R, ROSENFELD G, WAYMIRE JC. Activation of protein kinase C by purified bovine brain 14-3-3: Comparison with tyrosine hydroxylase activation. *J Neurochem* 1994; **63**(5): 1908–1916.
- [82] TOKER A, ELLIS CA, SELLERS LA, AITKEN A. Protein kinase C inhibitor proteins. Purification from sheep brain and sequence similarity to lipocortins and 14-3-3 protein. *Eur J Biochem* 1990; **191**: 421–429.
- [83] TOKER A, SELLERS LA, AMESS B, PATEL Y, HARRIS A, AITKEN A. Multiple isoforms of a protein kinase C inhibitor KCIP-1-14-3-3 from sheep brain amino acid sequence of phosphorylated forms. *Eur J Biochem* 1992; **206**(2): 453–461.
- [84] de VETTEN NC, FERL RJ. Two genes encoding GF14 (14-3-3) proteins in *Zea mays*. *Plant Physiol* 1994; **106**: 1593–1604.
- [85] de VETTEN NC, LU G, FERL RJ. A maize protein associated with the G-box binding complex has homology to brain regulatory proteins. *Plant Cell* 1992; **4**: 1295–1307.
- [86] VINCENZ C, DIXIT VM. 14-3-3 proteins associate with A20 in an isoform-specific manner and function both as chaperone and adapter molecules. *J Biol Chem* 1996; **271**: 20029–20034.

- [87] WHEELER-JONES CPD, LEARMONTH MP, MARTIN H, AITKEN A. Identification of 14-3-3 proteins in human platelets: effects of synthetic peptides on protein kinase C activation. *Biochem J* 1996; **315**: 41–47.
- [88] WILCZYŃSKI G, KULMA A, SZOPA J. The expression of 14-3-3 isoforms in potato is developmentally regulated. wysłana do druku.
- [89] XIAO B, SMERDON SJ, JONES DH, DODSON GG, SONEJI Y, AITKEN A, GAMBLIN SJ. Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways. *Nature* 1995; **376**: 188–194.
- [90] YAO B, ZHANG YH, DELIKAT S, MATHIAS S, BASU S, KOLESNICK R. Phosphorylation of Raf by ceramide-activated protein kinase. *Nature* 1995; **378**: 307–310.
- [91] ZHA J, HARADA H, YANG E, JOCKEL J, KORSMEYER SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X_L. *Cell* 1996; **87**: 619–628.
- [92] ZUPAN LA, STEFFENS DL, BERRY CA, LANDT M, GROSS RW. Cloning and expression of a human 14-3-3 protein mediating phospholipolysis. *J Biol Chem* 1992; **267**: 8707–8710.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 10.06. 1997 r.

Przyjęto: 28.07. 1997 r.

Adres autora: ul. Przybyszewskiego 63, 51-148 Wrocław

POLIAMINY W KOMÓRCZE ROŚLINNEJ: SYNTEZA, MECHANIZMY DZIAŁANIA I FUNKCJE*

POLYAMINES IN THE PLANT CELL: SYNTHESIS, MECHANISMS OF ACTION AND FUNCTIONS

Aleksandra NIKLAS**, Rafał BUTOWT, Elżbieta JAŹDŹEWSKA,
Anna MAJEWSKA-SAWKA

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Bydgoszcz

Streszczenie: Poliaminy są związkami alifatycznymi powszechnie występującymi we wszystkich organizmach żywych. U roślin są zlokalizowane głównie w ścianie komórkowej, wakuolach, chloroplastach, mitochondriach oraz na obszarze jądra i jąderka. Poliaminy mogą tworzyć specyficzne kompleksy ze substancjami wielkocząsteczkowymi, w tym z białkami i kwasami nukleinowymi, i stymulować procesy replikacji, transkrypcji i translacji. Wykazano również udział poliamin w regulacji rozwoju roślin *in vivo* i *in vitro*. Związki te pełnią ważne funkcje w procesach tworzenia pędów, korzeni, organów kwiatowych oraz w powstawaniu owoców. Stwierdzono także ich udział w inicjacji lub stymulacji somatycznej embriogenezy wielu gatunków roślin. Poliaminy wykazują działanie przeciwstawne w stosunku do etylenu i opóźniają procesy starzenia.

Słowa kluczowe: poliaminy, metabolizm, transport, synteza DNA i RNA, przekazywanie sygnałów, morfogeneza.

Summary: Polyamines are aliphatic compounds which commonly occur in all living organisms. They are mainly located in cell walls, vacuoles, chloroplasts and mitochondria, and also in the cell nuclei and nucleoli. Polyamines may bind to other macromolecules, such as nucleic acid and proteins, and stimulate DNA replication, transcription and translation. It has been shown that polyamines are involved in regulation of plant development *in vivo* and *in vitro*. They have some functions in shoot formation, rhizogenesis, differentiation of floral organs and fruits. Another function of these compounds is related to somatic embryogenesis of many plant species. Polyamines act as antagonists of ethylene and inhibit or delay physiological processes related to the senescence.

*Pracę wykonano w ramach grantu KBN nr 5S 301 018 07.

**Aleksandra Niklas jest doktorantką Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin. Adres stały: Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Akademia Techniczno-Rolnicza, Kaliskiego 7,

Key words: polyamines, metabolism, transport, DNA and RNA synthesis, signal transduction, morphogenesis.

1. WSTĘP

Poliaminy występują powszechnie w komórkach organizmów prokariotycznych i eukariotycznych [90, 92]. Funkcje i mechanizmy działania tych związków w roślinie są intensywnie badane przy wykorzystaniu metod cytologicznych, biochemicznych i molekularnych.

Liczne dane dotyczące roli poliamin w procesach fizjologicznych uzyskano w wyniku zastosowania specyficznych inhibitorów blokujących poszczególne etapy syntezy putrescyny, spermidyny czy sperminy [10, 32, 55, 73, 90]. Efekty działania niektórych z nich omówiono w kolejnych rozdziałach pracy i podsumowano w tabeli 1.

Udział poliamin w regulacji wzrostu i rozwoju roślin jest również analizowany na podstawie zmian zawartości tych związków w przebiegu określonych procesów życiowych [10, 17, 24, 60] i modyfikującego wpływu egzogennych poliamin na te procesy [31, 61, 66, 93].

Cennych danych dostarczają badania mutantów genetycznych wykazujących zaburzenia syntezy poliamin [27, 39, 45, 78] (tab. 2). Molekularna analiza genomu tych roślin ujawniła zmiany w genach struktury lub genach regulujących wytwarzanie dekarboksylazy argininowej i ornitynowej [67].

Rozwój genetyki i biologii molekularnej – szczególnie szybki w ostatnich kilku latach – umożliwił identyfikację, izolację i sklonowanie genów kodujących enzymy uczestniczące w syntezie poliamin: dekarboksylazę argininową (ADC), dekarboksylazę ornitynową (ODC) i dekarboksylazę S-adenozylometioniny (SAMDC) [59, 67, 71, 79]. Pozwoliło to z kolei na rozpoczęcie prac nad uzyskaniem roślin transgenicznych zawierających w swoim genomie dodatkowe kopie tych genów lub też sekwencje antysensowne w stosunku do określonego genu [11, 59, 68, 74, 100]. Rośliny takie wykazują zaburzenia ekspresji enzymów związanych z syntezą poliamin i liczne anomalie fenotypowe (tab. 3).

2. BIOSYNTENZA I DEGRADACJA POLIAMIN

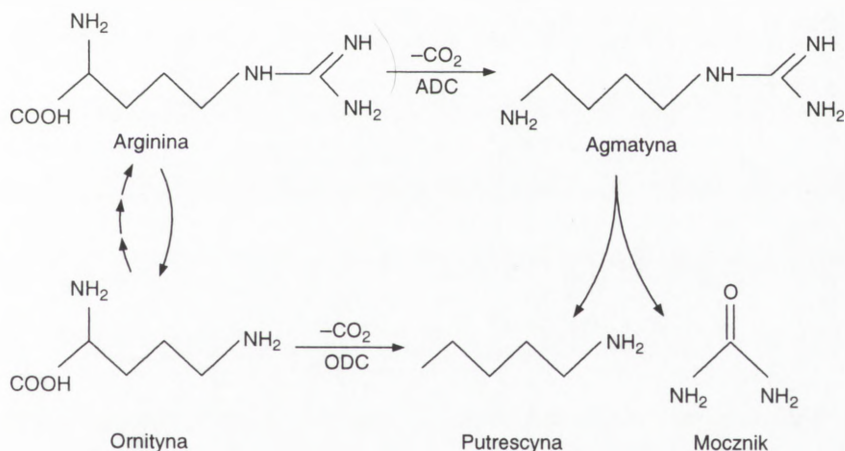
Podstawowym źródłem putrescyny u roślin jest cykl mocznikowy, w którym dekarboksylacji mogą podlegać różne aminokwasy (rys. 1). Synteza putrescyny zachodzi zarówno przy udziale dekarboksylazy ornitynowej (ODC) z ornityny, jak też dekarboksylazy argininowej (ADC) z argininy [91]. Proces enzymatycznego

Tabela 1. Wpływ inhibitorów syntezy poliamin na procesy morfogenetyczne roślin

Inhibitor	Efekt biochemiczny	Efekt morfologiczny	Literatura
DFMA	hamowanie aktywności dekarboksylazy argininowej (ADC)	– zmniejszenie masy pędów i liści – zahamowanie ryzogenezy – zaburzenia procesów embriogenezy somatycznej i gametofitowej – wzrost wrażliwości na warunki stresowe	[3, 19, 35, 44, 73, 86, 98]
DFMO	hamowanie aktywności dekarboksylazy ornitynowej (ODC)	– zmniejszenie masy pędów – zahamowanie ryzogenezy i tuberyzacji – zaburzenia kwitnienia – zaburzenia embriogenezy somatycznej	[32, 49, 62]
CHA	hamowanie aktywności syntazy spermidyny	– zahamowanie ryzogenezy – zaburzenia kwitnienia – obniżenie odporności na stres – stymulacja kiełkowania nasion	[32, 41, 54, 85, 86]
MGBG	hamowanie aktywności dekarboksylazy S-adenozylometioniny (SAMDC)	– zahamowanie wzrostu pędów i liści – zaburzenia kwitnienia – zaburzenia somatycznej embriogenezy – zahamowanie ryzogenezy	[19, 32, 86]

DMFA – dwufluorometylarginina, DMFO – dwufluorometylomityna, CHA – cykloheksyloamina, MGBG – metylgliksal-bis(guanylohydrazon)

usuwania grupy karboksylowej wymaga obecności fosforanu pirydoksalu jako koenzymu. W wyniku dekarboksylacji argininy powstaje agmatyna, która pod działaniem specyficznej hydrolazy ulega rozkładowi do putrescyny i mocznika. Dekarboksylacji podlega również ornityna oraz niekiedy cytrulina [90]. W nastę-



Rys. 1. Schemat syntezy putrescyny u roślin. W wyniku dekarboksylacji argininy, katalizowanej przez dekarboksylazę argininową (ADC), powstaje agmatyna, która ulega hydrolizie do putrescyny i mocznika. Dekarboksylacja ornityny przez dekarboksylazę ornitynową (ODC) prowadzi bezpośrednio do wytworzenia putrescyny

Tabela 2. Charakterystyka cech rozwojowych ujawniających się w mutantach o zaburzonej biosyntezie poliamin

Mutacja	Gatunek	Efekt biochemiczny	Efekt morfologiczny	Literatura
<i>spe1</i> w genie struktury ADC, <i>spe10</i> w genie regulatorowym ADC, <i>spe2</i> w genie ODC	rzodkiewnik	obniżona aktywność ADC/ODC zmniejszona zawartość putrescyny	zaburzenia morfologii łodyg, kwiatów i korzeni	[67]
<i>mgbgr3</i>	tytoń	odporność na MGBG podwyższony poziom poliamin	zaburzenia morfologii liści i kwiatów	[27, 39]
mutacje nie określone	petunia, pomidor, tytoń	wzrost aktywności ADC wzrost zawartości putrescyny	zaburzenie morfologii kwiatów	[45, 78]

ADC – dekarboksylaza argininy, ODC – dekarboksylaza ornityny

Tabela 3. Charakterystyka cech rozwojowych ujawniających się w roślinach transgenicznych o zaburzonej biosyntezie poliamin

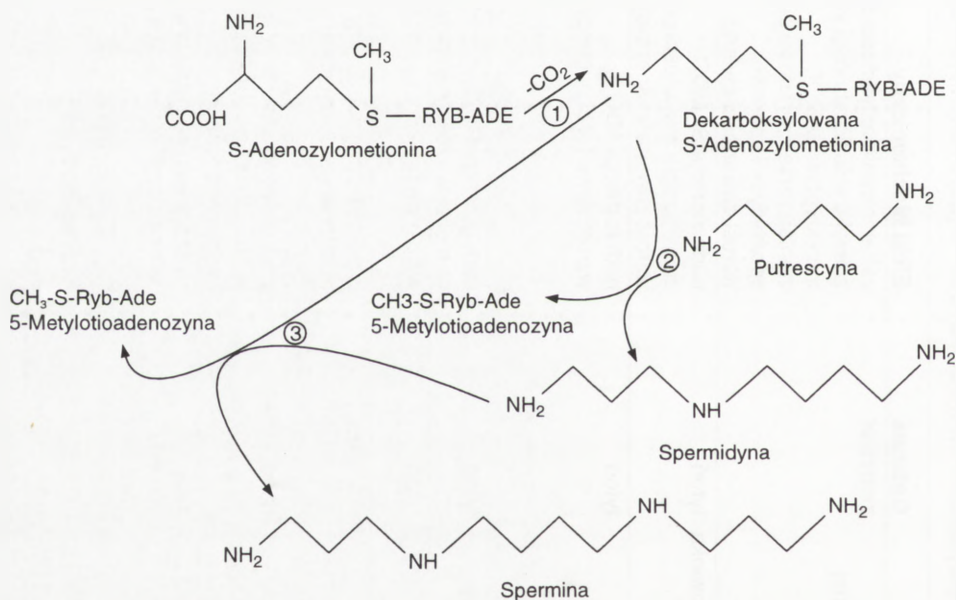
Transgen	Gatunek	Efekt biochemiczny	Efekt morfologiczny	Literatura
cDNA genu SAMDC w orientacji antysensownej	ziemniak	zahamowanie aktywności SAMDC zmniejszenie liczebności stabilnych transkryptów SAMDC zmniejszenie zawartości putrescyny spermidyny i sperminy wzrost zawartości etyleny	wzrost liczby pędów bocznych, skrócone międzywęźla mniejsze liście zahamowany wzrost korzeni	[59]
cDNA genu SAMDC czlowieka	tytoń	nadekspresja SAMDC zmniejszenie zawartości putrescyny wzrost zawartości spermidyny		[102]
cDNA genu ADC owsa	tytoń	nadekspresja ADC wzrost zawartości putrescyny	skrócone międzywęźla mniejsze liście i łodygi chloroza i nekroza liści zahamowany wzrost korzeni, przedwczesne kwitnienie	[68]
cDNA genu ODC drożdży	tytoń	nadekspresja ODC wzrost zawartości nikotyny		[48]
cDNA genu ODC myszy	tytoń	wzrost syntezy putrescyny	karłowatość roślin, zaburzenia rozwoju liści i pręcików	[28]
cDNA genu ODC myszy	marzechw	wzrost syntezy putrescyny obniżenie produkcji etyleny	wzrost liczby zarodków somatycznych przyspieszony rozwój zarodków	[11, 74]
<i>sam1 Arabidopsis thaliana</i>	tytoń	zróżnicowana ekspresja syntezy SAM w poszczególnych roślinach transgenicznych		[16]
<i>sam1 Arabidopsis thaliana</i>	mak komórki zawiesinowe	zróżnicowana ekspresja syntezy SAM w poszczególnych liniach komórkowych		[13]
rolA <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	tytoń	zahamowanie akumulacji poliamin i ich pochodnych	karłowatość roślin przyspieszony wzrost korzeni nadmierny rozwój korzeni bocznych	[14]

ADC – dekarboksylaza argininy, ODC – dekarboksylaza ornityny, MGBG – metyloglioksal-bis(guanylohydraton), SAM – S-adenozylometionina, SAMDC – dekarboksylaza S-adenozylometioniny

ptwie dekarboksylacji lizyny powstaje kadaweryna – poliamina będąca homologiem putrescyny – a jej synteza przebiega niezależnie od cyklu mocznikowego [42].

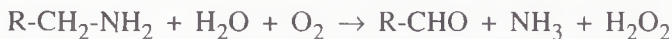
Synteza spermidyny i sperminy w komórkach roślinnych i zwierzęcych przebiega podobnie (rys. 2). W procesie tym S-adenozylometionina (SAM) ulega dekarboksylacji, a następnie przy udziale syntazy spermidyny łączy się z cząsteczką putrescyny. W efekcie powstaje spermidyna oraz 5-metylotioadenozyna (5-MTA). Kondensacja spermidyny z drugą cząsteczką zdekarboksylowanej formy S-adenozylometioniny prowadzi do syntezy sperminy i kolejnej cząsteczki 5-metylotioadenozyny, która wchodzi do tzw. cyklu Yanga i uczestniczy w regeneracji metioniny [53].

Rozkład putrescyny, spermidyny i sperminy polega na oksydacyjnej deaminacji tych poliamin katalizowanej przez oksydazę diaminową (DAO) oraz oksydazę poliaminową (PAO). Enzymy te są metaloflawoproteinami nie wykazującymi ścisłej specyficzności substratowej [32]. Oksydaza diaminowa z nasion orzecha ziemnego (*Arachis hypogea*) jest homodimeryczną proteiną zawierającą miedź [47]. Natomiast oksydaza poliaminowa w liściach lilii (*Lilium longiflorum*) jest glikoproteiną zawierającą 1 cząsteczkę dinukleotydu flawinowo-adeninowego (FAD) [105].



Rys. 2. Schemat syntezy spermidyny i sperminy. Dekarboksylacja S-adenozylometioniny (SAM) przy udziale dekarboksylazy S-adenozylometioniny (1) prowadzi do wytworzenia zdekarboksylowanej cząsteczki SAM. Łączy się ona z putrescyną przy udziale syntazy spermidyny (2) z wytworzeniem spermidyny i 5-metylotioadenozyny. Kondensacja spermidyny z drugą cząsteczką zdekarboksylowanej SAM prowadzi do syntezy sperminy, katalizowanej przez syntazę sperminy (3)

W wyniku działania oksydazy diaminowej pierwszorzędowa grupa aminowa putrescyny przekształca się w grupę aldehydową i dodatkowo powstaje cząsteczka H_2O_2 , zgodnie z reakcją:



Dalsze przemiany aminoaldehydów prowadzą do ich cyklizacji, z wytworzeniem układów pirolidonowych i piperydynowych, które są wykorzystywane w syntezie niektórych alkaloidów [42, 56].

3. LOKALIZACJA SUBKOMÓRKOWA

Głównym miejscem nagromadzenia poliamin jest ściana komórkowa, co stwierdzono badaniem frakcji komórkowych. Pochłania ona około 70% egzogennie podawanej spermidyny i 30% egzogennie putrescyny. Mechanizm akumulacji poliamin w ścianie polega prawdopodobnie na elektrostatycznym oddziaływaniu dodatnio naładowanych grup aminowych z komponentami ściany komórkowej o ładunku ujemnym, takimi jak np. pektyny [70, 84]. W ścianie komórkowej zlokalizowane są również enzymy utleniające poliaminy [5, 63, 82, 89], takie jak oksydaza diaminowa i oksydaza poliaminowa, które utleniają pierwszo- i drugorzędowe grupy aminowe poliamin z wytworzeniem H_2O_2 , aminoaldehydów i amoniaku lub 1,3-diaminopropanu [5, 82]. Nadtlenek wodoru jest z kolei rozkładany przez apoplastowe peroksydazy, aktywnie zaangażowane w syntezę ściany wtórnej, jej lignifikację i suberyfikację.

Poliaminy gromadzą się również w wakuolach, co wykazano w eksperymentach z protoplastami marchwi. Wakuole niezwykle szybko akumulują egzogennie podawane poliaminy, tak że ich zawartość w tych organellach osiąga wartość około 1 mM i znacznie przekracza stężenia fizjologiczne [73]. Poliaminy gromadzą się także w mitochondriach i chloroplastach [4, 88], i jak się uważa, wpływają stabilizująco na membrany tylakoidów [12, 15, 37, 58, 99] oraz regulują syntezę chlorofilu [12].

Eksperymenty z użyciem przeciwciał poliklonalnych wytworzonych przeciwko putrescynie, spermidynie i sperminie ujawniły podwyższony poziom poliamin w zdekondensowanych obszarach chromatyny oraz w jąderku [2].

4. TRANSPORT POLIAMIN DO KOMÓRKI

Transport egzogennych poliamin do komórki jest intensywnie badany w protoplastach, które otoczone są jedynie błoną plazmatyczną. Kinetyka transportu putrescyny i spermidyny do protoplastów zależy od ich stężenia w środowisku

zewnątrznym [7]. W niskim zewnątrzkomórkowym zakresie stężeń poliamin, tzn. od 0,1–0,25 μM , transport zachodzi ze stałą szybkością (system I), natomiast przy wysokich zewnętrznych stężeniach poliamin, tzn. powyżej 0,5 mM, kinetyka transportu ma charakter liniowy (system II). Uważa się, że system I reprezentuje specyficzny układ przENOŚNIKÓW poliamin, natomiast system II funkcjonuje na zasadzie utraty selektywności plazmolemy wobec poliamin lub uaktywniania się kanałów jonowych, co umożliwiłaby przepływ poliamin zgodnie z gradientem stężeń [7, 26].

W transporcie poliamin ważną rolę odgrywają jony Ca^{2+} , których nie mogą zastąpić inne kationy, takie jak Mg^{2+} czy też K^{+} [6]. W obecności Ca^{2+} w środowisku szybkość transportu poliamin wzrasta co najmniej dwukrotnie. Przypuszcza się, że aktywacja białkowego przENOŚNIKA poliamin zachodzi w wyniku związania określonej liczby jonów Ca^{2+} , co jest możliwe dopiero przy zewnątrzkomórkowej zawartości tego pierwiastka rzędu 1 mM. Jak dotąd, przENOŚNIKA takiego nie wyizolowano, tak więc kwestia ta pozostaje nie wyjaśniona. Substancje blokujące plazmolemalne kanały wapniowe, np. werapamil, jony La^{3+} czy jony Ga^{3+} , hamują w dużej mierze przemieszczanie się poliamin, nawet w obecności jonów Ca^{2+} [7]. Fakt ten sugeruje, iż transportowi poliamin towarzyszy przepływ jonów wapnia do komórki przez kanały jonowe błony plazmatycznej. W roztworze 1 mM CaCl_2 transport putrescyny i spermidyny jest również stymulowany przez sperminę [6].

Transport przez plazmolemę wykazuje następujące cechy [8]:

- a. Jest częściowo pasywny, a więc zachodzi zgodnie z gradientem stężeń.
- b. Może zachodzić aktywnie, a więc przeciwko gradientowi stężeń; w plazmolemie obecne są dwa niezależne przENOŚNIKI, z których jeden działa w niskich, a drugi w wysokich zewnątrzkomórkowych stężeniach poliamin.
- c. Jest stymulowany obecnością jonów Ca^{2+} w środowisku.
- d. Jest energozależny, zostaje zahamowany przez protonofor cyjanokarbonylo-p-(trifluorometoksy)fenylohydrazon (FCCP) oraz wanadan sodu będący inhibitorem ATP-az typu P.

5. MECHANIZM DZIAŁANIA POLIAMIN

5.1. Udział w syntezie DNA, RNA i biosyntezie białek

Oddziaływania grup aminowych poliamin z grupami fosforanowymi kwasów nukleinowych stanowią molekularną podstawę stabilizacji podwójnej helisy DNA, a także końców i pętli w cząsteczkach rRNA, mRNA i tRNA [42, 80, 97]. Zmiana struktury przestrzennej kwasów nukleinowych w wyniku przyłączenia poliamin może być czynnikiem modyfikującym procesy syntezy DNA i RNA w komórkach *Eukaryota* [50]. Badania *in vitro* potwierdziły, że egzogenne poliaminy przyspieszają transkrypcję w protoplastach mezofilowych owsa [1]. Stwierdzono udział poliamin

w biosyntezie białka dzięki ich wiązaniu z tRNA i aktywacji polimerazy RNA [88]. Wykazano również, że poliaminy mogą stymulować ekspresję genów u roślin, w tym sekwencji regulujących podziały komórkowe [38]. Powodują też oddysocjowania niektórych białek od DNA, m.in. białka HMG1 (ang. *high mobility group*), co może być związane z indukowaniem przez poliaminy zmian konformacyjnych DNA ze struktury prawoskrętnej helisy na formę lewoskrętną [104]. Rozważana jest możliwość udziału poliamin w posttranslacyjnych modyfikacjach białek roślinnych za pośrednictwem transglutaminaz [34, 44, 75, 87]. Niektóre z tych enzymów katalizują syntezę wiązania izopeptydowego pomiędzy γ -karboksylową grupą kwasu glutaminowego a pierwszorzędową grupą aminową poliaminy. Połączenie drugiej grupy aminowej z kolejną cząsteczką białka prowadzi do kowalencyjnego związania polipeptydów.

Poliaminy uczestniczą również w podziałach komórkowych. W intensywnie dzielących się mikroorganizmach oraz tumorach skorzonery (*Scorzonera hispanica*) zawartość poliamin jest szczególnie wysoka [91]. Wykazano również, że egzogenne poliaminy stymulują podziały protoplastów izolowanych z liści owsa (*Avena sativa*) [54], protoplastów z ogonków liściowych słodkich ziemniaków (*Ipomoea batatas*) [31] i protoplastów zawiesinowych buraka cukrowego (*Beta vulgaris*) [66], jak również komórek glonu *Dunaliella primolecta* [52] i zawiesin komórkowych *Catharanthus roseus* [72].

5.2. Stabilizacja błon komórkowych

Wykazano stabilizujące działanie poliamin na błony plazmatyczne, w tym plasmolemę i wewnętrzną błonę chloroplastów [12, 15, 95]. Efekt ten może częściowo wynikać z przyłączania polikationów, jakimi są poliaminy, w miejsce kationów dwuwartościowych, np. Ca^{2+} [21, 65, 107]. Spermina i spermidyna wypierają jony wapnia z błon protoplastów buraka cukrowego, natomiast putrescyna nie wykazuje takiego działania [64]. Ponadto sugeruje się udział poliamin w hamowaniu peroksydacji lipidów błonowych oraz ograniczaniu syntezy kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego (ACC), będącego prekursorem etylenu [18, 29, 40, 101]. Kwestie te zostały omówione we wcześniejszych pracach przeglądowych [53, 88].

5.3. Uczestnictwo w przekazywaniu sygnałów

Rośliny wykształciły szereg swoistych mechanizmów odbioru i przekształcania sygnałów zewnątrzkomórkowych, działających za pośrednictwem chemicznych substancji przekaźnikowych. Są nimi m.in. fosfolipidy inozytolowe (IP) zlokalizowane w błonach komórkowych [57, 83]. Badania *in vitro* ujawniły, że poliaminy mogą tworzyć stabilne kompleksy z grupami fosforanowymi umieszczonymi wokół pierścienia mezo-inozytolowego w pozycji 1, 4 i 5 [69]. Kompleksowanie cząsteczek

inozytolo-1,4,5-trisfosforanu (IP_3) może powodować częściowe zahamowanie uwalniania jonów wapnia z wakuol i siateczki śródplazmatycznej do cytosolu.

W hypokotylach *Brassica* inkubowanych w roztworze spermidyny następuje wyraźny wzrost zawartości fosfatydyloinozytolo-4-fosforanu (PIP) i fosfatydyloinozytolo-4,5-bis-fosforanu (PIP_2) oraz zmniejszenie puli fosfatydylo-1-inozytoli (PI), inozytolo-1,4-bisfosforanu (IP_2), a także inozytolo 1,4,5-trisfosforanu (IP_3) w porównaniu z hypokotylami inkubowanymi w roztworze fitohormonów [30]. Sugeruje to udział spermidyny w hamowaniu enzymatycznej hydrolizy fosfatydyloinozytoli obecnych w błonie komórkowej.

Udział poliamin w procesach fosforylacji i defosforylacji białek komórkowych, może wskazywać na ich pośrednią rolę w regulacji niektórych procesów fizjologicznych. Spermia może aktywować jedną z roślinnych kinaz serynowo-treoninowych obecnych w jądrze komórkowym. Wykazano, że w komórkach tytoniu putrescyna nie ma wpływu na fosforylację białek plazmolemalnych, natomiast spermidyna i spermia wzmacniają fosforylację seryny i treoniny w trzech białkach błonowych o masach 66.5, 34 i 60 kDa [106].

6. UDZIAŁ POLIAMIN W PROCESACH FIZJOLOGICZNYCH

6.1. Regulacja procesów somatycznej embriogenezy

Rola poliamin jako regulatorów rozwoju zarodków somatycznych została szczególnie dobrze zbadana w kulturach zawieszinowych marchwi (*Daucus carota*). Kultury te wykazują zdolność do wytwarzania zarodków po wyeliminowaniu lub znacznym obniżeniu zawartości auksyn w pożywce [103]. Oprócz fitohormonów, znaczącą rolę w tym procesie odgrywiają poliaminy, a zahamowanie ich syntezy zmniejsza liczbę wytwarzanych zarodków [33, 103].

Synteza i akumulacja endogennych poliamin towarzyszy także procesowi somatycznej embriogenezy u innych gatunków roślin [46, 51]. Jednakże zawartość poliamin jest inna u poszczególnych gatunków i zmienia się w zależności od fazy rozwojowej zarodków [3, 73, 81].

6.2. Stymulacja morfogenezy

Poliaminy regulują u roślin szereg procesów morfogenetycznych, takich jak tworzenie pędów i korzeni, tuberyzację, różnicowanie organów kwiatowych oraz zawiązywanie nasion i powstawanie owoców. Rozwojowi tkanek i organów towarzyszą zmiany zawartości endogennych poliamin [17]. Rola poszczególnych poliamin w tych procesach jest ostatnio przedmiotem intensywnych badań [85].

Wpływ egzogennych poliamin oraz inhibitorów ich syntezy na procesy morfogenetyczne bada się w ściśle kontrolowanych warunkach *in vitro* [98]. Egzogenne poliaminy mogą stymulować organogenezę i regenerację roślin z eksplantatów tkankowych, a w konsekwencji zwiększać efektywność namnażania *in vitro* [25, 93, 94]. Regulują także przyrost świeżej masy części nadziemnych i podziemnych, przy czym efekt działania różnych poliamin może być przeciwstawny. W kulturach ziemniaka (*Solanum tuberosum*) spermina stymuluje tuberyzację, spermidyna hamuje ten proces, a putrescyna nie wykazuje żadnego wpływu [35, 36].

Rozwój systemu korzeniowego w kulturach tytoniu (*Nicotiana tabacum*) wymaga obecności putrescyny. Zablockowanie zaś biosyntezy tej dwuaminy przez dwufluorometylargininę (DFMA) bądź dwufluorometylornitynę (DFMO) hamuje wzrost korzeni [19, 20].

Niekiedy efektywne różnicowanie się roślin z tkanek kalusowych wymaga obniżenia zawartości endogennych poliamin, co można wykazać stosując inhibitory dekarboksylazy ornitynowej lub argininowej [10, 98]. Zapotrzebowanie na poliaminy podczas morfogenezy może być zatem różne u poszczególnych gatunków roślin, a także w zależności od fazy rozwojowej.

6.3. Wpływ na kwitnienie i wytwarzanie owoców

Putrescyna jest niezbędna do rozpoczęcia kwitnienia niektórych gatunków roślin, np. *Sinapis alba* [49] i *Chrysanthemum morifolium* [9]. Inicjacja organów generatywnych następuje w wyniku transportu tej diaminy z liści do wierzchołków pędu [9, 21-24, 49, 55] lub też w wyniku jej syntezy *de novo* [43].

Zmniejszenie zawartości putrescyny (np. w wyniku działania dwufluorometylornityny) powoduje zaburzenia rozwoju łodyg i liści oraz mniej obfite kwitnienie. Prawidłowy rozwój organów wegetatywnych i generatywnych może zostać przywrócony po dostarczeniu egzogennej putrescyny [9].

Inicjacja pąków kwiatowych w kulturze tytoniu jest skorelowana ze znacznym wzrostem zawartości spermidyny [96]. Ponadto wykazano, że obecność 1–5 mM tej poliaminy w pożywce stymuluje tworzenie zawiązków kwiatowych. Zahamowanie syntezy poliamin przez cykloheksyloaminę (CHA) i dwufluorometylornitynę powoduje zmniejszenie zawartości endogennej spermidyny i wzrost liczby pąków wegetatywnych [55]. Dwufluorometylarginina nie wywołuje żadnych zmian morfologicznych, co sugeruje wyłączny udział ornityny w procesie biosyntezy poliamin u tytoniu. Inne inhibitory spermidyny, takie jak cykloheksyloamina i metylglio-ksal-bis(guanylohydrazon) (MGBG), wywoływały szklistość liści, ciemnienie znamion słupek, deformacje w budowie pręcików i niską płodność roślin.

Wczesna faza rozwoju owoców związana jest z intensywnymi podziałami komórkowymi, którym towarzyszy wyraźny wzrost zawartości endogennych poliamin.

Po ustaniu podziałów, kiedy wzrost owocu zachodzi głównie w wyniku powiększenia objętości poszczególnych komórek, zawartość poliamin ulega obniżeniu [60, 77].

7. PODSUMOWANIE

Mechanizmy działania poliamin nie zostały, jak dotąd, precyzyjnie określone. Wiadomo jednak, że dodatnie grupy aminowe mogą tworzyć połączenia z ujemnie naładowanymi komponentami komórki, np. z grupami fosforanowymi DNA i RNA, fosfolipidami błonowymi czy grupami karboksylowymi aminokwasów, co może prowadzić do zmian ich konformacji przestrzennej, a w konsekwencji wpływać na przebieg określonych procesów molekularnych. Poliaminy regulują kluczowe dla rośliny procesy metaboliczne, w tym fosforylację białek i przemiany fosfatydyloinozytoli. Przeciwdziałają degradacji błon cytoplazmatycznych i zbyt wysokiemu stężeniu etylenu, przez co opóźniają procesy starzenia. Poliaminy zostały wyodrębnione w grupę szczególnych regulatorów wzrostu i rozwoju roślin, różną od fitohormonów [97].

LITERATURA

- [1] ALTMAN A, KAUR-SAWHNEY R, GALSTON AW. Stabilization of oat leaf protoplasts through polyamine-mediated inhibition of senescence. *Plant Physiol* 1977; **60**: 570–574.
- [2] AMARASINGHE V, CARLSON JE. Subcellular localization of polyamines in embryogenic callus of white spruce (*Picea glauca*). *Can J Bot* 1994; **72**: 788–793.
- [3] AMARASINGHE V, DHAMI R, CARLSON JE. Polyamine biosynthesis during somatic embryogenesis in interior spruce (*Picea glauca* x *Picea engelmannii* complex). *Plant Cell Rep* 1996; **15**: 495–499.
- [4] ANDREADAKIS A, KOTZABASIS K. Changes in the biosynthesis and catabolism of polyamines in isolated plastids during chloroplast photodevelopment. *J Photochem Photobiol* 1996; **33**: 163–170.
- [5] ANGELINI R, FEDERICO R, BONFANTE P. Maize polyamine oxidase: antibody production and ultrastructural localization. *J Plant Physiol* 1995; **145**: 686–692.
- [6] ANTOGNONI F, PISTOCCHI R, BAGNI N. Uptake competition between polyamines and analogues in carrot protoplasts. *Plant Physiol Biochem* 1993; **31**: 693–698.
- [7] ANTOGNONI F, CASALI P, PISTOCCHI R, BAGNI N. Kinetics and calcium-specificity of polyamine uptake in carrot protoplasts. *Amino Acids* 1994; **6**: 301–309.
- [8] ANTOGNONI F, PISTOCCHI R, CASALI P, BAGNI N. Does calcium regulate polyamine uptake in carrot protoplasts? *Plant Physiol Biochem* 1995; **33**: 701–708.
- [9] ARIBAUD M, MARTIN-TANGUY J. Polyamine metabolism, floral initiation and floral development in *Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *Plant Growth Reg* 1994; **15**: 23–31.
- [10] BAJAJ S, RAJAM MV. Polyamine accumulation and near loss of morphogenesis in long-term callus cultures of rice. Restoration of plant regeneration by manipulation of cellular polyamine levels. *Plant Physiol* 1996; **112**: 1343–1348.

- [11] BASTOLA RD, MINOCHA SC. Increased putrescine biosynthesis through transfer of mouse ornithine decarboxylase cDNA in carrot promotes somatic embryogenesis. *Plant Physiol* 1995; **109**: 63–71.
- [12] BEIGBEDER A, VAVDAKIS M, NAVAKOUDIS E, KOTZABASIS K. Influence of polyamine inhibitors on light-independent and light-dependent chlorophyll biosynthesis and on the photosynthetic rate. *J Photochem Photobiol* 1995; **28**: 235–242.
- [13] BELNY M, HEROUART D, THOMASSET B, DAVID H, JACQUIN-DUBREUIL A, DAVID A. Transformation of *Papaver somniferum* cell suspension cultures with *sam1* from *A. thaliana* results in cell lines of different S-adenosyl-L-methionine synthetase activity. *Physiol Plant* 1997; **99**: 233–240.
- [14] BEN-HAYYIM G, MARTIN-TANGUY J, TEPFER D. Changing root and shoot architecture with the *rol A* gene from *Agrobacterium rhizogenes*: Interactions with gibberellic acid and polyamine metabolism. *Physiol Plant* 1996; **2**: 237–243.
- [15] BESFORD RT, RICHARDSON CM, CAPELL T, TIBURCIO AF. Effect of polyamine on stabilization of molecular complexes in thylacoid membranes of osmotically stressed oat leaves. *Planta* 1993; **189**: 201–206.
- [16] BOERJAN W, BAUW G, VAN MONTAGU M, INZE D. Distinct phenotypes generated by overexpression and suppression of S-adenosyl-L-methionine synthetase reveal developmental patterns of gene silencing in tobacco. *Plant Cell* 1994; **6**: 1401–1414.
- [17] BOGET N, TORNE JM, WILLADINO L, SANTOS M. Variations in endogenous polyamine content of maize calli obtained from zygotic and androgenetic embryos. *Plant Cell Tiss Org Cult* 1995; **40**: 139–144.
- [18] BORRELL A, CARBONELL L, FARRAS R, PUIG-PARELLADA P, TIBURCIO AF. Polyamines inhibit lipid peroxidation in senescing oat leaves. *Physiol Plant* 1997; **99**: 385–390.
- [19] BURTIN D, MARTIN-TANGUY J, PAYNOT M, CARRE M, ROSSIN N. Polyamines, hydroxycinnamoylputrescines, and root formation in leaf explants of tobacco cultivated *in vitro*. *Plant Physiol* 1990; **93**: 1398–1404.
- [20] BURTIN D, MARTIN-TANGUY J, TEPFER D. α -DL-difluoromethylornityne, a specific, irreversible inhibitor of putrescine biosynthesis, induces a phenotype in tobacco similar to that ascribed to the root-inducing, left-hand transferred DNA of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Physiol* 1991; **95**: 461–468.
- [21] BUTOWT R, JAŻDŻEWSKA E, MAJEWSKA-SAWKA A. Are polyamines involved in calcium signaling in plants? *Folia Histochem Cytobiol* 1996; **43**: 2.
- [22] CAFFARO SV, SCARAMAGLI S, ANTOGNONI F, BAGNI N. Polyamines content and translocation in soybean plants. *J Plant Physiol* 1993; **141**: 563–568.
- [23] CAFFARO SV, ANTOGNONI F, SCARAMAGLI S, BAGNI N. Polyamine translocation following photoperiodic flowering induction in soybean. *Physiol Plant* 1994; **91**: 251–256.
- [24] CAFFARO SV, VICENTE C. Early changes in the content of leaf polyamines during the photoperiodic flowering induction in soybean. *J Plant Physiol* 1995; **145**: 756–758.
- [25] CHI GL, LIN WS, LEE JEE, PUA EC. Role of polyamines on *de novo* shoot morphogenesis from cotyledons of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (Lour) Olsson *in vitro*. *Plant Cell Rep* 1994; **13**: 323–329.
- [26] COLOMBO R, CERANA R, BAGNI N. Evidence for polyamine channels in protoplasts and vacuoles of *Arabidopsis thaliana* cells. *Biochem Biophys Res Comm* 1992; **182**: 1187–1192.
- [27] CORDIERO A, FRITZE K, SCHELL J, WALDEN R. T-DNA tagging genes influencing polyamine metabolism. *Plant Physiol* 1996; **111**: 21.
- [28] DESCENZO RA, MINOCHA SC. Modulation of cellular polyamines in tobacco by transfer and expression of mouse ornithine decarboxylase cDNA. *Plant Mol Biol* 1993; **22**: 113–127.
- [29] DROLET G, DUMBROFF EB, LEGGE RL, THOMPSON JE. Radical scavenging properties of polyamines. *Phytochemistry* 1986; **25**: 367–371.

- [30] DUREJA-MUNJAL I, ACHARYA M, GUHA-MUKHERJEE S. Effect of hormones and spermidine on the turnover of inositolphospholipids in *Brassica* seedlings. *Phytochemistry* 1992; **31**: 1161–1163.
- [31] EILERS RJ, SULLIVAN JG, SKIRVIN RM. Analyzing the effect of exogenous polyamines and growth regulators on plating efficiency of sweet potato protoplasts using a central composite test design. *Plant Cell Rep* 1988; **7**: 216–219.
- [32] EVANS PT, MALMBERG RL. Do polyamines have roles in plant development? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1989; **40**: 235–269.
- [33] FEIRER RP, MIGNON G, LITVAY JD. Arginine decarboxylase and polyamines required for embryogenesis in the wild carrot. *Science* 1984; **223**: 1433–1435.
- [34] FALCONE P, SERAFINI-FRACASSINI D, DEL DUCA S. Comparative studies of transglutaminase activity and substrates in different organs of *Helianthus tuberosus*. *J Plant Physiol* 1993; **142**: 265–273.
- [35] FERAY A, HOURMANT A, BRUN A, PENOT M. Effect of polyamines on morphogenesis of *in vitro* potato plants (*Solanum tuberosum* cv. Bintje). *Life Sci* 1993; **316**: 1446–1451.
- [36] FERAY A, HOURMANT A, PENOT M, CAROFF J, CANN-MOISAN CH. Polyamines and morphogenesis-effects of methylglyoxal-bis(guanylhydrazone). *Bot Acta* 1994; **107**: 18–23.
- [37] FLORES HE, GALSTON AW. Osmotic stress-induced polyamine accumulation in cereal leaves. 1. Physiological parameters of the response. *Plant Physiol* 1984; **75**: 102–109.
- [38] FOWLER MR, KIRBY MJ, SCOTT NW, SLATER A, ELLIOTT M. Polyamine metabolism and gene regulation during the transition of autonomous sugar beet cells in suspension culture from quiescence to division. *Physiol Plant* 1996; **98**: 439–446.
- [39] FRITZE K, CZAJA I, WALDEN R. T-DNA tagging of genes influencing polyamine metabolism: isolation of mutant plant lines and rescue of DNA promoting growth in the presence of a polyamine biosynthetic inhibitor. *Plant J* 1995; **7**: 261–271.
- [40] FUHRER J, KAUR-SAWHNEY R, SHIH LM, GALSTON AW. Effects of exogenous 1,3-diaminopropane and spermidine on senescence of oat leaves. *Plant Physiol* 1982; **70**: 1597–1600.
- [41] GALLARDO M, GALLARDO ME, MATILLA AJ, RUEDA PM, SANCHEZ-CALLE IM. Inhibition of polyamine synthesis by cyclohexylamine stimulates the ethylene pathway and accelerates the germination of *Cicer arietinum* seeds. *Physiol Plant* 1994; **91**: 9–16.
- [42] GALSTON AW. Polyamines as modulators of plant development. *BioSci* 1983; **33**: 382–386.
- [43] GALSTON AW. Polyamines and plant morphogenesis. [w] Slocum RD, Flores HE [red.] *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*, Boca Raton, Florida, CRC Press 1991: 175–186.
- [44] GARRIDO D, CHIBI F, MATILLA A. Polyamines in the induction of *Nicotiana tabacum* pollen embryogenesis by starvation. *J Plant Physiol* 1995; **145**: 731–735.
- [45] GERATS AGM, KAYE C, COLLINS C, MALMBERG RL. Polyamine levels in *Petunia* genotypes with normal and abnormal floral morphologies. *Plant Physiol* 1988; **86**: 390–393.
- [46] HADRAMI IE, DAUZAC J. Effects of polyamine biosynthetic inhibitors on somatic embryogenesis and cellular polyamines in *Hevea brasiliensis*. *J Plant Physiol* 1992; **140**: 33–36.
- [47] HAGIWARA M, SOEDA M, SUZUKI Y. Purification and characterization of diamine oxidase from *Arachis hypogea* seedlings. *J Plant Physiol* 1994; **144**: 12–16.
- [48] HAMILL JD, ROBINS RJ, PARR AJ, EVANS DM, FURZE JM, RHODES MJC. Over-expression of yeast ornithine decarboxylase gene in roots of transgenic *Nicotiana rustica* can lead to enhanced nicotine accumulation. *Plant Mol Biol* 1990; **15**: 27–38.
- [49] HAVELANGE A, LEJEUNE P, BERNIER G, KAUR-SAWHNEY R, GALSTON AW. Putrescine export from leaves in relation to floral transition in *Synapis alba*. *Physiol Plant* 1996; **96**: 59–65.
- [50] HEBY O, PERSSON L. Molecular genetics of polyamine synthesis in eucaryotic cells. *TIBS* 1990; **15**: 153–158

- [51] HELLEBOID S, COUILLEROT JP, HILBERT JL, VASSEUR J. Inhibition of direct somatic embryogenesis by α -difluoromethylarginine in a *Cichorium* hybrid: effects on polyamine content and protein patterns. *Planta* 1995; **196**: 571–576.
- [52] HOURMANT A, MEREAU N, PENOT M, CANN C, CAROFF J. Influence of polyamines on growth and metabolism of *Dunaliella primolecta*. *Acta Bot Neerl* 1994; **43**: 129–136.
- [53] JAKUBOWICZ M. Etylen – jego udział w regulacji dojrzewania owoców i. starzenia się kwiatów. Aspekty biotechnologiczne. *Post Bioch* 1996; **42**: 65–72.
- [54] KAUR-SAWHNEY R, FLORES HE, GALSTON A. Polyamine-induced DNA synthesis and mitosis in oat leaf protoplasts. *Plant Physiol* 1980; **65**: 368–371.
- [55] KAUR-SAWHNEY R, TIBURCIO AF, GALSTON AW. Spermidyne and flower bud differentiation in thin-layer explants of tobacco. *Planta* 1988; **173**: 282–284.
- [56] KĄCZKOWSKI J. Biochemia roślin. PWN, Warszawa, 1993.
- [57] KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ L. Cytobiochemia. PWN, Warszawa, 1995.
- [58] KOTZABASIS K. A role for chloroplast-associated polyamines? *Bot Acta* 1996; **109**: 5–7.
- [59] KUMAR A, TAYLOR MA, ARIF SAM, DAVIES HV. Potato plants expressing antisense and sense S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) transgenes show altered levels of polyamines and ethylene: antisense plants display abnormal phenotypes. *Plant J* 1996; **9**: 147–158.
- [60] KUSHAD MM, YELENOSKY G, KNIGHT R. Interrelationship of polyamine and ethylene biosynthesis during *Avocado* fruit development and ripening. *Plant Physiol* 1988; **87**: 463–467.
- [61] LAUKKANEN H, SARJALA T. Effect of exogenous polyamines on scots pine callus *in vitro*. *J Plant Physiol* 1997; **150**: 167–172.
- [62] MADER JC. Studies on polyamines in *Solanum tuberosum in vitro*: effects of DMFO, DMFA, chlorogenic acid and putrescine on the endogenous distribution of polyamines, tuberization and morphology. *J Plant Physiol* 1997; **150**: 141–152.
- [63] MAINI L, CARRARO LM, TORRIGIANI P, LOMBARDO G, GEROLA PD. Cytochemical localization of diamine oxidase in *Helianthus tuberosus* developing tubers. *J Plant Physiol* 1995; **146**: 375–378.
- [64] MAJEWSKA-SAWKA A, BUTOWT R, NIKLAS A. Do polyamines release membrane-bound calcium in sugar beet protoplasts? *J Plant Physiol* (w druku).
- [65] MAJEWSKA-SAWKA A, NIKLAS A, JAŻDŻEWSKA E, BUTOWT R. Influence of polyamines on plating efficiency of sugar beet protoplasts. [w] Plant Embryogenesis Workshop - Abstracts 1996: 50.
- [66] MAJEWSKA-SAWKA A, NIKLAS A, JAŻDŻEWSKA E. The effect of polyamines on the development of sugar beet protoplasts. *Biol Plant* 1997; **39**: 561–567.
- [67] MALMBERG RL, WATSON MB. Genetic analysis of polyamine biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 1996; **111**: 21
- [68] MASGRAU C, ALTABELLA T, BORRELL A, FARRAS R, FLORES D, BESFORD RT, THOMPSON AJ, TIBURCIO AF. Localization and inducible over-expression of oat arginine decarboxylase in transgenic tobacco. *Plant Physiol* 1996; **111**: 22.
- [69] MERNISSI-ARIFI K, IMBS I, SCHLEWER G, SPIESS B. Complexation of spermine and spermidyne by myo-inosytol 1,4,5-tris(phosphate) and related compounds: biological significance. *Bioch Biophys Acta* 1996; **1289**: 404–410.
- [70] MESSIAEN J, CAMBIER P, VAN CUSTEM P. Polyamines and pectins. *Plant Physiol*. 1997; **113**: 387–395.
- [71] MICHAEL AJ, FURZE JM, RHODES MJC, BURTIN D. Molecular cloning and functional identification of plant ornithine decarboxylase cDNA. *Biochem J* 1996; **314**: 241–248.
- [72] MINOCHA R, MINOCHA SC, KOMAMINE A, SHORTLE WC. Regulation of DNA synthesis and cell division by polyamines in *Catharanthus roseus* suspension cultures. *Plant Cell Rep* 1991; **10**: 126–130.

- [73] MINOCHA R, KVAALEN H, MINOCHA SC, LONG S. Polyamines in embryogenic cultures of Norway spruce (*Picea abies*) and red spruce (*Picea rubens*). *Tree Physiol* 1993; **13**: 365–377.
- [74] MINOCHA SC, BASTOLA DR, ANDERSEN SE. Increased putrescine production via transgene expression promotes somatic embryogenesis. *Plant Physiol* 1995; **108**: 47.
- [75] MIZRAHI Y, APPLEWHITE PB, GALSTON AW. Polyamine binding to proteins in oat and petunia protoplasts. *Plant Physiol* 1989; **91**: 738–743.
- [76] PISTOCCHI R, KELLER F, BAGNI N, MATILE P. Transport and subcellular localization of polyamines in carrot protoplasts and vacuoles. *Plant Physiol* 1988; **87**: 514–518.
- [77] PONAPPA T, MILLER AR. Polyamines in normal and auxin-induced strawberry fruit development. *Physiol Plant* 1996; **98**: 447–454.
- [78] RASTOGI R, KAUR-SAWHNEY V. Polyamines and flower development in the male-sterile stamenless-2 mutant of tomato. I. Levels of polyamines and their biosynthesis in normal and mutant flowers. *Plant Physiol* 1990; **93**: 439–445.
- [79] RASTOGI R, DULSON J, ROTHSTEIN SJ. Cloning of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) arginine decarboxylase gene and its expression during fruit ripening. *Plant Physiol* 1993; **103**: 829–834.
- [80] SAKAI TT, COHEN SS. Effects of polyamines on the structure and reactivity of tRNA. *Prog Nucl Acid Res Mol Biol* 1976; **17**: 15–42.
- [81] SANTANEN A, SIMOLA LK. Changes in polyamine metabolism during somatic embryogenesis in *Picea abies*. *J Plant Physiol* 1992; **140**: 475–480.
- [82] SCALET M, FEDERICO R, ANGELINI R. Time course of diamine oxidase and peroxidase activities and polyamine changes after mechanical injury of chick-pea seedlings. *J Plant Physiol* 1991; **137**: 571–575.
- [83] SCANLON CH, MARTINEC J, MACHACKOVA I, ROLPH CE, LUMSDEN PJ. Identification and preliminary characterization of a Ca²⁺-dependent high-affinity binding site for inosytol-1,4,5-trisphosphate from *Chenopodium rubrum*. *Plant Physiol* 1996; **110**: 867–874.
- [84] SCOCCIANI V, BAGNI N, MALIS SA. Interaction between polyamines and cells of the marine unicellular red alga *Porphyridium* sp. *Plant Physiol Biochem* 1989; **27**: 899–904.
- [85] SHARMA P, YADAV JS, RAJAM MV. Polyamines modulate *in vitro* root growth and differentiation. *Plant Physiol* 1995; **108**: 48.
- [86] SHARMA P, YADAV JS, RAJAM MV. Induction of laterals in root cultures of eggplant (*Solanum melongena* L.) in hormone-free liquid medium: a novel system to study the role of polyamines. *Plant Sci* 1997; **125**: 103–111.
- [87] SIGNORINI M, BENINATI S, BERGAMINI CD. Identification of transglutaminase activity in the leaves of silver beet (*Beta vulgaris* L.). *J Plant Physiol* 1991; **137**: 547–552.
- [88] SIŃSKA I. Poliaminy i aminy aromatyczne. [w] Jankiewicz LS [red.] *Regulatory Wzrostu i Rozwoju Roślin*. PWN, Warszawa, 1997: 150–168.
- [89] SLOCUM RD, FUREY MJ. Electron-microscopic cytochemical localization of diamine and polyamine oxidase in pea and maize tissues. *Planta* 1991; **183**: 443–450.
- [90] SMITH TA. Polyamines. *Ann Rev Plant Physiol* 1985; **36**: 117–143.
- [91] SPERANZA A, BAGNI N. Putrescine biosynthesis in *Agrobacterium tumefaciens* and in normal and crown gall tissues of *Scorzonera hispanica* L. *Z Pflanzenphysiol* 1977; **81**: 226–233.
- [92] TABOR CW, TABOR H. Postulated functions for the polyamines. *Ann Rev Biochem* 1984; **53**: 749–790.
- [93] TANOMOTO S, MATSUBARA Y. Stimulating effect of spermine on bulblet formation in bulb scale segments of *Lilium longiflorum*. *Plant Cell Rep* 1995; **15**: 297–300.
- [94] TARENGHI E, CARRE M, MARTIN-TANGUY J. Effects of inhibitors of polyamine biosynthesis and of polyamines on strawberry microcutting growth and development. *Plant Cell Tiss Org Cult* 1995; **42**: 47–55.
- [95] TASSONI A, ANTOGNONI F, BAGNI N. Polyamine binding to plasma membrane vesicles isolated from zucchini hypocotyls. *Plant Physiol* 1996; **110**: 817–824.

- [96] TIBURCIO AF, KAUR-SAWHNEY R, GALSTON AW. Polyamine biosynthesis during vegetative and floral bud differentiation in thin layer tobacco tissue cultures. *Plant Cell Physiol* 1988; **29**: 1241–1249.
- [97] TIBURCIO AF, CAMPOS JL, FIGUERAS X, BESFORD RT. Recent advances in the understanding of polyamine functions during plant development. *Plant Growth Reg* 1993; **12**: 331–340.
- [98] TORNE JM, CLAPAROLS I, MARCE M, GUERGUE AM, SANTOS MA. Influence of pretreatments with inhibitors of putrescine synthesis on polyamine metabolism and differentiation processes of maize calluses. *Plant Sci* 1994; **100**: 15–22.
- [99] TORRIGIANI P, SERAFINI-FRACASSINI D, BIONDI S, BAGNI N. Evidence for the subcellular localization of polyamines and their biosynthesis enzymes in plant cells. *J Plant Physiol* 1986; **124**: 23–29.
- [100] WALDEN R, CORDEIRO A, TIBURCIO AF. Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. *Plant Physiol* 1997; **113**: 1009–1013.
- [101] WINER L, APELBAUM A. Involvement of polyamines in the development and ripening of avocado fruits. *J Plant Physiol* 1986; **126**: 223–233.
- [102] WOON NOHE, MINOCHA SC. Expression of a human S-adenosylmethionine decarboxylase in transgenic tobacco and its effects on polyamine biosynthesis. *Transgenic Res* 1994; **3**: 113–127.
- [103] WRÓBLEWSKI TA. Proces somatycznej embriogenezy – charakterystyka szczegółowa. *Post Biol Kom* 1994; **21**: 11–32.
- [104] VANDEN BROECK, VANDER STRAETEN D, VAN MONTAGUM, APLAN A. A group of chromosomal proteins is specifically released by spermine and losses DNA-binding activity upon phosphorylation. *Plant Physiol* 1994; **106**: 559–566.
- [105] YANAGISAWA H, HAMASIMA N, KATO T. Polyamine oxidase from leaves of *Lilium longiflorum*: purification and properties. *J Plant Physiol* 1996; **149**: 657–662.
- [106] YE XS, AVDIUSHKO SA, KUC J. Effects of polyamines on *in vitro* phosphorylation of soluble and plasma membrane proteins in tobacco, cucumber and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 1994; **97**: 109–118.
- [107] YOUNG ND, GALSTON AW. Putrescine and acid stress. *Plant Physiol* 1983; **71**: 767–771.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 23.06. 1997 r.

Przyjęto: 20.08. 1997 r.

Adres autorów: 85-950 Bydgoszcz, Powstańców Wielkopolskich 10

CYTOTOKSYCZNE RYBONUKLEAZY O SZCZEGÓLNYM DZIAŁANIU BIOLOGICZNYM (RYSBAZY): RYSBAZY DROBNOUSTROJÓW I ROŚLIN

CYTOTOXIC RIBONUCLEASES WITH SPECIAL BIOLOGICAL ACTIONS (RISBASES): MICROORGANISM AND PLANT RISBASES

Andrzej WIERZBICKI, Adam SOBKOWIAK, Wiesław H. TRZECIAK

Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Poznaniu

Streszczenie: Rysbazy są to rybonukleazy o specjalnym działaniu biologicznym. Omówiono budowę, mechanizm działania i funkcje niektórych rysbaz bakteryjnych, grzybowych i roślinnych. Kolicyna E3 i kloacyna DF13 z bakterii mają podobny mechanizm działania do RNazowych toksyn grzybowych, takich jak α -sarcyna. Zabijają one komórki docelowe przez specyficzną hydrolizę rRNA i blokowanie syntezy białka. W roślinach kwiatowych występują białka RIP: rycyna i PAP. Rycyna, jako N-glikozydaza, także degradowuje rRNA w jego pętli α -sarcyny. Białka PAP mają funkcję antywirusową. Inny typ rysbazy – S-RNaza odgrywa rolę w zapobieganiu zapłodnieniu u roślin przez zatrzymanie wzrostu niezgodnej łagiewki pyłkowej. W ten sposób białka te uniemożliwiają samozapylenie, a co za tym idzie krzyżowanie w pokrewieństwie u niektórych gatunków roślin kwiatowych.

Słowa kluczowe: rysbazy, rybonukleazy, cytotoksyczność

Summary: Risbases are ribonucleases with special biological actions. Structure, mechanism of action and functions of some bacterial, fungal and plant risbases were described. Colicin E3 and Cloacin DF13 from bacteria have a similar mechanism of action to that of the fungal RNase toxins such as α -sarcin. They kill their target cells by cleaving the rRNA and blocking protein synthesis. Flowering plants have a RIP proteins such as ricin and PAP which have a cytotoxic actions. Ricin, as a N-glycosidase, also degrades rRNA in their α -sarcin loop. PAP proteins have an antiviral function. Other type of risbase – S-RNase plays a role in prevention of fertilization in plants by arresting incompatible pollen tube growth. In this way this protein makes impossible self-pollination and in consequence inbreeding in some species of plants.

Key words: risbases, ribonucleases, cytotoxic

WSTĘP

Rybonukleazy (RNazy) są enzymami hydrolizującymi kwas rybonukleinowy. Należą do nich: fosfodiesterazy, hydrolizujące wiązania fosfodiestrowe rybozonukleozydofosforanowego łańcucha RNA oraz glikozydazy, hydrolizujące wiązania pomiędzy zasadą azotową i węglem C1 rybozy. Poszczególne RNazy charakteryzują się różną specyficznością substratową i parametrami kinetycznymi reakcji.

Do niedawna wiedza o funkcji RNaz w organizmach żywych była niewielka. Wiadomo było, że hydrolizują one RNA specyficznie podczas ekspresji genu i niespecyficznie w przewodzie pokarmowym [9]. W miarę postępu badań okazało się, że wiele czynników aktywnych biologicznie to RNazy. D'Alessio zaproponował dla nich nazwę *Ribonucleases with Special Biological Actions* (RISBASEs) [4]. Wszystkie Rysbazy są wydzielane pozakomórkowo i wykazują specyficzną aktywność biologiczną, z reguły cytotoksyczną. Niektóre z nich działają na wszystkie komórki różnych organizmów (np. α -sarcyna działa na komórki ssaków), inne na określone komórki pewnych typów (angiogeniny – np. na śródbłonek naczyń krwionośnych [27], a S-RNazy – na komórki niektórych roślin).

Rysbazy spełniają różne funkcje m. in.: zabezpieczenie przed samozapłodnieniem, indukcja tworzenia się naczyń krwionośnych, zwalczanie pasożytów, zwalczanie nowotworów, antywirusowe, działanie antybiotyczne i immunosupresyjne. Aby pełnić swą biologiczną rolę, Rysbazy muszą być aktywne rybonukleolitycznie. Po ich inaktywacji za pomocą inhibitora lub drogą konstruowania wersji enzymu ze zmienionym centrum katalitycznym metodą ukierunkowanej mutagenyzy ich aktywność biologiczna zanika.

Celem pracy jest przedstawienie najnowszych badań dotyczących struktury i funkcji najważniejszych rysbaz mikroorganizmów i roślin, ze szczególnym uwzględnieniem ich funkcji cytotoksycznych.

1. RYSBAZY DROBNOUSTROJÓW

1.1. α -Sarcyna

α -Sarcyna (EC 3.1.27.10) należy do rodziny RNaz T1 [16], a jej nazwa pochodzi od czynnika wyizolowanego z pleśni *Aspergillus giganteus*, który wykazywał aktywność przeciwnowotworową (*antisarcoma*). Jego obecność stwierdzono w moczu pacjentów zainfekowanych przez grzyby z rodzaju *Aspergillus* i białko to jest uważane za jeden z głównych czynników patogennych [30]. Ustalono, że α -sarcyna wykazuje właściwości cytotoksyczne również wobec komórek prawidłowych [24, 30].

α -Sarcyna zbudowana jest z 150 aminokwasów, a jej masa cząsteczkowa wynosi ok. 17 kDa. Występuje w postaci monomeru, choć ma skłonność do dimeryzacji, a aminokwasami czynnymi katalitycznie są reszty histydyny [10, 16]. Bardzo podobne do tego białka (80% identyczności) są dwie homologiczne RNazy z *Aspergillus restrictus*: restryktocyna (*restrictocin*) i mitogilina (*mitogillin*), które różnią się między sobą tylko dwiema resztami aminokwasowymi [24]. Są to monomeryczne białka zasadowe o masie cząsteczkowej około 17 kDa, wykazujące podobną strukturę II- i III-rzędową.

Białka te, dzięki występowaniu na ich powierzchni zarówno obszarów silnie zasadowych, jak i hydrofobowych, dostają się do komórek docelowych przypuszczalnie oddziałując z obdarzoną ujemnym ładunkiem dwuwarstwą fosfolipidową. W warunkach doświadczalnych α -sarcyna powoduje łączenie się pęcherzyków fosfolipidowych i zmianę ich właściwości termotropowych [10, 16].

W komórkach *Eukaryota* enzym ten powoduje swoistą hydrolizę rRNA podjednostki większej rybosomu: 26S u drożdży i 28S u ssaków. Właśnie w tych rRNA występują konserwatywne sekwencje AGUACGAG \downarrow AGGAC (\downarrow – miejsce hydrolizy) [24, 28], z którymi wiążą się czynniki elongacyjne eEF-2. Zgodnie z nazewnictwem przyjętym dla *E. coli* sekwencje te, określane jako szypuła i pętla α -sarcyny (α -*sarcin stem-loop*, u *Prokaryota* C²⁶⁴⁶-G²⁶⁷⁴, u *Eukaryota* A⁴³⁰⁸-U⁴³³⁹), występują w domenie VI 23S rRNA, co u *Eukaryota* odpowiada domenie VII 28S rRNA (rys. 1) [17, 28]. Sekwencje te są specyficznie rozpoznawane przez α -sarcynę i pokrewne enzymy oraz grupę specyficznych N-glikozydaz roślinnych, określaną jako *Ribosome inactivating proteins* (RIP) [24]. α -Sarcyna katalizuje reakcję hydrolizy wiązania fosfodiestrowego pomiędzy G²⁶⁶¹ i A²⁶⁶² w 23S rRNA i po 3' stronie G⁴³²⁵ w 28S rRNA, co uniemożliwia wiązanie czynników elongacyjnych [8, 17]. Powoduje to w komórkach *Eukaryota* zahamowanie translacji zależnej od eEF-2 i utrudnia tworzenie kompleksu inicjującego 80S. Jeżeli substratem dla α -sarcyny są rybosomy, to 5S, 5.8S i 18S rRNA pozostają nietknięte, a hydrolizowane jest tylko jedno wiązanie w 28S rRNA. Rybosomy *E. coli* są odporne na działanie tego enzymu, a wolny 23S rRNA jest trawiony niespecyficznie, choć z mniejszą szybkością [8].

1.2. Kolicyny

Białka bakteryjne – kolicyny zostały odkryte w 1925 roku przez E. Gratia, a dopiero po 50 latach stwierdzono, że niektóre z nich – kolicyny E3 i E6 oraz kloacyna DF13 wykazują aktywność rybonukleolityczną [4]. Białka te, jak inne kolicyny, są wydzielane przez bakterie w odpowiedzi na stres środowiskowy, co ma istotne znaczenie w współzawodnictwie między poszczególnymi szczepami i gatunkami [30]. Są one kodowane przez plazmidy bakteryjne, np. kloacyna przez plazmid CloDF13 [6].

Kloacyna to białko o masie cząsteczkowej ok. 59 kDa, zbudowane z 561 aminokwasów. Jej hydrofobowy N-koniec, zawierający dużo reszt glicyny, jest przypuszczalnie odpowiedzialny za translokację białka przez błonę komórkową, a C-koniec, bogaty w aminokwasy zasadowe, tworzy domenę o aktywności RNazy [6]. RNazy te rozpoznają specyficzne receptory na powierzchni wrażliwych bakterii. Są to receptory dla witaminy B12 (kolicyna) i ferrichromu aerobaktyny (kloacyna).

Kolicyny przekraczają błonę komórkową bakterii korzystając z układu transportowego Tol, wykorzystywanego również przez niektóre bakteriofagi [30]. Mechanizm działania kolicyny E3 i E6 oraz kloacyny DF13 polega na hamowaniu biosyntezy białka przez hydrolizę pojedynczego wiązania w 16S rRNA podjednostki 30S rybosomu w pozycji 1493, tj. około 50 nukleotydów od końca 3'. W ten sposób unieczynnijają one rybosom, uniemożliwiając wiązanie mRNA i blokując translację [30]. Nie hydrolizują one jednak wolnego rRNA. Komórka wytwarzająca kolicynę zabezpiecza się przed jej działaniem wytwarzając inhibitor Imm (*Immunity*). Jest to białko o masie cząsteczkowej ok. 10 kDa, które wiąże się specyficznie z kolicyną, blokując jej działanie cytotoksyczne na komórki wydzielające daną kolicynę. Geny kodujące kolicynę i jej inhibitor znajdują się w bezpośrednim sąsiedztwie w plazmidowym DNA. Kolicyny mają bardzo dużą aktywność katalityczną. Jedna cząsteczka kloacyny inaktywuje około 480 rybosomów/min, a do spowodowania śmierci komórki wystarcza 12 cząsteczek tej RNazy [30].

2. RYSBAZY ROŚLINNE

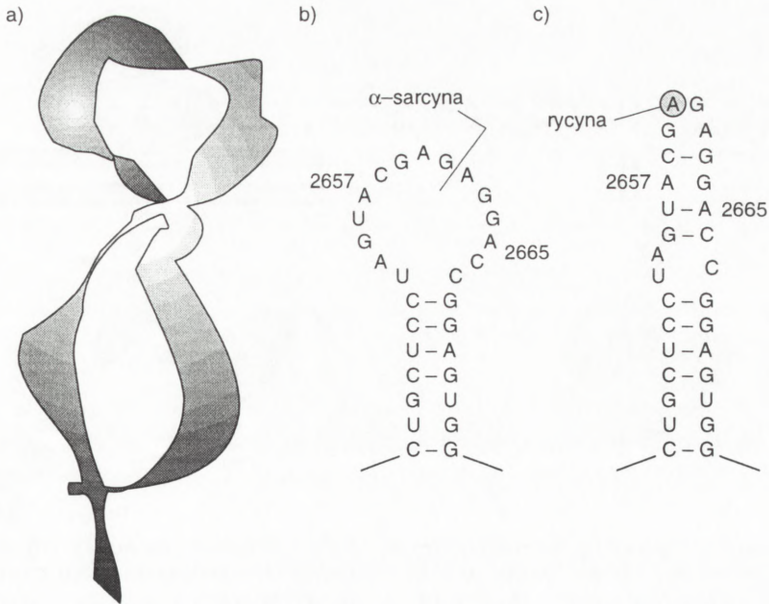
2.1. Białka inaktywujące rybosomy

Roślinne białka inaktywujące rybosomy (ang. *Ribosome Inactivating Proteins* – RIP) występują u wielu roślin wyższych. Z uwagi na ich strukturę wyróżnia się RIP I, monomery podjednostki A (określane również jako SCRIP – *single chain RIP*) i RIP II, tworzące dimery złożone z podjednostek A i B [11]. Do RIP I zaliczane są m.in. gelonina, dodekandryna, trichosantyna, trikokieryna, bryodyna, MAP (*Mirabilis antiviral protein*), BRIP (*Barley ribosome-inactivating protein*), PAP (*Pokeweed antiviral protein*), saporyna, luffina i momordyna [24].

Mechanizm podobny do działania RIP I (zahamowanie metabolizmu komórki zainfekowanej wirusem), występuje także w przypadku indukowanej przez interferon rybonukleazy L.

Funkcją RIP II w organizmach roślinnych jest przypuszczalnie obrona przed spożyciem nasion przez zwierzęta, a RIP I – obrona przeciwwirusowa.

Najlepiej zbadanym białkiem zaliczanym do RIP II jest rycyna (*ricin*), enzym katalizujący swoistą hydrolizę wiązania N-glikozydowego między adenozyną i rybozą w pozycji 4324 w eukariotycznym 28S rRNA (rys. 1). Jest to heterodimerska

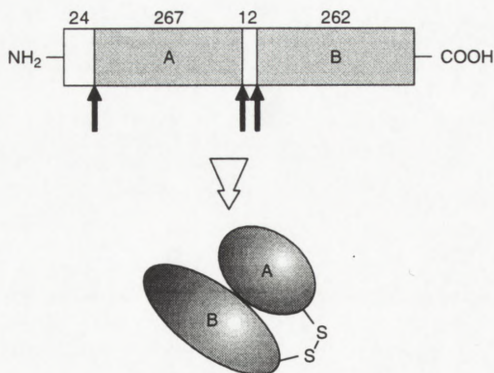


Rys. 1. Struktura pętli α -sarcyny rRNA: a – struktura przestrzenna w konformacji rozpoznawanej przez α -sarcynę; b – schemat budowy w konformacji rozpoznawanej przez α -sarcynę; kreską oznaczono miejsce hydrolizy wiązania fosfodiesterowego katalizowanej przez α -sarcynę; c – schemat budowy w konformacji rozpoznawanej przez rycynę, oznaczono adenozynę, w której rycyna hydrolyzuje wiązanie N-glikozydowe między adeniną i rybozą

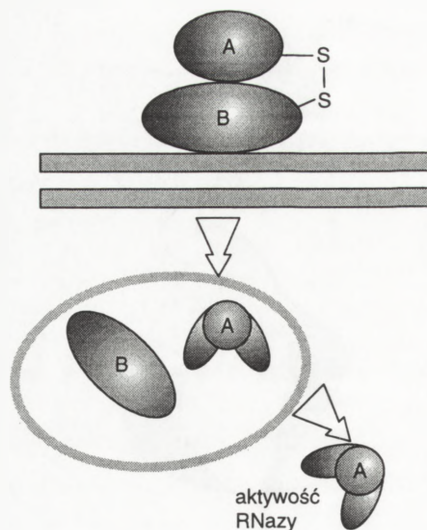
glikoproteina o masie cząsteczkowej około 32 kD, złożona z podjednostek A i B (267 i 262 reszty aminokwasowe) połączonych ze sobą wiązaniem disiarczkowym [7].

Rycyna jest syntetyzowana jako polipeptyd złożony z domen A i B, łączącego je odcinka o długości 12 aminokwasów i N-końcowej sekwencji sygnałowej o długości 24 aminokwasów. Na skutek modyfikacji potranslacyjnej, te ostatnie odcinki polipeptydu są specyficznie wycinane przez proteazy, a obie domeny A i B są glikozylowane i łączone wiązaniem disiarczkowym (rys. 2) [24]. Gen rycyny powstał przypuszczalnie w wyniku duplikacji pra-genu, na co wskazuje duże podobieństwo struktury podjednostek A i B.

Rycyna występuje m.in. w nasionach rącznika (*Ricinus communis*), a także *Abrius precatorius*. Jest to białko inaktywujące rybosomy *Prokaryota* [7]. Komórki docelowe dla rycyny mają na swej powierzchni glikoproteiny lub glikolipidy zawierające β -D-galaktozę. Są one rozpoznawane przez łańcuch B, który jest lektyną mającą na swej powierzchni dwa miejsca silnie wiążące reszty galaktozy [24]. Po rozpoznaniu receptora następuje internalizacja i transport przez układ endosomalny do aparatu Golgiego. Tu przypuszczalnie ulegają redukcji wiązania disiarczkowe, co umożliwia łańcuchowi A przejście z endosomów do cytozolu (rys. 3). Pojedyncza cząsteczka



Rys. 2. Przemiany cząsteczki proenzymu rycyny w komórkach organizmu syntetyzującego to białko; zaznaczono sekwencję sygnałową zawierającą 24 aminokwasy na N-końcu proenzymu, łańcuch A i B rozdzielony fragmentem łączącym o długości 12 aminokwasów, strzałkami oznaczono miejsca działania proteaz w obrębie potranslacyjnej, podjednostki A i B rycyny połączone są wiązaniem disiarczkowym oraz licznymi wiązaniami hydrofobowymi



Rys. 3. Schemat wnikania rycyny do komórek docelowych: podjednostka B rozpoznaje na powierzchni komórek galaktosę glikoprotein lub glikolipidów, następuje internalizacja rycyny i transport do komórki przez układ endosomalny, w którym zachodzi redukcja wiązania disiarczkowego, odłączenie podjednostek powoduje odsłonięcie regionów niepolarnych w podjednostce A, które ułatwiają jej transport do cytozolu, jednocześnie następuje zmiana konformacji podjednostki A, powodująca ujawnienie się aktywności rybonukleolitycznej

rycyny może zabić komórkę, inaktywując rybosomy z szybkością 1 500–1 777/min [7]. Enzym ten hydrolizuje prokariotyczne 16S i 23S rRNA oraz eukariotyczny 28S rRNA. Strukturą rozpoznawaną przez rycynę jest ramię z pętlą zawierającą sekwencję GAGA (porównaj rozdział α -sarcyna) [7, 28]. Pętla ta, podczas translokacji zachodzącej w czasie wydłużania łańcucha peptydowego, zmienia cyklicznie swą konformację. Jedną z tych konformacji jest przypuszczalnie rozpoznawana przez α -sarcynę, a druga przez rycynę (rys. 1).

Podobna pod względem struktury i funkcji jest grupa bakteryjnych shiga-toksyn (SLTs: *shiga-like toxins*, homologów toksyny z bakterii *Shigella dysenteriae*). Toksyny te zawierają pojedynczą, aktywną katalityczną podjednostkę typu A i liczne (6 do 7) podjednostki typu B, wiążące się ze specyficznymi receptorami komórkowymi [25].

Roślina *Phytolacca americana* zawiera trzy białka zaliczane do RIP I o podobnych właściwościach przeciwwirusowych: PAP, PAP II i PAP-S, występujące odpowiednio w liściach rozwijających się, rozwiniętych i nasionach. Białko PAP występuje

w ścianie komórkowej i na powierzchni błony komórek mezofilu liści i może być łatwo wydzielone z ekstraktów wodnych zmacerowanej tkanki. Spełnia ono funkcję obronną, przeciwwirusową. Przypuszczalnie PAP wnika do wnętrza komórki razem z wirusem i, unieczynniając rybosomy, powoduje zahamowanie biosyntezy białka oraz hamuje replikację wirusa [15, 24]. Pokrycie powierzchni liści innych roślin białkiem PAP całkowicie zabezpiecza je przed przeniesieniem różnych niespokrewnionych wirusów.

Białko PAP hamuje replikację wirusów u roślin i w hodowlach komórek ssaków. Gen PAP wprowadzono do tytoniu (*N. tabacum*) i uzyskano jego ekspresję, co zabezpieczyło rośliny przed chorobami wirusowymi wywoływanymi przez wirusy PVX, PVY (*potato virus X i Y*) i CMV (*cucumber mosaic virus*) [31].

Wirusy mogą działać jako czynnik przenoszący te enzymy z zewnętrznej powierzchni do wnętrza, bądź to razem z częścią błony komórkowej, bądź też wiążąc się z nimi bezpośrednio. Badania mechanizmu wnikania białek PAP do komórki znajdują być może zastosowanie w hodowli roślin odpornych na wirusy. Wiele grzybowych RNaz zachowuje się zgodnie z tym modelem – dostają się do komórki podczas infekcji przez picornawirusy, adenowirusy i wirusa Semliki Forest [31]. Ponadto w hodowlach komórek ssaków PAP hamuje namnażanie wirusów grypy i poliovirusa [31]

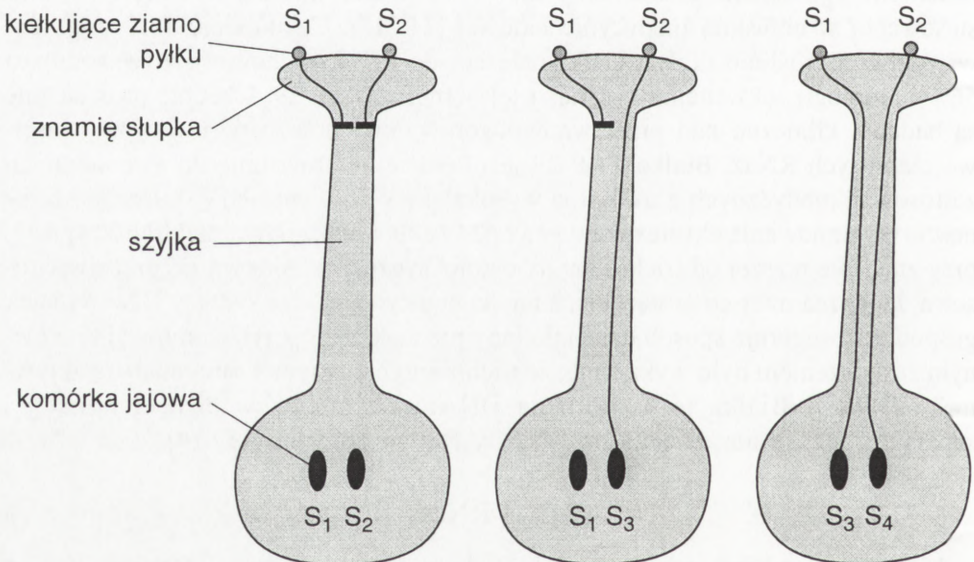
Podobne działanie wykazują abryna (*abrin*), bryodyna (*bryodin*) [31] i trichosantyna GLQ 223 (*trichosantin*) [11, 13]. Szczególnie wiele uwagi poświęca się badaniom tego ostatniego białka, wyizolowanego z rośliny *Trichosantes kirilowii*, stosowanej w chińskiej medycynie ludowej [11, 13]. Czynnikiem aktywnym zawartym w tej roślinie są dwa białka należące do RIP I: trichosantyna (wykazująca 56% homologii sekwencji z rycyną) i jej homolog TAP 29. Obecnie prowadzone są badania kliniczne nad przeciwnowotworowymi i przeciwwirusowymi właściwościami tych RNaz. Białko TAP 29 jest bardziej odpowiednie do ewentualnych zastosowań medycznych z uwagi na wysoką aktywność anty-HIV, mierzoną zdolnością do hamowania ekspresji antygeny p24 i aktywności odwrotnej transkryptazy, przy znacznie niższej od trichosantyny cytotoksyczności. Aktywność przeciwwirusowa, która ma miejsce w stężeniach nie hamujących jeszcze syntezy DNA i białek gospodarza, sugeruje sposób działania inny niż inaktywacja rybosomów [11]. Pewnym zaskoczeniem było wykazanie, że trichosantyna, rycyna i sarcyna mają aktywności DNazy. Białka te hydrolizują DNA występujący w postaci kolistej i superskręconej, a nie działają na DNA w formie liniowej [13, 14].

2.2. S-RNazy

U roślin z rodziny psiankowatych (*Solanaceae*) S-RNazy (*S-RNases*) tworzą układ zabezpieczający przed samozapłodnieniem. Są one produktami przynajmniej 20 alleli [10] jednego genu S [1, 3, 12, 20]. Gen ten umiejscowiony jest w locus

S, w którym występuje kilka genów: pyłkowy, słupkowy i specyficzności, a produktem jednego z nich są RNazy S. Ekspresja glikoprotein kodowanych przez allele genu S zachodzi na znamieniu i w szyjce słupka oraz w łagiewce pyłkowej. Stopień ekspresji genów znajdujących się w locus S w gametoficie żeńskim rośnie wraz z dojrzewaniem kwiatów [2]. Jeżeli w pyłku kielkującym na znamieniu ulega ekspresji taki sam allel, jak jeden z dwóch, które uległy ekspresji w słupku, wzrost łagiewki pyłkowej jest zahamowany i nie dochodzi do zapłodnienia [3, 18, 19, 20, 21, 22] (rys. 4).

S-RNazy to białka zbudowane z około 260 aminokwasów, o masie cząsteczkowej 29 kDa i zawierające 8 reszt cysteiny, N-końcową sekwencję sygnałową oraz miejsca rozpoznające reszty cukrowcowe w N-glikanach. Na podstawie sekwencji aminokwasowej zostały zaliczone do rodziny RNaz T2 [23]. Porównanie sekwencji znanych do tej pory RNaz S pozwoliło wyróżnić w nich pięć ewolucyjnie konserwatywnych domen: C1–C5. Dwie z nich, hydrofobowe C1 i C5, tworzą przypuszczalnie rdzeń enzymu. Z kolei hydrofilowe domeny C2 i C3, zawierające dwie reszty histydyny (funkcja katalityczna), mają sekwencję homologiczną do przypuszczalnego miejsca aktywnego niespecyficznych RNaz tworzących rodzinę T2 i występujących u grzybów (RNaza T2 z *Aspergillus oryzae* i RNaza Rh z *Rhizopus niveus* [1, 30]. U organizmów tak odległych ewolucyjnie, jak bakterie, wirusy oraz owady (*Drosophila*), stwierdzono sekwencje homologiczne do sekwencji C1 i C2, rozdzielone 30–40 resztami aminokwasowymi [1]. Najbardziej zachowawcza część



Rys. 4. Udział S-RNaz w układzie niedopuszczającym do zapłodnienia u roślin kwiatowych; w przypadku obecności takich samych alleli genu S w pyłku i słupku następuje zahamowanie wzrostu łagiewki pyłkowej w wyniku hydrolizy rRNA przez S-RNazy i nie dochodzi do zapłodnienia komórki jajowej

składa się z 33 reszt aminokwasowych, w tym 8 reszt cysteiny. Pozostałe sekwencje wykazują bardzo dużą zmienność.

S-RNazy są enzymami wydzielanymi zewnątrzkomórkowo, a ekspresja ich genu następuje w dojrzałym słupku i w znacznie mniejszym stopniu w rozwijających się ziarnach pyłku [5, 19, 26]. Przypuszczalnie S-RNazy dostają się do wnętrza niezgodnych, czyli identycznych pod względem alleli, łagiewek pyłkowych podczas ich przerastania przez słupek i hydrolizują rRNA. Powoduje to obumarcie łagiewki, gdyż geny rRNA nie ulegają ekspresji w ziarnach pyłku [4, 19, 21]. Analiza rRNA ze słupków roślin zapylanych ziarnami pyłku zgodnego i niezgodnego wykazała, że rRNA z kielkującego pyłku zgodnego (czyli niezgodnego pod względem alleli) był niezhydrolizowany, a z ziaren pyłku zawierającego allele locus S, takie same jak w słupku, został zhydrolizowany. Sposób przedostawania się S-RNazy przez ściany i błony komórkowe nie jest całkowicie poznany [3].

Obecność właściwości katalitycznych w S-RNazach potwierdza też obserwacja, że samopylna odmiana pomidora (*Lycopersicon peruvianum*) nosiła zmutowaną, nieaktywną formę enzymu [26].

RNazy homologiczne do S-RNazy z *N. alata* stwierdzono u petunii, ziemniaka i pomidora [18]. W tytoniu S-RNazy występują w bardzo małych ilościach i przypuszczalnie właśnie dzięki temu możliwe jest u tej rośliny samozapłodnienie. Homologiczne glikoproteiny stwierdzono u jabłoni (*Malus domestica*) i czereśni (*Prunus avium*) [1].

W roślinach transgenicznych, syntetyzujących S-RNazę nieaktywną katalitycznie, dochodziło do samozapłodnienia. Podobnie pyłek z tym samym allelem genu S, który w słupku zapładniał komórki jajowe, jeżeli w gametoficie następowała ekspresja RNA antysensownego do genu S-RNazy [12, 21]. Z kolei ekspresja takiego allelu S-RNazy w roślinie transgenicznej, w której normalnie on nie występował, powoduje odrzucenie pyłku zawierającego taki sam allel, podczas gdy w roślinie nietransformowanej pyłek nie był odrzucany. Oznacza to, że S-RNaza jest wystarczającym czynnikiem do odrzucenia izoallelicznego pyłku, zapobiegając samozapłodnieniu [20].

Funkcja kontrolna S-RNazy jest ewolucyjnie nowa, a enzymy o bardzo podobnej budowie i właściwościach biorą udział w metabolizmie RNA. Dowiedziono, że ich aktywność wzrasta szczególnie w procesach dojrzewania, starzenia i niedoboru fosforanów [29].

Zjawisko samosterylności zwiększa genetyczną zmienność roślin i ułatwia ich dostosowanie się do środowiska [12, 18], jednak w hodowli roślin jest czynnikiem negatywnym. W sadach w klimacie umiarkowanym większość drzew jest samosterylna częściowo lub całkowicie. Powoduje to konieczność sadzenia, oprócz głównej odmiany towarowej, drzew – zapylaczy (w ilości około 10% wszystkich drzew). Ich owoce są często niższej jakości niż głównej rośliny uprawowej. Sądzi się, że wyeliminowanie samosterylności w odmianach towarowych pozwoliłoby na upra-

wy jednodmianowe, dające wyższy plon z jednostki powierzchni uprawy [1, 32]. Czynnikiem powodującym bezpłodność są również S-RNazy. W celach hodowlanych u tytoniu i rzepaku uzyskano rośliny męskosterylne, dzięki wprowadzeniu do roślin skonstruowanych w tym celu genów-hybryd. Geny te złożone są z genu kodującego RNazę (T1 z *Aspergillus oryzae* lub barnazy z *Bacillus amyloliquefaciens*) i promotora powodującego ekspresję kontrolowanego przez siebie genu w tapetum – warstwie wyścielającej woreczek pyłkowy. Ponieważ gen ten ulega ekspresji tylko w tapetum, następuje zniszczenie wyłącznie tej tkanki i nie dochodzi do wytworzenia pyłku. Przekształcone w ten sposób rośliny, zawierające geny-hybrydy, mają wiele cennych właściwości hodowlanych.

UWAGI KOŃCOWE

Cechą wspólną omówionych Rysbaz pochodzących z drobnoustrojów i roślin kwiatowych jest ich cytotoksyczność. Wszystkie te białka wykazują specyficzną aktywność rybonukleolityczną w stosunku do różnych rodzajów rRNA. Skutkiem tej aktywności enzymatycznej jest unieczynnianie rybosomów, co biologicznie manifestuje się, zależnie od pochodzenia Rysbazy bądź zwalczaniem konkurencyjnych komórek (Kolicyny), bądź działaniem przeciwwirusowym (RIP) lub ochroną przed samozapłodnieniem (S-RNazy).

Enzymy te są wydzielane zewnątrzkomórkowo, a ich przedostawanie się przez osłony lub błony do komórek docelowych jest niedostatecznie wyjaśnione. Zagadnienie to jest bardzo istotne ze względu na możliwość zastosowania Rysbaz w celach praktycznych, np. wyhodowaniu roślin odpornych na wirusy i ich odmian samosterylnych oraz wykorzystaniu ich właściwości przeciwnowotworowych i antywirusowych (HIV) w terapii.

LITERATURA

- [1] BROOThAERTS W, JANSSENS GA, PROOST P, BROEKAERT WF. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. *Plant Mol Biol* 1995; **27**: 499–511.
- [2] CAPPADOCIA M, HEIZMANN P, DUMAS C. Tissue printing and its applications in self-incompatibility studies. *Plant Mol Biol* 1993; **23**: 1079–1085.
- [3] CLARKE AE, NEWBIGIN E. Molecular aspects of self-incompatibility in flowering plants. *Annu Rev Genet* 1993; **27**: 257–279.
- [4] D'ALESSIO G. New and cryptic biological messages from RNases. *Trends Cell Biol* 1993; **3**: 106–109.

- [5] DODDS PN, BÖNIG I, HE DU, RÖDIN J, ANDERSON MA, NEWBIGIN E, CLARKE A E. S-RNase gene of *Nicotiana alata* is expressed in developing pollen. *Plant Cell* 1993; **5**: 1771–1782.
- [6] ELZEN VAN DEN PJ, WALTERS HH, VELTKAMP E, NIJKAMP HJ. Molecular structure and function of the bacteriocin gene and bacteriocin protein of plasmid Clo DF13. *Nucl Acids Res* 1983; **11**: 2465–2477.
- [7] GLÜCK A, ENDO Y, WOOL IG. Ribosomal RNA identity elements for Ricin A-chain recognition and catalysis. Analysis with tetraloop mutants. *J Mol Biol* 1992; **226**: 411–424.
- [8] GLÜCK A, ENDO Y, WOOL IG. The ribosomal RNA identity elements for ricin and for a-sarcin: mutations in the putative CG pair that closes a GAGA tetraloop. *Nucl Acids Res* 1994; **22**: 321–324.
- [9] JERMANN TM, OPITZ JG, STACKHOUSE J, BENNER SA. Reconstructing the evolutionary history of the artidactyl ribonuclease superfamily. *Nature* 1995; **374**: 57–59.
- [10] LACADENA J, MANCHEO JM, MARTINEZ-RUIZ A, MARTINEZ DEL POZO A, GASSET M, OÑADERRA M, GAVILANES JG. Substitution of histidine-137 by glutamine abolishes the catalytic activity of the ribosome-inactivating protein α -sarcin. *Biochem J* 1995; **309**: 581–586.
- [11] LEE-HUANG S, HUANG PL, HSIANG-FU KUNG, BAO-QUN LI, HUANG PL, HUANG P, HUANG HI, HAO-CHIA CHEN. TAP 29: An anti-human immunodeficiency virus protein from *Trichosanthes kirilowii* that is nontoxic to intact cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 6570–6574.
- [12] LEE HYUN-SOOK, HUANG S, KAO TEH-HUI. Sproteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature* 1994; **367**: 560–563.
- [13] LI M-X, YEUNG H-W, LIAN-PING PAN, CHAN SI. Trichosanthin, a potent HIV-1 inhibitor, can cleave supercoiled DNA *in vitro*. *Nucl Acids Res* 1991; **19**: 6309–6312.
- [14] LING J, WANG YL, WANG TP. Cleavage of supercoiled double-stranded DNA by several ribosome-inactivating proteins *in vitro*. *FEBS Lett* 1994; **345**: 143–146.
- [15] LODGE JK, KANIEWSKI WK, TUMER NE. Broad-spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 7089–7093.
- [16] MANCHEÑO JM, GASSET M, LACADENA J, MARTINEZ DEL POZO A, OÑADERRA M, GAVILANES JG. Predictive study of the conformation of the cytotoxic protein α -sarcin: A structural model to explain α -sarcin-membrane interaction. *J Theor Biol* 1995; **172**: 259–267.
- [17] MARCHANT A, HARTLEY MR. Mutational studies on the α -sarcin loop of *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA. *Eur J Biochem* 1994; **226**: 141–147.
- [18] MATTON DP, NASS N, CLARKE AE, NEWBIGIN E. Self-incompatibility: How plants avoid illegitimate offspring. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 1992–1997.
- [19] MATTON DP, MAU S-L, OKAMOTO S, CLARKE AE, NEWBIGIN E. The S-locus of *Nicotiana alata*: genomic organization and sequence analysis of two S-RNase alleles. *Plant Mol Biol* 1995; **28**: 847–858.
- [20] MURFETT J, ATHERTON TL, MOU B, GASSER CS, McCLURE BA. S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S-allele-specific pollen rejection. *Nature* 1994; **367**: 563–566.
- [21] MURFETT J, BOURQUE JE, McCLURE B A. Antisense suppression of S-RNase expression in *Nicotiana* using RNA polymerase II- and III-transcribed gene constructs. *Plant Mol Biol* 1995; **29**: 201–212.
- [22] MURFETT J, EBERT PR, HARING V, CLARKE AE. An S-RNase promoter from *Nicotiana alata* functions in transgenic *N. alata* plants but not *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol Biol* 1995; **28**: 957–963.
- [23] OHGI K, TAKEUCHI M, IWAMA M, IRIE M. Enzymatic properties of mutant enzymes at Trp49 and Tyr57 of RNase Rh from *Rhizopus niveus*. *J Biochem* 1996; **119**: 9–15.
- [24] PERENTESIS JP, MILLER SP, BODLEY JW. Protein toxin inhibitors of protein synthesis. *BioFactors* 1992; **3**: 173–184.

- [25] REISBIG R, OLSNES S, EIKLID K. The cytotoxic activity of *Shigella* toxin. Evidence for catalytic inactivation of the 60S ribosomal subunit. *J Biol Chem* 1981; **256**: 8739–8744.
- [26] ROYO J, KUNZ C, KOWYAMA Y, ANDERSON M, CLARKE A, NEWBIGIN E. Loss of a histidine residue at the active site of S-locus ribonuclease is associated with self-compatibility in *Lycopersicon peruvianum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 6511–6514.
- [27] SONCIN F. Angiogenin supports endothelial and fibroblast cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 2232–2236.
- [28] SZEWCZAK AA, MOORE PB, CHAN Y-L, WOOL IG. The conformation of the sarcin/ricin loop from 28S ribosomal RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 9581–9585.
- [29] TAYLOR CB, BARIOLA PA, Del CARDAYRE SB, RAINES RT, GREEN PJ. RNS2: A senescence-associated RNase of *Arabidopsis* that diverged from the S-RNases before speciation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 5118–5122.
- [30] YOULE RJ, NEWTON D, WU Y-N, GADINA M, RYBAK SM. Cytotoxic ribonucleases and chimeras in cancer therapy. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 1993; **10**: 1–28.
- [31] YOULE RJ, WU Y-N, MIKULSKI SM, SHOGEN K, HAMILTON RS, NEWTON D, D'ALESSIO G, GRAVELL M. RNase inhibition of human immunodeficiency virus infection of H9 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 6012–6016.
- [32] Informacja bieżąca 1997; Internet, <http://www.protein.osaka-u.ac.jp/chemistry/kagaku-e.html>

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 14.07. 1997 r.

Przyjęto: 25.08. 1997 r.

Adres autora: ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań,

ROZPAD APARATU FOTOSYNTETYCZNEGO W TRAKCIE STARZENIA SIĘ LIŚCI

THE DECOMPOSITION OF PHOTOSYNTHETIC APPARATUS DURING THE SENESCENCE OF LEAVES

Grzegorz JACKOWSKI

Zakład Fizjologii Roślin, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Poznań

Streszczenie: Starzenie jest końcową fazą ontogenezy liści, bezpośrednio poprzedzającą ich śmierć i opadanie. W toku starzenia następują zmiany degeneracyjne ultrastruktury szeregu organelli komórkowych, jednak procesy degradacji zachodzą na największą skalę w chloroplastach. Zanikanie wielu białek chloroplastowych oraz barwników fotosyntetycznych prowadzi do całkowitego rozpadu aparatu fotosyntetycznego. Masowemu zanikaniu składników chloroplastów towarzyszy indukcja ekspresji starzeniowo-specyficznych białek, produktów starzeniowo-specyficznych genów. W ostatnich latach zgromadzono wiele nowych danych dotyczących mechanizmów zanikania i degradacji ważnych białek chloroplastowych i chlorofilu, a także scharakteryzowano niektóre starzeniowo-specyficzne geny.

Słowa kluczowe: starzenie, liść, chloroplast, błona tylakoidowa, degradacja, zanikanie, białko, chlorofil, programowana śmierć komórkowa

Summary: Senescence is a final phase of leaf ontogenesis that occurs just prior to the leaves death and abscission. During the course of senescence numerous subcellular organelles show signs of deterioration but the most evident decomposition events take place inside chloroplasts. The disappearance and degradation of many chloroplast proteins and photosynthetic pigments results in a total disruption of photosynthetic machinery. The massive degradation is accompanied by the increase in abundance of senescence-associated proteins, the products of senescence-associated genes. In the last few years considerable progress has been achieved with regard to the mechanisms underlying the disappearance and degradation of seminal chloroplast proteins and chlorophyll. Some senescence-associated genes have been characterized.

Key words: senescence, leaf, chloroplast, thylakoid membrane, degradation, disappearance, protein, chlorophyll, programmed cell death

WSTĘP

Końcową fazę ontogenezy liścia stanowi jego starzenie. W komórkach starzejących się liści dochodzi do poważnych zmian ekspresji genów i przebiegu procesów metabolicznych, których konsekwencją jest rozpad struktur subkomórkowych, a w końcu śmierć i opadanie liścia. Metabolity i związki odżywcze nagromadzone w liściu w trakcie wcześniejszych faz jego ontogenezy są podczas starzenia hydrolizowane, a produkty hydrolizy wycofywane i wykorzystywane do budowy struktur innych organów, dopiero wkraczających w fazę wzrostu lub dojrzałości, np. młodszych liści, kwiatów, owoców czy nasion. Liście mogą wkraczać w fazę starzenia w odpowiedzi na abiotyczne i biotyczne sygnały środowiskowe, takie jak zacienienie lub ciemność, wysoka dawka światła, deficyt substancji mineralnych w glebie, susza, a także atak organizmu patogennego [7,39,54]. Jeśli takie sygnały nie napływają, liście wchodzi w fazę starzenia po osiągnięciu określonego wieku [25], a pojawieniem się syndromu starzeniowego sterują regulatory wzrostu. Są wśród nich zarówno liczne substancje promujące starzenie, np. kwas jasmonowy i jego pochodne, etylen oraz kwas abscysynowy [4,49,52], jak i regulatory o aktywności antystarzeniowej, a mianowicie cytokininy i ich rybozydy [40,41]. W przypadku dobrze rozpoznanego modelu starzenia się liści soi ustalono, że do inicjacji starzenia dochodzi w rezultacie zmniejszenia się strumienia rybozydu dwuhydrozeatyny docierającego z korzeni do liścia. Niezbędne jest także odebranie przez liść pozytywnego sygnału starzeniowego, którego źródłem – podobnie jak sygnału obniżającego poziom cytokininy w korzeniach – są nasiona dojrzewające w strąku [41]. Natura chemiczna cząsteczek sygnałnych produkowanych przez nasiona nie została jeszcze wyjaśniona.

Starzeniu się liści towarzyszą liczne degeneracyjne zmiany ultrastruktury organelli, zwłaszcza błon, jednak procesy rozpadu są najlepiej widoczne w chloroplastach. Są one konsekwencją degradacji wielu elementów aparatu fotosyntetycznego, tzn. białek, lipidów i barwników fotosyntetycznych; jednym z najbardziej charakterystycznych symptomów starzenia liścia jest jego żółknięcie, spowodowane intensywnym katabolizmem chlorofilu [34]. W przebiegu starzenia w chloroplastach dominują procesy rozpadu i degradacji, ale starzenie jest sekwencją wydarzeń obejmującą nie tylko zanikanie różnych składników aparatu fotosyntetycznego, ale i wybiórczą ekspresję specyficznych genów i białek [54]. W ciągu ostatnich kilku lat uzyskano wiele nowych danych dotyczących kinetyki i mechanizmów zanikania białek strukturalnych i enzymatycznych chloroplastu oraz zidentyfikowano niektóre spośród genów indukowanych specyficznie w toku procesów starzeniowych [13,42]. Jednocześnie osiągnięto zasadniczy przełom w badaniach nad enzymatyką i wewnątrzchloroplastową kompartmentacją towarzyszącego starzeniu szlaku katabolizmu chlorofilu [12]. Przedmiotem niniejszego opracowania jest przegląd tych dokonań.

ZANIKANIE BIAŁEK CHLOROPLASTOWYCH

W trakcie starzenia liści stwierdza się spadek poziomu bardzo znacznej liczby białek chloroplastowych, czemu towarzyszy obniżanie się wydajności procesów fotosyntetycznych wyrażające się, między innymi, spadkiem intensywności produkcji tlenu i asymilacji CO₂ [53]. Zanikanie białek chloroplastowych jest procesem o kluczowym znaczeniu dla realizacji ontogenetycznej funkcji starzenia, jaką jest odżywianie młodych organów produktami hydrolizy makromolekuł pochodzących ze starzejących się liści. Szacuje się, że ok. 90% puli azotu odprowadzanego ze starzejącego się liścia stanowi azot pochodzenia chloroplastowego. Większość tej puli jest wykorzystywana dla syntezy *de novo* aparatu fotosyntetycznego młodego liścia [33]. Wyniki wielu doświadczeń sugerują, że główną przyczyną spadku intensywności fotosyntezy w starzejących się liściach jest spadek poziomu karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-bisfosforanu (RuBP) [14], stanowiącej u niektórych gatunków ok. 50% rozpuszczalnego białka liści [5]. Również inne, operujące w stromie, białka enzymatyczne związane z fazą ciemniową fotosyntezy zanikają lub tracą aktywność wraz z postęпами procesu starzenia; dotyczy to np. dehydrogenazy triozofosforanowej [18] i kinazy rybulozo-5-fosforanu [5,6]. Bardzo wyraźnie spada, mierzony immunologicznie, poziom białek błon tylakoidowych zaangażowanych w fotosyntetyczny transport elektronów i fotofosforylację. Dane potwierdzające tę prawidłowość uzyskano w przypadku cytochromu f [18, 21, 33] oraz polipeptydów α i β podjednostki CF₁ syntazy ATP. Spada także poziom polipeptydów głównej anteny energetycznej PSII – LHCI [19, 21, 23, 33] oraz polipeptydów wewnętrznych anten energetycznych i rdzenia centrum reakcji PSII i PSI [43]. Tempo spadku poszczególnych polipeptydów LHCI (LHCPI) jest niejednakowe, co jest przyczyną tego, że już po krótkich czasach starzenia w liściach jęczmienia stwierdza się zmienione, w porównaniu do liści nie starzejących się, stosunki stechiometryczne tych polipeptydów [23]. Konsekwencją zmian stosunków stechiometrycznych wiążących LHCPI są modyfikacje struktury LHCI na poziomie trimerycznych subkompleksów, wyrażające się spadkiem względnej reprezentacji subkompleksów wzbogaconych w szybciej zanikające LHCPI [23]. Wielu badaczy uważa, że poziom LHCPI, niezależnie od wewnętrznego zróżnicowania kinetyki ich zaniku, spada w starzejących się liściach wolniej niż poziom wewnętrznych anten energetycznych PSII – kompleksów chlorofil a - białko CP47 i CP43, a dowodzić tego mają liczne obserwacje pośrednie, wskazujące, że postępowi starzenia towarzyszy spadek stosunku ilościowego chlorofil a/ chlorofil b w błonach tylakoidowych [19, 33, 46]. Pogląd ten musi jednak budzić poważne wątpliwości, ponieważ trudno sobie wyobrazić, w jaki sposób mogłyby utrzymywać integralność strukturalną cząstki fotosystemu II (PSII) zawierające zlokalizowany peryferycznie LHCI, natomiast pozbawione rdzenia (CP47 + CP43). Ponadto intensywniejsza

kinetyka zaniku polipeptydów CP47 i CP43 (psbB/psbC) wobec LHCP II nigdy nie została udowodniona bezpośrednio [22, 43]. Oznaczenia zmian stosunku stechiometrycznego chlorofil a/chlorofil b oczyszczonych cząstek PSII sugerują, że mamy raczej do czynienia z sytuacją odwrotną, tzn. LHCP II zanikają szybciej niż psbB/psbC [22]. Spadek stosunku chlorofil a/ chlorofil b stwierdzany dla całkowitych błon tylakoidowych może zatem odzwierciedlać np. wyższe tempo zaniku fotosystemu I (PSI) w porównaniu do PSII; w starzejących się liściach fasoli i ryżu PSI zanika rzeczywiście szybciej niż PSII [29].

W przypadku karboksylazy/oksygenazy RuBP, LHCP II oraz cytochromu f udowodniono, że równoległe ze spadkiem mierzonego immunologicznie poziomu tych białek w starzejących się liściach jęczmienia i fasoli ma miejsce spadek ekspresji sekwencji kodujących te białka [1,21], co dowodzi, że starzeniowo-specyficzny zanik tych ważnych białek chloroplastowych jest regulowany na poziomie transkrypcji. Z kolei zawartość białka psbA (dawniej określanego jako D1) jest regulowana na poziomie stabilności (degradacji) białka, na co wskazuje obserwacja, iż poziom psbA spada do zera już na bardzo wczesnych etapach starzenia liści, mimo iż transkrypty DNA kodującego to białko są wykrywalne aż do ostatnich faz starzenia [21]. Nie jest wykluczone, że zanik karboksylazy/oksygenazy RuBP jest częściowo regulowany na poziomie posttranskrypcyjnym (być może przez degradację), ponieważ w toku starzenia się liści jęczmienia kinetyka zaniku tego białka nie jest ściśle skorelowana z kinetyką spadku ekspresji sekwencji kodujących [21]. Co ciekawe, wydaje się że duża i mała podjednostka enzymu zanikają w toku starzenia w niejednakowym tempie [21, 55]. Jeśli rzeczywiście poziom karboksylazy/oksygenazy RuBP może być, przynajmniej częściowo, regulowany poprzez jego degradację, to pojawia się interesujące pytanie: jak wytłumaczyć niejednakowe tempo degradacji podjednostek operujących przecież jako holokompleks w tym samym przedziale chloroplastu (stromie) i w jednakowym stopniu dostępnych dla proteaz? Nie jest wykluczone, że odpowiedzią na to pytanie jest istnienie odrębnych enzymów proteolitycznych, trawiących starzeniowo-specyficznie podjednostki enzymu z niejednakową wydajnością. W stromie chloroplastów grochu wykryto co prawda metaloproteazę (zależną od Zn^{2+}), zdolną do trawienia dużej podjednostki karboksylazy/oksygenazy RuBP, a jednocześnie niezdolną do hydrolizy mniejszej podjednostki [3, 57], jednak na razie nie ma żadnych danych na temat ewentualnej starzeniowo-specyficznej ekspresji tej proteazy. Starzeniowo-specyficzny wzrost aktywności stwierdza się natomiast u licznych gatunków roślin dla innych proteaz, trawiących szersze spektrum substratów, np. endopeptydaz [8]. Wzrost ten może być skutkiem aktywacji transkrypcji odpowiednich genów – u *Arabidopsis* i kukurydzy już na wczesnych etapach starzenia pojawiają się, nieobecne w dojrzałych liściach, transkrypty sekwencji homologicznych do sekwencji zwierzęcych i roślinnych proteaz cysteinowych [17, 32, 50]. Aktywacja transkrypcji genów proteaz cysteinowych jest jednym z przykładów potwierdzających tezę, iż

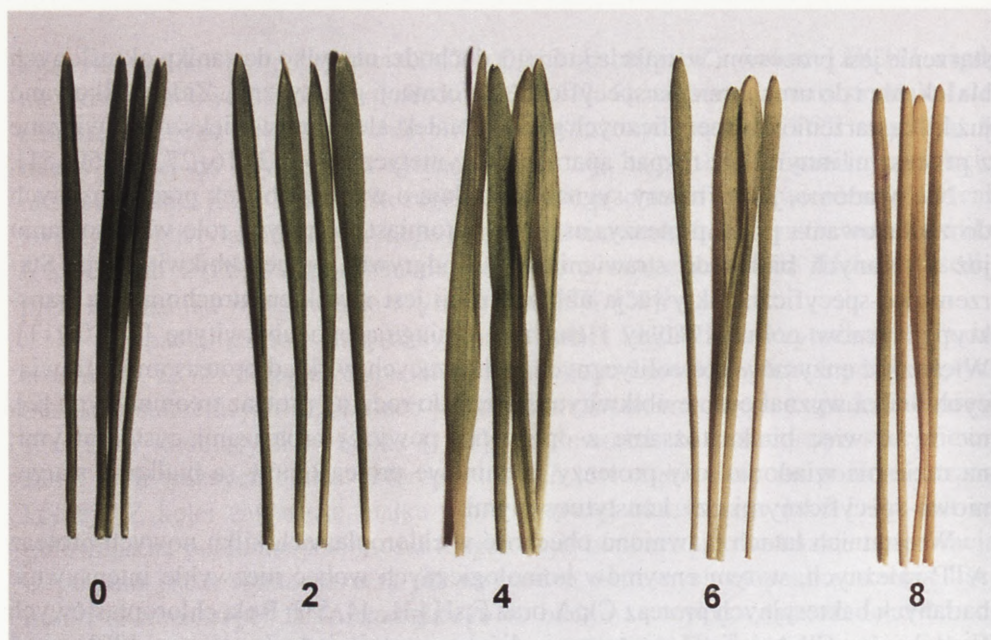
starzenie jest procesem, w trakcie którego dochodzi nie tylko do zaniku określonych białek, ale i do uruchomienia specyficznej informacji genetycznej. Zidentyfikowano już kilka starzeniowo-specyficznych genów i białek, ale są one w większości związane z procesami innymi niż rozpad aparatu fotosyntetycznego [13, 16, 27, 42, 50, 51].

Nie wiadomo, jakiej natury sygnały decydują o wyborze białek przeznaczonych do zaatakowania przez proteazy, ustalono natomiast, że pewną rolę w kierowaniu już wybranych białek do strawienia może odgrywać proces ubikwitynacji. Starzeniowo-specyficzna aktywacja ubikwitynacji jest wynikiem uruchomienia transkrypcji genów poliubikwityny i enzymu koniugującego ubikwitynę [2, 10, 11]. Większość enzymów proteolitycznych wchodzących w skład proteasomów trawiących białka wyznakowane ubikwityną należy do rodziny proteaz treoninowych [2], nie są to więc białka tożsame z opisanymi powyżej proteazami cysteinowymi; na razie nie wiadomo, czy proteazy treoninowe proteasomów są białkami starzeniowo-specyficznymi czy konstytutywnymi.

W ostatnich latach ujawniono obecność w chloroplastach kilku nowych proteaz ATP-zależnych, w tym enzymów homologicznych wobec niezwykle intensywnie badanych bakteryjnych proteaz ClpA oraz FtsH [31, 44, 57]. Rola chloroplastowych homologów ClpA i FtsH w starzeniu liści pozostaje jednak niejasna [20].

DEGRADACJA CHLOROFILU

Degradacja chlorofilu i będące jej konsekwencją żółknięcie liści (rys. 1) jest znanym od dziesięcioleci objawem starzenia, jednak pierwsze informacje dotyczące szlaku katabolizmu chlorofilu w starzejących się tkankach uzyskano dopiero w ciągu ostatnich kilku lat. Degradację chlorofilu zawsze poprzedza obniżenie tempa jego biosyntezy, ale nie ustalono jeszcze, których enzymów biosyntetycznych dotyczy obniżenie ekspresji i na jakim poziomie biosyntezy białka zachodzą procesy regulacyjne [12]. Pierwszym etapem degradacji chlorofilu najprawdopodobniej jest enzymatyczne odcięcie łańcucha fitolu i przekształcenie w ten sposób chlorofilu w chlorofilid. Reakcję tę katalizuje chlorofilaza, enzym uczestniczący także w procesie syntezy chlorofilu [12]. Uwolniony fitol podlega w obecności singletowego tlenu oraz rodników ponadtlenkowych dalszym procesom degradacyjnym, a ich produktami są liczne izoprenoidy, dokładnie scharakteryzowane w przypadku starzejących się liści owsa i pietruszki [45]. Dalsze losy tych izoprenoidów pozostają nieznane. Drugi produkt defitylacji chlorofilu – chlorofilid ulega natomiast procesowi dechelatacji, tzn. odszczepienia Mg^{2+} . Produktem reakcji jest feoforbid, a katalizuje ją dechelataza, enzym opisany z chloroplastów rzepaku [30]. Odszczepienie reszty alkoholu metylowego estryfikującej pierścień karboksycykliczny związany z III pierścieniem pirolowym może być kolejnym etapem degradacji. W wyniku



Rys. 1. Degradacja chlorofilu w starzejących się liściach jęczmienia. W źdźbłach dziesięciodniowych siewek jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.) indukowano procesy starzenia przez odcięcie od rośliny macierzystej i inkubację w ciemności, w zlewkach z wodą, przez 0–8 dni

tego procesu mogłaby powstawać porfiryna o nazwie pirofeoforbid [12], a dalsze etapy procesów katabolicznych obejmowałyby degradację szkieletu porfiryнового. Większość badaczy uważa jednak, że już na etapie feoforbidu następuje rozpad szkieletu porfiryнового, a pierwszy etap rozpadu ma katalizować enzym roboczo nazwany dioksygenazą feoforbidu, opisany z chloroplastów starzejących się liści jęczmienia [36, 48]. Produkt dioksygenacji feoforbidu jest już związkiem bezbarwnym, podobnie jak wszystkie dalsze metabolity chlorofilu. Udowodniono, że dioksygenaza jest białkiem starzeniowo-specyficznym, pojawiającym się dopiero w starzejących się chloroplastach [47]. Czynnikiem aktywującym dioksygenazę jest zredukowana ferredoksyna [48]. Obserwacja ta interesująco koreluje z faktem, że w trakcie starzenia liści kukurydzy następuje specyficzna aktywacja ekspresji genu kodującego białko o wysokim stopniu homologii sekwencyjnej do ferredoksyny [50]. W przeciwieństwie do dioksygenazy feoforbidu, chlorofilaza i dechelataza są konstytutywnymi enzymami chloroplastowymi [47], udowodniono jednak, że chloroplasty liści nie starzejących się zawierają nieaktywną formę obu enzymów. Starzeniowo-specyficzna aktywacja chlorofilazy i dechelatazy wymaga nie zakłóconej syntezy na rybosomach cytoplazmatycznych jakiegoś, nieznanego jeszcze, czynnika regulacyjnego [56].

Wszystkie trzy scharakteryzowane dotąd enzymy katabolizmu chlorofilu – chlorofilaza, dechelataza i dioksygenaza – są zlokalizowane w otoczce chloroplastowej [36, 37]. Jest to fakt zaskakujący, zważywszy, że chlorofil pozostaje, w formie kompleksów barwnikowo-białkowych, wyłącznie w błonach tylakoidowych. Niektórzy badacze sugerują, że cząsteczki chlorofilu, oddysocjowawszy na wczesnych etapach starzenia od wiążących je białek, są transportowane przez jakieś starzeniowo-specyficzne białko do miejsca degradacji, tj. otoczki chloroplastowej [37].

Dlaczego w ogóle chlorofil jest degradowany w trakcie starzenia? Takie pytanie jest, wbrew pozorom, zupełnie uzasadnione. O ile bowiem związki zawierające azot uwolniony z degradowanych białek starzejących się liści są bardzo istotnym budulcem dla młodych organów rośliny, o tyle azot zawarty w cząsteczkach chlorofilu stanowi w skali liścia zaledwie 3–5% puli azotu pochodzenia białkowego [35], trudno zatem mówić o istotnej roli troficzej azotu chlorofilowego. Sądzi się, że katabolizm chlorofilu jest strategią ochrony przed niebezpieczeństwami wynikającymi z pojawienia się w chloroplastach tego związku w wolnej chemicznie postaci, po oddysocjowaniu w trakcie starzenia od wiążących go białek. Niezwiązany w formie kompleksów barwnikowo-białkowych chlorofil staje się cząsteczką fotodynamiczną, która może, w obecności tlenu tripletowego ($^3\text{O}_2$), generować tlen singletowy ($^1\text{O}_2$), czynnik o wielkiej sile destrukcji wobec środowiska komórkowego (zdolny do inicjowania peroksydacji lipidów błonowych, niekontrolowanej degradacji białek itp.) Niekontrolowana destrukcja różnych komponentów komórkowych spowodowana obecnością $^1\text{O}_2$ mogłaby skutecznie zaburzyć przebieg procesu starzenia, który – choć obejmuje głównie procesy degradacji – jest degradacją kontrolowaną, uzależnioną do niezakłóconej biosyntezy białka, metabolizmu pośredniego i produkcji energii metabolicznej [35].

Równoległe z rozkładem chlorofilu w starzejących się liściach degradowane są karotenoidy, tempo ich destrukcji jest jednak wyraźnie niższe od tempa destrukcji chlorofilu i właśnie ta okoliczność oraz fakt, że już po kilku reakcjach katabolicznych chlorofil przekształcany jest w bezbarwne pochodne, decyduje o przebarwieniu starzejących się liści na żółto [12]. Czerwona lub purpurowa barwa starzejących się liści niektórych gatunków roślin jest natomiast konsekwencją intensywnej syntezy antocyjanów i tanin [12].

Zanikanie białek i barwników fotosyntetycznych prowadzi do poważnych zmian w ultrastrukturze chloroplastów. Zmiany te zostały dokładnie rozpoznane i wyczerpująco opisane ponad dwadzieścia lat temu, ultrastruktura chloroplastów starzejących się liści jest więc dziedziną badań nad procesami starzenia, w której nie obserwuje się już znaczącego przyrostu nowych faktów. We wczesnych fazach starzenia liści dochodzi do stopniowego rozpadu tylakoidów stromy, a następnie tylakoidów gran. Etapem przejściowym w procesie degeneracji systemu tylakoidowego może być u niektórych gatunków pojawianie się wydłużonych, luźno ułożonych tylakoidów lub gęsto upakowanych gran olbrzymich. Zanikowi systemu

tylakoidów towarzyszy rozpad ziaren skrobi. Na zaawansowanych etapach destrukcji systemu tylakoidowego w stromie chloroplastowej pojawia się znaczna ilość sudano- i osmofilnych globuli, nazywanych plastoglobulami. Są one miejscem akumulacji produktów degradacji karotenoidów (np. estrowych pochodnych karotenoidów) oraz plastochinonów i wolnych kwasów tłuszczowych [12]. Ostatecznym rezultatem postępującej degeneracji chloroplastów jest pęknięcie otoczki i uwolnienie resztek treści organelum do środowiska wewnątrzkomórkowego [15].

CZY STARZENIE SIĘ LIŚCI JEST ROŚLINNYM PRZYKŁADEM PROGRAMOWANEJ ŚMIERCI KOMÓRKOWEJ?

Od kilku lat wiadomo, że rośliny są zdolne do uruchamiania w pewnych sytuacjach programowanej śmierci komórkowej (PCD), której przebieg, zarówno na poziomie cytologicznym jak i biochemicznym, nawiązuje do scenariusza zwierzęcej PCD [24, 26]. Najlepiej poznanym spośród procesów uważanych za roślinne analogi zwierzęcej PCD jest odpowiedź lokalna (superczuła) roślin na atak patogenu, polegająca na kontrolowanym obumieraniu grupy komórek zaatakowanych przez szkodnika i ich usuwaniu, wraz z patogenem, poza obręb tkanki. Podobieństwo odpowiedzi lokalnej do zwierzęcej PCD jest wielorakie i dotyczy np. istotnej roli, jaką odgrywa w obydwu przypadkach wybuchowa produkcja reaktywnych form tlenu [28]. Również niektóre roślinne procesy embriogenetyczne i histogenetyczne korespondują ze zwierzęcą PCD przez istotną rolę degradacji DNA jądrowego czy indukcji proteaz cysteinowych [38]. Jak już wspomniano, w przebiegu starzenia liści stwierdza się indukcję ekspresji białek o wysokiej homologii sekwencyjnej wobec proteaz cysteinowych [32, 50], a także akumulację agresywnych metabolicznie form tlenu w chloroplastach [45]. Obserwacje te są podstawą do wysuwania przez niektóre zespoły sugestii, iż starzenie się liści jest jedną z roślinnych wersji PCD [9].

LITERATURA

- [1] BATE NJ, ROTHSTEIN SJ, THOMPSON JE. Expression of nuclear and chloroplast photosynthesis-specific genes during leaf senescence. *J Exp Bot* 1991; **42**: 801–811.
- [2] BELKNAP WR, GARBARINO JE. The role of ubiquitin in plant senescence and stress responses. *Trends in Plant Sci* 1996; **1**: 331–335.
- [3] BUSHNELL TP, BUSHNELL D, JAGENDORF P. A purified zinc protease of pea chloroplasts, EPI, degrades the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Physiol* 1993; **103**: 585–591.
- [4] CHOU CM, KAO CH. Methyl jasmonate, calcium, and leaf senescence in rice. *Plant Physiol* 1992; **99**: 1693–694.

- [5] CRAFTS-BRANDNER SJ, SALVUCCI ME, EGLI DB. Changes in ribulosephosphate carboxylase/oxygenase and ribulose-5-phosphate kinase abundances and photosynthetic capacity during leaf senescence. *Photosynth Res* 1990; **23**: 223–230.
- [6] FISCHER A, FELLER U. Senescence and protein degradation in leaf segments of young winter wheat. *J Exp Bot* 1994; **270**: 103–109.
- [7] FOYER CH, LELANDAIS M, KUNERT KJ. Photooxidative stress in plants. *Physiol Plant* 1994; **92**: 696–717.
- [8] FROHLICH V, FELLER V. Effect of phloem interruption on endopeptidase and aminopeptidase activities in flag leaves of field-grown wheat. *Biochim Physiol Pflanzen* 1992; **188**: 13–21.
- [9] GAN, AMASINO RM. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* 1995; **270**: 1986–1988.
- [10] GARBARINO JE, OOSUMI T, BELKNAP WR. Isolation of a polyubiquitin promoter and its expression in transgenic potato plants. *Plant Physiol* 1995; **109**: 1371–1378.
- [11] GENSCHLIK P, DURR A, FLECK J. Differential expression of several E2-type ubiquitin carrier protein genes at different developmental stages in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana sylvestris*. *Mol Gen Genet* 1994; **244**: 548–555.
- [12] GOSSAUER A, ENGEL N. Chlorophyll catabolism – structures, mechanisms, conversions. *J Photochem Photobiol B: Biology* 1996; **32**: 141–151.
- [13] GRAHAM IA, LEAVER CJ, SMITH SM. Induction of malate synthase gene expression in senescing and detached organs of cucumber. *Plant Cell* 1992; **4**: 349–357.
- [14] GROVER A. How do senescing leaves lose photosynthetic activity? *Curr Sci* 1993; **64**: 226–234.
- [15] GUIAMET JJ, GIANNIBELLI MC. Inhibition of the degradation of chloroplast membranes during senescence in nuclear staygreen mutants of soybean. *Physiol Plant* 1995; **91**: 395–402.
- [16] HANFREY C, FIFE M, BUCHANAN-WOLLASTON V. Leaf senescence in *Brassica napus*: expression of genes encoding pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol* 1996; **30**: 597–609.
- [17] HENSEL LL, GRBIC V, BAUMGARTEN DA, BLEECKER AB. Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1993; **5**: 553–564.
- [18] HIDEWA J, MAKINO A, MAE T, OJIMA K. Photosynthetic characteristics of rice leaves aged under different irradiances from full expansion through senescence. *Plant Physiol* 1991; **97**: 1287–1293.
- [19] HIDEWA J, MAKINO A, KURITA Y, MAE T, OJIMA K. Changes in the levels of chlorophyll and light-harvesting chlorophyll a/b protein of PSII in rice leaves aged under different irradiances from full expansion through senescence. *Plant Cell Physiol* 1992; **33**: 1209–1214.
- [20] HUMBECK K, KRUPINSKA K. Does the Clp protease play a role during senescence-associated protein degradation in barley leaves? *J Photochem Photobiol B: Biology* 1996; **36**: 321–326.
- [21] HUMBECK K, QUAST S, KRUPIŃSKA K. Functional and molecular changes in the photosynthetic apparatus during senescence of flag leaves from field-grown barley plants. *Plant Cell Environment* 1996; **19**: 337–344.
- [22] JACKOWSKI G. Kompleksy chlorofil a/b-białko fotosystemu II. Poznań: Wydawnictwo Naukowe UAM 1996: 1–108.
- [23] JACKOWSKI G. Senescence-related changes in the subcomplex arrangement of the major light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex of photosystem II (LHCII) as influenced by cytokinin. *Z Naturforsch* 1996; **51c**: 464–472.
- [24] JACKOWSKI G. Programowana śmierć komórkowa u roślin i zwierząt. *Wszechświat* 1997; **98**: 220–224.
- [25] JIANG CZ, RODERMEL SR, SHIBLES RM. Photosynthesis, Rubisco activity and amount, and their regulation by transcription in senescing soybean leaves. *Plant Physiol* 1993; **101**: 105–112.

- [26] JONES AM, DANGL JL. Logjam at the Styx: programmed cell death in plants. *Trends in Plant Sci* 1996; **1**: 114–119.
- [27] JORDI W, STOOPEN GM, ARGIROUDI I, INT VELD E, HEINEN P, VAN TOL H. Accumulation of a 50-kDa protein during leaf senescence of alstromeria cut flowering stems. *Physiol Plant* 1996; **98**: 819–823.
- [28] KOMBRINK E, SOMMSICH IE. Defense responses of plants to pathogens. *Adv Bot Res* 1995; **21**: 2–34.
- [29] KURA-HOTTA M, SATOH K, KATOH S. Relationship between photosynthesis and chlorophyll content during leaf senescence of rice seedlings. *Plant Cell Physiol* 1987; **28**: 1321–1329.
- [30] LANGMEIER M, GINSBURG S, MATILE P. Chlorophyll breakdown in senescent leaves: demonstration of Mg-dechelataase activity. *Physiol Plant* 1993; **89**: 347–353.
- [31] LINDAHL M, TABAK S, CSEKE L, PICHERSKY E, ANDERSSON B, ADAM Z. Identification, characterization, and molecular cloning of a homologue of the bacterial FtsH protease in chloroplasts of higher plants. *J Biol Chem* 1996; **271**: 29329–29334.
- [32] LOHMAN KN, GAN S, MANORAMA CJ, AMASINO RM. Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 1994; **92**: 320–328.
- [33] MAE T, THOMAS H, GAY AP, MAKINO A, HIDEWA J. Leaf development in *Lolium temulentum*: photosynthesis and photosynthetic proteins in leaves senescing under different irradiances. *Plant Cell Physiol* 1993; **34**: 391–399.
- [34] MATILE P. Chloroplast senescence. [w] Baker N, Thomas H [red.] Crop Photosynthesis: Spatial and Temporal Determinants. Amsterdam: Elsevier 1992: 413–440.
- [35] MATILE P, DUGGELIN T, SCHELLENBERG M, RENTSCH D, BORTLIK D, PEISKER H, THOMAS H. How and why is chlorophyll broken down in senescing leaves? *Plant Physiol Biochem* 1989; **27**: 595–604.
- [36] MATILE P, SCHELLENBERG M. The cleavage of pheophorbide a is localised in the envelope of barley gerontoplasts. *Plant Physiol Biochem* 1996; **34**: 55–59.
- [37] MATILE P, SCHELLENBERG M, VINCENTINI F. Localization of chlorophyllase in the chloroplast envelope. *Planta* 1997; **201**: 96–99.
- [38] MITTLER R, SHULAEV V, LAM E. Coordinated activation of programmed cell death and defense mechanisms in transgenic tobacco plants expressing a bacterial proton pump. *Plant Cell* 1995; **7**: 29–42.
- [39] NOODEN LD, HILLSBURG JW, SCHNEIDER MJ. Induction of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* by long days through a light-dosage effect. *Physiol Plant* 1996; **96**: 491–495.
- [40] NOODEN LD, KAHANAK GM, OKATAN Y. Prevention of monocarpic senescence in soybeans with auxin and cytokinin. *Science* 1979; **206**: 841–843.
- [41] NOODEN LD, LETHAM SD. Cytokinin metabolism and signalling in the soybean plant. *Aust J Plant Physiol* 1993; **20**: 639–653.
- [42] OH SA, LEE SY, CHUNG IK, LEE CH, NAM HG. A senescence-associated gene of *Arabidopsis thaliana* is distinctively regulated during natural and artificially induced leaf senescence. *Plant Mol Biol* 1996; **30**: 739–754.
- [43] OKADA K, INOUE Y, SATOH K, KATOH S. Effects of light on degradation of chlorophyll and proteins during senescence of detached rice leaves. *Plant Cell Physiol* 1992; **33**: 1183–1191.
- [44] OSTERSETZER O, ADAM Z. Effects of light and temperature on expression of ClpC, the regulatory subunit of chloroplastic Clp protease, in pea seedlings. *Plant Mol Biol* 1996; **31**: 673–676.
- [45] RONTANI J-F, CUNY P, GROSSI V. Photodegradation of chlorophyll phytyl chain in senescent leaves of higher plants. *Phytochemistry* 1996; **2**: 347–351.
- [46] ROSENTHAL SI, CAMM EL. Effects of air temperature, photoperiod and leaf age on a foliar senescence of western larch (*Larix occidentalis* Nutt) in environmentally controlled chambers. *Plant Cell Environment* 1996; **19**: 1057–1065.

- [47] SCHELLENBERG M, MATILE P. Association of components of the chlorophyll catabolic system with pigment-protein complexes from solubilized chloroplast membranes. *J Plant Physiol* 1995; **146**: 604–608.
- [48] SCHELLENBERG M, MATILE P, THOMAS H. Production of a presumptive chlorophyll catabolite *in vitro*: requirement for a reduced ferredoxin. *Planta* 1993; **191**: 417–420.
- [49] SEMBDNER G, PARTHIER B. The biochemistry and physiological and molecular actions of jasmonates. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1993; **44**: 569–589.
- [50] SMART C, HOSKEN SE, THOMAS H, GREAVES JA, BLAIR BG, SCHUCH W. The timing of maize leaf senescence and characterisation of senescence-related cDNAs. *Physiol Plant* 1995; **93**: 673–682.
- [51] TAYLOR CB, BARIOLA PA, DELCARDAYRE SB, REINES RT, GREEN PJ. RNS2: A senescence-associated RNase of *Arabidopsis* that diverged from the S-RNases before speciation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 5118–5122.
- [52] THIMANN K. The senescence of leaves. [w] Thimann VK [red.] Senescence in Plants. Boca Raton, USA: CRC Press Inc. 1980: 86–115.
- [53] THOMAS H. Aging in the plant and animal kingdoms – the role of cell death. *Rev Clin Gerontol* 1994; **4**: 5–20.
- [54] THOMAS H, STODDART JL. Leaf senescence. *Ann Rev Plant Physiol* 1980; **31**: 83–111.
- [55] WINTER U, FEIERABEND J. Multiple coordinate controls contribute to a balanced expression of ribulose -1,5- biphosphate carboxylase/oxygenase subunits in rye leaves. *Eur J Biochem* 1990; **187**: 445–453.
- [56] VINCENTINI F, HORTENSTEINER S, SCHELLENBERG M, THOMAS H, MATILE P. Chlorophyll breakdown in senescent leaves: identification of the biochemical lesion in a stay-green genotype of *Festuca pratensis*. *New Phytol* 1995; **129**: 247–252.
- [57] ZACH A. Protein stability and degradation in chloroplasts. *Plant Mol Biol* 1996; **32**: 773–783.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 27.06. 1997 r.

Przyjęto: 19.08. 1997 r.

Al. Niepodległości 14, 61-713 Poznań.

MOLEKULARNE MECHANIZMY SAMONIEZGODNOŚCI HOMOMORFICZNEJ ZAPOBIEGAJĄCE SAMOZAPŁODNIENIU ROŚLIN OKRYTONASIENNYCH

MOLECULAR MECHANISMS OF HOMOMORPHIC SELF-INCOMPATIBILITY THAT PREVENT SELF-FERTILIZATION OF ANGIOSPERM

Elżbieta KRZYWNICKA, Stanisław KOWALCZYK

Zakład Biochemii Instytutu Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja
Kopernika, Toruń

Streszczenie: Samoniezgodność jest mechanizmem kontrolowanym genetycznie, funkcjonującym w żeńskiej tkance sporofitu, obejmującym reakcje rozpoznania i odrzucenia pyłku o określonym genotypie. Mechanizm samoniezgodności oparty jest na interakcji produktów locusa S pyłku z analogicznymi cząsteczkami syntetyzowanymi w słupku. Identyfikacja genów locusa S w słupku u przedstawicieli *Solanaceae*, *Papaveraceae* i *Brassicaceae* oraz poznanie właściwości biochemicznych ich produktów pozwoliło zaproponować molekularne podstawy samoniezgodności. U przedstawicieli *Solanaceae* podstawę mechanizmu stanowi S-RNaza odpowiedzialna za rozpoznanie niezgodnego pyłku i zahamowanie jego wzrostu w następstwie degradacji RNA. U *Papaver rhoeas* mechanizm ten zakłada reakcję niskocząsteczkowego białka syntetyzowanego w szyjce słupka z białkiem receptorowym pyłku prowadzącą z kolei do uruchomienia w pyłku wapniowego szlaku sygnalizacyjnego. U przedstawicieli *Brassicaceae* w mechanizmie rozpoznania i odrzucenia uczestniczy układ złożony z białka sekrecyjnego i związanej z błoną plazmatyczną kinazy białkowej, współdziałających w odbieraniu sygnału z pyłku i przenoszących informację do wnętrza komórek wyrostkowych znamienia. Na podstawie liczby alleli S, których produkty ekspresji determinują niezgodność w pyłku, samoniezgodność rozpatrywana jest jako gametofityczna bądź sporofityczna.

Słowa kluczowe: samoniezgodność, locus S, S-RNaza, receptorowa kinaza serynowo/treoninowa

Summary: Self-incompatibility is a genetically controlled mechanism for self-recognition that results in rejection of self pollen by the female tissue of the sporophyte. Self-incompatibility involves the interaction of molecules produced by the S locus in pollen with those present in the pistil. Identification of genes at the S locus in the *Solanaceae*, *Papaveraceae* and *Brassicaceae* has allowed development of molecular models for self-incompatibility based on the biochemical properties of the products of these genes. In the *Solanaceae*, a model involves S-RNases which are responsible for both recognition of incompatible pollen tubes and direct inhibition of their growth. In *Papaveraceae*, a mechanism is based on a low molecular weight stylar protein activating a calcium-mediated signaling system in the pollen tube. In *Brassicaceae*, the recognition and rejection mechanisms involve signal transduction mediated by extracellular receptors and membrane-bound protein kinase localized in plasma membrane of the stigmatic papillae. Self-incompatible systems are described as either sporophytic or gametophytic based on the number of S-allele expressed by the pollen grain.

Key words: self-incompatibility, locus S, S-RNase, serine/threonine receptor kinase

WSTĘP

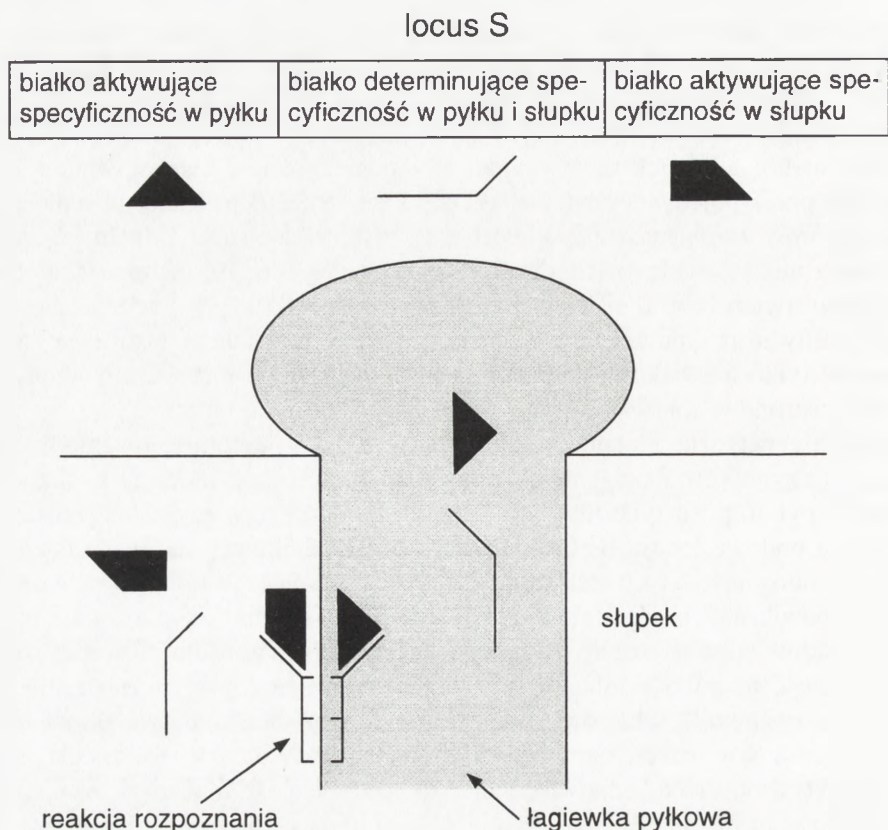
Ponad 70% roślin okrytonasiennych wytwarza kwiaty obupłciowe, których budowa na ogół sprzyja samozapyleniu mogącemu prowadzić do zapłodnienia wsobnego. Znane powszechnie zjawisko depresji wsobnej przypuszczalnie uniemożliwiłoby osiągnięcie sukcesu ewolucyjnego roślin okrytonasiennych, gdyby nie doszło do wykształcenia mechanizmów samoniezgodności (*self-incompatibility*). Samoniezgodność określana również jako niezgodność wewnątrzgatunkowa, definiowana jest jako niezdolność do wytworzenia zygoty w wyniku samozapylenia. Terminem tym obejmuje się także wykształcone u niektórych roślin cechy morfologiczne kwiatu utrudniające samozapylenie (heterostylia, herkogamia) czy czasowe rozdzielenie płci (dichogamia) mające zapobiegać samozapyleniu. Przystosowania te określone są mianem samoniezgodności heteromorficznej w odróżnieniu od samoniezgodności homomorficznej opartej na kontrolowanym genetycznie mechanizmie molekularnym zapobiegającym samozapłodnieniu. Mechanizm samoniezgodności homomorficznej umożliwia selekcję pyłków padających na znamię słupka i nie dopuszcza do zapłodnienia przez pyłek o niewłaściwym genotypie. Na poziomie molekularnym mechanizm ten musi zatem obejmować reakcję **rozpoznania** oraz reakcję **odpowiedzi**, których efektem będzie akceptacja bądź odrzucenie pyłku.

Pierwsze propozycje dotyczące sposobu funkcjonowania mechanizmu samoniezgodności nawiązywały do interakcji antygeny z przeciwciałami. Hipoteza ta zakładała obecność w pyłku i słupku białek strukturalnie komplementarnych. Białko „antygenowe” pyłku byłoby rozpoznawane przez „przeciwciało” produkowane w słupku, a reakcja odrzucenia miałaby przypominać reakcję immunologiczną. W innej koncepcji proponowano, że w pyłku i słupku są obecne identyczne białka w formie dimerów, które w przypadku samozapylenia tworzyłyby tetramery pełniące funkcję induktora bądź represora określonych genów.

Do połowy lat osiemdziesiątych większość prowadzonych badań zmierzała głównie w kierunku poznania genetycznej kontroli samoniezgodności. Metodami krzyżowań genetycznych ustalono, że samoniezgodność występuje u co najmniej 71 rodzin i oszacowano, że obejmuje do 50% wszystkich roślin kwiatowych. Stwierdzono ponadto, że u większości gatunków samoniezgodność kontrolowana jest genetycznie przez pojedynczy wieloalleliczny locus S (*self*) uważany obecnie przez wielu autorów za najbardziej polimorficzny roślinny locus. O stopniu jego zróżnicowania może świadczyć chociażby fakt, że u 1000 roślin gatunku *Oenothera organensis* stwierdzono aż 38 alleli locusa S [cyt. za 94]. To wyjątkowe zróżnicowanie mogło nasuwać przypuszczenie, że locus S tworzy pojedynczy cistron, a geny S różnią się tylko niewielkimi zmianami sekwencji bądź że locus S utworzony jest z wielu cistronów, między którymi może zachodzić rekombinacja.

Analiza genetyczna mutantów, u których w wyniku napromieniowania lub chemicznych czynników mutagennych zanikła zdolność rozpoznawania i odrzucania własnego pyłku, posłużyła do sformułowania roboczej hipotezy zakładającej trójczęściową budowę locusa S [63]. Hipoteza trójskładnikowej budowy zakłada, że locus S zbudowany jest z trzech strukturalnie odrębnych części funkcjonalnie ściśle ze sobą powiązanych. Zgodnie z tym locus S zawierałby wspólny dla słupka i pyłku składnik odpowiedzialny za specyficzność allelu, a ponadto część aktywującą specyficzność allelu S w słupku oraz część aktywującą specyficzność allelu w pyłku. Na rysunku 1 schematycznie pokazano współdziałanie produktów trzech genów locusa S w reakcji samoniezgodności. Produkty genów swoiste dla słupka i pyłku aktywują białko odpowiedzialne za specyficzność reakcji uczestnicząc w ten sposób w mechanizmie rozpoznania. Części te mogłyby działać jak białka chaperonowe indukujące zmiany konformacji, bądź jako części komplementarne umożliwiające interakcje białek S w słupku i pyłku. W innej wersji tej hipotezy proponowano, że locus S zawiera dwa geny kodujące białka aktywujące w słupku i pyłku, mające dodatkowo wspólną część determinującą specyficzność locusa S bądź że białko S jest produktem jednego genu zawierającego 3 domeny funkcjonalne. Mimo że hipoteza Lewisa [63] nie została ostatecznie zweryfikowana, a to głównie z powodu niewielkiego postępu badań nad identyfikacją białek S w pyłku, to przez wiele lat wyznaczała główne kierunki poszukiwań biochemicznych podstaw samoniezgodności.

Obecnie przyjmuje się powszechnie pogląd, że ekspresja takiego samego allelu S w słupku i pyłku osiadłym na jego znamieniu prowadzi do rozpoznania pyłku jako niezgodnego i w konsekwencji staje się przyczyną reakcji odrzucenia. Jednakże już obserwacje sprzed pół wieku wskazywały, że u przedstawicieli *Solanaceae* i *Cruciferae* funkcjonują dwa różne mechanizmy genetycznej kontroli samoniezgodności. Te dwa typy samoniezgodności, noszące obecnie nazwę samoniezgodności gametofitycznej i samoniezgodności sporofitycznej, były krótko opisane przed pięć laty w Post. Biol. Kom. [4]. Niniejsza praca w swojej zasadniczej części nawiązuje



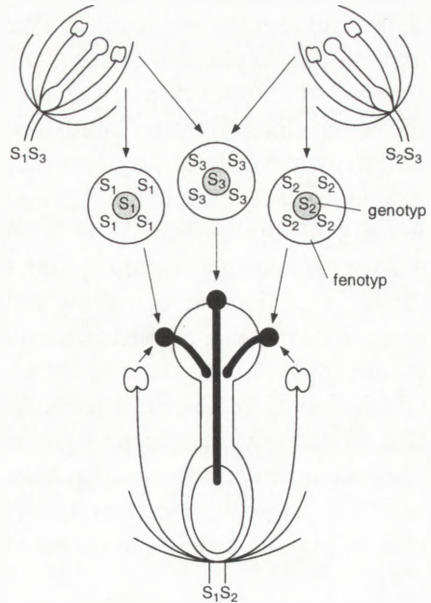
Rys. 1. Schemat ilustrujący współdziałanie produktów trójskładnikowego locusa S w reakcji samoniezgodności, zaproponowany schemat ilustruje hipotezę Lewisa [63] w wersji zakładającej, że trzem składnikom locusa S odpowiadają trzy geny

do referatów wygłoszonych w ramach konferencji pt. *Frontiers in Plant Biology: How Plants Communicate*, zorganizowanej w 1996 roku na *Michigan State University*. W ostatnim pięcioleciu pojawiło się też w literaturze światowej szereg mniej lub bardziej wyczerpujących prac przeglądowych prezentujących postępy badań w tym zakresie [20, 22, 29, 42, 66, 92, 102].

SAMONIEZGODNOŚĆ GAMETOFITYCZNA

Samoniezgodność gametofityczna (SG) jest genetycznie dobrze opisana u przedstawicieli 15 rodzin, a u dalszych 45 rodzin jej występowanie jest prawdopodobne, chociaż nie zostało jeszcze dostatecznie udokumentowane. Wydaje się więc, że

SG jest najpowszechniejszym rodzajem samoniezgodności u roślin okrytonasiennych. Na poziomie molekularnym SG badana była u przedstawicieli następujących pięciu rodzin: *Solanaceae*, *Rosaceae*, *Poaceae*, *Scrophulariaceae* i *Papaveraceae*. U większości badanych przedstawicieli wymienionych rodzin SG jest kontrolowana przez pojedynczy locus, ale już u niektórych *Gramineae* SG zdeterminowana jest przez 2 loci, a u *Ranunculaceae* (*Ranunculus acris*) i *Chenopodiaceae* (*Beta vulgaris*) nawet przez 3 lub 4 loci [29, 42, 94]. Na rysunku 2 przedstawiono schematycznie mechanizm genetycznej kontroli SG u *Solanaceae*. Zgodnie z tym schematem, fenotyp pyłku zdeterminowany jest przez haploidalny genotyp mikrospory i jej komórek potomnych, a więc jest identyczny z genotypem pyłku. W wyniku interakcji produktów takich samych alleli pyłku i słupka następuje zahamowanie wzrostu łagiewki (rys. 2). Zgodnie z powyższym, tylko pyłek o genotypie S_3 nie zostanie odrzucony przez słupkę rośliny charakteryzującej się genotypem S_1S_2 . Badania biochemiczne, poparte w latach dziewięćdziesiątych wynikami biologii molekularnej, wykazały, że SG obejmuje co najmniej dwa odrębne mechanizmy [22, 31, 53, 54, 83, 84, 94]. Będą one przedstawione w dwóch kolejnych podrozdziałach.



Rys. 2. Schemat ilustrujący genetyczną kontrolę samoniezgodności gametofitycznej przez wieloalleliczny locus S. Białko S pyłku, produkt haploidalnego jądra, spotyka w słupku dwa białka S, produkty ekspresji homologicznych alleli S diploidalnych komórek słupka. Reakcja samoniezgodności jest wynikiem interakcji białek S takich samych alleli S pyłku i słupka (wg [53] zmodyfikowane)

IDENTYFIKACJA I WŁAŚCIWOŚCI BIAŁEK S U PRZEDSTAWICIELI RODZINY PSIANKOWATYCH

Początkowo strategia badań biochemicznych polegała na próbach identyfikacji białek S w słupku i pyłku, których obecność była skorelowana z odpowiednimi allelami S w krzyżówkach genetycznych. Identyfikacja białek S słupka jest stosunkowo łatwa, bowiem białka te ilościowo dominują w ekstraktach szyjki stanowiąc nawet do 20% całkowitej ilość białek [9]. Z jednej szyjki można uzyskać nawet

do kilku mikrogramów białek S. Poszczególne białka alleli S dobrze rozdzielają się w żelu poliakrylamidowym z SDS, co do pewnego stopnia odzwierciedla dużą zmienność ich struktury pierwszorzędowej [9, 49].

Pierwszą glikoproteiną, której sekwencja N-końca posłużyła do identyfikacji cDNA, było białko allelu S_2 tytoniu *Nicotiana glauca* [2]. Wkrótce po tym sklonowano cDNA odpowiadające allelom S_3 i S_6 z *N. glauca* [3, 58], a także ustalono sekwencje białek S z *Petunia inflata* [1, 17], *Solanum chacoense* [116], *Solanum tuberosum* [56], *Lycopersicon peruvianum* [108]. Obecnie znane są sekwencje cDNA dla ponad 30 białek S z siedmiu gatunków rodziny *Solanaceae*, a ponadto struktura pierwszorzędowa białek S przedstawicieli *Rosaceae* [8], *Scrophulariaceae* [117] i *Papaveraceae* [28].

Glikoproteiny o masie cząsteczkowej od 23 do 34 kDa, izolowane z ekstraktów słupka, charakteryzują się na ogół właściwościami zasadowymi [1, 49, 51, 59, 67]. Metodami immunochemicznymi oraz metodą hybrydyzacji mRNA dowiedziono, że białka S występują zewnątrzkomórkowo i to zarówno w tkance transmisyjnej słupka, jak też na powierzchni znamienia oraz w warstwie epidermalnej placenty [3, 18].

Kosegregacja białek S z odpowiednimi allelami, lokalizacja tkankowa oraz skorelowana w czasie z reakcją odrzucenia synteza białek S wskazywały na ich rolę w samoniezdności. Faktycznie jednak dopiero możliwości klonowania i transformowania genów S jednoznacznie dowiodły słuszności wcześniejszych założeń. Lee i wsp. [62] skonstruowali gen, który za promotorem genu S_3 miał włączony w położeniu antysensownym fragment cDNA kodujący około 70% białka S_3 . Takim zmienionym genem transformowano *P. inflata* o genotypie S_2S_3 . W ekstrakcie białkowym słupka roślin transgeniczných obserwowano obniżony poziom białka S_2 i S_3 lub całkowity brak białka S_3 , co w efekcie prowadziło do braku reakcji odrzucenia pyłku o genotypie S_3 . W tym samym laboratorium udało się transformować *P. inflata* o genotypie S_1S_2 genem S_3 w pozycji właściwej. W tym przypadku wykazano, że roślina transgeniczna obok białek S_1 i S_2 syntetyzowała białko S_3 i oprócz pyłków S_1 i S_2 odrzucała także pyłek o genotypie S_3 .

Obydwa rodzaje doświadczeń, w których roślina transgeniczna utraciła lub nabyła zdolność rozpoznania pyłku o właściwym genotypie, prowadzą do wniosku, że białka S są konieczne i wystarczające do wystąpienia reakcji samoniezdności.

Na rysunku 3 przedstawiono schemat struktury pierwszorzędowej białek S opracowany na podstawie znanych sekwencji 19 białek zidentyfikowanych u przedstawicieli *Solanaceae* [1, 2, 3, 8, 16, 56, 116]. Wszystkie białka mają na N-końcu sekwencję sygnałową skierowującą białko do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Peptyd sygnałowy w większości przypadków tworzą 22 aminokwasy, przy czym fragmenty konserwatywne zawierają serynę, leucynę i prolinę – aminokwasy przerywające strukturę helikoidalną. Szczegółowa analiza struktury pierwszorzędowej białek S prowadzi do wyodrębnienia dwóch hydrofilowych regionów, oznaczonych

różnych tkanek roślinnych [71]. To odkrycie stało się zresztą nowym, ważnym impulsem w badaniach roślinnych RNaz, a szczególnie ich roli w samoniezdgodności oraz procesach starzenia i głodzenia [38]. Dzisiaj już wiadomo, że wszystkie poznane sekwencje białek S zawierają w 100% konserwatywny fragment IHGLWP wokół histydyny-38 i prawie tak samo konserwatywny fragment w pobliżu histydyny-103 (rys. 3). Obie reszty histydyny mają zasadnicze znaczenie dla aktywności RNazy [57]. Zwraca uwagę również fakt, że 4 spośród 8 reszt cysteiny zajmują identyczne pozycje we wszystkich RNazach i tworzą mostki dwusiarczkowe w enzymie z *A. oryzae* [57, 92].

Aktywność RNazowa białek S została potwierdzona po raz pierwszy na oczyszczonych glikoproteinach z ekstraktu słupka *N. alata* i *P. inflata* [10, 69, 93]. Trzy białka S z *P. inflata* charakteryzujące się 73–80% identycznością sekwencji, wykazują bardzo podobne właściwości kinetyczne i podobną aktywność RNazy [93]. Aktywność RNazowa białek S stanowi od 40 do 86% całkowitej aktywności RNaz ekstraktu szyjki słupka *N. alata* i jest od 100 do 1000 razy wyższa niż aktywność w ekstrakcie słupka z samozgodnego tytoniu *N. tabacum* [69]. McClure i wsp. [68] znakując izotopowo *in situ* pyłkowy RNA stwierdzili, że w krzyżowym zapyleniu rRNA pozostaje nienaruszony, natomiast w przypadku samozapylenia ulega degradacji. Wyniki te, mimo że są bardzo sugestywne, nie udzieliły jednak odpowiedzi na pytanie, czy degradacja RNA jest przyczyną zatrzymania wzrostu łagiewki czy też skutkiem. RNA może bowiem ulegać hydrolitycznej degradacji w wyniku pęknięcia ściany łagiewki i wylania się zawartości do międzykomórkowej matriks słupka, co na ogół ma miejsce w reakcji odrzucenia. Gray i wsp. [37] obserwowali *in vitro* wnikanie S-RNaz do kielkujących ziaren pyłku oraz potwierdzili, że towarzyszy temu hamowanie syntezy białka w łagiewce, jednakże nie stwierdzili zależności od genotypu selektywności wnikania S-RNaz. Autorzy nie potwierdzili również zakładanej wcześniej specyficzności substratowej względem określonych mRNA, jaka na przykład ma miejsce w przypadku endonukleaz restrykcyjnych. Brak selektywności transportu S-RNaz do łagiewki może wynikać z nienaturalnych warunków *in vitro*, ale może też wskazywać, że jeszcze inne białka są konieczne do wystąpienia samoniezdgodności.

Rola S-RNaz w reakcji samoodrzućcia została jednoznacznie potwierdzona w badaniach genetycznych. *P. inflata* o genotypie S_1S_2 transformowano zmutowanym genem S_3 , w którym trójkę zasad kodującą histydynę-38 zastąpiono trójką kodującą asparaginę. W wyniku tych zmian syntetyzowane białko S_3 nie wykazywało aktywności RNazy, a roślina transgeniczna nie odrzucała pyłku o genotypie S_3 [44]. Interesujące wyniki uzyskali także Murfett i wsp. [73]. Dzięki zastosowaniu silnego promotora genu chitynazy z pomidora powiodła im się ekspresja genu S z *N. alata* w samozgodnej chimerycznej roślinie powstałej ze skrzyżowania *N. alata* z *N. langsdorffii*. Ekspresji genu S w samozgodnej roślinie towarzyszyło pojawienie się reakcji odrzucania pyłku o określonym genotypie. Uzyskane wyniki autorzy

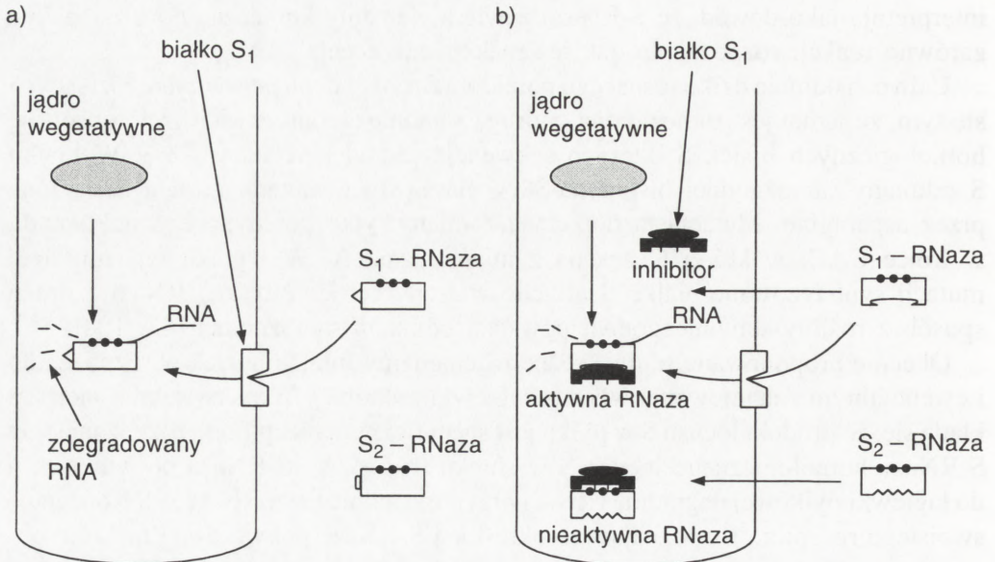
interpretują jako dowód, że S-RNaza zawiera elementy konieczne do wystąpienia zarówno reakcji rozpoznania, jak też reakcji odrzucenia.

U dwóch odmian dziko rosnącego pomidora *Lycopersicon peruvianum* różniących się tym, że jedna jest samozgodna, a druga samoniezgodna, stwierdzono obecność homologicznych białek S, których sekwencja jest identyczna w 78%. W białku S odmiany samozgodnej histydyna-38 w następstwie mutacji została zastąpiona przez asparaginę. Mutacja ta dotyczyła zamiany tylko pojedynczego nukleotydu w trójce CAC, w której C została zamieniona na A. W wyniku tej naturalnej mutacji syntetyzowane białko S utraciło właściwości katalityczne RNazy i w ten sposób z rośliny samoniezgodnej powstała odmiana samozgodna [87, 108].

Obecnie proponowane są dwa różne mechanizmy funkcjonujące w rozpoznaniu i ewentualnym zahamowaniu wzrostu łagiewki pyłkowej. W pierwszym z nich zakłada się, że produkt locusu S w pyłku jest specyficznym receptorem rozpoznającym S-RNazę homologicznego locusu S w słupek (rys. 4 A). S-RNaza po wnikięciu do łagiewki pyłkowej degraduje rRNA i przypuszczalnie też mRNA [39]. Koncepcję swoistego receptora rozpoznającego określoną S-RNazę potwierdzają niektóre obserwacje. Skonstruowano gen kodujący białko S₃, w którym histydynę-103 w regionie C-3 zastąpiono arginina, a następnie tak zmodyfikowanym genem transformowano roślinę o genotypie S₂S₃. Okazało się, że zmienione białko S₃, mimo że nie wykazywało aktywności RNazy, znacząco osłabiało reakcję odrzucenia pyłku S₃. Efekt ten tłumaczony jest jako wynik konkurowania właściwego i zmienionego białka S₃ o miejsce na receptorze w błonie łagiewki pyłkowej [54, 70].

W modelu zaproponowanym przez Thompsona [102] zakłada się, że produkt allelu S w pyłku jest inhibitorem RNazy. W tym mechanizmie rozpoznanie nie odbywa się na receptorze, ale zachodzi dopiero po wnikięciu S-RNaz do łagiewki pyłkowej (rys. 4 B). Zgodnie z tym modelem inhibitor syntetyzowany w pyłku powinien tworzyć kompleks z domeną determinującą specyficzność białka bądź z domeną katalityczną RNazy. W pierwszym przypadku następuje interakcja między domenami specyficzności, w drugim reakcja jest mniej swoista i prowadzi do zahamowania aktywności każdej z S-RNaz. Mechanizmem tym próbuje się tłumaczyć wyniki eksperymentów, w których w wyniku manipulacji na hodowlach tkankowych, z diploidalnej samoniezgodnej rośliny otrzymano roślinę tetraploidalną z częściowo zniesioną samoniezgodnością. Pyłek takiej tetraploidalnej rośliny był odrzucany tylko wtedy, gdy miał dwa identyczne allele, np. S₁S₁ lub S₂S₂, natomiast nie był odrzucany pyłek o genotypie S₁S₂ (Kao TH – doniesienie ustne).

Jak już wspomniano wcześniej, wszystkie poznane białka S zawierają od 1 do 5 charakterystycznych sekwencji (Asn-X-Tre/Ser) określających miejsce potencjalnej N-glikozylacji [94]. Różna liczba miejsc glikozylacji, a także stwierdzane powszechnie zróżnicowanie w części cukrowcowej, były od początku rozważane jako elementy determinujące specyficzność białek S odróżniające jedno białko od drugiego. W celu weryfikacji tej hipotezy zmodyfikowano gen S₃ z *P. inflata*,



Rys. 4. Modele ilustrujące mechanizmy reakcji rozpoznania pyłku o określonym genotypie na podstawie interakcji białek S pyłku i słupka: a – białko S pyłku pełni rolę receptora błonowego rozpoznającego i transportującego do jąderki S-RNazę będącą produktem takiego samego allelu S w słupku; b – białko S w pyłku jest swoistym inhibitorem S-RNaz mającym dodatkowo domenę specyficzności rozpoznającą S-RNazę takiego samego allelu S słupka (wg [39, 102], zmodyfikowane)

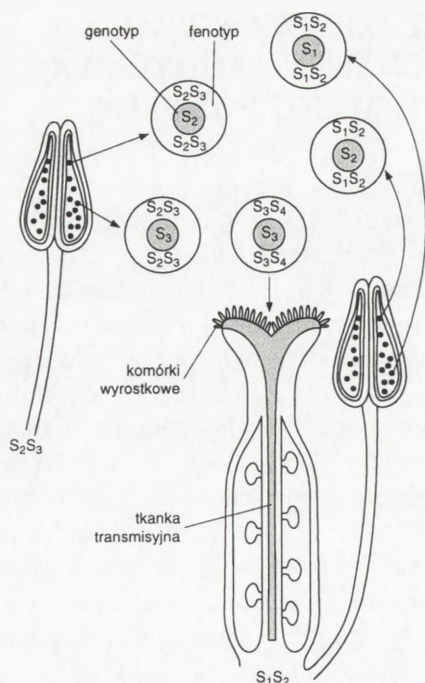
mający tylko jedno miejsce glikozylacji, zastępując asparaginę w pozycji 29 kwasem asparaginowym. Tak zmutowanym genem transformowano roślinę o genotypie S₁S₂. Transgeniczna *P. inflata* syntetyzowała normalny poziom nieglikozylowanego białka S₃, a mimo to całkowicie odrzucała pyłki o genotypie S₃ [55]. Wyniki doświadczeń sugerują, że specyficzność S-RNaz nie jest związana z częścią cukrową, tylko wynika z pierwszorzędowej struktury białka. Jak już wspomniano wyżej, potencjalnymi regionami mogącymi odpowiadać za specyficzność S-RNaz są fragmenty HVa i HVb. W celu zweryfikowania tego założenia skonstruowano chimeryczny gen, w którym obydwa regiony HVa i HVb genu S₃ oraz fragment zawarty między nimi zastąpiono odpowiednimi regionami genu S₁. W innej modyfikacji gen S₃ miał zastąpiony tylko region HVb przez taki sam region genu S₁. Okazało się, że produkty obu genów chimerycznych w transformowanej roślinie o genotypie S₂S₂ wykazywały aktywność RNazy, a mimo to nie rozpoznawały ani pyłku S₃, ani S₁ [54]. Wyniki te sugerują, że regiony HV są konieczne, chociaż niewystarczające w determinacji specyficzności oraz że sama domena katalityczna S-RNazy jest niewystarczająca do wystąpienia reakcji rozpoznania i odrzucenia. Tak więc na razie brak jest jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, które elementy glikoprotein S są odpowiedzialne za reakcje rozpoznania.

ZAKŁÓCENIA WEWNĄTRZYŁKOWEGO ROZMIESZCZENIA JONÓW WAPNIA, PODSTAWA REAKCJI ODRZUCENIA U MAKU POLNEGO

Identyfikacja białek S ze znamienia maku polnego (*Papaver rhoeas*) [34] poprzedzająca sklonowanie genu S_1 [28] doprowadziła do wykrycia odrębnego mechanizmu biochemicznego w obrębie SG. Białka glikozylowane S o masie cząsteczkowej 16,7–16,8 kDa stanowią tutaj zaledwie 0,5–1% całkowitej ilości białek wyrostków znamienia. Białka te pojawiają się w znamieniu kilka dni przed zapylaniem, by osiągnąć najwyższy poziom w przededniu pylenia. W odróżnieniu od białek u przedstawicieli rodziny *Solanaceae*, białko S z *P. rhoeas* nie ma aktywności RNazy [30], a także nie wykazuje żadnej znaczącej homologii z białkami S roślin z grupy SG [28]. Gen S_1 transformowany do *E. coli* dawał zrekombinowane białko wykazujące *in vitro* aktywność biologiczną przejawiającą się hamowaniem kiełkowania pyłku [28]. Obecnie przypuszcza się, że w tym przypadku mechanizm zatrzymania wzrostu łagiewki pyłkowej wiąże się ze wzrostem stężenia jonów wapnia w jej cytoplazmie. Białko S z ekstraktu znamienia [33], a także zrekombinowane białko S z *E. coli* [32] wywołuje przejściowy wzrost stężenia jonów wapnia w pyłku samoniezgodnym i powoduje zatrzymanie wzrostu łagiewki. Taki mechanizm mogą również potwierdzać obserwacje, z których wynika, że wzrost łagiewki można zatrzymać w wyniku podniesienia stężenia jonów wapnia w jej cytoplazmie. Może to nastąpić np. na skutek uwolnienia jonów wapnia z jego kompleksów wprowadzonych uprzednio do wnętrza łagiewki. Białko S znamienia indukuje również fosforylację białka o masie cząsteczkowej 26 kDa w pyłku samoniezgodnym. Fosforylacja wydaje się być zależna od wapnia i kalmoduliny [88]. W ostatnim czasie z błony plazmatycznej pyłku wyizolowano białko tworzące kompleksy z białkiem S znamienia. Wiązanie to, jak się jednak okazuje, nie jest selektywne i dlatego proponuje się, że nowe białko może być jedynie elementem pomocniczym hipotetycznego receptora [40].

SAMONIEZGODNOŚĆ SPOROFITYCZNA

W samoniezgodności sporofitycznej (SS) fenotyp pyłku nie jest zdeterminowany przez haploidalny genotyp tak jak w SG, lecz przez diploidalny genotyp rośliny macierzystej (rys. 5). Zgodnie z powyższym zakłada się, że w pyłku białka S są produktami obu homologicznych alleli S komórek tapetum i są wbudowywane do egzyny jeszcze w pylniku bądź że ich synteza zachodzi w diploidalnej komórce macierzystej pyłku wcześniej, zanim zajdzie mejoza. Tak więc każdy z pyłków mimo że genotypowo jest haploidalny, fenotypowo niesie produkty obu homologicznych alleli S rośliny macierzystej. Rozpoznanie pyłku jako samoniezgodnego



Rys. 5. Schemat ilustrujący genetyczną kontrolę samoniezgodności sporofitycznej. Białka S pyłku (fenotyp), produkty ekspresji homologicznych alleli S diploidalnych komórek sporofitu (tapetum), spotykają na znamieniu słupek dwa białka S, będące również produktami diploidalnych komórek sporofitu. Reakcja samoniezgodności wystąpi w sytuacji, gdy spotka się chociaż jedno białko allelu S pyłku z białkiem takiego samego allelu S słupek. Na pokazanym schemacie tylko pyłek o genotypie S_3 i fenotypie S_3S_4 nie zostanie odrzucony przez znamie rośliny o genotypie S_1S_2 (wg [53], zmodyfikowane)

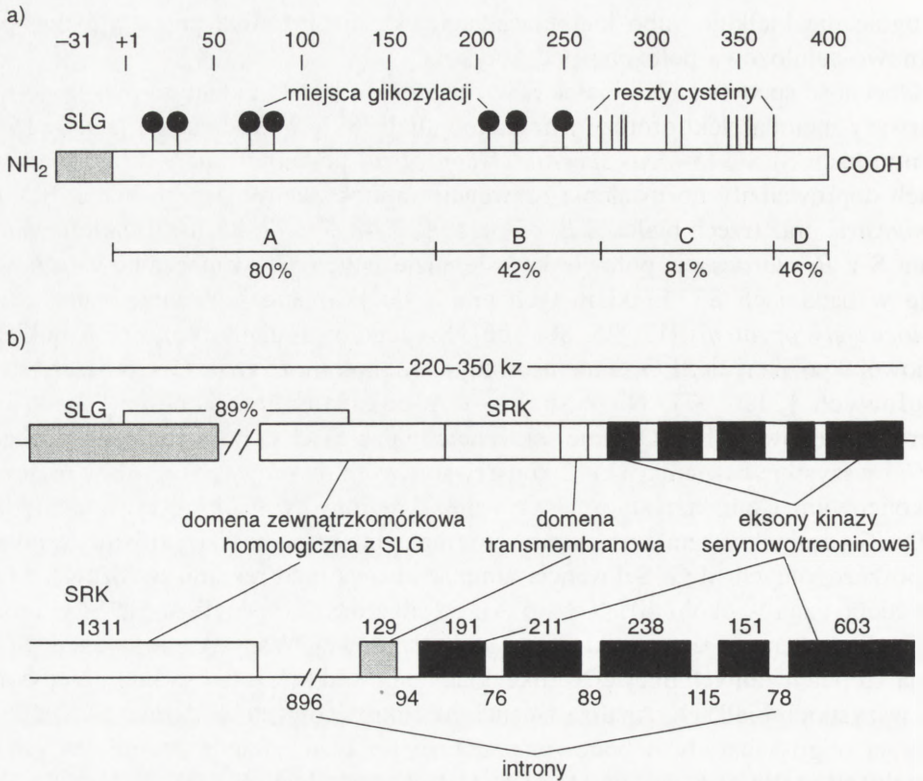
zachodzi wtedy, gdy pyłek i słupek niosą chociaż jeden taki sam allel. W krzyżówkach genetycznych obserwowano, że w SS przeważa kodominacja alleli S, chociaż mogą też występować zależności dominacji. Na ogół kodominacja alleli ma miejsce w znamieniu, natomiast w pyłku może występować kodominacja bądź dominacja [42]. Zróżnicowane zależności między allelami S w pyłku utrudniały analizę krzyżówek genetycznych i dlatego też ogromnie pomocna okazała się metoda samozapyłania pąków kwiatowych w okresie poprzedzającym pojawienie się samoniezgodności. W większości przypadków synteza białek S rozpoczyna się w słupek na 2–3 dni przed otwarciem kwiatu, by osiągnąć najwyższy poziom w przededniu pylenia. Stosowanie tej metody pozwala uzyskać rośliny homozygotyczne względem specyficznego allelu S, z których w drodze krzyżowania uzyskuje się następnie hybrydy F1. Samoniezgodność można też przełamać czynnikami fizycznymi lub chemicznymi, takimi jak: podwyższona temperatura, wyższe stężenie CO_2 , stymulacja elektryczna, traktowanie pyłku roztworem NaCl bądź cykloheksymidem [42].

Samoniezgodność typu sporofitycznego stwierdzono u przedstawicieli następujących rodzin: *Compositae*, *Cruciferae*, *Convolvulaceae*, *Betulaceae*, *Caryophyllaceae* i *Sterculiaceae*. Na poziomie molekularnym SS badana jest u kilku gatunków rodziny *Cruciferae*, głównie jednak *Brassica oleracea*, *Brassica campestris* i *Raphanus sativus*. Wyniki tych badań zebrano w kilku pracach przeglądowych opublikowanych w ostatnich latach [21, 76, 77, 79, 107]. Rośliny charakteryzujące się SS mają „suche” znamie, którego wyrostki są komórkami aktywnymi sekrecyjnie. Kondycja metaboliczna tych komórek istotnie wpływa na wystąpienie reakcji odrzucenia [42]. Sama odpowiedź odrzucenia jest bardzo szybka, bowiem pyłek albo

w ogóle nie kiełkuje, albo kiełkująca łagiewka nie przenika przez warstwę pektynowo-celulozową położoną pod kutykulą.

Obecność specyficznych białek S w znamieniu kapusty zidentyfikowano po raz pierwszy metodą elektroforezy i immunodyfuzji [82]. W następnych latach próby identyfikacji SLSG (*S-locus specific glycoprotein*) podejmowane w kilku pracowniach doprowadziły do ustalenia sekwencji aminokwasowej trzech białek S z *B. campestris* oraz trzech białek S *B. oleracea* [27, 48, 74, 77, 85, 100]. Sklonowanie genu S z *B. oleracea* w połowie lat osiemdziesiątych [75] zapoczątkowało nowy etap w badaniach SS. Efektem tych prac było poznanie sekwencji białek SLG (*S-locus glycoprotein*) [12, 25, 80, 106]. Szczegółową analizę sekwencji nukleotydowej 9 poznanych SLG zainteresowany Czytelnik może znaleźć w pracach przeglądowych [21, 107]. Na rysunku 6 A pokazany jest schemat struktury pierwszorzędowej SLG. Ogólnie sekwencje białek SLG są homologiczne w około 80% i wszystkie zawierają 11–12 konserwatywnych reszt cysteinowych w regionie C-końcowym. Charakterystyczne są również 4 regiony hydrofilowe zawarte między 180 a 274 aminokwasem, będące zarazem fragmentami najbardziej zróżnicowanymi w poszczególnych SLG. Sekwencja aminokwasowa tego regionu w różnych SLG jest identyczna w około 40% (rys. 6 A), co sugeruje, że specyficzność SLG może być zakodowana w jego strukturze pierwszorzędowej. Wszystkie sekwencje SLG mają 13 potencjalnych miejsc N-glikozylacji, spośród których 4 są konserwatywne we wszystkich białkach. Analiza łańcuchów cukrowcowych wykazała, że SLG zawierają oligosacharydy o budowie podobnej do tych, jakie występują w glikoproteinach roślinnych nie związanych z samoniezgodnością [21].

Na początku lat dziewięćdziesiątych poznano sekwencję receptorowej kinazy serynowo/treoninowej (ZmPK1) z korzeni kukurydzy [111], która, jak się okazało, jest w 27% identyczna z SLG. Mimo że rola tej kinazy białkowej nie jest nadal znana, to podobieństwo jej sekwencji z SLG wyraźnie wskazywało kierunek dalszych poszukiwań. Wkrótce potem odkryto, że locus S obok genu SLG zawiera jeszcze drugi gen, który po sklonowaniu z homozygotycznej linii S_6S_6 *B. oleraceae* okazał się być receptorową kinazą serynowo/treoninową – SRK (*S-locus receptor kinase*) [97, 98]. Białko SRK₆ o masie cząsteczkowej 98 kDa w części zewnątrzkomórkowej jest w 90% homologiczne z SLG i podobnie zawiera też 12 reszt cysteinowych w położeniu konserwatywnym w stosunku do SLG. W genie SRK₆ domena zewnątrzkomórkowa oddzielona jest intronem wielkości 896 pz od 20-aminokwasowej helikoidy błonowej (rys. 6 B). Część wewnątrzkomórkową tworzy 5 egzonów z wyraźnymi 11 subdomenami. Subdomeny VI i VIII zawierają sekwencje DLKVSN oraz GTYGYMSPE charakterystyczne dla kinaz serynowo/treoninowych. Obydwa geny, SLG i SRK położone są w obrębie tego samego locusa w odległości około 40 kb i mieszczą się wewnątrz fragmentu wielkości 220–350 kb (rys. 6 B) [6, 76]. Podobnie wysoki, bo sięgający rzędu 90%, stopień identyczności stwierdzono w obrębie pary genów SLG₃ i SRK₃ [19], a także recesywnych genów SLG₂ i

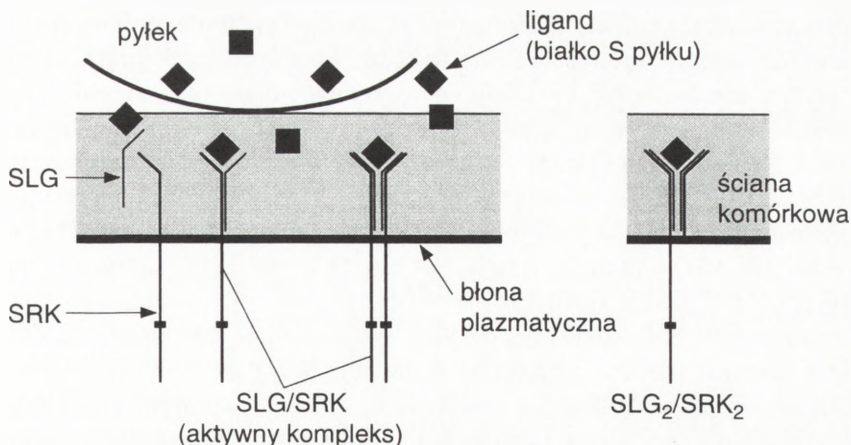


Rys. 6. Schemat budowy białek SLG (*S-locus glycoprotein*) i SRK (*S-locus receptor kinase*): a – sekrecyjne białka SLG zawierają 13 miejsc N-glikozylacji oraz 11–12 konserwatywnych reszt cysteinowych w części C-końcowej; b – schemat budowy locus S zawierającego gen SLG i gen SRK. Białko SRK w części zewnątrzkomórkowej jest w 90% homologiczne z SLG, a w części wewnątrzkomórkowej zawiera domenę kinazy białkowej (wg [19, 21, 25, 107, 110, 118], zmodyfikowane)

SRK₂ u *B. oleracea* [12]. W tym ostatnim przypadku recesywny gen SLG₂ koduje sekrecyjną glikoproteinę zakotwiczoną w błonie, ale pozbawioną domeny kinazy białkowej [101]. Recesywność locus S₂ wynika więc prawdopodobnie z obecności dodatkowej glikoproteiny obok pary genów SLG₂/SRK₂ (rys. 7).

Geny SLG i SRK są genami regulowanymi koordynacyjnie w wyrostkach znamienia. Współzależna ekspresja obu genów stała się przyczyną zastępowania określenia „allele S” nazwą „haplotyp S” [6].

Aktywność kinazowa białek SRK została potwierdzona po raz pierwszy przez Goringa i Rothsteina [36] oraz Steina i Nasrallaha [99]. W pierwszym przypadku autorzy sklonowali SRK₉₁₀ z samoniezdgodnej linii *B. napus*, a następnie zmodyfikowali gen zastępując lizynę w subdomenie II alaniną. Po stransformowaniu *E. coli* okazało się, że reakcja autofosforylacji seryny i treoniny rzeczywiście zachodzi w białku kodowanym przez niezmienny gen, natomiast nie występuje w białku



Rys. 7. Model ilustrujący interakcję białka S pyłku z białkami SLG i SRK komórek wyrostkowych znamienia. Białko S pyłku w przypadku reakcji samoniezgodności indukuje powstawanie aktywnego kompleksu SLG/SRK

zmodyfikowanym. Podobna zamiana konserwatywnej lizyny-524 na argininę w SRK₆ *B. oleracea* dawała również w transformowanej *E. coli* nieaktywną kinazę [99].

W ostatnich latach w różnych tkankach *Arabidopsis thaliana* odkryto rodziny genów podobnych do SRK. Są to białka homologiczne w około 60% w części zewnątrzkomórkowej i aż w 76% w domenie kinazowej [26, 103, 104, 109]. Geny ARK i RLK ulegają ekspresji w różnych częściach rośliny. Wyjątkiem jest gen AtS₁ kodujący kinazę białkową w wyrostkach znamienia [24, 110]. W związku z tym, że *A. thaliana* jest rośliną samozgodną, należy przypuszczać, że kinaza AtS₁ nie uczestniczy bezpośrednio w mechanizmie samoniezgodności, natomiast może grać pewną nieokreśloną jeszcze rolę w interakcji pyłek-słupek. Pewne wątpliwości rodzą się też wokół genów kodujących kinazę receptorową (IPK) u *Ipomoea trifida* (*Convolvulaceae*), homologicznych również z SRK. Geny te mimo dużego podobieństwa do SRK, nie wykazują jednak ścisłej korelacji z locusem S [29, 60].

Obok rodziny kinaz białkowych homologicznych z SLG, dużym podobieństwem do SLG odznacza się także grupa białek nosząca obecnie nazwę SLR (*S-locus related*) [5, 61, 90, 105]. Ekspresja tych genów jest taka sama jak SLG i to zarówno w odniesieniu do miejsca jak też fazy rozwojowej słupek. Białka SLR zidentyfikowano jednakże w znamieniu niektórych roślin samozgodnych, co sugeruje, że mogą one funkcjonować w zapylaniu, ale przypuszczalnie nie uczestniczą w mechanizmie samoniezgodności.

Liczebność i różnorodność genów pokrewnych do SLG uzmysławia, jak dalece niekompletne są informacje na temat molekularnych podstaw interakcji pyłek-słupek. Tym niemniej wydaje się, że dzisiaj nie budzi już wątpliwości udział sekrecyjnej

glikoproteiny (SLG) jak też transbłonowej kinazy serynowo/treoninowej (SRK) w mechanizmie samoniezgodności sporofitycznej. Po pierwsze, ekspresja obu genów skorelowana jest w miejscu i czasie z wystąpieniem reakcji samoniezgodności. Białka SLG akumulowane są w dużych ilościach w ścianach komórek wyrostkowych znamienia [52]. Z drugiej strony stwierdzono, że drastycznemu zredukowaniu poziomu SLG u pewnego mutantu *B. campestris* towarzyszy zanik reakcji samoniezgodności w znamieniu, przy równoczesnym braku zmian w pyłku [81]. Mutacja powyższa, jak się okazało, dotyczyła locusu SCF₁ uczestniczącego w regulacji transkrypcji SLG i SLR, jednakże nie SRK.

O konieczności współdziałania SRK w mechanizmie samoniezgodności może świadczyć analiza sekwencji białka SRK mutantu *B. napus* samozgodnej linii A₁₀. Okazało się, że cDNA allelu A₁₀ nie zawiera 1 zasady, co sprawia, że translacja w tym miejscu ulega przerwaniu dając białko SRK skrócone w części receptorowej [35]. W ostatnim czasie wyselekcjonowano innego samozgodnego mutantu *B. oleracea* (Sf₁), u którego w wyniku delecji powstał również wadliwy gen SRK [78]. Przytoczone wyniki badań potwierdzają zatem konieczność ekspresji obu genów SLG/SRK, która warunkuje występowanie reakcji samoniezgodności.

W sferze hipotez pozostaje nadal problem specyficzności reakcji rozpoznania, a także problem mechanizmu reakcji odrzucenia. Zgodnie z ogólnymi założeniami, w reakcji rozpoznania powinny uczestniczyć produkty alleli S syntetyzowane w pyłku bądź wbudowane wcześniej do egzyny. Obecnie przypuszcza się, że mogą to być białka, które albo modyfikują SLG, ewentualnie pełnią funkcję liganda indukującego powstawanie aktywnego kompleksu SLG/SRK. Tworzenie aktywnego kompleksu jest bardzo prawdopodobne zważywszy, że SLG są białkami sekrecyjnymi mogącymi się swobodnie przemieszczać w ścianie komórkowej. Związanie liganda, produktu odpowiedniego allelu S, pochodzącego z pyłku będzie prowadzić do utworzenia kompleksu dimerycznego typu SLG/SRK bądź tetramerycznego typu SRK/SLG-SLG/SRK (rys. 7) aktywującego w wyrostkach ciąg reakcji prowadzących do odrzucenia pyłku [101]. Mechanizm aktywacji byłby więc podobny do aktywacji receptorowej kinazy tyrozynowej bądź receptorowej kinazy serynowo/treoninowej będącej np. błonowym receptorem aktywowanym przez czynniki TGFβ [41, 114]. W przypadku recesywnego locusu S₂ *B. oleracea* aktywny kompleks zawierałby dodatkowo nieaktywną SRK pozbawioną domeny wewnątrzkomórkowej (rys. 7).

W ostatnim czasie badany był gen SLA₂ (*S-locus anther*) w pylniku *B. oleracea*, którego dwa transkrypty zidentyfikowano w komórkach tapetum i w mikrosporze. Autorzy przypuszczają, że translacja jednego z transkryptów, regulowana przez drugi nie podlegający składaniu (splicingowi), daje białko o masie cząsteczkowej 7,5–10 kDa [7]. Białka o podobnej masie cząsteczkowej były izolowane już wcześniej z powierzchni pyłku *B. oleracea* i *B. napus* [23, 43]. Białka te mają 8 reszt cysteinowych w regionie C-końcowym i reagują z białkami SLG i SLR₁ znamienia [95]. Białkiem kandydującym do roli pyłkowego liganda może być również białko

SLL₁ (*S-locus linked*), którego gen podlega ekspresji w pylniku tylko u rośliny samoniezgodnej [118]. W tym miejscu należy również zaznaczyć, że niski poziom ekspresji genów SLG/SRK stwierdzany był także w pylniku, chociaż jak na razie, brak jest jakichkolwiek sugestii odnośnie roli tych białek w tym miejscu. Jak dotychczas brak jest również jakichkolwiek jednoznacznych wyników, które mogłyby sugerować sposób funkcjonowania mechanizmu reakcji odrzucenia pyłku samoniezgodnego. W najprostszym przypadku reakcja mogła by się sprowadzać do fosforylacji syntetazy (13) glukanowej. Aktywowany w ten sposób enzym syntetyzowałby w komórkach wyrostkowych kalozę, która odcinając pyłek uniemożliwia jego hydratację. Inna możliwość to indukowanie przez kinazę białkową syntezy substancji hamującej kiełkowanie pyłku. Produkowanie takich substancji w słupku było już postulowane przed wielu laty przez niektórych badaczy. Nie można także wykluczyć możliwości modyfikacji bądź inaktywacji pewnych niezidentyfikowanych jeszcze substancji adhezyjnych, które determinowałyby polarność pyłku. Jak wiadomo, poprzedzająca kiełkowanie polaryzacja pyłku wiąże się ze zmianami stężenia jonów wapnia oraz reorganizacją cytoszkieletu w jego wnętrzu.

UWAGI KOŃCOWE

Poznane dotychczas molekularne mechanizmy samoniezgodności odnoszą się w zasadzie bądź do procesu kiełkowania pyłku, bądź wczesnej fazy wzrostu łagiewki pyłkowej. Staje się więc zrozumiałe, że dalszy postęp w poznawaniu mechanizmów samoniezgodności zależy w dużym stopniu od zrozumienia szczegółowych mechanizmów kiełkowania pyłku oraz ukierunkowanego wzrostu łagiewki prowadzącego do zapłodnienia. W tym miejscu należy podkreślić, że w odniesieniu do mechanizmu wzrostu łagiewki pyłkowej funkcjonuje nadal szereg poglądów i to nie tylko z powodu niewyjaśnionej do końca natury substancji sygnałowych skierujących łagiewkę do woreczka zalążkowego, ale także z powodu niejasnego mechanizmu wierzchołkowego wzrostu łagiewki. Łagiewka pyłkowa, niezależnie od rodzaju słupka, zawsze rośnie zewnątrzkomórkowo w ścianach komórkowych tkanki transmisyjnej bądź warstwy epidermalnej słupka otwartego. Dzisiaj już wiadomo, że ściany komórkowe tworząc tzw. zewnątrzkomórkowe matriks ECM (*extracellular matrix*) pełnią aktywną funkcję w wielu procesach fizjologicznych, w tym również w ukierunkowanym wzroście łagiewki. W interesujących doświadczeniach, w których śledzono przemieszczanie się mikrokuleczek lateksowych w tkance transmisyjnej, wykazano, że ich transport w ECM przypomina wzrost łagiewki pyłkowej [89]. Wydaje się więc, że chemotropowe ukierunkowanie łagiewki ma miejsce raczej w końcowej fazie wzrostu i ma na celu naprowadzenie łagiewki do okienka woreczka zalążkowego [45]. W najbliższym czasie będą zapewne po-

dejmowane próby weryfikacji modelu wzrostu, w którym składniki sekrecyjne ECM m.in. witronektyna wiążą się z cytoszkieletem łagiewki poprzez zlokalizowane w błonie plazmatycznej białka receptorowe z rodziny integryn. Istotę tego mechanizmu stanowiłaby tzw. adhezja zogniskowana (*focal adhesion*) wiążąca cytoszkieleć łagiewki z ECM [50, 89].

W ostatnich latach podejmowane były próby identyfikacji białek sekrecyjnych znamienia i szlaku transmisyjnego. Dotychczas wykazano, że są to glikoproteiny należące do białek z rodziny AGP (*arabinogalactan proteins*), a ponadto białka bogate w galaktozę, białka z rodziny ekstensyn bogate w hydroksyprolinę, a także białka mające cechy ekstensyn i AGP [13,14]. Charakterystyczne właściwości oraz proponowane funkcje białek z poszczególnych klas omówione są w pracy przeglądowej [91]. Szczególną uwagę zwraca się ostatnio na glikoproteiny TTS (*transmitting tissue-specific*), które oprócz roli odżywczej mogłyby też pełnić funkcję naprowadzania łagiewki do zalążni [15, 112, 115].

Wierchołkowy wzrost łagiewki uwarunkowany transportem pęcherzyków sekrecyjnych, a także zorganizowany ruch organelli i jąder, zwracają uwagę badaczy na cytoszkieleć łagiewki [86]. Ostatnie lata przyniosły również tutaj pewien postęp wyrażający się m.in. w biochemicznej identyfikacji szeregu składników cytoszkieletu, w tym polipeptydów miozyny i białek pokrewnych z kinezynami i dyneinami [11, 72].

Niezależnie od tego, czy przyjmiemy, że wzrost apikalny łagiewki kontrolują ściany komórkowe łącznie z turgorem, czy też, że jest on kontrolowany przez cytoszkieleć, w obu przypadkach istotną rolę grają jony wapnia. Jony wapnia sieciują bowiem pektyny, co w efekcie prowadzi do wzmocnienia ściany wierchołka łagiewki, a z drugiej strony aktywnie uczestniczą w reorganizacji cytoszkieletu. Tak więc rozmieszczenie oraz transport jonów wapnia przez błonę plazmatyczną łagiewki jest obecnie jednym z najbardziej intensywnie badanych problemów związanych z zapyłaniem i zapłodnieniem. Przegląd literatury na ten temat przedstawiono w obszernej pracy przeglądowej [96], a także pracach z ostatnich lat [13, 64, 113].

Uwagę zainteresowanych Czytelników pragniemy zwrócić również na postęp badań nad rolą związków fenolowych z grupy flawonoli, a także długołańcuchowych lipidów w międzykomórkowych interakcjach pyłek-słupek [13, 65, 113].

Po oddaniu pracy do druku w jednym z ostatnich zeszytów *Science* (1997; 276: 1563–1566) Ikeda i wsp. opublikowali pracę zatytułowaną: „*An aquaporin-like gene required for the Brassica self-incompatibility response*”. Wyniki przedstawione w pracy prowadzą do wniosku, że rola receptorowej kinazy białkowej SRK polega na regulowaniu drogą fosforylacji aktywności kanałów wodnych homologicznych z akwaporynami *A. thaliana*, zlokalizowanych w błonie plazmatycznej komórek wyrostkowych znamienia. Reakcja odrzucenia pyłku samoniezgodnego może zatem polegać na braku możliwości hydratacji pyłku padającego na „suche” znamie roślin z rodziny *Cruciferae*.

LITERATURA

- [1] AI Y, SINGH A, COLEMAN CE, IOERGER TR, KHEYR-POUR A, KAO T-H. Self-incompatibility in *Petunia inflata*: isolation and characterization of cDNAs encoding three S-allele-associated proteins. *Sex Plant Reprod* 1990; **3**: 130–138.
- [2] ANDERSON MA, CORNISH EC, MAU S-L, WILLIAMS EG, HOGGART R, ATKINSON A, BONIG I, GREGO B, SIMPSON R, ROCHE PJ, HALEY JD, PENSCHOW JD, NIALL HD, TREGEAR GW, COGHLAN JP, CRAWFORD RJ, CLARKE AE. Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature* 1986; **321**: 38–44.
- [3] ANDERSON MA, McFADDEN GI, BERNATZKY R, ATKINSON A, ORPIN T, DEDMAN H, TREGEAR G, FERNLEY R, CLARKE AE. Sequence variability of three alleles of the self-incompatibility gene of *Nicotiana glauca*. *Plant Cell* 1989; **1**: 483–491.
- [4] BEDNARSKA E. Interakcje międzykomórkowe podczas płciowego rozmnażania roślin kwiatowych. *Post Biol Kom* 1992; **19**: 293–309.
- [5] BOYES DC, CHEN CH, TANTIKANJANA T, ESCH JJ, NASRALLAH ME, NASRALLAH JB. Isolation of a second S-locus related cDNA from *Brassica oleracea*: genetic relationships between the S locus and two related loci. *Genetics* 1991; **127**: 221–228.
- [6] BOYES DC, NASRALLAH JB. Physical linkage of the SLG and SRK genes at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Mol Gen Genet* 1993; **236**: 369–373.
- [7] BOYES DC, NASRALLAH JB. An anther-specific gene encoded by an S locus haplotype of *Brassica oleracea* produces complementary and differentially regulated transcripts. *Plant Cell* 1995; **7**: 1283–1294.
- [8] BROOHAERTS W, JANSSENS GA, PROOST P, BROEKAERT WF. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. *Plant Mol Biol* 1995; **27**: 499–511.
- [9] BROOHAERTS WJ, VAN LAERE A, WITTERS R, PRÉAUX G, DECOCK B, VAN DAMME J, VENDRIG JC. Purification and N-terminal sequencing of style glycoproteins associated with self-incompatibility in *Petunia hybrida*. *Plant Mol Biol* 1989; **14**: 93–102.
- [10] BROOHAERTS WJ, VANVINCKENROYE P, DECOCK B, VAN DAMME J, VENDRIG JC. *Petunia hybrida* S-proteins: ribonuclease activity and the role of their glycan side chains in self-incompatibility. *Sex Plant Reprod* 1991; **4**: 258–266.
- [11] CAI G, MOSCATELLI A, CASINO CD, CRESTI M. Cytoplasmic motors and pollen tube growth. *Sex Plant Reprod* 1996; **9**: 59–64.
- [12] CHEN C-H, NASRALLAH JB. A new class of S sequences defined by a pollen recessive self-incompatibility allele of *Brassica oleracea*. *Mol Gen Genet* 1990; **222**: 241–248.
- [13] CHEUNG AY. Pollen-pistil interactions in compatible pollination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 3077–3080.
- [14] CHEUNG AY. The pollen tube growth pathway: its molecular and biochemical contributions and responses to pollination. *Sex Plant Reprod* 1996; **9**: 330–336.
- [15] CHEUNG AY, WANG H, WU H-M. A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell* 1995; **82**: 383–393.
- [16] CLARK KR, OKULEY JJ, COLLINS PD, SIMS TL. Sequence variability and developmental expression of S-alleles in self-incompatible and pseudo-self-compatible petunia. *Plant Cell* 1990; **2**: 815–826.
- [17] COLEMAN CE, KAO T-H. The flanking regions of two *Petunia inflata* S alleles are heterogeneous and contain repetitive sequences. *Plant Mol Biol* 1992; **18**: 725–737.
- [18] CORNISH EC, PETTITT JM, BONIG I, CLARKE AE. Developmentally controlled expression of a gene associated with self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature* 1987; **326**: 99–102.

- [19] DELORME V, GIRANTON J-L, HATZFELD Y, FRIRY A, HEIZMANN P, ARIZA MJ, DUMAS C, GAUDE T, COCK JM. Characterization of the S locus genes, SLG and SRK, of the *Brassica* S₃ haplotype: identification of a membrane-localized protein encoded by the S locus receptor kinase gene. *Plant J* 1995; **7**: 429–440.
- [20] DICKINSON H. Simply a social disease? *Nature* 1994; **367**: 517–518.
- [21] DICKINSON HG, CRABBE MJC, GAUDE T. Sporophytic self-incompatibility systems: S gene products. *Int Rev Cytol* 1992; **140**: 525–561.
- [22] DODDS PN, CLARKE AE, NEWBIGIN E. A molecular perspective on pollination in flowering plants. *Cell* 1996; **85**: 141–144.
- [23] DOUGHTY J, HEDDERSON F, McCUBBIN A, DICKINSON H. Interaction between a coating-borne peptide of the *Brassica* pollen grain and stigmatic S (self-incompatibility)-locus-specific glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 467–471.
- [24] DWYER KD, LALONDE BA, NASRALLAH JB, NASRALLAH ME. Structure and expression of AtS1, an *Arabidopsis thaliana* gene homologous to the S-locus related genes of *Brassica*. *Mol Gen Genet* 1992; **231**: 442–448.
- [25] DWYER KG, BALENT MA, NASRALLAH JB, NASRALLAH ME. DNA sequences of self-incompatibility genes from *Brassica campestris* and *B. oleracea*: polymorphism predating speciation. *Plant Mol Biol* 1991; **16**: 481–486.
- [26] DWYER KG, KANDASAMY MK, MAHOSKY DI, ACCIAI J, KUDISH BI, MILLER JE, NASRALLAH ME, NASRALLAH JB. A superfamily of S locus-related sequences in *Arabidopsis*: diverse structures and expression patterns. *Plant Cell* 1994; **6**: 1829–1843.
- [27] FERRARI TE, BRUNS D, WALLACE DH. Isolation of a plant glycoprotein involved with control of intercellular recognition. *Plant Physiol* 1981; **67**: 270–277.
- [28] FOOTE HCC, RIDE JP, FRANKLIN-TONG VE, WALKER EA, LAWRENCE MJ, FRANKLIN FCH. Cloning and expression of a distinctive class of self-incompatibility (S) gene from *Papaver rhoeas* L. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 2265–2269.
- [29] FRANKLIN FCH, LAWRENCE MJ, FRANKLIN-TONG VE. Cell and molecular biology of self-incompatibility in flowering plants. *Int Rev Cytol* 1995; **158**: 1–64.
- [30] FRANKLIN-TONG VE, ATWAL KK, HOWELL EC, LAWRENCE MJ, FRANKLIN FCH. Self-incompatibility in *Papaver rhoeas*: there is no evidence for the involvement of stigmatic ribonuclease activity. *Plant Cell Environ* 1991; **14**: 423–429.
- [31] FRANKLIN-TONG VE, FRANKLIN FCH. Gametophytic self-incompatibility in *Papaver rhoeas* L. *Sex Plant Reprod* 1992; **5**: 1–7.
- [32] FRANKLIN-TONG VE, RIDE JP, FRANKLIN FCH. Recombinant stigmatic self-incompatibility (S-) protein elicits a Ca²⁺ transient in pollen of *Papaver rhoeas*. *Plant J* 1995; **8**: 299–307.
- [33] FRANKLIN-TONG VE, RIDE JP, READ ND, TREWAVAS AJ, FRANKLIN FCH. The self-incompatibility response in *Papaver rhoeas* is mediated by cytosolic free calcium. *Plant J* 1993; **4**: 163–177.
- [34] FRANKLIN-TONG VE, RUUTH E, MARMAY P, LAWRENCE MJ, FRANKLIN FCH. Characterization of a stigmatic component from *Papaver rhoeas* L. which exhibits the specific activity of a self-incompatibility (S-) gene product. *New Phytol* 1989; **112**: 307–315.
- [35] GORING DR, GLAVIN TL, SCHAFER U, ROTHSTEIN SJ. An S receptor kinase gene in self-compatible *Brassica napus* has a 1-bp deletion. *Plant Cell* 1993; **5**: 531–539.
- [36] GORING DR, ROTHSTEIN SJ. The S-locus receptor kinase gene in a self-incompatible *Brassica napus* line encodes a functional serine/threonine kinase. *Plant Cell* 1992; **4**: 1273–1281.
- [37] GRAY JE, McCLURE BA, BÖNIG I, ANDERSON MA, CLARKE AE. Action of the style product of the self-incompatibility gene of *Nicotiana glauca* (S-RNase) on in vitro-grown pollen tubes. *Plant Cell* 1991; **3**: 271–283.
- [38] GREEN PJ. The ribonucleases of higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1994; **45**: 421–445.

- [39] HARING V, GRAY JE, McCLURE BA, ANDERSON MA, CLARKE AE. Self-incompatibility: a self-recognition system in plants. *Science* 1990; **250**: 937–941.
- [40] HEARN MJ, FRANKLIN FCH, RIDE JP. Identification of a membrane glycoprotein in pollen of *Papaver rhoeas* which binds stigmatic self-incompatibility (S-) proteins. *Plant J* 1996; **9**: 467–475.
- [41] HELDIN C-H. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 1995; **80**: 213–223.
- [42] HINATA K, WATANABE M, TORIYAMA K, ISOGAI A. A review of recent studies on homomorphic self-incompatibility. *Int Rev Cytol* 1993; **143**: 257–296.
- [43] HISCOCK SJ, DOUGHTY J, WILLIS AC, DICKINSON HG. A 7-kDa pollen coating-borne peptide from *Brassica napus* interacts with S-locus glycoprotein and S-locus-related glycoprotein. *Planta* 1995; **196**: 367–374.
- [44] HUANG S, LEE H-S, KARUNANANDAA B, KAO T-H. Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. *Plant Cell* 1994; **6**: 1021–1028.
- [45] HÜLSKAMP M, SCHNEITZ K, PRUITT RE. Genetic evidence for a long-range activity that directs pollen tube guidance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1995; **7**: 57–64.
- [46] IOERGER TR, CLARK AG, KAO T-H. Polymorphism at the self-incompatibility locus in *Solanaceae* predates speciation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 9732–9735.
- [47] IOERGER TR, GOHLKE JR, XU B, KAO T-H. Primary structural features of the self-incompatibility protein in the *Solanaceae*. *Sex Plant Reprod* 1991; **4**: 81–87.
- [48] ISOGAI A, TAKAYAMA S, TSUKAMOTO C, UEDA Y, SHIOZAWA H, HINATA K, OKAZAKI K, SUZUKI A. S-locus-specific glycoproteins associated with self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Plant Cell Physiol* 1987; **28**: 1279–1291.
- [49] JAHNEN W, BATTERHAM MP, CLARKE AE, MORITZ RL, SIMPSON RJ. Identification, isolation, and N-terminal sequencing of style glycoproteins associated with self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Plant Cell* 1989; **1**: 493–499.
- [50] JAUH GY, LORD EM. Movement of the tube cell in the lily style in the absence of the pollen grain and the spent pollen tube. *Sex Plant Reprod* 1995; **8**: 168–172.
- [51] KAMBOJ RK, JACKSON JF. Self-incompatibility alleles control a low molecular weight, basic protein in pistils of *Petunia hybrida*. *Theor Appl Genet* 1986; **71**: 815–819.
- [52] KANDASAMY MK, PAOLILLO DJ, FARADAY CD, NASRALLAH JB, NASRALLAH ME. The S-locus specific proteins of *Brassica* accumulate in the cell wall of developing stigma papillae. *Devel Biol* 1989; **134**: 462–472.
- [53] KAO T-H, HUANG S. Gametophytic self-incompatibility: a mechanism for self/nonself discrimination during sexual reproduction. *Plant Physiol* 1994; **105**: 461–466.
- [54] KAO T-H, McCUBBIN AG. How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 12059–12065.
- [55] KARUNANANDAA B, HUANG S, KAO T-H. Carbohydrate moiety of the *Petunia inflata* S₃ protein is not required for self-incompatibility interactions between pollen and pistil. *Plant Cell* 1994; **6**: 1933–1940.
- [56] KAUFMANN H, SALAMINI F, THOMPSON RD. Sequence variability and gene structure at the self-incompatibility locus of *Solanum tuberosum*. *Mol Gen Genet* 1991; **226**: 457–466.
- [57] KAWATA Y, SAKIYAMA F, TAMAOKI H. Amino-acid sequence of ribonuclease T₂ from *Aspergillus oryzae*. *Eur J Biochem* 1988; **176**: 683–697.
- [58] KHEYR-POUR A, BINTRIM SB, IOERGER TR, REMY R, HAMMOND SA, KAO T-H. Sequence diversity of pistil S-proteins associated with gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Sex Plant Reprod* 1990; **3**: 88–97.
- [59] KIRCH HH, UHRIG H, LOTTSCHEICH F, SALAMINI F, THOMPSON RD. Characterization of proteins associated with self-incompatibility in *Solanum tuberosum*. *Theor Appl Genet* 1989; **78**: 581–588.

- [60] KOWYAMA Y, KAKEDA K, NAKANOR, HATTORI T. SLG/SRK-like genes are expressed in the reproductive tissues of *Ipomoea trifida*. *Sex Plant Reprod* 1995; **8**: 333–338.
- [61] LALONDE BA, NASRALLAH ME, DWYER KG, CHEN C-H, BARLOW B, NASRALLAH JB. A highly conserved *Brassica* gene with homology to the S-locus-specific glycoprotein structural gene. *Plant Cell* 1989; **1**: 249–258.
- [62] LEE H-S, HUANG S, KAO T-H. S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature* 1994; **367**: 560–563.
- [63] LEWIS D. Genetic control of specificity and activity of the S antigen in plants. *Proc R Soc London Ser B* 1960; **151**: 468–477.
- [64] MALHO R, TREWAVAS AJ. Localized apical increases of cytosolic free calcium control pollen tube orientation. *Plant Cell* 1996; **8**: 1935–1949.
- [65] MASCARENHAS JP. Molecular mechanisms of pollen tube growth and differentiation. *Plant Cell* 1993; **5**: 1303–1314.
- [66] MATTON DP, NASS N, CLARKE AE, NEWBIGIN E. Self-incompatibility: how plants avoid illegitimate offspring. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 1992–1997.
- [67] MAU S-L, WILLIAMS EG, ATKINSON A, ANDERSON MA, CORNISH EC, GREGO B, SIMPSON RJ, KHEYN-POUR A, CLARKE AE. Style proteins of a wild tomato (*Lycopersicon peruvianum*) associated with expression of self-incompatibility. *Planta* 1986; **169**: 184–191.
- [68] McCLURE BA, GRAY JE, ANDERSON MA, CLARKE AE. Self-incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA. *Nature* 1990; **347**: 757–760.
- [69] McCLURE BA, HARING V, EBERT PR, ANDERSON MA, SIMPSON RJ, SAKIYAMA F, CLARKE AE. Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* 1989; **342**: 955–957.
- [70] McCUBBIN AG, CHUNG Y-Y, KAO T-H. A mutant S₃ RNase of *Petunia inflata* lacking RNase activity has an allele-specific dominant negative effect on self-incompatibility interactions. *Plant Cell* 1997; **9**: 85–95.
- [71] McKEON TA, LYMAN ML, PRESTAMO G. Purification and characterization of two ribonucleases from developing tomato fruit. *Arch Biochem Biophys* 1991; **290**: 303–311.
- [72] MOSCATELLI A, CAI G, LIU G-Q, TIEZZI A, CRESTI M. Dynein-related polypeptides in pollen and pollen tubes. *Sex Plant Reprod* 1996; **9**: 312–317.
- [73] MURFETT J, ATHERTON TL, MOU B, GASSER CS, McCLURE BA. S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana glauca* causes S-allele-specific pollen rejection. *Nature* 1994; **367**: 563–566.
- [74] NASRALLAH JB, KAO T-H, CHEN C-H, GOLDBERG ML, NASRALLAH ME. Amino-acid sequence of glycoproteins encoded by three alleles of the S locus of *Brassica oleracea*. *Nature* 1987; **326**: 617–619.
- [75] NASRALLAH JB, KAO T-H, GOLDBERG ML, NASRALLAH ME. A cDNA clone encoding an S-locus-specific glycoprotein from *Brassica oleracea*. *Nature* 1985; **318**: 263–267.
- [76] NASRALLAH JB, NASRALLAH ME. Pollen-stigma signaling in the sporophytic self-incompatibility response. *Plant Cell* 1993; **5**: 1325–1335.
- [77] NASRALLAH JB, NISHIO T, NASRALLAH ME. The self-incompatibility genes of *Brassica oleracea*: expression and use in genetic ablation of floral tissues. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1991; **42**: 393–422.
- [78] NASRALLAH JB, RUNDLE SJ, NASRALLAH ME. Genetic evidence for the requirement of the *Brassica* S-locus receptor kinase gene in the self-incompatibility response. *Plant J* 1994; **5**: 373–384.
- [79] NASRALLAH JB, STEIN JC, KANDASAMY MK, NASRALLAH ME. Signaling the arrest of pollen tube development in self-incompatible plants. *Science* 1994; **266**: 1505–1508.
- [80] NASRALLAH JB, YU S-M, NASRALLAH ME. Self-incompatibility genes of *Brassica oleracea*: expression, isolation, and structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 5551–5555.
- [81] NASRALLAH ME, KANDASAMY MK, NASRALLAH JB. A genetically defined *trans*-acting locus regulates S-locus function in *Brassica*. *Plant J* 1992; **2**: 497–506.

- [82] NASRALLAH ME, WALLACE DH. Immunochemical detection of antigens in self-incompatibility genotypes of cabbage. *Nature* 1967; **213**: 700–701.
- [83] NEWBIGIN E. The evolution of self-incompatibility: a molecular voyeurs perspective. *Sex Plant Reprod* 1996; **9**: 357–361.
- [84] NEWBIGIN E, ANDERSON MA, CLARKE AE. Gametophytic self-incompatibility systems. *Plant Cell* 1993; **5**: 1315–1324.
- [85] NISHIO T, HINATA K. Comparative studies on S-glycoproteins purified from different S-genotypes in self-incompatible *Brassica* species. I. Purification and chemical properties. *Genetics* 1982; **100**: 641–647.
- [86] PIERSON ES, CRESTI M. Cytoskeleton and cytoplasmic organization of pollen and pollen tubes. *Int Rev Cytol* 1992; **140**: 73–125.
- [87] ROYO J, KUNZ C, KOWYAMA Y, ANDERSON M, CLARKE AE, NEWBIGIN E. Loss of a histidine residue at the active site of S-locus ribonuclease is associated with self-compatibility in *Lycopersicon peruvianum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 6511–6514.
- [88] RUDD JJ, FRANKLIN FCH, LORD JM, FRANKLIN-TONG VE. Increased phosphorylation of a 26-kD pollen protein is induced by the self-incompatibility response in *Papaver rhoeas*. *Plant Cell* 1996; **8**: 713–724.
- [89] SANDERS LC, LORD EM. A dynamic role for the stylar matrix in pollen tube extension. *Int Rev Cytol* 1992; **140**: 297–318.
- [90] SCUTT CP, GATES PJ, GATEHOUSE JA, BOULTER D, CROY RRD. A cDNA encoding an S-locus specific glycoprotein from *Brassica oleracea* plants containing the S₅ self-incompatibility allele. *Mol Gen Genet* 1990; **220**: 409–413.
- [91] SHOWALTER AM. Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 1993; **5**: 9–23.
- [92] SIMS TL. Genetic regulation of self-incompatibility. *Crit Rev Plant Sci* 1993; **12**: 129–167.
- [93] SINGH A, AI Y, KAO T-H. Characterization of ribonuclease activity of three S-allele-associated proteins of *Petunia inflata*. *Plant Physiol* 1991; **96**: 61–68.
- [94] SINGH A, KAO T-H. Gametophytic self-incompatibility: biochemical, molecular genetic, and evolutionary aspects. *Int Rev Cytol* 1992; **140**: 449–483.
- [95] STANCHEV BS, DOUGHTY J, SCUTT CP, DICKINSON H, CROY RRD. Cloning of PCP1, a member of a family of pollen coat protein (PCP) genes from *Brassica oleracea* encoding novel cysteine-rich proteins involved in pollen-stigma interactions. *Plant J* 1996; **10**: 303–313.
- [96] STEER MW, STEER JM. Pollen tube tip growth. *New Phytol* 1989; **111**: 323–358.
- [97] STEIN JC, DIXIT R, NASRALLAH ME, NASRALLAH JB. SRK, the stigma-specific S locus receptor kinase of *Brassica*, is targeted to the plasma membrane in transgenic tobacco. *Plant Cell* 1996; **8**: 429–445.
- [98] STEIN JC, HOWLETT B, BOYES DC, NASRALLAH ME, NASRALLAH JB. Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 8816–8820.
- [99] STEIN JC, NASRALLAH JB. A plant receptor-like gene, the S-locus receptor kinase of *Brassica oleracea* L., encodes a functional serine/threonine kinase. *Plant Physiol* 1993; **101**: 1103–1106.
- [100] TAKAYAMA S, ISOGAI A, TSUKAMOTO C, UEDA Y, HINATA K, OKAZAKI K, SUZUKI A. Sequences of S-glycoproteins, products of the *Brassica campestris* self-incompatibility locus. *Nature* 1987; **326**: 102–105.
- [101] TANTIKANJANA T, NASRALLAH ME, STEIN JC, CHEN C-H, NASRALLAH JB. An alternative transcript of the S locus glycoprotein gene in a class II pollen-recessive self-incompatibility haplotype of *Brassica oleracea* encodes a membrane-anchored protein. *Plant Cell* 1993; **5**: 657–666.
- [102] THOMPSON RD, KIRCH H-H. The S-locus of flowering plants: when self-rejection is self-interest. *Trends Genet* 1992; **8**: 381–387.

- [103] TOBIAS CM, HOWLETT B, NASRALLAH JB. An *Arabidopsis thaliana* gene with sequence similarity to the S locus receptor kinase of *Brassica oleracea*. *Plant Physiol* 1992; **99**: 284–290.
- [104] TOBIAS CM, NASRALLAH JB. An S-locus-related gene in *Arabidopsis* encodes a functional kinase and produces two classes of transcripts. *Plant J* 1996; **10**: 523–531.
- [105] TRICK M. Genomic sequence of a *Brassica* S locus-related gene. *Plant Mol Biol* 1990; **15**: 203–205.
- [106] TRICK M, FLAVELL RB. A homozygous S genotype of *Brassica oleracea* expresses two S-like genes. *Mol Gen Genet* 1989; **218**: 112–117.
- [107] TRICK M, HEIZMANN P. Sporophytic self-incompatibility systems: *Brassica* S gene family. *Int Rev Cytol* 1992; **140**: 485–524.
- [108] TSAI D-S, LEE H-S, POST LC, KREILING KM, KAO T-H. Sequence of an S-protein of *Lycopersicon peruvianum* and comparison with other solanaceous S-proteins. *Sex Plant Reprod* 1992; **5**: 256–263.
- [109] WALKER JC. Receptor-like protein kinase genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 1993; **3**: 451–456.
- [110] WALKER JC. Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants. *Plant Mol Biol* 1994; **26**: 1599–1609.
- [111] WALKER JC, ZHANG R. Relationship of a putative receptor protein kinase from maize to the S-locus glycoproteins of *Brassica*. *Nature* 1990; **345**: 743–746.
- [112] WANG H, WU H-M, CHEUNG AY. Development and pollination regulated accumulation and glycosylation of a stylar transmitting tissue-specific proline-rich protein. *Plant Cell* 1993; **5**: 1639–1650.
- [113] WILHELMI LK, PREUSS D. Blazing new trails. Pollen tube guidance in flowering plants. *Plant Physiol* 1997; **113**: 307–312.
- [114] WRANA JL, ATTISANO L, WIESER R, VENTURA F, MASSAGUÉ J. Mechanism of activation of the TFG β -receptor. *Nature* 1994; **370**: 341–347.
- [115] WU H-M, WANG H, CHEUNG AY. A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower. *Cell* 1995; **82**: 395–403.
- [116] XU B, GRUN P, KHEYR-POUR A, KAO T-H. Identification of pistil-specific proteins associated with three self-incompatibility alleles in *Solanum chacoense*. *Sex Plant Reprod* 1990; **3**: 54–60.
- [117] XUE Y, CARPENTER R, DICKINSON HG, COEN ES. Origin of allelic diversity in *Antirrhinum* S locus RNases. *Plant Cell* 1996; **8**: 805–814.
- [118] YU K, SCHAFFER U, GLAVIN TL, GORING DR, ROTHSTEIN SJ. Molecular characterization of the S locus in two self-incompatible *Brassica napus* lines. *Plant Cell* 1996; **8**: 2369–2380.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 22.05. 1997 r.

Przyjęto: 30.09. 1997 r.

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

KLONOTYPOWE LIMFOCYTY B W SZPICZAKU PLAZMOCYTOWYM

CLONOTYPIC B LYMPHOCYTES IN MULTIPLE MYELOMA

Zofia M. RUPNIEWSKA¹, Jacek ROLIŃSKI^{1,2}

¹Katedra i Klinika Hematologii AM Lublin,

²Zakład Immunologii Klinicznej AM Lublin

Motto: „Teraźniejszość jest zawsze
brzemienna przyszłością”

Z listu Leibniza do Varignona

Streszczenie: Populacja krążących komórek B u chorych ze szpiczakiem plazmocytowym obejmuje zmienną co do wielkości subpopulację mającą taką samą rekombinację genów VDJ IgH jak szpiczakowe plazmocyty. Są to klonotypowe komórki B. Biologiczne znaczenie tej subpopulacji nie jest do końca wyjaśnione. Jest ona heterogenna i prawdopodobnie zawiera zarówno nie-nowotworowe komórki B, jak i klonogenne, nowotworowe komórki B. Te ostatnie stanowią krążący rezerwuuar macierzystych komórek szpiczakowych, umożliwiając szerzenie się nowotworu. Omówiono szereg cech, takich jak: ekspresja antygenów CD 34, CD 10, hiperdiploidia i nieprawidłowości niektórych genów, wskazujące na złośliwy charakter tych komórek B. Poruszono także problem komórki docelowej, w której ma miejsce rozstrzygający incydent (hit), decydujący o złośliwej transformacji.

Słowa kluczowe: szpiczak plazmocytowy, rekombinacje genów immunoglobulinowych, klonotypowe i klonogenne komórki B, pochodzenie szpiczakowych plazmocytoów.

Summary: Population of circulating multiple myeloma B cells contains variable subsets of cells with the same VDJ IgH genes recombination as malignant plasma cells. They are clonotypic B cells. Biological significance of this subpopulation is still unclear. It is heterogenous and it probably includes both normal B cells and malignant clonogenic B cells. The last ones constitute a circulating reservoir of progenitor multiple myeloma cells which facilitate spread of the neoplasm. Several features have been discussed, such as: expression of CD 34 and CD10 antigens, hyperploidy and abnormality of some genes which indicate that these B cells are neoplastic. Attention was given to the problem of the target cell where the main incident initiating malignant transformation takes place.

Key words: multiple myeloma, immunoglobulin genes recombination, clonotypic and clonogenic B cells, origin of malignant plasma cells

Klon komórek nowotworowych u chorych ze szpiczakiem plazmocytowym jest heterogenny i składa się zarówno z komponentu komórek osiadłych w szpiku, jak i komórek krążących we krwi obwodowej. Dzięki tym ostatnim komórkom możliwe jest szerzenie się nowotworu z pierwotnego ogniska do odległych miejsc w układzie kostnym. W końcowym stadium choroby w komponentcie krążącym przeważają nowotworowe plazmocyty. Natomiast we wcześniejszych okresach we krwi obwodowej krąży populacja dojrzałych komórek B, nazywanych także komórkami pre-szpiczakowymi, zaś typowe komórki plazmatyczne występują w śladowych ilościach.

Jeszcze w początkach lat siedemdziesiątych Lindström i wsp. oraz Mellstedt i wsp. [24] sygnalizowali, że limfocyty krwi obwodowej chorych ze szpiczakiem plazmocytowym noszą na powierzchni immunoglobuliny (Ig) o takim samym idyotypie jak klon plazmocytoów szpiczakowych. Takie monoklonalne limfocyty B wykryto także w szpiku u wszystkich chorych ze szpiczakiem plazmocytowym niezależnie od okresu choroby. U pacjentów z aktywną postacią choroby odsetek monoklonalnych limfocytów B w szpiku był stosunkowo niski w porównaniu z odsetkiem nowotworowych plazmocytoów. Natomiast u pacjentów w okresie remisji klinicznej, gdy w szpiku było zaledwie kilka procent komórek plazmatycznych, występował proporcjonalny wzrost odsetka monoklonalnych limfocytów. Odsetek monoklonalnych limfocytów we krwi obwodowej zależał od kresu choroby i był najwyższy w III stadium [24]. Obecnie klon nowotworowych komórek B we krwi obwodowej chorych ze szpiczakiem plazmocytowym może zostać rozpoznany dzięki badaniom rearanżacji genów VDJ łańcuchów ciężkich Ig (IgH; H – od *heavy*).

Bardzo ważnym zdarzeniem na poziomie molekularnym w patogenezie szpiczaka plazmocytoowego jest rekombinacja i mutacja genów Ig. Geny Ig podobnie jak większość genów w komórkach eukariotów, składają się z segmentów kodujących – egzonów, podzielonych sekwencjami niekodującymi – intronami. Każdą część łańcucha Ig koduje odrębny egzon. Część zmienna łańcucha IgH jest kodowana przez sekwencję złożoną z trzech genów: V (*variable*), D (*diversity*) i J (*joining*). Natomiast część zmienna łańcucha lekkiego Ig (IgL; L – od *light*) kodują dwa geny V i J [25,44]. We wczesnym okresie różnicowania komórki B dochodzi do rekombinacji genów V-(D-) J [25,41,44]. Najpierw jeden z 6 genów J łączy się z jednym z ponad 30 genów D i dopiero później do sekwencji D-J jest przyłączony jeden z ponad 200 genów V. Istnieje zatem co najmniej 180 000 możliwych kombinacji V-D-J IgH. Kompleks genów V-D-J koduje trzy regiony hiperzmiennie nazywane także regionami determinującymi dopasowanie przeciwciała do antygeny (*complementary-determining-regions* – CDRs). Drugi egzon genu V koduje CDR 1 i CDR 2, a ponadto w łańcuchu ciężkim gen D koduje większą część CDR

3. CDR 3 odgrywa niezwykle ważną rolę w rozpoznawaniu i wiązaniu antygeny przez IgH.

Czynnikiem zwiększającym różnorodność przeciwciał są mutacje zachodzące w rekombinowanych genach VJ dla IgL i VDJ dla IgH. Mutacje obejmują także CDRs [8,16]. Mutacje występują podczas stymulowanej antygenem proliferacji i różnicowania się limfocytów B w komórki pamięci immunologicznej w ośrodkach rozrodczych grudek chłonnych węzłów chłonnych lub śledziony. Częstotliwość tych mutacji jest 100-krotnie większa niż w spoczynkowych i pierwotnie pobudzonych antygenem limfocytach B. Mutacje mogą prowadzić zarówno do spadku, jak i do wzrostu powinowactwa wytwarzanego przeciwciała wobec antygeny. Ponowne jednak pobudzenie antygenem dokonuje swoistej selekcji stymulując te limfocyty B, których powinowactwo do antygeny wzrosło.

W dalszym etapie syntezy przeciwciał powstaje część stała Ig, najpierw dla IgH, a następnie zaczyna się rekombinacja genów kodujących IgL. Geny dla części stałej IgH leżą w genomie w odpowiedniej kolejności (μ , δ , γ , α , ϵ) określającej kolejność ich transkrypcji i produkcji przeciwciał odpowiedniej klasy. Kompleks genów VDJ łączy się początkowo z genem łańcucha ciężkiego μ . Dojrzałe komórki B IgM⁺ po stymulacji antygenowej mogą zmieniać klasy IgH (*class switch*). Mianowicie gen μ jest tracony, a VDJ specyficznie łączy się z genem γ lub α łańcucha ciężkiego. Ta rekombinacja umożliwia komórce kolejną produkcję przeciwciał różnych klas z zachowaniem tej samej swoistości. Zmiana klasy syntetyzowanych Ig zachodzi w trakcie proliferacji limfocytów B w ośrodkach rozrodczych grudek chłonnych w odpowiedzi na stymulację antygenową i wymaga kooperacji z limfocytami T. Wydaje się, że zmiana klasy IgH zwykle z IgM na IgG może zachodzić także w komórkach B pamięci immunologicznej. Badania powierzchniowych Ig na komórkach B pamięci sugerują:

- że komórka pamięci może jeszcze wykazywać ekspresję IgM i już zmienić izotyp,
- a także, że komórka pamięci IgG⁺ może wykazywać re-ekspresję IgM i IgD [16].

Obecnie uważa się, że unikalnymi markerami genetycznymi dla każdego z klonów komórki B są CDRs. Ze względu na niezwykle różnorodność układu immunologicznego prawdopodobieństwo, że prawidłowe komórki B będą miały takie same sekwencje CDRs jak klon nowotworowy jest bardzo małe. Zwłaszcza ważny jest CDR3 IgH, gdyż w warunkach prawidłowych odgrywa on główną rolę w rozpoznaniu i wiązaniu antygeny [22]. Tak więc sekwencja CDR3 lub rekombinacje genów VDJ w klonie szpiczakowym są unikalnymi nowotworowo-specyficznymi markerami. Sekwencje CDR3 lub rekombinacje genów VDJ w klonie szpiczakowym charakteryzują:

- liczne somatyczne hypermutacje [2,36,45],

– brak zmienności sekwencji wewnątrz klonu, co kontrastuje z heterogennością występującą w chłoniakach B-komórkowych wywodzących się z komórek ośrodków rozrodczych grudek chłonnych [1,49].

Jeśli idzie o ocenę ilościową klonu szpiczakowego, to Bergsagel i wsp. [7] podają, że u chorych w późniejszym okresie szpiczaka plazmocytozowego komórki B krwi obwodowej z klonotypową rekombinacją genów VDJ IgH, identyczną jak w nowotworowych plazmocytach szpiku, występują w liczbie $0,3\text{--}0,4 \times 10^9/l$ krwi. Wartości te mogą być zmienne w zależności od pacjenta i u jednych klonotypowe komórki stanowią większość krążących komórek B, a u innych występują w mniejszości. Monoklonalna populacja krążących komórek B u poszczególnych pacjentów może przetrwać po przebytej chemioterapii. Ponadto Witzig i wsp. [47] wykazali, że u niektórych chorych ze szpiczakiem plazmocytozowym we krwi obwodowej krążą także komórki plazmatyczne, przy czym liczby ich autorzy oceniają na $10^5\text{--}10^6/l$ krwi.

W tabeli 1 podano charakterystykę niektórych antygenów występujących na klonotypowych komórkach B. Ciekawe, że ekspresja antygeny CD19 na klonotypowych komórkach B krwi obwodowej, zwłaszcza na komórkach o cechach pre-plazmocytozowych jest wyraźnie słabsza i ma bardziej heterogeny charakter niż na prawidłowych komórkach B krwi obwodowej. Być może jest to odzwierciedleniem faktu, że w prawidłowym różnicowaniu się linii komórek B ekspresja CD19 słabnie w miarę dojrzewania [30,31]. Możliwe jednak, że poza mniejszym zagęszczeniem antygeny CD19 na powierzchni klonotypowych komórek B odgrywa także rolę zmiana konformacji samego antygeny, odmienna izoforma i /lub zróżnicowanie glikolizacji, względnie jeszcze inne czynniki. W związku z tym Pilarski i wsp. [34] dla wykrycia tej populacji zalecają stosowanie monoklonalnych przeciwciał anty CD19 firm Serotec (FMC63) lub Coulter (B4) i w stężeniach wyższych od rutynowo stosowanych.

Wysortowane komórki CD19⁺ krwi obwodowej chorych ze szpiczakiem plazmocytozowym stanowią morfologicznie mieszaninę mniej więcej równych ilości małych limfocytów i dużych monocytoidalnych komórek, nie spotykanych u osób zdrowych. Ponadto występuje 2–3% komórek plazmocytozoidalnych i poniżej 1% plazmoblastów lub plazmocytozów [47]. Obie małą i dużą monocytoidalną populację komórek B CD19⁺ charakteryzuje koekspresja antygenów CD20 i CD24 [20,30]. Ponadto większość dużych komórek B nosi antygen CD56 i wykazuje duże zagęszczenie antygeny CD38 [7]. Przy tym jak to podano w tabeli 1, są to antygeny typowe dla komórek szpiczaka plazmocytozowego. Wśród krążących komórek B znajduje się subpopulacja klonotypowych komórek CD34⁺ [5,32], co pozwala domniemywać, że mają one właściwości zbliżone do właściwości prawidłowych komórek macierzystych krwiotworzenia. Byłyby to zatem nowotworowe komórki macierzyste zapoczątkowujące ogniskowy rozrost komórek plazmatycznych w różnych miejscach układu kostnego lub tkanek miękkich. Dotychczas jednak brakuje przekonujących danych doświadczalnych. Poza tymi, być może nowotworowymi komórkami ma-

TABELA 1. Antygeny klonotypowych komórek B krwi obwodowej u chorych ze szpiczakiem plazmacytowym [11,21]

CD 10 Inne nazwy: powszechny antygen ostrej białaczki limfoblastycznej (*common acute lymphoblastic leukemia antigen*, skrót CALLA), obojętna endopeptydaza, metaloproteaza cynkowa. Jest członkiem rodziny peptydaz związanych z błoną komórkową, które odgrywają rolę w procesie różnicowania układu hemopoetycznego. Występuje na komórkach pre-B, komórkach B z ośrodka rozrodczego grudki chłonnej prekursorach limfocytów T, niektórych neutrofilach i komórkach epitelialnych. W stanach patologicznych ekspresję CD 10 stwierdzono na komórkach ostrej białaczki limfoblastycznej B komórkowej, chłoniaku wychodzącym z ośrodka rozrodczego grudki chłonnej oraz na plazmocytach linii szpiczakowej U 266.

CD 11b Łańcuch α^M integralny β_2 . Inne nazwy: receptor dla trzeciej składowej dopełniacza (C3biR), receptor adhezji neutrofilii. Tworzy heterodimer z CD 18 (CD 11b/CD 18), dla którego ligandą jest CD 54. CD 11b/CD 18 działa jako receptor dla C 3bi, fibrynogenu, X czynnika krzepnięcia ułatwia adhezję do komórek endotelium, adhezję homotypową, fagocytozę i chemotaksję. CD 11b występuje na niektórych komórkach B, komórkach NK, makrofagach, monocytach i granulocytach. W stanach patologicznych CD 11b wykryto na komórkach niektórych przewlekłych białaczek limfatycznych B komórkowych, białaczki włochato-komórkowej i większości ostrych białaczek szpiczkowych.

CD 19 Członek nadrodziny Ig. Odgrywa ważną rolę zarówno w szpiczkowym niezależnym od antygenów rozwoju komórek B począwszy od komórek pro-B, jak i antygenowo zależnym okresie rozwoju. Jest jedną z molekuł transdukcji sygnałów na komórkach B. Między innymi indukuje odpowiedź komórek B na interleukinę-2. Tworzy kompleksy transdukcji sygnałów z CD 21, CD 81 i Leu 13. Występuje na wszystkich komórkach B począwszy od komórek pro-B oraz na dendrytycznych makrofagach grudek chłonnych, a także na wszystkich nowotworach wychodzących z komórek B.

CD 20 Prawdopodobnie 4 cząsteczki CD 20 tworzą kanał pozwalający na dopływ Ca^{2+} koniecznego dla aktywacji komórki. Występuje na komórkach B, ale w nieco późniejszym okresie ich rozwoju. CD 20 charakteryzuje także chłoniaki B komórkowe i białaczkę włochato-komórkową. Na komórkach przewlekłej białaczki B komórkowej jego ekspresja jest słaba.

CD 24 Odgrywa rolę w indukcji proliferacji i/lub różnicowania komórek B. Występuje na komórkach pre-B, B, na ok. 2% tymocytów i neutrofilach, a także na większości nowotworów B komórkowych i w niektórych ostrych białaczkach szpiczkowych.

CD 34 Jak się wydaje, odgrywa rolę w transdukcji sygnałów, gdyż przy aktywacji komórek ulega fosforylacji. Występuje na najmłodszych rozwojowo macierzystych komórkach krwiotworzenia i komórkach ukierunkowanych do różnicowania w linie limfoidalne i mieloidalne oraz na komórkach endotelialnych. W stanach patologicznych ekspresję CD 34 stwierdzono w niektórych ostrych białaczkach limfoblastycznych i szpiczkowych.

CD 38 Ułatwia wenątrzkomórkową transdukcję sygnałów po związaniu receptorów powierzchni komórki. Jest nazywany także antygenem różnicowania. Występuje na komórkach ukierunkowanych do różnicowania (komórki CD 34⁺ CD 38⁺), tymocytach i młodszych rozwojowo lub aktywnych komórkach T, komórkach B, plazmocytach i monocytach. W stanach patologicznych ekspresję CD 38 wykryto na komórkach szpiczaka plazmacytowego, chłoniaków, ostrych białaczek limfoblastycznych i szpiczkowych.

CD 44 Należy do cząsteczek adhezyjnych. Jest receptorem dla kwasu hialuronowego, dzięki czemu może ułatwiać wiązanie limfocytów z wysokimi śródbłonkami małych weniul węzłów chłonnych i kępek Peyera. Odgrywa więc istotną rolę zarówno w adhezji i procesie zasiedlania się limfocytów w układzie chłonnym, jak i w ich migracji, a także w powstawaniu przerzutów nowotworowych. Ponadto CD 44 przez ułatwienie przylegania komórek progenitorowych do podścieliska ma znaczenie w limfopoezie. Warianty CD 44 z przyłączonym siarczanem chondroityny mogą wiązać fibronektynę, lamininy i kolagen. CD 44 występuje na tymocytach rdzenia grasicy, na komórkach T (szczególnie komórkach pamięci), komórkach pre-B, monocytach, neutrofilach i fibroblastach. Opisano także jego szczególną odmianę charakteryzującą wyłącznie komórki szpiczaka plazmacytowego

cd. tabeli 1

CD 56 Jest cząsteczką adhezyjną z nadrodziny immunoglobulin. Inna nazwa CD 56 to cząsteczką adhezji komórek nerwowych (*neural cell adhesion molecule-1*, skrót NCAM-1). Jego ligandą jest także NCAM, co ułatwia homo typową adhezję komórek. Ponadto CD 56 może hamować kontakto-wo-zależny wzrost komórek i alloreaktywną aktywność cytotliczną komórek NK oraz jak się wyda-je, odgrywa rolę w prawidłowym rozwoju tkanek. Ekspresję CD 56 wykryto na komórkach NK, subpopulacji aktywnych komórek T, komórkach układu nerwowego i komórkach embrionalnych. CD 56 jest uważany za charakterystyczny antygen szpiczaka plazmocytego

CD 62L Inne nazwy L-selektyna, cząsteczką adhezji leukocytów-1 (*leucocyte adhesion molecule-1*, skrót LAM-1). Działa jako receptor ułatwiający zasiedlanie się leukocytów w obwodowych wę-złach chłonnych oraz gromadzenie się leukocytów w miejscach zapalnych. „Dziewicze” komórki B, które po opuszczeniu szpiku nie zetknęły się z antygenem dzięki CD 61L, mogą wiązać się ze swoistymi ligandami, jak np. z zależną od glikolizacji rozpuszczalną cząsteczką adhezji-1 (*glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1*, skrót GlyCAM-1) albo z CD 34, które występują na ko-mórkach endotelialnych venuli węzłów chłonnych. CD 61L występuje na komórkach B, T, tymocytach, komórkach NK, neutrofilach, monocytach, eozynofiliach, bazofilach i progenitorach linii erytroblastów i mieloblastów. W stanach patologicznych CD 62L może ułatwiać adhezję komórek nowotworowych do endotelium.

cierzystymi CD34⁺, w krążeniu znajdują się jeszcze klonotypowe komórki B w nieco późniejszym okresie dojrzewania CD10⁺CD20⁺ [38].

Wreszcie krążące komórki B u chorych ze szpiczakiem plazmocyto-wym mają szczególnie receptor dla hialuronianu. Pomimo zdolności do wiązania hialuronianu nie jest on identyczny z CD44. Z uwagi na to, że receptor ten nie występuje na prawidłowych limfocytach [33,42], a jest charakterystyczny zarówno dla krążących komórek B, jak i szpikowych plazmocyto-wów u chorych ze szpiczakiem plazmo-cytowym nazwano go R-HAMM od *hyaluronan receptor multiple myeloma* [12,46]. R-HAMM jest odpowiedzialny za ruchliwość i ogniskową adhezję komórek [17], a ponadto sam jako taki ma właściwości onkogenne i wraz z RAS umożliwia transformację [12,48]. Podczas stymulacji komórki B przez hialuronian R-HAMM i gen RAS zostają one umiejscowione blisko siebie w sfałdowanych błonach komórki B, natomiast w komórkach plazmatycznych szpiku związanie hialuronianu stymuluje redystrybucję receptora [34], ale nie wpływa na bliskie umiejscowienie RAS. R-HAMM mediuje ruchliwość i deformację krążących monotypowych komórek B i także krążących białaczkowych komórek plazmatycznych, ale nie wywołuje ru-chliwości osiadłych w szpiku nowotworowych komórek plazmatycznych. Te różnice między działaniem R-HAMM w krążących komórkach B, a w osiadłych szpikowych plazmocyto-ach sugerują istnienie jego odmiennych izoform.

Komórki B CD19⁺ krwi obwodowej chorych ze szpiczakiem plazmocyto-wym podobnie jak krążące białaczkowe plazmocyty mają cząsteczki adhezyjne, do których między innymi należą CD11b [18] oraz inni członkowie z rodziny integryn [19], selektyny jak CD62L oraz receptor kwasu hialuronowego – CD44 [30]. Dzięki tym cząsteczkom komórki B mogą wiązać się z odpowiednimi ligandami na ko-mórkach śródbłonnków naczyńiowych i penetrować błonę podstawną oraz przylegać

do zrębu szpikowego, a więc reprezentowałyby populację zasiedlającą szpik. Przy tym wśród elementów macierzy pozakomórkowej głównym białkiem warunkującym adhezję szpiczakowych plazmocytów jest fibronektyna syntetyzowana przez komórki zrębu szpikowego. Jednakże aby osiągnąć mikrośrodowisko szpikowe klonotypowe, komórki B szpiczaka plazmocytowego muszą mieć dużą ruchliwość. Staje się to możliwe dzięki ich aktywnemu odkształcaniu się [23]. Natomiast osiadłe w szpiku komórki plazmatyczne nie wykazują ruchliwości ani pod wpływem hialuronianu, ani jakiegokolwiek innego substratu, jak również nie ulegają odkształceniu. Tak więc tylko krążący komponent w szpiczaku plazmocytowym ma zdolność szerzenia się.

Nowotworowe komórki plazmatyczne w szpiku są często hiperdiploidalne, ale także hiperdiploidię wykazuje 30–40% komórek B krwi obwodowej chorych ze szpiczakiem plazmocytowym [27,32]. Hiperdiploidalne komórki B występują u ponad 90% chorych ze szpiczakiem plazmocytowym we wszystkich okresach choroby. Klonotypowe komórki B noszą takie same nieprawidłowości genetyczne jak szpiczakowe plazmocyty. Tak np. wykryto taką samą mutację genu N-RAS i delecję genu RB w małej populacji krążących komórek B, jak i w nowotworowych plazmocytach.

Klonotypowe komórki B prawie wszystkich pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym charakteryzuje ekspresja błonowej fosfoglikoproteiny o masie cząsteczkowej 170 kD (P-gp 170) kodowanej przez gen MDR-1 (*multidrug resistance gene-1*) [27,28,29]. P-gp 170 w prawidłowych komórkach pełni dwojakie funkcje:

- Po pierwsze działa jako energochłonna pompa odpływowa usuwająca z komórek toksyny, produkty metabolizmu oraz hormony, a ponadto reguluje objętość komórki uczestnicząc w transporcie chlorków [43].

- Po drugie, co wiąże się z jej pierwszą czynnością, usuwa leki z komórki istotnie obniżając ich stężenie wewnątrzkomórkowe [15, 26].

Wzrost ekspresji P-gp 170 jest jednoznacznym markerem wielolekowej oporności. Klonotypowe komórki B wykazują ekspresję P-gp 170 zarówno przed rozpoczęciem leczenia, jak i po przebytej chemioterapii. Sugeruje to, że te krążące komórki B mające ekspresję P-gp stanowią rezerwuar lekoopornych komórek [27].

Krążące komórki B u chorych ze szpiczakiem plazmocytowym stymulowane *in vitro* cytokinami lub we współhodowli z komórkami zrębu szpikowego różnicują się do dojrzałych komórek plazmatycznych zawierających jeden typ cytoplazmatycznych Ig [9,10,40].

W tabeli 2 streszczono dane przemawiające za hipotezą, że wśród klonotypowych krążących komórek B znajdują się także klonogenne macierzyste komórki nowotworowe.

W zakończeniu niniejszego artykułu należało by jeszcze omówić dwa zagadnienia:

Tabela 2. Dane potwierdzające hipotezę o nowoworowych klonogennych komórkach występujących w populacji krążących klonotypowych komórek B

1. Ekspresja antygenów macierzystych komórek krwiotworzenia i komórek ukierunkowanych w linię limfocytów B (CD 34 i CD 10) na komórkach z rekombinacją i mutacją somatyczną genów VDJ IgH
2. Ekspresja antygenów charakterystycznych dla szpiczakowych plazmacytów (CD 38 i CD 56) na klonotypowych komórkach B
3. Ekspresja szczególnego receptora dla hialuronianu (R-HAMM) będącego receptorem adhezji i mającego właściwości onkogenne
4. Hiperdiploidia występująca w 30–40% komórek B, analogiczna do hiperdiploidii w szpiczakowych komórkach plazmatycznych
5. Mutacje N-RAS i delecja RB występująca zarówno w całej populacji komórek B, jak i w nowotworowych plazmacytach
6. Ekspresja genu MDR-1 występująca przed i po chemioterapii
7. Zdolność klonotypowych komórek B do migracji z krążenia i potencjalne możliwości zasiedlania szpiku w miejscach odległych od pierwotnej transformacji

– pierwsze dotyczy biologicznej roli krążących klonotypowych komórek B w szpiczaku plazmacytowym,

– drugie – etapu różnicowania komórki B, w którym ma miejsce złośliwa transformacja.

Jeśli idzie o pierwsze z poruszonych zagadnień, to pod względem fenotypu immunologicznego klonotypowe krążące komórki B stanowią heterogenną populację w różnych okresach różnicowania [20] począwszy od macierzystych komórek krwiotworzenia przez komórki pro-B, pre-B aż do komórek pre-plazmatycznych. Komórki te są ze sobą spokrewnione i mogą ulegać ostatecznemu różnicowaniu do komórek plazmatycznych w szpiku. W tej heterogennej populacji klonotypowych komórek B znajdują się zarówno nienowotworowe komórki, jak i prawdopodobnie nowotworowe komórki. Na ogół przyjmuje się, że szpiczak plazmacytowy powstaje wskutek nowotworowej transformacji przewlekle stymulowanego specyficznego antygenowo klonu komórki B. Przy tym okres przewlekłej stymulacji antygenowej klinicznie odpowiada monoklonalnej gammopatii. Dlaczego jednak czynnik stymulujący miałby zniknąć podczas ewolucji monoklonalnej gammopatii w szpiczaku plazmacytowego. A zatem krążące klonotypowe komórki B we krwi obwodowej chorych ze szpiczakiem plazmacytowym prawdopodobnie obejmują:

– „śmiertelne”, nienowotworowe, stymulowane antygenem komórki B reprezentujące populację występującą w monoklonalnej gammopatii,

– „unieśmiertelnione”, wskutek złośliwej transformacji, ich potomstwo o identycznej rekombinacji genów VDJ IgH jak rodzicielskie komórki.

Za tą sugestią przemawia także heterogenna ekspresja zmutowanego genu N-RAS [6]. Tak więc nienowotworowe, klonotypowe komórki B krwi obwodowej

mogą stanowić subpopulację zasilającą klon nowotworowy, po wystąpieniu odpowiednich zmian genetycznych.

Odpowiedź na pytanie, w którym etapie różnicowania komórki B ma miejsce transformacja nowotworowa, jak dotychczas nie została ustalona. Zmapowanie genów Ig w klonotypowych komórkach B wskazuje, że sekwencje DNA są charakterystyczne dla procesu sterowanego przez antygen [2,35]. Sugeruje to, że klonotypowa komórka B uległa nowotworowej transformacji w ośrodku rozrodczym grudki chłonnej. A zatem byłaby to albo komórka B pamięci immunologicznej, albo komórka pre-plazmatyczna. Niektórzy badacze stosując technikę reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) wykryli małe ilości matrycowego RNA (mRNA) C μ w szpiczakach IgG i IgA [3]. Jak to już podano, zmiana klasy łańcucha ciężkiego Ig może mieć miejsce także w komórkach pamięci immunologicznej, jest więc prawdopodobne, że komórka B pamięci immunologicznej po złośliwej transformacji staje się komórką macierzystą szpiczaka plazmacytowego. Przemawia za tym jeszcze fakt, że sekwencje CDRs lub rekombinacje genów VDJ w klonie szpiczakowym charakteryzują liczne somatyczne hypermutacje [2,36,45], a w warunkach prawidłowych somatyczne hypermutacje CDRs i VDJ najczęściej występują podczas powstawania komórek B pamięci w ośrodku rozrodczym grudki chłonnej [8]. Dodatkowej interpretacji wymaga występowanie we krwi obwodowej klonotypowych komórek CD34⁺. Prawidłowe komórki CD34⁺ nie mają jeszcze rekombinacji genów VDJ IgH, dlatego pojawienie się komórek CD34⁺ z rekombinacją i mutacją somatyczną genów IgH wydaje się być następstwem nowotworowej transformacji. Takishita i Kosaka [37] sugerują, że pierwotna nowotworowa komórka, która pochodzi z późniejszego okresu różnicowania linii komórki B, ulega odróżnicowaniu do komórki CD34⁺, odzyskując z jednej strony zdolność do samoodnowy, zaś z drugiej zachowując zdolność do różnicowania się do szpiczakowej komórki plazmatycznej.

Jednakże hipoteza, że komórką macierzystą nowotworowych plazmacytów jest transformowana komórka B pamięci immunologicznej lub pre-plazmacyt pozostaje w sprzeczności z hipotezą opartą na badaniach fenotypu immunologicznego szpiczakowych plazmacytów. Niektórzy autorzy podają, że aneuploidalna komórka plazmatyczna szpiczaka plazmacytowego wykazuje koekspresję markerów mielomonocytnych, megakariocytów i erytroblastów, co pozwala sugerować, że szpiczak plazmacytowy pochodzi z transformowanej komórki krwiotworzenia [4, 14]. Z drugiej jednak strony wiadomo, że prawidłowe komórki plazmatyczne mogą również wykazywać koekspresję niektórych z tych antygenów [39].

Sprawa biologii szpiczaka plazmacytowego pozostaje więc ciągle jeszcze daleka od wyjaśnienia i nie sposób przewidzieć, kiedy nastąpi jej rozwikłanie, a być może pojawią się nowe dotychczas nieprzewidywane problemy.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BAHLER DW, LEVY R. Clonal evolution of a follicular lymphoma: Evidence for antigen selection. *Proc Natl Acad Sci: USA* 1992; **89**: 6770–6774.
- [2] BAKKUS MHC, HEIRMAN C, van RIET I, van CAMP B, THIELEMANS K.: Evidence that multiple Ig heavy chain VDJ genes contain somatic mutations but show no intracлонаl variation. *Blood* 1992; **80**: 2326–2335.
- [3] BAKKUS MH, van RIET I, van CAMP B. Evidence that the clonogenic cell in multiple myeloma originates from a pre-switched but somatically mutated B cell. *Br J Haematol* 1994, **87**: 68–74.
- [4] BARLOGIE B, EPSTEIN J, SELVANAGAGAM P, ALEXANIAN R: Plasma cell myeloma – New biological insights and advances in therapy. *Blood* 1989; **73**: 865–879.
- [5] BELCH AR, BERGSAGEL PL, SZCZEPEK A, LANSDORP P, PILARSKI LM. CD34⁺ B cells in the blood of patients with multiple myeloma express clonotypic IgH sequences. *Blood* 1994; **84**: 385a.
- [6] BERGSAGEL PL, BELCH AR, PILARSKI LM. The blood B cells and bone marrow plasma cells in a patient with multiple myeloma include cells with the same N-RAS mutation. *Blood* 1994; **84**: 524a.
- [7] BERGSAGEL PL, MASELLIS A, SZCZEPEK A, MANT MJ, BELCH AR, PILARSKI LM. In multiple myeloma clonotypic B lymphocytes are detectable among CD19⁺ peripheral blood cells expressing CD38, CD56 and monotypic immunoglobulin light chain. *Blood* 1995; **85**: 436–447.
- [8] BEREK C, MILSTEIN C. Mutation drift and repertoire shift in the maturation of the immune response. *Immunol Rev* 1987; **96**: 23–41.
- [9] BERGUI L, SCHENA M, GAIDANO G, RIVA M, CALIGARIS-CAPPIO F. Interleukin 3 and interleukin 6 synergistically promote the proliferation and precursors in multiple myeloma. *J Exp Med* 1989; **170**: 613-618.
- [10] CALIGARIS-CAPPIO F, BERGUI L, GREGORETII MG, GAIDANO C. Role of bone marrow stromal cells in the growth of human multiple myeloma. *Blood* 1991; **77**: 2688–2693.
- [11] CLARK EA, LAW C-L. Immune accessory molecules and signal transduction. [w]: *Williams Hematology V Edition*. Red: E. Beutler, M.A. Lihtman, B.S. Coller, T.J. Kipps: 1995; 946–955
- [12] ENTWISTLE J, ZHANG S, YANG B, WONG C, LI Q, HALL CL, CUPREN G, MOWAT M, GREENBERG AH, TURLEY EA. Characterization of the murine gene encoding the hyaluronan receptor RHMM. *Gene* 1995; **163**: 233–238.
- [13] EPSTEIN J, HOOVER R, KORNBLUTH J, BARLOGIE B. Biological aspects of multiple myeloma. *Bailliere's Clin Haematol* 1995; **8**: 721–734.
- [14] EPSTEIN J, XIAO H., HE X-Y.: Markers of multiple hematopoietic- cells lineages in multiple myeloma. *N Engl J Med* 1990; **322**: 664–668.
- [15] GILL DR, HYDE SC, HIGGINS CF, VALVRDE M A, MINTENIG GM. SEPULVEDA FV. Separation of drug transport and chloride channel functions of the human multidrug resistance P.-glycoprotein. *Cell* 1992; **71**: 23–32.
- [16] GRAY D. Immunological memory. *Annu Rev Immunol*. 1993, **11**: 47–77.
- [17] HALL CL, WANG C, LANGE L, TURLEY EA. Hyaluronan and the hyaluronan receptor RHAMM promote focal adhesion turnover and tyrosine kinase activity. *J Cell Biol* 1994; **126**: 575–588.
- [18] JENSEN GS, BELCH AR, KHERANI F, MANT MJ, RUETHER B A, PILARSKI LM. Restricted expression of immunoglobulin light chain mRNA and of the adhesion molecule CD11b on circulating monoclonal B lineage cells in peripheral blood of myeloma patients. *Scand J Immunol*. 1992; **36**: 843–853.

- [19] JENSEN GS, BELCH AR, MANT M.J, RUETHER BA, YACYSHYN BR, PILARSKI LM. Expression of multiple beta-integrins on circulating monoclonal B cells in patients with multiple myeloma. *Am J Hematol* 1992; **43**: 29–36.
- [20] JENSEN GS, MANT MJ, BELCH AR, BERENSEN JR, RUETHER BA, PILARSKI LM. Selective expression of CD45 isoforms defines CALLA⁺ monoclonal B lineage cells in peripheral blood from myeloma patients as late stage B cells. *Blood* 1991; **78**: 711–719.
- [21] KIPPS TJ. The cluster of differentiation (CD.) antigens [w]: *Williams Hematology V Edition*. Red.: E. Beutler, M.A. Lichtman, B.S. Coller, T.J. Kipps. 1995; 113–140.
- [22] KIRKHAM PM, SCHROEDER HW Jr. Antibody structure and the evolution of immunoglobulin V gene segments. *Semin Immunol* 1994; **6**: 347–360.
- [23] MOSELLIS-SMITH A, BELCH AR, MANT MJ, TURLEY EA, PILARSKI LM. Hyaluronan-dependent motility of B cells and leukemic plasma cells in blood, but not of bone marrow plasma cells, in multiple myeloma: Alternate use of receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) and CD44. *Blood* 1996; **87**: 1891–1899.
- [24] MELLSTEDT H, HOLM G, BJÖRKHOLM M. Multiple myeloma, Waldenström's macroglobulinemia, and benign monoclonal gammopathy: Characteristics of the B cell clone, Immunoregulatory cell populations and clinical implications. *Adv Cancer Res* G. Klein, S. Weinhouse (Red.) 1984; **41**: 257–289.
- [25] OWEN MJ, LAMB JR (Red.) *Immune Recognition*. Oxford, IRL Press 1988.
- [26] PASTAN I, GOTTESMAN MM. Multi-drug resistance in human cancer. *N Engl J Med*. 1987; **316**: 1388–1393.
- [27] PILARSKI LM, BELCH AJ. Circulating monoclonal B cells expressing P.-glycoprotein may be a reservoir of multidrug resistant disease in multiple myeloma. *Blood* 1994; **83**: 724–736.
- [28] PILARSKI LM, BELCH AR. Intrinsic expression of the multidrug transporter, P.-glycoprotein 170, in multiple myeloma; Implications for treatment. *Leuk/Lymph*. 1995, **17**: 367–374.
- [29] PILARSKI LM, CASS CE, TSURO T, BELCH AR. Multidrug resistance of a continuously differentiating monoclonal B lineage in the blood and bone marrow of patients with multiple myeloma. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992; **182**: 177–185.
- [30] PILARSKI LM, JENSEN GS. Monoclonal circulating B cells in multiple myeloma: a continuously differentiating possibly invasive population as defined by expression of CD45 isoforms and adhesion molecules. *Hematol/Oncol Clin North Am* 1992; **6**: 297–322.
- [31] PILARSKI LM, JENSEN GS. Expression of CD45 isoforms (leucocyte common antigen) and adhesion molecules during normal and abnormal B lymphocyte development. *Adv Molec Cell Immunol* 1993; **1B**: 75–117.
- [32] PILARSKI LM, MANT MM, BELCH AR. Circulating, monoclonal, multi-drug resistant B cells may comprise the malignant stem cells population in multiple myeloma. [w]: *Challenges in Modern Medicine*. Red: F. Dammaco i B. Barlogie. 1994; **4**: 31–39.
- [33] PILARSKI LM, MASELLIS-SMITH, BELCH AR, YANG B, SAVANI RC, TURLEY EA. RHAMM, a receptor for hyaluronan-mediated motility, on normal lymphocytes, thymocytes and in B cell malignancy: A mediator in B cell malignancy? *Leuk/Lymph* 1994; **14**: 363–374.
- [34] PILARSKI LM, MASELLIS-SMITH A, SZCZEPEK A, MANT MJ, BELCH AR. Circulating clonotypic B cells in the biology of multiple myeloma: Speculations on the origin of myeloma. *Leuk/Lymph* 1996; **22**: 375–383.
- [35] RAPLH QM, BRISCO MH, JOSHUA DE, BROWN R, GIBSON J, MORLEY AA. Advancement of multiple myeloma from diagnosis through plateau phase to progression does not involve a new B-cell clone: Evidence from the Ig heavy chain gene. *Blood* 1993; **82**: 202–206.
- [36] SAHOTA S, HAMBLIN T, OSCIER DG, STEVENSON FK. Assessment of the role of clonogenic B lymphocytes in the pathogenesis of multiple myeloma. *Leukemia* 1994; **8**: 1285–1289.
- [37] TAKISHITA M, KOSAKA M. Multiple myeloma: New evidence and insights from the immunoglobulin heavy chain gene and phenotypes. *Leuk/Lymph* 1995; **19**: 395–400.

- [38] TAKISHITA M, KOSAKA M, GOTO T, SAITO S. Cellular origin and extent of clonal involvement in multiple myeloma: Genetic and phenotypic studies. *Br J Haematol* 1994; **87**: 735–742.
- [39] TARSTAPPEN LWMM, JOHNSEN S, SEGERS-NOLTEN IMJ, LOKEN M. Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high resolution flow cytometry. *Blood* 1990; **76**: 1739–1747.
- [40] THOMAS X, XIAO HQ, CHANG R, EPSTEIN J. Circulating B lymphocytes in multiple myeloma patients contain an autocrine IL-6 driver pre-myeloma cell population. *Curr Topics Microbiol Immunol* 1992; **182**: 201–207.
- [41] TONEGAWA S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983; **302**: 575–581.
- [42] TURLEY EA, BELCH AR, POPPEMA S, PILARSKI LM. Expression and function of a receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) on normal and malignant B lymphocytes. *Blood* 1993; **81**: 446–453.
- [43] VALVERDE MA, DÍAZ M, SEPULVDA FV, GILL DR, HYDE SC, HIGGINS CF. Volumen-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P.-glycoprotein. *Nature* 1992; **355**: 830–833.
- [44] van DONGEN JJM, WOLVERS-TETTERO ILM. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part I: Basic and technical aspects. *Clin Chim Acta* 1991; **198**: 1–91.
- [45] VESCIO RA, CAO J, HONG CH, LEE JC, WU CH, der DANIELIAN M., WU V., NEWMAN R, LICHTENSTEIN AK, BERENSON JR. Myeloma Ig heavy chain V region sequences reveal prior antigenic selection and marked somatic mutation but no intraclonal diversity. *J Immunol* 1995; **155**: 2487–2497.
- [46] WANG C, ENTWISTLE J, HOU LI Q, TURLEY EA. The characterization of a human RHAMM cDNA: Conservation of the hyaluronan-binding domains. *Gene* 1996; **174**: 299–306.
- [47] WITZING TE, DHODAPKAR MV, KYLE RA, GREIPP PR. Quantitation of circulating peripheral blood plasma cells and their relationship to disease in patients with multiple myeloma. *Cancer* 1993; **72**: 108–113.
- [48] YANG B, YANG X, ZHANG S, TURLEY M, SAMUEL S, SAVANI RC, GREENBERG AH, TURLEY EA. Overexpression of the hyaluronan receptor RHAMM is transforming, and is required for H-RAS transformation. *Cell* 1995; **82**: 19–28.
- [49] WHU D, HAWKINS RE, HAMBLIN TJ, STEVENSON FK. Clonal history of a human follicular lymphoma as revealed in the immunoglobulin variable region genes. *Br J Haematol* 1994; **86**: 505–512.

Redaktor prowadzący – M. Zabel

Otrzymano: 16.06. 1997 r.

Przyjęto: 12.09. 1997 r.

Adres autora: ul. Jaczewskiego 8, 20-954 Lublin

CD28/CTLA-4: DODATKOWY SYGNAŁ W PROCESIE AKTYWACJI LIMFOCYTÓW T*

CD28/CTLA4: CO-STIMULATORY SIGNAL OF T CELLS ACTIVATION

Henryk W. WITAS, Agata MŁYNARSKA, Wojciech MŁYNARSKI,
Jerzy BODALSKI

Pracownia Biologii Molekularnej, II Klinika Chorób Dzieci, Instytut Pediatrii AM
w Łodzi

Streszczenie: Aktywacja limfocytów T jest kluczowym etapem procesu swoistej inicjacji odpowiedzi immunologicznej organizmu. Jej efektem biologicznym jest produkcja cytokin, a w konsekwencji proliferacja komórek immunokompetentnych. Proces ten wymaga sygnału pierwotnego, inicjującego powstającego w czasie oddziaływania receptora TCR z prezentowanym przez cząsteczkę MHC antygenem oraz złożonego sygnału dodatkowego o charakterze regulacyjnym. Najlepiej poznanym szlakiem dodatkowej stymulacji jest sygnał przekazywany w wyniku interakcji receptorów CD28 i CTLA-4, które znajdują się na powierzchni komórek T z odpowiednimi ligandami komórek prezentujących antygen, tj. B7.1 i B7.2. Nieprawidłowościom w ekspresji genów *CD28* i *CTLA-4* przypisuje się istotne znaczenie w patogenezie wielu zaburzeń o podłożu immunologicznym, w tym chorób autoimmunologicznych i odrzucaniu przeszczepu. Wydaje się, że obydwie receptory oddziałują przeciwstawnie podczas rozwoju odpowiedzi immunologicznej. Wyczerpująca charakterystyka sygnału dodatkowej stymulacji, w tym oddziaływania CD28/CTLA-4 z B7.1/B7.2 może otworzyć nowe możliwości profilaktyki i terapii.

Słowa kluczowe: aktywacja limfocytów T, CD28, CTLA-4

Summary: T-cells activation is a key event triggering an antigen-specific immune response of the organism, which involves effective cytokine production, and proliferation of immuno-competent cells. The process is initiated by a primary signal generated due to TCR-antigen interaction *via* MHC molecules. This signal is crucial but not sufficient for the activation. In addition, complex co-stimulatory signal of regulatory properties is required. The best characterised signal is generated in the interaction of CD28 and CTLA-4 molecules located on T-cells with B7.1 and B7.2. ligands exposed by antigen presenting cells. Alterations in the expression of *CD28* and *CTLA-4* genes are considered among factors associated with pathogenesis of certain immune disorders, such as autoimmune diseases and graft rejections. Both receptors are believed to provide signals, which are antagonist in the generation of immune response.

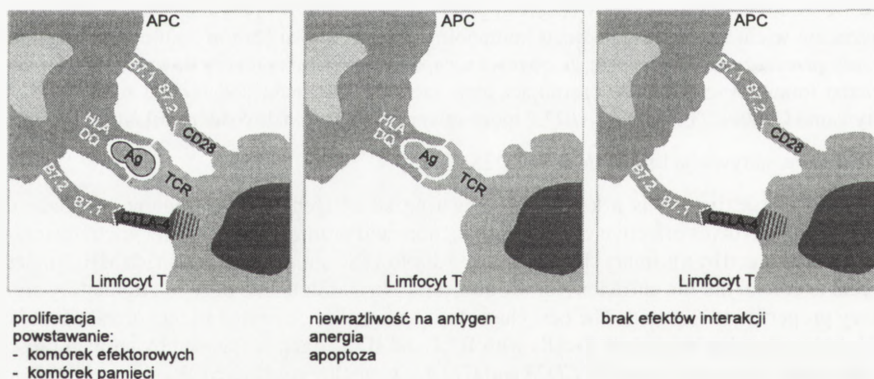
*Praca przygotowana w ramach grantu KBN Nr 4 P05E 085 13.

Thus, exhaustive studies of co-stimulatory pathway will contribute to new prophylactic and therapeutic approaches.

Key words: T-cell activation, CD28, CTLA-4

1. WSTĘP

Aktywacja limfocytów T pełni kluczową rolę w zapoczątkowaniu większości swoistych reakcji immunologicznych. Proces wymaga sygnału pierwotnego, realizowanego podczas kontaktu komórek z antygenem oraz złożonego sygnału dodatkowego (kostymulacji) o charakterze regulacyjnym. Pierwotny, a jednocześnie konieczny sygnał pojawia się w wyniku ekspozycji immunogenego peptydu (antygeny, epitopu) na cząsteczkach MHC (*major histocompatibility complex*), obecnych na powierzchni komórki prezentującej antygen (APC), rozpoznawanego przez właściwy limfocyt. Rozpoznawanie kompleksu składającego się z peptydu antygenowego i cząsteczki MHC przez odpowiedni receptor (TCR) uruchamia przewodzenie aktywującego sygnału do wnętrza limfocyty. Stymulacja przez TCR jest konieczna, ale nie wystarcza do funkcjonalnego uaktywnienia limfocytów T, a proces wymaga zaangażowania szeregu zewnątrzkomórkowo i wewnątrzkomórkowo zlokalizowanych cząsteczek komórek immunokompetentnych. Konsekwencją stymulacji limfocytów T przez TCR i pobudzenia szlaków dodatkowej stymulacji jest wydzielanie cytokin. W ślad za tym idzie możliwość proliferacji określonego klonu limfocytów, różnicowanie się komórek efektorowych lub/i komórek pamięci immunologicznej. Brak dodatkowego sygnału stymulacji prowadzić może do braku odpowiedzi komórki na antygen (anergii) bądź apoptozy (rys. 1) [24]. Efekt biologiczny zależy pra-



Rys. 1. Model przebiegu interakcji limfocyty T z komórką prezentującą antygen: APC – komórka prezentująca antygen (ang. *antigen presenting cell*), TCR – receptor limfocytów T (ang. *T cell receptor*), Ag – antygen, CTLA-4 – receptor limfocytów T sygnału dodatkowej stymulacji, CD28 – receptor limfocytów T sygnału dodatkowej stymulacji, B7.1 i B7.2 – ligandy dodatkowej stymulacji komórek prezentujących antygen

wpodobnie od stopnia dojrzałości komórki i jej pierwotnego uaktywnienia. Przykładowo, limfocyty T CD4+ o fenotypie T_h1 znacznie łatwiej podlegają anergii niż CD4+ T_h2. Najlepiej scharakteryzowany szlak dodatkowej stymulacji powstaje w wyniku oddziaływania receptorów CD28 i CTLA-4, które obecne są na powierzchni limfocytów T, z ich ligandami B7.1 (CD80) i B7.2 (CD86) eksponowanymi na komórkach prezentujących antygen [37].

2. STRUKTURA GENÓW *CD28* i *CTLA-4* I ICH EWOLUCYJNE PODOBIENSTWO

Geny kodujące cząsteczki CD28 i CTLA-4 znajdują się w bezpośrednim sąsiedztwie w regionie 2q33-34 i wykazują podobną budowę jako geny podzielone [22,32]. Występujące w obydwu genach cztery eksony kodują odpowiednio cztery domeny białkowych produktów ekspresji: fragment wiodący (ang. *leading sequence*), zewnątrzkomórkową domenę V, która jest homologiczna do zmiennej domeny immunoglobulin, domenę transbłonową oraz domenę cytoplazmatyczną. Porównanie odpowiednich genów człowieka i myszy wykazuje daleko posuniętą homologię, co z pewnością przemawia za konserwatywnością struktury, a tym samym znaczeniem kodowanych białek. Stwierdzono międzycząsteczkową i międzygatunkową homologię struktury pierwszorzędowej białek CD28 i CTLA-4 [2,20,22,32]. Wykazano obecność wspólnego motywu MYPPPY (Met-Tyr-Pro-Pro-Pro-Tyr) łączącego domenę zewnątrzkomórkową i transbłonową w obydwu rodzajach cząsteczek zarówno mysich jak i ludzkich [22]. Mysi i ludzki gen *CTLA-4* wykazuje homologię sięgającą 73% na poziomie DNA, zaś homologia na poziomie białka waha się od 62% dla fragmentu wiodącego do 100% dla domeny cytoplazmatycznej, zawierającej dwa potencjalne miejsca fosforylacji [11,22]. Międzygatunkowy, konserwatywny charakter domeny wewnątrzkomórkowej białka CTLA-4, kontrastując z różnicami struktury pierwszorzędowej genu, wskazuje na ewolucyjnie zachowaną skłonność do utrzymania kolejności aminokwasów zapewniającego istotną dla komórki funkcję. Wykazano również znaczne podobieństwo promotora genu *CTLA-4* (73%) i regionu 3' (67%), przy czym nie zaobserwowano aż tak daleko idącej homologii pomiędzy *CTLA-4* i *CD28* tego samego gatunku. Międzygatunkową homologię białek CD28 człowieka i myszy ocenia się na 77% [11].

Wydaje się, że pojawienie się genów kodujących obydwa rodzaje cząsteczek jest wynikiem duplikacji jednego z nich. Przemawiają za tym zarówno ich lokalizacja, jak i podobna struktura genu podzielonego (ilość eksonów i intronów je tworzących jest jednakowa). Proces powielenia genu miał miejsce zapewne przed specjacją, ponieważ obydwa geny znaleziono zarówno u myszy, jak i człowieka, chociaż na tyle późno, że zostało zachowane wyraźne podobieństwo. Duplikacja wyprzedziła

proces specjacji, o czym świadczy silniejsze międzygatunkowe niż międzycząsteczkowe podobieństwo struktury pierwszorzędowej niekodujących fragmentów, końców 5' i 3' obydwu genów. Czas, jaki upłynął, wystarczył zaledwie na pojawienie się różnic międzycząsteczkowych w obrębie tego samego gatunku. Różnice w strukturze pierwszorzędowej końców 5' i 3' genów *CD28* i *CTLA-4* sugerują odmienność mechanizmów regulacji ekspresji obydwu genów [22].

3. BUDOWA I FUNKCJA CZĄSTECZEK CD28 i CTLA-4

Białka CD28 i CTLA-4 należą do nadrodziny immunoglobulin zawierających pojedynczą zewnątrzkomórkową domenę zmienną (ang. *V* – *variable*) spiętą mostkiem dwusiarczkowym. Częsteczki CD28 występują na powierzchni 95% limfocytów T CD4+ oraz 50% limfocytów CD8+ zarówno dziewiczych (ang. *naive*), jak i aktywowanych [24,56]. W przeciwieństwie do nich, cząsteczki CTLA-4 pojawiają się wyłącznie na powierzchni komórek pobudzonych. Ligandami obydwu receptorów, znajdującymi się na powierzchni komórek prezentujących antygen są glikoproteiny B7.1 (CD80) i B7.2 (CD86), należące do nadrodziny immunoglobulin, z jedną domeną V i jedną domeną C [24,26,45]. Częsteczki B7.1 i B7.2 mają 20–100 razy większe powinowactwo do CTLA-4 niż do CD28 [26,56]. Do CD28 wiążą się one mniej więcej tak samo silnie, przy czym szybkość dysocjacji B7.2 jest większa [38].

3.1. Częsteczka CD28

CD28 jest glikoproteina o masie cząsteczkowej 44 kDa występującą w postaci monomeru lub homodimeru składającego się z dwóch łańcuchów połączonych mostkiem dwusiarczkowym. Każdy z nich zbudowany jest z 202 aminokwasów (23 kDa) i ma pięć miejsc glikozylacji [24,56]. W skład cząsteczki CD28 wchodzi: domena zewnątrzkomórkowa ze zmiennym fragmentem immunoglobulino-podobnym zawierającym motyw MYPPPY (Met-Tyr-Pro-Pro-Tyr), który jest miejscem wiązania z ligandem, domena transbłonowa oraz domena cytoplazmatyczna (41 aminokwasów) [24,56]. Cytoplazmatyczny fragment białka nie wykazuje właściwości enzymatycznych i stąd postuluje się, że przekazywanie sygnału do wnętrza komórki wymaga obecności odrębnego miejsca wiązania z cytoplazmatycznymi białkami sygnałowymi. Motyw ¹⁷³YMN¹⁷⁶ (Tyr-Met-Asn-Met) jest odpowiedzialny za przyłączanie białek sygnałowych, wśród których znajdują się: domena SH2 (ang. *src-homology 2*) podjednostki p85 3-kinazy fosfoinozytolowej (3-kinazy PI) oraz białko wiążące receptor dla czynnika wzrostu – Grb-2 (ang. *growth factor receptor binding protein*) [49]. Inne, bogate w prolinę motywy ¹⁷⁸PRRP¹⁸¹ (Pro-

Arg-Arg-Pro) i $^{190}\text{PYAP}^{193}$ (Pro-Tyr-Ala-Pro) wiążą domeny SH3 (ang. *src-homology 3*), które są podjednostkami p85 3-kinazy PI [24]. W domenie cytoplazmatycznej CD28 znajdują się miejsca, odpowiedzialne za oddziaływanie z innymi białkami sygnałowymi, w tym kinazami tyrozynowymi, fosfolipazą C, sfingomielinazą i p21^{ras} (rys. 2) [8,43,52,56].

CD28 wydaje się być samodzielną jednostką funkcjonalną, przekazującą sygnał do wnętrza komórki T [44].

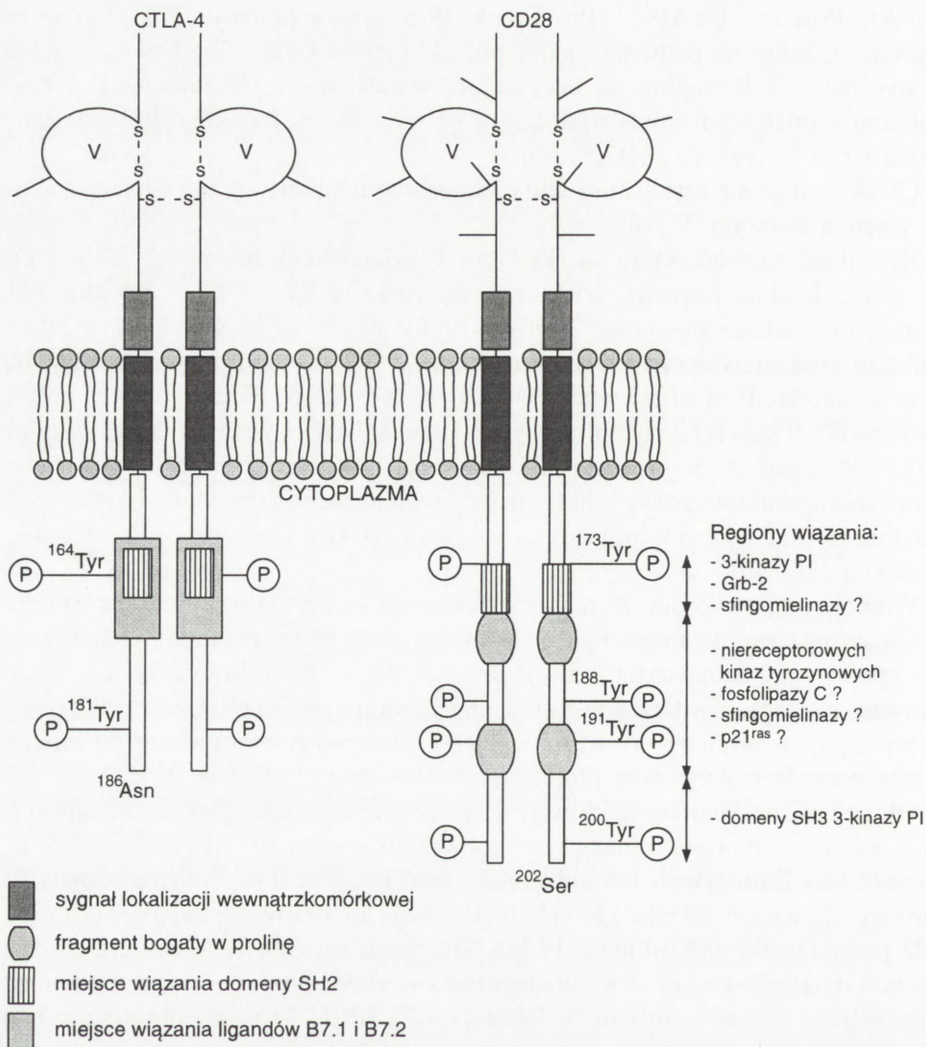
Kolejność zdarzeń, które są skutkiem oddziaływania cząsteczek B7 z CD28, nie jest dokładnie poznana. Niektórzy sugerują, że B7.1 i B7.2 indukują różne sygnały prowadzące do syntezy różnych limfokoin. I tak B7.1 warunkuje produkcję limfokoin charakterystycznych dla komórek $T_{\text{h}}1$, tj. IL-2 i IFN- γ , natomiast B7.2 sprzyja syntezie IL-4 i IL-5 wydzielanych przez $T_{\text{h}}2$ [18]. Według innych autorów zarówno B7.1, jak i B7.2 stymulują wydzielanie IL-2 i IFN- γ na tym samym poziomie [31]. Wykazano, że w procesie oddziaływania CD28 z B7.1 i B7.2 podczas powstawania dodatkowego sygnału stymulacji wymagana jest obecność 3-kinazy fosfatydyloinozytolu, co jest wspólną cechą obydwu szlaków prowadzących do nasilenia produkcji IL-2 [9].

Wiadomo z pewnością, że w przekazywaniu sygnału do wnętrza komórki przez CD28 zaangażowane mogą być co najmniej dwa szlaki przemian. Jeden z nich jest oporny na cyklosporynę A i występuje w dziewiczych limfocytach T, kiedy wysycenie receptorów CD28 jest niewielkie, a drugi jest wrażliwy na cyklosporynę A i występuje w aktywowanych limfocytach T, kiedy wysycenie receptorów ligandem osiąga wartość maksymalną [24,56].

Głównymi, wewnątrzkomórkowymi mediatorami sygnału obydwu rodzajów przemian są niereceptorowe kinazy tyrozynowe, takie jak p56^{lck} i p59^{fyn} [52,56]. W dziewiczych limfocytach ich substratem jest Tyr 173 i Tyr 191 cytoplazmatycznej domeny cząsteczki CD28, których fosforylacja umożliwia przyłączenie domeny SH2 podjednostki p85 3-kinazy PI [24,56], czego następstwem jest jej aktywacja. Produkt działania kinazy, 3,4,5-trifosforofosfatydyloinozytol, aktywuje z kolei szlak niewrażliwej na estry forbolu fosfokinazy C ζ (PKC ζ) i kaskadę kinazy białka c-Jun i czynnika transkrypcyjnego Elk-1 (JNK/ERK). Równocześnie z aktywacją 3-kinazy PI aktywowany jest układ sfingomielinaza/ceramid, który wspomaga efekt działania 3-kinazy PI [8,56].

W przebiegu szlaku wrażliwego na cyklosporynę A, aktywowane przez CD28 niereceptorowe kinazy tyrozynowe (p56^{lck} , p59^{fyn}) zapoczątkowują kaskadę, której efektem jest uruchomienie zasobów wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} przez aktywację fosfolipazy C oraz fosforylację czynnika Vav wpływającego na aktywację kaskady zależnej od p21^{ras} [43].

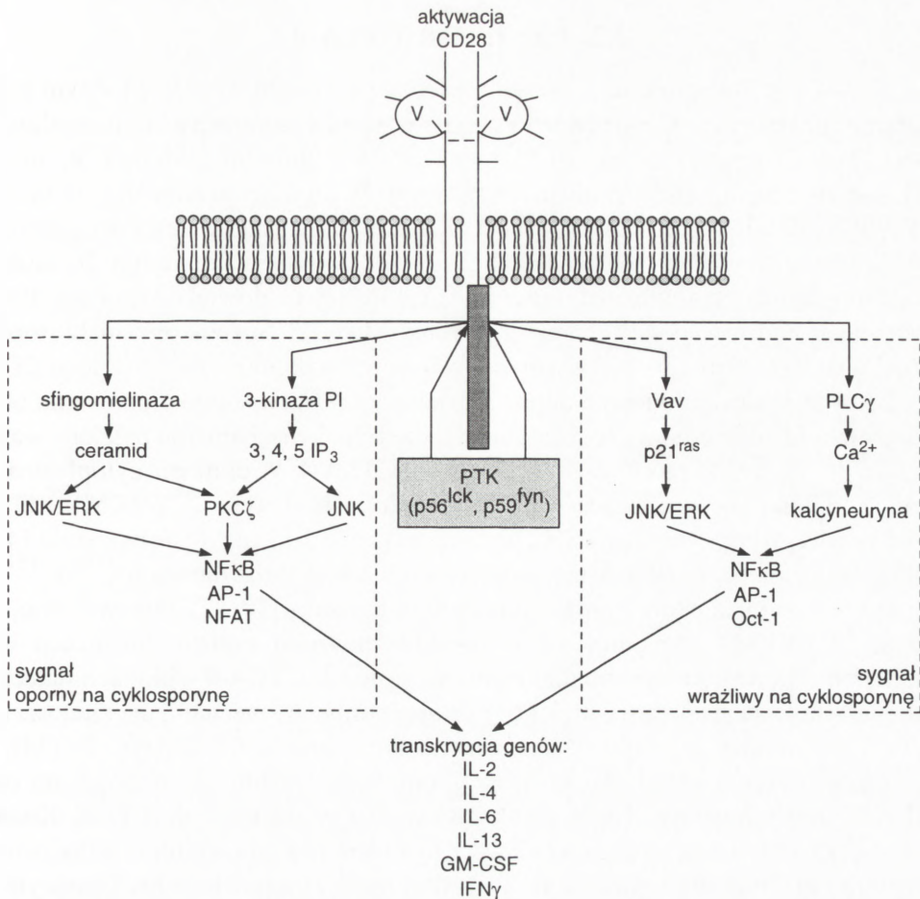
Ostatecznie, szlaki wewnątrzkomórkowego przenoszenia sygnału uruchamiane oddziaływaniem cząsteczek B7 z CD28 wiodą do aktywacji czynników transkry-



Rys. 2. Budowa cząsteczek CTLA-4 i CD28 [24,56]: Grb-2 – białko wiążące receptor czynnika wzrostu (ang. *growth factor receptor binding protein 2*), SH2 – domena podjednostki p85 3-kinazy fosfoinozytolowej (ang. *src-homology 2*), SH3 – domena podjednostki p85 3-kinazy fosfoinozytolowej (ang. *src-homology 3*), p21^{ras} – produkt białkowy protoonkogenu *c-ras*, 3-kinaza PI – 3-kinaza fosfoinozytolu (ang. *phosphoinositide 3-kinase*), P – miejsca wiązania reszty fosforanowej

pcyjnych, a wśród nich NFκB, AP-1, NFAT, Oct-1 i CD28RC oraz stabilizacji mRNA dla pewnych cytokin (rys. 3)[15,17,24,56].

Biologicznym efektem pełnej aktywacji limfocytów T jest synteza i uwolnienie przez te komórki maksymalnie dużego stężenia IL-2 oraz innych cytokin (IL-1α, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, GM-CSF, IFNγ) [17,24]. Jest to sygnał do proliferacji



Rys. 3. Model wewnętrzkomórkowych szlaków przesyłania sygnału po aktywacji cząsteczki CD28 [56]: JNK – kinaza białka *c-Jun* (ang. *c-jun N-terminal kinase*), ERK – kinaza czynnika transkrypcyjnego Elk-1 (kinaza MAP), p21^{ras} – produkt białkowy protoonkogenu *c-ras*, IL – interleukina; IFN- γ – interferon γ , GM-CSF – czynnik stymulujący kolonie granulocytów i monocytów (ang. *granulocyte monocyte-colony stimulating factor*), 3-kinaza PI – 3-kinaza fosfoinozytolu (ang. *phosphoinositide 3-kinase*), 3,4,5-IP₃ – 3,4,5-trifosfoinozytol, NF κ B, AP-1, NFAT – czynniki transkrypcyjne, PLC γ – fosfolipaza C γ , Vav – czynnik wymiany nukleotydu guaninowego, PKC ζ – fosfokinaza C ζ , PTK (p56^{lck}, p59^{fyn}) – białkowe kinazy tyrozynowe

komórek realizowany między innymi przez zwiększoną ekspresję genu *bcl-x_L* [5,6,42]. Tak indukowany przyrost ilości białka Bcl-x_L jest wewnętrzkomórkowym sygnałem hamującym apoptozę komórek, a tym samym stymulującym je do transformacji blastycznej i proliferacji [5,26]. Wewnętrzkomórkowy sygnał powstający w wyniku aktywacji CD28, pobudza także ekspresję receptorów powierzchniowych, a wśród nich cząsteczek CTLA-4, receptora IL-2 oraz antygeny powierzchniowe CD40 [12,16,35].

3.2. Częsteczka CTLA-4

CTLA-4 jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej około 20 kDa z jednym tylko miejscem glikozylacji. Częsteczka występuje w postaci monomeru lub homodimeru (S-S) [56]. Zewnątrzkomórkowa domena immunoglobulinopodobna V, białka CTLA-4 jest spięta mostkiem dwusiarczkowym. W jej obrębie znajduje się motyw MYPPPY (Met-Tyr-Pro-Pro-Pro-Tyr) analogiczny do występującego w cząsteczce CD28, stanowiący miejsce wiązania ligandu [22]. Stopień homologii 36 aminokwasowej domeny cytoplazmatycznej CTLA-4 myszy i człowieka sięgający 100% wskazuje na konserwatywny charakter jej funkcji [11,22]. Stosunkowo niski stopień homologii (30%) struktury pierwszorzędowej wewnątrzkomórkowych domen CD28 i CTLA-4 jest prawdopodobnie odpowiedzialny za różnice w funkcjonowaniu obydwu białek. Jak dotąd niewiele wiadomo o szczegółach mechanizmu przekazywania sygnału do wnętrza komórki za pośrednictwem CTLA-4. W domenie cytoplazmatycznej, podobnie jak w cząsteczce CD28, znajduje się motyw $^{164}\text{YVKM}^{167}$ (Tyr-Val-Lys-Met) wiążący domeny SH2 podjednostki p85 3-kinazy fosfoinozytolu [48]. Fosforylacja miejsc działania niereceptorowych kinaz tyrozynowych (^{164}Y , ^{181}Y) ma wpływ na transdukcję sygnału do wnętrza komórki [10]. Zaobserwowano, że motyw $^{164}\text{YVKM}^{167}$ znajduje się w obrębie sekwencji sygnału lokalizacji wewnątrzkomórkowej, co determinuje ekspresję cząsteczki CTLA-4 w błonach siateczki endoplazmatycznej i aparatu Golgiego sugerując odmienny mechanizm przenoszenia sygnału do wnętrza komórki w porównaniu z cząsteczką CD28 (rys. 2) [34].

Pomimo obserwowanej, daleko idącej homologii w budowie, biologiczna rola CTLA-4 jest odmienna, a wręcz antagonistyczna w stosunku do CD28. Konsekwencją oddziaływania cząsteczki CD28 z ligandem jest zmniejszenie wrażliwości receptora oraz znaczne ograniczenie jego liczebności na powierzchni limfocytów. W tym samym czasie CTLA-4 ulega maksymalnej ekspresji [36]. Jednoczesne zahamowanie syntezy białka Bcl-xL wpływając na równowagę białek z rodziny Bcl pod wpływem dodatkowej stymulacji (CTLA-4/ B7) ingeruje w regulację apoptozy komórki [17,21]. Wykazano, że CTLA-4 może hamować proliferację limfocytów niezróżnicowanych [28,55]. Pozbawiając myszy genu *CTLA-4* stwierdzono jego udział w supresji odpowiedzi immunologicznej [50,57]. Dodatkowym argumentem przemawiającym za antagonistycznym charakterem obydwu cząsteczek jest 20-100 większe powinowactwo CTLA-4 do ligandów, co wskazuje na możliwość kompetycyjnego, w obecności CD28, hamowania reakcji immunologicznej [19,56].

Wiele sprzecznych doniesień dotyczących oddziaływania B7 z CTLA-4 wymaga jeszcze weryfikacji, która pozwoli ustalić dokładnie udział cząsteczki CTLA-4 w przebiegu dodatkowej stymulacji i jej znaczenie w odpowiedzi immunologicznej.

4. KLINICZNE ZNACZENIE DODATKOWEJ STYMULACJI PRZEZ ODDZIAŁYWANIE CD28/CTLA-4 Z B7.1/B7.2

Szlak dodatkowej stymulacji przebiegający za pośrednictwem CD28/CTLA-4-B7.1/B7.2 uważany jest za jeden z głównych w układzie regulującym odpowiedź immunologiczną podczas odrzucania przeszczepu, w chorobach zakaźnych i autoimmunologicznych [1,30,47,51,54]. Model zwierzęcy wykorzystywany jest do oceny stopnia uruchomienia i przebiegu reakcji immunologicznych w patogenezie wielu chorób. Blokowanie poszczególnych etapów szlaku CD28/CTLA-4-B7.1/B7.2 swoistymi antagonistami jest skutecznym sposobem zapobiegania powstawaniu lub przynajmniej łagodzenia przebiegu chorób autoagresywnych i reakcji odrzucania przeszczepu [23,51]. Do tego celu stosuje się swoiste przeciwciała przeciwko B7.1 lub B7.2 oraz chimerę białkową CTLA-4-Ig składającą się z zewnątrzkomórkowej domeny CTLA-4 i regionów stałych C_H2-C_H3 IgG1. CTLA-4-Ig wiązana jest zarówno przez cząsteczki B7.1, jak i B7.2 i eliminuje ich aktywność biologiczną. U myszy z toczniem układowym (ang. *SLE* – *systemic lupus erythematosus*), CTLA-4-Ig wydłuża czas przeżycia najpewniej przez hamowanie syntezy przeciwciał anty-DNA biorących udział w rozwoju kłębkowego zapalenia nerek towarzyszącego chorobie [14,27].

Antagoniści B7.2 wykazują zdolność hamowania procesu autoimmunologicznego i zapobiegają/opóźniają niszczenie wysp trzustkowych (*insulinitis*) u transgenicznych myszy szczepu NOD (ang. *non-obese diabetic mice*) [33]. Fakt ten może sugerować m.in. rolę polimorfizmu genu *CTLA-4* (17^{Thr} → 17^{Ala}, *IDDM12*) w etiopatogenezie cukrzycy insulinozależnej, a także innej choroby o podłożu autoagresywnym, jaką jest choroba Gravesa u człowieka [4,13,40,41,53,58]. Wyniki badań nad mysim alergicznym zapaleniem mózgu i rdzenia kręgowego (ang. *murine allergic encephalomyelitis*), który stanowi model ludzkiego stwardnienia rozsianego (łac. *sclerosis multiplex*), wykazały złagodzenie objawów choroby po zablokowaniu oddziaływania B7.1/CD28 [29,39]. Wykazano również osłabienie reakcji przewlekłego odrzucania przeszczepu w drodze hamowania odpowiedzi komórkowej i humoralnej przez wyłączenie/blokowanie sygnału dodatkowej stymulacji w wyniku terapii hybrydą CTLA-4-Ig [1,3,7].

Wydaje się, że oddziaływania typu CD28/CTLA-4 z B7.1/B7.2 mogą uczestniczyć w regulacji procesów immunologicznych związanych z chorobami infekcyjnymi, w tym również w regulacji przewlekłego procesu zapalnego [26]. Przykładowo, zakażeniu prątkiem gruźlicy (*M. tuberculosis*) lub wewnątrzkomórkowym pierwotniakiem *L. donovani* towarzyszy ograniczenie ekspresji cząsteczek B7.1 na powierzchni makrofagów, w następstwie czego odpowiedź komórkowa jest znacznie osłabiona [25,46]. W tym przypadku przebieg choroby mógłby zostać złagodzony

przez wzmocnienie sygnału dodatkowej stymulacji, na przykład po podaniu agonistów CD28.

5. PODSUMOWANIE

Badania dotyczące szlaków aktywacji limfocytów T zostały ostatnio uhonorowane nagrodą Nobla (1996, P.C. Doherty i R.M. Zinkernagel), co może wskazywać na znaczenie, jakie nadaje się w medycynie wzajemnym oddziaływaniom komórek immunokompetentnych. Wyczerpująca charakterystyka sygnału dodatkowej stymulacji, w tym oddziaływania typu CD28/CTLA-4 z B7.1/B7.2 może otworzyć nowe możliwości profilaktyki i terapii: wybiórczą immunosupresję w chorobach autoimmunologicznych, produkcję nowych szczepionek oraz wzmocnienie odpowiedzi immunologicznej w przebiegu pewnych chorób infekcyjnych i nowotworowych.

LITERATURA

- [1] AKALIN E, CHANDRACER A, RUSSEL ME, TURKA LA, HANCOCK WW, SAYEGH MH. CD28-B7 T cell costimulatory blockade by CTLA4Ig in the rat renal allograft model: inhibition of cell-mediated and humoral immune responses *in vivo*. *Transplantation* 1996; **62(12)**: 1942–1945.
- [2] ARUFFO A, SEED B. Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high efficiency COS cell expression system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 8573.
- [3] AZUMA H, CHANDRAKER A, NADEAU K, HANCOCK WW, CARPENTER CB, TILNEY NL, SAYEGH MH. Blockade of T-cell costimulation prevents development of experimental chronic renal allograft rejection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93(22)**: 12072–12075.
- [4] BADENHOOP K, DONNER H, BRAUN J, SIEGMUND T, RAU H, USADEL KH. Genetic markers in diagnosis and prediction of relapse in Graves disease. *Diabetes* 1996; **104** Supl 4: 98–100.
- [5] BOISE LH, MINN AJ, JUNE CH. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 1995; **3**: 87–98.
- [6] BOISE LH, THOMPSON CB. Hierarchical control of lymphocyte survival. *Science* 1996; **274**: 67–68.
- [7] BOLLING SF, LIN H, WEI RQ, TURKA LA. Preventing allograft rejection with CTLA-4-Ig: effect of donor-specific transfusion route or timing. *J Heart Lung Transplant* 1996; **15(9)**: 928–935.
- [8] BOUCHER LM, WIEGMAN K, FUTTERER A, PFFEFER K, MAK TW, KRONKE M. CD28 signals through acidic sphingomyelinase. *J Exp Med* 1995; **181**: 2059–2068.
- [9] CEFAID, CAI Y-C, HU H, RUDD CH. CD28 co-stimulatory regimes differ in their dependence on phosphatidylinositol 3-kinase: common co-signal induced by CD80 and CD86. *Int. Immun.* 1996; **8**: 1609–1616.
- [10] CHAMBERS CA, ALLISON JP. The role of tyrosine phosphorylation and PTP-1C in CTLA-4 signaling. *Eur J Immunol* 1996; **26 (12)**: 3224–3229.

- [11] DARIAVACH P, MATTEL G, GOLSTEIN P, LEFRANE MP. Human Ig superfamily CTLA-4 gene chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. *Eur J Immunol* 1988; **18**: 1901.
- [12] DE BOER M, KASRAN A, KWEKKEBOOM J, WALTER H, VANDENBERGHE P, CEUPPENS JL. Ligation of B7 with CD28/CTLA-4 on T cells results in CD40 ligand expression, interleukin-4 secretion and efficient help for antibody production by B cells *Eur J Immunol* 1993; **23**: 3120–3125.
- [13] DONNER H, RAU H, WALFISH PG, BRAUN J, SIEGMUNT T, FINKE R, HERWIG J, USADEL KH, BADENHOOP K. CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves disease and to type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**(1): 143–146.
- [14] FINK BK, LINSLEY PS, WOFYSY D. Treatment of murine lupus with CTLA4g. *Science* 1994; **265**: 1225–1227.
- [15] FRASER JD, IRVING BA, CRABTREE GR, WEISS H. CD28 and T cell antigen receptor signal transduction coordinately regulate interleukin 2 gene expression in response to superantigen stimulation. *Eur.J.Immunol.* 1991; **25**1: 313–319.
- [16] FRASER JD, IRVING BA, CRABTREE GR, WEISS A. Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science* 1991; **25**1: 311–316.
- [17] FRASER JD, STRAUSD, WEISS A. Signal transduction events leading to T-cell lymphokine gene expression. *Immunol Today* 1993; **14**: 2601–2612.
- [18] FREEMAN GJ, BOUSIOTIS VA, ANUMANTHAN A, BERNSTEIN GM, KE X-Y, RENNART PD, GRAY GS, GRIBBEN JG, NADLER LM. B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. *Immunity* 1995; **2**: 225–232.
- [19] GALVIN F, FREEMAN GJ, RAZI-WOLF Z, BENACERRAF B, NADLER LM, REISER H. Effects of cyclosporin A, FK 506, and mycalamide A on the activation of murine CD4+ T cells by the murine B7 antigen. *Eur J Immunol* 1993; **23**: 283–286.
- [20] GROSS JA, ST JOHN T, ALLISON JP. Murine homologue of the T lymphocyte antigen CD28: molecular cloning and cell surface expression. *J Immunol* 1990; **144**: 3201.
- [21] GRIBBEN JG, FREEMAN GJ, BOUSSIOTIS VA, RENNERT P, JELLIS CL, GREENFIELD E, BARBER M, RESTIVO VA JR, KE X, GRAY GS. CTLA4 mediates antigen-specific apoptosis of human T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 811–815.
- [22] HARPER K, BALZANO C, ROUVIER E, MATTEI MG, LUCIANI MF, GOLSTEIN P. CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *J Immunol* 1991; **147**: 1037–1044.
- [23] HEROLD KC, VEZYS V, KOONS A, LENSCHOW D, THOMPSON C, BLUESTONE JA. CD28/B7 co-stimulation regulates autoimmune diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin. *J Immunol* 1997; **158**(2): 984–991.
- [24] JUNE CH, BLUESTONE JA, NADLER LA, THOMPSON CG. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today* 1994; **15**: 321–331.
- [25] KAYE PM, ROGERS NJ, CURRY AJ, SCOTT JC. Deficient expression of costimulatory molecules on Leishmania-infected macrophages. *Eur J Immunol* 1994; **24**: 2850–2854.
- [26] KARIV I, TRUNEH A, SWEET RW. Analysis of the site of interaction of CD28 with its counter-receptors CD80 and CD86 and correlation with function. *J Immunol* 1996; **157**: 29–38.
- [27] KOVACS B, THOMAS DE, TSOKOS GC. Elevated in vivo expression of the costimulatory molecule B7-BB1(CD80) on antigen presenting cells from a patient with SLE. *Clin Exp Rheumatol* 1996; **14**(6): 695–700.
- [28] KRUMMEL MF, ALLISON JP. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 development pathways: application to autoimmune disease therapy.. *J Exp Med* 1995; **182**: 459–465.

- [29] KUCHROOVK, DAS MP, BROWN JA, RANGER AM, ZAMVIL SS, SOBEL RA, WEINER HL, NABAVI N, GLIMCHER LH. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 1995; **80**: 707–718.
- [30] LAKKIS FG, KONIECZNY BT, SALEEM S, BADDOURA FK, LINSLEY PS, ALEXANDER DZ, LOWRY RP, PEARSON TC, LARSEN CP. Blocking the CD28-B7 T cell costimulation pathway induces long term cardiac allograft acceptance in the absence of IL-4. *J Immunol* 1997; **158**(5): 2443–2448.
- [31] LANIER LL, O'FALLON S, SOMOZA C, PHILIPS JH, LINSLEY PS, OKUMURA K, ITO D, AZUMA. CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *J Immunol* 1995; **154**: 97–105.
- [32] LEE KP, TAYLOR C, PETRYNIAK B, TURKA LA, JUNE CH, THOMPSON CB. The genome organization of the CD28 gene implications for the regulation of CD28 mRNA expression heterogeneity. *J Immunol* 1990; **145**: 344.
- [33] LENSCHOW DJ, HO SC, SATTAR H. Differential effects of anti-B7.1 and anti-B7.2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *J Exp Med* 1995; **181**: 1145–1155.
- [34] LEUNG HT, BRADSHAW J, CLEAVELAND JS, LINSLEY PS. Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4, a high avidity receptor for CD80 and CD86, contains an intracellular localization motif in its cytoplasmic tail. *J Biol Chem* 1995; **270**: 1–8.
- [35] LINDSTEIN T, JUNE CH, LEDBETTER JA, STELLA G, THOMPSON CB. Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science* 1989; **29**: 339–345.
- [36] LINSLEY PS, BRADSHAW J, URNES M, GROSMIRE L, LEDBETTER JA. CD28 engagement by B7/BB-1 induces transient down-regulation of CD28 synthesis and prolonged unresponsiveness to CD28 signaling. *J Immunol* 1993; **160**: 3161–3169.
- [37] LINSLEY PS, GOLSTEIN P. Lymphocyte activation: T-cell regulation by CTLA-4. *Curr Biol* 1996; **6**(4): 398–400.
- [38] LINSLEY PS, GREENE JR, BRADY W, BAJORATH J, LEDBETTER JA, PEACH R. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1994; **1**: 793–801.
- [39] MILLER SD, VANDERLUGT CL, LENSCHOW DJ. Blockage of CD28/B7-1 interaction prevents epitope spreading and clinical relapses of murine EAE. *Immunity* 1995; **3**: 739–745.
- [40] NISTICO L, BUZZETTI R, PRITCHARD LE, VAN DER AUWERA B, GIOVANNINI C. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. *Hum Molec Genet* 1996; **5**: 1075–1080.
- [41] NISTICO L, BUZZETTI R, PRITCHARD LE. CTLA-4 region predisposes to IDDM and Graves' disease. *Diabetologia* 1996; **39**(suppl), A79.
- [42] NOEL PJ, BOISE LH, THOMPSON CB. Regulation of T cell activation by CD28 and CTLA-4. *Adv Exp Med Biol* 1996; **406**: 209–217.
- [43] NUNES J, COLLETTE Y, TRUNEH A, OLIVE D, CANTRELL DA. The role of p21ras in CD28 signal transduction: triggering of CD28 with antibodies, but not the ligand B7-1, activates p21ras. *J Exp Med* 1994; **180**: 1067–1076.
- [44] PRASAD KVS, CAI Y-C, RAAB M, DUCKWORTH B, CANTLEY L, SCHOELSON SE, RUDD CE. T-cell antigen CD28 interacts with the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase by a cytoplasmic Tyr(P)-Met-Xaa-Met motif. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 2834–2838.
- [45] REISER H, STADECKER MJ. Costimulatory B7 molecules in the pathogenesis of infectious and autoimmune disease. *N Eng. J Med* 1996; **335**: 1369–1377.
- [46] SAHA B, DAS G, VOHRA H, GANGULY NK, MISHRA G. Macrophage T cell interaction in experimental mycobacterial infection: selective regulation of co-stimulatory molecules on

- Mycobacterium-infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immune response. *Eur J Immunol* 1994; **24**: 2618–2624.
- [47] SCHLEGEL PG. The role of adhesion and costimulation molecules in graft-versus-host disease. *Acta Haematol* 1997; **97(1-2)**:105–117.
- [48] SCHNEIDER H, PRASAD KV, SHOELSON S, RUDD C. CTLA-4 binding to the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase in T cells. *J Exp Med* 1994; **181**: 351–355.
- [49] SONGYANG Z, SHOELSON SE, CHAUDHURI M, GISH G, PAWSON T, HASER WG, KING F, ROBERTS T, RATNOFSKY S, LECHLEIDER RJ. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 1993; **72**: 767–778.
- [50] TIVOL EA, BORRIELLO F, SCHWEIZER AN, LYNCH WP, BLUESTONE JA. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 1995; **3**: 541–547.
- [51] TIVOL EA, SCHWIEZER AN, SHARPE AH. Costimulation and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 1996; **8(6)**: 822–830.
- [52] VANDENBERGHE P, FREEMAN GJ, NADLER LM, FLEATHER MC, KAMOUN M, TURKA LA, LEDBETTER JA, THOMPSON CB, JUNE CH. Antibody and B7/BB1-mediated ligation of the CD28 receptor induces tyrosine phosphorylation in human T cells. *J Exp Med* 1992; **175**: 951–960.
- [53] VAN DER AUWERA B, VANDEWALLE C, SCHUIT F. CTLA-4 gene polymorphism confers susceptibility to IDDM independently from genetic and immune disease markers. *Diabetologia* 1996; **39** (suppl), A61.
- [54] VIA CS, RUS V, NGUYEN P, LINSLEY P, GAUSE WC. Differential effect of CTLA4Ig on murine graft-versus-host disease (GVHD) development: CTLA4Ig prevents both acute and chronic GVHD development but reverses only chronic GVHD. *J Immunol* 1996; **157(9)**: 4258–4267.
- [55] WALUNAS TL, LENSCHOW DJ, BAKKER CY, LINSLEY PS, FREEMAN JM, THOMPSON CB, BLUESTONE JA. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1994; **1**: 405–413.
- [56] WARD SG. CD28: a signaling perspective. *Biochem J* 1996; **318**: 361–377.
- [57] WATERHOUSE P, PENNINGER JM, TIMS E, WAKEHAM A, SHAHINIAN A, LEE KP, THOMPSON CB, MAK TW. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CtlA-4. *Science* 1995; **270**: 985–988.
- [58] WITAS HW, MŁYNAŃSKI W, RÓŻAŃSKI M, SYCHOWSKI R, BODALSKI J. Polymorphism in promotor of CTLA-4 gene (IDDM12) in insulin dependent diabetes mellitus. *Diabet Pol* 1997; **4** (suppl 1): U40.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 16.09. 1997 r.

Przyjęto: 10.10. 1997 r.

ul. Sporna 36/50, 91738 Łódź

DIGOKSYGENINA – NIERADIOAKTYWNY MARKER W BADANIACH KWASÓW NUKLEINOWYCH CZEŚĆ I. ZNAKOWANIE SOND MOLEKULARNYCH*

DIGOXIGENIN – A NON-RADIOACTIVE MARKER IN NUCLEIC ACIDS RESEARCH. PART I. LABELLING OF MOLECULAR PROBES

Elżbieta WYROBA, Jolanta WIEJAK, Anna CYWIŃSKA, Liliana SURMACZ

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

Streszczenie: Rosnąca popularność nieradioaktywnego systemu znakowania oligonukleotydów i kwasów nukleinowych pochodnymi digoksygeniny związana jest z bezpieczeństwem detekcji oraz dokładnością, powtarzalnością i szybkością uzyskiwania wyników. W pracy scharakteryzowano digoksygeninę oraz szczegółowo opisano różne sposoby znakowania oligonukleotydów (na 3'- i 5'-końcu) i kwasów nukleinowych (np. techniką przemieszczania pęknięć, wydłużania starterów i w trakcie PCR) przy użyciu DIG-ddUTP, DIG-dUTP i DIG-UTP.

Słowa kluczowe: digoksygenina, kwasy nukleinowe, oligonukleotydy, sondy molekularne, nieradioaktywne znakowanie, chemiluminescencja.

Summary: Non-radioactive labelling system of nucleic acids with digoxigenin (DIG) has been recently widely used and its advantages over radioactive methods are: a safety, an accuracy and a speed of the detection as well as the repetitiveness of the results. A detailed characteristics of the DIG-derivatives and specificity and sensitivity of the method is described. The different methods for labelling of oligonucleotides (at 3'-end and 5'-end) and nucleic acids (including nick translation, primer extension and PCR labelling) with DIG-ddUTP, DIG-dUTP and DIG-UTP are presented.

Key words: Digoxigenin, nucleic acids, oligonucleotides, molecular probes, non-radioactive labelling, chemiluminescence.

Stosowane skróty: **DIG** – digoksygenina, **anty-DIG** – przeciwciało anty-digoksygeninowe, **PCR** (ang. *polymerase chain reaction*) – reakcja łańcuchowa polimerazy, **dATP** – deoksyadenozynotrójfosforan,

*Praca finansowana z funduszy statutowych IBD oraz Grantu KBN Nr 6PO4A 05910.

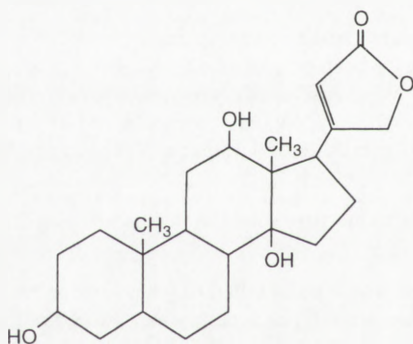
dUTP – deoksyurydynotrójfosforan, **ddUTP** – dideoksyurydynotrójfosforan, **dNTP** – mieszanina czterech deoksynukleotydów.

I. WSTĘP

Od kilku lat coraz częściej stosuje się nieradioaktywne metody znakowania i detekcji kwasów nukleinowych, gdyż mają one liczne zalety: oszczędzają czas, koszty i eliminują ryzyko związane z ekspozycją na szkodliwe dla zdrowia promieniowanie β o wysokiej energii emitowane przez izotopy ($[^{32}\text{P}]$ $[^{35}\text{S}]$) [10, 13]. Ponadto, sondy kwasów nukleinowych znakowane nieradioaktywnie są bardziej stabilne niż sondy radioaktywne. Obecnie najczęściej używanymi technikami znakowania kwasów nukleinowych i oligonukleotydów są metody z użyciem pochodnych digoksygeniny (DIG), które wykrywa się przy zastosowaniu specyficznych przeciwciał (IgG) o wysokim powinowactwie [1–8,12,18,20–25].

II. CHARAKTERYSTYKA DIGOKSYGENINY

Digoksygenina (rys. 1) jest sterydowym haptentem, chemicznie uzyskiwanym z lanatozydu C i aglikonu digoksyny, występujących w warunkach naturalnych w naparstnicy. Pochodne digoksygeniny zostały wykorzystane do znakowania DNA, RNA i oligonukleotydów [9, 10, 12]. DIG doskonale nadaje się do tego celu, gdyż nie występuje naturalnie w komórkach zwierzęcych, w przeciwieństwie do biotyny, która była stosowana w pierwszej nieradioaktywnej metodzie (system biotyna-awidyna/streptawidyna) detekcji kwasów nukleinowych [11]. Dodatkowymi zaletami digoksygeniny są: łatwość łączenia jej z nukleotydami, dostępność przeciwciał anti-DIG o wysokim powinowactwie [10] oraz fakt, że jej rozmiar i hydrofilność umożliwiają wbudowywanie znakowanych nią nukleotydów do kwasów nukleinowych [7].



Rys. 1. Wzór strukturalny digoksygeniny (wg [9])

Do tej pory zsyntetyzowano kilka różnych nukleotydów znakowanych digoksygeniną, których zastosowanie przedstawiono w tabeli 1 [7].

Badanie kwasów nukleinowych przy użyciu DIG obejmuje zasadniczo 3 etapy:

Tabela 1. Nukleotydy sprzężone z digoksygeniną i ich zastosowanie w reakcjach znakowania sond molekularnych (wg [7])

Nukleotydy	Zastosowanie
DIG-ddUTP	• znakowanie oligo- i polinukleotydów na końcach
DIG-dUTP	• znakowanie DNA metodą wydłużania startera (<i>primer extension</i>), przemieszczania pęknięć (<i>nick translation</i>), wypełniania (<i>filling in reaction</i>) i PCR (<i>polymerase chain reaction</i>) • tworzenie ogonków (<i>tailing</i>) na końcach oligo- lub polinukleotydów przy udziale terminalnej transferazy
DIG-UTP	• znakowanie RNA metodą transkrypcji <i>in vitro</i>

- wyznakowanie sondy kwasu nukleinowego digoksygeniną;
- hybrydyzację wyznakowanej sondy do kwasów nukleinowych na filtrze lub *in situ*;
- detekcję za pomocą przeciwciał anti-DIG połączonych bezpośrednio z barwnikiem fluorescencyjnym lub z enzymem, który umożliwia reakcję kolorową, fluorescencyjną lub chemiluminescencyjną [7].

III. METODY ZNAKOWANIA

Znakowanie oligonukleotydów

Istnieją trzy sposoby znakowania oligonukleotydów, które ilustruje rysunek 2:

A. Znakowanie na 3'-końcu. Do 3'-końca oligonukleotydów (o długości 14-100 nukleotydów) przy udziale terminalnej transferazy dodawana jest tylko 1 reszta



A. znakowanie na 3'-końcu



B. dodawanie ogonka na 3'-końcu



C. znakowanie na 5'-końcu

Rys. 2. Sposoby nieradioaktywnego znakowania oligonukleotydów (wg [20]); gwiazdką (*) oznaczono położenie pojedynczych reszt digoksygeninowych

Tabela 2. Charakterystyka oligonukleotydów znakowanych dioksygeniną i ich zastosowanie (wg [20])

Metoda znakowania	Czułość sondy	Specyficzność sondy	Ogólna charakterystyka	Zastosowanie
Znakowanie 3'-końca	>10 pg	+++	dodanie jednej reszty DIG	<ul style="list-style-type: none"> • przeszukiwanie bibliotek • <i>dot/slot blot</i> • hybrydyzacja <i>in situ</i>
Dodanie ogonka na 3'-końcu	>1 pg	++	dodanie kilku reszt DIG	<ul style="list-style-type: none"> • hybrydyzacje typu <i>Southern</i> i <i>Northern</i> • hybrydyzacja <i>in situ</i>
Znakowanie estrem DIG –NHS na 5'-końcu	>10 pg	+++	oligo musi być syntetyzowany z resztą aminową: metoda dobra do dużych prób (reakcja chemiczna)	<ul style="list-style-type: none"> • przeszukiwanie bibliotek • <i>dot/slot blot</i> • hybrydyzacja <i>in situ</i> • wydłużanie startera

ddUTP wyznakowana digoksygeniną [DIG-ddUTP] (zastosowanie dideoksynukleotydu w tej reakcji uniemożliwia dołączanie następnych nukleotydów) (tab. 2). Sondy te zachowują wysoki stopień specyficzności i mogą być używane do hybrydyzacji w tych samych warunkach (temperatura i stężenie soli), co oligonukleotydy nie znakowane [16, 21].

B. Znakowanie przez dodanie ogonka na 3'-końcu. Do 3'-końca oligonukleotydu dodawany jest ogonek o długości 10–100 znakowanych DIG nukleotydów (tab. 2). Reakcja zachodzi przy udziale terminalnej transferazy w mieszaninie nie znakowanych nukleotydów i digoksygenino-11-dUTP. Powstaje ogonek zawierający wiele reszt digoksygeniny. Takie sondy są 10 razy bardziej czułe niż znakowane na 3'-końcu, mogą jednak dawać niespecyficzne tło, np. jeżeli nie znakowanym nukleotydem użytym do reakcji jest dATP, sonda może mieć powinowactwo do regionów bogatych w T. Takie niespecyficzne sygnały mogą być zminimalizowane przez zastosowanie różnych nie znakowanych nukleotydów do reakcji tworzenia ogonka lub przez prehybrydyzację z odpowiednimi sekwencjami (np. poly dA) albo przez ścisłe dostosowanie warunków reakcji. Sondy znakowane w ten sposób są odpowiednie do doświadczeń wymagających optymalnej czułości, takich jak hybrydyzacje typu *Southern* i *Northern* [17].

Metody A. i B. umożliwiają nieradioaktywne znakowanie konwencjonalnie zsintetyzowanych oligonukleotydów.

C. Znakowanie oligonukleotydów na 5'-końcu. Wykonywane jest przy użyciu estrów NHS-digoksygeniny. Oligonukleotydy są znakowane przez dodanie DIG na 5'-końcu w dwuetapowym procesie. Pierwszym etapem jest synteza oligonu-

kleotydu z resztą aminową (*Aminolink*) na 5'-końcu. Po oczyszczeniu syntetycznego nukleotydu następuje drugi etap – tworzenie wiązań kowalencyjnych między estrem NHS-digoksygeniny i 5'-końcową resztą aminową oligonukleotydu.

Sondy są specyficzne, mają czułość porównywalną z sondami znakowanymi na 3'-końcu i są odpowiednie do przeszukiwania bibliotek genomowych i *dot blot* (tab. 2) [2].

Inną istotną cechą tak znakowanych sond jest wolny 3'-koniec, który może stać się starterem w reakcji syntezy DNA metodą PCR. Ilość wyznakowanych sond jest 1000 razy większa niż przy znakowaniu na 3'-końcu. Mogą być one wykrywane i oczyszczane metodą chromatografii powinowactwa z użyciem przeciwciał anty-digoksygeninowych [25].

Znakowanie kwasów nukleinowych

Przemieszczanie pęknięć. Sondy DNA mogą być znakowane DIG metodą przemieszczania pęknięć (*nick translation*). Metoda ta jest szczególnie korzystna w przypadku badań *in situ*, ponieważ wielkość powstałych sond może być określana przez zmianę mieszaniny używanych enzymów (polimeraza I DNA i DNA-za I). Uzyskiwane tą metodą małe ilości zsyntetyzowanego produktu są wystarczające w doświadczeniach *in situ*. Ostatnio wprowadzono gotowy do użycia roztwór zawierający wszystkie składniki niezbędne do wytworzenia sond (200–500 bp) znakowanych DIG, które są optymalne *in situ*. Roztwór ten może być używany w przypadku matryc liniowych i kołowych włącznie z produktami PCR [7].

Wydłużanie starterów (*primer extension*). Metoda polega na syntezie nici DNA komplementarnej do matrycy zaczynając od wolnej grupy 3-OH startera i jest polecana do enzymatycznej syntezy plazmidów i fragmentów DNA znakowanych DIG (rys. 3). Ma ona przewagę nad innymi metodami, ponieważ:

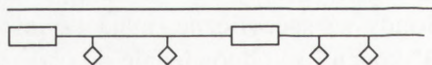
- jest bardzo skuteczna, działa z różnymi typami DNA niezależnie od wielkości cząsteczki i nie wymaga DNA wysoko oczyszczonego;
- wymagana jest mała ilość matrycowego DNA (10 ng);
- w metodzie tej starterowy DNA działa tylko jako matryca, a reakcja znakowania jest reakcją syntezy *de novo*.

W przypadku znakowania DNA digoksygeniną stężenie nukleotydów nie jest czynnikiem ograniczającym (w przeciwieństwie do znakowania radioaktywnego), dlatego mikrogramowa ilość znakowanego DNA może powstać z kilku nanogramów matrycowego DNA. Ostatnio ulepszono warunki znakowania DNA pochodnymi digoksygeniny, by poprawić skuteczność i niezawodność tej reakcji. Wszystkie wymagane składniki, tj. nukleotydy, w tym DIG-dUTP, polimerazę Klenowa, heksanukleotydy i stabilizatory są przygotowane w optymalnym dla reakcji buforze zawierającym 50% glicerol. Używając tej mieszaniny znakującej, zwanej DIG *High-*

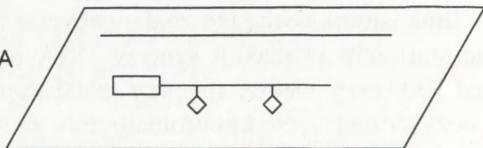
zdenaturowane liniowe DNA służące jako matryca do syntezy sondy



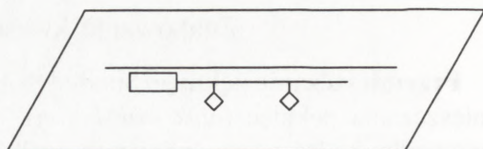
synteza znakowanego DNA – sondy przez polimerazę Klenowa przy użyciu startera, mieszaniny dNTP i DIG-dUTP



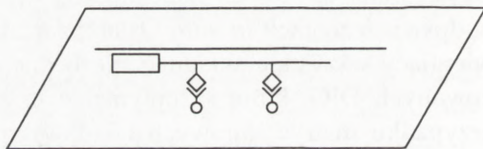
badane DNA związane z błotem + sonda DNA



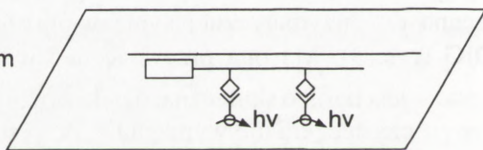
hybrydyzacja






wiązanie przeciwciał anti-DIG połączonych z alkaliczną fosfatazą



reakcja z substratem chemiluminescencyjnym (np. CDP-Star)



-  starter
-  DIG-dUTP
-  przeciwciało anti-DIG połączone z alkaliczną fosfatazą

Rys. 3. Znakowanie sondy DNA pochodną digoksygeniny (DIG-dUTP) metodą wydłużania startera i jej detekcja po hybrydyzacji typu *Southern* (wg [20])

Prime (Boehringer Mannheim), wymagane jest tylko jedno pipetowanie, a ilość otrzymanej sondy jest znacznie większa (1–3 mg znakowanego DIG DNA w standardowej reakcji znakowania).

Znakowanie metodą wydłużania startera może być stosowane po trawieniu DNA-azą, która zmniejsza wielkość znakowanego DNA [7, 14].

Znakowanie w trakcie reakcji PCR. DIG-dUTP może być także wbudowywany podczas amplifikacji DNA w trakcie reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). Zwykle do syntezy czułych sond hybrydacyjnych wymagana jest duża ilość związku znakującego, jak np. w metodzie wydłużania starterów. Natomiast sondy uzyskiwane metodą PCR mogą być syntetyzowane z minimalnej ilości matrycowego DNA i zawierają tylko oczekiwane sekwencje bez sekwencji wektorowych [12]. Zależnie od matrycy wydajność PCR może być obniżona wskutek wysokiego stężenia DIG-dUTP, niemniej jednak jest ona wystarczająca dla różnych typów hybrydacji. Produkty PCR mogą być rozdzielane na żelu, przenoszone na filtry i wykrywane przeciwciałami anti-DIG [1, 3, 4, 6, 8, 15, 24].

Znakowanie RNA. Sondy RNA znakowane DIG są syntetyzowane z wektorów plazmidowych lub fagowych zawierających odpowiednie promotory polimerazy RNA bakteriofaga SP6, T3 lub T7. Jest to najbardziej wydajna metoda enzymatycznego znakowania. Reakcja transkrypcji *in vitro* z użyciem jednej z tych polimeraz RNA i mieszaniny trifosforanów rybonukleozydów oraz DIG-UTP doprowadza do powstania bardzo dużej ilości (10–20 mg z 1 mg plazmidowego DNA) RNA wyznakowanego DIG, podczas gdy znakowanie PCR lub metodą wydłużania startera daje 1–3 mg znakowanego DIG DNA w reakcji standardowej.

Sondy RNA znakowane DIG wykazują znacznie większą czułość w metodzie *Northern* w porównaniu z sondami DNA. Ponadto sondy RNA dają lepszy sygnał w hybrydacji *in situ* z mRNA. Inną korzyścią jest możliwość użycia znakowanego sensownego RNA jako kontroli negatywnej [5, 7, 16].

Znakowanie wewnętrzne do sekwencjonowania DNA. W znakowaniu tym stosuje się DIG-dATP. Metoda ta wykorzystuje fakt, że nukleotydy purynowe są rzadziej włączane przez niektóre polimerazy DNA niż pirymidynowe. I tak, w pierwszym etapie elongacji z użyciem polimerazy DNA T7 i określonych stężeń dNTP wbudowywana jest tylko jedna reszta DIG-dATP, co prowadzi do powstania produktów o identycznej masie cząsteczkowej i jest wstępnym warunkiem powstania drabinki sekwencyjnej [7].

Ilościowość reakcji znakowania. Bezpośredni pomiar ilościowy reakcji znakowania i powstałego produktu nie jest możliwy. Ocenę ilościową można przeprowadzić przez porównanie z wyznakowanym DNA standardowym. Ostatnio są dostępne ilościowe prążki DNA, które umożliwiają szybsze określenie względnej ilości powstałych kwasów nukleinowych znakowanych DIG [7]. Ponadto dokonać można porównania stopnia wyznakowania oligonukleotydów stosując elektroforezę na żelu poliakrylamidowym i barwienie bromkiem etydydy [23]: wyznakowany oligonukleotyd migruje wolniej niż nieznakowany i jest wyraźnie widoczny [19].

Oczyszczanie i stabilność sond. Sondy po wyznakowaniu DIG zasadniczo nie wymagają oczyszczania i mogą być bezpośrednio dodawane do reakcji hybrydacji

oraz są stabilne nawet przez kilka lat przy odpowiednim przechowywaniu. Wyznakowane oligonukleotydy można oczyszczać na kolumnkach chromatograficznych typu Bio-Spin 6 [18, 19, 23]. Możliwość syntezy dużej ilości znakowanych DIG kwasów nukleinowych w pojedynczej reakcji podwyższa powtarzalność i porównywalność wyników, ponieważ można stosować dokładnie te same sondy DNA w tym samym stężeniu w wielu eksperymentach. Sondy radioaktywne, które muszą być przygotowywane co pewien czas od nowa, różnią się zarówno stopniem oczyszczenia, jak i gęstością znakowania [7].

PIŚMIENNICTWO

- [1] AN SF, FRANKLIN D, FLEMING KA. Generation of digoxigenin-labelled double-stranded and single-stranded probes using the polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 1992; **6**: 193–200.
- [2] BOUZYK M, EVANS C, CULLIN L, COX S, WARNE D, NYBERG K, BRYANT SP, SPURR NK. Isolation and mapping of three new polymorphic markers to chromosomes 3, 20 and 21. *Ann Hum Genet* 1996; **60**: 73–75.
- [3] CELEDA D, BETTAG U, CREMER C. PCR amplification and simultaneous digoxigenin incorporation of long DNA probes for fluorescence *in situ* hybridization. *Biotechniques* 1992; **12**: 98–102.
- [4] DAKHAMA A, HEGELE RG. A nonradioactive method for rapid and sensitive detection of polymerase chain reaction products by use of bromo-deoxyuridine. *Mod Pathol* 1996; **9**: 849–853.
- [5] FARQUHARSON M, HARVIE R, McNICOL AM. Detection of mRNA using a digoxigenin end labelled oligonucleotide probe. *J Clin Pathol* 1990; **43**: 424–428.
- [6] FISHER P, BAMUHIIGA J, KILIAN AH, BUTTNER DW. Strain differentiation of *Onchocerca volvulus* from Uganda using DNA probes. *Parasitology* 1996; **112**: 401–408.
- [7] HÖLTKE HJ, ANKENBAUER W, MUHLEGGGER R, REIN R, SAGNER G, SEIBL R, WALTER T. The digoxigenine (DIG) system for non-radioactive labelling and detection of nucleic acids. *Cell Mol Biol* 1995; **41**: 883–905.
- [8] IBRAHIM A, LIESACK W, STACKEBRANDT E. Differentiation between pathogenic and non-pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains by colony hybridization with a PCR-mediated digoxigenin-dUTP-labelled probe. *Mol Cell Probes* 1992; **6**: 163–171.
- [9] KESSLER C. The digoxigenin: anti-digoxigenin (DIG) system [w] KESSLER C [red.] Nonradioactive Labeling and Detection of Biomolecules. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1992: 35–56.
- [10] KESSLER C. The digoxigenin (DIG) technology – a survey on the concept and realization of a novel bioanalytical indicator system. *Mol Cell Probes* 1991; **5**: 161–205.
- [11] LANGER PR, WALDROP AA, WARD DC. Enzymatic synthesis of biotin-labelled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 6633–6637.
- [12] LION T, HAAS OA. Nonradioactive labeling of probe with digoxigenin by polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1990; **188**: 335–337.
- [13] MARTIN R, HOOVER C, GRIMME S, GROGAN C, HOLTKE J, KESSLER CA. Highly sensitive, nonradioactive DNA labeling and detection system. *BioTechniques* 1990; **6**: 762–768.
- [14] MÜHLEGGGER K, HUBER E, von der ELTZ H, RUGER R, KESSLER C. Non-radioactive labeling and detection of nucleic acids: IV. Synthesis and properties of digoxigenin-modified

- 2'-deoxyuridine 5'triphosphates and a photoactivatable analog of digoxigenin (photodigoxigenin). *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1990; **371**: 953–965.
- [15] POWELL EE, KROON PA. Measurement of mRNA by quantitative PCR with a nonradioactive label. *J Lipid Res* 1992; **33**: 609–614.
- [16] ROSEMEYER V, LAUBROCK A, SEIBL R. Nonradioactive 3'-end-labeling of RNA molecules of different lengths by terminal deoxynucleotidyltransferase. *Anal Biochem* 1995; **224**: 446–449.
- [17] SCHMITZ GG, WALTER T, SEIBL R, KESSLER C. Nonradioactive labelling of oligonucleotides *in vitro* with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Anal Biochem* 1991; **192**: 222–231.
- [18] SUBRAMANIAN SV, WYROBA E, ANDERSEN AP, SATIR BH. Cloning and sequencing of parafusin, a calcium-dependent exocytosis-related phosphoglycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 9832–9836.
- [19] SURMACZ L, KRAWCZYK K, WYROBA E. Different β -adenergetic specific molecular probes reveal the same DNA species in *Paramecium* hybridization analysis. 1997. -wysta \acute{n} e do druku.
- [20] TIZARD R, CATE RL, RAMACHANDRAN KL, WYSK M, VOYTA C, MURPHY OJ, BRONSTEIN I. Imaging of DNA sequences with chemiluminescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 4514–4518.
- [21] The Genius System Users Guide for Filter Hybridization. Version 2.0. Boehringer-Mannheim Corp., Indianapolis, IN. 1992: 5–29.
- [22] WYROBA E, SUBRAMANIAN SV, SATIR BH. Southern blot analysis of *Paramecium* DNA using parafusin and phosphoglucomutase specific probes. *Mol Biol Cell (Suppl)* 1992; **3**: 62 a.
- [23] WYROBA E, WIDDING HOYER A, STORGAARD PS, SATIR BH. Mammalian homologue of the calcium-sensitive phosphoglycoprotein, parafusin. *Eur J Cell Biol* 1995; **68**: 419–426.
- [24] ZABEL M., CIESIELSKA M., WYSOCKA T. Localization of calcitonin mRNA using *in situ* labeling with reverse transcriptase PCR. *Folia Histochem Cytobiol (Suppl 1)* 1996; **34**: 7–8.
- [25] ZISCHLER H, NANDA I, SCHÄFER R, SCHMID M, EPPLEN JT. Digoxigenated oligonucleotide probes specific for simple repeats in DNA fingerprinting and hybridization *in situ*. *Hum Genet* 1989; **82**: 227–233.

Redaktor prowadzący – M. Zabel

Otrzymano: 10.09. 1997 r.

Przyjęto: 17.10. 1997 r.

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

DIGOKSYGENINA – NIERADIOAKTYWNY MARKER W BADANIACH KWASÓW NUKLEINOWYCH. CZEŚĆ II. ZASTOSOWANIE WYZNAKOWANYCH SOND MOLEKULARNYCH*

DIGOXIGENIN – NON-RADIOACTIVE MARKER IN NUCLEIC
ACIDS RESEARCH. PART II. APPLICATION AND DETECTION
OF THE LABELLED PROBES

Jolanta WIEJAK, Anna CYWIŃSKA, Liliana SURMACZ, Elżbieta WYROBA
Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego
PAN, Warszawa

Streszczenie: Opisano różnorodne techniki detekcji sond molekularnych wyznakowanych digoksygeniną (DIG) przy użyciu przeciwciał anti-DIG sprzężonych ze związkami fluorescencyjnymi, enzymami (fosfataza alkaliczna i peroksydaza) lub złotem koloidalnym. Szegółowo scharakteryzowano kilkanaście substratów chemiluminescencyjnych umożliwiających najszybszą i najdokładniejszą detekcję sond. Następnie omówiono rozmaite zastosowania wyznakowanych oligonukleotydów i kwasów nukleinowych w hybrydyzacji typu *Southern*, *Northern*, *in situ* oraz EMSA, PRINS i sekwencjonowaniu DNA.

Słowa kluczowe: digoksygenina, przeciwciała anti-DIG, hybrydyzacja, detekcja kwasów nukleinowych, fosfataza alkaliczna, peroksydaza chrzanowa, złoto koloidalne, związki fluorescencyjne.

Summary. Different techniques of detection of digoxigenin-labelled oligonucleotides and nucleic acids with anti-DIG antibodies coupled to fluorescent dyes, enzymes (alkaline phosphatase and horseradish peroxidase) or colloidal gold are discussed. Several chemiluminescent substrates – enabling the most efficient, rapid and sensitive detection of the labelled probes – have been described. A variety of application of DIG-labelled probes in *Southern*, *Northern* and *in situ* hybridization as well as in EMSA, PRINS and DNA sequencing are presented.

Key words: digoxigenin, anti-DIG antibodies, hybridization, detection of nucleic acids, alkaline phosphatase, horseradish peroxidase, colloidal gold, fluorescent dyes.

*Praca finansowana z funduszy statutowych IBD oraz Grantu KBN Nr 6PO4A 05910.

Stosowane skróty: **DIG** – digoksygenina, **anty-DIG** – przeciwciało anty-dioksygeninowe, **FISH** (ang. *fluorescent in situ hybridization*) – hybrydyzacja fluorescencyjna *in situ*, **PRINS** (ang. *primed in situ synthesis*) – synteza *in situ* przy udziale startera, **EMSA** (ang. *electrophoretic mobility shift assay*) – test opóźnienia migracji, **AP** – alkaliczna fosfataza, **dUTP** – deoksyurydynotrójfosforan, **dCTP** – deoksy-cytydynotrójfosforan, **PCR** (ang. *polymerase chain reaction*) – reakcja łańcuchowa polimerazy, **BCIP** – 5-bromo-4-chloro-3-indolilofosforan, **NBT** – chlorek nitroblekitu tetrazolu, **HNPP** – fosforan hydroksynaftylofenylu, **HNP** – hydroksynaftylofenyl, **PNP** – fosforan 4-nitrofenylu, **TMB** (3,3',-5,5'-tetramethylbenzidine) – tetrametylobenzydyna, **ABTS** (ang. *2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)*), **DNP** – dinitrofenol.

I. WSTĘP

Subpikogramowe ilości DNA i RNA mogą być wykryte precyzyjnie, szybko i bezpiecznie dzięki zastosowaniu nieradioaktywnego markera – digoksygeniny [10], którą scharakteryzowano w pierwszej części tego szkicu. Kilkanaście sposobów detekcji sond molekularnych wyznakowanych digoksygeniną oraz ich różnorodne zastosowania przyczyniły się do rozpowszechnienia tej metody wśród biologów molekularnych.

II. ZASTOSOWANIA

Omówimy tutaj kilka typowych i bardziej interesujących przykładów zastosowań oligonukleotydów i kwasów nukleinowych znakowanych DIG, z których większość opiera się na analizie hybrydyzacyjnej.

Hybrydyzacja

Hybrydyzacja kwasów nukleinowych jest metodą powszechnie używaną w biologii molekularnej. Kinetyka i warunki hybrydyzacji z użyciem sond nieradioaktywnych [10] nie różnią się istotnie od metod radioaktywnych [25]. Do transferu używane są filtry nylonowe lub nitrocelulozowe. Filtry nylonowe są prostsze w użyciu, trwalsze, silniej wiążą kwasy nukleinowe, wykazują większą czułość detekcyjną i silniej wzmacniają sygnał chemiluminescencyjny. Dla układu DIG przygotowano filtry zawierające ściśle określoną ilość ładunków dodatnich, dające wysoką czułość i niskie tło (zbyt duży ładunek dodatni powoduje bowiem powstanie wysokiego tła wskutek niespecyficznego wiązania się białek, szczególnie przeciwciał używanych do detekcji, natomiast filtry nie naładowane wykazują mniejszą czułość) [10, 30].

Po przeprowadzeniu hybrydyzacji filtry wymagają zablokowania czynnikiem blokującym (np. sterylnym roztworem kazeiny lub firmowym Boehringer-Mannheim).

Hybrydyzacja typu Southern. Filtry mogą być hybrydyzowane z sondami DNA, RNA lub oligonukleotydowymi [28] znakowanymi DIG [20] i wykrywane reakcją kolorową, fluorescencyjną lub chemiluminescencyjną [20, 35–37]. Metody zna-

kowania i detekcji zależą od konkretnych wymagań dotyczących czułości i szybkości reakcji.

Sondy DNA i RNA charakteryzują się wyższą czułością niż sondy oligonukleotydowe. Stosowanie detekcji fluorescencyjnej lub chemiluminescencyjnej umożliwia „oderwanie” (*stripping*) związanej sondy np. w wyniku 30-minutowej inkubacji w 0,2 M NaOH i ponowne użycie blotów do kolejnej hybrydyzacji. Procedura ta jest trudniejsza, gdy detekcja odbywa się przy użyciu reakcji kolorowej, ponieważ powstały w tej reakcji osad trudno jest usunąć z filtra. Z drugiej jednak strony detekcja kolorowa umożliwia względnie najlepszy rozdział blisko położonych prążków i dlatego preferowana jest ona w takich zastosowaniach, jak np. *finger-printing* DNA [10, 27].

Hybrydyzacja typu Northern. Hybrydyzacja typu *Northern* jest jedną z najbardziej wygodnych metod wykrywania mRNA. Stosowane są tutaj głównie sondy antysensownego RNA, ponieważ wykazują one znacznie wyższą czułość niż sondy cDNA czy oligonukleotydowe [7]. Metodą nieradioaktywną można wykryć nawet śladowe ilości mRNA, co jest trudne przy zastosowaniu sond znakowanych radioaktywnie [26, 31].

Hybrydyzacja *in situ* w mikroskopie świetlnym. Hybrydyzacja molekularna *in situ* stosowana jest do uwidaczniania kwasów nukleinowych (DNA lub RNA) w utrwalonych komórkach [29] lub tkankach, co umożliwia badanie ekspresji genów na poziomie histologicznym [9]. Hybrydyzacje *in situ* mogą być wykonywane z użyciem sond DNA [32], RNA [13, 34] lub oligonukleotydowych.

Obecnie coraz częściej stosowane są sondy znakowane nieradioaktywnie, szczególnie digoksygeniną, ponieważ są łatwiejsze i szybsze w użyciu [1] niż sondy radioaktywne, pomimo że istnieją trudności w ilościowej ocenie sygnału zlokalizowanego wewnątrz komórki [9, 29]. Użycie digoksygeniny eliminuje problemy związane zarówno z użyciem sond znakowanych radioaktywnym fosforem (np. krótka trwałość, konieczność ochrony radiologicznej), jak i biotyną, która występuje endogennie w dużych ilościach w wątrobie i nerkach [9, 29].

Detekcja DIG-sond odbywa się przy zastosowaniu anty-DIG fosfatazy alkalicznej i reakcji kolorowej z użyciem substratu kolorowego BCIP/NBT lub przeciwciał anty-DIG połączonych z cząsteczkami złota [10, 38].

Hybrydyzacja fluorescencyjna *in situ* (FISH = *fluorescent in situ hybridization*). W metodzie tej stosowane są głównie sondy DNA znakowane DIG, chociaż znane są również przypadki stosowania sond RNA znakowanych DIG, a także znakowanych oligonukleotydów. Detekcja jest bezpośrednia z użyciem przeciwciał anty-DIG znakowanych fluoresceiną, rodaminą lub aminokumaryną. Może być ona wzmocniona przez podanie pierwszorzędowego mono- lub poliklonalnego przeciwciała anty-DIG, a następnie przeciwciała drugorzędowego wyznakowanego fluoresceiną. Jest to często stosowana metoda wzmacniania sygnału [6, 23].

Można również zastosować detekcję pośrednią, używając przeciwciał anty-fluoresceinowych znakowanych fosfatazą alkaliczną i jej substratu – HNPP, który zwiększa dodatkowo czułość detekcji FISH przez amplifikację sygnału enzymatycznego fosfatazy alkalicznej. Używając tego substratu można nawet wykryć jednokopijne geny na chromosomie metafazowym [5, 14].

Synteza i znakowanie *in situ* przy udziale startera (PRINS = *primed in situ synthesis*). Technika ta opiera się na hybrydyzacji nie znakowanych fragmentów DNA do sekwencji docelowych (DNA) *in situ*. Dalsza reakcja zachodzi po dodaniu mieszaniny zawierającej polimerazę DNA (np. Taq), buforu i dNTPs (mieszaniny dezoksynukleotydów) zawierającej DIG-dUTP. Nie znakowana sonda działa jako starter, a sekwencja docelowa jako matryca do syntezy DNA znakowanego DIG. Produkt jest wykrywany podobnie jak w standardowej metodzie FISH [10].

Technika PRINS jest prosta, czuła i znacznie szybsza niż inne techniki (np. FISH), gdyż wymaga tylko nieznakowanego oligonukleotydu umożliwiającego hybrydyzację. Ponadto zaletą tej metody jest lepsze zachowanie struktury chromosomów, komórek i tkanek. Sonda jest nieznakowana i dlatego jej niespecyficzne wiązanie z próbką nie powoduje dużego tła, co pozwala na stosowanie jej w wysokim stężeniu. Metoda PRINS jest używana do analizy szczegółowych substruktur w powtarzalnym DNA, organizacji sekwencji DNA w centromerze oraz w genetyce klinicznej do badań ekspresji genów i aberracji chromosomowych. Ponadto technika ta pozwala na lokalizację sklonowanego cDNA podczas badania nieprawidłowego składania pre-mRNA i występujących w nim mutacji oraz do wykrywania sekwencji jednokopijnych w interfazowym jądrze. PRINS umożliwia także badanie utraconych fragmentów chromosomów metafazowych i jądra [10, 15].

Test opóźnienia migracji – EMSA

Metoda EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) jest stosowana do detekcji lub kontroli białek wiążących określone sekwencje DNA. Jako sond używa się przede wszystkim dwuniciowych oligonukleotydów znakowanych DIG. Czułość metody z zastosowaniem DIG jest porównywalna z metodą radioaktywną, lecz daje lepszy rozdział prążków, który jest szczególnie istotny w analizach ekstraktów jądrowych. Aby być pewnym, że digoksygenina nie przyłączy się do miejsca wiążącego białko, dołączana jest ona na końcu dideksynukleotydu, np. przez wypełnienie tępych końców przez polimerazę Klenowa i DIG-dUTP lub DIG-dCTP lub też przez wyznakowanie 3'-końca przy użyciu terminalnej transferazy [10].

Sekwencjonowanie DNA

Starterem w reakcji sekwencjonowania DNA jest oligonukleotyd znakowany digoksygeniną na 5'-końcu. Produkty reakcji są rozdzielane na standardowym żelu

sekwencjonującym DNA i po elektroforezie są przenoszone na filtry nylonowe (może się to również odbywać przez bezpośrednią elektroforezę na filtrze) [10].

Detekcja drabinki sekwencyjnej opiera się na reakcji między DIG na 5'-końcu startera i przeciwciałem anti-DIG sprzężonym z fosfatazą alkaliczną, która przeprowadza reakcję kolorową, fluorescencyjną lub chemiluminescencyjną. Z jednego sekwencjonowania można odczytać około 300 nukleotydów. Detekcja chemiluminescencyjna jest bardzo szybka (5–20 minut ekspozycji na kliszy rentgenowskiej w przypadku użycia CDP-Star) w porównaniu z detekcją radioaktywną (16–40 godzin). Intensywny sygnał chemiluminescencyjny jest trwały i może być wykrywany nawet po 2 lub 3 dniach. Metoda ta jest prosta i względnie tania w porównaniu z metodą radioaktywną oraz z całkowicie zautomatyzowanym sekwencjonowaniem DNA. Łatwy i szybki jest również *stripping* blotów po detekcji chemiluminescencyjnej [10, 24].

Zastosowanie anti-DIG kuleczek magnetycznych

Technika wiązania przeciwciał anti-DIG z kuleczkami magnetycznymi używana jest do izolowania kwasów nukleinowych, głównie mRNA, przez DIG-znakowane oligo(dT). Metoda ta pozwala również na odzyskanie określonych cząsteczek kwasów nukleinowych przy użyciu sond oligonukleotydowych o specyficznej sekwencji oraz oddzielanie sond hybrydacyjnych kwasów nukleinowych znakowanych DIG od nie znakowanej matrycy. Kuleczki magnetyczne mogą być także stosowane do sekwencjonowania unieruchomionych jednoniciowych fragmentów DNA.

Kombinacja kuleczek magnetycznych anti-DIG ze streptawidynowymi kuleczkami magnetycznymi pozwala na unieruchomienie obu nici DNA z pojedynczej reakcji PCR z jednym starterem znakowanym DIG, a drugim znakowanym biotyną i sekwencjonowanie obu nici produktu PCR. Pozwala to np. na detekcję allelo-specyficznych zmian lub mutacji w złożonych próbach. Innym interesującym zastosowaniem jest hybrydacja odejmująca (*subtractive hybridization*) i klonowanie różnicowe (*difference cloning*) [12].

III. DETEKcja

Do detekcji kwasów nukleinowych znakowanych DIG (tab. 1) używane są fragmenty Fab owczych poliklonalnych przeciwciał anti-DIG sprzężonych z:

- związkami fluorescencyjnymi (fluoresceina, rodamina, aminokumaryna);
- enzymami (fosfataza alkaliczna, peroksydaza chrzanowa, β -galaktozydaza, fosfataza kwaśna, mikroperoksydaza), które mogą katalizować reakcję chemiluminescencyjną, fluorescencyjną lub kolorową;
- metalami (złoto koloidalne).

Tabela 1. Metody detekcji kwasów nukleinowych znakowanych DIG (zmodyfikowana wg [10])

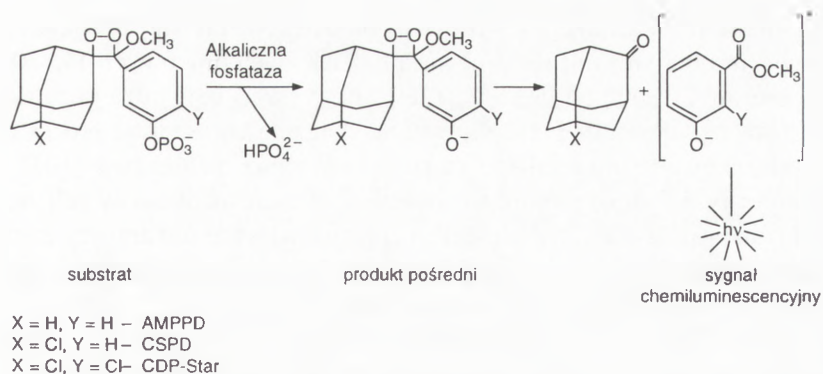
Przeciwciało	Substrat	Produkt	Zastosowanie
AP anty-DIG	BCIP/NBT	kolorowy osad	hybrydyzacja na filtrach i <i>in situ</i> w mikroskopie świetlnym
	HNPP +Fast Red TP	osad fluoerescencyjny	hybrydyzacja na filtrach, FISH
	Atto-Phos	roztwór fluorescencyjny	płytki wielodołkowe, detekcja w roztworze
	dioksetany	sygnał chemiluminescencyjny	filtry, płytki wielodołkowe, detekcja w roztworze
	PNP	kolorowy roztwór	detekcja w roztworze, płytki wielodołkowe
Peroksydaza chrzanowa anty-DIG	ABTS/TMB	kolorowy roztwór	detekcja w roztworze, płytki wielodołkowe
	DAB luminol jodofenol	kolorowy osad sygnał chemiluminescencyjny	hybrydyzacja <i>in situ</i> w mikroskopie świetlnym filtry, płytki wielodołkowe, detekcja w roztworze
Kulki złota anty-DIG		cząstki odbijające światło	hybrydyzacja <i>in situ</i> w mikroskopie świetlnym i elektronowym
Związki fluorescencyjne anty-DIG		fluorescencja	FISH

Fosfataza alkaliczna jest polecana do detekcji chemiluminescencyjnej (rys. 1) oraz do tworzenia kompleksów fluorescencyjnych lub kolorowych [10]. Wykazuje ona wysoki stopień termostabilności i odporności na warunki środowiskowe, co sprawia, że jest enzymem preferowanym w wykrywaniu kwasów nukleinowych [3].

Peroksydaza chrzanowa natomiast jest stosowana przeważnie do kolorowej lub chemiluminescencyjnej detekcji sond znakowanych DIG w roztworach (np. w próbach na płytkach wielodołkowych) [22].

Substraty fosfatazy alkalicznej

1. BCIP/NBT. 5-bromo-4-chloro-3-indolilofosforan (BCIP) i chlorek nitro błękitu tetrazolu (NBT) tworzą bezbarwny lub lekko żółty rozpuszczalny kompleks substratów. Po defosforylacji przez alkaliczną fosfatazę zachodzi reakcja redoks, w



Rys. 1. Reakcja generowania sygnału chemiluminescencyjnego (wg [3,29]). Alkaliczna fosfataza biorąca udział w tej reakcji jest sprzężona z przeciwciałem antydigoksygeninowym

wyniku której powstaje niebiesko-purpurowy, nierozpuszczalny w wodzie osad w miejscu, gdzie enzym jest aktywny. Umożliwia to czułą detekcję kwasów nukleinowych znakowanych DIG przez fosfatazę alkaliczną sprzężoną z przeciwciałem anti-DIG zarówno na filtrach, jak i *in situ*. W obu przypadkach osiągane jest bardzo wyraźne rozdzielenie blisko położonych źródeł sygnałów. Reakcja kolorowa na błonach przebiega od kilku minut do 16 godzin. Z tej wysokiej rozdzielczości układu BCIP/NBT korzystać można np. w metodzie DNA *fingerprinting*. Produkt reakcji jest bardzo mocno związany z filtrem i dlatego usunięcie go w celu ponownego użycia blotów jest trudne i nie polecane [10, 21].

2. HNPP. Fosforan hydroksynaftylufenyłu (HNPP) jest substratem fluorescencyjnym, który umożliwia czułą detekcję biocząsteczek na filtrach. Po defosforylacji HNPP wytwarza silnie fluorescencyjny nierozpuszczalny w wodzie osad o maksimum emisji w 509 nm (wykrywany przy użyciu ultrafioletu), który można zarejestrować na kliszy fotograficznej. Filtry po detekcji HNPP, w przeciwieństwie do BCIP/NBT, łatwo ulegają strippingowi i mogą być ponownie użyte.

Przy zastosowaniu *in situ* oprócz HNPP dodawana jest jeszcze czerwień trwała (*Fast Red TR*), aby zwiększyć powinowactwo do skrawków tkankowych i chromosomów oraz utrwalić osad zdefosforylowanej formy (HNP). Maksimum absorpcji osadu *HNP/Fast Red TR* przesuwają się do 550 nm, a widmo emisji fluorescencji ma maksimum w 562 nm. Ilość osadu fluorescencyjnego można zwiększyć przez powtórne dodanie świeżego roztworu substratu, co zwiększa czułość detekcyjną, która jest porównywalna ze standardową nie-enzymatyczną metodą detekcji fluorescencyjnej *in situ* posługującą się przeciwciałami znakowanymi fluoresceiną lub rodaminą [10, 14].

3. Atto-Phos. W wyniku defosforylacji z Atto-Phos, podobnie jak z HNPP, powstaje produkt fluorescencyjny, którego maksimum emisji wynosi 560 nm. Zdefosforylowany Atto-Phos nie tworzy osadu, gdyż jest znacznie lepiej rozpuszczalny

w wodzie niż HNPP i dlatego jest stosowany do detekcji aktywności enzymatycznej w środowisku wodnym, np. do prób na płytkach wielodołkowych [4, 10].

4. Dioksetany. Chemiluminescencja jest najszybszą i najbardziej czułą metodą detekcji fosfatazy alkalicznej. 1,2-dioksetany znacznie upraszczają proces detekcji przez wyeliminowanie pośredniego etapu wbudowania nadtlenuków [10].

Istotne cechy 1,2-dioksetanów to: obecność wiązań nadtlenukowych będących nośnikiem energii dla chemiluminescencji (procesowi temu towarzyszy uwolnienie 100 kcal/mol energii i wytworzenie silnego sygnału chemiluminescencyjnego), obecność grupy spiroadamantanowej warunkującej stabilność oraz możliwość emitowania światła (bez dodawania żadnych utleniaczy) związana z obecnością podstawnika arylowego. Grupa odszczepiana przez enzym gwarantuje pojawienie się luminescencji tylko w przypadku działania właściwego enzymu [3]. Dioksetany mogą być stosowane do detekcji DIG-znakowanych kwasów nukleinowych zarówno na filtrach nitrocelulozowych, nylonowych, jak i w roztworach, a sygnał chemiluminescencyjny utrzymuje się na filtrze przez kilka dni. Czas ekspozycji na kliszę rentgenowską wynosi od kilku sekund do kilku minut.

W ciągu ostatnich kilku lat zsyntetyzowano i ulepszono różne substraty chemiluminescencyjne. Pierwsze dostępne substraty, AMPPD [2, 18], LumigenPPD i Lumiphos 450 wykazywały wysoką czułość. Przez podstawienia w pierścieniu adamantylowym lub fenylowym dioksetanu, np. resztami chlorowymi w CSPD, a ostatnio w CDP-Star zwiększono szybkość reakcji i wzmocniono emisję światła.

CSPD. Enzymatyczna defosforylacja CSPD prowadzi do powstania bardzo niestabilnego anionu dioksetanowego, który uwalnia kwant energii w postaci emisji światła. Maksimum emisji w roztworze wodnym wynosi 477 nm. Zdefosforylowany anion dioksetanowy ma czas półtrwania na filtrze nylonowym około 40 minut [18, 19].

CDP-Star. Jest on używany jako substrat od 1994 roku. Obecnie jest on powszechnie dostępnym, łatwym w użyciu i jak dotąd najbardziej specyficznym chemiluminescencyjnym substratem fosfatazy alkalicznej [33].

CDP-Star jest 1,2-dioksetanem podstawionym atomami chloru, który umożliwia wyjątkowo szybkie uzyskanie sygnału chemiluminescencyjnego, rejestrowanego na kliszy rentgenowskiej. Enzymatyczna defosforylacja CDP-Star prowadzi do powstania niestabilnego produktu pośredniego (anionu fenolanu dioksetanowego), który rozpada się w roztworze i emituje światło o długości fali 466 nm [11].

Daje on 10 razy czulszy i szybszy sygnał chemiluminescencyjny niż inne substraty. CDP-Star jest szczególnie użyteczny do szybkiego i czułego wykrywania znakowanych nieradioaktywnie kwasów nukleinowych w hybrydyzacjach typu *Southern*, *Northern*, hybrydyzacjach kolonijnych i łysinkowych. W tych doświadczeniach poleca się użycie filtrów nylonowych, ponieważ w przypadku filtrów nitrocelulozowych konieczne jest dodanie wzmacniacza (np. *NitroBlock*) [11].

Kinetyka emisji światła i maksymalna długość fali różnią się dla różnych substratów chemiluminescencyjnych. Kiedy substratem fosfatazy alkalicznej jest CDP-Star, natężenie światła wzrasta bardzo szybko w ciągu pierwszych kilku minut i utrzymuje się przez wiele godzin na mniej więcej stałym poziomie. Ta szybka kinetyka emisji światła jest szczególnie korzystna w przypadku sekwencjonowania DNA znakowanego DIG, ponieważ pozwala uzyskać drabinkę sekwencyjną w ciągu kilkunastu minut [10].

5. PNP. Fosforan 4-nitrofenylu (PNP) jest substratem używanym od wielu lat do ilościowych pomiarów fosfatazy alkalicznej w roztworze. Jest bezbarwny, a po defosforylacji daje zabarwienie od żółtego do zielonego w pH 9–10, które może być mierzone standardowym fotometrem lub w czytniku płytek wielodołkowych przy 405 nm. PNP może być stosowany do ilościowej detekcji DNA znakowanego DIG przez fosfatazę alkaliczną *anti-DIG*. Reakcja kolorowa przebiega przez wiele godzin ze wzrastającą intensywnością sygnału [10].

Substraty peroksydazy chrzanowej

1. ABTS/TMB. Układ ABTS/TMB (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid/3,3'-5,5'-tetramethylbenzidine) może być używany do detekcji i ilościowego oznaczania kwasów nukleinowych znakowanych DIG w roztworze. Reakcja ABTS / peroksydaza powoduje powstanie zielono zabarwionego roztworu, którego absorpcja jest mierzona przy 405 nm, podczas gdy TMB daje kolor żółty (450 nm). Peroksydaza chrzanowa jest aktywna przez 60–90 minut [8, 10].

2. Luminol/jodofenol. Peroksydaza chrzanowa może być wykrywana także przy zastosowaniu substratów chemiluminescencyjnych: luminolu/jodofenolu. Reakcja chemiluminescencyjna mierzona w odpowiednich luminometrach do płytek wielodołkowych daje szerszy zasięg ilościowy niż reakcja kolorowa.

System *anti-DIG* peroksydaza chrzanowa i luminol/jodofenol może być stosowany do filtrów, jednak daje słabszy i krócej trwający sygnał niż fosfataza alkaliczna połączona z chemiluminescencyjnym dioksetanem, dlatego nie poleca się go do transferów kwasów nukleinowych. Maksimum emisji światła wynosi 425 nm. Intensywność sygnału szybko wzrasta, ale również szybko zanika i już po około 90 minutach jest on praktycznie całkowicie niewykrywalny [10].

3. DAB. 3,3'-diaminobenzzydina (DAB) jest najbardziej znanym substratem peroksydazy chrzanowej stosowanym w cytochemii na poziomie mikroskopu świetlnego i elektronowego. Jak widać z tabeli 1, DAB może być użyty w hybrydyzacji *in situ*. W wyniku reakcji powstaje ciemnobrązowy osad (polimer) nierozpuszczalny w alkoholu ani w rozpuszczalnikach organicznych i wykazujący zdolność wiązania metali ciężkich [17].

Złoto koloidalne

Przeciwciała anti-DIG mogą być także połączone z cząsteczkami złota koloidalnego. Są one używane do detekcji kwasów nukleinowych znakowanych DIG w hybrydyzacji *in situ* w mikroskopii świetlnej i dają taką samą czułość, jaką uzyskuje się przy pomocy przeciwciał znakowanych enzymem. Rozproszone cząsteczki złota mają niezwykle mały rozmiar, średnio około 0.8 nm, dlatego mogą skutecznie penetrować komórki i tkanki, ale są trudne do dostrzeżenia pod mikroskopem świetlnym bez wzmocnienia kontrastu solami srebra. Przez wytrącenie się srebra na powierzchni cząsteczki powiększa jej pierwotny rozmiar i pojawia się brązowo-czarne zabarwienie o wysokim kontraście [10].

Związki fluorescencyjne

Do detekcji kwasów nukleinowych znakowanych DIG we fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH = *fluorescent in situ hybridization*) stosowane są przeciwciała anti-DIG połączone z różnymi związkami fluorescencyjnymi. Dzięki temu można wybrać odpowiedni kolor wywołanej reakcji, aby uzyskać optymalny rozdział, kontrast i czułość. Dodatkowo fluorochromy są użyteczne dla wielokolorowych FISH, gdy używa się innych niż DIG związków znakujących (takich jak biotyna, DNP czy estradiol) oraz odpowiadających im przeciwciał znakowanych fluorescencyjnie lub streptawidyną [10, 16].

Aby wzmocnić czułość detekcji kwasów nukleinowych znakowanych DIG w hybrydyzacji fluorescencyjnej *in situ* (FISH), można używać kaskady przeciwciał anti-DIG połączonego z drugorzędowymi lub trzeciorzędowymi przeciwciałami wyznakowanymi fluorescencyjnie lub sprzężonymi z alkaliczną fosfatazą (AP) [10].

PODSUMOWANIE

System DIG jest znacznie lepszy i szybszy niż radioaktywne metody znakowania i detekcji kwasów nukleinowych, a ponadto umożliwia wiązanie wyznakowanych sond do fazy stałej, np. płytek wielodołkowych lub kuleczek magnetycznych.

Obecnie możliwości tego systemu nie są całkowicie wykorzystane i w najbliższej przyszłości można się spodziewać wprowadzenia nowych interesujących zastosowań.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BESANON R, BENCSIK A, VOUTSINOS B, BELIN MF, FEVRE-MONTANGE M. Rapid *in situ* hybridization using digoxigenin probe and microwave oven. *Cell Mol Biol* 1995; **41**: 975-977.
- [2] BRONSTEIN I, FORTIN J, VOYTA J. Nitro-block enhancement of AMPPD chemiluminescent signal in the detection of DNA. *BioTechniques* 1992; **4**: 500-501.

- [3] BRONSTEIN I, VOYTA J, LAZZARI K, MURPHY O, EDWARDS B, KRICKA L. Rapid and sensitive detection of DNA in Southern blots with chemiluminescence. *BioTechniques* 1990; **8**: 319–314.
- [4] CANO RJ, TORRES MJ, KLEM RE, PALOMARES JC. DNA hybridization assay using Atto Phos, a fluorescent substrate for alkaline phosphatase. *BioTechniques* 1992; **12**: 264–269.
- [5] CELEDA D, BETTAG U, CREMER C. PCR amplification and simultaneous digoxigenin incorporation of long DNA probes for fluorescence in situ hybridization. *Biotechniques* 1992; **12**: 98–102.
- [6] DEMETRICK DJ. The use of archival frozen tumor tissue imprint specimens for fluorescence in situ hybridization. *Mod Pathol* 1996; **9**: 133–136.
- [7] FARQUHARSON M, HARVIE R, McNICOL AM. Detection of mRNA using a digoxigenin end labelled oligonucleotide probe. *J Clin Pathol* 1990; **43**: 424–428.
- [8] GALLATI H. Horseradish peroxidase: A study of the kinetics and the determination of optimal reaction conditions, using hydrogen peroxide and 2,2-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfoic acid) (ABTS) as substrate. *J Clin Chem Clin Biochem* 1979; **17**: 1–7.
- [9] HILLAN KJ. Detection of mRNA in fixed tissues using RNA probes. [w] KESSLER C [red.] Nonradioactive labeling and detection of biomolecules. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1992: 336–343.
- [10] HÖLTKE HJ, ANKENBAUER W, MUHLEGGER R, REIN R, SAGNER G, SEIBL R, WALTER T. The digoxigenine (DIG) system for non-radioactive labelling and detection of nucleic acids. *Cell Mol Biol* 1995; **41**: 883–905.
- [11] HÖLTKE HJ, SCHNEIDER S, ETTLI I, BINSACK R, OBERMAIER I, SELLER M, SAGNER G. Rapid, highly sensitive detection of digoxigenin-labeled nucleic acids by improved chemiluminescent alkaline phosphatase substrates. *Biochemica* 1995; **1**: 17–20.
- [12] HULTMANT, STAHL S, HORNES E, UHLEN M. Direct solid phase sequencing of genomic and plasmid DNA using magnetic beads as a solid support. *Nucl Acid Res* 1989; **17**: 4937–4946.
- [13] JANDER S, POHL J, GILLEN C, STOLL. Differential expression of interleukin-10 mRNA in Wallerian degeneration and immune-mediated inflammation of the rat peripheral nervous system. *J Neurosci Res* 1996; **43**: 254–259.
- [14] KAGIYAMA N, YOSHIDA K, HAMABATA T, JUNI N, AWASAKI T, FUJITA S, MOMIYAMA M, KONDOH Y, YOSHIDA MC, HORI SH. A novel fluorescent method for *in situ* hybridization. *Acta Histochem Cytochem* 1993; **26**: 441–445.
- [15] KOCH J. Probe labeling and hybridization in one step. [w] KESSLER C [red.] Nonradioactive labeling and detection of biomolecules. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1992: 336–343.
- [16] LI X, MELAMED MR, DARZYNKIEWICZ Z. Detection of apoptosis and DNA replication by differential labeling of DNA strand breaks with fluorochromes of different color. *Exp Cell Res* 1996; **222**: 28–37.
- [17] LITWIN J. Metody immunoenzymatyczne [w] ZABEL M [red.] Immunocytochemia. PWN Warszawa 1990: 65–91.
- [18] MARTIN C, BRESNICK L, JUO R, VOYTA J, BRONSTEIN I. Improved chemiluminescent DNA sequencing. *BioTechniques* 1991; **11**: 110–114.
- [19] MARTIN CS, BRONSTEIN I. DNA sequencing: chemiluminescent detection with the 1,2-dioxetane CSPD. [w] KESSLER C [red.] Nonradioactive labeling and detection of biomolecules. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1992: 288–293.
- [20] MARTIN R, HOOVER C, GRIMME S, GROGAN C, HOLTKE J, KESSLER CA. Highly sensitive, nonradioactive DNA labeling and detection system. *BioTechniques* 1990; **6**: 762–768.
- [21] McGADEY J. Tetrazolium method for nonspecific alkaline phosphatase. *Histochemie* 1970; **23**: 180–184.
- [22] POLLARD-KNIGHT E, SYMS A, BRADY MAW. Nonradioactive nucleic acid detection by enhanced chemiluminescence using probes directly labeled with horseradish peroxidase. *Anal Biochem* 1990; **185**: 84–89.

- [23] RIED T, BALDINI A, RAND TC, WARD DC. Simultaneous visualization of seven different DNA probes by *in situ* hybridization using combinatorial fluorescence and digital imaging microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992a; **89**: 1388–1392.
- [24] SAGNER G. DIG DNA sequencing with chemiluminescent or dye substrates. [w] KESSLER C [red.] Nonradioactive labeling and detection of biomolecules. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1992: 281–287.
- [25] SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Cold Spring Harbour, NY 1989.
- [26] SATO M, MURAO K, MIZOBUCHI M, TAKAHARA J. Quantitative and sensitive northern blot hybridization using PCR-generated DNA probes labeled with digoxigenin by nick translation. *Biotechniques* 1993; **15**: 880–882.
- [27] SIEIRO C, REBOREDO NM, BLANCO P, VILLA TG. Cloning of a new FLO gene from the flocculating *Saccharomyces cerevisiae* IM1-8b strain. *FEMS Microbiol Lett* 1997; **146**: 109–115.
- [28] SOUTHERN EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; **98**: 503–517.
- [29] STARZINSKI-POWITZ A, ZIMMERMANN K. Detection of mRNA in fixed cells with DIG-labeled RNA probes. [w] KESSLER C [red.] Nonradioactive labeling and detection of biomolecules. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1992: 359–363.
- [30] TIZARD R, CATE RL, RAMACHANDRAN KL, WYSK M, VOYTA C, MURPHY OJ, BRONSTEIN I. Imaging of DNA sequences with chemiluminescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 4514–4518.
- [31] TRAYHURN P, DUCAN JS, NESTOR A, THOMAS ME, RAYNER DV. Chemiluminescent detection of mRNAs on northern blots with digoxigenin end-labeled oligonucleotides. *Anal Biochem* 1994; **222**: 224–230.
- [32] TOKUNAGA K, OGOSE A, ENDO N, NOMURA S, TAKAHASHI HE. Human osteosarcoma (OST) induces mouse reactive bone formation in xenograft system. *Bone* 1996; **19**: 447–454.
- [33] VOYTA J. CDP-StarTM-new, bright, and rapid substrate for alkaline phosphatase. *Luminescence Topics* 1994; **3**: 1.
- [34] WARD RP, DORSA DM. Colocalization of serotonin receptor subtypes 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, and 5-HT₆ with neuropeptides in rat striatum. *J Comp Neurol* 1996; **370**: 405–414.
- [35] WYROBA E, SATIR B H. Molecular search for putative counterparts of *Paramecium* parafusin. *Mol Biol Cell (Suppl)* 1993; **4**: 430a.
- [36] WYROBA E, SUBRAMANIAN SV, SATIR BH. Southern blot analysis of *Paramecium* DNA using parafusin and phosphoglucomutase specific probes. *Mol Biol Cell (Suppl)* 1992; **3**: 62 a.
- [37] WYROBA E, WIDDING HOYER A, STORGAARD PS, SATIR BH. Mammalian homologue of the calcium-sensitive phosphoglycoprotein, parafusin. *Eur J Cell Biol* 1995; **68**: 419–426.
- [38] ZABEL M, CIESIELSKA M, WYSOCKA T. Localization of calcitonin mRNA using *in situ* labeling with reverse transcriptase PCR. *Folia Histochem Cytobiol (Suppl 1)* 1996; **34**: 7–8.

Redaktor prowadzący – M. Zabel

Otrzymano: 10.09. 1997 r.

Przyjęto: 17.10. 1997 r.

02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3

KOMUNIKATY

Komunikat Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej

Zarząd Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej przyznaje doroczną nagrodę naukową, w tym również w roku 1997 i 1998, za wyróżniającą się oryginalną pracę z zakresu biologii komórki, indywidualną lub zespołową, wykonaną wyłącznie w krajowej placówce naukowej, opublikowaną w ostatnich dwóch latach w czasopiśmie figurującym w Current Content bądź Medline.

Zgłoszenia wraz z dwoma odbitkami należy kierować do dnia 15 listopada każdego roku pod adresem Fundacji. Regulamin nagrody poniżej.

Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa
tel. 34-03-44, fax 3404470

Regulamin

dorocznej nagrody Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej

- * **1.** Raz w roku przyznawana będzie jedna nagroda za wyróżniającą się, oryginalną pracę z zakresu biologii komórki, indywidualną lub zespołową, wykonaną wyłącznie w krajowej placówce naukowej.
- * **2.** Praca musi być wydrukowana w czasopiśmie naukowym referowanym w Current Content.
- * **3.** Praca powinna być opublikowana nie wcześniej niż w ostatnich dwóch latach poprzedzających nadanie nagrody.
- * **4.** Preferowane będą prace młodych autorów.
- * **5.** Wysokość nagrody w danym roku kalendarzowym ustala Zarząd Fundacji.
- * **6.** Zgłaszać pracę do nagrody może każdy.
- * **7.** Pracę należy zgłaszać do Zarządu Fundacji ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, pokój 314 do 15 października każdego roku.
- * **8.** Ocenę kwalifikującą prace do nagrody przeprowadza Komisja Nagród powołana przez Zarząd Fundacji zasięgając w razie potrzeby opinii specjalistów.
- * **9.** Decyzja Komisji ogłaszana będzie w "Postęпах Biologii Komórki".
- * **10.** Nagroda wręczana będzie w czasie jednej z konferencji naukowych z zakresu biologii komórki.

MOLECULAR AND CELLULAR BASIS OF ANGIOGENESIS THE ROLE OF GROWTH FACTORS

(A workshop of the Annual Meeting of European Society for Clinical Investigation
Cracow, April 16–19, 1998)

- * **Organizers:** Professor Heinrich M. Schulte,
dr Amal K. Mukhopadhyay
- * **Topics to be discussed:** VEGF and related factors: regulation of gene expression, vascularization during foetal growth and metastasis, new therapeutic applications, signal transductions, relevance for reproductive and endocrine tissues etc.
- * **Information:** **Dr Amal K. Mukhopadhyay**
Institute for Hormone and Fertility Research
Grandweg 64, 22429 Hamburg
Tel.: +49 40 5619080, Fax: +49 40 56190864
e. mail: mukhopad@uke.uni.hamburg.de

STYPENDIUM DOKTORANCKIE W USA

Jednoroczne lub dwuletnie stypendia w Centrum Naukowym Kimmela na Uniwersytecie Thomasa Jeffersona w Filadelfii w dziedzinie biologii molekularnej nowotworów. Centrum Rakowe Kimmela (dyr. dr Carlo Croce) skupia naukowców badających molekularne mechanizmy onkogenezy oraz lekarzy wdrażających nowe metody leczenia chorób nowotworowych. Jest to obecnie jeden z przodujących ośrodków w USA w dziedzinie onkologii eksperymentalnej i klinicznej.

Po zakończeniu stypendium możliwe jest kontynuowanie pracy w Zakładzie Cytologii Klinicznej CMKP w Warszawie we współpracy z Uniwersytetem Thomasa Jeffersona.

Kandydaci powinni mieć tytuł doktora oraz własny dorobek naukowy. Zyciorys wraz z nazwiskami (+telefon) 3 osób mogących udzielić informacji o kandydacie należy przesyłać do

dr Tomasz Skorskiego

Thomas Jefferson University, Kimmel Cancer Center
BLSB 630, 233 South 10th Street, Philadelphia, PA 19107, USA
tel. (215) 503-4524, fax (215) 923-0249, E-mail: skorski1@jefflin.tju.edu

IV KONFERENCJA POLSKIEGO TOWARZYSTWA CYTOMETRII

Konferencja odbędzie się w Gdańsku w dniu 18 października 1998 roku. W programie przewidujemy wystąpienia zaproszonych gości oraz sesję plakatową. Wykładowcami będą: **Zbigniew Darzynkiewicz** (*Nowy Jork, USA*), **Jim Watson** (*Cambridge, W. Brytania*), **Carleton Stewart** (*Buffalo, USA*), **Paul Robinson** (*West Lafayette, USA*), **David Hedley** (*Toronto, Kanada*), **Jan Kapuściński** (*Gdańsk, Polska*).

Bezpośrednio po Konferencji w dniach 18–21 października zostaną zorganizowane warsztaty metodyczne z udziałem zaproszonych wykładowców. Konferencja oraz warsztaty będą prowadzone w języku angielskim. Liczba uczestników warsztatów jest ograniczona.

Osoby zainteresowane udziałem prosimy o nadsyłanie zgłoszeń uczestnictwa w terminie do 28 lutego 1998 roku na adres Komitetu Organizacyjnego:

Dr hab. **Jacek Bigda**
Sekretarz Komitetu Organizacyjnego
IV Konferencji Polskiego Towarzystwa Cytometrii
Katedra Histologii i Immunologii AM Gdańsk
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk
tel/fax 058-323673
e-mail: jjbigd@amed01.amg.gda.pl

VII OGÓLNOPOLSKA KONFERENCJA BIOLOGII KOMÓRKI THE VIITH POLISH CONFERENCE ON CELL BIOLOGY

Uprzejmie informujemy, że VII Ogólnopolska Konferencja Biologii Komórki zostanie zorganizowana w 1999 roku, w dniach 9 (środa) do 12 (sobota) września, w Krakowie.

Za organizację Konferencji z upoważnienia Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki odpowiedzialni będą profesorowie: Tadeusz Cichocki, Włodzimierz Korohoda i Stanisław Przystański.

Zainteresowanych prosimy o śledzenie dalszych komunikatów.

First Announcement. The VIIth Polish Conference on Cell Biology will be organized in Cracow, on 9 (Wednesday) to 12 (Saturday) September 1999.

For the organization of Conference the professors: Tadeusz Cichocki, Włodzimierz Korohoda and Stanisław Przystański have been chosen by the Polish Cell Biology Society.

Please keep attention to the forthcoming communicates.

Wskazówki przygotowania rysunków do publikacji w PBK

Dostarczane na dyskietkach teksty powinny być napisane w Wordzie, wersja 6,0 lub wcześniejsza. Jeśli w tekst zostały wstawione rysunki, powinny one zostać umieszczone osobno na dyskietce. Powinny to być albo mapy bitowe (.TIF, .PCX), albo pliki z Corela, wersja 5,0 lub wcześniejsza. Każda wersja Worda lub Corela pozwala na zachowanie pracy w formacie wersji wcześniejszej.

Cennik odbitek prac dla Autorów w 1997 r.

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

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

LISTY DO REDAKCJI

Prof. dr Mieczysław Chorąży (*Zakład Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii, Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, 44-100 Gliwice*) nadesłał list następującej treści:

Zwracam się do Pana, jako redaktora „Postępów Biologii Komórki”, z następującymi dwoma sprawami:

1. Druk w „Postępach” jest bardzo często o barwie szarej, a nie czarnej, co utrudnia czytanie.

2. Zapis genów i białek jest czasami nie uporządkowany. Podstawowa reguła:

- * geny wirusów, bakterii, roślin, zwierząt (oprócz człowieka) powinny być pisane małymi literami i kursywą, np. *bcl-2*, *agrB*, *env*;
- * geny ludzkie zapisujemy dużymi literami i kursywą, np. *N-MYC*, *BCL-2*, *RAS*;
- * białka zwierząt – pierwsza litera symbolu duża, pismo proste, np. *Myc*, *Fos*, *Ras*;
- * białka ludzkie – symbol dużymi literami, pismo proste, np. *RAS*, *TNF*, *IL-1*.

Redakcja „Postępów” uprzejmie prosi Autorów o przestrzeganie reguł proponowanych przez Autora listu.

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach. Prosimy Autorów o nadsyłanie prac bezpośrednio do Redaktorów odpowiedniej specjalności (adresy na 2 str. okładki), a do Redakcji w Warszawie tylko te artykuły, które nie odpowiadają żadnej z wymienionych specjalności.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

1) artykuły przeglądowe nie przekraczające 20 stron maszynopisu licząc tabele i piśmiennictwo w zasadzie z ostatnich 5 lat (do 10% pozycji bibliograficznych starszych);

2) mini-reviews do 10 stron maszynopisu z pozycjami bibliograficznymi z ostatnich 2 lat (licząc od daty wysłania do redakcji);

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

Tekst pracy i załączniki należy przysyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 z podwójną interlinią i marginesem 4 cm po lewej stronie. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki na s. 150) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows oraz ASCII. Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona dla redakcji winna zawierać: imiona i nazwiska autorów oraz ich tytuły naukowe, adresy w pracy i domowy wraz z telefonem, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rysunków. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następną stroną powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszcza tabel, schematów lub rysunków, a jedynie zaznacza ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawiać alfabetycznie według następującego wzoru:

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

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

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

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu doby. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą oraz mogą zamówić odbitki odpłatnie odsyłając korektę, cennik na s. 150.

Redakcja prosi o propozycje do 5 osób (nazwisko, imię, adres, fax), które byłyby odpowiednimi recenzentami maszynopisu, nie powinny jednak być pracownikami instytucji, w której pracuje autor, ani jego współpracownikami. Redakcja prosi także głównego Autora o dołączenie do maszynopisu podpisanej odpowiedzi na następujące pytania:

Dołączono 2 kopie maszynopisu,	Treść pracy nie była uprzednio publikowana i nie została
tabela i rycin.	wysłana do innej redakcji.
Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę.	tak nie Dołączono kopię pracy na dyskietce z podaniem nazwy
Jest zgoda osób, których informacje niepubli-	pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM tak nie
kowane są zamieszczone w tekście artykułu tak	Odpowiadam za całość pracy opisaną w zał. maszyn. tak nie
Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w "Postęпах Biologii Komórki" przechodzi na własność reda-	tak nie
kacji i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji.	podpis

TREŚĆ

W tym Zeszycie	1
OSTROWSKI K.: Wściekle krowy i inne choroby prionowe a Nagroda Nobla 1997 z Medycyny	3
WILCZYŃSKI G., MARKIEWICZ E., KULMA A., SZOPA J.: Białka rodziny 14-3-3, występowanie i właściwości	9
NIKLAS A., BUTOWT R., JAŻDŻEWSKA E. MAJEWSKA-SAWKA A.: Poliaminy w komórce roślinnej: synteza, mechanizmy działania i funkcje	35
WIERZBICKI A., SOBKOWIAK A., TRZECIAK W.: Cytotoksyczne rybonukleazy o szczególnym działaniu biologicznym (Rysbazy) Rysbazy drobnoustrojów i roślin	51
JACKOWSKI G.: Rozpad aparatu fotosyntetycznego w trakcie starzenia się liści	63
KRZYWNICKA E., KOWALCZYK S.: Molekularne mechanizmy samoniezgodności homomorficznej zapobiegające samozapłodnieniu roślin okrytonasiennych	75
RUPNIEWSKA Z., ROLIŃSKI J.: Klonotypowe limfocyty B w szpiczaku plazmocytowym	99
WITAS H. W., MŁYNARSKA A., MŁYNARSKI W., BODALSKI J.: CD28/CTLA-4: dodatkowy sygnał w procesie aktywacji limfocytów T	111
WYROBA E., WIEJAK J., CYWIŃSKA A., SURMACZ L.: Digoksygenina – nieradioaktywny marker w badaniach kwasów nukleinowych. Część I. Znakowanie sond molekularnych	125
WIEJAK J., CYWIŃSKA A., SURMACZ L., WYROBA E. Digoksygenina – nieradioaktywny marker w badaniach kwasów nukleinowych. Część II. Zastosowanie wyznakowanych sond molekularnych	135
Komunikaty	147
Wskazówki przygotowania rysunków	160
Listy do Redakcji	151

Warunki prenumeraty kwartalnika POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Prenumerata na rok 1998

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1998 na konto:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 12401053-40006576-2700-401112-001.

Cena prenumeraty rocznika na rok 1998:

- dla instytucji (bibliotek) wynosi 60 zł,
- a dla odbiorców indywidualnych 20 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 1998 should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland, account No:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 12401053-40006576-2700-401112-001.

Price per year 20 dollars USA.

Indeks 369705