

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

TOM 25 NR-4'98
(485–678)

25-4'98

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 BILINSKI (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 – *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. Chatubińskiego 6a*)

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI, Olgierd NARKIEWICZ, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA, Lech WOJTCZAK

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

Recenzenci tomu 25 PBK, 1998 – Referees of the volume No 25, 1998:

prof. Wanda Barańska, prof. Szczepan Biliński, prof. Maria Charzyńska, prof. Halina Gabryś, prof. Barbara Grzelakowska-Sztabert, prof. Edward Gwóźdź, dr hab. Lila Hryniewiecka, prof. Marek Jakóbiśiak, prof. Adam Jaworski, prof. Jerzy Kawiak, prof. Wincenty Kilarski, prof. Zofia Kiliańska, dr Beata Kozłowska-Boszkó, prof. Jacek Kuźnicki, dr Witold Lasek, prof. Stanisław Lewak, prof. Renata Maryniak, prof. Jan Michejda, dr Katarzyna Nałęcz, prof. Maria Olszewska, prof. Krystyna Ossowska, prof. Barbara Płytycz, prof. Danuta Rożynkova, prof. Wiesława Rudnicka, dr Ewa Sikora, dr Krzysztof Skowronek, prof. Witold Walerych, prof. Stanisław Więckowski, dr hab. Michał Witt, dr hab. Elżbieta Wyroba, prof. Maciej Zabel

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

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

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

W tym Zeszycie Postępów Biologii Komórki

W tym zeszycie pięć artykułów jest poświęconych komórkom roślinnym.

- W artykule pt. „Status energetyczny komórek roślinnych oraz jego regulacja w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska” (str. 487) przedyskutowano zmiany tego statusu zachodzące pod wpływem działania abiotycznych czynników stresowych, takich jak: niska temperatura, ograniczony dostęp tlenu, okresowy niedobór wody i substancji odżywczych oraz zanieczyszczenia środowiska.
- Ważnym białkiem kontrolującym homeostazę wapniową zarówno w komórkach zwierzęcych, jak i roślinnych jest obecna w ER komórek kalretikulina (str. 501). Opisano budowę i funkcjonowanie tego białka.
- Przedstawiono charakterystykę fitoferrytyny w porównaniu z ferrytyną z innych organizmów na stronie 511.
- W artykule na stronie 525 opisano mechanizmy usprawniające pobieranie i transport nieorganicznego węgla w różnych grupach roślin.
- Chromoplasty są wyspecjalizowane w syntezie i gromadzeniu karotenoidów (str. 539). Występują w barwnych płatkach korony kwiatów i miąższu owoców, a powstają tam drogą przekształcenia chloroplastów.

Inne tematy w tym zeszycie dotyczą regulacji cyklu komórkowego i apoptozy:

- Ogólnie omówiono molekularne mechanizmy kontrolujące cykl komórkowy (str. 571), głównie na podstawie badania komórek drożdży oraz wykorzystania bezkomórkowych wyciągów z cytoplazmy jaj *Xenopus*; przedstawiono kontrolę polegającą na cyklicznie aktywowanych w cyklu kinazach białkowych, tworzeniu przez nie kompleksów z cyklinami i regulacji aktywności kinaz gromadzeniem się, a potem rozpadem cyklin oraz dodatkową regulacją aktywności kinaz przez fosforylację i defosforylację. Temat ten był kilkakrotnie omawiany w „Postęпах Biologii Komórki” (17, 325, 1990; 20, 33, 1993; 21, 243, 1994) oraz w „Postęпах Biochemii” (38, 98, 1992), co pozwala prześledzić postępy w tej dziedzinie wiedzy.
- Postępy w badaniach regulacji dojrzewania mejotycznego oocytów oraz pierwszych cykli mitotycznych w zarodkach myszy omówiono w artykule na stronie 549.
- W „Postęпах” apoptozę omawiano dotąd w komórkach organizmów wielokomórkowych (22, 247, 1995; 23, 299, 1996; 24, 561, 1997; 25, 315, 1998). Na stronie 649 Czytelnik znajdzie omówienie pewnych aspektów apoptozy wykryte w organizmach jednokomórkowych.



STATUS ENERGETYCZNY KOMÓREK ROŚLINNYCH ORAZ JEGO REGULACJA W ODPOWIEDZI NA ZMIENIAJĄCE SIĘ WARUNKI ŚRODOWISKA*

ENERGY STATUS OF PLANT CELLS AND ITS REGULATION
IN RESPONSE TO CHANGING ENVIRONMENTAL CONDITIONS

Agnieszka BYCZYŃSKA, Gabriela LORENC-PLUCIŃSKA

Instytut Dendrologii PAN, Kórnik

Streszczenie: W artykule omówiono parametry opisujące stan energetyczny komórek roślinnych i przedstawiono charakterystykę statusu energetycznego niektórych tkanek roślinnych w aspekcie rytmiki sezonowej i starzenia się. Przedyskutowano też zmiany tego statusu zachodzące pod wpływem działania abiotycznych czynników stresowych, takich jak: niska temperatura, ograniczony dostęp tlenu, okresowy niedobór wody i substancji odżywczych oraz zanieczyszczenia środowiska.

Słowa kluczowe: nukleotydy adeninowe, ładunek energetyczny, potencjał fosforylacyjny, rytmika sezonowa, czynniki stresowe.

Summary: This paper discusses the energy status of plant cells and describes the energy state of plant tissues and its changes with season and with plant senescence. The influence of abiotic stress factors such as low temperature, restricted oxygen supply, temporary water and nutrient deficit and environmental pollution on plant energy status are also studied.

Key words: adenylate nucleotides, adenylate energy charge, phosphorylation potential, seasonal changes, stressing factors.

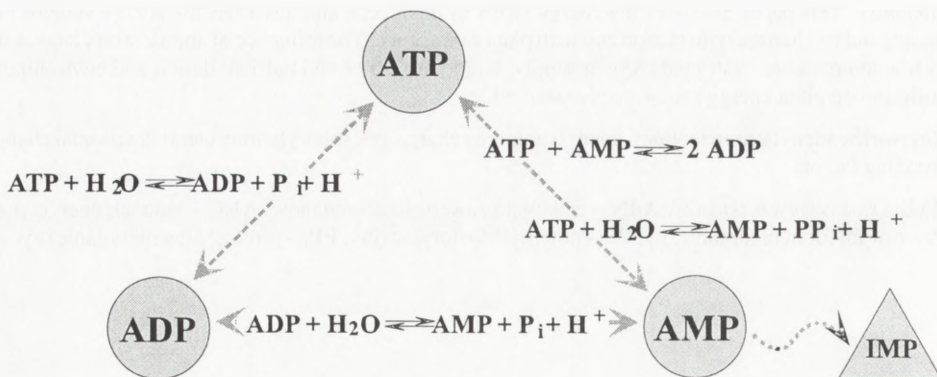
Wykaz stosowanych skrótów: **AdN** – całkowita zawartość adenylanów, **AEC** – ładunek energetyczny, **P_i** – ortofosforan nieorganiczny, **PP** – potencjał fosforylacyjny, **PP_i** – pirofosforan nieorganiczny.

*Praca finansowana w ramach grantu KBN nr 6 P04G 068 10.

1. WSTĘP

Zdolność do zaspokajania potrzeb energetycznych jest jedną z charakterystycznych właściwości żywej komórki. Konieczność utrzymania homeostazy wymaga jednak, aby włączanie i wyłączanie szlaków anabolicznych i katabolicznych, w których dokonują się przemiany energii, było ściśle kontrolowane przez mechanizmy komórkowe. Reakcje te są ze sobą sprzężone za pomocą związku pośredniego, jakim jest adenozynotrifosforan (ATP). Jest on nukleotydem składającym się z adeniny, rybozy i trifosforanu. Jednostka trifosforanowa zawiera dwa bezwodnikowe wiązania fosforanowe, dlatego ATP nazywany jest często związkem wysokoenergetycznym [44].

Energia chemiczna, zmagazynowana w wiązaniach fosforanowych ATP, może być użyta do przebiegu reakcji endoergicznych. Produktami egzoenergetycznej hydrolizy ATP są adenozynodifosforan (ADP) i nieorganiczny fosforan (P_i) lub adenozynomonofosforan (AMP) i nieorganiczny pirofosforan (PP_i). ADP i AMP – jako prekursorzy ATP – są bezpośrednimi akceptorami grup fosforanowych w reakcjach dostarczających energię w komórce. Całkowita zawartość adenylanów ($AdN = ATP + ADP + AMP$) nie ulega radykalnym zmianom, lecz znajduje się w stanie dynamicznej równowagi [33]. Nukleotydy adeninowe ulegają wzajemnym przekształceniom w reakcjach endo- i egzoenergetycznych (rys. 1). Sumaryczne stężenie nukleotydów adeninowych w fazie wodnej nienaruszonych komórek różnego typu wynosi od 2 do 15 mmol/l, przy czym stężenie ATP znacznie przewyższa stężenie ADP i AMP [44]. Wzrost poziomu mono- i dinukleotydów prowadzi do uruchomienia mechanizmów kompensujących te zmiany. Kluczową rolę w regulacji puli AdN odgrywa deaminaza AMP [51]. Enzym ten ulega aktywacji, kiedy stężenie AMP jest wysokie i katalizuje jego deaminację do inozynomonofosforanu (IMP) (rys. 1).



RYSUNEK 1. Wzajemne przemiany nukleotydów adeninowych

Rozróżnia się 3 podstawowe typy reakcji, podczas których syntezowany jest ATP:

- 1) fosforylacja substratowa,
- 2) fosforylacja oksydacyjna,
- 3) fotofosforylacja.

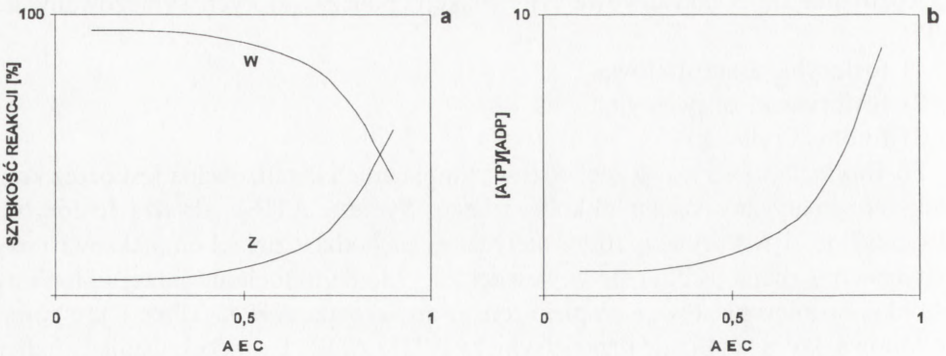
Fosforylacja substratowa zachodzi w cytoplazmie i katalizowana jest przez kompleks enzymatyczny szlaku glikolitycznego. Synteza ATP w drodze fosforylacji oksydacyjnej i fosforylacji fotosyntetycznej zachodzi dzięki kompleksowi enzymatycznemu znajdującemu się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej i błonie tylakoidalnej chloroplastów. Kompleks ten, zwany syntazą ATP (ATPazą), jest pompą protonową, która katalizuje reakcję syntezy ATP z ADP i P_i , wykorzystując gradient protonowy tworzony w wyniku utleniania substratów energetycznych lub pochłaniania energii świetlnej [44]. Synteza ATP może zachodzić również bez przekształcenia energii, w drodze *transfosforylacji*. Z dwóch cząsteczek ADP powstaje wówczas ATP i AMP. Reakcja ta, katalizowana przez kinazę adenylnową (kinazę AMP; AK), jest energetycznie neutralna i zachodzi w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów. Wysoka aktywność AK obserwowana jest najczęściej w warunkach, gdy fosforylacja oksydacyjna nie zaspokaja w pełni zapotrzebowania na ATP, a poziom ADP jest wysoki. Kinaza adenylnowa, podobnie jak deaminaza AMP, jest enzymem odgrywającym kluczową rolę w regulacji puli nukleotydów adenylnowych [5].

2. PARAMETRY OPISUJĄCE STATUS ENERGETYCZNY KOMÓRKI

Stosunek względnych stężeń ATP i ADP (ATP/ADP) jest jednym z podstawowych parametrów charakteryzujących status energetyczny komórki. Zmiany wartości współczynnika ATP/ADP wpływają na aktywność metaboliczną. ATP może działać jak allosteryczny inhibitor, zmniejszając powinowactwo kluczowych enzymów szlaków katabolicznych do ich substratów [44]. Hamujące działanie ATP jest znoszone przez ADP. Aktywność szlaków katabolicznych wzrasta w momencie obniżenia współczynnika ATP/ADP.

W stanie równowagi ATP jest prawie całkowicie zhydrolizowany do ADP i P_i ($ATP \leftrightarrow ADP + P_i$). Wielkością termodynamiczną opisującą zdolność do przeniesienia grupy fosforanowej w układzie ATP/ADP jest potencjał fosforylacyjny (PP), wyrażający się równaniem:

$$PP = \frac{[ATP]}{[ADP][P_i]} [M^{-1}]$$



RYSUNEK 2. Aktywność enzymów reakcji wytwarzających (linia W) i zużywających ATP (linia Z) jako % maksymalnej szybkości katalizowanych reakcji (a) oraz wartość współczynnika [ATP]/[ADP] (b) w zależności od ładunku energetycznego (AEC) [33]

Ścisła korelacja między wartością potencjału fosforylacyjnego i współczynnikiem ATP/ADP pozwala przewidywać, iż w określonych warunkach wartość tego ostatniego będzie rosła wraz ze wzrastającym stężeniem P_i w komórce [33].

Innym podstawowym parametrem opisującym stan energetyczny komórki jest ładunek energetyczny (AEC) [33], który wyraża się wzorem:

$$AEC = \frac{ATP + 0,5 ADP}{ATP + ADP + AMP}$$

Wartość AEC charakteryzuje stopień „wypełnienia” układu ATP:ADP:AMP „wiązaniami wysokoenergetycznymi”. AEC może więc przybierać wartości od 0 (gdy $[AdN]=[AMP]$) do 1 (gdy $[AdN]=[ATP]$) (rys. 2). Szlaki metaboliczne wytwarzające lub zużywające ATP reagują na zmiany wartości AEC. Punkt przecięcia się krzywych szybkości reakcji syntezy i degradacji ATP (rys. 2) odpowiada stanowi dynamicznej równowagi metabolicznej, kiedy szybkość zużycia ATP równa się szybkości jego regeneracji [33]. AEC, PP i stosunek ATP/ADP są ze sobą ściśle powiązane i znajomość jednego z tych parametrów umożliwia wyznaczenie pozostałych wielkości [33].

3. CHARAKTERYSTYKA STATUSU ENERGETYCZNEGO NIEKTÓRYCH TKANEK ROŚLINNYCH

Odległe ewolucyjnie gatunki roślin różnią się od siebie wymaganiami, jakie muszą być spełnione, aby zachodził ich prawidłowy wzrost, rozwój i rozmnażanie.

Pomimo występowania tych różnic parametry stanu energetycznego komórek osiągają podobne wartości w grupach tkanek o podobnych funkcjach fizjologicznych oraz podlegają wspólnemu mechanizmowi regulacyjnemu. W tkankach metabolicznie aktywnych AEC przekracza zwykle wartość 0,8 (najczęściej $=0,85$) [33]. Uogólnienie to ulega jednak pewnym modyfikacjom, jeśli weźmie się pod uwagę odchylenia wartości AEC pomiędzy komórkami organów asymilujących a komórkami pozostałych organów [33]. Utrzymujący się na poziomie 0,7–0,8 AEC charakteryzuje zielone liście wielu gatunków roślin [33]. Przeniesienie zielonych liści z ciemności na światło powoduje tylko niewielkie zmiany AEC (lub odpowiadających mu wartości stosunku ATP/ADP). Natomiast komórki korzeni charakteryzują się wyższym AEC, który osiąga w nich zwykle wartość 0,9. Podobny poziom AEC stwierdzono także w kiełkujących nasionach wielu gatunków roślin oraz w zarodkach soi i etiolowanych koleoptylach ryżu [33]. Tak wysoki AEC występuje również w wielu rodzajach komórek zwierzęcych i u mikroorganizmów (AEC w granicach 0,85–0,94) [33].

Główne szlaki metaboliczne, podczas których następuje regeneracja ATP (tj. glikoliza, fosforylacja oksydacyjna, fotofosforylacja), zlokalizowane są w trzech przedziałach komórki: w cytozolu, mitochondriach i chloroplastach. Adenylany nie mogą swobodnie przemieszczać się przez błony organelli, w rezultacie czego tworzą pule nukleotydów adeninowych matriks, stromy i cytozolu [17, 43]. W protoplastach zielonych liści cytozol zawiera tylko 44% puli AdN, mitochondria 9%, a chloroplasty 47%, [43]. Stosunek ATP/ADP w mitochondriach ma niższą wartość (0,6 w ciemności i 2,6 na świetle) niż w cytozolu (9,1 w ciemności i 6,4 na świetle), do którego ATP jest transportowany wbrew istniejącemu gradientowi stężeń [43], dzięki częściowo elektrogennemu działaniu translokazy nukleotydów adeninowych. Z kolei współczynnik ATP/ADP w chloroplastach w ciemności wynosi około 1,1, a na świetle osiąga wartość 1,5–3 [43]. Taka kompartmentacja umożliwia utrzymywanie niskiego współczynnika ATP/ADP w przedziałach, gdzie syntetyzowany jest ATP, w przeciwieństwie do wysokiego ATP/ADP w cytozolu, gdzie zachodzi większość reakcji zużywających ATP. W tkankach asymilujących dojrzałych roślin poziom ATP w cytozolu wzrasta po ich przeniesieniu z ciemności na światło w następstwie pośredniego transferu ATP z chloroplastów do cytozolu przez pętlę triozofosforan-fosfoglicerynian [43], przy czym wzrostowi wartości współczynnika ATP/ADP towarzyszy obniżenie aktywności mitochondrialnej fosforylacji oksydacyjnej, która jest limitowana przez niski poziom ADP [28].

Ogólny status energetyczny nasion, korzeni i etiolowanych liści odpowiada wartościom AEC i ATP/ADP cytozolu, który zawiera około 90% puli AdN [33].

4. CZYNNIKI ŚRODOWISKA INDUKUJĄCE ZMIANY PARAMETRÓW STATUSU ENERGETYCZNEGO

4.1. Zmiany sezonowe

Sezonowa rytmika zmian statusu energetycznego komórek roślinnych poznana jest jak dotąd fragmentarycznie. Na ogół przyjmuje się, że zróżnicowanej aktywności metabolicznej roślin w ciągu sezonu wegetacyjnego odpowiada cykliczna fluktuacja parametrów opisujących ich stan energetyczny.

W doświadczeniach nad sezonową rytmiką zmian zawartości poszczególnych nukleotydów adeninowych w liściach kilku gatunków bagiennych bylin stwierdzono wzrost wartości AEC, ATP/ADP i ATP/AMP wczesną wiosną wraz z rozwojem liści, dalszy jej wzrost latem, kiedy aktywność metaboliczna organów asymilacyjnych jest największa i następnie spadek w okresie późnego lata i jesieni [26]. Sezonową rytmikę zmian zawartości ATP i ADP oraz stosunku ATP/ADP stwierdzano także w igłach jednorocznych i wieloletnich świerka pospolitego [49].

W żywych partiach łyka i ksylemu pędów topoli (*Populus gelrica* Houtz), miesiąc przed nadejściem wiosny rozpoczyna się synteza ATP w komórkach łyka, a indukcja pączkowania charakteryzuje się gwałtownym zwielokrotnieniem zawartości ATP w ksylemie [38]. Wraz ze wzrostem i różnicowaniem się młodych tkanek rośnie stężenie ATP we floemie i drewnie, osiągając maksymalny poziom w lipcu. Późnym latem i jesienią zawartość ATP w tych tkankach stopniowo maleje i po osiągnięciu minimum w październiku pozostaje stała przez całą zimę. Również wartość AEC (około 0,73) w łyku i ksylemie nie zmienia się podczas zimowania [38].

4.2. Starzenie się roślin

Wyniki doświadczeń prowadzonych na liściach tytoniu pokazały, że indukowana w procesie starzenia reorganizacja metabolizmu komórkowego zachodzi wraz ze zmianami w aktywności enzymów glikolitycznych [24]. Włączanie P_i do fosforanów heksoz w żółknących liściach tytoniu zachodzi między innymi kosztem włączenia P_i do nukleotydów adeninowych, co w rezultacie objawia się obniżeniem poziomu ATP i ADP w porównaniu z zielonymi liśćmi roślin kontrolnych [24]. Nasilenie reakcji katabolicznych prowadzi do stopniowego wyczerpania komórkowych zapasów energetycznych, takich jak białka i węglowodany. Odbudowywanie tych rezerw w drodze reakcji anabolicznych jest niemożliwe, ponieważ stopniowa utrata chlorofilu osłabia pozyskiwanie energii w drodze fotofosforylacji [24]. Z drugiej strony doświadczenia na odciętych liściach owsa wykazały, że dostarczenie cukrów, jako egzogennych substratów oddechowych i naświetlanie roślin umożliwia ciągłą resyntezę biopolimerów i tym samym opóźnienie procesu starzenia [16].

Dane dotyczące badań nad wierzchołkami wzrostu korzeni kukurydzy dowodzą, że w 8–24 godzin po ich odcięciu (indukcja starzenia) znacznie maleje w nich całkowita zawartość cukrów, obniża się pobór tlenu i wartość współczynnika oddychania, a wraz z upływem czasu spada w nich również całkowita zawartość nukleotydów adeninowych [40].

4.3. Reakcja na czynniki stresowe

W zależności od warunków klimatycznych bądź siedliskowych, rośliny narażone są między innymi na działanie niskich temperatur, ograniczony dostęp tlenu, okresowy niedobór wody i substancji odżywczych.

Odporność na wymarzenie badana była przede wszystkim u zbóż, u których cecha ta decyduje często o zastosowaniu rośliny w uprawie. W izolowanych komórkach pszenicy ozimej odpowiedzią na stres związany z niską temperaturą jest spadek stężenia ATP. Pomimo tego w zakresie temperatur od -1°C (umiarkowany stres) do -30°C (gdy większość komórek jest martwa) AEC pozostaje wysoki w rezultacie obniżenia AdN w komórkach [32]. W odpornych na wymarzenie odmianach pszenicy AEC utrzymuje się na poziomie 0,85–0,98, podczas gdy w odmianach wrażliwych wartość ta jest nieco niższa lub wykazuje tendencje spadkowe [36]. Utrzymywanie wysokiego poziomu ATP i potencjału fosforylacyjnego w odmianach odpornych na mróz może warunkować ich wysoką zdolność do przetrwania stresu i prawidłowy rozwój roślin po jego ustąpieniu [36].

Zmiany statusu energetycznego można również obserwować u roślin poddanych okresowemu brakowi tlenu. Badania wykonane na wierzchołkach korzeni kukurydzy i grochu dowodzą, że podczas zmniejszonej dostępności (hipoksji) lub całkowitego braku tlenu w otoczeniu (anoksji), oddychanie ciemniowe jest zahamowane, a metabolizm komórki zostaje przełączony na pozyskiwanie energii przez aktywację procesu fermentacji alkoholowej lub mleczanowej [2, 41]. W procesie fermentacji powstaje jednak tylko $\sim 4\%$ energii uzyskiwanej w drodze fosforylacji oksydacyjnej [45]. Dlatego też w warunkach wydłużonej anoksji wartości AEC i ATP/ADP spadają bardzo wyraźnie [2, 41]. Uruchomienie mechanizmu kompensującego spadek AEC może prowadzić do uaktywnienia deaminazy AMP, co wpływa na zmniejszenie zawartości AdN w komórce [41].

W warunkach beztlenowych obserwuje się czasami wysoką aktywność metaboliczną i tym samym podwyższoną wartość AEC [1, 41, 46]. Dzieje się tak na przykład podczas przechowywania dojrzałych owoców lub kiełkowania nasion, których łupina jest nieprzepuszczalna dla gazów. Duże zapotrzebowanie na ATP, który jest szybko zużywany w gwałtownych przemianach metabolicznych, musi być wówczas zaspokajane przez intensywne procesy fermentacyjne [1, 10, 34, 37, 46]. Odcięte wierzchołki korzeni kukurydzy aklimatyzowane w warunkach hipoksji i przeniesione do środowiska beztlenowego wykazywały wysoki poziom ATP, ATP/ADP i AEC

w porównaniu do nie aklimatyzowanych wierzchołków kontrolnych. W tkankach poddanych anoksji obserwowano ponadto aktywację enzymów fermentacyjnych oraz wysoki poziom alkoholu etylowego lub kwasu mlekowego [11, 39, 40]. Wysoką zawartość etanolu stwierdzono również w kiełkujących nasionach ryżu lub w dojrzałych owocach winogron [31, 46]. Wykazano ponadto, że ryż jest zdolny do kiełkowania w warunkach skrajnie beztlenowych, przy czym AEC utrzymuje się na poziomie 0,65–0,8 [1]. W dojrzałych owocach winogron, które są odporne na niedobór tlenu podczas przechowywania, powolny spadek AEC regulowany jest przez zmiany zawartości ATP w komórkach [46].

Zmiany stanu energetycznego, spowodowane hipoksją lub anoksją, mogą mieć charakter odwracalny. Po ściśle określonym czasie (różnym w zależności od gatunku rośliny i badanego organu) ograniczenia dostępności tlenu lub jego braku, ponowne natlenienie, a czasami również dostarczenie substratów oddechowych, prowadzi do odbudowania wyjściowego AEC [8, 11, 39, 41]. Podczas wydłużonej anoksji AEC spada poniżej wartości krytycznej, czego następstwem jest śmierć komórki [2, 11].

Pierwsze objawy przedłużającego się niedoboru wody to utrata turgoru, zamknięcie aparatów szparkowych i osłabienie fotosyntezy oraz zahamowanie wzrostu rośliny [47]. Podczas umiarkowanej suszy nawet niewielki spadek potencjału wody w komórkach liści (0,1–0,2 MPa) powoduje znaczne obniżenie poziomu ATP i AdN, co jednak nie prowadzi do zmian wartości AEC, dzięki czemu aktywność metaboliczna tych komórek utrzymuje się na stałym poziomie [47]. Z drugiej strony, w narażonych na niedobór wody liściach obserwowano również podwyższenie zawartości ATP w następstwie obniżenia aktywności szlaków zużywających ten nukleotyd [52].

Inną przyczyną zaburzeń statusu energetycznego roślin jest zmniejszona dostępność substancji odżywczych, zwłaszcza fosforu. Niedobór P_i w komórkach korzeni powoduje spadek aktywności fosforylacji oksydacyjnej i wzrost przepływu elektronów przez niewrażliwą na KCN alternatywną drogę oddechową [7, 35], która nie prowadzi do regeneracji ATP [37]. Podobny efekt obserwowano w zawieszynie kultur komórek *Catharanthus roseus* L., gdzie niedobór P_i i obniżenie poziomu ADP powodowały włączenie alternatywnej drogi oddechowej [15]. Z drugiej strony, spadek poziomu adenylanów w komórkach liści soi, spowodowany niską zawartością P_i w pożywce, tłumaczono zarówno obniżoną syntezą fosforanów nukleotydów, jak i wysokim stopniem ich degradacji [27].

Przyjmuje się, że biochemiczne podstawy odporności na stres polegają między innymi na utrzymaniu ciągłej regeneracji ATP, jako donora energii dla przebiegu podstawowych procesów fizjologicznych [11]. Ważnym elementem w strategii przetrwania stresu mogą być również inne, niezależne od AdN systemy dostarczające energię w komórce, takie jak pula nukleotydów urydynowych i pirofosforan (PP_i) [6, 9, 11]. Zaobserwowano, że podczas stresu wywołanego brakiem tlenu, ochło-

dzeniem lub brakiem P_i w pożywce, PP_i może odgrywać rolę komplementarną do ATP w cytozolu roślin wyższych [6, 9].

4.4. Reakcja na zanieczyszczenie środowiska

W antropogenicznie zmienionym środowisku przyrodniczym rośliny narażone są na działanie różnorodnych, toksycznych związków. Ich skutki mogą się na siebie nakładać, utrudniając tym samym precyzyjne określenie wywoływanych uszkodzeń. W tabeli I zestawiono efekty wywierane przez zanieczyszczenia powietrza i gleby. Ze względu na brak bezpośrednich danych o wpływie niektórych związków fitotoksycznych na status energetyczny komórek, w tabeli umieszczono również informacje dotyczące zaburzeń aktywności procesów związanych z pozyskiwaniem energii. Dane zamieszczone w tabeli I zostały uśrednione do efektów obserwowanych najczęściej, zarówno *in vivo* jak i *in vitro*.

Szkodliwe oddziaływanie zanieczyszczeń przemysłowych prowadzi najczęściej do zaburzeń w natężeniu procesów wymiany CO_2 zachodzącej na świetle i w ciemności, metabolizmu węgla w fotosyntezie oraz zawartości substratów energetycznych. Kierunek i wielkość tych zmian zależą zarówno od między- i wewnątrzgatunkowej wrażliwości roślin na dany czynnik toksyczny, jak i od określonych warunków eksperymentalnych w doświadczeniach laboratoryjnych i polowych, zwłaszcza od dawki (tzn. stężenie \times czas działania toksycznego związku) oraz od synergistycznego, antagonistycznego i więcej niż addytywnego oddziaływania różnorodnych zanieczyszczeń. Obniżenie zawartości chlorofilu, inhibicja procesów fotosyntezy i wzrost lub zahamowanie natężenia oddychania wiążą się z zaburzeniami statusu energetycznego komórek w odpowiedzi na zanieczyszczenie środowiska. Innym wytłumaczeniem obniżenia regeneracji ATP w obecności zanieczyszczeń przemysłowych może być uszkodzenie błon organelli przez wolne rodniki [29].

5. PODSUMOWANIE

Konieczność utrzymania homeostazy w komórce wymaga, aby reakcje wytwarzania i zużywania energii zachodziły w sposób ściśle kontrolowany, w zależności od wymagań metabolizmu rośliny. Głównymi czynnikami uczestniczącymi w regulacji statusu energetycznego są:

- 1) kompartmentacja syntezy ATP;
- 2) stężenie poszczególnych nukleotydów w puli AdN, jak również wartości stosunków ATP/ADP, PP i AEC;
- 3) aktywność enzymów kontrolujących syntezę i degradację nukleotydów adeninowych (np. kinazy adenylanowej i deaminazy AMP).

Parametry statusu energetycznego są ze sobą ściśle powiązane, a ich wartości mogą zmieniać się w zależności od pory roku i związanej z nią sezonowej rytmiki

TABELA 1. Wpływ niektórych zanieczyszczeń przemysłowych na wybrane aspekty metabolizmu komórki roślinnej: ↑ – pozytywny wpływ, ↓ – ujemny wpływ

Zanieczyszczenie	Wpływ na poziom ATP, ATP/ADP, AEC	Inne efekty	Literatura
SO ₂ , SO ₃ ²⁻ , SO ₄ ²⁻	↓ ATP ↓ ATP/ADP ↓ AEC	↓ fotofosforylacja ↓ aktywność fotosyntezy ↑ aktywność oddychania ↓ synteza ATP w mitochondriach	[14, 20, 21]
NO ₂	↑ ATP ↑ AEC		[50]
SO ₂ + NO ₂	↓ ATP ↓ AEC		[50]
O ₃	↑ P _i ↑ ATP/ADP	↓ fotofosforylacja ↓ aktywność fotosyntezy ↑ aktywność oddychania ↓ synteza ATP w mitochondriach	[3, 25, 49]
HF		↓ aktywność fotosyntezy ↑ aktywność oddychania ↓ synteza ATP w mitochondriach	[3, 30]
Al ³⁺	↓ ATP ↓ ATP/ADP ↓ AEC	↓ kataboliczny ładunek redukcyjny ↓ pojemność fosforylacyjna ↓ P _i	[18, 19, 22, 23]
Cd ²⁺		↓ aktywność fotosyntezy ↑ aktywność oddychania ↓ zawartość chlorofilu w liściach ↓ synteza ATP w mitochondriach	[1, 4, 13, 42]
Pb ²⁺ Zn ²⁺		↓ aktywność fotosyntezy ↓ zawartość chlorofilu w liściach	[12, 48]
Hg, CH ₃ Hg		↓ aktywność fotosyntezy ↓ zawartość chlorofilu w liściach	[4, 12]

metabolizmu rośliny. Działanie czynników stresowych, takich jak: niska temperatura, hipoksja, anoksja, niedobór wody i substancji odżywczych, przyczyniają się do obniżenia poziomu ATP i wartości AEC przez spadek aktywności szlaków syntezy ATP lub uruchomienie alternatywnej niewrażliwej na KCN drogi transportu elektronów, która nie prowadzi do powstawania ATP.

Przypuszcza się, że utrzymanie wysokiego AEC ma krytyczne znaczenie dla przetrwania stresu przez roślinę. Zaobserwowano, że rośliny aklimatyzowane w warunkach stresowych utrzymują wysoką wartość AEC dzięki regulacji puli AdN (np. przy udziale deaminazy AMP), uruchomieniu alternatywnych dróg syntezy ATP (np. fermentacji), lub malejącemu zapotrzebowaniu na ATP w następstwie

obniżenia aktywności reakcji zużywających ATP. Nie wyklucza się również równoległego działania innych systemów dostarczających energię (pula nukleotydów urydynowych i PP_1), które są niezależne od puli nukleotydów adeninowych.

O wiele trudniej jest określić jednoznacznie wpływ zanieczyszczeń środowiska na status energetyczny rośliny. Najczęściej obserwowanym efektem jest zakłócenie syntezy ATP, które może mieć przyczyny zarówno w zaburzeniu metabolizmu, jak i struktury komórkowej. Niski poziom ATP może powodować spadek aktywności szlaków zależnych od jego dopływu, w tym większości reakcji anabolicznych, obejmujących również mechanizmy naprawcze i detoksyfikujące.

PODZIĘKOWANIE

Serdecznie dziękujemy Panu prof. dr hab. Edwardowi Gwoździowi za krytyczne przeczytanie manuskryptu.

LITERATURA

- [1] AL-ANI A, BRUZAU F, RAYMOND P, SAINT-GES V, LEBLANC JM, PRADET A. Germination, respiration, and adenylate energy charge of seeds at various oxygen partial pressures. *Plant Physiol* 1985; **79**: 885–890.
- [2] ANDREEV VY, GENEROZOVA IP, VARTAPETIAN BB. Energy status and mitochondrial ultrastructure of excised pea root at anoxia and postanoxia. *Plant Physiol Biochem* 1991; **29**: 171–176.
- [3] BALLANTYNE DJ. Phytotoxic air pollutants and oxidative phosphorylation. [w] Kozioł MJ, Whatley FR [red.] Gaseous air pollutants and plant metabolism. London, Boston, Durban, Singapore, Sydney, Toronto, Wellington, Butterworths 1984: 223–230.
- [4] BEDNARZ T, STARZECKA A. Development and activity of algae and bacteria in soils under the influence of short-term action of metallurgic industrial dusts. *Archiv für Hydrobiologie. Supplementband. Algological Studies* 1992; **94**: 129–148.
- [5] BUSCH K, NINNEMANN H. The controlling influence of ADP, ATP and magnesium on the activities of adenylate kinase, ATP synthase, ADP/ATP translocator and the mitochondrial respiration in plants. *Plant Sci* 1997; **128**: 85–95.
- [6] CARYSTINOS GD, MACDONALD HR, MONROY AF, DHINDSA RS, POOLE RJ. Vacuolar H^+ -translocating pyrophosphatase is induced by anoxia or chilling in seedlings of rice. *Plant Physiol* 1995; **108**: 641–649.
- [7] CIERESZKO I, RYCHTER AM. Zmiany metaboliczne w korzeniach wywołane deficytem fosforu *Wiad Bot* 1995; **39**: 81–90.
- [8] CRAWFORD RMM, BRAENDLE R. Oxygen deprivation stress in a changing environment. *J Exp Bot* 1996; **47**: 145–159.
- [9] DANCER J, VEITH R, FEIL R, KOMOR E, STITT M. Independent changes of inorganic pyrophosphate and the ATP/ADP or UTP/UDP ratios in plant cell suspension cultures. *Plant Sci* 1990; **66**: 59–63.
- [10] DE MEILLON S, SMALL JGC, VAN DE VENTER HA. Possible role of the adenylate energy charge in dormancy alleviation of *Strelitzia juncea* seeds. *Plant Physiol Biochem* 1994; **32**: 347–354.
- [11] DREW MC. Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1997; **48**: 223–250.

- [12] GODBOLD D, SCHLEGEL H, HUTTERMANN A. Heavy metals – a possible factor in spruce decline. Forest dieback: influencing factors and their evaluation. Symposium in Goslar, W. Germany, 18–20.VI.1985. *VDI Berichte* 1985; **560**: 703–716.
- [13] GODBOLD DL, LITZINGER M, GRIESE C, ADRIANO DC. Cadmium toxicity in clones of *Populus tremula*. Metals in soils, waters, plants and animals. International Conference, Orlando, Florida, 30 IV–3 V 1990. *Water, Air, and Soil Poll* 1991; **57–58**: 209–215.
- [14] HAMPP R, EINIG W, EGGER B. Energy and redox status, and carbon allocation in one- to three-year-old spruce needles. *Environ Pollut* 1990; **68**: 305–318.
- [15] HOEFNAGEL MHN, VAN IREN F, LIBBENGA KR, VAN DER PLAS LHW. Possible role of adenylates in the engagement of the cyanide-resistant pathway in nutrient-starved *Catharantus roseus* cells. *Physiol Plant* 1994; **90**: 269–278.
- [16] KENNETH VT, TETLEY RM, KRIVAK BM. Metabolism of oat leaves during senescence. Senescence in light. *Plant Physiol* 1977; **59**: 448–454.
- [17] KRÖMER S. Respiration during photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1995; **46**: 45–70.
- [18] LORENC-PLUCIŃSKA G. Effects of aluminium on free inorganic phosphate levels in Scots pine roots. *Arbor Kórnickie* 1995; **40**: 135–141.
- [19] LORENC-PLUCIŃSKA G, KAROLEWSKI P. Aluminium effects on pyridine nucleotide redox state in roots of Scots pine. *Acta Soc Bot Pol* 1994; **63**: 176–171.
- [20] LORENC-PLUCIŃSKA G, MISZALSKI Z, ZIEGLER H. Sugar transport and sulfite action in etioplasts, semi-etiochloplast and green protoplasts of *Avena sativa* L. *Bot Acta* 1989; **102**: 37–45.
- [21] LORENC-PLUCIŃSKA G, ZIEGLER H. Mechanisms of sugar uptake inhibition by sulfite in leaf discs and protoplasts of *Vicia faba* L. *Biochem Physiol Pflanzen* 1989; **184**: 107–126.
- [22] LORENC-PLUCIŃSKA G, ZIEGLER H. The effect of aluminium on adenylate levels in Scots pine roots. *Acta Physiol Plant* 1995; **17**: 225–232.
- [23] LORENC-PLUCIŃSKA G, ZIEGLER H. Changes in ATP levels in Scots pine needles during aluminium stress. *Photosynthetica* 1996; **32**: 141–144.
- [24] MACNICOL PK, YOUNG RE, BIALE JB. Metabolic regulation in the senescing tobacco leaf. Changes in pattern of ³²P incorporation into leaf disc metabolites. *Plant Physiol* 1973; **51**: 793–797.
- [25] MAGEL E, HÖLL W, ZIEGLER H. Alteration of physiological parameters in needles of cloned spruce trees (*Picea abies* (L.) Karst.) by ozone and acid mist. *Environ Pollut* 1990; **64**: 337–345.
- [26] McKEE KL, MENDELSSOHN IA. The influence of season on adenine nucleotide concentrations and energy charge in four marsh plant species. *Physiol Plant* 1984; **62**: 1–7.
- [27] MIGINIAK-MASLOW M, NGUYEN J, HOARAU A. Adenylate metabolism in phosphate-depleted isolated soybean leaf cells and wheat leaf fragments. *J Plant Physiol* 1986; **123**: 69–77.
- [28] MOORE AL, LEACH G, WHITEHOUSE DG, VAN DEN BERGEN CWM, WAGNER A M, KRAB K. Control of oxidative phosphorylation in plant mitochondria: the role of non-phosphorylating pathways. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1187**: 145–151.
- [29] MOSTOWSKA A, GWÓZDŹ E. Reakcje aparatu fotosyntetycznego na stres oksydacyjny. *Post Biol Kom* 1995; **22**: 43–63.
- [30] OLEKSYN J. Effects of SO₂, HF, and NO₂ on net photosynthetic and dark respiration rates of Scots pine needles of various ages. *Photosynthetica* 1984; **18**: 259–262.
- [31] PERATA P, ALPI A. Plant responses to anaerobiosis. *Plant Sci* 1993; **93**: 1–17.
- [32] POMEROY MK, ANDREWS CJ. Changes in adenine nucleotides and energy charge in isolated winter wheat cells during low temperature stress. *Plant Physiol* 1986; **81**: 361–366.
- [33] PRADET A, RAYMOND P. Adenine nucleotide ratios and adenylate energy charge in energy metabolism. *Annu Rev Plant Physiol* 1983; **34**: 199–224.

- [34] RICARD B, COUE I, RAYMOND P, SAGLIO PH, SAINT-GES V, PRADET A. Plant metabolism under hypoxia and anoxia. *Plant Physiol Biochem* 1994; **32**: 1–10.
- [35] RUFY TW, ISRAEL DW, VOLK R J, QIU J, SA T. Phosphate regulation of nitrate assimilation in soybean. *J Exp Bot* 1993; **262**: 879–891.
- [36] RYBKA Z. Changes in ATP level in crowns of winter wheat seedlings during hardening to frost. *J Plant Physiol* 1990; **136**: 635–637.
- [37] RYCHTER AM. Roślinny łańcuch oddechowy. *Post Bioch* 1996; **42**: 268–276.
- [38] SAGISAKA S. Adenosine triphosphate levels in the poplar during one year of growth. *Plant Cell Physiol* 1981; **22**: 1287–1292.
- [39] SAGLIO PH, DREW MC, PRADET A. Metabolic acclimation to anoxia induced by low (2–4 kPa partial pressure) oxygen pretreatment (hypoxia) in root tips of *Zea mays*. *Plant Physiol* 1988; **86**: 61–66.
- [40] SAGLIO PH, PRADET A. Soluble sugars, respiration, and energy charge during aging of excised maize root tips. *Plant Physiol* 1980; **66**: 516–519.
- [41] SAGLIO PH, RAYMOND P, PRADET A. Metabolic activity and energy charge of excised maize root tips under anoxia. Control by soluble sugars. *Plant Physiol* 1980; **66**: 1053–1057.
- [42] SCHLEGEL H, GODBOLD DL, HUTTERMAN A. Whole plant aspects of heavy metal induced changes in CO₂ uptake and water relations of spruce (*Picea abies*) seedlings. *Physiol Plant* 1987; **69**: 265–270.
- [43] STITT M, LILLEY RMCC, HELDT HW. Adenine nucleotide levels in the cytosol, chloroplasts, and mitochondria of wheat leaf protoplasts. *Plant Physiol* 1982; **70**: 971–977.
- [44] STRYER L. Biochemia. Przekład zbiorowy pod red. J. Augustyniaka i J. Michejdy. Wyd. Nauk. PWN 1997.
- [45] TAIZ L, ZEIGER E. Respiration and lipid metabolism. [w] Plant physiology. The Benjamin/Cumming Publishing Company Inc. 1991: 269–286.
- [46] TESNIRE C, ROMIEU C, DUGELAY I, NICOL MZ, FLANZY C, ROBIN JP. Partial recovery of grape energy metabolism upon aeration following anaerobic stress. *J Exp Bot* 1994; **45**: 145–151.
- [47] TURNER LB, WELLBURN AR. Changes in adenylate nucleotide levels in the leaves of *Capsicum annuum* during water stress. *J Plant Physiol* 1985; **120**: 111–122.
- [48] UZUNOVA A, IOROVA K, PLUGCHIEVA M. Tree vegetation along main roads receives the first impact. *Gora* 1992; **48**: 8–9.
- [49] WEIDMANN P, EINIG W, EGGER B, HAMPP R. Contents of ATP and ADP in *Norway spruce* in relation to their development, age, and to symptoms of forest decline. *Trees* 1990; **4**: 68–74.
- [50] WELLBURN AR. Effects of SO₂ and NO₂ on metabolic function. [w] Unsworth MH, Ormorth DP [red.] Effect of gaseous air pollution in agriculture and horticulture. London: Butherworths 1982: 169–187.
- [51] YOSHINO M, MURAKAMI K. AMP deaminase from spinach leaves. Purification and some regulatory properties. *Z. Pflanzenphysiol* 1980; **99**: 331–338.
- [52] ZAGDANSKA B. Respiratory energy demand for protein turnover and ion transport in wheat leaves upon water deficit. *Physiol Plant* 1995; **95**: 428–436.

Redaktor prowadzący – Jan Michejda

Otrzymano: 10.01. 1998 r.

Przyjęto: 17.03.1998 r.

Adres autora: Instytut Dendrologii PAN, Kórnik

KALRETIKULINA – CHARAKTERYSTYKA BIOCHEMICZNA I FUNKCJE W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH

CALRETICULIN – BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND FUNCTION IN PLANT CELLS

Marta LIBIK

Zakład Cytologii i Embriologii Roślin, Instytut Botaniki,
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie: Zmiany w stężeniu jonów wapnia odgrywają rolę w kontrolowaniu wielu procesów w komórkach *Eukariota*. Jony wapnia są gromadzone i przechowywane w komórce między innymi w wakuoli i siateczce śródplazmatycznej (ER). Organelle te odgrywają fundamentalną rolę w kontrolowaniu stężenia wapnia w komórce. W świetle ER zaobserwowano występowanie specyficznych białek wiążących jony wapnia. Białka te nazywane są retikuloplazminami. Stwierdzono, że najważniejszym białkiem kontrolującym homeostazę wapniową jest obecna w ER kalretikulina wykryta w komórkach zarówno zwierzęcych, jak i roślinnych. W tym artykule podano najważniejsze cechy charakterystyczne kalretikuliny dotyczące zarówno budowy, jak i funkcjonowania tego białka.

Słowa kluczowe: kalretikulina, białka wiążące i przechowujące wapń, siateczka śródplazmatyczna (ER), komórka roślinna.

Summary: Rapid increase of knowledge concerning participation of Ca^{2+} ions in regulation of many physiological processes in animal cells stimulated the development of research referring to the role of calcium in plant cell. Plants and animals have similar cellular mechanism for regulating cytosolic calcium level. Nevertheless, the components involved in Ca^{2+} homeostasis have not been fully understood in plants. In the last few years growing interest has been addressed to identify plant counterparts of animal Ca^{2+} binding/storage proteins. Evidence is accumulating for the expression of calreticulin as the main endoplasmic reticulum (ER) resident protein that controls Ca^{2+} homeostasis in plant and animal cells. In this article the basic role of this protein, involved in many cellular processes is presented in the light of the latest findings obtained in plant cells.

Key words: calreticulin, calcium binding/storage protein, endoplasmic reticulum (ER), plant cell.

WSTĘP

W zależności od typu tkanki, wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia u *Eukariota* waha się w granicach od 0,1 do 10 mmol/l [30]. Jony wapnia biorą udział w regulacji metabolizmu, wzrostu i rozwoju organizmów eukariotycznych. Podczas tych procesów zachodzą ilościowe i jakościowe zmiany w zawartości i rozmieszczeniu Ca^{2+} . Wynikają one albo ze wzmożonej akumulacji, albo też chwilowej redystrybucji komórkowej puli Ca^{2+} .

Zmiany w stężeniu jonów wapnia odgrywają znaczącą rolę w kontrolowaniu wielu procesów fizjologicznych w komórce [4, 6]. Jony wapnia pełnią rolę wewnątrzkomórkowego informatora, który bierze udział w wielu szlakach przekazywania sygnałów, np. w procesach widzenia, w cyklu fosfotydyloinozytolowym czy w regulacji skurczu mięśni. Praktycznie trudno jest podać taki przykład procesu, w którym jony wapnia nie pełniłyby podstawowej lub choćby znaczącej funkcji. Kontrolowana zmiana w poziomie jonów Ca^{2+} jest możliwa dzięki mechanizmowi transportu tych jonów z i do miejsc gromadzących i przechowujących wapń. Miejsca, w których jony wapnia są przechowywane w komórce, należą do dwóch typów [27]. Mitochondria, a w komórkach roślinnych także chloroplasty, nie mają zdolności do szybkiej wymiany jonów wapnia i nie odgrywają znaczącej roli w regulacji homeostazy wapniowej. Natomiast wakuola i siateczka śródplazmatyczna pełnią fundamentalną rolę w krótkotrwałym magazynowaniu jonów wapnia i w ten sposób pozwalają komórce kontrolować stężenie wapnia bez udziału Ca^{2+} ze źródeł zewnętrznych. W wakuoli występuje bardzo wysokie stężenie jonów Ca^{2+} , a tonoplast wyposażony jest w nośniki wapnia, takie jak: $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antyport (transport zależny od pH) oraz kanały wapniowe. Chociaż wciąż pojawiają się nowe doniesienia dotyczące regulacji homeostazy wapniowej w wakuoli [28, 29], to jednak potrzebna jest szersza wiedza, aby ocenić stopień udziału tego organellum w regulacji gospodarki wapniowej w komórce.

W siateczce śródplazmatycznej jest również wysokie stężenie jonów Ca^{2+} , około 10 $\mu\text{mol/l}$. Organellum to jednak w komórkach roślinnych jest znacznie słabiej scharakteryzowane pod względem możliwości transportu i gromadzenia jonów wapnia niż wakuola. W błonie siateczki śródplazmatycznej występuje Ca^{2+} ATP-aza, natomiast nie stwierdzono tam obecności kanałów wapniowych. W świetle ER zaobserwowano występowanie specyficznych białek wiążących wapń z wysoką wydajnością (mają wysokie wartości stałych wiązania jonów), jednocześnie charakteryzujących się niskim powinowactwem do tych jonów (mają wysokie wartości stałych dysocjacji). Dzięki tym białkom, w ER mogą gromadzić się dość duże ilości wapnia i jony te mogą być szybko uwalniane w trakcie pobudzenia komórki. Białka występujące w świetle ER nazywane są retikuloplazminami. Niektóre z nich, np. BiP lub endoplazminy, mają niewiele miejsc wiążących wapń i w związku

z tym nie odgrywają znaczącej roli w regulacji poziomu tych jonów w komórce [8]. Stwierdzono, że najważniejszym białkiem kontrolującym homeostazę wapniową jest kalretikulina obecna w świetle ER, występująca w komórkach zarówno roślinnych, jak i zwierzęcych. Jej odpowiednikiem w komórkach mięśniowych jest kalsekwestryna. Pod względem strukturalnym oba te białka nie są spokrewnione, ale łączy je wiele podobnych cech biochemicznych [18]. Dlatego też dopiero kilka lat temu Fliegel odróżnił te dwa białka od siebie [10]. Najbardziej znaczącą cechą kalretikuliny i kalsekwestryny są wysoka wydajność wiązania jonów wapnia (wysokie wartości stałych wiązania jonów wapnia 20–50 mol Ca^{2+} /1 mol białka) i wysokie powinowactwo do tych jonów (niskie wartości stałych dysocjacji jonów wapnia [K_d 1 μM]).

Mimo niewątpliwej roli, jaką odgrywa wakuola w regulacji stężenia jonów Ca^{2+} w komórce, w soku komórkowym nie stwierdzono obecności kalretikuliny [26]. Wysłunięto więc hipotezę o istnieniu w komórkach roślinnych dwóch równocennych pod względem ważności miejsc gromadzenia jonów Ca^{2+} , tj. wakuoli i retikulum endoplazmatycznego.

2. KALRETIKULINA – CHARAKTERYSTYKA BIOCHEMICZNA I FUNKCJE

Budowa chemiczna opracowana na podstawie analizy sekwencji aminokwasowej wskazuje, że kalretikulina składa się z trzech domen: neutralnej domeny N, bogatej w prolinę domeny P i domeny C, która nadaje całej cząsteczce białka charakter kwasowy ($\text{pI}=4,65$). Te trzy fragmenty białka różnią się od siebie nie tylko strukturalnie, ale również funkcjonalnie. Domena N bierze udział w oddziaływaniach między białkami, np. z podjednostką α integryny, domena P odpowiedzialna jest za wiązanie jonów Ca^{2+} z niską wydajnością (1 mol białka wiąże 1 mol jonów Ca^{2+}), ale charakteryzuje się wysokim powinowactwem do tych jonów (K_d 1 μM).

Domena C wiąże wapń z wysoką wydajnością (1 mol białka wiąże około 20 moli jonów Ca^{2+}) i charakteryzuje się niskim powinowactwem do tych jonów (K_d 2 mM).

W tabeli 1 podsumowano cechy fizykochemiczne kalretikuliny pochodzących z komórek zwierzęcych i roślinnych.

Masa cząsteczkowa tego białka wynosi u zwierząt 46 kDa, podczas gdy u roślin waha się w granicach 55–60 kDa. Kalretikulina pochodząca z komórek zwierzęcych nie zawsze jest białkiem glikozylowanym. Nie wykryto łańcuchów węglowodanowych w cząsteczkach tego białka pochodzących z komórek mięśni szkieletowych i gładkich u człowieka, a także w przypadku kalretikuliny pochodzącej z komórek wątroby królika [18].

TABELA 1. Porównanie cech biochemicznych kalretikuliny izolowanej z komórek zwierzęcych i roślinnych

CECHY CHARAKTERYSTYCZNE	KOMÓRKI ZWIERZĘCE	KOMÓRKI ROŚLINNE
MASA CZĄSTECZKOWA	46 kDa	50–60 kDa
PUNKT IZOELEKTRYCZNY	4,65	4,65
GLIKOZYLACJA	u niektórych badanych gatunków	u wszystkich badanych gatunków
FOSFORYLACJA	u wszystkich badanych gatunków	u wszystkich badanych gatunków
MIEJSCA WIĄZANIA JONÓW WAPNIA		
– niska wydajność (niskie wartości stałych wiązania Ca^{2+})	domena P 1 mol białka/1 mol Ca^{2+}	domena P 1 mol białka/1 mol Ca^{2+}
– duże powinowactwo (niskie wartości stałych dysocjacji)	K_d 1 μM	K_d 1 μM
– wysoka wydajność (wysokie wartości stałych wiązania Ca^{2+})	domena C 1 mol białka/20–25 moli Ca^{2+}	domena C 1 mol białka/20–25 moli Ca^{2+}
– małe powinowactwo (wysokie wartości stałych dysocjacji)	K_d 2 mM	K_d 2 mM

W komórkach roślinnych u wszystkich badanych do tej pory gatunków kalretikulina jest białkiem glikozylowanym. Analiza strukturalna łańcucha węglowodanowego wykazała, że białko to glikozylowane jest głównie przez mannozę [23], co jest bardzo charakterystyczne dla białek znajdujących się w świetle ER. Kalretikulina, zarówno roślinna jak i zwierzęca, jest białkiem, które stanowi substrat dla kinaz białkowych, między innymi kinazy białkowej C [1], co wskazuje, że aktywność tego białka jest regulowana przez procesy fosforylacji i defosforylacji.

Kalretikulina, podobnie jak i inne białka ER, zawiera domenę C zakończoną sekwencją (*retention sequence*) odpowiedzialną za utrzymywanie białka stale w świetle ER. Analiza sekwencji C-terminalnej wykazała, że w przypadku zwierząt występuje sekwencja KDEL, a w przypadku roślin HDEL. Oprócz zdolności do wiązania jonów Ca^{2+} kalretikulina może również wiązać jony Zn^{2+} (14 moli Zn^{2+} /1 mol białka) [18]. Wskazuje to na możliwość regulacji poziomu obu typu jonów przez cząsteczkę tego białka. Poza podstawową rolę, jaką jest wiązanie jonów wapnia, kalretikulina może pełnić inne, dodatkowe funkcje. Sugeruje się na podstawie obserwacji połączeń kalretikuliny z „dojrzewającymi” glikoproteinami, że białko to bierze udział w kontrolowaniu struktury trzeciorzędowej, pełni więc funkcje białka opiekuńczego – chaperonu [18]. Ponadto doświadczenia *in vitro* dotyczące interakcji pomiędzy kalretikuliną, receptorami steroidowymi i integrynami, a także dane wskazujące na możliwość występowania kalretikuliny poza światłem ER, zdają

się potwierdzać hipotezę, że kalretikulina jest również białkiem biorącym udział w modulowaniu ekspresji genów [3, 7].

3. CHARAKTERYSTYKA KALRETIKULINY POCHODZĄCEJ Z KOMÓREK ROŚLINNYCH

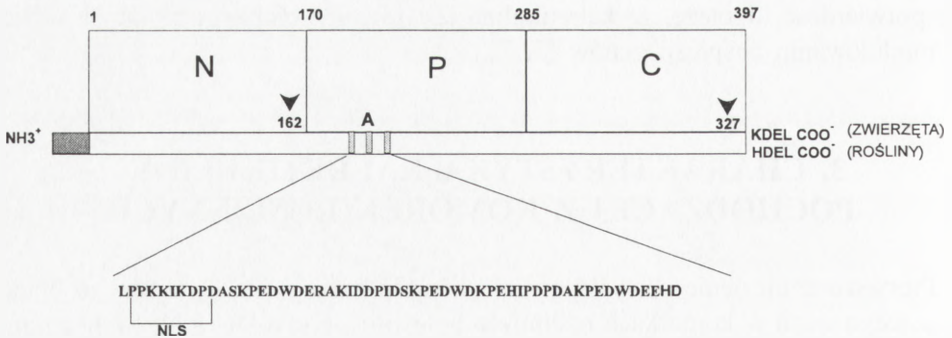
Pierwsze doniesienie o występowaniu homologicznego do zwierzęcego białka wiążącego wapń w komórkach roślinnych pojawiło się w roku 1989. Krause scharakteryzował w komórkach liści szpinaku białko, które uznał za kalsekwestrynę [13]. Mniej więcej w tym samym czasie pojawiły się inne doniesienia dotyczące identyfikacji kalsekwestryny w komórkach *Beta vulgaris* [31] i w komórkach *Pistia stratiotes* [11]. Wyniki dokładniejszych badań białka izolowanego z komórek liści szpinaku poddały w wątpliwość występowanie w tych komórkach kalsekwestryny. Ponieważ przypuszczano, że zidentyfikowane przez Krausego białko to kalretikulina, zastosowano bardziej rygorystyczne kryteria czystości identyfikacji i udowodniono, że rzeczywiście białko obecne w komórkach liści szpinaku to kalretikulina [16, 22]. Podobnie w przypadku białka izolowanego z komórek *Beta vulgaris* wyniki dotyczące obecności kalsekwestryny zostały skorygowane. Zamiast kalsekwestryny stwierdzono obecność kalretikuliny.

W ciągu ostatnich lat pojawiło się kilka doniesień na temat występowania kalretikuliny w komórkach kilku gatunków roślin wyższych: *Hordeum vulgare* [5], *Arabidopsis thaliana* [2], *Nicotiana tabacum* [9], *Zea mays* [14, 19], *Pisum sativum* [12], *Daucus carota* [15]. Podjęto również próby identyfikacji i charakterystyki biochemicznej kalretikuliny pochodzącej z różnych gatunków roślin, interesujących ze względu na ich pozycję taksonomiczną, np. u przedstawiciela prymitywnych okrytonasiennych – *Liriodendron tulipifera* [25], przedstawiciela najstarszych nagonasiennych – *Ginkgo biloba* [20] oraz u przedstawiciela pierwotniaków *Euglena gracilis* [24].

Porównując sekwencję aminokwasową między kalretikulinami izolowanymi u różnych gatunków roślin stwierdzono, że stopień podobieństwa wynosi 95%. Wyniki te wskazują, że kalretikulina jest białkiem o wysoce konserwatywnej strukturze i może odgrywać określoną rolę w regulacji metabolizmu. Stopień homologii kalretikliny zwierzęcej i roślinnej jest również stosunkowo wysoki i waha się w granicach 40–50%.

Metody immunofluorescencyjne [9, 18] potwierdziły lokalizację kalretikuliny roślinnej w obrębie ER, podobnie jak i w komórkach zwierzęcych. Nie jest to zaskakujące, skoro kalretikulina roślinna ma sekwencje retencyjną HDEL.

Masa cząsteczkowa kalretikuliny roślinnej wynosi 55–60 kDa. U roślin dwuliściennych jest wyższa niż u roślin jednoliściennych [19].



RYSUNEK 1. Budowa cząsteczki kalretikuliny (wg Michalaka M. [17], zmieniony): NLS – miejsce odpowiedzialne za lokalizację w jądrze (*nuclear localization site*), ■ – sekwencja sygnałowa, A – miejsce serii powtórzeń KPEDWD, prawdopodobnie odpowiedzialne za wiązanie jonów wapnia z dużym powinowactwem, ▼ – potencjalne miejsca glikozylacji

U niektórych gatunków roślin, np. u szpinaku stosując metody immunologiczne z użyciem przeciwciał przeciw kalretikulinie roślinnej uzyskano dwa prążki, stwierdzając tym samym obecność dwóch białek wykrywalnych przez przeciwciała przeciw kalretikulinie. Prążek główny odpowiadał białku o masie molekularnej 56 kDa, a nieco mniej wyraźnie widoczny drugi prążek odpowiadał białku o masie 55 kDa [19, 22]. Analiza sekwencji N terminalnej wykazała, że oba białka to dwie izoforny kalretikuliny, które wykazują bardzo niewielkie różnice w składzie aminokwasowym.

Niektóre z dotychczas opublikowanych prac dotyczące kalretikuliny roślinnej poruszają problem ekspresji genu kodującego to białko. Zauważono, że w przypadku jęczmienia ekspresja genu kodującego kalretikulinę badanego w obrębie tkanek zalążni wzrasta po zapyleniu i we wczesnych etapach embriogenezy [5]. U tytoniu natomiast stwierdzono specyficzno-tkankową regulację ekspresji genu kodującego kalretikulinę. Najmniejszą ilość transkryptu zaobserwowano w liściach, a największą w tkankach kwiatu i kielkujących nasionach.

4. PERSPEKTYWY DALSZYCH BADAŃ

Minęło niecałe dziesięć lat od pojawienia się pierwszego doniesienia dotyczącego występowania w ER komórek zwierzęcych kalretikuliny – białka wiążącego wapń z wysoką wydajnością (mają wysokie wartości stałych wiązania jonów) i małym powinowactwem (mają wysokie wartości stałych dysocjacji). W tym czasie poczyniono duże postępy w charakterystyce biochemicznej i molekularnej tego białka, czego dowodzą liczne publikacje dotyczące tego problemu (ponad 100 prac cy-

towanych w artykule przeglądowym Michalaka z 1996 roku [17]). Na podstawie wciąż rozszerzającej się wiedzy na temat kalretikuliny można twierdzić, że rola tego białka nie ogranicza się tylko do wiązania i przechowywania jonów wapnia. Jest to raczej białko wielofunkcyjne [21]. Mimo że do tej pory uzyskano wiele danych i wysnuto różne hipotezy dotyczące funkcji kalretikuliny, opierając się głównie na obserwacjach *in vitro*, wciąż jednak konieczne są dalsze badania w celu potwierdzenia istniejących przypuszczeń o funkcji i lokalizacji tego białka w ER i poza tym organellum.

Obecnie w wielu laboratoriach na świecie prowadzi się badania obejmujące różne aspekty wiedzy o kalretikulinie. Głównie próbuje się uzyskać dane potrzebne do wykrycia i zrozumienia związków pomiędzy kalretikulina i innymi retikuloplazminami, a także dane potwierdzające funkcje kalretikuliny jako białka opiekuńczego (chaperonu).

Następnym otwartym problemem do dyskusji jest funkcjonowanie kalretikuliny w innych niż ER miejscach w komórce. Stwierdzono bowiem u niektórych badanych gatunków obecność tego białka również w jądrze komórkowym, błonie komórkowej lub poza komórką, np. w pożywce w przypadku kultury *in vitro* komórek roślinnych niektórych gatunków.

W porównaniu z ogromną ilością danych dotyczących charakterystyki kalretikuliny w komórkach zwierzęcych, obecna wiedza o homologue tego białka występującym w komórkach roślinnych jest bardzo mała. Poczyniono dopiero pierwszy krok, identyfikację i lokalizację kalretikuliny w materiale roślinnym. Następnym problemem do rozwiązania powinno być ustalenie dokładnych funkcji biochemicznych w związku ze specyficznym metabolizmem w organizmach roślinnych. Wykorzystanie organizmów jednokomórkowych, takich jak *Euglena* lub *Chlamydomonas* [24], pozwoli zrozumieć mechanizmy fizjologiczne, w których uczestniczą wapń i kalretikulina.

LITERATURA

- [1] BALDAN B, NAVAIZO L, FRISO A, MARIANI P, MEGGIO F. Plant calreticulin is specifically and efficiently phosphorylated by protein kinase CK2. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **221**: 498–502.
- [2] BENEDETTI CE, TURNER JG. Nucleotide sequence of an *Arabidopsis thaliana* cDNA homologous to plant and animal calreticulins. *Plant Physiol* 1995; **109**: 337.
- [3] BURNS K, ATKINSON EA, BLEACKLEY RC, MICHALAK M. Calreticulin: from Ca²⁺ binding to control of gene expression. *Trends Cell Biol* 1994; **4**: 152–154.
- [4] BUSH DS. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1995; **46**: 95–122.
- [5] CHEN F, HAYES PM, MULROONEY DM, PAN A. Identification and characterization of cDNA clones encoding plant calreticulin in barley. *Plant Cell* 1994; **6**: 835–843.

- [6] CLAPHAM DE. Calcium signaling. *Cell* 1995; **80**: 259–268.
- [7] DEDHAR S. Novel function for calreticulin: interaction with integrins and modulation of gene expression? *Trends Biol Sci* 1994; **19**: 269–271.
- [8] DENECKE J, EK B, CASPERS M, SINJORGO KMC, PALVA PT. Analysis of sorting signals responsible for the accumulation of soluble reticuloplasmins in plant endoplasmic reticulum. *J Exp Bot* 1993; **44**: 213–221.
- [9] DENECKE J, CARLSSON LE, VIDAL S, HOGLUND AS, Ek B, VAN ZEIJL MJ, SINJORGO KMC, PALVA ET. The tobacco homolog of mammalian calreticulin is present in protein complexes *in vivo*. *Plant Cell* 1995; **7**: 391–406.
- [10] FLIEGEL L, BURNS K, MCLENNAN DH, REITHMEIER RAF, MICHALAK M. Molecular cloning of the high affinity calcium-binding protein (calreticulin) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1989; **264**: 21522–21528.
- [11] FRANCESCHI VR, LI X, ZHANG D, OKITA T. Calsequestrinlike calcium-binding protein is expressed in calcium-accumulating cells of *Pistia stratiotes*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 6986–6990.
- [12] HASSAN AM, WESSON C, TRUMBLE WR. Calreticulin is the major Ca^{2+} storage protein in the endoplasmic reticulum of pea plant (*Pisum sativum*). *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **211**: 54–59.
- [13] KRAUSE KH, CHOU M, THOMAS MA, SJOLUNDR, CAMPBELL KP. Plant cells contain calsequestrin. *J Biol Chem* 1989; **264**: 611–616.
- [14] KWIATKOWSKI BA, ZIELIŃSKA-KWIATKOWSKA AG, MIGDALSKI A, KLECZKOWSKI LA, WASILEWSKA LD. Cloning of two cDNAs encoding calnexin-like and calreticulin-like proteins from maize (*Zea mays*) leaves: identification of potential calcium-binding domains. *Gene* 1995; **165**: 219–222.
- [15] LIBIK M, NAVAZIO I, BALDAN B, LO SCHIAVO F, TERZI M, MARIANI P. Characterization of a calcium-binding protein in cell suspension culture of *Daucus carota* L. 10 th FESP Congress, Florence, Italy, September 9–13 1996.
- [16] MENEGAZZI P, GUZZO F, BALDAN B, MARIANI P, TREVES S. Purification of calreticulin-like protein(s) from spinach leaves. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **190**: 1130–1135.
- [17] MICHALAK M. Calreticulin. Springer, New York 1996: 1–211.
- [18] MICHALAK M, MILNER R, BURNS K, OPAS M. Calreticulin. *Biochem J* 1992; **285**: 681–692.
- [19] NAPIER RM, TRUEMAN S, HENDERSON J, BOYCE JM, HAWES C, FRICKER MD, VENIS MA. Purification, sequencing and functions of calreticulin from maize. *J Exp Bot* 1995; **46**: 1603–1613.
- [20] NARDIMC, GIACOMELLIE, DAINESE P., FITCHETTE-LAINE A-C, FAYEL, BALDAN B, NAVAZIO L, MARIANI P. *Ginkgo biloba* expresses calreticulin, the major calcium-binding reticuloplasm in eukaryotic cells. *Botanica Acta* 1997 (in press).
- [21] NASH PD, OPAS M, MICHALAK M. Calreticulin: not just another calcium-binding protein. *Mol Cell Biochem* 1994; **135**: 71–78.
- [22] NAVAZIO L, BALDAN B, DAINESE P, JAMES P, DAMIANI E, MARGRETH A, MARIANI P. Evidence that spinach leaves express calreticulin but not calsequestrin. *Plant Physiol* 1995; **109**: 983–990.
- [23] NAVAZIO L, BALDAN B, MARIANI P, GERWIG GJ, VLIEGENTHART JFG. Primary structure of N-linked carbohydrate chains of calreticulin from spinach leaves. *Glycoconjugate J* 1996; **13**: 1–7.
- [24] NAVAZIO L, NARDI MC, PANCALD S., DAINESE P., BALDAN B, FITCHETTE-LAINEA-C, FAYEL, MEGGIO F, MARTIN W, MARIANI P. Functional conservation in *Euglena gracilis* of calcium homeostat component of the endoplasmic reticulum calreticulin. *J Eucaryotic Microbiol* 1997 (accepted for publication).

- [25] NAVAIZO L, SPONG L, DAINESE P., FITCHETTE-LAINEA-C, FAY L, BALDAN B, MARIANI P. The calcium binding protein calreticulin in pollen of *Liriodendron tulipifera* L. *Plant Science* 1997 (in press).
- [26] OPAS M, THARIN S, MILNER R.E, MICHALAK M. Identification and localization of calreticulin in plant cells. *Protoplasma* 1996; **191**: 164–171.
- [27] POZZAN T, RIZZUTO R, VOLPE P, MELDOLESI J. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Reviews* 1994; **74**: 595–636.
- [28] RANDALL SK. Characterization of vacuolar calcium-binding proteins. *Plant Physiol* 1992; **100**: 859–867.
- [29] SEALS DF, PARRISH ML, RANDALL SK. A 42-kilodalton annexin-like protein is associated with plant vacuoles. *Plant Physiol* 1994; **106**: 1403–1412.
- [30] TRETYN A. Wapń w komórkach eukariotycznych – występowanie, transport, komórkowy mechanizm działania. PWN 1994: 5–236.
- [31] XING T, WILLIAMS LE, NELSON SJ, EAST JM, HALL JL. Immunological detection and localization of a calsequestrin-like protein in red beet and cucumber cells. *Protoplasma* 1994; **179**: 158–165.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 12.01.1998 r.

Przyjęto: 16.03. 1998 r.

Adres autora: 31-044 Kraków, ul. Grodzka 52

FERRYTYNA – SPECYFICZNE BIAŁKO OCHRONNE*

FERRITIN – THE SPECIFIC PROTECTIVE PROTEIN

Joanna SMÓL, Tomasz TWARDOWSKI

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań

Streszczenie: Przedstawiono ogólną charakterystykę fitoferrytyny w porównaniu z ferrytyną z innych organizmów. Wszystkie ferrytyny pełnią tę samą funkcję – regulację gospodarki żelazem i mają podobną strukturę: makrokompleksu składającego się z dwóch podjednostek. Najprawdopodobniej obie podjednostki są wynikiem modyfikacji posttranslacyjnej, a nie produktami różnych mRNA specyficznych dla ferrytyny. Na podstawie dokonanej analizy właściwości omawiane są funkcje biologiczne tego białka.

Słowa kluczowe: ferrytyna, łubin, regulacja translacji.

Summary: The present review describes plant ferritin and compares with other ferritins. All ferritins play the same function – iron housekeeping and have similar macromolecular structure consisting of two subunits. Most probably the subunits are not programmed by different mRNAs but they are a result of posttranslational modification. In correlation with presented characteristics the biological functions of this protein are discussed.

Key words: ferritin, lupin, regulation of translation.

Wykaz stosowanych skrótów: **ABA** – kwas abscysynowy (fitohormon); **ALA** – kwas 5-aminolewulinowy, **ferrH₂O** – ferrytynaH₂O – preparat ferrytyny izolowany z 7-dniowych kiełków łubinowych podlewanych wodą destylowaną, **ferrFe** – ferrytynaFe – preparat ferrytyny izolowany z 7-dniowych kiełków łubinowych podlewanych roztworem FeSO₄, **H** (*heavy*) – podjednostka ferrytyny zwierzęcej o m. cz. ok. 21 kDa, **IRE** (ang. *iron responsive element*) – sekwencja w 5' niekodującym rejonie mRNA_{fer} o długości 28 nukleotydów, odpowiedzialna za zależną od żelaza regulację syntezy ferrytyny na poziomie translacji, **IRE - BP** (ang. *iron responsive element binding protein*) – białko cytoplazmatyczne wiążące się do IRE, **L** (*light*) – podjednostka ferrytyny zwierzęcej o m. cz. ok. 19 kDa, **mRNA_{fer}** – mRNA specyficzny dla ferrytyny, **mRNP** – rybonukleoproteid, kompleks RNA z białkiem

* Artykuł ten stanowi rozwinięcie tematu prezentowanego w 1989 r. na łamach Postępów Biologii Komórki [11].

WSTĘP

Ilość żelaza w komórkach regulowana jest dzięki występowaniu kompleksu żelazowo-białkowego zwanego ferrytyną. Żelazo – piąty pierwiastek na Ziemi pod względem częstości występowania – jest niezbędne do prawidłowego wzrostu i rozwoju wszystkich organizmów żywych, jednocześnie zbyt wysokie stężenie żelaza może być niebezpieczne dla ustroju. Powoduje ono przede wszystkim degradację kwasów nukleinowych. Organizmy są jednak do pewnego stopnia zdolne do obrony przed jonami żelaza przez biosyntezę ferrytyny charakteryzującej się zdolnością do chelatowania tego jonu.

Ferrytyna znana była od dawna w komórkach zwierzęcych. Natomiast w komórkach roślinnych została zidentyfikowana dopiero w latach 1961–1963 i nazwano ją fitoferrytyną. Jej główna funkcja polega na ochronie środowiska komórkowego przed toksycznie wysokim stężeniem żelaza oraz na gospodarce tym pierwiastkiem. Stanowi ona bowiem jednocześnie magazyn żelaza (wychwyconego wcześniej w czasie pełnienia funkcji ochronnej) zapewniający jego dostępność na podstawowe potrzeby komórki. Z dotychczasowych badań wynika, że fitoferrytyna stanowi nietoksyczną formę zapasową żelaza, występującą głównie w proplastydach i etioplastach. Jej funkcją jest dostarczanie żelaza do biosyntezy tych białek, które dla swej aktywności wymagają tego pierwiastka (np. cytochromy). Wykazano również obecność fitoferrytyny w chromoplastach – jako wynik rozkładu i akumulacji żelaza związanego funkcjonalnie z aparatem fotosyntetycznym [22].

W badaniach nad funkcją ferrytyny wykazuje się, że działa ona jako białko regulujące poziom żelaza i zabezpieczające komórkę przed toksycznie wysokim stężeniem tego jonu [40]. Jedna cząsteczka ferrytyny może wiązać nawet 4000 jonów Fe^{2+} [10]. To właśnie ta zdolność ferrytyny do chelatowania jonów żelaza pozwala jej pełnić detoksykacyjną funkcję wobec materiału genetycznego komórki. Zagrożenie dla materiału genetycznego wynika przede wszystkim z hydrolitycznej aktywności jonów żelaza trójwartościowego, które w tej formie ma zdolność degradacji zarówno DNA, jak i RNA. Żelazo związane z ferrytyną nie jest groźne dla układów biologicznych, wręcz odwrotnie, kompleks Fe-ferrytyna pełni rolę magazynu żelaza, które jest ważnym kofaktorem wielu procesów enzymatycznych [30].

CHARAKTERYSTYKA FERRYTYNY ROŚLINNEJ W PORÓWNANIU ZE ZWIERZĘCĄ

Pierwsze doniesienia o ferrytynie pochodzenia roślinnego opublikowano w 1963 r., jednak rzeczywisty rozwój badań nad tym białkiem u roślin rozpoczął się dopiero w latach osiemdziesiątych.

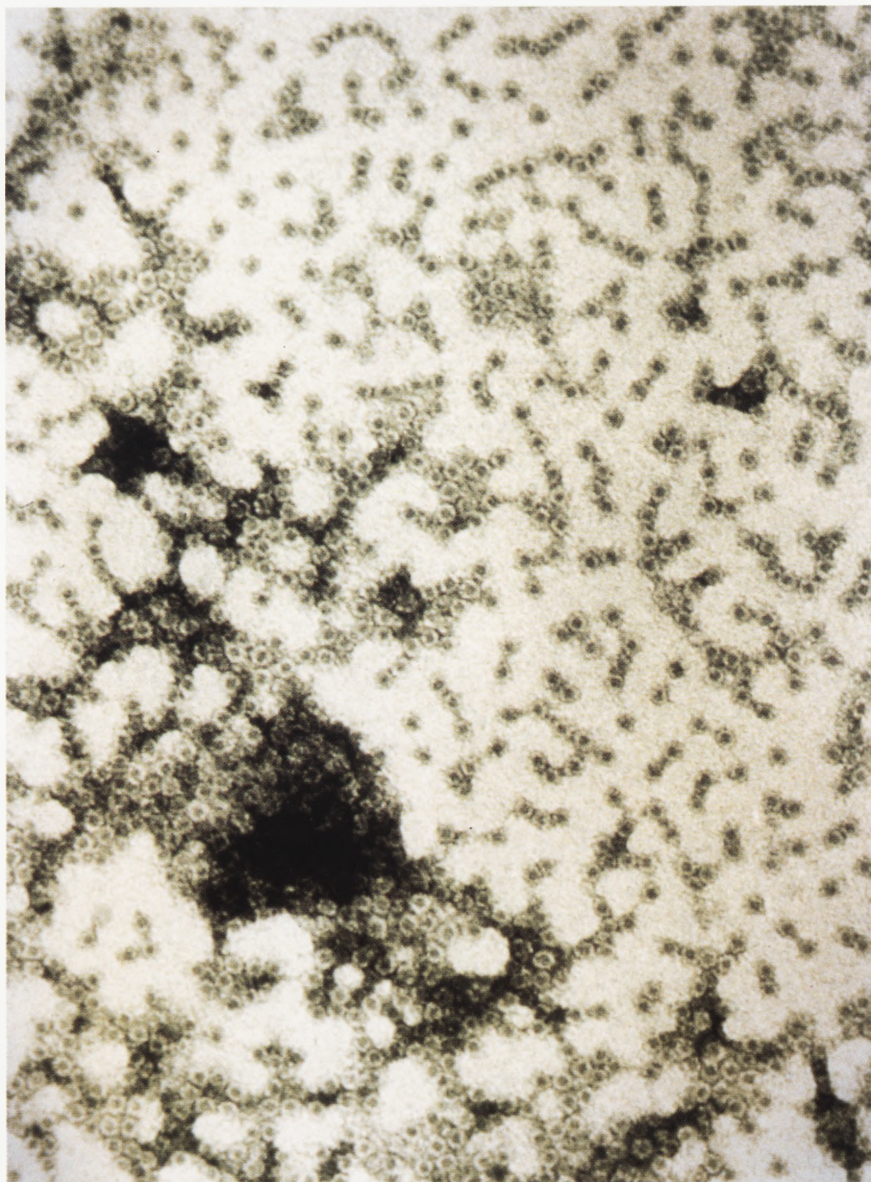
Rozmieszczenie ferrytyny w organach rośliny jest nierównomierne i zależy prawdopodobnie od stężenia żelaza [42,44]. Wewnątrzkomórkowo fitoferrytynę zlokalizowano w plastydach, np. amyloplastach soi i innych roślin motylkowatych oraz w chloroplastach fasoli. W roślinach motylkowatych ferrytyna wykazuje najwyższe stężenie w brodawkach korzeniowych. Znaczny wzrost koncentracji ferrytyny następuje zwłaszcza w początkowych etapach tworzenia się brodawek korzeniowych. Zapoczątkowanie ich rozwoju jest sygnałem stymulującym biosyntezę ferrytyny. W dalszych etapach żelazo zmagazynowane w ferrytynie wykorzystywane jest m. in. do syntezy leghemoglobiny i nitrogenazy, biorących udział w przyswajaniu wolnego azotu. W czasie ich syntezy zawartość ferrytyny gwałtownie maleje [24]. To jedna z wielu obserwacji sugerujących funkcję ferrytyny jako magazynu żelaza dwuwartościowego dla ważnych procesów biologicznych.

Funkcjonalna ferrytyna jest dużym białkiem o masie ok. 450 kDa i stałej sedymentacji 17–18S. Jest to multimeryczne, sferyczne białko składające się z 24 podjednostek o m. cz. ok. 20 kDa. Po całkowitym naładowaniu żelazem ferrytyna może dwukrotnie zwiększyć masę do ok. 900 kDa i osiąga wtedy współczynnik sedymentacji 24S [11,12,13].

W mikroskopie elektronowym na ultracienkich skrawkach fitoferrytyna występuje w plastydowej matrix w trzech różnych postaciach: gęstych i amorficznych agregatów, krystalicznych inkluzji oraz układów parakrystalicznych (rys. 1). Ze szczegółowych analiz wynika, że kompleksy fitoferrytyny tworzą ziarenka o średnicy ok. 12 nm, które utworzone są z cząstek o średnicy 5,5–7 nm [26]. W przypadku krystalicznego układu ich centra oddalone są od siebie o 10 nm. Każda cząstka ma określoną strukturę utworzoną z 6 podjednostek o średnicy 1,5 nm. Są one ułożone na 6 rogach ośmiościanu, który stanowi jej „żelazowe jądro” otoczone powłoką (płaszczem) o grubości 2 nm, zbudowaną z białka – apoferrytyny. To centralne „żelazowe jądro” ma postać dużego (8 nm) wgłębienia (jamki), w którym lokowane jest magazynowane żelazo [34,43].

Żelazo magazynowane jest wewnątrz płaszcza białkowego w formie wodrotlenku żelazowego $[\text{Fe}^{3+}\text{O}(\text{OH})]$ w połączeniu ze zmienną ilością fosforanów [11]. Ferrytyna zwierzęca charakteryzuje się niską zawartością fosforanów, natomiast dla roślinnej znamieną jest ich wysoka zawartość [29]. W enzymatycznym procesie połączenia żelaza dwuwartościowego z apoferrytyną (czyli ferrytyną pozbawioną żelaza) powstaje kompleksowy związek – ferrytyna, przy czym żelazo utlenia się w tej reakcji do trójwartościowego. Odwrotnie, każdemu procesowi odszczepiania żelaza z ferrytyny towarzyszy jego redukcja do żelaza dwuwartościowego [36]. Zdolność ferrytyny do katalizowania utleniania Fe^{2+} związana jest z konserwatywnym centrum ferrokсыdazy usytuowanym wewnątrz polipeptydowych łańcuchów apoferrytyny.

W badaniach nad zwierzęcą ferrytyną dowiedziono istnienia dwóch podjednostek oznaczonych jako H i L (z j. ang. *heavy* – ciężka i *light* – lekka) różniących



RYSUNEK 1. Obraz preparatu ferrytyny z tubinu w mikroskopie elektronowym (pow. 60 000 \times , barwienie negatywowe): cząstki ferrytyny widoczne w kształcie 5–6-kątnego przekroju ptaszcza białkowego otaczającego zabarwiony na ciemno rdzeń żelazowy; ciemniejsze bezkształtne plamy odpowiadają prawdopodobnie uwolnionym z białka kompleksom wodorotlenku żelazowego z polifosforanami [wg 10]

się mobilnością w rozdziale elektroforetycznym. Masa tych podjednostek oznaczona na podstawie elektroforezy wynosi ok. 21 kDa dla H i ok. 19 kDa dla L. Podjednostki te są produktami translacji różnych mRNA, a nie wynikiem modyfikacji posttranslacyjnej [25]. Podobieństwo sekwencji aminokwasowych podjednostek H i L jest rzędu 47%. Różnica między nimi wynika przede wszystkim ze zdolności podjednostki H do szybkiego utleniania Fe^{2+} . Jest to spowodowane występowaniem w niej centrum ferroksozydazowego złożonego z 7 konserwatywnych reszt: Glu – 27, Tyr – 34, Glu – 61, Glu – 62, His – 65, Glu – 107, Gln – 141 [19,32,33,43]. Żelazo uwalniane jest z ferrytyny nie tylko podczas zapotrzebowania komórki na jony Fe^{2+} , ale również przez niektóre związki chemiczne. Należą do nich: 6-hydroksydopamina, tlenek azotu oraz kwas 5-aminolewulinowy (ALA) [15,23].

Ogólna struktura ferrytyny roślinnej podobna jest do zwierzęcej, ale prawdopodobnie różnią się one determinantami antygenowymi, ponieważ nie zaobserwowano immunologicznych reakcji krzyżowych między przeciwciałami dla ferrytyny roślinnej a ferrytyną pochodzenia zwierzęcego. Ferrytynę roślinną charakteryzuje wyższa masa cząsteczkowa w porównaniu ze zwierzęcą.

Charakterystykę molekularną ferrytyny roślinnej i zwierzęcej zawarto w tabeli 1.

TABELA 1. Porównanie wybranych parametrów molekularnych ferrytyny roślinnej i zwierzęcej [10,11,30,33]

Parametry	Ferrytyna		
	łubinowa	szarłatowa	zwierzęca
Masa cząsteczkowa			
– natywna	450 kDa	450 kDa	400 kDa
– podjednostki	28, 26,5 kDa	28, 26,5 kDa	21, 19 kDa
Funkcja	gospodarka żelazem	gospodarka żelazem	gospodarka żelazem
Stabilność pH i temp.	pH: 4,5–10 od –70 do +70°C	pH: 4,5–10 od –70 do +70°C	pH: 4,5–10 od –70 do +70°C
Zawartość fosforanów	wysoka	wysoka	niska
Stymulacja biosyntezy	jony Fe^{2+}	jony Fe^{2+}	jony Fe^{2+}
Regulacja na poziomie	transkrypcji i translacji	transkrypcji i translacji	głównie translacji

BIOSYNTETA FERRYTYNY

Ferrytyna jest białkiem zakodowanym w genomie jądrowym i syntetyzowanym w cytoplazmie. Powstaje ona w formie prekursora zaopatrzonego w N-terminalną sekwencję dodatkową, tzw. tranzytową. Dzięki niej prekursor może być przetransportowany przez otoczkę chloroplastu do jego wnętrza. Na zewnętrznej błonie otoczki

znajdują się receptory rozpoznające i wiążące prekursor bez udziału energii. Sam proces transportu białka do wnętrza chloroplastu wymaga jednak energii. Wewnątrz chloroplastu następuje odcięcie sekwencji dodatkowej przez endopeptydazę, w wyniku czego powstaje dojrzałe białko zdolne do pełnienia swojej funkcji. Jest to proces posttranslacyjnego dojrzewania białka [41].

W badaniach prowadzonych nad mechanizmami regulacji biosyntezy ferrytyny stwierdzono, że jest ona regulowana w zależności od ilości wewnątrzkomórkowego żelaza zarówno na poziomie transkrypcji, jak i translacji [17]. Naukowcy zajmujący się tym problemem są zgodni, że u zwierząt dominuje regulacja na poziomie translacji. Natomiast w przypadku roślin prezentowane są dwa poglądy: w pierwszym przyjmuje się, że regulacja biosyntezy fitoferrytyny odbywa się również głównie na poziomie translacji przez mechanizm autorepresji [11]. Zgodnie z drugą opinią w materiale roślinnym żelazo reguluje biosyntezę ferrytyny przede wszystkim na poziomie transkrypcji [4,5,18]. Z taką hipotezą wystąpił jako pierwszy van der Mark, stwierdzając, że zależnie od stężenia żelaza w układzie roślinnym ilość mRNA specyficznego dla ferrytyny jest zmienna, a zatem regulacja biosyntezy tego białka zachodzi na poziomie transkrypcji. Pogląd ten poddano jednak krytyce, ponieważ w pracach van der Marka brakuje między innymi danych hybrydyzacyjnych (wiarygodna wycena ilości mRNA możliwa jest przez zastosowanie techniki hybrydyzacji). Zmiana ilości aktywnego w translacji ferrytynowego mRNA może być zatem przypisana również aktywacji zgromadzonego nieaktywnego mRNA, specyficznego dla ferrytyny [11,12,13].

Przyпуска się, że u roślin żelazo indukuje wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia kwasu abscysynowego (ABA). Jest to fitohormon stresowy, który przez układ transdukcji sygnału powoduje ekspresję specyficznego dla ferrytyny genu lub genów. Podobny efekt (wzrost ilości mRNA) uzyskano dodając egzogenne ABA. Jednak pełna ekspresja genów ferrytynowych nie może być tłumaczona tylko wzrostem stężenia ABA. Najprawdopodobniej istnieją dwie drogi regulacji transkrypcji genów: jedna zależna od ABA i druga, na którą ABA nie ma wpływu [21].

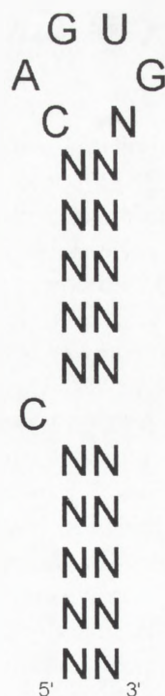
Model regulacji syntezy ferrytyny na poziomie translacji zaproponowano już w latach siedemdziesiątych, a poparto wieloma doświadczeniami na przełomie lat osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych. Z danych doświadczalnych wynika, że w 5' niekodującym rejonie ferrytynowego mRNA znajduje się 28-nukleotydomowa sekwencja wykazująca właściwości regulatorowe. Sekwencję tę nazwano „IRE” (ang. *iron responsive element*) i zaproponowano model jej struktury (rys. 2). W modelu tym zakłada się, że II-rzędowa struktura „IRE” ma postać „szpilki do włosów” (ang. *hairpin*) o następujących właściwościach:

- a) 6-nukleotydomowa pętla o sekwencji CAGUGN (N-dowolny nukleotydom, może być A, ale zazwyczaj jest U lub C);
- b) „górný” dwuniciowy odcinek „łodygi” złożony z 5 par zasad;
- c) niesparowana reszta C znajdująca się od 5' końca;

d) „dolny” dwuniciowy odcinek „łodygi” o zróżnicowanej długości i lokalizacji [7,9].

Zależna od żelaza regulacja biosyntezy ferrytyny na poziomie translacji zachodzi przez wiązanie do „IRE” cytoplazmatycznego białka. Białko to nazwano „IRE-BP” (ang. *IRE-binding protein*). W warunkach niskiego stężenia żelaza znaczna część frakcji „IRE-BP” wykazuje zwiększone powinowactwo do struktury „IRE”. W związku z tym „IRE-BP” wiąże się do „IRE” tworząc kompleks powodujący represję translacji ferrytyny [16]. Represja ta jest osiągnięta przez blokowanie inicjacji translacji w wyniku uniemożliwienia przyłączenia się 43S preinicjacyjnego kompleksu do ferrytynowego mRNA [6]. Zwiększenie stężenia żelaza w komórce prowadzi do obniżenia powinowactwa białka „IRE-BP” do fragmentu „IRE”, w wyniku czego następuje degradacja kompleksu „IRE-BP-IRE”, uwolnienie mRNA i derepresja syntezy ferrytyny. Podobny efekt, tj. zmniejszenie powinowactwa „IRE-BP” do „IRE” powoduje kwas askorbinowy. Nie tylko uniemożliwia on tworzenie kompleksów represyjnych, ale i uwalnia „IRE-BP” z już istniejących, przez co stymuluje aktywność ferrytynowego mRNA [35]. Te obserwacje sugerują rolę wolnych rodników w omawianym procesie, jednakże nie znamy danych eksperymentalnych popierających tę hipotezę. Wiadomo natomiast, że szczególnie żelazo dwuwartościowe wywiera istotny wpływ na procesy rodnikowe, co pośrednio wzmacnia znaczenie postawionej hipotezy.

Zasadniczy mechanizm regulacji syntezy ferrytyny na poziomie translacji polega na autorepresji mRNA specyficznego dla ferrytyny w wyniku jego asocjacji z podjednostką ferrytyny do kompleksu nukleoproteidowego mRNA_{fer}-ferrytyna (mRNP), który jest nieaktywny w procesie translacji. Autorepresja mRNA_{fer} spowodowana jest przez interakcję wolnych podjednostek ferrytyny, rozpoznających sekwencje informacyjnego RNA od końca 5'. Utworzony kompleks mRNP uniemożliwia włączenie informacyjnego RNA_{fer} do procesu biosyntezy białka. Natomiast przy wzroście stężenia żelaza w komórce następuje interakcja żelaza z podjednostkami ferrytyny uprzednio związanymi z mRNA_{fer} – zachodzi proces derepresji. Po utworzeniu kompleksu żelazo-ferrytyna następuje uwolnienie mRNA specyficznego dla ferrytyny, w pełni aktywnego biologicznie, który jest natychmiast zdolny do biosyntezy ferrytyny.



RYSUNEK 2.
Schemat struktury „IRE” (N – dowolny nukleotyd) [wg 7, 9]

CHARAKTERYSTYKA MOLEKULARNA FERRYTYNY ROŚLINNEJ

Badania nad ferrytynami z różnych roślin są prowadzone dość intensywnie [5, 17,38,39 i prace tam cytowane], jednakże wiele kwestii nadal wymaga wyjaśnienia. Właściwości molekularne ferrytyny scharakteryzowano w szeregu roślin modelowych, np. łubinie, grochu, kukurydzy, szarłacie [5,12,13,17,29,30]. Ferrytyna roślinna (np. łubinowa, szarłatowa) ma masę cząsteczkową 450 kDa i stałą sedimentacji 17S, składa się ona z 24 podjednostek: lekkich i ciężkich. Masy cząsteczkowe podjednostek oznaczone metodą elektroforetyczną w żelu poliakrylamidowym wynoszą: 28 kDa i 26,5 kDa.

Żelazo stymuluje biosyntezę ferrytyny roślinnej [4,18,21,28]. Biosynteza ferrytyny jest znacznie bardziej intensywna (ok. 4 x) na pożywcze bogatej w siarczan żelazawy. Jednakże jon żelazawy w dużych stężeniach jest toksyczny dla rozwoju rośliny. W hodowlach obserwowano znaczne różnice w wyglądzie nasion. Siarczan żelazawy w dużym stężeniu powodował prawie 50% zahamowanie wzrostu kiełków łubinu (w porównaniu z nasionami hodowanymi na wodzie destylowanej). Charakteryzowały się one także ciemniejszym (prawie brunatnym) kolorem okrywy nasiennej, czerwonym zabarwieniem i skróceniem korzeni, na liścieniach występowały natomiast brunatne plamy. Można sądzić, że roślina „broni się” przed toksycznym efektem żelaza przez zwiększenie biosyntezy ferrytyny. Obrona ta jest jednak możliwa tylko do pewnego, granicznego poziomu stężenia.

Jak już wcześniej wspomniano, lokalizacja ferrytyny jest prawdopodobnie uzależniona od zapotrzebowania organizmu na żelazo. Procentowo najwięcej ferrytyny zawierają korzenie roślin. Porównywalnie dużo jest jej również w liściach. Najmniejsze stężenie ferrytyny wykazują łodygi.

Z porównania danych literaturowych można wnioskować o podobieństwie właściwości molekularnych ferrytyny roślinnej do zwierzęcej. Potwierdzają to również badania nad omułkiem bałtyckim (*Mytilus trossulus*) [14]. Małż ten może magazynować kadm. Początkowo przypuszczano, że za jego wiązanie odpowiedzialna jest metalotioneina. Jednak wykrywano obecność kadmu w tkankach, w których nie występowała metalotioneina. Wysłunięto więc hipotezę, że białkiem, które jest odpowiedzialne za wiązanie kadmu u omulka, może być ferrytyna. Przez zastosowanie szeregu metod analitycznych wykazano podobieństwo strukturalne i funkcjonalne, a następnie udowodniono, że białkiem tym we wszystkich organizmach jest ferrytyna.

ANALIZA SEKWENCJI AMINOKWASOWYCH FERRYTYNY

Sekwencje aminokwasowe dostarczają cennych informacji dotyczących pokrewieństwa białek, ich stosunków ewolucyjnych i chorób wywołanych mutacjami. Dla ferrytyny łubinowej stwierdzono następującą N-końcową sekwencję aminokwasową: **PNVSLARQNY**.

Z analizy N-końcowych sekwencji aminokwasowych obu podjednostek ferrytyny łubinowej wynika, że podjednostka lekka powstaje przez skrócenie podjednostki ciężkiej. Sekwencje N-końcowe obu podjednostek są bowiem identyczne. Najprawdopodobniej podjednostki te są wynikiem modyfikacji posttranslacyjnej, a nie produktami różnych mRNA specyficznych dla ferrytyny [31]. Ta obserwacja potwierdza tezę o regulacji biosyntezy ferrytyny na poziomie translacji.

Z porównania sekwencji aminokwasowej ferrytyny łubinowej ze znanymi już sekwencjami aminokwasowymi ferrytyny, wyizolowanej z różnych organizmów: roślinnych, zwierzęcych i człowieka, wynika, że zachowawczość sekwencji aminokwasów w roślinnych ferrytynach waha się od 60 do 92,5%. Zachowawcze są zwłaszcza sekwencje od 80 do 159 aminokwasu oraz od 210 do 300, które wykazują duże podobieństwo także z ferrytynami zwierzęcymi i ludzką. Potwierdzeniem wysokiej zachowawczości sekwencji aminokwasowej ferrytyny roślinnej może być analiza sekwencji nukleotydowych z *Zea mays* i *Glycine max*. Analiza struktur DNA także wskazuje na istnienie fragmentów o dużej homologii – 72,2% [31].

BIOLOGICZNE FUNKCJE FERRYTYNY

Ferrytyna spełnia istotne funkcje biologiczne. Należą do nich:

- przeciwdziałanie stresowi,
- pełnienie roli „magazynu” żelaza,
- dostarczanie żelaza na potrzeby organizmu.

Funkcje te są wzajemnie połączone i uzależnione. Często określa się funkcje ochronne jako „sanitarne”; termin ten dobrze oddaje zadania pełnione przez to białko. Ta fitosanitarna funkcja ferrytyny związana jest z przeciwdziałaniem stresowi, głównie abiotycznemu. Stresem jest każdy czynnik środowiskowy, który ma zdolność wywoływania u rośliny zmian fizycznych lub chemicznych. Stres dzielimy na biotyczny i abiotyczny. Biotyczny powodują np. patogeny wirusowe i bakteryjne oraz pasożyty. Abiotyczny natomiast wywołują takie czynniki, jak: przesuszenie gleby, nadmierne schłodzenie lub przegrzanie, zbyt wysokie lub zbyt niskie stężenie jonów metali, np. Fe^{2+} , fosforanów itp. [10].

Żelazo jest pierwiastkiem niezbędnym dla każdej formy życia jako element składowy wielu białek biorących udział w fundamentalnych procesach życiowych komórki, takich jak: oddychanie, fotosynteza, wiązanie azotu, synteza DNA i podział komórki. Mając dwa stabilne stopnie utlenienia (Fe^{2+} , Fe^{3+}) żelazo odgrywa ważną rolę w wielu reakcjach oksydo-redukcyjnych w chloroplastach, mitochondriach i peroksydomach. Żelazo zawierają między innymi: cytochromy, peroksydazy, katalaza, leghemoglobina, ferredoksyna i ferrytyna [40]. Kompleks Fe-ferrytyna pełni rolę „magazynu” żelaza, które jest ważnym kofaktorem wielu procesów enzymatycznych [12,13].

Żelazo jest również toksyczne. Toksyczny charakter żelaza wiąże się przede wszystkim z jego udziałem w powstawaniu wolnych rodników, czyli wysoce reaktywnych utleniaczy, m.in. reaktywnego tlenu bądź rodnika hydroksylowego, które redukują żelazo zmagazynowane przez ferrytynę, w wyniku czego następuje jego uwalnianie. Uwolnione żelazo natomiast generuje powstawanie kolejnych wolnych rodników i dalsze uwalnianie żelaza z jego „magazynów” w ferrytynie [15,23]. Właśnie jony nadtlenkowe lub ponadtlenkowe jako wolne rodniki są czynnikami odpowiedzialnymi za utlenianie lipidów i hydrolizę kwasów nukleinowych, przez co są niebezpieczne dla żywej komórki. W odróżnieniu od DNA cząsteczka RNA jest stosunkowo bardziej odporna wobec wolnych rodników. Przyjmuje się, że ferrytyna może pełnić funkcję ochronną przed degradacją wywołowaną działaniem wolnych rodników.

Efekt ochronny ferrytyny obserwowano w jądrach komórek wątroby szczurów doświadczalnych hodowanych w warunkach silnego nadmiaru żelaza. W jądrach tych w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi następował znaczny wzrost transkrypcji mRNA specyficznego dla ferrytyny [2,8]. Badano również ochronne oddziaływanie ferrytyny w organizmie ludzkim. W warunkach fizjologicznych eryocyty dobiegające kresu swej biologicznej przydatności zostają z krążenia usunięte i ulegają fagocytozie przez makrofagi układu siateczkowo-śródbłonkowego. W układzie tym następuje stopniowa degradacja uwalnianej z krwinek hemoglobiny. Pod wpływem oksygenazy hemowej następuje rozerwanie pierścienia pirolowego hemu i uwalnianie żelaza. Uwolnione żelazo ulega zmagazynowaniu w postaci ferrytyny lub jest transportowane za pośrednictwem transferyny do szpiku kostnego, gdzie służy do syntezy nowych cząsteczek hemu [1]. W warunkach stresu tlenowego silnie wzrasta synteza oksygenazy hemowej. Powoduje ona powstawanie w organizmie znacznego nadmiaru reaktywnego żelaza, które z kolei indukuje powstawanie wolnych rodników. Z przeprowadzonych badań wynika, że prawdopodobnie wzrost w organizmie poziomu oksygenazy hemowej automatycznie stymuluje syntezę ferrytyny, która chelatuje zbędne żelazo. W alternatywnej hipotezie zakłada się, że wzrost syntezy ferrytyny stymuluje sam uszkodzony hem [3]. Tezę tę może potwierdzać wykrywanie kompleksu mRNP. Kompleks nukleoproteidowy jest źródłem specyficznego mRNA (mRNA_{fer}), niezbędnego dla szybkiej reakcji obronnej

organizmu; zanim sygnał o zagrożeniu dotrze do jądra. Inną możliwością wytłumaczenia stymulacji syntezy ferrytyny jest regulacja na poziomie transkrypcji. Prawdopodobnie uszkodzony hem przez układ transdukcji sygnału powoduje ekspresję specyficznych dla ferrytyny genów.

Kolejnym schorzeniem powodowanym przez reaktywne utleniacze i oksygenazę hemową jest upośledzenie dyfuzji nerkowej, które często kończy się zejściem śmiertelnym. Czynnikiem zapobiegającym jest wzrost poziomu nerkowej ferrytyny, która jest inhibitorem oksygenazy hemowej i „konserwuje” pierścień pirolowy. Wysoki poziom ferrytyny wyraźnie przyspiesza dyfuzję nerkową u osób chorych [3,6].

Jedną z najczęstszych jednostek chorobowych, za którą odpowiedzialne są wolne rodniki, jest arterioskleroza. W ostatnio poczynionych obserwacjach wykazano, że komórki endotelium naczyń, których ściany są patologicznie zmienione, zawierają znaczny nadmiar żelaza w porównaniu z sąsiednimi komórkami nie zaatakowanymi chorobą. Na podstawie tych obserwacji sądzi się, że żelazo w uszkodzonych komórkach indukuje syntezę ferrytyny. Jej wysokie stężenie przez kontrolę poziomu żelaza nie tylko zapobiega dalszym uszkodzeniom, ale i prawdopodobnie powoduje cofanie się zmian już istniejących. Natomiast zmutowana ferrytyna (w łańcuchu podjednostki H zamieniono Glu⁶² na Lys i His⁶⁵ na Gly), która nie miała aktywności feroksydazowej (nie mogła chelatować jonów żelaza) była zupełnie nieefektywna w sprawowaniu funkcji ochronnej wobec komórek śródbłonna naczyniowego. Jednocześnie, gdy do kultur komórek endotelium ze zmianami arteriosklerotycznymi dodano apoferrytynę, otrzymano znacznie silniejszy efekt ochronny niż w przypadku dodania ferrytyny. Najprawdopodobniej jest to spowodowane tym, że apoferrytyna nie ma żelaza i dzięki temu może go „wychwycić” znacznie więcej niż ferrytyna [3,15].

Jony żelaza (Fe^{2+}) są także inhibitorami mechanizmów translacyjnych. Prawdopodobnie najbardziej wrażliwy na działanie żelaza jest etap inicjacji translacji. Inhibitorowy wpływ żelaza może być częściowo zniesiony w obecności ferrytyny. Podjednostki ferrytyny wiążąc jony żelazawe umożliwiają przebieg translacji. Ta zdolność ferrytyny do chelatowania jonów żelaza pozwala jej spełniać funkcję ochronną wobec układów biologicznych. Organelle komórkowe wyspecjalizowane w gromadzeniu ferrytyny są w stanie szybko odpowiedzieć na zwiększenie czy też spadek wewnątrzkomórkowego stężenia żelaza, bez wnikania żelaza do jądra komórkowego, co prowadziłoby do inhibicji transkrypcji. Wiąże się to bezpośrednio z detoksykacyjnym charakterem ferrytyny, przede wszystkim w celu ochrony materiału genetycznego komórki. Kompleksacja żelaza przez ferrytynę jest zgodna z biologiczną funkcją tego białka (strategia unikania stresu przez ameliorację*) [18].

*Amelioracja (roślina potrafi „radzić” sobie z wysokim, wewnątrzprotoplastydom stężeniem toksycznych jonów przez: (1) lokalizację stresora na zewnątrz lub wewnątrz protoplastu (kompartymencja) w niektórych organach, (2) inaktywację chemiczną polegającą na tym, że jon obecny w protoplaście jest związany w formę mniej toksyczną, (3) rozcieńczenie (szczególnie istotna obrona przed zasoleniem).

W nawiązaniu do funkcji ferrytyny możemy w następujący sposób określić możliwości wykorzystania jej przez komórkę:

- 1) wiązania jonów żelaza Fe^{2+} , a w konsekwencji,
- 2) ochrony mRNA specyficznego dla ferrytyny na poziomie translacji;
- 3) ochrony jądrowego DNA [39].

Wymienione w artykule właściwości molekularne ferrytyny roślinnej warunkujące jej biologiczne funkcje ukazują możliwości praktycznego zastosowania tego białka. Postuluje się m.in. obsadzanie poboczy ruchliwych dróg przebiegających w pobliżu pól uprawnych pasami roślinności ochronnej, charakteryzującej się wysokim poziomem ferrytyny zdolnej do „wychwytywania” szkodliwych jonów żelaza. Jest to możliwe, ponieważ wysokie stężenie żelaza stymuluje syntezę ferrytyny w roślinach, umożliwiając jej pełnienie funkcji ochronnej przez chelatowanie jonów żelaza (ferrytyna może wychwytywać też inne pierwiastki, np. kadm, ołów). Do tego celu szczególnie przydatny byłby szarłat szorstki. Jest to bowiem pospolita roślina o bardzo małych wymaganiach klimatycznych i glebowych. Należy sobie jednak zdawać sprawę, że rośliny stanowiące pasy ochronne będą – ze względu na zgromadzone w nich pierwiastki – szkodliwe i z tego względu nieprzydatne do wykorzystania w gospodarce. Konieczne będzie ich niszczenie (np. przez spalanie). Jednak, czy zastosowanie pasów ochronnych sprawdzi się w praktyce, pokaże czas.

LITERATURA*

- [1]ANGIELSKI S i współautorzy. Biochemia kliniczna w praktyce lekarskiej. PZWL Warszawa 1983; 484–489.
- [2]BALLA G. i wsp. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem endothelium. *Biol Chem* 1992; **267**: 18148–18153.
- [3]EVANS PJ, TREDGER JM, DUNNE JB, HALLIWELL B. Catalytic metal ions and the loss of reduced glutathione from University of Wisconsin preservation solution. *Transplantation* 1996; **62**: 1046.
- [4]FOBIS-LOISY I, LORIDON K, LOBREAUX S, LEBRUN M, BRIAT JF. Structure and differential expression of two maize ferritin genes in response to iron and abscisic acid. *Eur J Biochem* 1995; **231**: 609–619.
- [5]FOBIS-LOISY I, AUSSEL L, BRIAT JF. Post-transcriptional regulation of plant ferritin accumulation in response to iron as observed in the maize mutant ys1. *FEBS Lett* 1996; **397**: 149–154.
- [6]GRAY N, HENTZE M. Iron regulatory protein prevents binding of the 43s. Translation pre - initiation complex to ferritin and eALAs mRNA. *EMBO* 1994; **13**: 3882–3891.

*Dopiero po złożeniu tego tekstu do druku autorzy mieli możliwość zapoznania się z artykułem opublikowanym w *Trends in plant science* (1997, **2**:187–193) pt. *Iron transport and storage in plants* autorstwa JF. Briat i S. Lobreaux, który stanowi istotne rozwinięcie informacji na temat gospodarki żelazem w roślinach.

- [7]JAFFREY SR. The interaction between the iron - responsive element binding protein and its cognate RNA is highly depend upon both RNA sequence and structure. *Nucleic Acids Res* 1993; **21**: 4627–4631.
- [8]JUCKETT MB, BALLA J, BALLA G, JESSURUN J, JACKOB HS, VERCELLOTTI GH. Ferritin protects endothelial cells from oxidized low density lipoprotein *in vitro*. *Am J Pathol* 1995; **147**: 782–789.
- [9]KIKINIS Z, EISENSTEIN RS, BETTANY AJ, MUNRO HN. Role of RNA secondary structure of the iron-responsive element in translational regulation of ferritin synthesis. *Nucleic Acids Res* 1995; **23**: 4190–4195.
- [10]KORCZ A. Udział niskocząsteczkowych produktów naturalnych (oraz jonów żelazawych) w procesach regulatorowych biosyntezy białka w układach roślinnych (badania modelowe). *praca doktorska* 1991: UAM Poznań-Wydział Biologii.
- [11]KORCZ A, TWARDOWSKI T. Mechanizmy regulacji biosyntezy białka na przykładzie ferrytyny. *Post Biol Kom* 1989; **16**: 177–196.
- [12]KORCZ A, TWARDOWSKI T. The effect of selected heavy metal ions on wheat germ-protective function of plant ferritin. *Acta Physiol Plant* 1992; **14**: 185–190.
- [13]KORCZ A, TWARDOWSKI T. Lupin ferritin: purification and characterization, biosynthesis and regulation of *in vitro* synthesis in plant system. *J Plant Physiol* 1992; **141**: 75–81.
- [14]KOZUCH J, PEMPKOWIAK J, KUPRYSZEWSKI G, MUCHA P, REKOWSKI P, SMÓL J. Analysis of ferritin-type proteins in the hepatopancreas of Baltic blue mussel (*Mytilus trossulus*). *Oceanologia* 1992; **39**: 157–162.
- [15]KUKIEŁKA E, CEDERBAUM AI. Ferritin stimulation of hydroxyl radical production by rat liver nuclei. *Arch Biochem Biophys* 1994; **308**: 70–77.
- [16]LEIBOLD E, LAUDANO A, YANG Yu. Structural requirements of iron - responsive elements for binding of the protein involved in both transferrin receptor and ferritin mRNA post-transcriptional regulation. *Nucleic Acid Res* 1990; **18**: 1819–1824.
- [17]LESCURE AM, MASSENET O, BRIAT JF. Purification and characterization of an iron-induced ferritin from soybean (*Glycine max*) cell suspensions. *Biochem J* 1990; **272**: 145–150.
- [17a]LESCURE AM, PROUDHON D, PESEY H, RAGLAND M., THEIL EC, BRIAT JF. Ferritin gene transcription is regulated by iron in soybean cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 8222–8226.
- [18]LEVI S, CORSI B, ROVIDA E, COZZI A, SANTAMBROGIO P, ALBERTINI A, AROSIO P. Construction of a ferroxidase center in human ferritin L-chain. *J Biol Chem* 1994; **269**: 30334–30339.
- [19]LOBREAUX S, MASSENET O, BRIAT JF. Iron induces ferritin synthesis in maize plantlets. *Plant Mol Biol* 1992; **19**: 563–575.
- [20]LOBREAUX S, HARDY T, BRIAT JF. Abscisic acid is involved in the iron-induced synthesis of maze ferritin. *EMBO* 1993; **12**: 651–657.
- [21]MŁODZIANOWSKI F, WOŹNY A. Wykłady i ćwiczenia z biologii komórki. Wyd. Nauk. UAM Poznań 1990: 181–183.
- [22]OTEIZA PI i wsp. Amidolevulinic acid induces iron release from ferritin. *Arch Biochem Biophys* 1995; **316**: 607–611.
- [23]RAGLAND M, THEIL E. Ferritin (mRNA, protein) and iron concentrations during soybean nodule development. *Plant Mol Biol* 1993; **21**: 555–560.
- [24]SANTAMBROGIO P i wsp. Production and characterization of recombinant heteropolymers of human ferritin H and L chains. *J Biol Chem* 1993; **268**: 12744–12748.
- [25]SAWICKI W. Histologia. Podręcznik dla studentów. PZWL, Warszawa 1993: 130–143.
- [26]SIERZPUTOWSKA-GRACZ H, Mc KENZIE RA, THEIL E. Production and characterization of recombinant heteropolymers of human ferritin H and L chains. *Nucleic Acids Res* 1995; **23**: 146–153.

- [28]SMÓL J. Funkcja biologiczna i mechanizm biosyntezy ferrytyny roślinnej. *praca licencyjna*, UAM Poznań-Wydział Biologii i ICHB PAN 1994.
- [29]SMÓL J. Porównanie właściwości molekularnych ferrytyny wyizolowanej z łubinu żółtego (*Lupinus luteus*) i szarłatki szorstkiej (*Amaranthus retroflexus*). [w:] Frencl, Gulewicz. Łubin: kierunki badań i perspektywy użytkowe, *Postępy w badaniach łubinu Polskie Towarzystwo Łubinowe - ICHB PAN Poznań 1996*; 212–218.
- [30]SMÓL J. Ferrytyna – specyficzne białko ochronne. Właściwości molekularne, mechanizm biosyntezy i funkcja biologiczna ferrytyny roślinnej. Porównanie właściwości molekularnych ferrytyny wyizolowanej z łubinu żółtego (*Lupinus luteus*) i szarłatki szorstkiej (*Amaranthus retroflexus*). *praca magisterska*, UAM Poznań-Wydział Biologii i ICHB PAN 1996.
- [31]SMÓL J. Zachowawczość sekwencji aminokwasowych ferrytyny. *Biotechnologia 1997*; **4**: 135–139.
- [32]THEIL E. Ferritin structure, gene regulation and cellular function in animals, plants and microorganisms. *Ann Rev Biochem 1987*; **56**: 289–315.
- [33]THEIL EC. Ferritin mRNA translation, structure and gene transcription during development of animals and plants. *Enzyme 1990*; **44**: 68–82.
- [34]THEIL E, SAYERS D. Iron core formation in ferritin. *Basic Life Sci 1989*; **51**: 161–167.
- [35]TOTH I, BRIDGES K. Ascorbic acid enhances ferritin mRNA translation by an IRP/ aconitase switch. *Biol Chem 1995*; **270**: 19540–19544.
- [36]TRACZYK W, TRZEBSKI A. Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej. PZWL, Warszawa 1989; 468.
- [37]TWARDOWSKI T. Wyżywienie ludzkości a biotechnologia roślin, *Problemy 1988*; 8.
- [38]TWARDOWSKI T. Łubin jak soja? *Przeł Techn 1988*; **25**.
- [39]TWARDOWSKI T. Alkaloidy łubinowe – niedoceniane związki z ciekawą przyszłością. *Wiad Chem 1988*; **41**: 392–408.
- [40]Van DARL M, HARRISON P, BOTTKE W. Expression in *E. coli* of a recreated invertebrate ferritin. *Eur J Biochem 1994*; **222**: 367–376.
- [41]WALDO GS, WRIGHT E, WHANY ZH, BRIAT JF, THEIL EC, SAYERS DE. Formation of the ferritin iron mineral occurs in plastids. *Plant Physiol 1995*; **109**: 797–802.
- [42]WOŹNY A. Struktura i subultrastruktura chloroplastów granowych. *Post Biol Kom 1985*; **12**: 216–217.
- [43]WUYTSWINKEL O, BRIAT JF. Conformational changes and *in vitro* core-formation modifications induced by site-directed mutagenesis of the specific N-terminus of pea seed ferritin. *Biochem J 1995*; **305**: 959–965.
- [44]ZHAO Z, TREFFRY A, QUAIL MA, HARRISON PM. A capillary electrophoresis method for studying apo, holo, recombinant and subunit dissociated ferritin. *Anal Biochem 1994*; **218**: 47–54.

Prowadzący redaktor – Jan Michejda

Otrzymano: 10.01. 1998 r.

Przyjęto: 20.04 1998 r.

Adres autora: 61-704 Poznań, ul. Noskowskiego 12/14.

WEWNĄTRZKOMÓRKOWY TRANSPORT I AKUMULACJA NIEORGANICZNEGO WĘGLA JAKO WSTĘPNE ETAPY FOTOSYNTEZY*

INTRACELLULAR TRANSPORT AND ACCUMULATION OF INORGANIC CARBON AS THE INITIAL STAGES OF PHOTOSYNTHESIS

Bożena KOZŁOWSKA-SZERENOS, Stanisław MALESZEWSKI

Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku

Streszczenie: Stężenie CO₂ w chloroplastach, obok napromienienia, jest podstawowym czynnikiem określającym szybkość fotosyntezy. W fotosyntetyzujących komórkach działają mechanizmy usprawniające pobieranie i transport nieorganicznego węgla oraz zwiększające stężenie CO₂ w miejscu działania rubisco. W pracy tej przedstawiono ich główne elementy i funkcjonowanie w różnych grupach roślin.

Słowa kluczowe: mechanizm zwiększający stężenie CO₂, anhydraza węglanowa, fotosynteza, nieorganiczny węgiel, rubisco.

Summary: Concentration of CO₂ in chloroplast apart from irradiation is the basic factor affecting photosynthetic rate. The mechanisms occur in photosynthetic cells raising the efficiency of uptake and transport of inorganic carbon and increasing CO₂ concentration at the active site of rubisco. Their main elements and action are presented in various groups of plant.

Key words: CO₂-concentrating mechanisms, carbonic anhydrase, photosynthesis, inorganic carbon, rubisco.

Wykaz skrótów: **DIC** – rozpuszczalne nieorganiczne związki węgla, **CCM** – mechanizm zwiększający stężenie CO₂, **CA** – anhydraza węglanowa, karboksylaza, **PEP** – karboksylaza fosfoenolopirogronianu, **rośliny C₃** – rośliny, u których pierwszym trwałym produktem asymilacji CO₂ jest kwas fosfoglicerynowy, **rośliny C₄** – rośliny, u których pierwszym produktem wiązania CO₂ jest kwas szczawiooctowy, **rośliny CAM** – rośliny gruboszowate (kwasowe), które gromadzą CO₂ w nocy, wiążąc go w kwasach organicznych, **rubisco** – karboksylaza/oksygenaza RuBP.

*Artykuł został napisany podczas realizacji przez B. Kozłowską-Szerenos grantu KBN nr 6 PO4C 104 10.

WSTĘP

Asymilację i fotosyntetyczne przemiany związków węgla w roślinach zielonych inicjuje wiązanie CO₂, katalizowane przez karboksylazę/oksygenazę RuBP (rubisco, EC 4.1.1.39), występującą w stromie chloroplastów (reakcja 1).



Ten sam enzym katalizuje także oksygenację RuBP (reakcja 2).



Oksygenacja RuBP ogranicza asymilację CO₂, gdyż O₂ współzawodniczy z CO₂ o miejsce aktywne enzymu. Zapoczątkowuje również proces fotooddychania [48]. Stosunek szybkości obu reakcji zależy od kinetycznych parametrów rubisco oraz od stężeń CO₂ i O₂ w miejscu działania enzymu [19].

Stężenie dwutlenku węgla w atmosferze, wynoszące obecnie około 360 ppm [11,12], jest kilka razy niższe od stężenia wysycającego karboksylację RuBP [16,29]. Ponadto, na skutek oporów dyfuzyjnych, stężenie CO₂ w przestrzeniach międzykomórkowych napromienionego liścia, skąd substrat ten jest bezpośrednio pobierany, jest znacznie niższe od stężenia w otaczającej atmosferze [11]. Ogranicza to reakcję (1) i wzmagą niekorzystną dla fotosyntezy reakcję (2).

W środowisku wodnym, będącym w równowadze z powietrzem, maksymalne stężenie CO₂ jest nieco niższe od stężenia tego gazu w atmosferze. Występują także inne formy rozpuszczalnego węgla nieorganicznego. Ich stężenia zależą od wielu czynników: temperatury, pH, mieszania się wody w zbiorniku oraz wiązania i wytwarzania CO₂ w procesach biologicznych [8].

Dostarczanie CO₂ do miejsca działania rubisco w komórce, obok napromienienia, stanowi główny czynnik limitujący fotosyntezę. W procesie ewolucji fotoautotrofów wykształciły się różne mechanizmy aktywnego pobierania, transportu i zwiększania stężenia CO₂ w miejscu działania tego enzymu. Ze względu na ich duże znaczenie dla produktywności roślin są obecnie przedmiotem intensywnych badań. Dodatkowym powodem wzmagającym zainteresowanie tymi mechanizmami jest stały wzrost stężenia CO₂ w atmosferze, wynoszący obecnie około 1,8 ± 0,2 ppm na rok [12], który może doprowadzić do istotnych modyfikacji w ich funkcjonowaniu.

FORMY NIEORGANICZNEGO WĘGLA POBIERANEGO PRZEZ FOTOAUTOTROFY

Rośliny lądowe oraz hydrofity, których liście pływają na powierzchni wody, pobierają CO₂ bezpośrednio z atmosfery. Natomiast rośliny całkowicie zanurzone (makrofit, mikroglony, sinice) korzystają z zawartego w wodzie CO₂ i z innych

form rozpuszczonego nieorganicznego węgla (DIC, ang. *dissolved inorganic carbon*), które powstają w wyniku reakcji CO_2 z wodą (reakcja 3):



Powstający słaby kwas węglowy dysocjuje na jony H^+ i HCO_3^- oraz w niewielkim stopniu na CO_3^{2-} . Przy obojętnym i alkalicznym odczynie wody, będącej w równowadze gazowej z powietrzem, HCO_3^- występuje w dużo większym stężeniu niż CO_2 (tab. 1). Jony węglanowe, a głównie jon wodorowęglanowy stanowi zasobne źródło CO_2 dla reakcji katalizowanej przez rubisco. Obecność w roztworze innych jonów i trudno rozpuszczalnych soli kwasu węglowego z jonami metali alkalicznych tylko w niewielkim stopniu wpływa na stężenie składników DIC. Natomiast istotny wpływ mają zmiany temperatury. Na przykład podwyższenie temperatury do 30°C powoduje obniżenie stężenia CO_2 do 9 mmol oraz zmianę stosunku stężeń CO_2/O_2 w kierunku niekorzystnym dla fotosyntezy [39].

Przedstawione zależności między CO_2 i innymi formami DIC (tab. 1) dotyczą również wewnętrznego wodnego środowiska komórek roślinnych, będącego w równowadze gazowej bezpośrednio z atmosferą lub z zewnętrznym środowiskiem wodnym [15]. W komórkach fotoautotrofów przemiany DIC są katalizowane przez anhidrazę węglanową (CA, EC 4.2.1.1).

TABELA 1. Stężenie CO_2 i HCO_3^- w roztworach wodnych o różnym pH, w temp. 20°C , będących w równowadze gazowej z powietrzem (wartości obliczone wg równania Hendersona-Hasselbacha [17])

pH	Stężenie CO_2 (μM)	Stężenie HCO_3^- (μM)	$\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$
5,0		0,58	0,05
6,0		5,78	0,5
6,3		11,6	1,0
7,0	12	57,0	5,0
7,3		116,0	10,0
8,0		578,0	50,0
8,3		1156,0	100,0

$$* \text{pH} = \text{pK} + \log [\text{HCO}_3^-] - \log [\text{CO}_2]$$

KOMÓRKOWE MECHANIZMY POBIERANIA I TRANSPORTU NIEORGANICZNEGO WĘGLA

Stężenie CO_2 w miejscu działania rubisco podczas fotosyntezy zależy od szybkości karboksylacji RuBP oraz dopływu CO_2 spoza komórki i ze źródeł wewnętrznych (oddychania i fotooddychania).

Ładowe rośliny C₃. Dopływ CO₂ z zewnętrznej atmosfery do przestrzeni międzykomórkowych liścia reguluje stopień otwarcia aparatów szparkowych. U roślin nie poddanych stresowi wodnemu, apertura szparek jest zwykle odwrotnie skorelowana ze stężeniem CO₂ [30,49]. Aparaty szparkowe współdziałają w utrzymaniu stężenia CO₂ w przestrzeniach międzykomórkowych napromienionych liści roślin C₃ w granicach 220–260 ppm, średnio wynosi ono około 0,7 stężenia zewnętrznego [11,14]. U ładowych roślin C₃ nie stwierdzono metabolicznych mechanizmów wzmagających pobieranie CO₂ i transport DIC do miejsca działania rubisco [7]. Wydaje się, że odbywa się to wyłącznie w drodze dyfuzji. Jedynie anhidraza węglanowa (CA), występująca w stromie chloroplastów i prawdopodobnie w cytoplazmie podstawowej [6,9], przyspiesza przekształcanie innych form DIC w CO₂, bezpośredni substrat rubisco (rys. 1A).

Rośliny C₄. U roślin C₄ (np. trzcina cukrowa, kukurydza, portulaka) występują "dodatkowe" mechanizmy fotosyntetyczne, zwiększające stężenie CO₂ w miejscu działania rubisco. Mięszysz asymilacyjny tych roślin, na przekroju poprzecznym liścia, charakteryzuje się wieńcowym układem komórek; wiązki przewodzące są otoczone zwartym pierścieniem komórek tworzących pochwę wokółwiązkową, na zewnątrz której znajdują się luźno rozmieszczone komórki mezofilu.

Wnikający do liści dwutlenek węgla jest w cytoplazmie komórek mezofilu, przy udziale anhidrazy węglanowej (CA), przekształcany w HCO₃⁻ i pierwotnie wiązany (reakcja 4), przez występującą tam karboksylazę fosfoenolopirogronianową (karboksylazę PEP, EC 4.1.1.31).



Szczawiooctan (OAA) ulega redukcji do kwasu jabłkowego i/lub aminacji do kwasu asparaginowego. Powstałe kwasy są następnie transportowane do komórek pochwy wokółwiązkowej i przetwarzane w ich cytoplazmie w CO₂ i odpowiedni produkt trójwęglowy, pirogronian i/lub alaninę. Uwolniony dwutlenek węgla jest wtórnie wiązany przez rubisco (reakcja 1), występującą u roślin C₄ tylko w chloroplastach komórek pochwy wokółwiązkowej, i metabolizowany tam w cyklu Calvina (rys. 1B).

Efektom funkcjonowania fotosyntetycznego mechanizmu C₄ jest podwyższone stężenie tego substratu w miejscu działania rubisco, co zwiększa karboksylację i ogranicza oksygenację RuBP. Przejawem działania tego mechanizmu jest też utrzymywanie na niskim poziomie, około 100 ppm, stężenia CO₂ w przestrzeniach międzykomórkowych napromienionych liści [14]. Duży gradient stężenia CO₂ pomiędzy otaczającą atmosferą i przestrzeniami międzykomórkowymi pozwala na sprawną dyfuzję CO₂ do liści nawet przy małej aperturze szparek. Może to być także czynnikiem wysokiej produktywności transpiracji roślin C₄, np. kukurydzy [43]. Wydajne funkcjonowanie mechanizmu C₄ jest uzależnione od CA, zlokalizowanej w cy-

toplazmie komórek mezofilu, która katalizuje wytwarzanie HCO_3^- , bezpośredniego substratu karboksylazy PEP (rys. 1B).

W fizjologicznych warunkach stężenie HCO_3^- we wnętrzu komórek może być 5–10 razy większe od stężenia CO_2 . Powinowactwo karboksylazy PEP do HCO_3^- jest też trzykrotnie wyższe od powinowactwa rubisco do CO_2 . Ponadto, mechanizm C_4 ogranicza efekt fotooddychania, czego wyrazem jest niski punkt kompensacyjny CO_2 fotosyntezy. Dzięki tym właściwościom, przy optymalnym napromieniowaniu i temperaturze, szybkość asymilacji węgla i fotosyntetyczna produktywność u roślin C_4 są znacznie wyższe niż u roślin C_3 . Funkcjonowanie mechanizmu C_4 jest jednak związane z prawie dwukrotnie wyższym zapotrzebowaniem kwantowym fotosyntetycznego wiązania CO_2 [29].

Rośliny typu pośredniego $\text{C}_3\text{-C}_4$. Podobny przebieg i rozdział przestrzenny reakcji fotosyntezy, związany z aktywnym zwiększaniem odpowiednich postaci nieorganicznego węgla w miejscu działania obu enzymów karboksylujących, występuje także u grupy roślin (gatunki z rodzaju *Flaveria*, *Panicum*, *Molluga*, *Moricandia*), które nie mają typowego dla roślin C_4 wieńcowego układu mięksiszu asymilacyjnego, a jedynie szczątkowe pochwy wokółwiązkowe. Fotosynteza ich, tak jak u roślin C_4 , charakteryzuje się dużym natężeniem i niskim punktem kompensacyjnym CO_2 [7].

Uważa się, że fotosynteza typu pośredniego $\text{C}_3\text{-C}_4$ stanowi etap rozwojowy pomiędzy fotosyntezą C_3 a ewolucyjnie młodszą C_4 . Powstanie obu typów było prawdopodobnie związane z obniżaniem się stężenia CO_2 w atmosferze Ziemi i rozprzestrzenianiem się roślin na obszary o niskiej wilgotności, lecz dużym napromienieniu [17].

Rośliny CAM. U roślin CAM (ang. *Crassulacean Acid Metabolism*), pochodzących głównie z pustynnych regionów tropikalnych (np. kaktusy, agawy, aloesy), elementy mechanizmu fotosyntetycznego C_3 i C_4 występują w tych samych komórkach, lecz ich działanie jest rozdzielone czasowo. Pierwotna reakcja asymilacji węgla z udziałem karboksylazy kwasu fosfoenolopirogronowego (reakcja 4), przebiegająca w nocy przy otwartych aparatach szparkowych prowadzi do nagromadzenia w wakuolach fotosyntetyzujących komórek kwasu jabłkowego. Dekarboksylacja jabłczanu i wtórne wiązanie uwolnionego CO_2 katalizowane przez rubisco (reakcja 1) następuje podczas dnia, gdy aparaty szparkowe są zamknięte (rys. 1C). Mechanizm ten istotnie ogranicza straty wody. Umożliwia też utrzymanie podczas dnia wysokiego wewnętrznego stężenia CO_2 , minimalizującego fotooddychanie. Zapotrzebowanie energetyczne asymilacji węgla na tej drodze jest również wyższe niż szlaku C_3 [13].

Rośliny wodne. W wodzie morskiej całkowite stężenie nieorganicznego węgla wynosi około 2,2 mM. W stanie równowagi z powietrzem CO_2 stanowi około 8%, a HCO_3^- aż około 92%. Szybkość dyfuzji CO_2 w środowisku wodnym jest około 10^4 razy mniejsza niż w powietrzu. W takich warunkach pobieranie i transport

CO₂ do miejsca działania rubisco oparte na czysto fizycznej dyfuzji stanowiłby istotny czynnik ograniczający fotosyntezę [26]. Fotoautotrofy całkowicie zanurzone w wodzie (sinice, glony i makrofity) pobierają ze środowiska CO₂ i HCO₃⁻. Mało wydajne przenikanie obu postaci DIC przez ich błonę lipidową drogą prostej dyfuzji może być istotnie wzmagane przez mechanizmy zwiększające stężenie CO₂ w komórce. Poznanymi składnikami tych mechanizmów są transbłonowe przenośniki nieorganicznych form węgla oraz anhidraza węglanowa [5].

Zarówno CO₂, jak HCO₃⁻ mogą być pobierane i transportowane przy udziale błonowych ATP-az, które wyrzucają protony z cytoplazmy do przestrzeni peryplazmatycznej. Wytworzony gradient protonów umożliwia bezpośrednio odwrotny transport HCO₃⁻ drogą kotransportu H⁺/HCO₃⁻ lub antyportu OH⁻/HCO₃⁻ [18,35]. Zakwaszenie przestrzeni peryplazmatycznej stwarza warunki do rozkładu dyfundującego jonu, co usprawnia zaopatrzenie komórek w CO₂ [18]. W procesach tych u glonów może uczestniczyć zewnątrzkomórkowa anhidraza węglanowa, występująca w przestrzeni peryplazmatycznej ich komórek [8,41,46].

Wykazano, że niektóre gatunki glonów nie mają jednak zdolności aktywnego pobierania HCO₃⁻, mimo iż ich fotosynteza ma właściwości, takie jak u fotoautotrofów wodnych, zwiększających stężenie nieorganicznego węgla w miejscu działania rubisco. Uzyskano dane sugerujące, że rośliny te mogą transportować bezpośrednio CO₂ przy udziale specyficznej CO₂-ATP-azy [38].

W wyniku działania mechanizmów zateżających (CCM, ang. *CO₂-concentrating mechanism*), wewnątrzkomórkowe stężenie CO₂ może być nawet 10³ razy większe niż w bezpośrednim otoczeniu. Dzięki ich działaniu fotosynteza w komórkach glonów i sinic typu C₃, tak jak fotosynteza typu C₄, wykazuje:

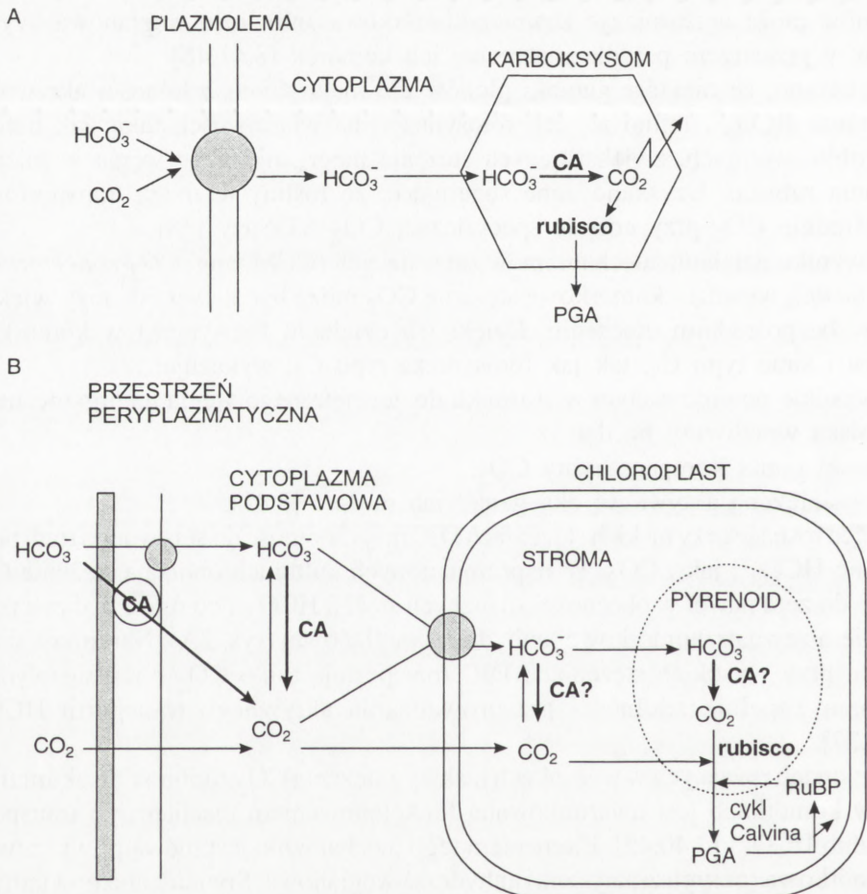
- wysokie powinowactwo w stosunku do zewnętrznego węgla nieorganicznego,
- niską wrażliwość na tlen,
- niski punkt kompensacyjny CO₂,
- ograniczoną aktywność oksigenacyjną rubisco [8,47].

Sinice rosnące przy niskich stężeniach DIC mają zdolność do aktywnego transportu zarówno HCO₃⁻, jak i CO₂. W napromienionych kulturach obniżają stężenie CO₂ prawie do zera nawet w obecności znacznych stężeń HCO₃⁻, co może być związane z brakiem zewnątrzkomórkowej anhidrazy węglanowej (rys. 2A). Natomiast sinice rosnące przy wysokich stężeniach DIC transportują tylko CO₂ i jak się wydaje, nie mają zupełnie zdolności przeprowadzania aktywnego transportu HCO₃⁻ [3,7,8,27].

W glonach rosnących w warunkach niskiego stężenia CO₂ zdolność do akumulacji DIC w komórkach jest uwarunkowana funkcjonowaniem mechanizmu transportu CO₂ i/lub HCO₃⁻ [4,40,45]. Elementem tego mechanizmu jest niewątpliwie zewnątrzkomórkowa (peryplazmatyczna) anhidraza węglanowa. Stwierdzano bowiem ścisłą korelację między jej aktywnością a szybkością fotosyntezy [46]. Mechanizm CCM i jego lokalizacja jest lepiej poznany u gatunków z rodzajów *Chlamydomonas*

i *Chlorella*. U *Chlamydomonas reinhardtii* preferowaną w transporcie formą DIC jest CO_2 [45]. Gromadzenie CO_2 przebiega tylko w komórkach napromienionych i jest hamowane przez inhibitory świetlnej fazy fotosyntezy [7]. Natomiast gatunki *Chlorella* rosnące w atmosferycznym stężeniu CO_2 , podobnie jak wiele innych jednokomórkowych glonów, są zdolne do transportu obu form DIC [10,36,37]. Ostatnio w komórkach *Chlamydomonas reinhardtii* i *Dunaliella tertiolecta* zlokalizowano mechanizmy transportu zarówno CO_2 , jak i HCO_3^- w otoczce chloroplastów oraz specyficzne w stosunku do HCO_3^- w plazmolemie [1].

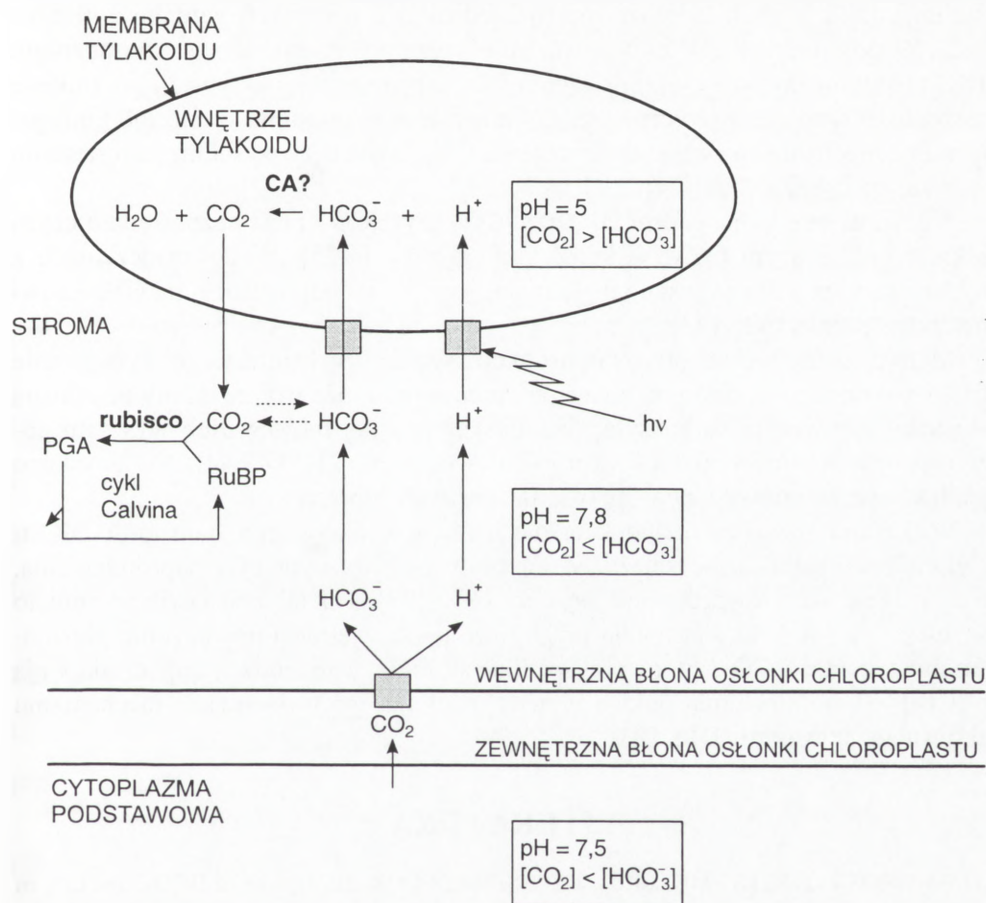
Mechanizm procesów pobierania, transportu i zwiększania stężenia CO_2 w komórkach glonów nie jest wystarczająco wyjaśniony. Wiadomo jednak, że oprócz wspomnianej peryplazmatycznej CA występują izoenzymy CA w cytoplazmie i



RYSUNEK 2. Udział anhidrazy węglanowej w przemianach węgla nieorganicznego sinic (A) i mikroglonów (B) (wg [6], zmodyfikowany): pogrubionymi strzałkami zaznaczono reakcje dostarczające substrat do reakcji karboksylacji

chloroplastach, które mogą uczestniczyć w tych procesach. Na rysunku 2B przedstawiono ich hipotetyczne funkcje [6,8].

Mechanizm CCM może być bezpośrednio związany z uruchamianym przez energię pochłanianego światła fotosyntetycznym przepływem elektronów w błonach tylakoidów, sprzężonym z gromadzeniem się H^+ we wnętrzu tylakoidów. Wytwarzany gradient protonów warunkuje fotosyntetyczną produkcję ATP [28]. Wysłunięto hipotezę, że HCO_3^- może być przenoszony do wnętrza tylakoidów równoległe z aktywnie transportowanym H^+ (rys. 3). Tam w środowisku o niskim pH jest on przekształcany w CO_2 , który dyfundując do stromy jest wiązany przez rubisco. Brana też jest pod uwagę możliwość, że w przekształcaniu obu form DIC we wnętrzu tylakoidów uczestniczy anhydraza węglanowa [31,32,34].



RYSUNEK 3. Schemat transportu HCO_3^- w kotransporcie z H^+ do wnętrza tylakoidów (wg [34], zmodyfikowane): w ramach podano wartości pH cytoplazmy podstawowej, stromy chloroplastu i wnętrza tylakoidu oraz odpowiadające im stosunki stężeń składników DIC

INDUKCJA MECHANIZMÓW TRANSPORTU I ZATĘŻANIA CO₂

Rozpowszechniony jest pogląd, że podstawowym warunkiem wytworzenia aktywnych mechanizmów zwiększania stężenia CO₂ w komórkach glonów i większości gatunków sinic jest niskie stężenie wszystkich form DIC w ich środowisku, niższe od występującego w wodzie znajdującej się w równowadze gazowej z powietrzem. Mimo iż u niektórych gatunków badanych sinic zależność taka nie występuje wyraźnie, to jednak mechanizmy zwiększania stężenia CO₂ indukowane u nich przez niskie stężenia DIC mają zwykle większą sprawność i odmienne właściwości od funkcjonujących przy dużych stężeniach DIC [7].

Zależność komórkowych mechanizmów transportu nieorganicznego węgla od stężenia DIC w podłożu może nie być jednakowa u różnych gatunków glonów [22]. W doświadczeniach z *Chlorella ellipsoidea* wykazano, że system transportu DIC zredukowany w wysokim stężeniu CO₂ ulega szybkiej aktywacji po zmianie stężenia CO₂ na atmosferyczne. Zaś u *Chlorella saccharophila* wykazano funkcjonowanie mechanizmu zwiększania stężenia CO₂ nawet przy wysokim jego stężeniu w fazie gazowej kultur [24].

Nie wiadomo, która z form DIC, tzn. CO₂ czy HCO₃⁻, jest bezpośrednio czynnikiem indukującym CCM w komórkach glonów [2,25]. W doświadczeniach z *Chlorella ellipsoidea* uzyskano dane sugerujące, że są odpowiedzią na niskie zewnętrzne stężenie CO₂ [23].

Mało poznany jest też proces transdukcji sygnału uruchamiającego wytwarzanie CCM w komórce. Brano pod uwagę, że proces ten może być związany ze zmianą stosunku aktywności karboksylacyjnej/oksygenacyjnej rubisco i/lub wysokim poziomem metabolitów szlaku kwasu glikolowego [20, 21,33,42,44]. Nie uzyskano jednak jeszcze wiarygodnego potwierdzenia tych hipotez.

Wykazano również, że indukcja mechanizmów aktywnego transportu DIC u *Chlorella ellipsoidea* nie zależy od intensywności fotosyntezy i napromienienia, lecz jedynie od zewnętrznego stężenia CO₂ [23]. Na tej podstawie wysunięto sugestię, że komórki tego glonu mogą mieć na zewnętrznej powierzchni plazmolemy receptory CO₂, które przy niskim stężeniu tego bodźca zapoczątkowują wewnątrzkomórkową transdukcję sygnału indukującego wytwarzanie mechanizmu aktywnego transportu DIC [23].

LITERATURA

- [1] AMOROSO G, SÜLTEMEYER D, THYSSEN C, FOCK HP. Uptake of HCO₃⁻ and CO₂ in cells and chloroplasts from the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Dunaliella tertiolecta*. *Plant Physiol* 1998; **116**: 193–201.

- [2] BADGER MR. The CO₂-concentrating mechanism in aquatic phototrophs. [w] Hatch MD, Boardman NK [red.] The Biochemistry of Plants, Vol 10. New York: Academic Press 1987: 219–274.
- [3] BADGER MR, GALLAGHER A. Adaptation of photosynthetic CO₂ and HCO₃⁻ accumulation by the cyanobacterium *Synechococcus* PCC6301 to growth at different inorganic carbon concentrations. *Aust J Plant Physiol* 1987; **14**: 189–201.
- [4] BADGER MR, KAPLAN A, BERRY J. Internal inorganic carbon pool of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 1980; **66**: 407–413.
- [5] BADGER MR, PRICE DG. The CO₂ concentrating mechanism in cyanobacteria and microalgae. *Physiol Plant* 1992; **84**: 605–615.
- [6] BADGER MR, PRICE DG. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1994; **45**: 369–392.
- [7] CANVIN DT. Photorespiration and CO₂-concentrating mechanisms. [w] Dennis D, Turpin D [red.] Plant Physiology Biochemistry and Molecular Biology. London: Longman Scientific and Technical 1990: 253–273.
- [8] COLEMAN JR. The molecular and biochemical analyses of CO₂-concentrating mechanisms in cyanobacteria and microalgae. *Plant Cell Environ* 1991; **14**: 861–867.
- [9] COWAN 1986. Economics of carbon fixation in higher plants. [w] Givinish TJ [red.] On the Economy of Plant Form and Functions. London: Cambridge University Press 1986: 130–170.
- [10] GEHL KA, COLMAN B, SPOSATO LM. Mechanism of inorganic carbon uptake in *Chlorella saccharophila*: lack of involvement of carbonic anhydrase. *J Exp Bot* 1990; **41**: 1–7.
- [11] DRAKE BG, GONZALEZ-MELER MA, LONG SP. More efficient plants: A consequence of rising atmospheric CO₂? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1997; **48**: 609–639.
- [12] GIFFORD RM. The global carbon cycle: A viewpoint on the missing sink. *Aust J Plant Physiol* 1994; **21**: 1–15.
- [13] HALL DO, RAO KK. Carbon dioxide fixation: the C₃ and C₄ pathways. [w] Photosynthesis. London: Cambridge University Press 1992: 99–125.
- [14] KEARNS EV, ASSMANN SM. The guard cell - environment connection. *Plant Physiol* 1993; **102**: 711–715.
- [15] LAMPERT W, SOMMER U. Ekologia wód śródlądowych. Warszawa: PWN 1996.
- [16] LARCHER W. Carbon utilization and dry matter production. [w] Physiological Plant Ecology. Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg 1995: 57–166.
- [17] LAWLOR DW. Carbon dioxide supply for photosynthesis. [w] Photosynthesis: metabolism, control and physiology. London: Longman Scientific and Technical 1990: 202–216.
- [18] LUCAS WJ. Photosynthetic assimilation of exogenous HCO₃⁻ by aquatic plants. *Ann Rev Plant Physiol* 1983; **34**: 71–104.
- [19] MALESZEWSKI S, KOZŁOWSKA-SZERENOS B. Karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5 bisfosforanu – kluczowy enzym fotosyntezy i fotooddychania – ostatnia dekada badań. *Post Biol Kom* 1997; **24**: 387–398.
- [20] MARCUS Y, HAREL E, KAPLAN A. Adaptation of the cyanobacterium *Anabena variabilis* to low CO₂ - concentration in their environment. *Plant Physiol* 1983; **71**: 208–210.
- [21] MAREK LF, SPALDING MH. Changes in photorespiratory enzyme activity in response to limiting CO₂ in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 1991; **97**: 420–425.
- [22] MATSUDA Y, COLMAN B. Induction of CO₂ an bicarbonate transport in the green alga *Chlorella ellipsoidea*. I. Time course of induction of the two systems. *Plant Physiol* 1995a; **108**: 253–260.
- [23] MATSUDA Y, COLMAN B. Induction of CO₂ an bicarbonate transport in the green alga *Chlorella ellipsoidea*. II. Evidence for induction in response to external CO₂ concentration. *Plant Physiol* 1995b; **108**: 253–260.
- [24] MATSUDA Y, COLMAN B. Active uptake of inorganic carbon by *Chlorella saccharophila* is not repressed by growth in high CO₂. *J Exp Bot* 1996; **47**: 1951–1956.

- [25] MAYO WP, WILLIAMS TG, BIRCH DG, TURPIN DH. Photosynthetic adaptation by *Synechococcus leopoliensis* in response to exogenous dissolved inorganic carbon. *Plant Physiol* 1986; **80**: 1038–1040.
- [26] MERCADO JM, NIELL FX, FIGUEROA FL. Regulation of the mechanism for HCO_3^- use by the inorganic carbon level in *Porphyra leucosticta* Thur. In Le Jolis (*Rhodophyta*). *Planta* 1997; **201**: 319–325.
- [27] MILLER AG, CANVIN DT. Na^+ -stimulation of photosynthesis in the cyanobacterium *Synechococcus* UTEX 625 grown on high levels of inorganic carbon. *Plant Physiol* 1987; **84**: 118–124.
- [28] MITCHELL P. Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation. Bodmin, Cornwall: Glynn Research Ltd 1966.
- [29] MOHR H, SCHOPFER P. C_4 plants and CAM plants. [w] *Plant Physiology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 1995: 245–258.
- [30] MOTT KA. Do stomata respond to CO_2 concentrations other than intercellular? *Plant Physiol* 1988; **86**: 200–203.
- [31] PRONINA NA, BORODIN VV. CO_2 stress and CO_2 concentration mechanism: investigation by means of photosystem-deficient and carbonic anhydrase-deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthetica* 1993; **28**: 515–522.
- [32] PRONINA NA, SEMENENKO VE. Role of the pyrenoid in concentration, generation and fixation of CO_2 in the chloroplast of microalgae. *Soviet Plant Physiol* 1992; **39**: 470–476.
- [33] RAMAZANOV Z, CARDENAS J. Involvement of photorespiration and glycolate pathway in carbonic anhydrase induction and inorganic carbon concentration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 1992; **84**: 502–508.
- [34] RAVEN JA. CO_2 -concentrating mechanisms: a direct role for thylakoid lumen acidification? *Plant Cell Env* 1997; **20**: 147–154.
- [35] RAVEN JA, LUCAS WJ. The energetics of carbon acquisition. [w] Lucas WJ, Berry JA [red.] *Inorganic carbon uptake by aquatic photosynthetic organisms*. Rockwell, Maryland: American Society of Plant Physiologists 1985: 305–324.
- [36] ROTATORE C, COLMAN B. The active uptake of carbon dioxide by the unicellular green algae *Chlorella saccharophila* and *Chlorella ellipsoidea*. *Plant Cell Env* 1991a; **14**: 371–375.
- [37] ROTATORE C, COLMAN B. The acquisition and accumulation of inorganic carbon by the unicellular green alga *Chlorella ellipsoidea*. *Plant Cell Env* 1991b; **14**: 377–382.
- [38] ROTATORE C, LEW RR, COLMAN B. Active uptake of CO_2 during photosynthesis in the green alga *Eremosphaera viridis* is mediated by a CO_2 -ATPase. *Planta* 1992; **188**: 539–545.
- [39] ŠESTAK Z, ČATSKÝ J, JARVIS PG. *Plant photosynthetic production, manual of methods*. Dr Junk NV [red.] Publishers, The Hague 1971.
- [40] SHELPEL BJ, CANVIN DT. Utilization of exogenous inorganic carbon species in photosynthesis by *Chlorella pyrenoidosa*. *Plant Physiol* 1980; **65**: 774–779.
- [41] SMITH RG, BIDWELL RGS. Inorganic carbon uptake by photosynthetically active protoplast of the red macroalga *Chondrus crispus*. *Mar Biol* 1989; **102**: 1–4.
- [42] SPALDING MH, OGREN W. Photosynthesis is required for induction of the CO_2 -concentrating system in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett* 1982; **145**: 41–44.
- [43] STREBEYKO P. *Woda i światło w życiu roślin*. Warszawa: PWN 1956.
- [44] SUZUKI K, MAREK LF, SPALDING MH. A photorespiratory mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 1990; **93**: 231–237.
- [45] SULTEMEYER DF, MILLER AG, ESPIE GS, FOCK HP, CANVIN DT. Active CO_2 transport by the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 1989; **89**: 1213–1219.
- [46] WILLIAMS TG, COLMAN B. The effect of pH and dissolved inorganic carbon on external carbonic anhydrase activity in *Chlorella saccharophila*. *Plant Cell Env* 1996; **19**: 485–489.
- [47] VILLAREJO A, ORÚS MI, MARTINEZ F. Regulation of the CO_2 -concentrating mechanism in *Chlorella vulgaris* UAM 101 by glucose. *Physiol Plant* 1997; **99**: 293–301.

- [48] TOLBERT NE. The C₂ oxidative photosynthetic carbon cycle. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1997; **48**: 1–25.
- [49] ZEIGER E. The biology of stomatal guard cells. *Annu Rev Plant Physiol* 1983; **34**: 441–475.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 20.02.1998 r.

Przyjęto: 29.04.1998 r.

Adres autora: ul. Świerkowa 20b, 15-950 Białystok

SPECYFICZNE BIAŁKA CHROMOPLASTOWE

CHROMOPLAST-SPECIFIC PROTEINS

Grzegorz JACKOWSKI

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

Streszczenie: Chromoplasty są kategorią plastydów wyspecjalizowanych w syntezie i gromadzeniu karotenoidów. Występują przede wszystkim w barwnych płatkach korony kwiatów i miąższu owoców, a powstają tam drogą przekształcenia chloroplastów, obejmującego destrukcję systemu tylakoidowego i pojawienie się w jego miejsce różnego rodzaju struktur akumulujących karotenoidy (fibrylle, kryształy i inne). Część białek chloroplastowych nie ulega w toku konwersji chloroplast/chromoplast rozpadowi i jest odnajdywana w dojrzałych chromoplastach (np. enzymy syntezy kwasów tłuszczowych), część zaś białek chromoplastowych stanowią frakcje specyficzne dla tej grupy organelli. Do tej kategorii białek chromoplastowych zalicza się, między innymi, jeden z enzymów operujących w szlaku syntezy specyficznie chromoplastowych ketoksantofili, a także białka wiążące karotenoidy lub peryferycznie związane ze strukturami akumulującymi karotenoidy oraz pojedyncze białko stresowe. Funkcje kilku specyficznie chromoplastowych białek pozostają nieznanne.

Słowa kluczowe: chromoplast, karotenoidy, synteza, akumulacja, gen, białko, fibrylle.

Summary: Chromoplasts is a distinct type of plastids specialised in accumulating various carotenoids. They are found mainly in coloured flower corolla petals or fruits and originate there by conversion of fully developed chloroplasts of green petals and green fruits. The chloroplast/chromoplast transition involves the decomposition of the system of thylakoids and the development of carotenoid-bearing structures (fibrils, crystals etc.). Some proteins present in chloroplasts are not degraded during the course of chloroplast/chromoplast transition and are detectable in mature chromoplasts (e.g. the enzymes of fatty acid synthesis pathway) while other proteins are confined virtually to chromoplasts (chromoplast-specific ones). This category of chromoplast proteins comprises: xanthophyll biosynthesis enzyme capsanthin/capsorubin synthase, a group of proteins that bind carotenoids or are peripherally bound to carotenoid-bearing structures and a single stress protein. The functions of a few chromoplast-specific proteins remain unknown.

Key words: chromoplast, carotenoids, synthesis, accumulation, gene, protein, fibrils.

WSTĘP

Jedną z najbardziej charakterystycznych cech komórki roślinnej jest obecność w niej plastydów, rodziny organelli powstających w toku ontogenezy rośliny drogą różnicowania się form prekursorowych – proplastydów, występujących w tkankach merystematycznych. Różnicowanie się proplastydów przebiega w sposób tkankowo-specyficzny i prowadzi do powstania form dojrzałych, spośród których tylko chloroplasty zawierają chlorofil i są zdolne do przeprowadzania procesów fotosyntetycznych, pozostałe zaś – amyloplasty, leukoplasty i chromoplasty – są wyspecjalizowane w pełnieniu innych, nie zawsze zrozumiałych funkcji metabolicznych. Specjalizacja metaboliczna chromoplastów polega na syntezie i akumulacji znacznej ilości karotenoidów i ich acylowych pochodnych. Chromoplasty występują najczęściej (choć nie wyłącznie) w płatkach korony kwiatowej i miąższu owoców. Powstają tam jednak nie drogą różnicowania proplastydów, lecz przez odróżnicowanie chloroplastów obecnych w niedojrzałych (zielonych) płatkach lub owocach. Zakumulowane w chromoplastach karotenoidy nadają dojrzałym płatkom i owocom, przy współudziale antocyjanów zawartych w wodniczce, żywe kolory – różne odcienie żółtego, pomarańczowego i czerwonego [24]. Nadawanie płatkom i owocom wizualnej atrakcyjności, zachęcającej zwierzęta zapylające i rozprzestrzeniające nasiona znajdujące się wewnątrz barwnych owoców, wydaje się jedyną funkcją chromoplastów występujących w tych organach. Nieznana natomiast pozostaje funkcja chromoplastów (i zdeponowanych w nich karotenoidów) spotykanych w komórkach korzeni niektórych gatunków (np. marchwi) oraz w komórkach mięsiszowych żółtych sektorów pstrych liści. W toku konwersji chloroplast/chromoplast dochodzi do zasadniczej przebudowy ultrastruktury plastydu, obejmującej całkowitą destrukcję systemu tylakoidowego oraz biogenezę struktur akumulujących karotenoidy. Mimo to w dojrzałych chromoplastach stwierdza się obecność szeregu aktywności enzymatycznych znajdujących także w chloroplastach, np. obydwa typy organelli zawierają komplet enzymów katalizujących syntezę kwasów tłuszczowych [14], a także związanych z metabolizmem DNA i RNA organelowego [22]. Niektóre spośród białek, obecnych także w chloroplastach, są akumulowane w chromoplastach w większej ilości – taką sytuację opisano w przypadku dysmutazy ponadtlenkowej, syntazy cysteinowej i kilku innych aktywności enzymatycznych prawdopodobnie związanych z detoksykacją agresywnych metabolicznie form tlenu gromadzących się w chromoplastach podczas dojrzenia owoców klimakterycznych [19]. Pewna liczba białek pojawiających się w toku biogenezy chromoplastów ma jednak charakter chromoplastowo-specyficzny. Są to białka związane głównie, choć nie wyłącznie, z syntezą i wiązaniem karotenoidów. W ciągu ostatnich kilku lat obserwuje się bardzo gwałtowny przyrost wiedzy na temat ich struktury, wewnątrzchromoplastowej kompartmentacji i regulacji ekspresji. Przedmiotem niniejszego opracowania

wania jest przegląd tych dokonań. Literatura polskojęzyczna jest pozbawiona jakichkolwiek publikacji przeglądowych dotyczących chromoplastów, w szczególności ich białek.

BIAŁKA ZWIĄZANE Z SYNTEZĄ KAROTENOIDÓW

Chromoplasty zawierają komplet enzymów związanych z syntezą podstawowych frakcji karotenów i ksantofili [17]; enzymy te, syntetyzowane także w chloroplastach, są kodowane przez genom jądrowy [1]. Od niedawna wiadomo natomiast, że w chromoplastach owoców papryki (*Capsicum annuum*) występują dwa dodatkowe ksantofile – kapsorubina i kapsantyna – niespotykane w chloroplastach żadnego ze zbadanych gatunków roślinnych. Kapsantyna powstaje przez przekształcenie zawierającego grupę epoksydową pierścienia β -jononowego anteraksantyny w pierścień κ -jononowy z ugrupowaniem ketonowym. Również kapsorubina jest ketoksantofilem, a jej powstawanie polega na przekształceniu obydwu pierścieni epoksy- β -jononowych wiolaksantyny w strukturę typu κ z grupą ketonową [12]. Syntezę kapsantyny i kapsorubiny katalizuje ten sam enzym, syntaza kapsantynowa/kapsorubinowa (CCS) będący białkiem specyficznym chromoplastowym [10]. Dzięki badaniom grupy Kuntza w ciągu ostatnich kilku lat szczegółowo scharakteryzowano CCS, a także sklonowano jądrowy gen kodujący to białko. Odcinek kodujący CCS ma długość, której odpowiada sekwencja 498 aminokwasów, o masie cząsteczkowej 57 kDa [2]. Jednak dojrzała forma CCS okazuje się mieć masę cząsteczkową tylko 50 kDa. Różnica między masą wydedukowaną na podstawie analizy sekwencji kodującej a masą rzeczywistą wynika z faktu, iż CCS jest syntetyzowana na rybosomach cytoplazmatycznych jako forma prekursorowa dłuższa od dojrzałej postaci o 56-aminokwasowy peptyd tranzytowy, odtrawiany po translokacji prekursora przez otoczkę do wnętrza chromoplastu [2]. Porównanie struktury pierwszorzędowej CCS z dostępnymi w bazach danych strukturami wielu innych białek pozwoliło na ujawnienie obecności 17-aminokwasowego motywu zlokalizowanego w pobliżu N-końca CCS przypominającego miejsce wiążące nukleotydy (FAD, NAD), znajdujące także w innych enzymach związanych z syntezą karotenoidów, tzn. desaturazie fitoenuwej i cyklazie likopenowej [2,4,5,11]. Struktura CCS zawiera ponadto kilka krótszych motywów sekwencyjnych obecnych także w strukturze cyklazy likopenowej, jednak funkcja tych motywów pozostaje nieznana. Pokrewieństwo omawianych enzymów potwierdza obserwacja, iż białkowy produkt genu CCS poddawanego ekspresji w komórkach *Escherichia coli* wykazuje aktywność cyklazy likopenowej [12]. CCS jest *in vivo* związana z frakcją tzw. wewnątrznych błon chromoplastowych, jedną z dwóch subpopulacji wewnątrzchromoplastowych struktur akumulujących karotenoidy w owocach papryki. Drugą

subpopulację stanowią fibrylle [21], które można oddzielić od wewnętrznych błon chromoplastowych przez ultrawierowanie w gradiencie sacharozowym [2]. Właśnie fibrylle są miejscem akumulacji kapsantyny i kapsorubiny, co oznacza, że do miejsca akumulacji ketoksantofile muszą być transportowane z miejsca syntezy (wewnętrzne błony chromoplastowe). Transport tego rodzaju mógłby być ułatwiony przez istnienie stref fizycznego kontaktu wewnętrznych błon i fibrylli. Nie jest wykluczone, że takie strefy istnieją, a czynnikiem bezpośrednio zaangażowanym w oddziaływanie: wewnętrzne błony – fibrylle mogłaby być sama CCS. Wskazuje na to obserwacja, iż struktura pierwszorzędowa CCS obejmuje domenę EEKCVIT, bardzo podobną do sekwencji EEKVVVTK, o której sądzi się, że jest pośrednikiem w różnych oddziaływaniach wewnątrzkomórkowych [2, 23].

CCS jest akumulowana preferencyjnie w chromoplastach dojrzewających owoców papryki, a osiągnięty wówczas poziom białka utrzymuje się aż do stadium pełnej dojrzałości owocu. Podobną dynamikę akumulacji obserwuje się w odniesieniu do mRNA CCS, a to oznacza, że regulacja ekspresji CCS odbywa się głównie na poziomie transkrypcyjnym [2].

BIAŁKA WIĄŻĄCE KAROTENOIDY

Część karotenoidów może być zdeponowana w chromoplastach w formie kompleksów karotenoidowo-białkowych. Kompleksy te stanowią główny składnik biochemiczny niektórych typów chromoplastowych struktur akumulujących karotenoidy. Taką sytuację stwierdzono w odniesieniu do chromoplastów owoców papryki oraz płatków korony kwiatu ogórka (*Cucumis sativus*). Fibrylle chromoplastów papryki zawierają duże ilości specyficznego dla tej kategorii plastydów białka o masie cząsteczkowej 58 kDa, nazwanego CHRA [9]. Białko to można izolować z fibrylli w formie kompleksu karotenoidowo-białkowego, co bardzo poważnie sugeruje, że *in vivo* CHRA pełni rolę białka wiążącego karotenoidy [3]. Dodatkowym, choć pośrednim potwierdzeniem roli CHRA jako czynnika wiążącego karotenoidy są obserwacje, iż białko to pojawia się w toku rozwoju owocu papryki dopiero wówczas, gdy akumulują się karotenoidy, to znaczy na późnych etapach dojrzewania [20].

Znacznie więcej wiadomo na temat innego białka wiążącego karotenoidy, nazwanego CHRC, a stanowiącego składnik fibrylli chromoplastów płatków korony kwiatu ogórka. Bezpośrednim dowodem potwierdzającym tezę, iż CHRC wiąże karotenoidy jest, podobnie jak w przypadku CHRA, fakt, że CHRC można oczyszczać w warunkach łagodnie denaturującej elektroforezy jako kompleks karotenoidowo-białkowy [24]. Odcinek kodujący genu *CHRC* ma długość odpowiadającą sekwencji 322 aminokwasów (41 kDa), a dojrzałe białko (35 kDa) powstaje przez odcięcie

od 322-aminokwasowej formy prekursorowej N-terminalnego peptydu tranzytowego [27]. Analiza sekwencji aminokwasowej dojrzałej formy CHRC pozwoliła na stwierdzenie dwóch interesujących cech tego białka – łańcuch polipeptydowy nie zawiera ani jednej reszty cysteiny, a w sześciu miejscach struktury występują tandemowe ugrupowania DE, ED lub EEE. Aminokwasy 147-164 CHRC najprawdopodobniej formują transmembranową α -helisę [27]. Poziom CHRC oraz jego mRNA wzrasta wraz z postęпами procesu rozwoju kwiatu aż do antezy, po której następuje gwałtowny spadek zawartości zarówno omawianego białka, jak i kodującego go mRNA [26]. Dokładnie taka sama jest kinetyka akumulacji karotenoidów w płatkach korony. Podobny co do kinetyki wzrost poziomu karotenoidów i CHRC można także osiągnąć umieszczając kwiaty w ciemności. Dzięki opanowaniu przez zespół Vainsteina umiejętności hodowli zawiązków kwiatów ogórka *in vitro* [24] ustalono, że poziom CHRC pozostaje pod kontrolą hormonalną. Wprowadzenie do pożywki kwasu gibberelinowego (GA_3) powodowało bardzo szybki, nie poprzedzony fazą zwłoki wzrost zawartości CHRC, a efekt ten był wydajnie odwracany przez kwas abscysynowy (ABA) [26]. Co ciekawe, GA_3 powodował także wzrost zawartości karotenoidów w płatkach hodowanych *in vitro* kwiatów, jednak efekt ten następował ze znacznym opóźnieniem w stosunku do stymulacji poziomu CHRC. Oznacza to wbrew temu, co można by sądzić opierając się na równoległości ciemnościowego przyspieszenia akumulacji karotenoidów i CHRC, iż obecność karotenoidów nie jest warunkiem niezbędnym dla akumulacji CHRC, tzn. karotenoidy nie stabilizują CHRC. Można natomiast z dużym prawdopodobieństwem przypuszczać, że CHRC stabilizuje barwniki.

Ostatnio w pracowni Vainsteina opisano białko chromoplastów kwiatów ogórka nazwane CHR D, o właściwościach bardzo zbliżonych do właściwości CHRC, np. w toku rozwoju kwiatu regulacja ekspresji obu białek przez czynniki środowiskowe (światło/ciemność) i hormonalne (GA_3 , ABA) jest identyczna [25]. CHRC i CHR D mają natomiast odmienne masy cząsteczkowe (CHR D – 14 kDa), a poziom CHR D w chromoplastach płatków kwiatu ogórka jest wielokrotnie niższy niż CHRC. Odkrywczy CHR D nie mają całkowitej pewności, czy białko to, podobnie jak CHRC, wiąże karotenoidy. Mimo iż można je izolować z tego samego kompleksu karotenoidowo-białkowego, z którego izoluje się CHRC, to nie sposób wykluczyć możliwości, że kompleks ten zawiera tylko CHRC, a bezbarwny CHR D migruje razem z tym kompleksem w trakcie łagodnie denaturującej elektroforezy [25]. Innym przykładem białka chromoplastowego, co do którego nie ma całkowitej pewności, czy wiąże karotenoidy, jest bardzo dokładnie opisana przez zespół Kuntza fibrylina z fibrylli chromoplastów owoców papryki [6]. Odcinek kodujący genu fibryliny zawiera informację o formie prekursorowej białka (35,2 kDa) dłuższej od formy dojrzałej (32 kDa) o 60 aminokwasów stanowiących peptyd tranzytowy. Podobnie jak w przypadku CHRC również cząsteczka fibryliny nie zawiera ani jednej reszty cysteiny, a w sześciu miejscach struktury występują tandemowe grupy DE, ED

lub EEE. W cząsteczce fibryliny zidentyfikowano rejon o wysokim indeksie hydrofobowości, który *in vivo* prawdopodobnie reprezentuje transmembranową α -helisę. Rejon ten obejmuje dokładnie ten sam odcinek struktury pierwszorzędowej białka co domniemana transmembranowa α -helisa CHRC, tzn. aminokwasy 147-164. Stopień pokrewieństwa struktury CHRC i fibryliny wynosi 59% na poziomie DNA i 74% na poziomie dojrzałego białka [27]. Podobieństwo na poziomie DNA jest niższe, dlatego że CHRC i fibrylina mają odmiennie zbudowane peptydy tranzytowe (48% podobieństwa). Przypuszcza się, że CHRC i fibrylina są reprezentantami szerszej grupy białek stanowiących element organizacji strukturalnej fibrylli. Reprezentantem tej samej grupy białek jest zapewne frakcja 32 kDa z fibrylli płatków korony kwiatu nasturcji [7], mająca z fibryliną wspólne determinanty antygenowe [6] oraz opisane niedawno z fibrylli płatków *Thunbergia alata* białko o tej samej masie cząsteczkowej [18]. Białka tej rodziny nie występują natomiast w chromoplastach należących do innych (niż fibryllarny) morfotypów, np. bezskuteczne okazały się poszukiwania analogu fibryliny i CHRC w chromoplastach pomidora, należących do morfotypu krystalicznego [6].

O ile funkcja CHRC jako czynnika wiążącego karotenoidy nie ulega wątpliwości, o tyle nie ma takiej pewności w odniesieniu do fibryliny. Sądzi się raczej, że cząsteczki tego białka budują odrębną (peryferyczną) strefę fibrylli, podczas gdy nie związane z białkami, czyste chemicznie karotenoidy miałyby stanowić strefę rdzeniową, oddzieloną od peryferycznej obszarami wypełnionymi galaktolipidami i fosfolipidami [6]. Struktury o właściwościach natywnych fibrylli można rekonstruować *in vitro* przez zmieszanie ze sobą, w odpowiednich proporcjach: fibryliny, karotenoidów i polarnych lipidów acylowych [6]. Zarówno mRNA, jak i fibrylina akumulują się najintensywniej w stadium pełnej dojrzałości owocu, a poziom białka pozostaje pod kontrolą hormonalną – ABA podwyższa ten poziom, zaś GA_3 i kwas indoliloctowy – obniżają [6].

BIAŁKA STRESOWE

Ostatnio w zespole Moore zidentyfikowano gen jądrowy kodujący unikalne białko preferencyjnie akumulujące się w chromoplastach owocu pomidora, w końcowej fazie jego dojrzewania (konwersja chloroplast/chromoplast) [15]. Doświadczenia wykonywano z wykorzystaniem bardzo pomysłowego systemu transkrypcyjno-translacyjnego sprzężonego z importem produktu białkowego do wnętrza plastydu. cDNA wyizolowany z miąższu dojrzewających owoców poddawano transkrypcji *in vitro*, a produkt transkrypcji programował z kolei translację *in vitro* w układzie bezkomórkowym. Uzyskane białka importowano *in vitro* do wnętrza chloroplastów, wykorzystanych w tym systemie „w zastępstwie” chromoplastów,

znacznie gorzej scharakteryzowanych jako składniki systemów importowych *in vitro*, ale mających bardzo podobny do chloroplastowego aparat importowy [19]. Intensywność ekspresji wspomnianego genu (oznaczonego jako *pTOM 111*) wzrastała wraz z postęпами procesu dojrzewania owocu osiągając poziom maksymalny w przypadku owoców w pełni dojrzałych, maksymalnie pigmentowanych, których komórki zawierają liczne chromoplasty należące do morfotypu krystalicznego. Produkt genu *pTOM 111* (24 kDa) jest bez wątpienia białkiem chromoplastowym. Na tym bowiem etapie dojrzewania owocu, na którym stwierdza się maksymalny poziom ekspresji genu, populacja chloroplastów ulega już przekształceniu w chromoplasty, a zdolność translokacji *in vitro* białka 24 kDa do wnętrza chloroplastu oznacza – w związku z daleko posuniętym podobieństwem aparatu importowego chloroplastów i chromoplastów – że jest to białko kierowane *in vivo* do wnętrza chromoplastów. Przeszukiwanie baz danych pozwoliło na stwierdzenie, że struktura pierwszorzędowa białka 24 kDa wykazuje 77% podobieństwa do niskocząsteczkowego białka szoku termicznego (hsp) z chloroplastów petunii. Co więcej, ekspresję genu *pTOM 111* można *in vivo* silnie stymulować szokiem termicznym [15]. Wyniki te bardzo poważnie sugerują, że białko 24 kDa jest niskocząsteczkowym hsp. Zważywszy, że białka tej kategorii mogą być w komórkach roślinnych indukowane przez inne, poza szokiem termicznym, sytuacje stresowe [28], można postawić interesujące pytanie: jakie warunki stresowe pojawiają się w toku konwersji chloroplast/chromoplast w komórkach owocu pomidora? Wydaje się prawdopodobne, że dochodzi wówczas do przejściowego stresu oksydacyjnego, a wskazywać na to może fakt, że w dojrzewających owocach pomidora wzrasta aktywność wspomnianej już wcześniej dysmutazy ponadtlenkowej [19], a także lipoksygenazy [8]. Inną sytuacją stymulującą ekspresję niskocząsteczkowego hsp może być pojawienie się dużych ilości fragmentów białek powstałych w wyniku destrukcji aparatu fotosyntetycznego, towarzyszącej konwersji chloroplast/chromoplast [13,16].

BIAŁKA O NIEZNANYCH FUNKCJACH

Na wczesnych etapach dojrzewania owoców papryki chromoplasty akumulują specyficzne białko nazwane CHRB (35 kDa), przypominające właściwościami CHRA, jednak nie wiążące karotenoidów [20]. Funkcja tego białka pozostaje nieznaną, podobnie jak funkcja produktu genu *pTOM41*, intensywnie ulegającego ekspresji w chromoplastach owoców pomidora równoległe z białkiem 24 kDa [15]. Sekwencja aminokwasowa tego białka nie przypomina żadnej innej dostępnej w bazach danych.

LITERATURA

- [1] BARTLEY GE, SCOLNICK PA. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell* 1996; **7**: 1027–1038.
- [2] BOUVIER F, HUGUENEY P, d'HARLINGUE A, KUNTZ M, CAMARA B. Xantophyll biosynthesis in chloroplasts: isolation and molecular cloning of an enzyme catalyzing the conversion of 5,6-epoxycarotenoid into ketocarotenoid. *Plant J* 1994; **6**: 45–54.
- [3] CERVANTES-CERVANTES M, HADJEB N, NEWMAN LA, PRICE CA. ChrA is a carotenoid-binding protein in chromoplasts of *Capsicum annuum*. *Plant Physiol* 1990; **192**: 1241–1243.
- [4] CUNNINGHAM JR, SUNZ FX, CHIAMOVITZ D, HIRSCHBERG J, GANTT E. Molecular structure and enzymatic function of lycopene cyclase from the cyanobacterium *Synechococcus* sp strain PCC 7942. *Plant Cell* 1994; **6**: 1107–1121.
- [5] DERUERE J, BOUVIER F, STEPPUHN J, KLEIN B, CAMARA B, KUNTZ M. Structure and expression of two plant genes encoding chromoplast-specific proteins: occurrence of partially spliced transcripts. *Biochem Biophys Res Commun* 1994a; **3**: 1144–1150.
- [6] DERUERE J, ROMER S, d'HARLINGUE A, BACKHAUSE RA, KUNTZ M, CAMARA B. Fibril assembly and carotenoid overaccumulation in chromoplasts: a model for supramolecular lipoprotein structures. *Plant Cell* 1994b; **6**: 119–133.
- [7] EMTER O, FALK H, SITTE P. Specific carotenoids and proteins as prerequisites for chromoplast tubule formation. *Protoplasma* 1990; **157**: 128–135.
- [8] FERRIE BJ, BEAUDOIN N, BURKART W, BOWSCHER CG, ROTHSTEIN SJ. The cloning of two tomato lipoxygenase genes and their differential expression during fruit ripening. *Plant Physiol* 1994; **106**: 109–118.
- [9] HADJEB N, GOUNARIS I, PRICE CA. Chromoplast-specific proteins in *Capsicum annuum*. *Plant Physiol* 1988; **88**: 42–45.
- [10] HOULNE G, SCHANTZ M-L, MEYER B, POZUETA-ROMERO J, SCHANTZ R. A chromoplast-specific protein in *Capsicum annuum*: characterization and expression of the corresponding gene. *Curr Genet* 1994; **26**: 524–527.
- [11] HUGUENEY P, ROMER S, KUNTZ M, CAMARA B. Characterization and molecular cloning of flavoprotein catalyzing the synthesis of phytofluene and z-carotene in *Capsicum* chromoplasts. *Eur J Biochem* 1992; **209**: 399–407.
- [12] HUGUENEY P, BADILLO A, CHEN H-C, KLEIN A, HIRSCHBERG J, CAMARA B, KUNTZ M. Metabolism of cyclic carotenoids: a model for the alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annuum* chromoplasts. *Plant J* 1995; **8**: 417–424.
- [13] JAKOB U, BUCHNER J. Assisting spontaneity: the role of Hsp90 and small Hsps as molecular chaperones. *Trends Biochem Sci* 1994; **19**: 205–211.
- [14] KLEINIG H, LIEDVOGEL L. Fatty acid synthesis by isolated chromoplasts from the daffodil. Energy sources and distribution pattern of the acids. *Planta* 1980; **150**: 166–169.
- [15] LAWRENCE SD, CLINE K, MOORE G. Chromoplast development in ripening tomato fruit: identification of cDNAs for chromoplast-targeted proteins and characterization of a cDNA encoding a plastid-localized low-molecular weight heat-shock protein. *Plant Mol Biol* 1997; **33**: 483–492.
- [16] LEE GJ, POKALA N, VIERLING E. Structures and *in vitro* molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. *J Biol Chem* 1995; **270**: 10432–10438.
- [17] LINDEN H, LUCAS M, de FELIPE MR, SNADMANN G. Immunogold localization of phytoene desaturase in higher plant chloroplasts. *Physiol Plant* 1993; **88**: 229–236.
- [18] LJUBESIC N, WRISCHER M, DEVIDE Z. Chromoplast structures in *Thunbergia* flowers. *Protoplasma* 1996; **193**: 174–180.

- [19] MARANO MR, SERRA EC, ORELLANO EG, CARILLO N. The path of chromoplast development in fruits and flowers. *Plant Sci* 1993; **94**: 1–1.
- [20] OREN-SHAMIR M, HADJEB N, NEUMANN LA, PRICE CA. Occurrence of the chromoplast protein ChrA correlates with a fruit-color gene in *Capsicum annuum*. *Plant Mol Biol* 1993; **21**: 549–554.
- [21] SALOPEK B, LJUBESIC N. The fine structure of pepper chromoplasts: the effect of bleaching herbicides. *Acta Bot Croat* 1994; **53**: 7–13.
- [22] SERRA EC, CARILLO N. DNA polymerase activity of tomato fruit chromoplasts. *FEBS Lett* 1990; **275**: 102–106.
- [23] SHAW G. A neurofilament-specific sequence motif. *Trends Biochem Sci* 1992; **17**: 345.
- [24] SMIRRA I, HALEVY AH, VAINSTEIN A. Isolation and characterization of a chromoplast-specific carotenoid-associated protein from *Cucumis sativus* corollas. *Plant Physiol* 1993; **102**: 491–496.
- [25] WEKSLER-LIBAL Y, VISHNEVETSKY M, OVADIS M, VAINSTEIN A. Isolation and regulation of accumulation of a minor chromoplast-specific protein from cucumber corollas. *Plant Physiol* 1993; **113**: 59–63.
- [26] VAINSTEIN A, HALEVY AH, SMIRRA I, VISHNEVETSKY M. Chromoplast biogenesis in *Cucumis sativus* corollas. *Plant Physiol* 1994; **104**: 321–326.
- [27] VISHNEVETSKY M, OVADIS M, ITZHAKI H, LEVY N, LIBAL-WEKSLER Y, ADAM Z, VAINSTEIN A. Molecular cloning of a carotenoid-associated protein from *Cucumis sativus* corollas: homologous genes involved in carotenoid sequestration in chromoplasts. *Plant J* 1996; **10**: 1111–1118.
- [28] ZUR-NIEDEN U, NEUMANN D, BUCKA A, NOVER L. Tissue-specific localization of heat-stress proteins during embryo development. *Planta* 1995; **196**: 530–538.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska.

Otrzymano: 18.02.1998 r.

Przyjęto: 07.05.1998 r.

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

REGULACJA DOJRZEWANIA MEJOTYCZNEGO OOCYTÓW ORAZ PIERWSZYCH CYKLÓW MITOTYCZNYCH W ZARODKACH MYSZY

CONTROL OF MEIOSIS IN OOCYTES AND FIRST MITOTIC DIVISIONS IN MOUSE EMBRYOS

Maria Anna CIEMERYCH

Zakład Embriologii, Instytut Zoologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

Streszczenie: Oocyty i zarodki kręgowców stanowią doskonały obiekt do badań nad aktywnością czynników kontrolujących cykl komórkowy. Umożliwiły także określenie roli wielu białek enzymatycznych odpowiedzialnych za prawidłowy przebieg kolejnych faz cyklu komórkowego, a także pozwoliły na określenie wpływu specyficznych czynników na zmiany w organizacji cytoszkieletu i chromatyny w trakcie podziałów komórki. Te właśnie doświadczenia, w których wykorzystano oocyty płazów, doprowadziły do odkrycia MPF – uniwersalnego czynnika odpowiedzialnego za zapoczątkowanie podziałów zarówno mejotycznych, jak i mitotycznych. W tym artykule przedstawiony został obecny stan wiedzy o regulacji dojrzwania mejotycznego oocytów oraz pierwszych cykli mitotycznych w zarodkach myszy.

Słowa kluczowe: mejoza, mitoza, oocyt, zarodki myszy, cykl komórkowy, MPF, CSF.

Summary: Investigations carried out on vertebrate oocytes and embryos enabled to determine the role of many enzymes regulating the cell cycle, and controlling changes of the cytoskeleton and chromatin during the cell division. These investigations led to the discovery of M-phase promoting factor (MPF), which is an universal factor responsible for the initiation of meiosis and mitosis. In this article I summarize the present knowledge of the control of meiotic maturation of oocytes and the first mitoses in mouse embryos.

Key words: meiosis, mitosis, oocyte, mouse embryo, cell cycle, MPF, CSF.

1. REGULACJA DOJRZEWANIA MEJOTYCZNEGO OOCYTU MYSZY

Podczas oogenezy oocyty myszy zostają zablokowane w profazie pierwszego podziału mejotycznego. W tym stadium przechodzą fazę wzrostu, podczas której

intensywnie syntetyzują różnego rodzaju RNA oraz białka [1,2]. Jedynie oocyty, które osiągnęły odpowiedni rozmiar (około 80 μm), są zdolne do wznowienia mejozy w odpowiedzi na stymulację hormonalną lub też na uwolnienie z jajnika i przeniesienie do hodowli *in vitro*. Momentem, w którym oocyt rozpoczyna dojrzewanie mejotyczne, jest rozpad pęcherzyka zarodkowego, czyli zanik jądra oocytu w wyniku depolimeryzacji lamin otoczki jądrowej i kondensacji chromatyny. Wrzeczono pierwszego podziału mejotycznego (metafaza I) zostaje uformowane po 4–5 godzinach, jednakże podział następuje dopiero po 8–9 godzinach od momentu rozpadu pęcherzyka zarodkowego. Podział ten jest nierównomierny, a w jego wyniku od dojrzewającego oocytu zostaje odcięta mniejsza komórka – pierwsze ciało kierunkowe. Bezpośrednio po ukończeniu pierwszego podziału mejotycznego dochodzi do utworzenia wrzeczona drugiego podziału (metafaza II) i wtedy dojrzewanie oocytu ponownie ulega zablokowaniu. W tym stadium oocyty myszy, podobnie jak większości ssaków, są owulowane, a następnie mogą być zapłodnione lub aktywowane partenogenetycznie. Zarówno wniknięcie plemnika, jak i zadziaływanie bodźcem partenogenetycznym powoduje dokończenie drugiego podziału mejotycznego i rozpoczęcie interfazy pierwszego cyklu komórkowego.

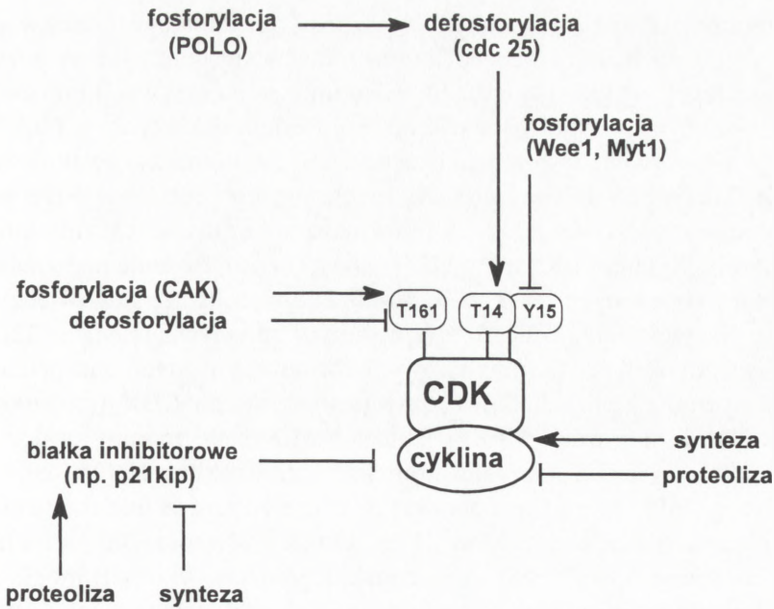
Badania, których wyniki umożliwiły poznanie mechanizmów regulujących mejozę, dotyczyły nie tylko dojrzewania oocytów myszy, *Xenopus*, i innych organizmów, lecz także regulacji podziałów mitotycznych.

1.1. MPF uniwersalny czynnik regulujący fazę M

Rozpoczęcie dojrzewania mejotycznego wywołane jest wzrostem aktywności czynnika określanego jako MPF (z ang. *M-phase Promoting Factor* lub *Maturation Promoting Factor*). MPF bierze udział w zapoczątkowaniu zarówno podziałów mejotycznych, jak i podziałów mitotycznych. Został on po raz pierwszy opisany jako czynnik obecny w cytoplazmie dojrzewających oocytów *Xenopus* [3]. MPF jest dimerem złożonym z podjednostki katalitycznej – kinazy białkowej o masie 34 kD, homologicznej z białkiem cdc2 wyizolowanym z drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, oraz z podjednostki regulacyjnej – cykliny B [4, 5]. Kinaza cdc2 należy do rodziny kinaz białkowych CDK (ang. *Cyclin Dependent Kinase*), które zaangażowane są w regulację takich procesów w cyklu komórkowym, jak synteza DNA czy też mitoza. Regulacja aktywności enzymów z grupy CDK odbywa się przez:

- i) przejściowe połączenie ze specyficznymi podjednostkami regulatorowymi – cyklinami;
- ii) oddziaływanie z inhibitorami białkowymi;
- iii) odwracalną fosforylację (rys. 1).

Poziom kinaz CDK nie ulega znaczącym wahaniom w trakcie cyklu komórkowego, natomiast precyzyjnie określony jest moment syntezy i degradacji podjednostek



RYSUNEK 1. Regulacja aktywności kinaz typu CDK (na przykładzie cdc2). Strzałki oznaczają oddziaływania aktywujące kompleks CDK-cyklina, natomiast oddziaływania hamujące oznaczone są liniami z prostym zakończeniem; Y – tyrozyna, T – treonina

regulatorowych – cyklin. Dzięki temu możliwe jest ograniczenie aktywności określonej kinazy CDK do specyficznego okresu w cyklu komórkowym [6].

Fosforylacja określonych białek katalizowana przez MPF odgrywa podstawową rolę podczas przejścia z fazy G2 do M. Istnieją przekonujące dowody, że fosforylacja histonu H1 oraz białek z grupy HMG, katalizowana przez kinazę cdc2, towarzyszy kondensacji chromatyny w jądrze [7, 8]. Pomiar aktywności kinazy histonu H1 stał się klasycznym testem w badaniu aktywacji MPF [9]. Kinaza ta bierze udział w fosforylacji lamin jądrowych i dezagregacji otoczki jądrowej [10], wpływa na dynamikę polimeryzacji i depolimeryzacji mikrotubul [11]. Również rozpad jąderek i represja transkrypcji związane są z fosforylacją nukleoliny i czynników transkrypcyjnych katalizowaną przez MPF [12, 13].

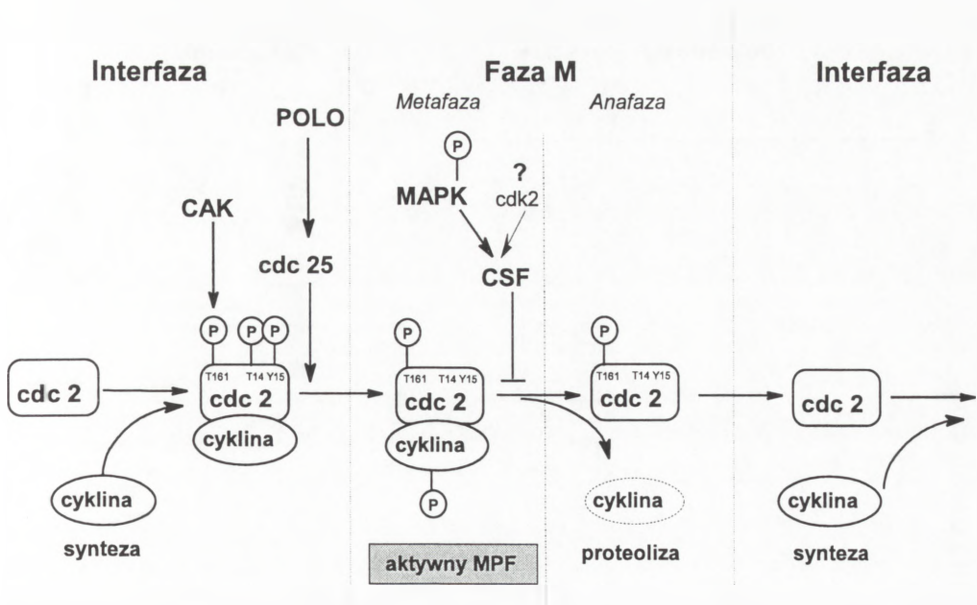
MPF utrzymywany jest w formie nieaktywnej dzięki aktywności kinaz białkowych Wee1 [14] i Myt1 [15], które fosforylują tyrozynę w pozycji 15 i treoninę w pozycji 14 (rys. 1). Aby zaszła aktywacja MPF, konieczne jest połączenie kinazy cdc2 z cyklina B oraz fosforylacja i defosforylacja specyficznych reszt aminokwasowych białka cdc2. Dodatkowo niezbędne jest usunięcie specyficznych inhibitorów białkowych, które odwracalnie łączą się z kompleksem cdc2-cyklina B [16] (rys. 1). Sugeruje się również, że kinaza cdk2-cyklina E zaangażowana jest w aktywację kompleksu cdc2-cyklina B, gdyż zablokowanie aktywności kinazy cdk2 uniemo-

żliwia rozpoczęcie mitozy [17]. Enzymem bezpośrednio biorącym udział w aktywacji cdc2 jest fosfataza białkowa cdc25, która defosforyluje tyrozinę w pozycji 15 i treoninę w pozycji 14 [18, 19] (rys. 1). Wiadomo, że po aktywacji kompleksu cdc2-cyklina B może fosforylować fosfatazę cdc25 powodując jej aktywację [20]. Sugeruje to istnienie pozytywnego sprzężenia zwrotnego, co tłumaczy gwałtowny wzrost aktywności MPF obserwowany po rozpoczęciu mitozy [21]. Obok MPF enzymem zaangażowanym w aktywację cdc25 jest kinaza zaliczana do rodziny kinaz określanych jako POLO lub PLK (ang. *POLO-Like Kinases*). Badania nad kinazą POLO w ekstraktach uzyskanych z oocytów *Xenopus* wykazały, że odpowiedzialna jest ona za aktywację fosfatazy cdc25, a tym samym za aktywację MPF [22]. Kinazy POLO biorą udział także w prawidłowym formowaniu wrzeciona podziałowego [23, 24]. Aktywność kinazy białkowej CAK (z angielskiego: *CDK Activating Kinase*) niezbędna jest do aktywacji MPF na skutek fosforylacji treoniny w pozycji 161. *In vitro* funkcję kinazy CAK pełni kompleks cdk7-cyklina H [25, 26].

Inaktywacja MPF zachodząca podczas przejścia metafaza/anafaza związana jest z proteolityczną degradacją cykliny B zachodzącą równocześnie z ruchem anafazowym chromosomów [27,28]. Aby jednak degradacja cykliny B mogła nastąpić, musi dojść do aktywacji wielobiałkowego kompleksu określanego jako „cyklosom” [29] lub kompleks inicjujący anafazę (APC z ang. *Anaphase Promoting Complex*) [30]. Składniki APC to białka i enzymy odpowiedzialne za połączenie białka, które ma ulec degradacji, z ubikwityną oraz proteasom, który jest odpowiedzialny za degradację ubikwitylizowanego białka [29, 31]. Aktywacja APC odbywa się podczas mitozy i prawdopodobnie, pośrednio lub też bezpośrednio, zaangażowany jest w nią MPF [32]. Być może rolę w aktywacji kompleksu odgrywa sygnał z prawidłowo uformowanego wrzeciona. Aktywny APC katalizuje ubikwitylizację białek, których degradacja konieczna jest do ukończenia podziału. Wydaje się, że zapoczątkowanie ruchu anafazowego wymaga degradacji białek zaangażowanych w połączenie chromatyd siostrzanych (jak na przykład białka wykryte w komórkach drożdży: Cut2 i Pds1 [33, 34]). APC odpowiedzialny jest również za degradację cykliny B [28]. Inaktywacja kompleksu APC zachodzi dopiero w fazie G1 i jest katalizowana przez kinazy CDK charakterystyczne dla tej fazy [30].

1.2. Rola MPF w regulacji dojrzewania mejotycznego

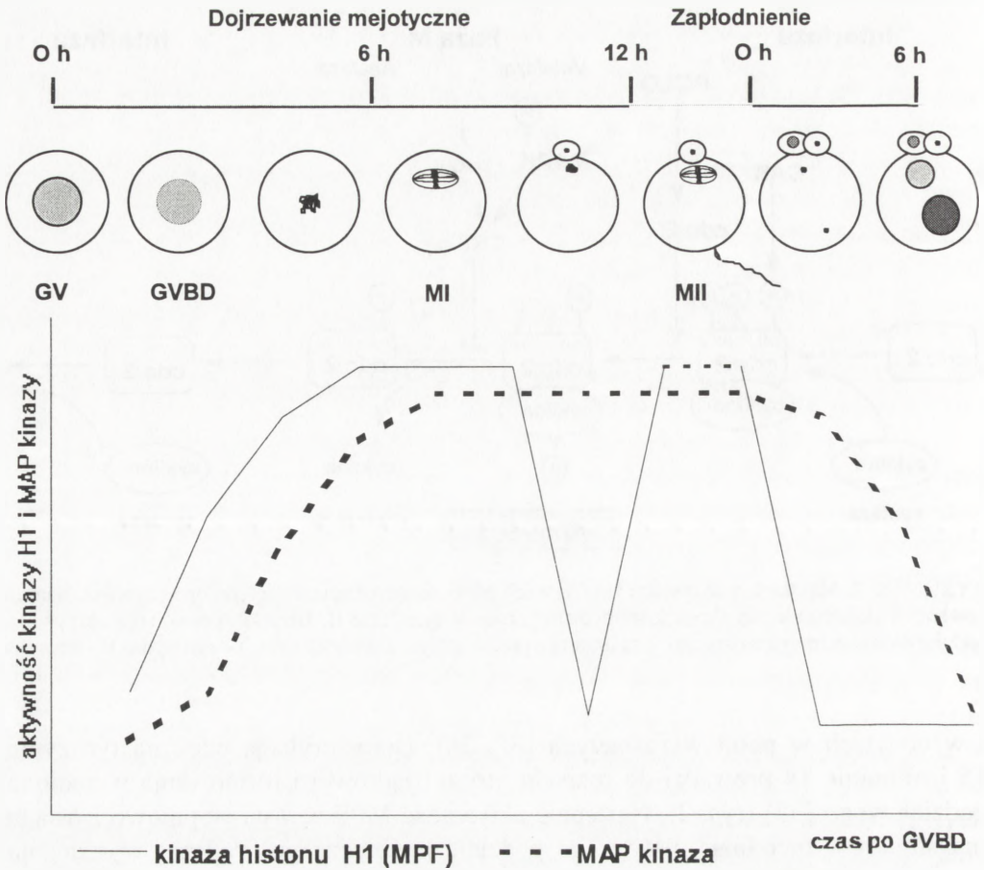
Do rozpadu otoczki jądra oocytu dochodzi w oocytach, które uzyskały kompetencję do kontynuowania dojrzewania mejotycznego i są w stanie zareagować na zewnętrzny sygnał inicjujący ten proces. Jednym z koniecznych warunków jest zgromadzenie w cytoplazmie oocytów odpowiedniej ilości podjednostki katalitycznej MPF – białka cdc2 [35, 36]. Cyklina B – jednostka regulacyjna MPF nie stanowi w warunkach fizjologicznych czynnika ograniczającego rozpad otoczki jądrowej, gdyż jej poziom jest wysoki zarówno w oocytach, które kontynuują wzrost, jak



RYSUNEK 2. Mechanizm aktywacji i inaktywacji MPF, na schemacie uwzględniono czynniki zaangażowane w pojawianie się aktywności cytotatycznej w metafazie II, strzałki symbolizują aktywację, oddziaływania hamujące oznaczone są liniami z prostopadłym zakończeniem, Y – tyrozyna, T – treonina

i w oocytach w pełni wyrośniętych [35, 36]. Defosforylacja cdc2 na tyrozynie 15 i treoninie 14 prowadzi do rozpadu otoczki jądrowej i formowania wrzeciona podziałowego [37] (rys. 2). Następnie aktywność MPF narasta stopniowo i osiąga maksimum w metafazie pierwszego podziału mejotycznego. Podczas wyrzucania pierwszego ciała kierunkowego aktywność MPF przejściowo spada, jednakże nie jest to wynikiem zmian fosforylacji białka cdc2, lecz gwałtowną degradacją cykliny B [38]. Po wyrzuceniu pierwszego ciała kierunkowego MPF jest ponownie aktywowany dzięki syntezie cykliny B i tworzeniu kompleksu z białkiem cdc2. Równocześnie formowane jest wrzeciono metafazy II. Po osiągnięciu tego stadium aktywność MPF utrzymuje się na wysokim poziomie aż do zapłodnienia lub aktywacji partenogenetycznej oocytu (rys. 3).

Enzymem zaangażowanym w utrzymanie bloku w metafazie II jest MAP kinaza (ang. *Mitogen Activated Kinase*). W oocytach myszy enzym ten występuje w dwóch formach białkowych: ERK1 i ERK2 o masach cząsteczkowych 42 i 44 kD [39]. W dojrzewających oocytach myszy aktywacja MAP kinazy rozpoczyna się około 1,5 godziny po rozpadzie otoczki jądrowej, a następnie aktywność enzymu rośnie i osiąga maksimum w metafazie pierwszego podziału dojrzewania. Za zapoczątkowanie reakcji, które doprowadzają do aktywującej fosforylacji białek ERK1 i ERK2, a tym samym aktywacji MAP kinazy, odpowiedzialna jest kinaza białkowa



RYSUNEK 3. Aktywność MPF i MAP kinazy podczas dojrzewania meiotycznego oocytów myszy: GV – stadium pęcherzyka zarodkowego (z ang. *Germinal Vesicle*); GVBD – rozpad pęcherzyka zarodkowego (ang. *Germinal Vesicle Breakdown*); MI – metafaza I; MII – metafaza II

Mos [40, 41]. Mos nie fosforyluje bezpośrednio MAP kinazy, lecz aktywuje kinazę MAP kinazy – MEK1, a ta z kolei aktywuje MAP kinazę [42]. MAP kinaza, w przeciwieństwie do MPF, nie jest inaktywowana podczas przejścia metafaza I / metafaza II. W tym okresie odpowiedzialna jest ona za utrzymanie chromatyny oocytu w stanie skondensowanym, a także uniemożliwia odtworzenie interfazowej sieci mikrotubul [39, 43]. Aktywność MAP kinazy utrzymuje się na wysokim poziomie także w oocytach zablokowanych w metafazie II, a spada po aktywacji oocytu (rys. 3). Aktywacja MAP kinazy jest konieczna do powstania aktywności cytostatycznej odpowiedzialnej za zablokowanie dojrzewających oocytów kręgowców w metafazie II [44].

1.3. Odkrycie czynnika cytostaticznego

Czynnik odpowiedzialny za stabilizację aktywności MPF w trakcie metafazy II został odkryty w oocytach płazów jednocześnie z MPF [3]. Dzielące się blastomery w zarodkach *Rana pipiens* ulegały zablokowaniu w mitozie, jeżeli nastrzyknięte zostały cytoplazmą pochodzącą z owulowanych oocytów. Wyniki tego doświadczenia wskazywały na to, że w metafazowym oocycie obecny jest czynnik cytostaticzny (CSF, ang. *Cytostatic Factor*), który stabilizuje aktywność MPF. Obecnie ciągle nie jest jasne, w jaki sposób CSF utrzymuje aktywność MPF na wysokim poziomie. Poważną przeszkodę w zrozumieniu mechanizmu działania CSF stanowi fakt, że nie zostały poznane wszystkie jego składniki.

Ważnym wydarzeniem w historii badań nad CSF w oocytach płazów było odkrycie, że białko Mos jest zaangażowane w powstawanie aktywności cytostaticznej [44, 45]. W oocytach *Xenopus* aktywność CSF jest związana z aktywnością kinazy Mos, która odpowiedzialna jest za fosforylację, a tym samym aktywację MAP kinazy [40, 44]. MAP kinaza jest więc czynnikiem, przez który Mos wpływa na utrzymanie wysokiej aktywności MPF [46, 47, 48]. Oddziaływanie to mogłoby odbywać się przez negatywną regulację degradacji cyklin. W ekstrakcie z dojrzewających jaj *Xenopus* aktywacja MAP kinazy musi nastąpić przed aktywacją MPF, aby degradacja cyklin została efektywnie zablokowana [46]. Prawdopodobnie dlatego nie dochodzi do zablokowania dojrzewania mejotycznego na stadium metafazy I, gdyż podczas dojrzewania oocytów *Xenopus* oba enzymy aktywowane są jednocześnie. Spadek aktywności MPF zachodzi podczas wyrzucania pierwszego ciała kierunkowego, a jego ponowny wzrost przy przejściu do metafazy II następuje w obecności aktywnej MAP kinazy. Spełnione jest więc założenie, że aby wykształcił się CSF, aktywacja MAP kinazy powinna nastąpić przed aktywacją MPF [46].

Pomimo stwierdzenia, że aktywacja MAP kinazy jest niezbędna do wytworzenia się aktywności CSF, to wydaje się, że nie jest ona jedynym czynnikiem zaangażowanym w wytwarzanie aktywności cytostaticznej. Istnieją sprzeczne doniesienia dotyczące roli kinazy cdk2 w dojrzewaniu oocytów *Xenopus* oraz pojawianiu się aktywności cytostaticznej w tych oocytach [49, 50]. Gabrielli i wsp. [49] wykazali, że w dojrzewających oocytach *Xenopus* poziom kinazy cdk2 wzrasta po rozpadzie otoczki jądra oocytu i osiąga maksimum w metafazie II. Począwszy od tego momentu kinaza białkowa cdk2 wykrywana jest na stałym poziomie w bruzdkujących zarodkach *Xenopus* aż do stadium gastrulacji. Dojrzewające oocyty *Xenopus*, które zostały nastrzyknięte antysensowymi oligodezoksynukleotydami komplementarnymi do mRNA kodującego cdk2, nie ulegały zablokowaniu w metafazie II, lecz przechodziły do interfazy [49]. Nastrzyknięcie tych oocytów białkiem cdk2 powodowało, że odtwarzany był blok metafazowy. Znaczyłoby to, że cdk2 obok kinazy Mos odpowiedzialne jest za wytwarzanie CSF. Synteza Mos w oocytach *Xenopus* rozpoczyna się jeszcze przed rozpadem otoczki jądra oocytu, a wysoki poziom tego

białka wykrywany jest w metafazie I. Ponieważ jednak w tym czasie poziom białka cdk2 jest niski, więc według Gabrielli'ego i wsp. nie dochodzi do wytworzenia aktywności cytotatycznej. Dopiero po wyrzuceniu pierwszego ciała kierunkowego, czyli wtedy gdy aktywność zarówno kinazy cdk2, jak i kinazy Mos jest wysoka, oocyty ulegają zablokowaniu w metafazie II. Wprowadzenie kinazy Mos do blastomeru bruzdkującego zarodka *Xenopus* (wysoka aktywność cdk2) powoduje wytworzenie aktywnego CSF prawdopodobnie na skutek współdziałania cdk2 i Mos [49].

Przeciwstawne wyniki przedstawione zostały przez Furuno i wsp. [50]. Doświadczenia polegające na nastrzykiwaniu dojrzewających oocytów *Xenopus* białkiem p21^{cip}, które jest inhibitorem kinazy cdk2, sugerują, że aktywność kinazy cdk2 nie jest konieczna ani do rozpoczęcia dojrzewania mejotycznego, ani do aktywacji MPF, ani też do wytworzenia bloku w metafazie II. Brak udziału kinazy cdk2 w regulacji dojrzewania mejotycznego dodatkowo świadczyłby o tym, że aktywacja MPF podczas mejozy oocytów kontrolowana jest odmiennie niż aktywacja MPF podczas bruzdkowania zarodków *Xenopus*. Badania z wykorzystaniem ekstraktów uzyskanych z bruzdkujących zarodków *Xenopus* sugerują bowiem, że kinaza cdk2 bierze udział w aktywacji MPF [17].

Określenie roli, jaką odgrywa cdk2 podczas dojrzewania oocytów *Xenopus*, wymaga dalszych badań. Jeżeli kinaza cdk2 okazałaby się współodpowiedzialna za pojawianie się aktywnego CSF, należałoby określić sposób, w jaki współdziała ona z kinazą Mos i/lub MAP kinazą. Być może fosforylacja wspólnego substratu niezbędna jest do wytworzenia bloku w metafazie II. Takim substratem mogłaby być cyklina B. Wiadomo, że cyklina B może być fosforylowana przez Mos, ale nie ma to znaczenia dla metabolizmu cykliny B [51, 52]. Możliwe jest także, że istnieją dwa substraty fosforylowane każdy przez inną kinazę (cdk2 lub Mos), które niezbędne są do wytworzenia bloku w metafazie II. Jeżeli jednak cdk2 nie odgrywa żadnej roli w regulacji podziałów mejotycznych, może być ono syntetyzowane w dojrzewającym oocycie *Xenopus*, a wykorzystywane już po aktywacji oocytu, podczas replikacji DNA. Wiadomo bowiem, że kinaza cdk2 odgrywa ważną rolę w regulacji syntezy DNA nie tylko w bruzdkujących zarodkach, ale także w komórkach somatycznych [53]. Niezbędnym krokiem w celu wyjaśnienia działania czynnika cytotatycznego powinno być określenie substratów Mos, MAP kinazy i cdk2.

1.4. Czynniki cytotatyczne w oocytach myszy

Oocyty myszy owulowane są w stadium metafazy drugiego podziału mejotycznego. Blok w metafazie II, podobnie jak w oocytach płazów, utrzymywany jest na skutek działania CSF. Wiedza o naturze czynnika cytotatycznego aktywnego

w oocytach ssaków jest znacznie uboższa od wiedzy uzyskanej w wyniku badań nad oocytami płazów.

W 1993 roku Kubiak i wsp. [54] przeprowadzili doświadczenie podobne do klasycznego doświadczenia Markerta i Masui'ego [3] i po raz pierwszy bezpośrednio wykazali obecność CSF w owulowanych oocytach myszy. W doświadczeniach tych fuzjowano oocyty w metafazie II z jednokomórkowymi, mitotycznymi zarodkami myszy, uzyskanymi w wyniku aktywacji partenogenetycznej. Cytoplazma oocytów w metafazie II powodowała zablokowanie podziału mitotycznego w zarodkach jednokomórkowych.

Podobnie jak w dojrzewających oocytach *Xenopus*, tak i w oocytach myszy za wytwarzanie CSF odpowiedzialna jest kinaza Mos aktywująca MAP kinazę. Pojawienie się aktywności MAP kinazy w dojrzewających oocytach myszy [39] skorelowane jest z akumulacją białka Mos [43]. W oocytach myszy *Mos*^{-/-}, które pozbawione zostały genu *mos* i z tego powodu nie produkują białka Mos, nie dochodzi do aktywacji MAP kinazy [43, 55, 56]. Pomimo to dojrzewanie oocytów *Mos*^{-/-} przebiega bez zakłóceń do stadium metafazy I. Oocyty *Mos*^{-/-} osiągają metafazę II, nie ulegają jednak zablokowaniu w tym stadium, lecz aktywują się partenogenetycznie [43, 55, 56, 57]. Niektóre z nich po wyrzuceniu drugiego ciała kierunkowego nie przechodzą do interfazy, ale odtwarzają kolejną płytkę metafazową i ulegają zablokowaniu w stadium określanym jako metafaza III [58]. Tak więc, podczas dojrzewania oocytów myszy kinaza Mos biorąca udział w aktywacji MAP kinazy odpowiedzialna jest za wytworzenie się bloku w metafazie II. Wydaje się, że również w przypadku oocytów myszy nie jest ona jedynym składnikiem CSF. Gdyby jedynie MAP kinaza była odpowiedzialna za pojawienie się aktywności CSF, dojrzewanie oocytów mogłoby blokować się w stadium metafazy I, gdyż już wtedy aktywność MAP kinazy jest wysoka.

Być może, podobnie jak to sugerowano w przypadku oocytów *Xenopus*, za wytworzenie aktywnego CSF odpowiedzialny jest czynnik/czynniki, które aby ulec aktywacji, muszą być najpierw ufosforylowane przez MAP kinazę, a następnie przez MPF [46]. Aktywny CSF pojawiałby się więc dopiero po przejściu oocytu z metafazy I do metafazy II. Dla określenia momentu, w którym podczas dojrzewania oocytów myszy aktywuje się CSF, szczególnie użyteczne są badania z wykorzystaniem oocytów, które dojrzewając blokują się w metafazie I. W badaniach nad mechanizmem tego bloku wykorzystuje się nie w pełni wyrośnięte oocyty jajnikowe, pochodzące z niedojrzałych płciowo myszy [59]. Dogodnym obiektem badań są również oocyty szczepu myszy LT/Sv. Niektóre z nich podczas dojrzewania nie wyrzucają pierwszego ciała kierunkowego, w czasie charakterystycznym dla normalnie dojrzewających oocytów, lecz pozostają w metafazie I, a następnie część z nich ulega partenogenetycznej aktywacji [60, 61]. Wykazano, że w oocytach tych aktywny CSF obecny jest już w metafazie I [62]. Czynnik cytostatyczny mógłby więc wykształcać się niezależnie od tego, czy w oocytach nastąpiło wyrzucenie

pierwszego ciała kierunkowego i przejście od stadium metafazy II, a bodziec anafazowy inicjowałby pierwszy podział mejotyczny w obecności CSF. W okresie między metafazą I a metafazą II następowałaby przejściowa inaktywacja CSF, a następnie jego reaktywacja w metafazie II. Nie byłby to odosobniony przypadek, gdyż także drugi podział mejotyczny zachodzi w obecności aktywnych kinaz, które odpowiedzialne są za wytworzenie CSF. Białko Mos oraz aktywna MAP kinaza są wykrywane także w pobudzonym oocyście [39, 63]. Zjawisko przejściowej inaktywacji CSF obserwuje się również podczas partenogenetycznej aktywacji oocytów, które ukończyły pierwszy podział mejotyczny bezpośrednio przed zadziałaniem bodźca aktywującego. Oocyty te po wyrzuceniu drugiego ciała kierunkowego nie przechodzą do interfazy, lecz rozpoczynają kolejną fazę M – metafazę III [58]. Wydaje się więc możliwe, że przejście metafaza I / metafaza II może zachodzić w obecności aktywnej kinazy Mos i MAP kinazy (Ciemerych i Kubiak, dane nie publikowane), jednakże w skład CSF, oprócz tych kinaz musi wchodzić także inny, niezdefiniowany dotychczas czynnik, który ulegałby przejściowej inaktywacji podczas metafazy pierwszego podziału mejotycznego.

Dotychczasowe badania nad aktywacją CSF podczas dojrzewania oocytów myszy koncentrowały się jedynie na roli Mos i MAP kinazy. Rola innych czynników białkowych, takich jak np. kinaza cdk2, nie została dotychczas zbadana. W związku z tym nie wiadomo, jaki jest dokładny mechanizm działania czynnika cytostaticznego. Być może CSF przeciwdziałając proteolitycznej degradacji cykliny B uniemożliwia inaktywację MPF. Badania nad metabolizmem cykliny B powinny dostarczyć ważnych informacji o mechanizmie działania CSF. W stadium metafazy II zarówno w oocytach *Xenopus* [47], jak i w oocytach myszy [54] degradacja cykliny B zachodzi pomimo obecności aktywnego CSF. W stadium metafazy II degradacji cykliny B towarzyszy jej ciągła synteza, co umożliwia utrzymanie aktywności MPF na stałym poziomie [54]. Po aktywacji oocytu zachodzi gwałtowna degradacja cykliny B przewyższająca poziom syntezy tego białka, dzięki czemu dochodzi do inaktywacji MPF. Rolą CSF byłoby spowolnienie/osłabienie degradacji cykliny B umożliwiające zachowanie równowagi między jej syntezą a degradacją.

1.5. Inaktywacja CSF w oocytach myszy

Jednym ze zjawisk zachodzących po aktywacji oocytu jest spadek aktywności czynnika cytostaticznego. Wydaje się, że zanik aktywności CSF w pobudzonym oocyście następuje stopniowo. Wykazano, że po aktywacji oocytu *Xenopus* jego cytoplazma może spowodować zablokowanie mitozy w dzielących się blastomerach [64]. Spadek aktywności cytostaticznej koreluje z postępującym zanikiem białka Mos w aktywowanych oocytach *Xenopus* [64]. Wydaje się więc możliwe, że także w ssaczych oocytach aktywność CSF zanika stopniowo po ich aktywacji, a obecność

aktywnej MAP kinazy i białka Mos jest związana właśnie z ciągłą obecnością CSF.

W oocytach myszy w reakcji na pobudzenie partenogenetyczne inaktywacja MPF następuje w ciągu około 15 minut po zadziałaniu bodźca partenogenetycznego [65], natomiast inaktywacja MAP kinazy zaczyna się 2 godziny po inaktywacji MPF [39]. Równocześnie wykrywane są jeszcze znaczne ilości białka Mos [63]. Oznacza to, że podobnie jak w oocytach *Xenopus* degradacja Mos nie jest konieczna do inaktywacji MPF [66]. Inaktywacja czynnika cytostatycznego, rozumianego jako aktywność kinazy Mos i/lub MAP kinazy, nie jest więc konieczna do inaktywacji MPF. Być może rola tego czynnika, tak jak było to sugerowane przez Kubiaka i wsp. [54], polega na opóźnieniu (utrudnieniu) degradacji cykliny B w trakcie metafazy II, której towarzyszy ciągła synteza tego białka. Aktywacja oocytu powodowałaby zachwianie tej subtelnej równowagi poprzez gwałtowne uaktywnienie mechanizmów odpowiedzialnych za degradację cyklin.

Pierwsze doświadczenia, które miały na celu zbadanie tempa zaniku aktywności cytostatycznej w aktywowanych oocytach, wykonano fuzując oocyty w różnym czasie po aktywacji z jednokomórkowymi, mitotycznymi zarodkami myszy (Ciemerych i Kubiak, dane niepublikowane). Stosując ten test udało się wykazać, że jeszcze ponad godzinę po aktywacji cytoplazma niektórych oocytów powoduje zablokowanie podziału mitotycznego. Równocześnie w hybrydach zablokowanych w fazie M wykrywa się aktywną MAP kinazę (Ciemerych i Kubiak, dane niepublikowane). Wydaje się więc, że inaktywacja CSF mogłaby zachodzić dwustopniowo w odpowiedzi na aktywację partenogenetyczną oocytu. Najpierw przejściowo inaktywowany byłby efektor MAP kinazy, a dopiero później następowałaby stopniowa degradacja Mos i inaktywacja MAP kinazy.

2. REGULACJA PIERWSZYCH CYKLÓW KOMÓRKOWYCH W ZARODKU MYSZY

Plemniki zapładniając oocyt powoduje ukończenie drugiego podziału mejyotycznego: dochodzi do wyrzucenia drugiego ciała kierunkowego, a chromatyna oocytu formuje interfazowe jądro – przedjądrze żeńskie. W tym samym czasie także jądro plemnika, który wniknął do oocytu, ulega szeregowi zmian prowadzących do powstania przedjądrza męskiego. Przekształcenia te zapoczątkowuje rozpad otoczki jądrowej i gwałtowna dekondensacja chromatyny plemnika. Dekondensacja chromatyny męskiej umożliwia wymianę związanych z nią białek zasadowych – protamin – na histony obecne w cytoplazmie oocytu [67], dzięki czemu może zajść rekondensacja chromatyny [68]. Gdy chromatyna osiągnie stan maksymalnej rekondensacji, rozpoczyna się formowanie przedjądrza męskiego. Odtwarzana jest otoczka

jądrowa, a chromatyna męska ponownie dekondensuje. W zarodku myszy oba przedjądrza pozostają odseparowane od siebie przez cały pierwszy cykl komórkowy, oddzielnie przechodzą fazę replikacji DNA, a do wymieszania chromatyny żeńskiej i chromatyny męskiej dochodzi dopiero w trakcie pierwszego podziału bruzdkowania – podczas formowania wspólnej płytki metafazowej. Wniknięcie plemnika do owulowanego oocytu wywołuje szereg biofizycznych i biochemicznych procesów, które prowadzą do powstania jednokomórkowego zarodka – zygoty.

2.1. „Mejotyczne” cechy pierwszego cyklu komórkowego

Pierwszy cykl pod wieloma względami różni się od następujących po nim cykli zarodkowych, nie tylko z powodu zachodzących w jego początkowej fazie specyficznych przekształceń chromatyny oocytu i plemnika. Jest to okres niezwykle ważny dla rozwijającego się zarodka, gdyż właśnie wtedy mechanizmy kontrolujące dojrzewanie mejotyczne przestają funkcjonować, a ich miejsce zajmują mechanizmy typowe dla kontroli cykli mitotycznych. Pierwszym etapem przejścia od mejotycznego do mitotycznego typu kontroli cyklu komórkowego jest proces inaktywacji CSF, opisany w rozdziale 1.5. Obecność aktywnej MAP kinazy na początku pierwszego cyklu komórkowego ma wpływ na organizację cytoszkieletu jednokomórkowego zarodka oraz prawdopodobnie na formowanie się przedjądrzy. Wiadomo bowiem, że enzym ten oddziałuje na cytoszkielet mikrotubularny i otoczkę jądrową podtrzymując ich metafazowy charakter [39, 43]. W jednokomórkowym zarodku odtworzenie interfazowego cytoszkieletu oraz formowanie przedjądrzy skorelowane jest z zanikiem aktywności MAP kinazy i następuje około 1,5–2 godziny po aktywacji oocytu [39, 56, 64]. Mechanizm, w jaki MAP kinaza reguluje powyższe procesy, nie został dotychczas poznany. Wiadomo, że enzym ten może fosforylować białka towarzyszące mikrotubulom oraz białka zaangażowane w nukleację mikrotubul [39], a także laminę B, składnik błony jądrowej [10]. Należy brać pod uwagę możliwość, że jej wpływ na organizację mikrotubul i otoczki jądrowej jest pośredni. Być może spowolnienie pierwszej fazy cyklu jednokomórkowego zarodka ma za zadanie zapewnienie korzystnych warunków dla transformacji silnie skondensowanej chromatyny oocytu i plemnika w interfazowe przedjądrza. O ile bowiem długości pierwszego i drugiego cyklu komórkowego nie różnią się znacząco od siebie (około 17–20 godzin), to pierwszy cykl charakteryzuje się wydłużoną fazą G1 (5–7 godzin [69]), podczas gdy w drugim cyklu komórkowym jądra interfazowe odtwarzane są niezwykle szybko, a faza G1 kończy się w około 2 godziny po ukończeniu pierwszego podziału bruzdkowania [70].

2.2. Procesy zachodzące autonomicznie w jednokomórkowych zarodkach myszy

We wczesnym okresie rozwoju zarodkowego pewne aktywności cytoplazmatyczne mogą przebiegać niezależnie od siebie, a niektóre z nich także niezależnie od kontroli jądra. Aktywność korowa manifestuje się w aktywowanych oocytach i wczesnych zarodkach *Xenopus* jako okresowe zmiany naprężenia korteksu. Poprzedzają one kilka pierwszych podziałów bruzdkowania i widoczne są w postaci fali skurczu rozprzestrzeniającej się od animalnego do wegetatywnego bieguna zarodka [71]. We fragmentach bezjądrowych uzyskanych z aktywowanych jaj *Xenopus* aktywność korowa pojawia się z taką samą częstotliwością jak w dzielących się, jądrowych fragmentach. Towarzyszy jej pojawiająca się również cyklicznie aktywność odpowiedzialna za kondensację chromatyny – MPF [71]. Wiadomo, że pojawienie się aktywności korowej w zarodkach płazów poprzedza aktywację MPF, a jej zanik jest reakcją na pojawienie się aktywności MPF [72]. Podobne oscylacje aktywności MPF zaobserwowano również w bezjądrowych fragmentach uzyskanych z zarodków szkarłupni: jeżowców i rozgwiazd [73]. Aktywność korową można zaobserwować również w zarodkach myszy, lecz odkształcenia powierzchni obserwuje się wyłącznie w zarodkach jednokomórkowych. Pojawiają się one w fazie G₂, a zanikają bezpośrednio przed pierwszym podziałem bruzdkowania. Obserwacje bezjądrowych fragmentów uzyskanych z jednokomórkowych zarodków wykazały, że ich aktywność korowa zachodzi niezależnie od kontroli jądrowej i że zaczyna się i kończy z nieznacznym opóźnieniem w stosunku do kontrolnych fragmentów jądrowych [74]. Podobnie jak w całych jednokomórkowych zarodkach, tak i w bezjądrowych fragmentach uzyskanych z tych zarodków, zanikowi aktywności korowej towarzyszy reorganizacja cytoszkieletu komórki. Interfazowa sieć mikrotubul zanika, a pojawiają się zgrupowania mikrotubul będące odpowiednikami wrzeciona (Ciemerych i wsp., dane niepublikowane). Równocześnie obserwuje się aktywację MPF, co wykazano stosując test biologiczny polegający na wprowadzaniu interfazowego jądra tymocytu do bezjądrowego fragmentu jednokomórkowego zarodka. Jądro to w reakcji na aktywny MPF przechodziło wymuszoną kondensację chromatyny [75]. Dodatkowo przeprowadzono test biochemiczny na obecność MPF polegający na określeniu aktywności kinazy histonu H1 w badanych fragmentach bezjądrowych (Ciemerych i wsp., dane niepublikowane). Oba testy wykazały, że w jednokomórkowym zarodku myszy MPF aktywuje się autonomicznie. Podobne badania przeprowadzone na fragmentach bezjądrowych pochodzących z blastomerów zarodków dwukomórkowych wykazały, że w drugim cyklu komórkowym również zachodzi aktywacja MPF odzwierciedlana we wzroście aktywności kinazy histonu H1. Jednakże we fragmencie blastomeru zarodka dwukomórkowego poziom aktywności MPF jest na tyle niski, że nie wywołuje mitotycznej rearanżacji cytoszkieletu. Nie jest także wystarczający do wywołania przedwczesnej kondensacji

chromatyny jądra tymocyty wprowadzonego do bezjądrowego fragmentu blastomeru zarodka dwukomórkowego [75].

Regulacja aktywacji MPF w pierwszym cyklu komórkowym różni się więc od regulacji tego procesu w następnych cyklach mitotycznych. Różnice w dynamice aktywacji MPF we fragmentach bezjądrowych pochodzących z zarodków jedno- i dwukomórkowych być może są spowodowane przez różnice w dystrybucji lub/i metabolizmie czynników zaangażowanych w regulację MPF. Wiadomo, że pierwszy cykl komórkowy znajduje się pod kontrolą czynników matczyńskich, nagromadzonych w trakcie oogenezy. Cytoplazma jednokomórkowego zarodka, w przeciwieństwie do zarodka dwukomórkowego zawiera wszystkie składniki niezbędne do aktywacji MPF. Regulacja drugiego i następnych cykli komórkowych prawdopodobnie kontrolowana jest przede wszystkim przez białka zsyntetyzowane już po aktywacji genomu zarodka [76]. Być może więc bezjądrowe fragmenty uzyskiwane z zarodków dwukomórkowych były pozbawione czynników odpowiedzialnych za prawidłową aktywację MPF, których syntetyza zachodzi tuż przed samym podziałem mitotycznym lub też są zgromadzone w jądrze komórkowym. Wydajna aktywacja MPF w bezjądrowych fragmentach blastomerów zarodków dwukomórkowych mogła zostać uniemożliwiona również z powodu niedostępności białek regulujących aktywność MPF.

W zarodkach jedno- i dwukomórkowych analizowano dotychczas rozmieszczenie dwóch białek, o których wiadomo, że odgrywają kluczową rolę w aktywacji MPF w komórce: cyklina A i cyklina B. Okazało się, że fragmenty jądrowe i bezjądrowe uzyskane zarówno z zarodków jednokomórkowych, jak i z blastomerów zarodków dwukomórkowych zawierają podobne ilości obu tych białek (Ciemerych i wsp., dane nie publikowane). Wyklucza to możliwość, że różnice w regulacji aktywności MPF w dwóch pierwszych cyklach komórkowych są wynikiem zróżnicowanego rozmieszczenia cykliny A lub cykliny B w badanych komórkach. Wyniki te różnią się od rezultatów badań nad rozmieszczeniem cykliny A i B w komórkach somatycznych. W ludzkich fibroblastach począwszy od fazy S cyklina A jest transportowana do jądra komórkowego i po połączeniu się z kinazą cdc2 odgrywa rolę w aktywacji kompleksu cdc2-cyklina B. Natomiast cyklina B pozostaje w cytoplazmie aż do momentu rozpadu otoczki jądrowej [77, 78]. Wydaje się więc, że pierwsze cykle komórkowe zarodków myszy regulowane są w sposób odmienny od cykli komórek somatycznych. Nie znane są jednak dane dotyczące lokalizacji innych białek regulatorowych ani też szczegóły dotyczące regulacji aktywności MPF, dlatego też mechanizm obserwowanych różnic pozostaje niewyjaśniony.

2.3. Regulacja pierwszej mitozy w zarodku myszy

W jednokomórkowym zarodku myszy przedjądrze żeńskie i przedjądrze męskie pozostają od siebie odseparowane przez cały pierwszy cykl komórkowy. Podczas

przejścia z fazy G2 do fazy M przedjądrze żeńskie reaguje wcześniej na aktywację MPF i ono jako pierwsze przechodzi rozpad otoczki jądrowej i kondensację chromatyny [79]. Chromatyna obu przedjądrzy kondensuje więc niezależnie od siebie, a do wymieszania chromosomów matczynych i ojcowskich dochodzi podczas tworzenia płytki metafazowej pierwszego podziału mitotycznego. Chromosomy matczyne są z reguły krótsze i silniej zespiralizowane, męskie dłuższe i mniej skondensowane [79, 82]. Zróżnicowana kondensacja chromatyny nie jest jedynym zjawiskiem charakterystycznym wyłącznie dla pierwszego podziału mitotycznego. Pierwsza mitoza trwa około 40–50 minut dłużej niż druga i trzecia. Od rozpadu otoczki jądrowej przedjądrzy do cytokinezy upływa średnio 120 minut. Długość pierwszego podziału mitotycznego nie zależy od zawartości chromatyny w dzielącym się zarodku i jest taka sama zarówno w haploidalnych zarodkach partenogenetycznych, jak i w diploidalnych zygotach (Ciemerych i wsp., dane niepublikowane). Podczas pierwszego podziału mitotycznego aktywność kinazy histonu H1 (biochemiczna miara aktywności MPF) po osiągnięciu maksimum utrzymuje się przez 50–60 minut na stałym, wysokim poziomie. Druga mitoza trwa średnio 70 minut, a aktywność MPF jest maksymalna jedynie przez około 20 minut (rys. 4) (Ciemerych i wsp., dane niepublikowane).

Wzrostowi aktywności MPF towarzyszy formowanie się wrzeciona mitotycznego. W jednokomórkowym zarodku proces ten przebiega w sposób przypominający formowanie wrzeciona pierwszej metafazy mejotycznej. Kondensująca chromatyna otoczona jest mikrotubulami tworzącymi przez dość długi czas strukturę radialnie symetryczną. Długie mikrotubule na biegunach wrzeciona podziałowego oraz astery mikrotubularne w cytoplazmie jednokomórkowego zarodka obecne są nawet w zaawansowanych stadiach pierwszego podziału mitotycznego (rys. 4). Taki sposób formowania wrzeciona jest charakterystyczny dla pierwszej, ale już nie dla drugiej mitozy (Ciemerych i wsp., dane niepublikowane). Pierwszy podział mitotyczny przypomina pierwszy podział mejotyczny nie tylko pod względem sposobu formowania wrzeciona podziałowego. Od uformowania wrzeciona do cytokinezy upływa średnio dwa razy więcej czasu niż w trakcie następnych podziałów bruzdkowania. Podobne opóźnienie charakterystyczne jest dla pierwszego podziału mejotycznego, kiedy to wrzeciono metafazy I zostaje uformowane w około 4–5 godzin, a dokończenie podziału następuje dopiero w 8–9 godzin od rozpoczęcia dojrzewania. Być może za wydłużenie pierwszego podziału mitotycznego odpowiedzialne są mechanizmy analogiczne do tych, które kontrolują wydłużenie metafazy I. Wiadomo jednak, że w stabilizacji MPF podczas pierwszej mitozy nie bierze udziału MAP kinaza, gdyż enzym ten nie ulega wtedy aktywacji [39, 81].

Obok aktywności cytotatycznej, która odpowiedzialna jest za stabilizację aktywności MPF, istnieją też inne sposoby regulacji długości fazy M. Badania nad tworzeniem płytki metafazowej w ssaczych komórkach somatycznych oraz w spermatocytach owadów wykazały, że ukończenie podziału może nastąpić tylko

wtedy, gdy wszystkie chromosomy zostaną prawidłowo połączone z włóknami wrzeciona podziałowego. Prawidłowe połączenie mikrotubul z kinetochorami znajdującymi się na chromatydach siostrzanych warunkuje wytworzenie odpowiedniego naprężenia, które z kolei jest sygnałem do rozpoczęcia anafazy. Istnieje więc „punkt kontrolny” (ang. *checkpoint*), który warunkuje opóźnienie anafazy i umożliwia komórce prawidłowe połączenie chromosomów z aparatem mitotycznym [82]. Prawidłowe oddziaływanie między kinetochorami a mikrotubulami sprawia, że nie pojawia się sygnał uruchamiający „punkt kontrolny”. Natomiast chromosom, który jest połączony tylko z jednym biegunem wrzeciona, powoduje pojawienie się takiego sygnału i przejściowe zablokowanie podziału, do czasu wytworzenia prawidłowego oddziaływania z wrzecionem [83]. Wykazano, że kinetochory chromosomów mitotycznych rozpoznawane są przez przeciwciało monoklonalne 3F3/2 skierowane przeciwko specyficznym fosfoepitopom obecnym w kinetochorze, gdy nie jest on poddany naprężeniu. Wraz z utworzeniem prawidłowej płytki metafazowej wyznaczenie kinetochorów tym przeciwciałem przestaje być możliwe [84]. Nie wiadomo, w jaki sposób napięcie mechaniczne wywołuje defosforylację białek kinetochorowych. Model proponowany przez Gorbsky’ego [85] zakłada, że kinetochor, który nie został prawidłowo przyłączony do włókien wrzeciona, stymuluje produkcję inhibitora kompleksu APC (patrz rozdział 1.1). Mechanizm zaangażowany w ujawnienie się „punktu kontrolnego” powodowałby fosforylację – a tym samym produkcję aktywnego inhibitora, natomiast fosfatazy powodowałyby jego inaktywację. Po połączeniu wszystkich kinetochorów z mikrotubulami wrzeciona ustałoby wytwarzanie aktywnych inhibitorów, na skutek działania fosfataz obecnych w komórce. Brak aktywnego inhibitora powodowałby ubikwitynizację między innymi białek scalających ze sobą chromatydy siostrzane (Pds1/Cut2) i cykliny B, na skutek aktywacji kompleksu APC, a tym samym degradację tych białek. Dzięki temu zajście anafazy stawałoby się możliwe [85].

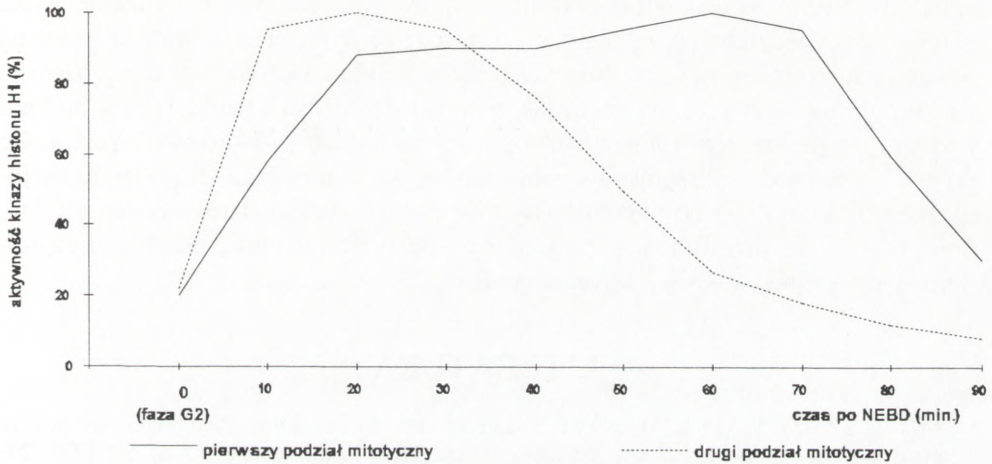
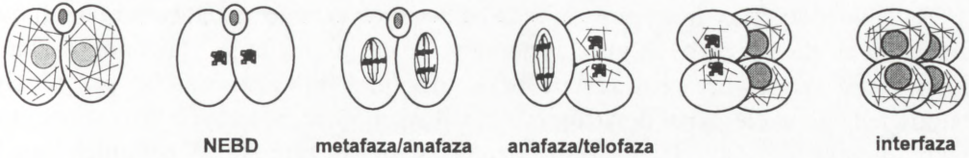
Obecnie trwają badania mające na celu ustalenie, czy mechanizm związany z ustaleniem prawidłowego napięcia na kinetochorach odpowiedzialny jest za wydłużenie pierwszego podziału mejotycznego podczas dojrzewania oocytów myszy. Wstępne badania sugerują, że w dojrzewającym oocyście myszy białka kinetochorowe są defosforylowane tuż przed anafazą pierwszego podziału dojrzewania (Brunet i wsp., informacja ustna). Te obserwacje wskazują na działanie podobnych mechanizmów kontrolnych jak w komórkach somatycznych. Nie wiadomo jednak, dlaczego wykształcenie właściwych połączeń między kinetochorami a włóknami wrzeciona podczas metafazy I trwa aż kilka godzin. Kontynuacja tych badań z wykorzystaniem dzielących się jednokomórkowych zarodków myszy być może pozwoliłaby także wyjaśnić działanie mechanizmu odpowiedzialnego za przedłużenie pierwszej mitozy.

Przedłużenie pierwszego podziału mitotycznego może być też wynikiem specyficznej regulacji metabolizmu białek zaangażowanych w regulację mitozy. Wiadomo, że cyklina A jest białkiem zaangażowanym w regulację aktywności MPF.

Pierwszy podział mitotyczny



Drugi podział mitotyczny



RYSUNEK 4. Zmiany w organizacji chromatyny i cytoskieletu mikrotubulowego podczas pierwszego i drugiego podziału mitotycznego skorelowane są ze zmianami w aktywności MPF (mierzonej jako aktywność kinazy histonu H1), NEBD (ang. *Nuclear Envelope Breakdown*) – rozpad otoczki jądrowej

Aktywacja kompleksu cdc2-cyklina A zachodzi przy przejściu z fazy G2 do fazy M i poprzedza aktywację MPF [77, 86]. Jego inaktywacja na skutek proteolizy cykliny A zachodzi na początku podziału mitotycznego [78, 86, 87]. Analiza metabolizmu cykliny A2 podczas pierwszego i drugiego cyklu komórkowego zarodków myszy wykazała, że białko to nie ulega degradacji podczas pierwszego podziału mitotycznego, a pewne jego ilości wykrywane są również w zarodkach przechodzących drugi podział bruzdkowania (Ciemerych i wsp., dane niepublikowane). Być może aktywność kinazy cdc2-cyklina A utrzymująca się przez cały pierwszy podział mitotyczny zaangażowana jest w stabilizację MPF i przedłużenie pierwszej

mitozy. Przebieg pierwszego cyklu komórkowego i pierwszego podziału mitotycznego regulowane są w sposób różniący się od regulacji cykli komórek somatycznych. Dotychczas przeprowadzone badania nad mechanizmami kontrolującymi wczesne etapy rozwoju zarodków myszy nie dały odpowiedzi na pytanie, jakie jest molekularne podłoże obserwowanych zjawisk.

3. UWAGI KOŃCOWE

Badania dotyczące regulacji dojrzewania mejotycznego oocytów organizmów zaliczanych do tak różnych grup systematycznych jak nicianie, stawonogi, szkarłupnie czy kręgowce, prowadzone przez ostatnich kilkadziesiąt lat przyniosły odpowiedź na wiele pytań dotyczących mechanizmów regulujących wzrost oocyty, jego dojrzewanie, zapłodnienie oraz późniejszy rozwój zarodka. W ostatnich latach zidentyfikowano bardzo wiele czynników białkowych i określono funkcję wielu genów odpowiedzialnych za regulację rozwoju różnych organizmów. Z roku na rok obraz mechanizmów kontrolujących przebieg cyklu komórkowego coraz bardziej się komplikuje. Jednakże, podobnie jak w innych dziedzinach nauki, tak i w biologii rozwoju ciągle nie otrzymujemy odpowiedzi na bardzo podstawowe pytania. Co powoduje, że oocyty kręgowców zablokowane są w metafazie II podziału mejotycznego? W jaki sposób plemnik aktywuje oocyt? Mam nadzieję, że ten artykuł, pomimo że nie przedstawił odpowiedzi na powyższe pytania, przybliżył czytelnikowi dziedzinę, w której są one stawiane.

LITERATURA

- [1] SCHULTZ RM, WASSARMAN PM. Biochemical studies of mammalian oogenesis: protein synthesis during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse. *J Cell Sci* 1977; **24**: 167–194.
- [2] BACHVAROVA R. Synthesis, turnover and stability of heterogeneous RNA in growing mouse oocytes. *Dev Biol* 1981; **86**: 384–392.
- [3] MASUI Y, MARKERT CL. Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 1971; **177**: 129–146.
- [4] LEE MG, NURSE P. Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature* 1987; **327**: 31–35.
- [5] MURRAY AW, SOLOMON MJ, KIRSHNER MW. The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature* 1989; **25**: 280–286.
- [6] NIGG EA. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eucaryotic cell cycle. *BioEssays* 1995; **17**: 471–480.
- [7] BRADBURY EM. Reversible histone modifications and the chromosome cell cycle. *BioEssays* 1992; **14**: 9–16.
- [8] REEVES R. Chromatin changes during the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 1992; **4**: 413–423.
- [9] ARION DL, MEIJER L, BRIZUELA L, BEACH D. *cdc2* is a component of M-phase specific histone H1 kinase: evidence for identity with MPF. *Cell* 1988; **55**: 371–378.

- [10] PETER M, NAKAGAWA J, DOREE M, LABBE J-C, NIGG EA. *In vitro* disassembly of the nuclear lamina and M phase-specified phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* 1990; **61**: 591–602.
- [11] VERDE F, LABBE J-C, DOREE M, KARSENTI E. Regulation of microtubule dynamics by cdc2 protein kinase in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *Nature* 1990; **343**: 233–238.
- [12] PETER M, NAKAGAWA J, DOREE M, LABBE J-C NIGG EA. Identification of major nucleolar proteins as candidate mitotic substrates of cdc2 kinase. *Cell* 1990; **60**: 791–801.
- [13] LCHER B, EISENMAN RN. Mitosis-specific phosphorylation of the nuclear oncoproteins Myc and Myb. *J Cell Biol* 1992; **118**: 775–784.
- [14] FEATHERSTONE C, RUSSELL P. Fission yeast genes p107^{wce1} mitotic inhibitor is a tyrosine/serine kinase. *Nature* 1991; **349**: 808–811.
- [15] MUELLER PA, COLEMAN TR, KUMAGAI A, DUNPHY WG. Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* 1995; **270**: 86–90.
- [16] XIONG Y, HANNON GJ, ZHANG H, KEYOMARSI K, ELLEDGE S.J p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993; **366**: 236–242.
- [17] GUADAGNO TM, NEWPORT JW. Cdk2 kinase is required for entry into mitosis as a positive regulator of cdc2-cyclin B kinase activity. *Cell* 1996; **84**: 73–82.
- [18] KUMAGAI A, DUNPHY WG The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation on the cdc2 protein in a cell-free system. *Cell* 1991; **64**: 903–914.
- [19] STRAUSFELD UJ, LABBE J-C, FESQUET D, CAVADORE J-C, PICARD A, SADHU K, RUSSELL P, DOREE M. Dephosphorylation and activation of p34cdc2-cyclin B complex *in vitro* by human cdc25 protein. *Nature* 1991; **351**: 242–245.
- [20] HOFFMANN I, CLARKE PR, MARCOTE MJ, KARSENTI E, DRAETTA G. Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2-cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *EMBO J* 1993; **12**: 53–63.
- [21] SOLOMON MJ, GLOTZER M, LEE TH, PHILIPPE M, KIRSCHNER MW. Cyclin activation of p34cdc2. *Cell* 1990; **63**: 1013–1024.
- [22] KUMAGAI A, DUNPHY WG. Purification and molecular cloning of Plx1, a cdc25-regulatory kinase from *Xenopus* egg extracts. *Science* 1996; **273**: 1377–1380.
- [23] LANE HA, NIGG EA. Cell-cycle control: POLO-like kinases join the outer circle. *Trends Cell Biol* 1997; **7**: 63–68.
- [24] LANE HA, NIGG EA. Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *J Cell Biol* 1997; **135**: 1701–1713.
- [25] SOLOMON MJ, HARPER JW, SHUTTLEWORTH J. CAK the p34^{cdc2} activating kinase, contains a protein identical or closely related to p40^{MO15}. *EMBO J* 1993; **12**: 3133–3142.
- [26] FISHER RP, MORGAN DO. A novel cyclin associates with MO15/Cdk7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* 1994; **78**: 713–724.
- [27] GLOTZER M, MURRAY AW, KIRSHNER MW. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 1991; **349**: 132–138.
- [28] HOLLOWAY S, GLOTZER M, KING RW, MURRAY AW. Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of maturation-promoting factor. *Cell* 1993; **73**: 1393–1402.
- [29] SUDAKIN V, GANTOHD, DAHAN A, HELLER H, HERSHKO J, LUCA FC, RUDERMAN JV, HERSHKO A. The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol Biol Cell* 1995; **6**: 185–198.
- [30] KING RW, DESHAIES RJ, PETERS J-M, KIRSCHNER MW. How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 1996; **274**: 1652–1659.
- [31] WÓJCIK C. Proteasomy i szlak degradacji białek zależny od ubikwityny. *Post Biol Kom* 1995; **22**: 295–315.

- [32] FELIX MA, LABBE JC, DOREE M, HUNT T, KARSENTI E. Triggering of cyclin degradation in interphase extracts of amphibian eggs by cdc2 kinase. *Nature* 1990; **346**: 379–382.
- [33] YAMAMOTO A, GUACCI V, KOSHLAND D. Pdspl, an inhibitor of anaphase in budding yeast, plays a critical role in the APC and checkpoint pathway. *J Cell Biol* 1996; **133**: 99–110.
- [34] FUNABIKI H, YAMANO H, KUMADA K, NAGAO K, HUNT T, YANAGIDA M. Cut2 proteolysis is required for sister-chromatid segregation in fission yeast. *Nature* 1996; **381**: 438–441.
- [35] CHESNEL F, EPPIG JJ. Synthesis and accumulation of p34^{cdc2} and cyclin B in mouse oocytes during acquisition of competence to resume meiosis. *Mol. Reprod Dev* 1995; **40**: 503–508.
- [36] DE VANTERY C, GAVIN AC, VASSALLI JD, SCHORDERET-SLATKINE S. An accumulation of p34^{cdc2} at the end of mouse oocyte growth correlates with the acquisition of meiotic competence. *Dev Biol* 1996; **174**: 335–344.
- [37] CHOI T, AOKI F, MORI M, YAMASHITA M, NAGAHAMA Y, KOHOMOTO K. Activation of p34cdc2 protein kinase activity in meiotic and mitotic cell cycles in mouse oocytes and embryos. *Development* 1991; **113**: 789–795.
- [38] HAMPL A, EPPIG JJ. Translational regulation of the gradual increase in histone H1 kinase activity in maturing mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 1995; **40**: 9–15.
- [39] VERLHAC M-H, KUBIAK JZ, CLARKE HJ, MARO B. Microtubule and chromatin behaviour follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development* 1994; **120**: 1017–1025.
- [40] NEBRADA AR, HUNT T. The c-mos proto-oncogene protein kinase turns on and maintains the activity of MAP kinase, but not MPF, in cell-free extracts of *Xenopus* oocytes and eggs. *EMBO J* 1993; **12**: 1979–1986.
- [41] GAVIN A-C, CAVADORE J-C, SCHORDERET-SLATKINE S. Histone H1 kinase activity, germinal vesicle breakdown and M phase entry in mouse oocytes. *J Cell Sci* 1994; **107**: 275–283.
- [42] KOSAKO H., GOTOH Y., NISHIDA E. Requirement for the MAP kinase kinase/MAP kinase cascade in *Xenopus* oocyte maturation. *EMBO J* 1994; **13**: 2131–2138.
- [43] VERLHAC M-H, KUBIAK JZ, WEBER M, GERAUD G, COLLEDGE WH, EVANS M, MARO B. Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Development* 1996; **122**: 815–822.
- [44] HACCARD O, SARCEVIC B, LEWELLYN A, HARTLEY R, ROY L, IZUMI T, ERIKSON E, MALLER JL. Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by MAP kinase. *Science* 1993; **262**: 1262–1265.
- [45] SAGATA N, WATANABEN, VANDE WOUDE GF, IKAWA Y. The c-mos proto-oncogene product is a cytoplasmic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature* 1989; **342**: 512–518.
- [46] ABRIEU A, LORCA T, LABBE J-C, MORIN N, KEYSE S, DOREE M. MAP kinase does not inactivate, but rather prevents the cyclin degradation pathway from being turned on in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Sci* 1996; **109**: 239–246.
- [47] THIBIER C, DE SMEDT V, POULHE R, HUCHON D, JESSUS C, OZON R. *In vivo* regulation of cytotstatic activity in *Xenopus* metaphase II-arrested oocytes. *Dev Biol* 1997; **185**: 55–66.
- [48] MINSHULL J, SUN H, TONKS NK, MURRAY AW. A MAP kinase-dependent spindle assembly checkpoint in *Xenopus* egg extracts. *Cell* 1994; **79**: 475–486.
- [49] GABRIELLIBG, ROY LM, MALLER JL. Requirement for Cdk2 in cytotstatic factor-mediated metaphase II arrest. *Science* 1993; **259**: 1766–1769.
- [50] FURUNO N, OGAWA Y, IWASHITA J, NAKAJO N, SAGATA N. Meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes is independent of cdk2 kinase. *EMBO J* 1997; **16**: 3860–3865.
- [51] ROY LM, SINGH B, GAUTIER J, ARLINGHAUS RB, NORDEEN SK, MALLER JL. The cyclin B2 component of MPF is a substrate for the c-mos^{xc} proto-oncogene product. *Cell* 1990; **61**: 825–831.

- [52] IZUMI T, MALLER JL. Phosphorylation of *Xenopus* cyclin B1 and B2 is not required for cell cycle transition. *Mol Cell Biol* 1991; **11**: 3860–3867.
- [53] STILLMAN B. Cell cycle control of DNA replication. *Science* 1996; **274**: 1659–1664.
- [54] KUBIAK JZ, WEBER M, DE PENNART H, WINSTON NJ, MARO B. The metaphase II arrest in mouse oocytes is controlled through microtubule-dependent destruction of cyclin B in the presence of CSF. *EMBO J* 1993; **12**: 3773–3778.
- [55] ARAKI K, NAITO K, HARAGUCHI S, SUZUKI R, YOKOYAMA M, INOUE M, AIZAWA S, TOYODA Y, SATO E. Meiotic abnormalities of c-mos knockout mouse oocytes: Activation after first meiosis or entrance into third meiotic metaphase. *Biol Reprod* 1996; **55**: 1315–1324.
- [56] CHOI T, FUKUSAWA K, ZHOU R, TESAROLLO L, BORROR K, RESAU J, VANDE WOUDE GF. The Mos/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway regulates size and degradation of the first polar body in maturing mouse oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 7032–7035.
- [57] COLLEDGE WH, CARLTON MBL, UDY GB, EVANS MJ. Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature* 1994; **370**: 65–68.
- [58] KUBIAK JZ. Mouse oocytes gradually develop the capacity for activation during metaphase II arrest. *Dev Biol* 1989; **136**: 537–545.
- [59] HAMPL A, EPPIG JJ. Analysis of the mechanism(s) of metaphase I arrest in maturing mouse oocytes. *Development* 1995; **121**: 925–933.
- [60] EPPIG J.J. Developmental potential of LT/Sv parthenotes derived from oocytes matured *in vitro* and *in vivo*. *Dev Biol* 1978; **65**: 829–838.
- [61] KAUFMAN MH, HOWLETT SK. The ovulation and activation of primary and secondary oocytes in LT/Sv strain of mice. *Gamete Res* 1986; **14**: 225–264.
- [62] HIRAO Y, EPPIG JJ. Analysis of the mechanism(s) of metaphase I arrest in strain LT mouse oocytes: participation of MOS. *Development* 1997; **124**: 5107–5113.
- [63] WEBER M, KUBIAK JZ, ARLINGHAUS RB, PINES J, MARO B. c-mos proto-oncogene product is partially degraded after release from meiotic arrest and persist during interphase in mouse zygotes. *Dev Biol* 1991; **148**: 393–397.
- [64] WATANABE N, HUNT T, IKAWA Y, SAGATA N. Independent inactivation of MPF and cytostatic factor (Mos) upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature* 1991; **352**: 247–248.
- [65] SZÖLLÖSI MS, KUBIAK JZ, DEBEY P, DE PENNART H, SZÖLLÖSI D, MARO B. Inhibition of protein kinase by 6-dimethylaminopurine accelerates the transition to interphase in activated mouse oocytes. *J Cell Sci* 1993; **104**: 861–872.
- [66] LORCA T, GALAS S, FESQUET D, DEVAULT A, CAVADORE J-C, DOREE M. Degradation of the proto-oncogene product p39mos is not necessary for cyclin proteolysis and exit from meiotic metaphase: requirement for a Ca²⁺-calmodulin dependent event. *EMBO J* 1991; **10**: 2087–2093.
- [67] KOPECNY V, PAVLOK A. Autoradiographic study of mouse spermatozoon arginine-rich nuclear protein in fertilization. *J Exp Zool* 1975; **191**: 85–96.
- [68] ADENOT PG, SZÖLLÖSI MS, GEZE M, RENARD J-P, DEBEY P. Dynamics of paternal chromatin changes in live one-cell mouse embryo after natural fertilization. *Mol Reprod Dev* 1991; **28**: 23–32.
- [69] ABRAMCZUK J, SAWICKI N. Pronuclear synthesis of DNA in fertilized and parthenogenetically activated mouse eggs. *Exp Cell Res* 1975; **92**: 361–372.
- [70] BOLTON VB, OADES PJ, JOHNSON MH. The relationship between cleavage, DNA replication, and gene expression in the mouse 2-cell embryo. *J Embryol Exp Morphol* 1984; **79**: 139–163.
- [71] HARA K, TYDEMANN P, KIRSHNER M. A cytoplasmic clock with the same period as the division cycle in *Xenopus* eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; **77**: 462–466.
- [72] RANKIN S, KIRSCHNER MW. The surface contraction waves of *Xenopus* eggs reflect the metachronous cell-cycle state of cytoplasm. *Curr Biol* 1997; **7**: 451–454.

- [73] YONEDA M, YAMAMOTO K. Periodicity of cytoplasmic cycle in non-nucleate fragments of sea urchin and starfish eggs. *Dev Growth Differ* 1985; **27**: 385–391.
- [74] WAKSMUNDZKA M, KRYSIAK E, KARASIEWICZ J, CZOŁOWSKA R, TARKOWSKI AK. Autonomous cortical activity in mouse eggs controlled by cytoplasmic clock. *J Embryol Exp Morphol* 1984; **79**: 77–96.
- [75] CIEMERYCH MA. Chromatin condensation activity and cortical activity during the first three cell cycles of a mouse embryo. *Mol Reprod Dev* 1995; **41**: 416–424.
- [76] FLACH G, JOHNSON MH, BRAUDE PR, TAYLOR RAS, BOLTON VN. The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. *EMBO J* 1982; **1**: 681–686.
- [77] MINSHULL J, GOLSTEYN R, HILL CS, HUNT T. The A- and B-type cyclin associated cdc2 kinases in *Xenopus* turn on and off at different times in the cell cycle. *EMBO J* 1990; **9**: 2865–2875.
- [78] PINES J, HUNTER T. Human cyclin A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *J Cell Biol* 1991; **115**: 1–17.
- [79] CIEMERYCH MA, CZOŁOWSKA R. Differential chromatin condensation of female and male pronuclei in mouse zygotes. *Mol Reprod Dev* 1993; **34**: 73–80.
- [80] DYBAN AP, SOROKIN AV. A comparison of the size of paternal and maternal homologous chromosomes during the first two cleavage divisions in mice. *Ontogenese* 1983; **14**: 238–245.
- [81] KALAB P, KUBIAK JZ, VERLHAC M-H, COLLEDGE WH, MARO B. Activation of p90rsk during meiotic maturation and first mitosis in mouse oocytes and eggs: MAP kinase-independent and -dependent activation. *Development* 1996; **122**: 1957–1964.
- [82] LI X, NICKLAS RB. Mitotic forces control a cell cycle checkpoint. *Nature* 1995; **373**: 630–632.
- [83] NICKLAS RB, WARD SC, GORBSKY GJ. Kinetochore chemistry is sensitive to tension and may link mitotic forces to a cell cycle checkpoint. *J Cell Biol* 1995; **130**: 929–939.
- [84] GORBSKY GJ, RICKETTS WA. Differential expression of a phosphoepitope at the kinetochores of moving chromosomes. *J Cell Biol* 1993; **122**: 1311–1321.
- [85] GORBSKY G.J. Cell cycle checkpoints: arresting progress in mitosis. *BioEssays* 1997; **19**: 193–197.
- [86] WHITFIELD WGF, GONZALEZ C, MALDONADO-CODINA G, GLOVER D. The A- and B-type cyclins of *Drosophila* are accumulated and destroyed in temporally distinct events that define separable phases of the G2-M transition. *EMBO J* 1990; **9**: 2563–2572.
- [87] HUNT T, LUCA FC, RUDERMAN JV. The requirements for protein synthesis and degradation and the control of destruction of cyclin A and B in the meiotic and mitotic cell cycles of the clam embryo. *J Cell Biol* 1992; **116**: 707–724.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 09.03. 1998 r.

Przyjęto: 30. 04. 1998 r.

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

KONTROLA REPLIKACJI DNA W CYKLU KOMÓRKOWYM*

CELL CYCLE CONTROL OF DNA REPLICATION

Janusz MASZEWSKI, Justyna POLIT

Katedra Cytofizjologii, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie: W komórkach eukariotycznych, replikacja DNA oraz mitotyczna segregacja chromosomów podlegają ścisłej kontroli. W procesie inicjacji fazy S wyróżnić można dwa główne etapy: (1) montażu czynników niezbędnych dla nadania chromatynie stanu kompetencji oraz (2) aktywacji cyklino-zależnych kinaz białkowych. Kontrolne mechanizmy molekularne, koordynujące te stadia, zapewniają jednorazową replikację genomu w każdym cyklu. W pracy przedstawiono wybrane, najnowsze informacje dotyczące regulacji fazy S, zebrane głównie na podstawie badań komórek drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) oraz badań prowadzonych z wykorzystaniem bezkomórkowych ekstraktów cytoplazmatycznych z jaj *Xenopus*.

Słowa kluczowe: replikacja DNA, faza S, cykl komórkowy, kinazy cyklino-zależne.

Summary: In Eukaryotes, the initiation of DNA replication and segregation of chromosomes is controlled rigorously. The initiation of S phase can be considered as a two step process, including (1) assembly of factors needed to transform chromatin into replication-competent state, and (2) activation of cyclin-dependent protein kinases. The molecular control mechanisms that provide coordination of these steps determine that replication occurs only once per cell cycle. In this review, recent progress, based primarily on studies using yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) and cell-free extracts from *Xenopus* egg cytoplasm is discussed.

Key words: DNA replication, S phase, cell division cycle, cyclin-dependent kinases.

WSTĘP

Replikacja jądrowego DNA w komórkach eukariotycznych przebiega w ściśle wyodrębnionym przedziale czasu – fazie S, jednak usytuowanie tego okresu w

*Praca finansowana w części z funduszków grantu KBN 6 P203 047 06.

cyklu komórkowym jest w znacznym stopniu zróżnicowane. Odstępstwa od standardowego schematu, w którym faza G1 poprzedza proces powielania genomu, a faza G2 mitotyczną kondensację chromosomów, stosunkowo często spotykane są u niższych *Eukaryota* [7]. U *Chlorella* i *Chlamydomonas* większą część cyklu stanowi wydłużona faza G1, natomiast replikacja DNA następuje bezpośrednio przed podziałem komórki. W plazmodiach śluzowców *Physarum* i *Dictyostelium* cykle jądrowe pozbawione są fazy G1, a replikacja DNA rozpoczyna się zaraz po zakończeniu mitozy; większą część interfazy stanowi długi okres G2. Brak fazy G1 charakteryzuje także synchroniczne cykle komórkowe w niciach spermatogenicznych ramienic [58, 73]. U orzęsków *Paramecium* i *Tetrahymena* w mikro- i makronukleusach różnie usytuowane są nie tylko okresy syntezy DNA, ale także różne są relacje czasowe między ich replikacjami [7].

Zróżnicowanie czasu trwania syntezy DNA jądrowego i momentu jej inicjacji w cyklu komórkowym charakteryzuje także rośliny i zwierzęta na znacznie wyższych poziomach organizacji. Wczesne etapy embriogenezy owadów dwuskrzydłych i płazów to – z reguły – cykle przemiennie następujących po sobie okresów replikacji DNA i mitozy, nie rozdzielonych fazą G1 i G2 [47, 72]. W pierwszych stadiach rozwoju zarodkowego u *Drosophila* faza S trwa 4 min, a u *Xenopus* 25 min. W dalszych etapach rozwoju embrionalnego pojawia się faza G1 i G2, jednocześnie wzbudzana jest synteza RNA, a okres replikacji DNA w mitotycznie dzielących się komórkach dorosłych organizmów wydłuża się do kilku i kilkunastu godzin. Prawdopodobnie, to właśnie brak aktywności transkrypcyjnej jąder we wczesnych stadiach rozwoju (a ściślej brak konieczności koordynowania ruchu cząsteczek polimerazy RNA i polimerazy DNA na wspólnej matrycy genowej) umożliwia uruchomienie wszystkich, nawet blisko siebie leżących miejsc inicjacji replikacji (tzw. regiony *origins*), a tym samym maksymalne zdynamizowanie przebiegu cykli jądrowych [47]. Mimo tak istotnych różnic międzygatunkowych i ontogenetycznych, realizacja procesów związanych z replikacją DNA w fazie S podlega ścisłej kontroli i określonym, powszechnie obowiązującym regułom:

1. Inicjacja replikacji DNA nie może nastąpić przedwcześnie. Rozpoczęcie fazy S determinuje najczęściej przyszłą mitozę. Faza G1 jest więc okresem, w którym musi zapaść decyzja, czy cykl będzie kontynuowany i zakończony kolejnym podziałem, czy też komórka ma wyjść z cyklu i w wyniku procesu różnicowania podjąć nowe, wyspecjalizowane funkcje. Ponadto, przedwczesna inicjacja syntezy DNA w komórce nie przygotowanej pod względem energetycznym lub pozbawionej odpowiedniego zestawu enzymatycznego groziłaby możliwością powstania błędów replikacyjnych [40, 74]. Swoistym mechanizmem zabezpieczającym przed zbyt wczesną inicjacją fazy S jest system kontroli wielkości komórki, poznawany coraz lepiej na podstawie biochemicznych i genetycznych badań drożdży. Zmiany stanu metabolicznego komórki sprzężone są w tym systemie z kaskadowymi reakcjami wyzwalanymi przez kinazy MAP, modyfikacje aktywatorów i represorów głównych

kinaz białkowych cyklu komórkowego oraz fosforylacje i defosforylacje kompleksów związanych z cyklinami [4, 62, 75].

2. Replikacja każdej cząsteczki DNA może się odbyć raz i tylko jeden raz podczas każdej fazy S. Komórki prokariotyczne „rozwiązują” ten problem włączając wszystkie sekwencje swojego genomu w pojedynczy, kolisty chromosom, który powielany jest za pomocą pary widełek replikacyjnych. W każdym cyklu rozchodzą się one z jednego tylko miejsca inicjacji (*ori*) [71] i ponownie spotykają w regionie zawierającym sekwencje *ter* (lub *Ter*; ang. *DNA replication terminus*; [33]); w rezultacie podwojenie genomu bakteryjnego o przeciętnych rozmiarach (np. u *E. coli*) zajmuje co najmniej 40 minut. Komórki eukariotyczne kopiują swoje chromosomy wykorzystując jednocześnie liczne miejsca inicjacji (od 10^3 do 10^5 w każdym jądrze) rozmieszczone wzdłuż liniowych cząsteczek DNA, przez co cały materiał genetyczny ulega syntezie w znacznie krótszych odcinkach czasu. Taka strategia replikacji wymaga jednak mechanizmu chroniącego miejsca inicjacji funkcjonujące we wczesnych stadiach fazy S (*“early” replicons*) przed ich ponownym uruchomieniem podczas dalszych etapów fazy S (*“late” replicons*) w tym samym cyklu komórkowym [22].

3. Mitotyczny podział jądra nie może nastąpić przedwcześnie, tj. przed zakończeniem replikacji. Uzależnienie momentu rozpoczęcia mitozy od zakończenia replikacji DNA zapewnia połączenie każdej z siostrzanych chromatyd, tworzących się podczas tej samej fazy S, z przeciwległymi biegunami wrzeciona podziałowego [22].

KINAZY CDK A STAN REPLIKACYJNEJ KOMPETENCJI CHROMATYNY

Spełnienie każdego z przedstawionych wcześniej warunków (a zarazem wszystkich łącznie) jest podstawą stabilnego poziomu ploidalności jąder komórkowych, a tym samym niezmienności osobniczych programów rozwoju oraz informacji genetycznej przekazywanej w kolejnych pokoleniach organizmów. Przemienność replikacji i mitozy oraz aktywacja specyficznych kinaz białkowych sugerowała możliwość funkcjonowania całkowicie odrębnych mechanizmów kontrolnych, z których jeden uzależnia moment inicjacji fazy S od zakończenia podziału chromosomów, drugi zaś zapewnia jednokrotne tylko uruchomienie każdego z licznych miejsc inicjujących proces syntezy DNA. Wyniki najnowszych badań ujawniają jednak między tymi mechanizmami system wzajemnych związków [22, 93].

Istnienie czynników modyfikujących zdolność do replikacji DNA jądrowego ujawniono po raz pierwszy w doświadczeniach polegających na fuzji komórek w różnych stadiach interfazy [80]. W hybrydach komórek G1/S, jądro niezreplikowane (G1) ulega natychmiastowej stymulacji do syntezy DNA. Indukcja taka nie zachodzi

w przypadku jakiegokolwiek z dwu innych możliwych połączeń: jądro G1 nie jest indukowane do replikacji przez komórkę znajdującą się w fazie G2, a jądro G2 nie ulega aktywacji w wyniku hybrydowego złączenia z komórką w fazie S. Wyniki tych doświadczeń wskazują, co następuje:

1. Stan kompetencji do inicjacji syntezy DNA jest wyłącznie cechą komórek będących w fazie G1.

2. Obecność czynnika aktywującego, zdolnego do indukowania replikacji DNA chromosomów kompetentnych (tj. jąder w fazie G1), jest wyłącznie cechą komórek znajdujących się w fazie S (a nie w fazie G1 lub G2).

3. Jądra będące w fazie G2 nie są w stanie ponownie inicjować replikacji DNA do czasu przejścia przez mitozę.

Procesy inicjacji fazy S i mitozy skorelowane są z aktywacją czynników indukujących: SPF (ang. *S-phase promoting factor*) – w późnej fazie G1 i MPF (ang. *M-phase promoting factor*) – w późnej fazie G2 [40, 41]. Czynniki te należą do grupy kinaz białkowych, których biologiczna efektywność zależy od ich połączeń z niestabilnymi podjednostkami regulatorowymi – cyklinami [65]. Aktywności cyklo-zależnych kinaz (CDK), specyficznych dla fazy S (S-CDK) i mitozy (M-CDK) zmieniają się w cyklu komórkowym, nasilając odpowiednio w początkowym okresie replikacji DNA i początkowym okresie mitozy. Brak stosownej kinazy CDK blokuje fazę S lub mitozę, natomiast przyspieszenie aktywacji CDK prowadzi do wcześniejszej inicjacji syntezy DNA albo przedwczesnej kondensacji chromosomów.

Wśród mechanizmów regulacji aktywności różnych typów CDK do najważniejszych należą zmiany w dynamice transkrypcji genów cyklin [56], różnicowanie poziomu białek inhibitorowych [88], blokowanie i fosforylacja podjednostek CDK [21], a także proteoliza cyklin. Ten ostatni mechanizm, prowadzący do gwałtownej degradacji cyklin mitotycznych podczas anafazy (warunkujący wyjście komórki z mitozy), wydaje się mieć charakter szczególnie konserwatywny [3, 27, 38, 39, 61, 96, 94].

W komórkach drożdży, katalitycznym składnikiem złożonego kompleksu CDK-cykлина, funkcjonującym zarówno podczas inicjacji fazy S jak i mitozy, jest tylko jeden rodzaj kinazy – Cdk1, znanej jako Cdc28 u *Saccharomyces cerevisiae* i Cdc2 u *Schizosaccharomyces pombe* [28, 52]. Na podstawie podobieństw sekwencji aminokwasowych, wzorów ekspresji w przebiegu cyklu komórkowego oraz cech funkcjonalnych wśród 11 poznanych dotąd cyklin *S. cerevisiae* wyróżnia się 2 grupy. Do pierwszej z nich należą cykliny typu G1 (*G1-type cyclins*): Cln1-3, OrfD i Hsc26; do drugiej cykliny typu B (*B-type cyclins*): Clb1-6. Wszystkie cykliny typu G1, a także Clb5 i Clb6 (zaliczane do cyklin typu B fazy S) zaangażowane są w procesach replikacji DNA, pączkowania i podwajania biegunowych ciałek wrzeciona, natomiast 4 cykliny typu B (Clb1-4; zaliczane do cyklin fazy G2-M) niezbędne są przy inicjacji mitozy [22, 52]. Chociaż każda z 11 cyklin *S. cerevisiae* jest w stanie łączyć się z kinazą Cdc28, żadna z nich osobno nie jest czynnikiem

bezwzględnie koniecznym dla inicjacji replikacji DNA lub mitozy, ponieważ ich funkcje w znacznym stopniu wzajemnie pokrywają się [66]. Delecja genów *CLB5* i *CLB6* opóźnia rozpoczęcie fazy S, natomiast przedwczesna aktywacja kompleksu kinazy Clb5-Cdk1 w komórkach G1 przyspiesza inicjację fazy S [88]. Wyniki te sugerują, że w przypadku braku Clb5 i Clb6 ich role przejmują cykliny Clb1-Clb4, a jedną z funkcji kompleksów kinaz Cln-Cdk1 w procesach poprzedzających inicjację fazy S jest aktywacja kompleksów kinaz Clb-Cdk1. Ponadto, ekspresja genów cyklin mitotycznych Clb2 w komórkach pozbawionych Cln1, Cln2 i Cln3 prowadzi najpierw do replikacji DNA i – dopiero jako efekt wtórny – do mitozy [3]. Tak więc, cykliny typu B, których funkcje wiązano początkowo wyłącznie z inicjacją mitozy, wykazują zarazem zdolność do indukowania fazy S, a cykliny typu B, których głównym zadaniem jest inicjowanie fazy S, podejmować mogą role typowe dla cyklin mitotycznych (np. przyspieszając proces formowania wrzeciona podziałowego).

Przedstawione wyżej badania genetyczne wskazują, że zróżnicowana aktywacja kompleksów Cln-Cdc28 i Clb-Cdc28 nie może być jedynym lub decydującym czynnikiem kontrolnym, który określa następstwo faz w cyklu i wzajemne ich relacje czasowe, a kolejne mobilizowanie tych kompleksów nie może stanowić głównego i niezawodnego systemu ochrony genomu przed jego ponowną syntezą. Obecnie dominuje pogląd, że za sprawność tego systemu odpowiedzialna jest przede wszystkim funkcjonalna organizacja miejsc inicjujących replikację.

Związki między czynnikami warunkującymi stan kompetencji chromatyny a miejscami inicjującymi syntezę DNA jądrowego w komórkach zwierzęcych nie są jeszcze dobrze poznane, przede wszystkim ze względu na trudności w identyfikowaniu sekwencji nukleotydów biorących udział w tych procesach. Sekwencje takie scharakteryzowane zostały w komórkach *S. cerevisiae*, gdzie replikacja DNA inicjowana jest w 300–400 miejscach; aktywność każdego z nich wiąże się z obecnością tzw. autonomicznie replikujących sekwencji – ARS (ang. *autonomously replicating sequences*), liczących od 100 do 200 par zasad [14, 67]. W jądrach komórek *S. cerevisiae*, odcinkiem warunkującym zdolność regionu "origin" do inicjowania replikacji DNA jest fragment zawierający element A (złożony z 11 par zasad) oraz ograniczające go, sąsiednie elementy B: B1, B2, B3 [35, 57, 79]. Z elementem A, stanowiącym tzw. sekwencję zgodności z ARS (ACS – ang. *ARS consensus sequence*) i elementem B1 wiąże się złożony czynnik białkowy o masie 250 kDa, zwany kompleksem rozpoznającym miejsce inicjacji replikacji (ORC; ang. *origin recognition complex*). Wraz z elementem B2, sekwencje A i B1 stanowią rdzeniową jednostkę „replikatora”. Rolę wzmacniacza pełni element B3, przyłączający białkowy czynnik wiążący ARS – Abf1 (ang. *ARS-binding Factor 1*) [12, 25].

ORC jest kluczowym elementem systemu kontroli replikacji DNA w komórkach eukariotycznych. W jego skład wchodzi 6 podjednostek polipeptydowych Orc1-6 o poznanych sekwencjach genowych [6, 51]. W warunkach restrykcyjnych szczepki komórek *S. cerevisiae* z wrażliwymi na temperaturę mutacjami w obrębie genów

ORC2 i *ORC5* tracą plazmidy wyposażone w sekwencje ARS, a własny genom replikują z licznymi błędami [51, 59]. Defekty obu tych genów powodują także wyraźną redukcję liczby aktów inicjacji w obrębie replikatorów wyposażonych w odcinki ARS [29, 50]. Przyłączenie ORC w regionie ARS odciska charakterystyczny ślad (*footprint*), wywołujący nadwrażliwość sąsiadujących sekwencji (elementów B) na działanie DNazy I [25, 26]. Mimo utrzymywania się kompleksów ORC w miejscach inicjujących replikację DNA podczas całego cyklu komórkowego, podatność na działanie DNazy I pojawia się w początkowych stadiach fazy S, utrzymuje w czasie fazy G2 i mitozy aż do anafazy, a zanika w okresie przejścia mitozy → faza G1 [26, 85]. W procesie organizującym prereplikacyjną postać chromatyny nieodzowny jest więc udział jeszcze innego czynnika zdolnego do wiązania się z kompleksem ORC w obrębie sekwencji *origin* w rozdzielonych zespołach chromatyd siostrzanych, z których każdy formuje dwa potomne jądra komórkowe.

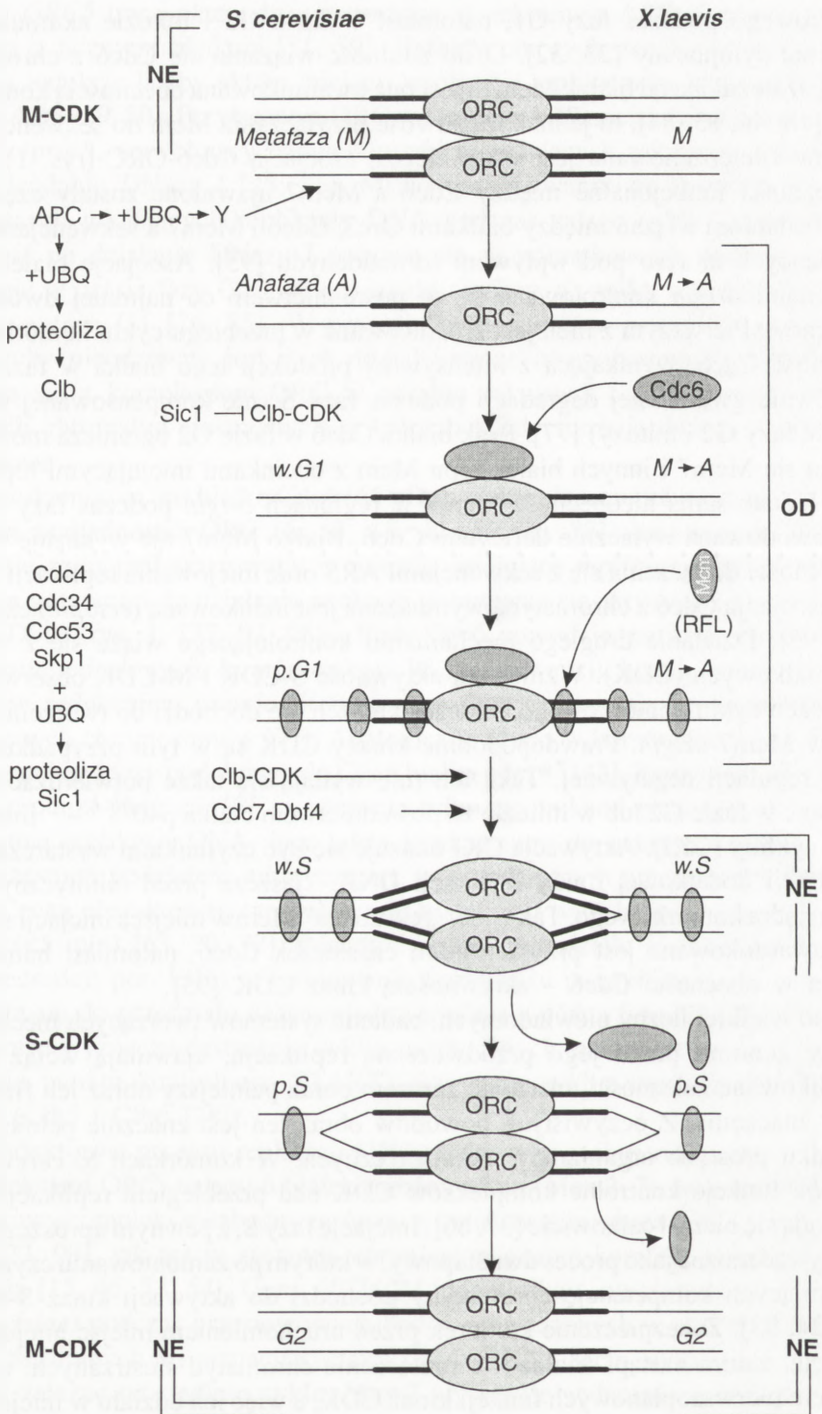
Czynnikiem tym jest białko Cdc6 (61 kDa), wykazujące podobieństwo sekwencji do dużej podjednostki ORC [6, 17, 18, 42, 50, 70, 78]. Jego syntezę *de novo* uznaje się za sygnał skierowany w miejsca inicjujące replikację, „przełączający” je w stan gotowości do działania w chwili pojawienia się aktywnych kinaz S-CDK i Cdc7-Dbf4 (rys. 1; [77, 93, 95]). Brak Cdc6 powoduje zanik replikacji DNA, nie blokuje jednak cyklu komórkowego. W konsekwencji, komórki wprowadzone zostają w redukcyjną, pseudomitotyczną anafazę i zamierają po segregacji niepodwojonych chromosomów [77]. Analogiczne skutki w komórkach *S. pombe* wywołuje zanik syntezy podobnego do Cdc6 białka *cdc18⁺* [42]. Zarówno białko Cdc6, jak też produkt genu *cdc18⁺* są więc nie tylko czynnikami niezbędnymi podczas inicjowania replikacji DNA, lecz także koniecznymi do ochrony komórki przed zbyt wczesnym podziałem mitotycznym, wyprzedzającym proces podwojenia genomu. Cechą charakterystyczną obu tych białek jest wyjątkowo krótki okres półtrwania (<5 min) [63, 70, 77]. Ponadto, możliwość udziału białka Cdc6 (ale nie jego obecności; por. [95]) w formowaniu kompleksu prereplikacyjnego wyraźnie ogranicza się do przedziału czasu między anafazą a późną fazą G1 [78]. Początek tego okresu wyznacza destrukcja cyklin mitotycznych, natomiast koniec (po przekroczeniu punktu kontrolnego START) aktywacja cyklin związanych z funkcją S-CDK (C1b5 i C1b6 [78]).

Do induktorów procesu replikacji DNA, które w sposób periodyczny wiążą się z kompleksami ORC, należy 6 białek rodziny Mcm (Mcm2–7), tworzących wieloskładnikowy kompleks niezbędny zarówno w indukowaniu syntezy DNA w regionach *origin* [23, 99], jak też w systemie chroniącym genom komórki przed powtórna replikacją [15, 46, 53, 54]. Geny *MCM/PI* zidentyfikowano pierwotnie u drożdży (*S. cerevisiae*) podczas przesiewowych badań prowadzonych w poszukiwaniu mutantów niezdolnych do inicjacji syntezy DNA. Białka Mcm wykazują zmiany lokalizacji zależne od stadium cyklu; Mcm7 występuje wyłącznie w obszarze jądra

komórkowego podczas fazy G1, natomiast w fazie G2 i mitozie akumuluje się na terenie cytoplazmy [23, 32]. O ile zdolność wiązania się Cdc6 z chromatyną nie jest uzależniona od białek Mcm (a jest ona uwarunkowana obecnością kompleksu ORC) [18, 46, 83, 84], to jednak możliwość przyłączania Mcm do sekwencji ARS wyraźnie zdeterminowana jest wcześniejszą asocjacją Cdc6-ORC (rys. 1).

Zależności funkcjonalne między Cdc6 a Mcm7 ujawnione zostały częściowo dzięki badaniom wiązań między białkami Orc2, Cdc6 i Mcm7 a sekwencjami ARS zachodzących *in vivo* pod wpływem formaldehydu [95]. Asocjacje białek Mcm z regionami *origin* kontrolowane są za pośrednictwem co najmniej dwóch mechanizmów. Pierwszym z nich jest zróżnicowana w przebiegu cyklu komórkowego dostępność Cdc6, wynikająca z intensywnej produkcji tego białka w fazie G1 i jego równie gwałtownej degradacji podczas fazy S (nie kompensowanej syntezą w czasie fazy G2 i mitozy) [77]. Brak białka Cdc6 w fazie G2 ogranicza możliwość łączenia się Mcm7 i innych białek typu Mcm z odcinkami inicjującymi replikację DNA. Jednak sama nieobecność Mcm7 w regionach *origin* podczas fazy G2 nie jest spowodowana wyłącznie deficytem Cdc6. Białko Mcm7 nie wykazuje w fazie G2 zdolności do łączenia się z sekwencjami ARS oraz inicjowania replikacji, nawet jeżeli asocjacja Cdc6 z chromatyną wymuszona jest indukowaną (*ectopic*) ekspresją Cdc6 [95]. Działanie drugiego mechanizmu kontrolującego wiąże się z funkcją kinaz białkowych (CDK). Wzmoczoną aktywność S-CDK i M-CDK obserwuje się w okresach cyklu komórkowego, podczas których nie dochodzi do tworzenia kompleksów Mcm7-*origin*. Prawdopodobnie kinazy CDK są w tym przypadku czynnikami regulacji negatywnej. Taką ich rolę wydają się także potwierdzać efekty wywołane w fazie G2 lub w mitozie za pośrednictwem białka p40^{Sic1} – inhibitora kinazy cykliny (CKI). Aktywacja CKI okazuje się być czynnikiem wystarczającym do indukcji dodatkowej rundy replikacji DNA, jeszcze przed mitotycznym podziałem jądra komórkowego. Tak więc, „rekrutacja” Mcm w miejsca inicjacji syntezy DNA uwarunkowana jest przyłączeniem cząsteczek Cdc6, natomiast hamowana – nawet w obecności Cdc6 – aktywnością kinaz CDK [95].

Mimo wielkiej liczby niewiadomych, badania systemów tworzących mechanizm ochrony genomu przed jego przedwczesną replikacją, ujawniają wciąż nowe, skomplikowane zależności, ukazując zarazem coraz pełniejszy obraz ich fizjologicznego znaczenia. Z oczywistych powodów obraz ten jest znacznie pełniejszy w przypadku prostych organizmów eukariotycznych. W komórkach *S. cerevisiae* i *S. pombe* funkcje kontrolne kompleksów CDK nad przebiegiem replikacji DNA pokrywają się niemal całkowicie [37, 66]. Inicjację fazy S, z pewnym uproszczeniem, rozpatrywać można jako proces dwuetapowy, w którym po zamontowaniu czynników warunkujących kompetencję chromatyny dochodzi do aktywacji kinaz S-CDK i Cdc7 [24, 93]. Zabezpieczenie komórek przed uruchomieniem miejsc inicjujących replikację, zanim nastąpi anafazowe rozłączenie chromatyd siostrzanych, nie jest wynikiem pierwszoplanowych funkcji kinaz CDK, a więc ich udziału w inicjowaniu



syntezy DNA. Przede wszystkim jest ono wynikiem zdolności tych kinaz do blokowania możliwości nabycia kompetencji do replikacji [22]. Aktywność kinaz CDK utrzymuje się od początku fazy S aż do chwili rozpadu cyklin mitotycznych podczas anafazy, a ich stała obecność w tym okresie prawdopodobnie chroni miejsca inicjacji przed przełączeniem w stan replikacyjnej gotowości. Białka Cdc6 i Mcm7 są czynnikami promocji stanu kompetencji podczas fazy G1, gdy kinazy S-CDK i M-CDK są nieaktywne [78]. Tak więc, uruchomienie miejsc inicjacji uzależnione jest od następstwa dwu okresów: najpierw okresu niskiej aktywności CDK (możliwe jest wówczas uzyskanie stanu kompetencji chromatyny), później zaś okresu wysokiej aktywności CDK (wówczas dopiero możliwa staje się inicjacja syntezy w kompetentnych sekwencjach *origin*; rys. 1). Ponieważ ten drugi etap procesu inicjacji syntezy DNA blokuje zarazem etap pierwszy, miejsca inicjacji uruchomione mogą zostać tylko jeden raz w całym cyklu kinaz CDK [95].

Warunkiem wstępnym tworzenia specyficznych wiązań z czynnikami umożliwiającymi replikację DNA, mitotyczną kondensację oraz segregację chromosomów jest określona forma przestrzenna chromatyny. Ośrodkiem regulacji zmiennej architektury genomu, stwarzającym możliwość formowania systemu okresowego pobudzania i hamowania aktywności replikacyjnej (zgodnego z rytmem cyklu komórkowego), jest sieć struktur macierzy jądrowej. Na tym strukturalnym poziomie regulacji cyklu najwyraźniej rysują się różnice między komórkami grzybów i wyższych organizmów eukariotycznych. W przeciwieństwie do komórek *Metazoa*, podział zreplikowanego jądra komórkowego u *S. cerevisiae* i *S. pombe* przebiega bez naruszenia integralności otoczki jądrowej. Być może to właśnie tłumaczy względną niezależność procesu aktywacji sekwencji *origin* u drożdży od ich wyposażenia w regiony MAR (ang. *matrix attachment region*) [2].

RYSUNEK 1. Model przedstawiający wybrane mechanizmy kontroli replikacji DNA na tle głównych etapów cyklu komórkowego u Eukaryota (*S. cerevisiae* i *Xenopus laevis*). Kompleks ORC rozpoznający sekwencje *origin* związany jest z odcinkami ARS (linie pogrubione) przez cały cykl komórkowy (z wyjątkiem pewnych elementów ORC u *Xenopus*; [18]). Na początku anafazy chromatydy siostrzane rozłączają się; w procesie tym uczestniczy kompleks APC (ang. *anaphase-promoting complex*), który przy udziale ubikwiny (UBQ) powoduje proteolizę czynnika (Y) blokującego segregację chromosomów. W anafazie, APC współuczestniczący z UBQ w procesie degradacji cyklin (Clb) redukuje aktywność kompleksów M-CDK (Clb-CDK). Między anafazą a późną fazą G1 (p. G1) u *S. cerevisiae* i w czasie przejścia metafaza→anafaza (M→A) u *Xenopus*, przy braku aktywności CDK, rozpoczyna się okres dostępności (OD) początkowo dla białka Cdc6, później dla białek Mcm (i RLF u *Xenopus*). Brak aktywności CDK (Clb-CDK) wiąże się dodatkowo z obecnością białka Sic1, które przy przejściu komórek do fazy S degradowane jest przy udziale białek Cdc4, Cdc34, Cdc53 i UBQ. Możliwa staje się aktywacja kinaz fazy S (S-CKD; Clb-CDK), które wraz z kompleksem Cdc7-Dbf4 inicjują wczesne stadia replikacji DNA (w.S). Odłączenie białek Cdc6 i Mcm (RLF) oraz aktywacja S-CDK, a następnie M-CDK, blokuje możliwość resyntezy DNA w dalszych etapach fazy S (p.S) i fazy G2. Przebieg całego cyklu komórkowego u *S. cerevisiae* zachodzi bez naruszenia integralności otoczki jądrowej (NE). U *Xenopus laevis* okres dostępności (OD) chromatyny dla Cdc6 i białek Mcm przypada na krótkie stadia przejściowe między metafazą i anafazą (M→A), przed odbudową NE. Model opracowano na podstawie publikacji: [43], [93], [18] i innych.

CZYNNIK ZEZWALAJĄCY NA REPLIKACJĘ DNA (RLF)

Strukturalne uwarunkowania procesu replikacji ujawniają się szczególnie wyraźnie w badaniach *in vitro*, wykorzystujących cytoplazmę komórek jajowych *Xenopus laevis* jako medium, w którym egzogenny DNA pozbawiony białek ulega stopniowo przekształceniu w nukleosomową postać chromatyny, następnie – przy udziale topoiizomerazy II – kondensuje formując domenowe jednostki wyższego rzędu, a w końcu, po związaniu się z białkami macierzy organizuje „pseudojądra” [1, 12]. Warunkiem koniecznym do rozpoczęcia syntezy DNA jest oddzielenie spontanicznie tworzących się „syntetycznych” jąder od cytoplazmy kompletną, dwubłonową otoczką. Po zainicjowaniu replikacji, zawartość DNA w każdym z pseudojąder ulega podwojeniu, jednak proces syntezy odbywa się tylko jednokrotnie.

Doświadczenia prowadzone z użyciem bezkomórkowego „modelu *Xenopus*” wykazały, że zarówno mechanizm wzbudzający syntezę DNA, jak i mechanizm ochrony jądra komórkowego przed jego ponowną syntezą wiąże się z działaniem dwóch odrębnych sygnałów replikacyjnych [8, 9, 10, 12, 15, 16]. Pierwszy z nich, tzw. „czynnik zezwalający na replikację” – RLF (ang. *replication licensing factor*) – sprawia, że sekwencje *origin* zostają wprowadzone w stan gotowości do syntezy DNA (*initiation-competent state*). Aktywność RLF uzależniona jest m.in. od przyłączenia do chromatyny białek ORC, Cdc6 i Mcm. Inicjację replikacji w uformowanych jądrach oddzielonych od cytoplazmy kompletną otoczką uruchamia drugi czynnik – SPF; równocześnie jednak powoduje on zniesienie stanu kompetencji wywołanego wcześniejszą aktywnością RLF. Powielenie DNA jądrowego zależy więc od następstwa obu procesów i nie mogą one przebiegać jednocześnie.

Zgodnie z modelem proponowanym przez Blowa i Laskeya [8, 10], RLF jest czynnikiem pozbawionym sygnału lokalizacji jądrowej (NLS; ang. *nuclear localization signal*). Może on łączyć się z chromatyną wprowadzoną do cytoplazmy *Xenopus* wyłącznie podczas mitozy, przed uformowaniem otoczki jądrowej. Aktywność RLF w przebiegu cyklu komórkowego zmienia się; jest ona wyraźnie ograniczona w metafazie, nasila się gwałtownie w początkowych stadiach anafazy, po czym stopniowo zanika w interfazie [8, 10, 21, 48]. Brak NLS sprawia, że chromatyna interfazowa, oddzielona od cytoplazmy błonami, zostaje pozbawiona szansy na ponowne przyłączenie RLF w kolejnych stadiach cyklu jądrowego. Pojawienie się SPF [11] i jego efektywne działanie indukujące replikację uzależnione jest, z kolei, od zakończenia procesu interfazowej rekonstrukcji jądra [12, 13, 68, 89]. Biologiczna funkcja RLF związana z ochroną jądra przed endoreduplikacją, wynika więc z faktu, że chociaż czynnik ten jest niezbędny w procesie inicjacji syntezy DNA, jest zarazem w chwili inicjacji pozbawiony aktywności. Wykorzystanie licencji udzielonej na powielenie każdego replikatora równoznaczne jest z pozbawieniem ważności tej licencji w stosunku do kolejnego aktu inicjacji syntezy, do czasu

przejścia komórki przez mitozę. W warunkach *in vitro*, wznowienie syntezy w jądrach o podwojonej zawartości DNA (G2) można wywołać także uszkodzeniem mechanicznym ich otoczek bądź też działaniem lizolecytyny [8].

Wysoki poziom MPF w metafazie, indukujący proces mitotycznej kondensacji chromosomów (m.in. zjawisko PCC – ang. *premature chromosome condensation* – w hybrydach komórek G1/M, S/M i G2/M [80]), skorelowany jest z niską aktywnością RLF [8, 55]. Gwałtowny wzrost aktywności RLF następuje po przejściu metafaza → anafaza, wraz z rozpoczęciem procesu proteolitycznej degradacji cyklin. Zdolność do indukowania stanu gotowości chromatyny do resyntezy DNA jest więc odsunięta w czasie i – w wyniku antagonistycznego oddziaływania CDK (MPF) wobec aktywności RLF – pojawia się dopiero po akcie rozłączenia chromatyd siostrzanych (rys. 1).

Biologiczne funkcje RLF u *Xenopus* wynikają z aktywności dwóch głównych frakcji: RLF-M i RLF-B [15]. Wyizolowanie i oczyszczenie RLF-M umożliwiło identyfikację 6 elementów składowych XMcm2-7 (*Xenopus* Mcm2-7) jako polipeptydów należących do rodziny MCM/P1. Przeciwciała anti-XMcm3 wytrącają wszystkie białka MCM/P1 formując kompleks analogiczny do RLF-M [46, 53, 54], a cytoplazmatyczne ekstrakty komórek jajowych zmieszane z tymi przeciwciałami tracą zdolność do indukowania stanu kompetencji chromatyny [15]. Charakter chemiczny drugiej frakcji, RLF-B, nie został jeszcze poznany.

Badania Mahbubani i wsp. [55] wykazały, że niski poziom efektywności RLF w replikacyjnym licencjonowaniu chromatyny wprowadzonej do metafazowych ekstraktów cytoplazmy *Xenopus* (uzyskiwanych z niezapłodnionych komórek jajowych będących w metafazie II podziału mejotycznego) wynika z braku aktywności RLF-B. Frakcję RLF-M charakteryzuje wysoka aktywność, mimo fosforylacji jednego z jej 6 składników – XMcm4 [20]. Proces aktywacji RLF może być zablokowany działaniem niektórych inhibitorów CDK, np. 6-dimetyloaminopuryny (6-DMAP) lub staurosporyny [8]. Ekstrakty metafazowe, zawierające 6-DMAP spontanicznie przekształcają się w „ekstrakty interfazowe” [8, 100], w których egzogenny DNA formowany jest w kompletne pseudojądra. Struktury takie wyposażone są we wszystkie składniki niezbędne do replikacji, z wyjątkiem RLF [8]. Podobne przemiany obserwuje się także po zastosowaniu staurosporyny [8, 45] lub olomucyny [97]. We wszystkich tych przypadkach wykazano ściśle korelacje między blokowaniem obu aktywności: MPF i RLF. Wywołanie efektu bloku w systemie licencjonowania chromatyny przez 6-DMAP uzależnione jest od momentu podania inhibitora; jego działanie nastąpić musi przed przekroczeniem krytycznego stadium przejścia metafaza → anafaza [8, 45]. Wydaje się więc, że inhibitory CDK blokują proces aktywacji RLF zachodzący podczas wyjścia komórki z metafazy, nie wpływają natomiast na efekty wywoływane działaniem aktywnej formy RLF [55]. Zanik aktywności RLF w metafazie związany jest ponadto z obecnością inhibitora RLF, blokującego prawdopodobnie tylko frakcję RLF-B [55]. Ze stopniową redukcją

aktywności RLF-B wiąże się również interfazowa redukcja aktywności RLF; nie jest ona jednak skorelowana z pojawianiem się inhibitora RLF. Jego obecność w metafazowych ekstraktach cytoplazmy *Xenopus* wykazuje wyraźny związek z aktywnością kinaz mitotycznych. Eliminacja MPF (dzięki zastosowaniu procedury wykorzystującej silne powinowactwo tego czynnika do białka p13^{sup1}) powoduje równoczesny zanik inhibitora RLF, natomiast zablokowanie aktywności MPF i stabilizacja cykliny B pod wpływem 6-DMAP przedłuża okres trwania inhibitora RLF i prowadzi do zachowania go w „ekstraktach interfazowych” [55]. Wydaje się więc, że funkcje inhibitora RLF polegają na wspomaganiu głównych mechanizmów chroniących DNA przed jego przedwczesną, ponowną syntezą (tj. nieprzenikalnością otoczki jądrowej dla RLF, kolejnością aktywacji MPF i RLF oraz antagonizmem tych czynników).

Nie ulega wątpliwości, że inny niż u *Xenopus* system kontroli replikacji funkcjonować musi w komórkach, w których mitoza odbywa się wewnątrz otoczki jądrowej (np. u drożdży), inny po przełączeniu cyklu mitotycznego na cykl endoreduplikacyjny, jeszcze inny podczas mejozy. Różne modyfikacje mechanizmów regulacyjnych zaangażowane są w przebiegu cyklu pełnego (z wszystkimi jego fazami) oraz w cyklu „skróconym”, w którym replikacja DNA rozpoczyna się wraz z telofazową dekondensacją chromosomów. Dlatego też wydaje się, że o ile główne czynniki nieodzowne w organizowaniu układów nadzoru nad replikacją genomu są w znacznym stopniu homologiczne, organizacje tych układów różnią się w komórkach *in situ*, w cytoplazmatycznych ekstraktach *in vitro*, a także w komórkach różnych organizmów.

ENDOREDUPLIKACJA DNA

U *Schizosaccharomyces pombe* mitotyczny kompleks kinazy z cykliną B – p34^{cdc2}/p56^{cdc13} – konieczny jest nie tylko do inicjacji mitozy [37], lecz także do hamowania ponownej syntezy DNA. Komórki pozbawione genu *cdc13*⁺ nie tworzą tego kompleksu i w konsekwencji, tracąc zdolność do blokowania fazy S, przechodzą liczne rundy replikacyjne [31]. Tak więc, aktywność p34^{cdc2}/p56^{cdc13} chroni przed rozpoczęciem dodatkowej fazy S, natomiast zanik tej aktywności uwalnia komórkę z bloku i zezwala na inicjację ponownej syntezy DNA. Wysoki poziom ekspresji *cdc2*⁺ i *cdc13*⁺ w komórkach zmuszonych do zatrzymania się w początkowych stadiach fazy G1 prowadzi do przedwczesnej (i letalnej) inicjacji mitozy [31].

Innym czynnikiem różnicującym zdolność komórki *S. pombe* do wejścia bądź to w fazę S, bądź też mitozę jest gen *rum1*⁺. Jego nadekspresja w fazie G2 blokuje inicjację mitozy, stymuluje natomiast liczne rundy replikacji DNA. W przypadku

delecji genu *rum1*⁺, komórki zablokowane w początkowych stadiach fazy G1 przedwcześnie wchodzą w mitozę i giną [60]. Pojawianie się fenotypów tego rodzaju tłumaczyć można jedynie faktem, że gen *rum1*⁺ odpowiedzialny jest za kodowanie inhibitora kinazy p34^{cdc2}/p56^{cdc13} o działaniu zbliżonym do białek klasy p15/p16^{Ink4}, p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, p40^{SIC1} oraz p83^{FAR1} [76, 90]. Dowody potwierdzające tę hipotezę pojawiły się wraz z wynikami badań Correa-Bordesa i Nurse'a [19]. Wykazali oni, że w komórkach zablokowanych we wczesnej fazie G2, eliminacja genu *rum1*⁺ wyraźnie podnosi zazwyczaj niski w tym okresie poziom białka p56^{cdc13} oraz aktywność p34^{cdc2}. Nadekspresja *rum1*⁺ prowadzi do wzmożonej syntezy białka *rum1*, które ulegając asocjacji z kinazą mitotyczną, tworzy warunki indukujące dodatkowe rundy replikacji DNA. Ponieważ aktywność kinazy białkowej p34^{cdc2} (nie związanej z główną cykliną mitotyczną B - p56^{cdc13}) pozostaje względnie stała, sądzić można, że białko *rum1* jest silniejszym inhibitorem aktywności M-CDK, niezbędnej w indukcji mitotycznej, niż aktywności S-CDK koniecznej do inicjowania fazy S [19].

Funkcje wielu cyklin typu B i jednej tylko kinazy CDK u drożdży rozdzielone są w komórkach roślin i zwierząt między cykliny typu A, B i E oraz liczne kinazy CDK [69]. Cykliny A i B akumulują się w późnych stadiach cyklu komórkowego i aktywują *cdk1*. U *Drosophila*, mutacje cykliny A i *cdk1* (*cdc2*) powodują przekształcenie cykli mitotycznych w cykle endoreduplikacyjne [30, 86]. Analogicznie jak w komórkach *S. pombe*, kinazy *cdk1* są w tym przypadku konieczne nie tylko w procesie indukcji samej mitozy, lecz także w kontroli sprzężenia fazy S z mitozą. Należy więc sądzić, że kompleksy *cdk1* u *Drosophila* przedłużają okres blokowania zdolności do ponownej inicjacji replikacji DNA w późnej fazie S i G2 aż do momentu zaniku kompleksu cykliny E/*cdk2*, odpowiedzialnego prawdopodobnie za indukcję przejścia G1→S [44].

Istotnym elementem regulacji procesu akumulowania się cyklin mitotycznych są geny typu *fizy-related* (*fzr*), zidentyfikowane dotychczas u *Drosophila*, *Xenopus* [91, 92] i w komórkach ludzkich [98], a homologiczny do *fzr* gen *HTC1* – w komórkach *S. cerevisiae* [87]. Gen *fzr* niezbędny jest w okresie rozwoju embrionalnego *Drosophila* podczas wychodzenia komórek z cyklu mitotycznego. W zarodkach pozbawionych genu *fzr*, komórki epidermalne po terminalnej mitozie nie zatrzymują się w fazie G1 i rozpoczynają dodatkowy cykl podziałowy, natomiast postmitotyczne komórki gruczołów ślinowych tracą zdolność do inicjowania cykli endoreduplikacyjnych. Zaburzenia te poprzedzone są nadplanową akumulacją cyklin mitotycznych. Odwrotny efekt wywołany jest przedwcześnie wzmożoną ekspresją genu *fzr*. Aktywność cyklin mitotycznych ulega wówczas ograniczeniu, a komórki pozbawione zdolności do wejścia w mitozę inicjują cykle endoreduplikacyjne. Gen *fzr* uczestniczy więc prawdopodobnie w uruchamianiu procesów związanych z destrukcją cyklin w komórkach postmitotycznych, warunkując albo ich zatrzymanie w fazie G1, albo wejście w cykle endoreduplikacyjne ([91], por. także [64]).

PODSUMOWANIE

Coraz więcej argumentów wydaje się potwierdzać pogląd, że kinazy CDK i ich związki z cyklinami są głównymi, a zarazem najbardziej konserwatywnymi elementami systemu kontroli replikacji DNA wszystkich *Eukaryota* [34]. W komórkach drożdży stanowią one podstawę układu regulacyjnego, funkcjonującego w kooperacji z kompleksami ORC, Cdc6, Mcm. U wyższych *Eukaryota* pojawiają się w tym systemie czynniki dodatkowe, towarzyszące zwiększaniu genomu i bardziej złożonym modyfikacjom macierzy jądrowej. Niektóre z nich wiążą się z zanikiem otoczki jądrowej podczas mitozy. Te nowe elementy rozbudowują strukturalno-biochemiczny aparat regulacji syntezy DNA. W komórkach wszystkich organizmów system ten ma charakter wielopoziomowy, a jego niezawodność wynika ze zwielokrotnienia czynników zabezpieczających i działania różnych mechanizmów kontrolujących fizjologiczny stan komórki [36, 49, 81, 82]. Chociaż wiele z nich poznano, wciąż otwarte pozostają problemy związane z przełączaniem cykli mitotycznych na cykle endoreduplikacji, z replikacją różnicującą przyrost niektórych tylko frakcji genomu (ang. *under- i over-replication*), z premejozyczną syntezą DNA oraz zanikiem replikacji między I i II podziałem w czasie mejozy.

LITERATURA

- [1] ALMOUZNI G, WOLFFE AP. Nuclear assembly, structure, and function: the use of *Xenopus in vitro* systems. *Exp Cell Res* 1993; **205**: 1–15.
- [2] AMATI BB, PICK L, LAROCHE T, GASSER S. Nuclear scaffold attachment stimulates, but is not essential for ARS activity in *Scacharomyces cerevisiae*: analysis of the *Drosophila* ftz SAR. *EMBO J* 1990; **9**: 4007–4016.
- [3] AMON A, IRNIGER S, NASMYTH K. Closing the cell cycle circle in yeast: G2 cyclin proteolysis initiated at mitosis persists until the activation of G1 cyclins in the next cycle. *Cell* 1994; **77**: 1037–1050.
- [4] BELENGUER P, PELLOQUIN L, BALDIN V, OUSTRIN ML, DUCOMMUN B. The fission yeast Nim1/Cdr1 kinase: A link between nutritional state and cell cycle control. [w] Meijer L, Guidet S, Tung HYL [red.] *Progress in Cell Cycle Research*, New York: Plenum Press 1995: 207–214.
- [5] BELL SP, STILLMAN B. ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* 1992; **357**: 128–134.
- [6] BELL SP, MITCHELL J, LEBER J, KOBAYASHI R, STILLMAN B. The multidomain structure of Orc1p reveals similarity to regulators of DNA replication and transcriptional silencing. *Cell* 1995; **83**: 563–568.
- [7] BERGER JD. The cell cycle in lower eukaryotes. *Curr Opinion in Cell Biology* 1989; **1**: 256–262.
- [8] BLOW JJ. Preventing re-replication of DNA in a single cell cycle: Evidence for a Replication Licensing Factor. *J Cell Biol* 1993; **122**: 993–1002.

- [9] BLOW JJ, LASKEY RA. Initiation of DNA replication in nuclei and purified DNA by a cell-free extract of *Xenopus* eggs. *Cell* 1986; **47**: 577–587.
- [10] BLOW JJ, LASKEY RA. A role for the nuclear envelope in controlling DNA replication within the cell cycle. *Nature* 1988, **332**: 546–548.
- [11] BLOW JJ, NURSE P. A cdc2-like protein is involved in the initiation of DNA replication in *Xenopus* egg extracts. *Cell* 1990; **62**: 855–862.
- [12] BLOW JJ, SLEEMAN AM. Replication of purified DNA in *Xenopus* egg extract is dependent on nuclear assembly. *J Cell Sci* 1990; **95**: 383–391.
- [13] BLOW JJ, WATSON JV. Nuclei act as independent and integrated units of replication in a *Xenopus* cell-free system. *EMBO J* 1987; **6**: 1997–2002.
- [14] BRUN C, SURDEJ P, MIASSOD R. Relationship between scaffold-attached regions, sequences replicating autonomously in yeast, and a chromosomal replication origin in the *Drosophila* rDNA. *Exp Cell Res* 1993; **208**: 104–114.
- [15] CHONG JPJ, MAHBUBANI MH, KHOO C-Y, BLOW JJ. Purification of an Mcm-containing complex as a component of the DNA replication licensing system. *Nature* 1995; **375**: 418–421.
- [16] CHONG JPJ, THOMMES P, BLOW JJ. The role of MCM/P1 proteins in the licensing of DNA replication. *Trends Biochem Sci* 1996; **21**: 102–106.
- [17] COCKER JH, PIATTI S, SANTOCANALE C, NASMYTH K, DIFFLEY JF. An essential role for the Cdc6 protein in forming the pre-replicative complexes of budding yeast. *Nature* 1996; **379**: 180–182.
- [18] COLEMAN TR, CARPENTER PB, DUNPHY WG. The *Xenopus* Cdc6 protein is essential for the initiation of a single round of DNA replication in cell-free extracts. *Cell* 1996; **87**: 53–63.
- [19] CORREA-BORDES J, NURSE P. p25^{rum1} orders S phase and mitosis by acting as an inhibitor of the p34^{cdc2} mitotic kinase. *Cell* 1995; **83**: 1001–1009.
- [20] COUÉ M, KEARSEY SE, MECHALI M. Chromatin binding, nuclear localization and phosphorylation of *Xenopus* cdc21 are cell-cycle dependent and associated with the control of initiation of DNA replication. *EMBO J* 1996; **15**: 1085–1097.
- [21] COVERLEY D, DOWNES CS, ROMANOWSKI P, LASKEY RA. Reversible effects of nuclear membrane permeabilization on DNA replication: evidence for a positive licensing factor. *J Cell Biol* 1993; **122**: 985–992.
- [22] DAHMANN C, DIFFLEY JF, NASMYTH KA. S-phase-promoting cyclin-dependent kinases prevent re-replication by inhibiting the transition of replication origins to a pre-replicative state. *Curr Biol* 1995; **5**: 1257–1269.
- [23] DALTON S, WHITBREAD L. Cell cycle-regulated import and export of Cdc47, a protein essential for initiation of DNA replication in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 2514–2518.
- [24] DIFFLEY JF. Once and only once upon a time: specifying and regulating origins of DNA replication in eukaryotic cells. *Genes Dev* 1996; **10**: 2819–2830.
- [25] DIFFLEY JFX, COCKER JH. Protein-DNA interactions at a yeast replication origin. *Nature* 1992; **357**: 169–172.
- [26] DIFFLEY JF, COCKER JH, DOWELL SJ, ROWLEY A. Two steps in the assembly of complexes at yeast replication origins *in vivo*. *Cell* 1994; **78**: 303–316.
- [27] DORE M, LE PEUCH C, MORIN N. Onset of chromosome segregation at the metaphase to anaphase transition of the cell cycle. [w] Meijer L, Guidet S, Tung HYL[red.] Progress in Cell Cycle Research. New York, USA: Plenum Press 1995: 309–318.
- [28] FORSBURG SL, NURSE P. Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Annu Rev Cell Biol* 1991; **7**: 227–256.
- [29] FOZ CA, LOO S, DILLIN A, RINE J. The origin recognition complex has essential functions in transcriptional silencing and chromosomal replication. *Genes Dev* 1995; **9**: 911–924.
- [30] HAYASHI S. A cdc2-dependent checkpoint maintains diploidy in *Drosophila*. *Development* 1996; **122**: 1051–1058.

- [31] HAYLES J, FISHER D, WOOLLARD A, NURSE P. Temporal order of S phase and mitosis in fission yeast is determined by the state of the p34^{cdc2}-mitotic cyclin complex. *Cell* 1994; **78**: 813–822.
- [32] HENNESSY KM, CLARK CD, BOTSTEIN D. Subcellular localization of yeast CDC46 varies with the cell cycle. *Genes Dev* 1990; **4**: 2252–2263.
- [33] HORIUCHI T, HIDAKA M, KOBAYASHI T. Termination of chromosome duplication in bacteria. [w] Ishihama A, Yoshikawa H [red.] Control of Cell Growth and Division. Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin 1991:25–46.
- [34] HUA XH, YAN H, NEWPORT J. A role for Cdk2 kinase in negatively regulating DNA replication during S phase in the cell cycle. *J Cell Biol* 1997; **137**:183–192.
- [35] HUANG R-Y, KOWALSKI D. Multiple DNA elements in ARS305 determine replication origin activity in a yeast chromosome. *Nucl Acids Res* 1996; **24**: 816–823.
- [36] HUBERMAN JA. Cell cycle control of initiation of eukaryotic DNA replication. *Chromosoma* 1991; **105**: 419–423.
- [37] HUBERMAN JA. Cell cycle control of S phase: a comparison of two yeasts. *Chromosoma* 1996; **105**: 197–203.
- [38] IRNIGER S, NASMYTH K. The anaphase-promoting complex is required in G1 arrested yeast cells to inhibit B-type cyclin accumulation and to prevent uncontrolled entry into S-phase. *J Cell Sci* 1997; **110**: 1523–1531.
- [39] IRNIGER S, PIATTI S, MICHAELIS C, NASMYTH K. Genes involved in sister chromatid separation are needed for B-type cyclin proteolysis in budding yeast. *Cell* 1995; **81**: 269–277.
- [40] JACOBS T. Control of the cell cycle. *Dev Biol* 1992; **153**: 1–15.
- [41] JESSUS C, OZON R. Function and regulation of cdc25 protein phosphatase through mitosis and meiosis. [w] Meijer L, Guidet S, Tung HYL [red.] Progress in Cell Cycle Research. New York: Plenum Press 1995: 215–228.
- [42] KELLY TJ, MARTIN GS, FORSBURG SL, STEPHEN RJ, RUSSO A, NURSE P. The fission yeast cdc18 gene product couples S phase to START and mitosis. *Cell* 1993; **74**: 371–382.
- [43] KING RW, PETERS J-M, TUGENDREICH S, ROLFE M, HEITER P, KIRSCHNER MW. A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* 1995; **81**: 279–288.
- [44] KNOBLICH JA, SAUER K, JONES L, RICHARSON H, SAINT R, LEHNER CF. Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. *Cell* 1994; **77**: 107–120.
- [45] KUBOTA Y, TAKISAWA H. Determination of initiation of DNA replication before and after nuclear formation in *Xenopus* egg cell-free extracts. *J Cell Biol* 1993; **123**: 1321–1331.
- [46] KUBOTA Y, MIMURA S, NISHIMOTO S, TAKISAWA H, NOJIMA H. Identification of the yeast MCM3-related protein as a component of *Xenopus* DNA Replication Licensing Factor. *Cell* 1995; **81**: 601–609.
- [47] LASKEY RA, FAIRMAN MP, BLOW JJ. S phase of the cell cycle. *Science* 1989; **246**: 609–614.
- [48] LENO GH, DOWNES CS, LASKEY RA. The nuclear membrane prevents replication of human G2 nuclei but not G1 nuclei in *Xenopus* egg extract. *Cell* 1992; **69**: 151–158.
- [49] LI JJ. Once, and only once. *Curr Biol* 1995; **5**: 472–475.
- [50] LIANG C, WEINREICH M, STILLMAN B. ORC and Cdc6p interact and determine the frequency of DNA replication in the genome. *Cell* 1995; **81**: 667–676.
- [51] LOO S, FOZ CA, RINE J, KOBAYASHI R, STILLMAN B, BELL S. The origin recognition complex in silencing, cell cycle progression, and DNA replication. *Mol Biol Cell* 1995; **6**: 741–756.
- [52] MACNEILL SA. Cell cycle control in yeasts. [w] Wessels/ Meinhardt [red.] The Mycota I, Growth, Differentiation and Sexuality. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1994: 3–23.

- [53] MADINE MA, KHOO C-Y, MILLS AD, LASKEY RA. MCM3 complex required for cell cycle regulation of DNA replication in vertebrate cells. *Nature* 1995a; **375**: 421–424.
- [54] MADINE MA, KHOO C-Y, MILLS AD, MUSAHL C, LASKEY RA. Nuclear envelope prevents re-replication by restricting binding of MCM3 to chromatin. *Curr Biol* 1995b; **5**: 1270–1279.
- [55] MAHBUBANI HM, CHONG JPJ, CHEVALIER S, THOMMES P, BLOW JJ. Cell cycle regulation of the replication licensing system: Involvement of a Cdk-dependent inhibitor. *J Cell Biol* 1997; **136**: 125–135.
- [56] MAHER M, CONG F, KINDELBERGER D, NASMYTH K, DALTON S. Cell-cycle-regulated transcription of the *CLB2* gene is dependent on *MCM1* and a ternary complex factor. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 3129–3137.
- [57] MARAHRENS Y, STILLMAN B. A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements. *Science* 1992; **255**: 817–823.
- [58] MASZEWSKI J, KOŁODZIEJCZYK P. Cell cycle duration in antheridial filaments of *Chara* spp. (*Characeae*) with different genome size and heterochromatin contents. *Pl Syst Evol* 1991; **175**: 23–38.
- [59] MICKLEM G, ROWLEY A, HARWOOD J, NASMYTH K, DIFFLEY JF. Yeast origin recognition complex is involved in DNA replication and transcriptional silencing. *Nature* 1993; **366**: 87–89.
- [60] MORENO S, NURSE P. Regulation of progression through the G1 phase of the cell cycle by the *rum1*⁺ gene. *Nature* 1994; **367**: 236–242.
- [61] MURRAY A. Cyclin ubiquitination: The destructive end of mitosis. *Cell* 1995; **81**: 149–152.
- [62] MUZI-FALCONI M, BROWN GW, KELLY TJ. DNA replication: Controlling initiation during the cell cycle. *Curr Biol* 1996a; **6**: 229–233.
- [63] MUZI-FALCONI M, BROWN GW, KELLY TJ. *cdc18*⁺ regulates initiation of DNA replication in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996b; **93**: 1566–1570.
- [64] NAGL W. Cdc2-kinases, cyclins, and the switch from proliferation to polyploidization. *Protoplasma* 1995; **188**: 143–150.
- [65] NASMYTH K. Control of the yeast cell cycle by the Cdc28 protein kinase. *Curr Opin Cell Biol* 1993; **5**: 166–179.
- [66] NASMYTH K. Control of S phase. [w] DePamphilis ML [red.] DNA replication of eukaryotic cells. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1996: 331–386.
- [67] NEWLON CS. Yeast chromosome replication and segregation. *Micr Rev* 1988; **52**: 568–601.
- [68] NEWPORT J. Nuclear reconstitution *in vitro*: stages of assembly around protein-free DNA. *Cell* 1987; **48**: 205–217.
- [69] NIGG EA. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* 1995; **17**: 471–480.
- [70] NISHITANI H, NURSE P. p65-cdc18 plays a major role in controlling the initiation of DNA replication in fission yeast. *Cell* 1995; **83**: 397–405.
- [71] OGASAWARA M, MORIYA S, YOSHIKAWA H. Mechanism of replication initiation and its control. [w] Ishihama A, Yoshikawa H [red.] Control of Cell Growth and Division. Japan Sci Soc Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin 1991: 3–21.
- [72] O'FARRELL PH, EDGAR BA, LAKICH D, LEHNER CF. Directing cell division during development. *Science* 1989; **246**: 635–640.
- [73] OLSZEWSKA MJ, GODLEWSKI M. An autoradiographic study of the synthesis of nucleic acids and protein during the cell cycle of synchronously dividing antheridial filaments in *Chara vulgaris* L. *Folia Histochem Cytochem* 1972; **10**: 245–256.
- [74] PARDEE AB. Multiple molecular levels of cell cycle regulation. *J Cell Biochem* 1994; **54**: 375–378.

- [75] PELECH SL, CHAREST DL. MAP kinase-dependent pathways in cell cycle control. [w] Meijer L, Guidet S, Tung HYL [red.] *Progress in Cell Cycle Research*. New York: Plenum Press 1995: 33–52.
- [76] PETER M, HERSKOWITZ I. Joining the complex: cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell* 1994; **79**: 181–184.
- [77] PIATTI S, LENGAUER C, NASMYTH K. Cdc6 is an unstable protein whose *de novo* synthesis in G1 is important for the onset of S phase and for preventing a 'reductional' anaphase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 1995; **14**: 3788–3799.
- [78] PIATTI S, BOHM T, COCKER JH, DIFFLEY JF, NASMYTH K. Activation of S-phase-promoting CDKs in late G1 defines a "point of no return" after which Cdc6 synthesis cannot promote DNA replication in yeast. *Genes Dev* 1996; **10**: 1516–1531.
- [79] RAO H, STILLMAN B. The origin recognition complex interacts with a bipartite DNA binding site within yeast replicators. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 2224–2228.
- [80] RAO PN, JOHNSON RT. Mammalian cell fusion studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. *Nature* 1970; **225**: 159–164.
- [81] REDDY PVG. Cell cycle: regulatory events in G1S transition of mammalian cells. *J Cell Biochem* 1994; **54**: 379–386.
- [82] REED SI. The role of p34 kinases in the G1 to S-phase transition. *Annu Rev Cell Biol* 1992; **8**: 529–561.
- [83] ROMANOWSKI P, MADINE MA, ROWLES A, BLOW JJ, LASKEY RA. The *Xenopus* origin recognition complex is essential for DNA replication and MCM binding to chromatin. *Curr Biol* 1996; **6**: 1416–1425.
- [84] ROWLES A, CHONG JP, BROWN L, HOWELL M, EVAN GI, BLOW JJ. Interaction between the origin recognition complex and the replication licensing system in *Xenopus*. *Cell* 1996; **87**: 287–296.
- [85] SANTOCANALE C, DIFFLEY JFX. ORC- and Cdc6-dependent complexes at active and inactive chromosomal replication origins in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 1996; **15**: 6671–6679.
- [86] SAUER K, KNOBLICH JA, RICHARDSON H, LEHNER CF. Distinct modes of cyclin E/cdc2c kinase regulation and S phase control in mitotic and endoreduplication cycles of *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev* 1995; **9**: 1327–1339.
- [87] SCHWAB M, LUTUM AS, SEUFERT W. Yeast Hct1 is a regulator of Clb2 cyclin proteolysis. *Cell* 1997; **90**: 683–693.
- [88] SCHWOB E, BOHM T, MENDENHALL MD, NASMYTH K. The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 1994; **79**: 233–244.
- [89] SHEEHAN MA, MILLS AD, SLEEMAN AM, LASKEY RA, BLOW JJ. Steps in the assembly of replication-competent nuclei in a cell-free system from *Xenopus* eggs. *J Cell Biol* 1988; **106**: 1–12.
- [90] SHERR CJ, ROBERTS JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1995; **9**: 1149–1163.
- [91] SIGRIST SJ, LEHNER CF. *Drosophila* fizzy-related down-regulates mitotic cyclins and is required for cell proliferation arrest and entry into endocycles. *Cell* 1997; **90**: 671–681.
- [92] SIGRIST S, JACOBS H, STRATMANN R, LEHNER CF. Exit from mitosis is regulated by *Drosophila* fizzy and the sequential destruction of cyclins A, B and B3. *EMBO J* 1995; **14**: 4827–4838.
- [93] STILLMANN B. Cell cycle control of DNA replication. *Science* 1996; **274**: 1659–1664.
- [94] STRATMANN R, LEHNER CF. Separation of sister chromatids in mitosis requires the *Drosophila* pimples product, a protein degraded after the metaphase/anaphase transition. *Cell* 1996; **84**: 25–35.

- [95] TANAKA T, KNAPP D, NASMYTH K. Loading of an Mcm protein onto DNA replication origins is regulated by Cdc6p and CDKs. *Cell* 1997; **90**: 649–660.
- [96] TUGENDREICH S, TOMKIEL J, EARNSHAW W, HIETER P. CDC27Hs colocalizes with CDC16Hs to the centrosome and mitotic spindle and is essential for the metaphase to anaphase transition. *Cell* 1995; **81**: 261–268.
- [97] VESEL J, HAVLICEK L, STRNAD M, BLOW JJ, DONELLA-DEANA A, PINNA L, LETHAM DS, KATO J, DETIVAUD L, LECLERC S, MEIJER L. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur J Biochem* 1994; **224**: 771–786.
- [98] WEINSTEIN J, JACOBSEN FW, HSUCHEN J, WU T, BAUM LG. A novel mammalian protein, p55^{CDC}, present in dividing cells is associated with protein-kinase activity and has homology to the *Saccharomyces cerevisiae* cell division cycle proteins Cdc20 and Cdc4. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 3350–3363.
- [99] YAN H, MERCHANT AM, TYE BK. Cell cycle-regulated localization of MCM2 and MCM3, which are required for the initiation of DNA synthesis at chromosomal replication origins in yeast. *Genes Dev* 1993; **7**: 2149–21-60.
- [100] ZHANG SC, MASUI Y. Activation of *Xenopus laevis* eggs in the absence of intracellular Ca activity by the protein phosphorylation inhibitor, 6-dimethylaminopurine (6-DMAP). *J Exp Zool* 1992; **262**: 317–329.

Redaktor prowadzący – Szczepan Biliński

Otrzymano: 09.03.1998 r.

Przyjęto: 28.05.1998 r.

Adres autora: 90-231 Łódź, ul. Pilarskiego 12/14.

FIZJOLOGICZNA ROLA RECEPTORÓW GLIKOPROTEIN

PHYSIOLOGICAL ROLE OF GLYCOPROTEIN RECEPTORS

Jolanta ZUWAŁA-JAGIEŁŁO, Jerzy OSADA

Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Akademia Medyczna we Wrocławiu

Streszczenie: W artykule przedstawiono informacje dotyczące rozpoznawania przez komórki cząsteczek zawierających odsłonięte reszty cukrowe, na podstawie badań cytowanych w literaturze ostatnich lat. Receptory glikoprotein uczestniczą nie tylko w metabolizmie glikokoniugatów. Biorą udział między innymi w interakcjach komórka-komórka i komórka-substancja międzykomórkowa podczas embriogenezy i rozwoju organizmu. Najlepiej poznana grupą receptorów glikoprotein jest wątrobowy receptor asjaloglikoproteinowy (ASGP-R). Na poziomie komórki główną molekularną funkcją tego receptora jest wychwyt i późniejsza degradacja ligandów z odsłoniętą resztą galaktozy lub N-acetylogalaktozamininy, jednak na poziomie organizmu funkcja receptora ASGP-R nie została ściśle określona. Zaburzenia funkcji tego receptora, a także innych receptorów, między innymi receptorów mannozo-6-fosforanu, prowadzić mogą do zmian patologicznych. Artykuł ten proponuje wyjaśnienie celu istnienia wątrobowego receptora ASGP-R i jego roli w regulacji metabolizmu glikokoniugatów u ssaków.

Słowa kluczowe: rodzina receptora glikoprotein, receptor ASGP-R, receptor M-6-P.

Summary: The information published during the last years, concerning the recognition of carbohydrate-containing molecules by cells has been presented. Glycoprotein receptors play many biological roles in addition to mediating glycoconjugates metabolism. They are responsible among other things for cell-cell and cell-matrix interactions during embryogenesis and development. The hepatic asialoglycoprotein receptor (ASGP-R) is the best known group of the glycoprotein receptors. At the cellular level, the basic molecular function of the receptor is to mediate the uptake and degradation of galactosyl/N-acetylgalactosaminyl-containing ligands. At the organism level, however, the physiological function is uncertain. Dysfunction of the asialoglycoprotein receptor group and other receptors lead to various diseases. This article proposes an explanation for the role of the hepatic ASGP-R in regulating the dynamic flux glycoconjugates in mammals.

Key words: glycoprotein receptor family, hepatic ASGP-R, Man-6-P receptor.

Wykaz stosowanych skrótów: **ASGP-R** (ang. *asialoglycoprotein receptor*) – receptor dla asjaloglikoprotein; **Gal** – galaktoza; **GalNAc** – N-acetylogalaktozamina; **ASGP** – asjaloglikoproteiny; **M-ASGP-R**

(ang. *macrophage asialoglycoprotein receptor*) – makrofagowy receptor dla asjaloglikoprotein; **RHL** (ang. *rat hepatic lectin*) – wątrobowa lektyna szczura; **HHL** (ang. *human hepatic lectin*) – wątrobowa lektyna ludzka; **γ -GT** – transferaza glutamylowa; **M-6-P** (ang. *mannose 6-phosphate*) – mannozo-6-fosforan; **IGF** (ang. *insulin-like growth factor*) – insulinopodobny czynnik wzrostu; **Man** – mannoza; **Fuk** – fukoza; **MBP** (ang. *mannose-binding protein*) – białko wiążące mannozę; **Glc** – glukoza; **Hyl** – hydroksylizyna; **HA** – hialuronian; **ICAM** (ang. *intercellular adhesion molecule*) – cząsteczka adhezji międzykomórkowej; **AGE** (ang. *advanced glycosylation end products*) – końcowe produkty zaawansowanej glikacji; **TNF** – czynnik martwicy nowotworów; **PDGF** – płytkopochodny czynnik wzrostu.

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA RODZINY RECEPTORA GLIKOPROTEIN

Dotychczas zidentyfikowano 4 klasy receptorów rozpoznających glikoproteiny, których specyficzność jest związana z rozpoznawaniem określonych końcowych monocukrów w jednostkach oligosacharydowych, a mianowicie: galaktozy (lub N-acetylogalaktozamininy), mannozy i/lub N-acetyloglukozoaminy, mannozo-6-fosforanu i fukozy (tab. 1). Na rysunku 1 przedstawiono schemat budowy większości członków rodziny receptora glikoprotein.

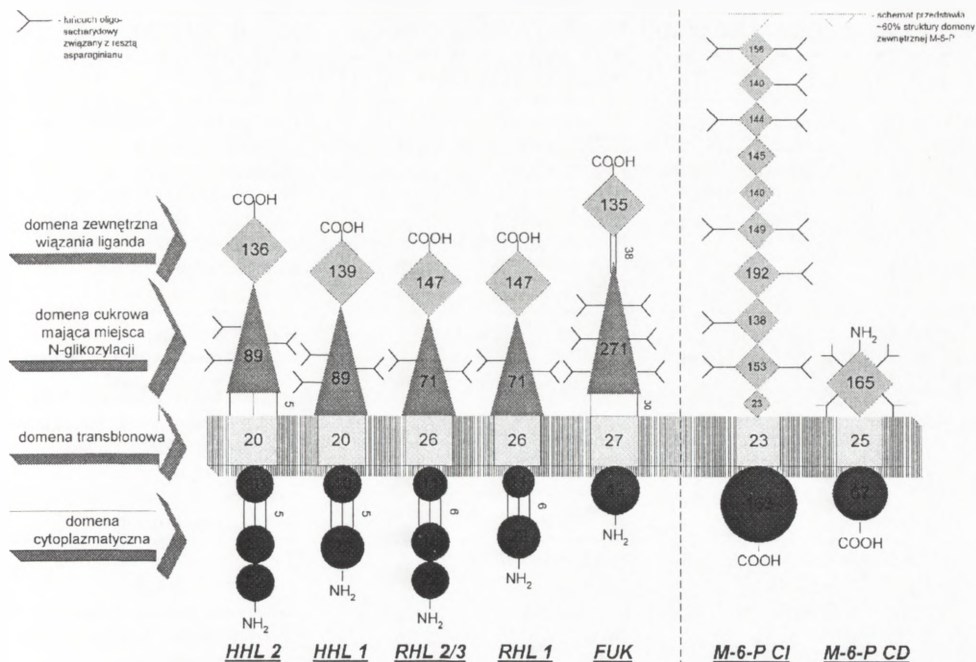
Cechą wszystkich białek należących do rodziny receptora glikoprotein jest budowa wielodomenowa [29]. Chociaż receptory glikoprotein stanowią zróżnicowaną grupę integralnych glikoprotein błonowych, schemat ich budowy jest podobny. Kolejność domen od przestrzeni pozakomórkowej do światła komórki przedstawia się następująco:

- domena wiążąca ligand
- domena cukrowa mająca miejsce N-glikozytacji (i może O-glikozytacji)
- domena transbłonowa
- domena cytoplazmatyczna.

Domena wiążąca ligand jest odpowiedzialna za przyłączanie składnika węglowodanowego glikoprotein. Zadaniem domeny cukrowej (ogona cukrowego) jest utrzymywanie pierwszej domeny w konformacji pozwalającej na przyłączenie ligandów wielowartościowych oligosacharydów [64]. Domena czwarta umożliwia receptorowi utrzymanie się w błonie komórkowej.

BUDOWA I ROLA RECEPTORA ASJALOGLIKOPROTEIN

Receptory glikoprotein błon hepatocytów ssaków rozpoznające galaktozę (Gal) lub N-acetylogalaktozaminę (GalNAc) uczestniczą w usuwaniu z krążenia glikoprotein z odsłoniętą resztą galaktozy, czyli asjaloglikoprotein (ASGP) [6,92]. Wykazano również, że komórki Kupffera i komórki endotelialne wiążą ligandy



RYSUNEK 1. Zarys budowy różnych typów receptorów glikoprotein: zaznaczono domeny strukturalne receptorów i ilość reszt aminokwasowych biorących udział w ich budowie (dokładny opis w tekście, wg [92] zmodyfikowany)

o wielkości od 2,2 do 11,7 nm, podczas gdy hepatocyty wiążą cząsteczki poniżej 7,8 nm [74]. Już wczesne badania wykazały, że te dwa rodzaje receptora ASGP-R są kształtowane niezależnie podczas rozwoju embrionalnego i wykazują różną ekspresję [13].

Białko szczyrzego receptora ASGP-R jest lektyną RHL składającą się z trzech podjednostek 1, 2 i 3 odpowiednio o masie cząsteczkowej 41,5, 49 i 54 kDa (tab.1). Wszystkie podjednostki receptora ASGP-R stanowią produkt dwóch wspólnych genów. Modyfikacja łańcuchów oligosacharydowych, na etapie obróbki po-translacyjnej, prowadzi do powstania dwóch homologicznych podjednostek RHL 2 i 3 (RHL 2/3) oraz podjednostki RHL 1 [16,79]. Ludzki receptor ASGP-R jest heterotetramerem składającym się z dwóch homologicznych podjednostek HHL1 (m. cz.~45 kDa) i HHL2 (m. cz.~50 kDa), które występują w stosunku molowym 2:2. Istnieją dowody, że podjednostka HHL1 zawiera miejsce wiązania ligandów triantenowych oligosacharydów [3,4,59]. Ponadto domena cytoplazmatyczna ludzkiego receptora ASGP-R ma specyficzną kinazę tyrozynową, której obecność

TABELA 1. Strukturalna klasyfikacja receptorów glikoprotein

RECEPTOR	RODZAJ KOMÓRKI	MASA CZĄSTECZKOWA/ BUDOWA PODJEDNOSTKOWA	FIZJOLOGICZNE LIGANDY
Galaktozy	Hepatocyty Komórki Kupffera Komórki endotelialne Makrofagi tkankowe	Heteroheksamer –264 kDa Podjednostki szczurzego receptora: RHL 1–42 kDa RHL 2–49 kDa RHL 3–50 kDa Podjednostki ludzkiego receptora: HHL 1–45 kDa HHL 2–50 kDa	Glikoproteiny rozpuszczalne z odsłoniętą resztą galaktozozaminy/ N-acetylogalaktozozaminy Cząsteczkowe glikokoniugaty z galaktozą Kompleksy przeciwciał IgG i IgA z antygenem
Mannozo-6-fosforanu (MPR)	Prawdopodobnie wszystkie komórki	M-6-P CD – 300 kDa M-6-P CI – 46 kDa; dimer lub trimer	Glikoproteiny z jednostkami wielomannozyowymi będącymi fosfomonoesterazami
Mannozy	Sinusoidalne komórki endotelialne Komórki Kupffera Makrofagi tkankowe	Pojedynczy polipeptyd 175÷180 kDa	Rozpuszczalne lub cząsteczkowe glikoproteiny zawierające oligosacharydy z końcową mannozą, fukożą lub N-acetyloglukozozaminą
Białko wiążące mannozę	Komórki parenchymalne wątroby Osocze krwi ludzkiej	Heksamer – 30 kDa	β -glukuronidaza α_2 -makroglobulina α_1 -kwaśna glikoproteina Glikokoniugaty na powierzchni mikroorganizmów
Fukozy	Komórki parenchymalne wątroby Komórki Kupffera	Oligomer – 61 kDa	Ligandy z końcową L-fukożą połączoną wiązaniem α 1,3 z N-acetylogalaktozozaminą

jest istotna dla endocytozy [21]. Szczurzy receptor ASGP-R jest heteroheksamerem składającym się z czterech podjednostek RHL1, oraz z podjednostek 2 i 3 (RHL 2/3). Każda podjednostka może zawierać miejsce wiązania istotne dla pojedynczych reszt cukrowych. Przypuszcza się, że każdy heksamer zawiera domeny wiązania tri- i tetraantenowych oligosacharydów. Domena wiążąca ligand tego receptora jest heterotrimerem składającym się z dwóch podjednostek RHL 1 i jednej podjednostki RHL 2/3. Każda z trzech podjednostek receptora jest zdolna do wiązania galaktozy [30,46]. W skład domeny wiążącej ligand wchodzi trzy C-końce domen wszystkich trzech podjednostek receptora [80]. Podjednostki te ułożone są w poziomy trójkąt o wymiarach boków 15, 22 i 25 Å. Polipeptydy podjednostek RHL 2/3 zawierają dodatkowy łańcuch węglowodanowy w domenie transbłonowej. Prawdopodobnie oddalenie miejsc wiązania liganda w podjednostkach RHL 2/3 od błony plazmatycznej może być wynikiem obecności tego łańcucha [28,30,93]. Charakterystyczna, dodatkowa sekwencja osiemnastu reszt aminokwasowych w podjednostkach RHL 2/3 ma wpływ na różnicę w masach cząsteczkowych dojrzałych

białek. Masa cząsteczkowa domeny wiązania asjaloorozomukoidu w natywnym receptorze została określona na ~105 kDa.

Świeżo izolowane hepatocyty i pierwotne ich hodowle endocyтую desjalowane glikoproteiny w dwóch czynnościowych subpopulacjach receptora ASGP-R (mniejszy szlak-1, większy szlak-2); które biorą udział zarówno w internalizacji, dysocjacji, i rozkładzie asjaloglikoprotein [65,104]. Drogi te przebiegają w sposób nieseryjny i równoległe. Połowa powierzchniowych i „wewnętrznych” receptorów ASGP-R bierze udział równocześnie w dwóch drogach endocytozy. W mniejszym szlaku-1 w odróżnieniu od większego szlaku-2, aktywność powierzchniowa receptorów nie jest modulowana (tab. 2). Ostatnio sądzi się, że receptory ASGP-R recyrkulują i przechodzą cykl inaktywacji/reaktywacji tylko w szlaku-2, natomiast diacytoza kompleksu receptor-ligand dotyczy mniejszego szlaku-1 endocytozy [102,103].

Najważniejszą funkcją receptora ASGP-R jest udział w usuwaniu glikoprotein z obiegu i w ich wewnątrzkomórkowym procesie trawienia. Fizjologiczna funkcja receptora ASGP-R nie została do końca jeszcze poznana. Przypuszczalnie uczestniczy on w *turnover* glikoprotein osocza, w eliminacji z krążenia kompleksów antygen-przeciwciała, adhezji typu komórka-komórka oraz w wewnątrzkomórkowym *turnover* i biosyntezie glikoprotein [74,92]. Wydaje się, że dwie pierwsze funkcje są najbardziej istotne.

Grupa pracująca pod kierunkiem Ashwella [83] zaproponowała funkcję receptora asjaloglikoprotein, jako usuwanie glikoprotein osocza, desjalowanych przez endogenne neuraminidazy. Sugerowano, że normalny mechanizm dla *turnover* białek osocza wywołuje utratę kwasu sjałowego „spontanicznie” lub pod wpływem krążących neuraminidaz, a następnie wychwyt desjalowanych białek przez receptor w hepatocytach. Okazało się jednak, że *turnover* między innymi transferyny, choriogonadotropiny czy też orozomukoidu nie odpowiada takiemu mechanizmowi. Wydaje się, że *turnover* tych białek nie zachodzi za pośrednictwem ich desjalizacji, ale tylko receptora obecnego w wątrobie. Są też sugestie, że większość glikoprotein z końcową galaktozą nie należy do endogennych ligandów [6,92]. Niedawno wykazano, że receptor ASGP-R uczestniczy w wychwycie transferazy γ -glutamyłowej (γ -GT). Nie zostało jeszcze do końca wyjaśnione, czy receptor ASGP-R poprzez regulację ekspresji aktywności γ -GT bierze udział w przemianach, w których uczestniczy ten enzym [58].

Receptor wiążący galaktozę może pośredniczyć w usuwaniu kompleksów przeciwciał IgG i IgA z antygenami *in vivo* [55]. Wiadomo że, pewne łańcuchy oligosacharydowe obecne w IgG mają końcową galaktozę, a mimo to przeciwciała nie znikają szybko z obiegu, być może konformacja przestrzenna białka utrudnia rozpoznanie galaktozy przez receptor. Przypuszczalnie dopiero po związaniu antygeny zachodzą zmiany konformacyjne immunoglobuliny, które umożliwiają interakcję jej reszty galaktozyłowej z receptorem i w efekcie usunięcie kompleksu IgG-antygen

TABELA 2. Niektóre cechy pozwalające na rozróżnienie dwóch szlaków endocytozy asjaloglikoprotein za pośrednictwem receptora ASGP-R (wg [90] zmodyfikowana)

Cechy charakterystyczne	Szlak 1 (mniejszy)	Szlak 2 (większy)
Modulacja powierzchni receptora przez: temperaturę, monenzynę, ATP	Nie	Tak
Recykulacja receptorów	Nie	Tak
Inaktywacja/ reaktywacja aktywności wiążącej receptora przez: obniżenie ATP/dodanie palmitylo CoA, acylację/deacylację kwasu palmitynowego	Nie	Tak
Diacytoza internalizowanych kompleksów receptor - ligand	Tak	Nie
Dysocjacja kompleksu receptor ligand	Wolna	Szybka
Hamowanie dysocjacji ligandu przez monenzynę.	Nie	Tak
Hamowanie rozkładu ligandu przez kolchicynę	Nie	Tak

z obiegu [92]. Przypuszcza się, że podobną rolę odgrywa receptor ASGP-R w eliminacji kompleksów IgA-antygen [85].

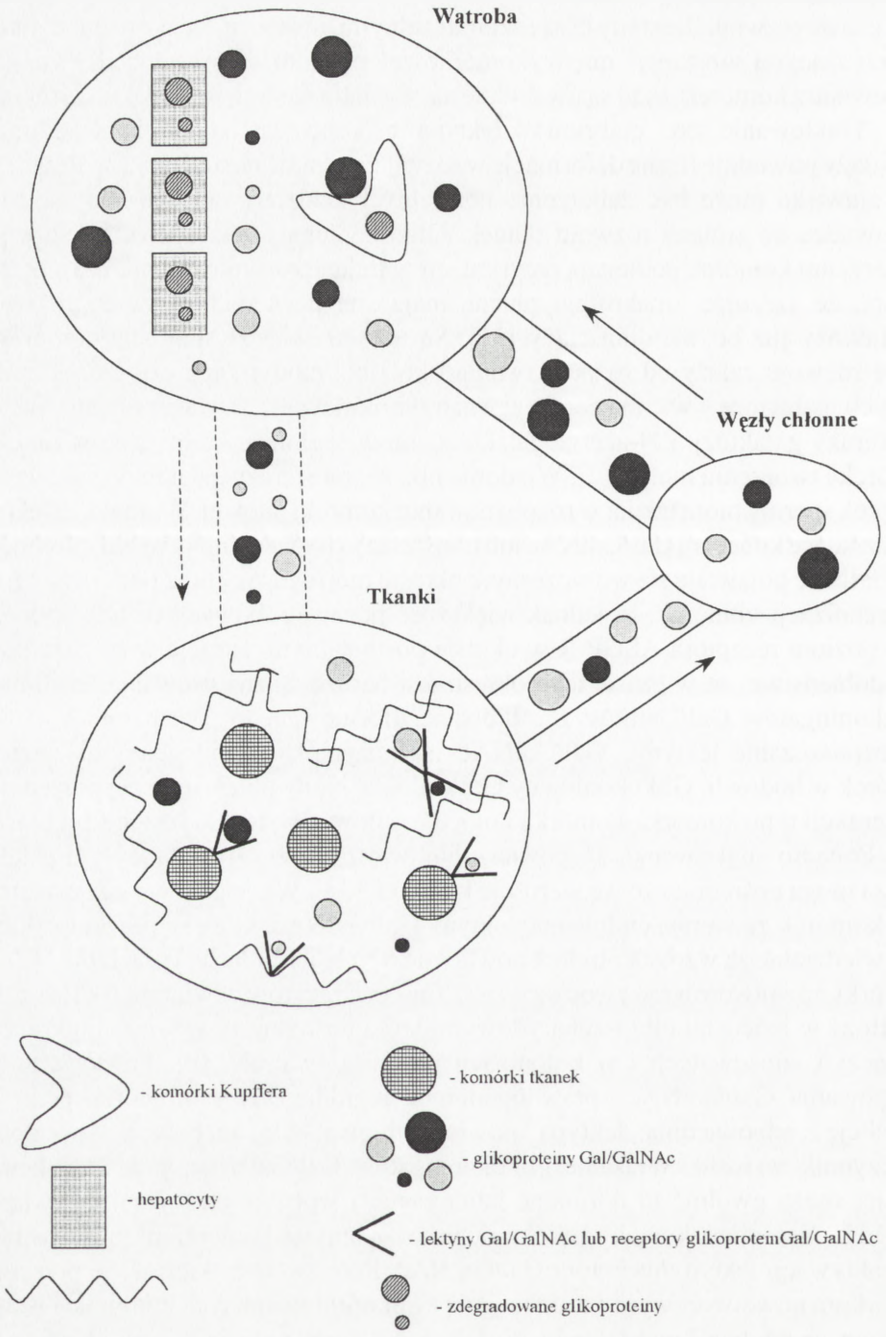
FIZJOLOGICZNA ROLA RECEPTORA ASJALOGLIKOPROTEIN

Istnieje teoria wyjaśniająca fizjologiczną rolę receptora ASGP-R w organizmie ssaków. Opiera się ona na założeniu, że powierzchniowe i wewnątrzkomórkowe glikokoniugaty z terminalną Gal/GalNAc są niezbędnymi cząsteczkami w czasie embriogenezy i rozwoju organów u ludzi. Morfogeneza i końcowe różnicowanie tkanek przebiega przy udziale tych cząsteczek, ale nieznaną dotychczas drogą. Po ukończeniu rozwoju utrzymywanie oddziaływań komórka-komórka, komórka-substancja międzykomórkowa i oddziaływań między elementami substancji międzykomórkowej oraz kontrola wzrostu komórek wymagają ciągłego udziału glikokoniugatów z końcową Gal/GalNAc i ich receptorów. Z kolei w tkankach utrzymywane jest określone stężenie glikokoniugatów jako ligandów, w wyniku stale przebiegającej ich degradacji i syntezy (rys. 2).

Okres rozwoju płodowego charakteryzuje się wysokim poziomem glikokoniugatów z końcową Gal/GalNAc, podczas gdy sama morfogeneza przebiega bez ekspresji receptorów Gal/GalNAc [100]. Przyczyną tego zjawiska może być brak zdolności do usuwania krążących glikokoniugatów przez płód. Wydaje się, że usuwanie tych cząsteczek przez płód/embrion w czasie rozwoju mogłoby być szkodliwe i wpływać na nienormalny jego rozwój. Lektyny wiążące β -galaktozydazę

uczestniczą w regulacji procesu rozwoju tkanek. Ich stężenie i rozmieszczenie zmienia się w czasie rozwoju. Lektyny te są rozpuszczalnymi, niskocząsteczkowymi białkami towarzyszącymi substancji międzykomórkowej, ponadto wiele tych białek znajduje się wewnątrz komórek, skąd są uwalniane na zewnątrz we wczesnym okresie rozwoju [72]. Traktowanie serc embrionów lektyną z końcową Gal lub haptenem galaktozydazy powoduje liczne deformacje w rozwijającym się narządzie [22]. Przyczyną tego zjawiska może być zaburzenie normalnych oddziaływań Gal-lektyna, które doprowadza do zmiany rozwoju tkanek. Glikokoniugaty z końcową galaktozą na powierzchni komórek podlegają recyrkulacji w trakcie rozwoju organizmu. Okazało się np., że sznurce makrofagi płucne mają na powierzchni związane reszty α -galaktozy już od 14. dnia ciąży [31]. Są też sugestie, że migracja komórek w czasie rozwoju zależy od rozpoznawania i kolejnej modyfikacji cząsteczek zawierających galaktozę w macierzy zewnątrzkomórkowej. Uważa się obecnie, że transferazy galaktozy i N-acetylgalaktozoaminy spełniają istotną rolę w migracji komórek i tworzeniu moruli [2]. Wiadomo np., że transferazy galaktozy powierzchni komórek spermy biorą udział w rozpoznawaniu komórki jajowej. Wprawdzie lektyny rozpoznające końcową Gal/GalNAc lub transferazy i powierzchniowe glikokoniugaty Gal/GalNAc pojawiają się we wczesnym okresie morfogenezy oraz podczas migracji i reorganizacji komórek, to jednak większość pozawątrobowych tkanek wykazuje niski poziom receptora ASGP-R w okresie postnatalnym. Istnieje więc duże prawdopodobieństwo, że w czasie tego okresu jest bardzo ważne usuwanie „nadmiaru” glikokoniugatów Gal/GalNAc z całkowicie uformowanego organizmu.

Rozpuszczalne lektyny Gal/GalNAc są czynnikami mitogennymi wzrostu komórek w hodowli. Glikokoniugaty Gal/GalNAc błony plazmatycznej pośredniczą w interakcji typu komórka-komórka i mogą regulować wzrost ludzkich fibroblastów [95]. Ponadto sugerowano, że powierzchniowa transferaza galaktozy i β -galaktozydaza mogą pośredniczyć we wzroście komórek [33]. Wiele guzów i nowotworowe linie komórek zawierają endogenne lektyny Gal/GalNAc, które są prawdopodobnie odpowiedzialne za wzrost komórek nowotworowych, ich adhezję i przerzuty [12,70]. Komórki nowotworowe wywodzące się z linii erytrocytów zawierają β -(1,4)-resztę galaktozy w łańcuchu oligosacharydowym, która pośredniczy w wiązaniu komórek do naczyń włosowatych i w kolonizacji płuc oraz wątroby [9]. Powierzchniowe ugrupowania Gal/GalNAc prawdopodobnie regulują wzrost komórek przez ich interakcję z odpowiednią „lektyną” powierzchniową, która zachowuje się podobnie jak czynnik wzrostu. Wiązanie glikokoniugatów Gal/GalNAc przez zewnętrzne lektyny może uwolnić to normalne hamowanie i wpłynąć na stymulację wzrostu komórek. Natomiast kontakt glikokoniugatów z innymi komórkami przyczynia się do inaktywacji lektyny/receptora Gal/GalNAc. Przeciwciała skierowane przeciwko komórkom nowotworowym często reagują z glikoproteinami tych komórek. Ostatnio sądzi się, że zdolność makrofagów, komórek NK (ang. *natural killers*) i limfocytów



RYSUNEK 2

cytotoksycznych do zabijania komórek nowotworowych zależy od ekspresji powierzchniowych receptorów galaktozowych [34].

Glikokoniugaty Gal/GalNAc i odpowiednie lektyny powierzchniowe mogą być „ukryte” w trakcie rozwoju immunologicznego. Wydaje się, że te glikokoniugaty można traktować jako potencjalne antygeny, zdolne do wywołania odpowiedzi autoimmunologicznej. Podobnie, kompleksy lektyna-glikokoniugat mogą być też umiejscowione wewnątrzkomórkowo. System immunologiczny może więc rozpoznawać te cząsteczki, które w normalnym rozwoju związane są z oddziaływaniami: komórka-komórka, komórka-substancja międzykomórkowa lub między elementami substancji międzykomórkowej. Obecność przeciwciał skierowanych przeciwko receptorom galaktozowym może zaburzać normalną interakcję glikokoniugat-lektyna w tkance. W surowicy krwi ludzkiej krąży około 1% IgG, które rozpoznają α -(1,3)-związaną galaktozę [24]. Te przeciwciała rozpoznając łańcuchy oligosacharydowe lamininy mogą zaburzać interakcje składników substancji międzykomórkowej, w których pośredniczą oligosacharydy. Syndrom Sjögrena (przewlekła choroba autoimmunologiczna) przebiega z podwyższonym poziomem asjalo-IgG w surowicy krwi. Liczne jednostki chorobowe są związane z produkcją przeciwciał skierowanych przeciwko Gal lub galaktozylacją krążących IgG. Uważa się obecnie, że przewlekłe wirusowe zapalenia wątroby typu B i C są związane z podwyższonym poziomem przeciwciał skierowanych przeciwko Gal [86].

Wprowadzenie rozpuszczalnych lub nierozpuszczalnych glikokoniugatów Gal/GalNAc do tkanek może okazać się szkodliwe, ponieważ będą one konkurować z endogennymi glikokoniugatami o wiązanie ze specyficznymi lektynami/receptorami macierzy zewnątrzkomórkowej i na powierzchni komórki. Konkurencja między tymi cząsteczkami może wpłynąć szkodliwie na przebieg i kontrolę wzrostu komórek oraz na zjawiska związane z adhezją typu komórka-komórka. Jest to przyczyna, dla której glikokoniugaty Gal/GalNAc wytwarzane w procesach fizjologicznych lub w czasie choroby, urazu czy śmierci komórki są usuwane przez dwa rodzaje receptorów: receptor ASGP-R błon hepatocytów i receptor M-ASGP-R komórek Kupffera. Niedawno stwierdzono że, podwyższony poziom glikoprotein Gal/GalNAc w surowicy krwi może być przyczyną patologicznych zmian w tkankach [91]. Przypuszcza się, że receptor ASGP-R w układzie siateczkowo-śródbłonkowym

RYSUNEK 2. Schematyczne ujęcie losów glikoprotein i ich receptorów w organizmie ludzkim. (wg [91], zmodyfikowany). Receptory glikoprotein błon hepatocytów uczestniczą w usuwaniu z krążenia rozpuszczalnych glikoprotein Gal/GalNAc. Komórki Kupffera wiążą rozpuszczalne i cząsteczkowe glikoproteiny. W tkankach utrzymywane jest określone stężenie glikoprotein (glikokoniugatów) jako ligandów, w wyniku stale przebiegającej degradacji i syntezy. Węzły chłonne mogą pośredniczyć w usuwaniu większości glikoprotein Gal/GalNAc przed ich dopływem do krwi. Zakładając, że stężenie glikoprotein w węzłach chłonnych jest wyższe niż we krwi to całkowity ich *turnover* może znacznie wzrosnąć. Zakłócenie stanu równowagi między ciągłym dopływem glikoprotein Gal/GalNAc do krwi a ich wychytem przez wątrobę, zmienia stężenie krążących glikoprotein osocza i może wpłynąć szkodliwie na przebieg i kontrolę wzrostu komórek w organizmie

węzłów chłonnych może pośredniczyć w usuwaniu większości glikokoniugatów Gal/GalNAc przed ich dopływem do krwi. Przyczyną tego zjawiska jest wyższe stężenie glikoprotein w węzłach dośrodkowych niż w odśrodkowych oraz znacznie wyższe niż we krwi. Zakładając, że węzły chłonne biorą udział w wychwycie glikokoniugatów Gal/GalNAc, to całkowity ich *turnover* może wówczas znacznie wzrosnąć. Stężenie fizjologiczne asjaloglikoprotein w surowicy krwi (średnio 10 nM) jest zbliżone do stałej dysocjacji miejsc wiązania liganda o wysokim powinowactwie w hepatocytach. Zakłócenie stanu równowagi pomiędzy ciągłym dopływem glikoprotein Gal/GalNAc do krwi a ich wychwytem przez wątrobę, zmienia stężenie krążących glikoprotein osocza. W stanach chorobowych związanych np. z marskością wątroby, poziom glikokoniugatów Gal/GalNAc wzrasta od 2–6 razy, prawdopodobnie na skutek zaburzenia/uszkodzenia funkcjonowania receptora ASGP-R [8].

BUDOWA I FUNKCJA RECEPTORA ASJALOGLIKOPROTEIN MAKROFAGÓW / KOMÓREK UKŁADU SIATECZKOWO-ŚRÓDBŁONKOWEGO

Występujący w błonie komórkowej makrofagów lub komórek układu siateczkowo-śródbłonkowego receptor asjaloglikoprotein (M-ASGP-R) charakteryzuje się zdolnością wiązania końcowej galaktozy rozpuszczalnych i cząsteczkowych glikokoniugatów. Częściowo określono budowę makrofagowego receptora M-ASGP-R. Stało się to możliwe dzięki użyciu metod klonowania cDNA [35]. Receptor ten wykazuje wszystkie charakterystyczne cechy budowy rodziny zwierzęcych lektyn typu-C. Zachowawcze sekwencje aminokwasowe tych receptorów o najsilniej wyrażonej homologii (59%) są zawarte w obrębie podjednostki RHL-1. Sklonowanie genu makrofagowego receptora M-ASGP-R pozwoliło wykazać, że koduje on białko błonowe złożone z 306 reszt aminokwasowych z dwoma miejscami N-glikozytacji [17]. Sekwencja łącząca domenę transbłonową z domeną wiążącą ligandy zawiera 24 aminokwasy.

Mimo homologii strukturalnej podjednostki RHL-1 obydwu receptorów ASGP-R hepatocytowego i makrofagowego, zachowana zostaje selektywność receptora makrofagowego względem rozpuszczalnych glikoprotein z końcową Gal [67]. Brak jest jednomyślności co do istoty oddziaływań molekularnych między rozpuszczalnymi i/lub cząsteczkowymi glikokoniugatami z końcową Gal a hepatocytowym lub makrofagowym ASGP-R. Proponowane są dwa rozwiązania:

1) makrofagowy receptor M-ASGP-R pełniłby rolę uzupełniającą funkcję hepatocytowego receptora ASGP-R,

2) tworzenie kompleksów cząsteczkowych glikokoniugatów z receptorem ASGP-R postulowane dla makrofagów, a niemożliwe w hepatocytach cechujących się specyficnością względem rozpuszczalnych glikoprotein.

Receptor ASGP-R występujący w wątrobie i niektórych wędrujących makrofagach prawdopodobnie jest związany z degradacją dojrzałych erytrocytów. Desjalizacja glikoprotein i gangliozydów na powierzchni erytrocytów może zachodzić spontanicznie pod wpływem neuraminidazy lub w odpowiedzi na uszkodzenie czy śmierć komórki [73].

BUDOWA I FUNKCJA RECEPTORA MANNOZO-6-FOSFORANOWEGO

Niedawno poznanymi członkami rodziny receptora glikoprotein są receptory mannozo-6-fosforanu (M-6-P). Nazwa ich wywodzi się z dużego powinowactwa do glikoprotein z odsłoniętą resztą mannozo-6-fosforanu, które występują przede wszystkim w nowo zsyntetyzowanych hydrolazach lizosomalnych. Wyróżnia się receptor M-6-P CD (ang. *CD-cation-dependent*) i M-6-P CI (ang. *CI-cation-independent*). Receptor M-6-P CD wykazuje większe powinowactwo do ligandów w obecności dwuwartościowych kationów [41]. Początkowo sądzono, że masa cząsteczkowa receptora M-6-P CI wynosi 215 kDa. Obecnie wiadomo, że M-6-P CI w postaci dojrzałej składa się z 2451 aminokwasów, a jego masa cząsteczkowa wynosi 300 kDa [66]. Receptor ten składa się z peptydu N-końcowego zbudowanego z 44 aminokwasów, domeny przezłonowej utworzonej przez 23 aminokwasy oraz ogona cytoplazmatycznego przy C-końcu, który ma 163 aminokwasy. Drugi receptor M-6-P CD jest dimerem lub trimerem składającym się z transbłonowych podjednostek o masie cząsteczkowej 46 kDa (rys.1). Te dwa receptory są bardzo podobne (ale nieidentyczne) i specyficzne dla glikoprotein z jednostkami wielomannozowymi będącymi fosfomonoesterazami [5]. Niedawno wyizolowano trzeci rodzaj białka wiążącego wielomannozowe oligosacharydy hydrolaz niezależnie od dwuwartościowych kationów, o masie cząsteczkowej 42 kDa [14]. Obecność M-6-P receptorów wykazano prawie we wszystkich badanych komórkach, chociaż mogą być typy komórek, w których jeden rodzaj receptora dominuje lub jest nieobecny. Ludzki receptor czynnika wzrostu insulinopodobnego-II (IGF-II), czyli białko pokrewne do receptora insuliny, jak wykazano niedawno, jest identyczne z ludzkim receptorem M-6-P CI [51,68,105]. Odkrycie to może mieć wpływ na rozwój badań w kierunku poznawania nowej roli czynnościowej receptora M-6-P.

W pewnych komórkach, głównie fibroblastach i hepatocytach, M-6-P CD jest zlokalizowany „wewnątrzkomórkowo”, a w innych np. monocytach jest obecny na ich powierzchni. Najważniejszą funkcją receptora M-6-P CD jest udział w

śródkomórkowym transporcie nowo zsyntetyzowanych hydrolaz lizosomalnych, szczególnie w sortowaniu i kierowaniu ich do lizosomów. Receptorowi M-6-P CI przypisuje się rolę w internalizacji egzogennych ligandów z odsłoniętą resztą mannozo-6-fosforanu [23,81]. Wykazano, że receptor M-6-P jest zaangażowany w internalizację i aktywację proreniny w reninę przez kardiomiocyty [87]. Inną, dość dobrze poznaną funkcją receptora M-6-P, jest zdolność wiązania i internalizacji wewnątrzkomórkowych enzymów lizosomalnych uwolnionych do krążenia w przypadku uszkodzenia lub śmierci komórki. Jest to swoisty mechanizm ochrony przed degradacyjnym potencjałem enzymów lizosomalnych, który mógłby doprowadzić do uszkodzenia zdrowych komórek. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja receptora M-6-P w obszarze *trans*-Golgiego wskazuje również na jego udział w regulacji aktywności enzymów lizosomalnych [7,42,45].

BUDOWA I FUNKCJA RECEPTORA ROZPOZNAJĄCEGO TERMINALNĄ MANNOZĘ

Receptory rozpoznające mannozę i/lub N-acetyloglukozoaminę oligosacharydów glikoprotein (receptory Man) znajdują się na powierzchni komórek układu siateczkowo-śródbłonkowego wątroby, komórek śledziony, szpiku kostnego oraz na powierzchni makrofagów [38,53]. Lokalizacja receptora Man w mózgu (lektyna R1), neuronach i w komórkach endotelialnych centralnego układu nerwowego wskazuje, że receptor ten może regulować funkcjonowanie tych komórek [101]. Jedną z funkcji receptora Man komórek układu siateczkowo-śródbłonkowego wątroby jest jego udział w *turnover* i degradacji glikoprotein z odsłoniętą resztą mannozy [53]. Receptor Man komórek endotelialnych wiąże *in vivo* glikoproteiny z końcową N-acetyloglukozoaminą, z powinowactwem od 3 do 7 razy większym niż komórki Kupffera [69]. Związek receptora Man z grupą komórek układu siateczkowo-śródbłonkowego wątroby sugeruje jego udział w usuwaniu rozpuszczalnych lub cząsteczkowych glikoprotein zawierających oligosacharydy z końcową mannozą, które z różnych fizjologicznych czy patologicznych przyczyn dostały się do przestrzeni pozakomórkowej.

Niedawno opisano makrofagowy receptor Man indukowany glikoproteinami, z końcową mannozą, fukozą lub N-acetyloglukozoaminą [96]. Makrofagowy receptor Man ludzi jest pojedynczym polipeptydem o masie cząsteczkowej około 175–180 kDa (tab. 1) i wykazuje w 97% homologię z króliczym i szczurzym odpowiednikiem [49,82,84]. Receptor ten składa się z domeny błonowej i trzech domen zewnątrzkomórkowych [60]. Pierwsza domena przy N-końcu składa się z 139 aminokwasów, wśród których przeważają reszty cysteinowe. Druga zawiera jedno powtórzenie podobne do fibronektyny. W skład domeny transbłonowej wchodzi

8 powtórzeń analogicznych do tych, które występują w receptorze ASGP-R. Delecja ogona cytoplazmatycznego w zmutowanym receptorze powoduje utratę zdolności internalizacji ligandów [20]. Ekspresja aktywności receptora Man jest modulowana *in vitro* w komórkach hodowlanych przez limfokiny i steroidy przeciwzapalne [10,47,48,50]. Dostarczanie makrofagom rozpuszczalnych monocukrów, takich jak: mannoza, N-acetyloglukozoamina, fukoza, również stymuluje wzrost zdolności wiążącej na powierzchni tych komórek. Odkrycia te czynią prawdopodobnym udział makrofagowych receptorów Man w usuwaniu drogą endocytozy bez pośrednictwa przeciwciał, substancji obcych dla ustroju (z odsłoniętymi resztami mannozyłowymi) wykazujących powinowactwo do tego receptora [18].

BUDOWA I FUNKCJA RECEPTORA ROZPOZNAJĄCEGO FUKOZĘ

Receptor rozpoznający terminalną L-fukozę, zwany także receptorem fukozylowym (receptor Fuk), jest glikoproteiną zawierającą 550 aminokwasów, o masie cząsteczkowej 61 kDa (rys. 1) [1]. Domena wiążąca ligand zlokalizowana w okolicy C-końca proteiny, składa się ze 135 aminokwasów. Domena transbłonowa zawiera 18 homologicznych powtórzeń, po 14–18 aminokwasów każde. W skład domeny cytoplazmatycznej wchodzi 42 reszty aminokwasowe, w tym sześć potencjalnych miejsc glikozylacji, z czterema zrealizowanymi [27].

Receptor fukozylowy występuje w małej ilości na powierzchni różnych komórek, najliczniej jednak na powierzchni hepatocytów i komórek Kupffera wątroby [27,40]. Jego fizjologiczna funkcja nie została jeszcze dokładnie poznana. Podobnie jak inne receptory z rodziny glikoprotein umożliwia on endocytozę wielu ligandom, a szczególnie zakończonych fukozą, która jest połączona wiązaniem glikozydowym α -(1,3) z N-acetylogalaktozaminą [37].

BUDOWA I FUNKCJA HEPATOCYTOWEGO BIAŁKA WIAŻĄCEGO MANNOZĘ

Białko wiążące mannozę występujące w błonach parenchymalnych komórek wątroby (małe ilości) oraz w osoczu krwi ludzkiej (duże ilości), od niedawna definiowane jest jako „białko wiążące mannozę” (ang. *MBP – mannose-binding protein*) parenchymalnych komórek wątroby. W terminologii spotyka się również pojęcie rdzeniowo specyficznej lektyny (ang. *core specific lectin*) lub wątrobowe białko wiążące mannozę [18].

Struktura dwóch typów białka wiążącego mannozę (MBP-A i MBP-C) znana jest częściowo. Białka wiążące obydwu typów składają się z sześciu identycznych podjednostek o masie cząsteczkowej 30 kDa. Domena N-końcowa składa się z 120–150 aminokwasów i spełnia funkcję domeny wiążącej ligand. Kolejna domena podobna jest do kolagenu i zawiera 18 powtórzeń tripletu Glc-Gal-Hyl, które tworzą potrójną spiralę. W dwóch typach białek wiążących mannozę znajdują się także powtórzenia podobne do acetylocholinoesterazy, C1 dopełniacza oraz dla surfaktantu płuc. MBP-A i MBP-C zawierają homologiczną sekwencję, charakterystyczną dla rodziny receptorów glikoprotein w szczególności dla podjednostek RHL-1 i RHL-2/3 szurzego receptora ASGP-R, makrofagowego receptora fukozy, kuzego receptora N-acetyloglukozoaminy [63].

Jednym z ligandów MBP jest lizosomalna β -glukuronidaza. Białka wiążące mannozę wiążą także α_2 -makroglobulinę, α_1 -kwaśną glikoproteinę a zatem mogą uczestniczyć w regulacji usuwania białek ostrej fazy z krwi [56].

Obydwa typy MBP mogą być związane z prymitywnym typem odpowiedzi immunologicznej przeciwko glikokoniuogatom z końcową mannozą na powierzchni mikroorganizmów [36]. Uważa się, że osoczowe MBP-A biorą udział w klasycznej drodze aktywacji dopełniacza oraz w procesie usuwania kompleksów antygen-przeciwciała [56]. Nie została jeszcze do końca wyjaśniona funkcja białka MBP-C. Lokalizacja tych dwóch typów białka wiążącego mannozę w osoczu, może wskazywać, że białko to reguluje syntezę i „przetwarzanie” rdzeniowo specyficznych lektyn.

INNE LIGANDY DLA RECEPTORÓW GLIKOPROTEIN

Glikozoaminoglikan (hialuronian-HA)

Hialuronian (glikozoaminoglikan-HA) jest głównym składnikiem substancji międzykomórkowej i może regulować proces adhezji komórek, tworzenie procesu nowotworowego i angiogenezę. Przypuszcza się, że hialuronian bierze udział w morfogenezie, ale jego rola nie jest znana. Zwiększony poziom HA w surowicy krwi w przypadku marskości wątroby, reumatoidalnego zapalenia stawów i w wielu nowotworach wskazuje, że ten glikozoaminoglikan może regulować przebieg tych chorób. Ostatnio wzrosło znaczenie zastosowania HA w leczeniu artretyzmu, chorób oczu i uszkodzeń ścięgien [43,44].

Hepatocyty szczura i komórki endotelialne specyficznie wiążą HA, podczas gdy same komórki endotelialne są głównym miejscem jego wychwytywania i degradacji. W zawiesinie komórek endotelialnych receptor HA obecny jest wewnątrz komórki, podczas gdy w hodowli tych komórek znajduje się w pęcherzykach endosomalnych i na powierzchni komórki [11,90,98].

Proces endocytozy kompleksu receptora HA i hialuronianu może być wykorzystany zarówno w mechanizmie degradacji hialuronianu, jak też do uzupełnienia liczby receptorów na powierzchni komórek w drodze ich recykulacji. Kompleksy receptora z hialuronianem mają zdolność przemieszczania się w płaszczynie błony i grupowania w dołkach optaszczonych (ang. *coated pit*). Z dołków tych powstają pęcherzyki okryte, które przekształcają się w endosomy. Dzięki obecności w błonie endosomów pompy protonowej, w przestrzeni tej utrzymywane jest niskie pH, które sprzyja oddysocjowaniu ligandów od receptorów HA. Hialuronian ulega degradacji po połączeniu z lizosomami pierwotnymi, natomiast jego receptor powraca na powierzchnię komórki [26,90]. Całkowity *turnover* hialuronianu u ludzi wynosi około 4 g na dobę. Mniejsze fragmenty HA są dostarczane z tkanek do układu limfatycznego, a następnie tą drogą do krwi. Dowodzi to, że hialuronian i inne łańcuchy glikoaminoglikanów nie przechodzące przez węzły chłonne są oczyszczane przez wątrobowe komórki endotelialne.

Ostatnio uważa się, że ICAM-1 (ang. *intercellular adhesion molecule-1*) jest receptorem ułatwiającym wnikanie hialuronianu do komórek endotelialnych wątroby [54]. Ekspresja ICAM-1 wzrasta na komórkach endotelialnych w trakcie reakcji zapalnych i nowotworzenia. Znaczenie interakcji ICAM-1 z hialuronianem nie zostało do tej pory wyjaśnione [25].

Fizjologiczna funkcja receptora hialuronianu nie została do końca jeszcze poznana. Podobnie jak inne receptory z rodziny glikoprotein umożliwia on endocytozę znanym jego endogennym ligandom. Związek receptora HA z metabolizmem fibrynogenu i trombiny sugeruje unikalną funkcję hialuronianu w procesie krzepnięcia krwi [94].

Końcowe produkty zaawansowanej glikacji (AGE)

W warunkach fizjologicznych grupa ketonowa łańcuchowej formy cukrów redukujących reaguje z wolną grupą aminową białek tworząc związek typu zasady Schiffa (aldoimina). Aldoiminy podlegają powolnej przebudowie, tzw. przegrupowaniu Amadori, do formy ketoaminowej, zwanej produktem wczesnego stadium reakcji Millarda. Ketozyloaminy podlegają dalszej przemianie pod wpływem różnych procesów, które trwają od kilku miesięcy do kilkunastu lat i prowadzą do formowania końcowych produktów zaawansowanej glikacji (ang. *AGE – advanced glycosylation end products*).

Monocyty i makrofagi tkankowe były pierwszymi komórkami, w których wykryto swoisty receptor dla białek zmodyfikowanych w reakcji Millarda [88]. Dwa rodzaje receptorów dla AGE wyizolowano z błony komórek parenchymalnych szczura. Jeden z nich ma masę 60 kDa, drugi – 90 kDa, określa się je odpowiednio jako p60 i p90 [97].

Istnieją dowody, że związanie AGE z receptorem monocytu może wywoływać liczne efekty metaboliczne. Zaktywowane monocyty wydzielają interleukinę 1, insulinopodobny czynnik wzrostu-I (IGF-I), czynnik martwicy nowotworów α (TNF- α) oraz płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), który jest silnym czynnikiem proliferacyjnym mięśni gładkich naczyń i fibroblastów [39,89,99]. Naturalnie tworzone AGE-proteiny indukują cytokiny i czynniki proliferacyjne, które ściśle ze sobą współpracują. Przyjmuje się, że zwiększona liczba AGE w komórkach warstwy podśródbłonkowej naczyń staje się sygnałem chemotaktycznym dla monocytów i makrofagów tkankowych. Prowadzi to do naciekania przez makrofagi podśródbłonkowej błony wewnętrznej tętnic [15,77].

Ostatnio wyizolowano z komórek śródbłonka naczyń dwa polipeptydy zdolne do wiązania zmodyfikowanych białek. Jeden z nich ma masę 35 kDa i nazywany jest laktoferynopodobnym białkiem wiążącym AGE. Drugi (46 kDa) jest członkiem immunoglobulinowej rodziny receptorów [62,75,76].

W czasie inkubacji *in vitro* komórek śródbłonka z AGE zmodyfikowanymi albuminami zmniejsza się aktywność zawartej w komórkach śródbłonka trombomoduliny. Zapobiega to aktywacji antykoagulacyjnego białka C oraz zwiększa ekspresję powierzchniową czynnika tkankowego, który przez przyłączenie czynnika VIIa, aktywuje czynniki krzepnięcia IX i X w zewnątrzpochodnym torze krzepnięcia [19]. Związanie AGE z receptorem na komórce śródbłonka zwiększa także zależną od endotelium aktywność endoteliny 1, która powoduje długo utrzymujący się wzrost oporu naczyniowego w krążeniu nerkowym [61]. Może być to przyczyną ogniskowej zakrzepicy i zwężenia naczynia krwionośnego.

W wiązaniu białek zmodyfikowanych przez AGE uczestniczy również receptor zmiatający (ang. *scavenger receptor*). Znajduje się on na powierzchni komórek Kupffera oraz sinusoidalnych komórek endotelialnych i jest receptorem dla acetylowanych LDL, utlenionych LDL i różnych polianionów [32,57,78]. Prawdopodobnie wiązanie AGE-protein z receptorem *scavenger* może wyzwać lub blokować odpowiedzi komórki, takie jak uwalnianie reaktywnych związków azotowych czy mediatorów procesu zapalnego [52,71].

PODSUMOWANIE

Endocytoza za pośrednictwem receptorów glikoprotein prawdopodobnie leży u podstaw usuwania pewnych zmienionych glikoprotein z przestrzeni pozakomórkowej i transportu ich do wnętrza komórki, gdzie podlegają biodegradacji. Pełnią również rolę nośników podczas obróbki i terminalnej glikozylacji nowo syntetyzowanych glikoprotein.

Badania nad receptorami glikoprotein ich strukturą i funkcją mają charakter poznawczy i użyteczny, gdyż w przyszłości glikoproteiny ssaków (specyficzne dla określonych typów komórek) zostaną prawdopodobnie wykorzystane jako środek w terapii do wprowadzania określonych białek, enzymów czy toksycznych leków bezpośrednio do określonych komórek danego narządu.

LITERATURA

- [1] AVRAMEAS A, MC ILROY D, HOSMALIN A, AUTRAN B, DEBRE P, MONSIGNY M, ROCHE AC, MIDOUX P. Expression of a mannose / fucose membrane lectin on human dendritic cells. *Eur J Immunol* 1996; **26**: 394–400.
- [2] BAYNA EM, SHAPER JH, SHUR BD. Temporally specific involvement of cell surface β -1,4 galactosyltransferase during mouse embryo morula compaction. *Cell* 1988; **53**: 145–157.
- [3] BIDER MD, CESCATO R, JENO P, SPIESS M. High-affinity ligand binding to subunit H1 of the asialoglycoprotein receptor in the absence of subunit H2. *Eur J Biochem* 1995; **230**: 207–212.
- [4] BIDER MD, WAHLBERG JM, KAMMERER RA, SPIESS M. The oligomerization domain of the asialoglycoprotein receptor preferentially forms 2:2 heterotetramers *in vitro*. *J Biol Chem* 1996; **271**: 31996–32001.
- [5] BOKER C, VON FIGURA K, HILLE-REFELD A. The carboxyl-terminal peptides of 46 kDa and 300 kDa mannose 6-phosphate receptors share partial sequence homology and contain information for sorting in the early endosomal pathway. *J Cell Sci* 1997; **110**: 1023–1032.
- [6] BREITFELD PP, SIMMONS CF jr., STROUS G JA, GEUZE HJ, SCHWARTZ A L. Cell biology of the ASGP-R system: A model of receptor-mediated endocytosis. *Internal Rev Cytology* 1985; **97**: 47–95.
- [7] BROWN WJ. Cation independent mannose 6-phosphate receptors are concentrated in *trans* Golgi elements in normal human and I-cell disease fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 1990; **51**: 201–210.
- [8] BURGESS JB, BAENZIGER JU, BROWN WR. Abnormal surface distribution of the human asialoglycoprotein receptor in cirrhosis. *Hepatology* 1992; **15**: 702–706.
- [9] CORNIL J, KERBEL RS, DENNIS JW. Tumor cell surface β -1,4-linked galactose binds to lectin(s) on microvascular to organ colonization. *J Cell Biol* 1990; **111**: 773–781.
- [10] DE FIFE KM, JENNEY CR, MC NALLY AK, COLTON E, ANDERSON JM. Interleukin-13 induces human monocyte/macrophage fusion and macrophage mannose receptor expression. *J Immunol* 1997; **158**: 3385–3390.
- [11] DEACIUC IV, BAGBY GJ, LANG CH, SPITZER JJ. Hyaluronic acid uptake by the isolated, perfused rat liver: an index of hepatic sinusoidal endothelial cell function. *Hepatology* 1993; **17**: 266–272.
- [12] DEAN B, OGUCHI H, CAI S, OTSUJI E, TASHIRO K, HAKOMORI S-J, TOYOKUNI T. Synthesis of multivalent β -lactosyl clusters as potential tumor metastasis inhibitors. *Carbo Res* 1993; **245**: 175–192.
- [13] DINI L., CONTI-DEVIRGILIS L., RUSSO-CAIA S. The galactose-specific receptor system in rat liver during development. *Development* 1987; **100**: 13–22.
- [14] DISTLER J.J., JOURDIAN G.W. Low molecular weight phosphomannosyl receptor from bovine testes. *Methods Enzymol* 1987; **138**: 504–509.

- [15] DOI T, VLASSARA H, KIRSTEIN M. Receptor specific increase in extracellular matrix production in mouse mesangial cells by advanced glycosylation end products is mediated via platelet derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 2873–2877.
- [16] DRICKAMER K. Membrane receptors that mediate glycoprotein endocytosis: Structure and biosynthesis. *Kidney Int* 1987; **32**: 167–180.
- [17] DRICKAMER K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J Biol Chem* 1988; **263**: 9557–9560.
- [18] DRICKAMER K, TAYLOR ME. Biology of animal lectins. *Annu Rev Cell Biol* 1993; **9**: 237–264.
- [19] ESPOSITO C, GERLACH H, BRETT J. Endothelial receptor mediated binding of glucose modified albumin is associated with increased monolayer permeability and modulation of cell surface coagulant properties. *J Exp Med* 1992; **170**: 1387–1407.
- [20] EZEKOWITZ RA, SASTRY K, BAILLY P, WARNER A. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: Demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeast in COS-1. *J Exp Med* 1990; **172**: 1785–1794.
- [21] FALLON RJ, DANAHER M, SAXENA A. The asialoglycoprotein receptor is associated with a tyrosine kinase in HepG2 cells. *J Biol Chem* 1994; **269**: 26626–26629.
- [22] FRUNCHAK YN, MARTHA GN, MC FADDEN KD, MILOS NC. Alterations of heart development in *Xenopus laevis* by galactoside-binding lectin or its sugar aptin inhibitor. *Anat Embryol* 1993; **187**: 299–316.
- [23] GABEL CA, GOLDBERG DE, KORNFELD S. Identification and characterization of cells deficient in the mannose 6-phosphate receptor. Evidence for an alternate pathway for lysosomal enzyme targeting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 775–779.
- [24] GALILI U. Evolution and pathophysiology of the human natural anti- α -galactosyl IgG (anti-Gal) antibody. *Springer Semin Immunopathol* 1993; **15**: 155–171.
- [25] GUSTAFSON S, BJORKMAN T, FORSBERG N, LIND T, WIKSTROM T, LIDHOLT K. Accessible hyaluronan receptors identical to ICAM-1 in mouse mast-cell tumors. *Glycoconj J* 1995; **12**: 350–355.
- [26] GUSTAFSON S, BJORKMAN T, WESTLIN JE. Labeling of high molecular weight hyaluronan with 125 I-tyrosine: studies *in vitro* and *in vivo* in the rat. *Glycoconj J* 1994; **11**: 608–613.
- [27] HALTIWANGER RS, LEHRMAN MA, ECKHARDT AE, HILL RL. The distribution and localization of the fucose-binding lectin in rat tissues and the identification of the high affinity form of the mannose/N-acetylglucosamine-binding lectin in rat liver. *J Biol Chem* 1986; **261**: 7433–7439.
- [28] HARDY MR, TOWNSEND RR, PARKHURST SM, LEE YC. Different modes of ligand binding to the hepatic galactose/N-acetylglucosamine lectin on the surface of rabbit hepatocytes. *Biochemistry* 1985; **24**: 22–28.
- [29] HERZIG MCS, WEIGEL PH. Surface and internal galactosyl receptors are heterooligomers and retain this structure after ligand internalization or receptor modulation. *Biochemistry* 1990; **29**: 6437–6447.
- [30] HERZIG MCS, WEIGEL PH. Synthesis and characterization of N-hydroxy-succinimide ester chemical affinity derivatives of asialoorozomucoid that covalently cross-link to galactosyl receptors on isolated rat hepatocytes. *Biochemistry* 1989; **28**: 600–610.
- [31] HONDA T, SCHULTE BA, SPICER SS. Glycoconjugate with terminal galactose-selective property of macrophages in developing rat lung. *Histochemistry* 1989; **91**: 61–67.
- [32] HORIUCHI S, HIGASHI T, IKEDA K. Advanced glycation end products and their recognition by macrophage and macrophage-derived cells. *Diabetes* 1996; **45** (Suppl.3): S 73–76.
- [33] HUMPHREYS-BEHER MG, ZELLES T, MAEDA N, PURUSHOTHAM KR, SCHNEYER CA. Cell surface galactosyltransferase acts as a general modulator of acinar cell proliferation. *Molec Cell Biochem* 1990; **95**: 1–11.

- [34] HYODO I, MIZUNO M, YAMADA G, TSUJI T. Distribution of asialoglycoprotein receptor in human hepatocellular carcinoma. *Liver* 1993; **13**: 80–85.
- [35] II M, KURATA H, ITOH N, YAMASHINA I, KAWASAKI T. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding the macrophage lectin specific for galactose and N-acetyl-galactosamine. *J Biol Chem* 1990; **265**: 11295–11298.
- [36] KAHN SJ, WLEKLINSKI M, EZEKOWITZ RA, CODER D, ARUFFO A, FARR A. The major surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes are ligands of the human serum mannose-binding protein. *Infect Immun* 1996; **64**: 2649–2656.
- [37] KAWASAKI T, BIESSEN EA, BAKKEREN HF, BEUTING DM, KUIPER J. Ligand size is a major determinant of high-affinity binding of fucose- and galactose-exposing (lipo)proteins by the hepatic fucose receptor. *Biochem J* 1994; **299**: 291–296.
- [38] KAWASHIMA H, WATANABE N, HIROSE M, MIYASAKA M. Characterization of 180 kDa molecule apparently reactive with recombinant L-selectin. *Glycoconj J* 1997; **14**: 321–330.
- [39] KIRSTEIN M, ASTON, HINTZ R, VLASSARA H. Receptor-specific induction of insulin-like growth factor I in human monocytes by advanced glycosylation end product-modified proteins. *J Clin Invest* 1992; **90**: 439–446.
- [40] KLEGERIS A, BUUD TC, GREENFIELD SA. Acetylcholinesterase-induced respiratory burst in macrophages: evidence for the involvement of the macrophage mannose-fucose receptor. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1289**: 159–168.
- [41] KORNFELD S. Trafficking of lysosomal enzymes. *FASEB J* 1987; **1**: 462–468.
- [42] KULIAWAT R, KLUMPERMAN J, LUDWIG T, ARVAN P. Differential sorting of lysosomal enzymes out of the regulated secretory pathway in pancreatic β -cells. *J Cell Biol* 1997; **137**: 595–608.
- [43] LAURENT TC, FRASER JR. Hyaluronan. *FASEB J* 1992; **6**: 2397–2404.
- [44] LAURENT TC, LAURENT UB, FRASER JR. Serum hyaluronan as a disease marker. *Ann Med* 1996; **28**: 241–253.
- [45] LE-BORGNE R., HOFACK B. Mannose 6-phosphate regulate the formation of clathrin-coated vesicles in the TGN. *J Cell Biol* 1997; **137**: 335–345.
- [46] LEE RT, LEE YC. Preparation of a high-affinity photolabeling reagent for the Gal/GalNAc lectin of mammalian liver. Demonstration of galactose-combining sites on each subunit of rabbit hepatic lectin. *Biochemistry* 1986; **25**: 6835–6841.
- [47] LEFKOWITZ DL, LINCOLN JA, KEFKOWITZ SS, BOLLEN A, MOGUILVSKI N. Enhancement of macrophage mediated bactericidal activity by macrophage-mannose receptor-ligand interaction. *Immunol Cell Biol* 1997; **75**: 136–141.
- [48] LEFKOWITZ DL, MILLS K, MORGAN D, LEFKOWITZ SS. Macrophage activation and immunomodulation by myeloperoxidase. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992; **199**: 204–210.
- [49] LENNARTZ MR, WILEMAN TE, STAHL PD. Isolation and characterization of a mannose-specific receptor from rabbit alveolar macrophages. *Biochem J* 1987; **245**: 705–711.
- [50] LIU ZH, STRIKER GE, STETLER-STEVENSON M, FUKUSHIMA P, PATEL A, STRICER LJ. TNF- α and Il-1 α induce mannose receptors and apoptosis in glomerular mesangial but not endothelial cells. *Am J Physiol* 1996; **270**: C1595–1601.
- [51] MARTINEZ DA, ZUSCIK MJ, ISHIBE M, ROSIER RN, ROMANO PR., CUSHING JE. Identification of functional insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptors in isolated bone cells. *J Cell Biochem* 1995; **59**: 246–257.
- [52] MARTINEZ I, SVEINBJORNSSON B, VIDAL-VANACLOCHA F. Differential cytokine-mediated modulation of endocytosis in rat liver endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **212**: 235–241.
- [53] MAYNARD Y, BAENZIGER JU. Oligosaccharide specific endocytosis by isolated rat hepatic reticuloendothelial cells. *J Biol Chem* 1981; **256**: 8063–8068.
- [54] MC COURT PA, EK B, FORSBERG N, GUSTAFSON S. Intercellular adhesion molecule-1 is a cell surface for hyaluronan. *J Biol Chem* 1994; **269**: 30081–30084.

- [55] METZGER H, KINET JP. How antibodies work: Focus Fc receptors. *FASEB J* 1988; **2**: 3–11.
- [56] MORI K, KAWASAKI T, YAMASHINA I. Isolation and characterization of endogenous ligands for liver mannan-binding protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 1988; **264**: 647–656.
- [57] MORI T, TAKAHASHI K, HIGASHI T. Localization of advanced glycation end products of Maillard reaction in bovine tissues and their endocytosis by macrophage scavenger receptors. *Exp Mol Pathol* 1996; **63**: 135–152.
- [58] MORTENSEN B, HUSEBY NE. Clearance of circulating γ -glutamyltransferase by the asialoglycoprotein receptor. Enzyme forms with different sialic acid content are eliminated at different clearance rates and without apparent deasialylation. *Clin Chim Acta* 1997; **258**: 47–58.
- [59] MU JZ, GORDON M, SHAO JS, ALPERS DH. Apical expression of functional asialoglycoprotein receptor in the human intestinal cell line HT-29. *Gastroenterology* 1997; **113**: 1501–1509.
- [60] MULLIN NP, HITCHEN PG, TAYLOR ME. Mechanism of Ca^{2+} and monosaccharide binding to a C-type carbohydrate-recognition domain of the macrophage mannose receptor. *J Biol Chem* 1997; **272**: 5668–5681.
- [61] NAWROTH PP, STERN D, BIERHAUS A. AGE-Albumin stimulierte Endothelzellen-ein in-vitro Modell diabetischer Spätschaden. *Diabetes Stoffwechs* 1992; **1** (Suppl.1): 153 A.
- [62] NEEPER M., SCHMIDT AM, BRETT J. Cloning and expression of RAGE: a cell surface for advanced glycosylation end products of protein. *J Biol Chem* 1992; **267**: 14998–15004.
- [63] NG K K-S, DRICKAMER K, WEIS I. Structural analysis of monosaccharide recognition by rat liver mannose-binding protein. *J Biol Chem* 1996; **271**: 663–674.
- [64] OKA JA, HERZIG MCS, WEIGEL PH. Functional galactosyl receptors on isolated rat hepatocytes are heterooligomers. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; **170**: 1308–1313.
- [65] OKA JA, WEIGEL PH. Monensin inhibits ligand dissociation only transiently and partially and distinguishes two galactosyl receptor pathways in isolated rat hepatocytes. *J Cell Physiol* 1987; **133**: 243–252.
- [66] OSHIMA A, NOLAN CM, KYLE JW, GRUBB JH, SLY WM. The human cation-independent mannose 6-phosphate receptor. Cloning and sequence of the full-length DNA and expression of functional receptor in COS cells. *J Biol Chem* 1988; **263**: 2553–2562.
- [67] OZAKI K, LEE RT, LEE YC, KAWASAKI T. The differences in structural specificity for recognition and binding between asialoglycoprotein receptors of liver and macrophages. *Glycoconj J* 1995; **12**: 268–274.
- [68] PAIKA JA, KARNA A, MILTYK W. Fibroblast chemotaxis and prolidase activity modulation by insulin-like growth factor II and mannose 6-phosphate. *Mol Cell Biochem* 1997; **168**: 177–183.
- [69] PRANNING-VAN DALEN DP, DE LEEUW AM, BROUWER A, KNOOK DL. Rat liver endothelial cells have a greater capacity than Kupffer cells to endocytose N-acetylglucosamine and mannose-terminated glycoproteins. *Hepatology* 1987; **7**: 672–679.
- [70] RAX A, LOTAN R. Endogenous galactoside-binding lectins: a new class of functional tumor cell surface molecules related to metastasis. Cancer and Metastasis colonization. *J Cell Biol* 1987; **111**: 773–781.
- [71] ROJAS A, CAVEDA L, ROMAY C. Effect of advanced glycosylation end products on the induction of nitric oxide synthases in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **225**: 358–362.
- [72] SANDERS EJ, ZALIK SE, SCHNEIDER WJ, LEDSHAM IM. The endogenous lectins of the chick blastoderm are present in association with an apolipoprotein in distinct organelles and in the ECM. *Roux's Arch Dev Biol* 1990; **199**: 295–306.
- [73] SCHLEPPER-SCHAFFER J., KOLB-BACHOFEN V. Red cell aging results in a change of cell surface carbohydrate epitopes allowing for recognition by galactose receptors of rat liver macrophages. *Blood Cells* 1988; **14**: 259–269.

- [74] SCHLEPPER-SCHAFFER J, HULSMANN D, DJOVKAR A, MEYER HE, HERBERTZ L, KOLB H, KOLB-BACHOFEN V. Endocytosis via galactose receptors *in vivo*-ligand size directs uptake hepatocytes and/or liver macrophages. *Exp Cell Res* 1986; **165**: 494–506.
- [75] SCHMIDT AM, MORA R, CAO K. The endothelial cell binding site for advanced glycation end products consists of A complex: an integral membrane protein and a lactoferrin-like polypeptide. *J Biol Chem* 1994; **269**: 9882–9888.
- [76] SCHMIDT AM, VIANNA M, GERLACH M. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem* 1992; **267**: 14987–14997.
- [77] SKOLNIK EY, YANG Z, MAKITA Z. Human and rat mesangial cell receptor for glucose-modified proteins: potential role in kidney tissue remodeling and diabetic nephropathy. *J Exp Med* 1991; **174**: 931–939.
- [78] SMEDSROD B, MELKKO J, ARAKI N, SANO H, HORIUCHI S. Advanced glycation end products are eliminated by scavenger-receptor-mediated endocytosis in hepatic sinusoidal Kupffer and endothelial cells. *Biochem J* 1997; **322**: 567–573.
- [79] SPIES M, LODISH HF. Sequence of a second human asialoglycoprotein receptor: Conservation of two receptor genes during evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 6465–6569.
- [80] STEER CJ, KEMPNER ES, ASHWELL G. Molecular size of the hepatic receptor for asialoglycoproteins determined *in situ* by radiation inactivation. *J Biol Chem* 1981; **256**: 5851–5856.
- [81] STEIN M, ZIJDERHAND-BLECKEMOLEN JE, GEUZE H, HASILIK A, VON FIGURA K. Mr 46000 mannose 6-phosphate specific receptor. Its role in targeting of lysosomal enzymes. *EMBO J* 1987; **6**: 2677–2681.
- [82] STEPHENSON JD, SHEPHERD VL. Purification of the human alveolar macrophage mannose receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; **148**: 883–889.
- [83] STOCKERT RJ, MORELL AG, ASHWELL G. Structural characteristics and regulation of the asialoglycoprotein receptor. *Targeted Diagn Ther* 1991; **4**: 41–64.
- [84] TAYLOR ME, CONARY JT, LENNARTZ MR, STAHL PD, DICKAMER K. Primary structure of the mannose receptor contains multiple motifs resembling carbohydrate-recognition domains. *J Biol Chem* 1990; **265**: 12156–12162.
- [85] TORCHIO M, ROPOLO L, FERRO M ET AL. Removal systems of immunoglobulin A and immunoglobulin A containing complexes in IgA nephropathy and cirrhosis patients. The role of asialoglycoprotein receptors. *Lab Invest* 1993; **69**: 714–723.
- [86] TREICHEL U, GERKEN G, ROSSOL S, ROTTHAUWE HW, MEYER-ZUM-BUSCHENFELDE KH, PORALLA T. Autoantibodies against the human asialoglycoprotein receptor: effects of therapy in autoimmune and virus-induced chronic active hepatitis. *J Hepatol* 1993; **19**: 55–63.
- [87] VAN KESTEREN CAM, DANSER AHJ, DERKX FHM, DEKKERS DHW. Mannose 6-phosphate receptor-mediated internalization and activation of prorenin by cardiac cells. *Hypertension* 1997; **30**: 1389–1396.
- [88] VLASSARA H, BROWNLEE M, CERAMI A. High-affinity receptor mediated uptake and degradation of glucose-modified proteins: a potential mechanism for the removal of senescent macromolecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 5588–5592.
- [89] VLASSARA H, BROWNLEE M, MONOGUE K. Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodeling. *Science* 1988; **240**: 1546–1548.
- [90] VROCHIDES D., PAPANIKOLAOU V., PERTOFT H., ANTONIADES A.A., HELDIN P. Biosynthesis and degradation of hyaluronan by nonparenchymal liver cells during liver regeneration. *Hepatology* 1996; **23**: 1650–1655.
- [91] WEIGEL PH. Galactosyl and N-acetylgalactosaminyl homeostasis: A function for mammalian asialoglycoprotein receptors. *BioEssays* 1994; **16**: 519–524.

- [92] WEIGEL PH. Mechanisms and control of glycoconjugate turnover. [w] Allen H.J., Kisailus E.C. [red.] *Glycoconjugates: Composition, Structure and Function*. New York: Marcel Dekker 1992: 421–494.
- [93] WEIGEL PH. Receptor recycling and ligand processing mediated by hepatic galactosyl receptors: A two-pathway system. [w] Olden K., Parent J.B. [red.] *Vertebrate Lectins*. New York: Van Nostrand Reinhold 1987: 65–91.
- [94] WEIGEL P.H., FULLER G.M., LE BOEUF R.D. A model for the role of hyaluronic acid and fibrin in the early events during the inflammatory response and wound healing. *J Theor Biol* 1986; **119**: 219–234.
- [95] WIESER RJ, OESCH F. Contact-dependent regulation of growth of diploid human fibroblasts is dependent upon the presence of terminal galactose residues on plasma membrane glycoproteins. *Exp Cell Res* 1988; **176**: 80–86.
- [96] WU K, YUAN J, LASKY LA. Characterization of a novel member of the macrophage mannose receptor type C lectin family. *J Biol Chem* 1996; **271**: 21323–21330.
- [97] YANG Z, MAKITA Z, HORII Y. Two novel rat liver membrane proteins that bind advanced glycosylation end product: relationship to macrophage receptor for glucose-modified proteins. *J Exp Med* 1991; **174**: 515–524.
- [98] YANNARIELLO-BROWN J, ZHOU B, WEIGEL PH. Identification of a 175 kDa protein as the ligand-binding subunit of the rat liver sinusoidal endothelial cell hyaluronan receptor. *Glycobiology* 1997; **7**: 15–21.
- [99] YUI S, SASAKI T, ARAKI N. Induction of macrophage growth by advanced glycation end products of the Maillard reaction. *J Immunol* 1994; **152**: 1943–1949.
- [100] ZALIK SE. On the possible role of endogenous lectins in early animal development. *Anat Embryol* 1991; **183**: 521–536.
- [101] ZANETTA JP, BINGEN A, DONTENWILL-KIEFER M, REEBER A, MEYER A, VINCENDON G. Cerebellar lectin „R1” is related to the receptor of circulating mannosyl glycoproteins of liver sinusoidal cells. *Cell Mol Biol* 1987; **33**: 423–434.
- [102] ZENG FY, KAPHALIA BS, ANSARI GAS, WEIGEL PH. Fatty acylation of the rat asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem* 1995; **270**: 2138–21387.
- [103] ZENG FY, OKA JA, WEIGEL PH. The human asialoglycoprotein receptor is palmitoylated and fatty deacylation causes inactivation of state 2 receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **218**: 325–330.
- [104] ZENG FY, WEIGEL PH. Hydroxylamine treatment differentially inactivates purified rat hepatic asialoglycoprotein receptors and distinguishes two receptor populations. *J Biol Chem* 1995; **270**: 21388–21395.
- [105] ZHANG Q, TALLY M, LARSSON O, KENNEDY RT, HUANG L, HALL K, BERGGREN PO. Insulin-like growth factor II signaling through the insulin-like growth factor II/mannose-6-phosphate receptor promotes exocytosis in insulin-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 6232–6237.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 26.05. 1998 r.

Przyjęto: 04.06. 1998 r.

Adres autora: 50-139 Wrocław, ul. Szewska 38/39

INHIBITORY TOPOIZOMERAZY I – NOWA KLASA LEKÓW PRZECIWNOWOTWOROWYCH*

TOPOISOMERASE I INHIBITORS – A NEW CLASS OF ANTICANCER DRUGS

Ewa CIESIELSKA

Zakład Chemii Ogólnej Akademii Medycznej w Łodzi

Streszczenie: Identyfikacja topoizomerazy I jako komórkowego receptora kamptotecyny – alkaloidu o silnym działaniu przeciwnowotworowym – spowodowała wzrost zainteresowania inhibitorami tego enzymu. Badania mechanizmu ich działania oraz zależności między strukturą i aktywnością, doprowadziły do syntezy szeregu pochodnych kamptotecyny o korzystniejszych właściwościach terapeutycznych. Dwa z nich, topotecan i irinotecan (CPT-11), przeszły pomyślnie próby kliniczne, a inne, tj. 9-aminokamptotecyna, 9-nitrokamptotecyna i 7-(4-metylopiperazynometyleno)10,11-etyleno-dioksykamptotecyna przechodzą obecnie I i II fazę tych prób. Wśród inhibitorów topoizomerazy I niespokrewnionych z kamptotecyną, poszukuje się także nowych leków przeciwnowotworowych.

Słowa kluczowe: topoizomeraza, kamptotecyny, leki przeciwnowotworowe.

Summary: Topoisomerase I identification as a cell target for camptothecin, a potent anticancer alkaloid, stimulated an interest of this enzyme inhibitors. Research on their mechanism of action as well as on their structure – activity relationships has led to the development of effective analogues with improved therapeutic properties. Two of them, topotecan and irinotecan (CPT-11) were registered for clinical use, others, 9-aminocamptothecin, 9-nitrocamptothecin and 7-(4-methylpiperazinomethylene)10,11-ethylene-dioxycamptothecin are undergoing phase I and II evaluation. The search for new noncamptothecin topoisomerase I inhibitors is also observed.

Key words: topoisomerase, camptothecins, anticancer drugs.

WSTĘP

Topoizomerazy występują we wszystkich organizmach żywych poczynając od wirusów, bakterii, roślin, na ssakach skończywszy. Wzrost zainteresowania tymi enzymami w ostatnich latach wynika z obserwacji, że okazały się one być receptorami

*Finansowanie pracy: Akademia Medyczna w Łodzi, temat 503-104-5.

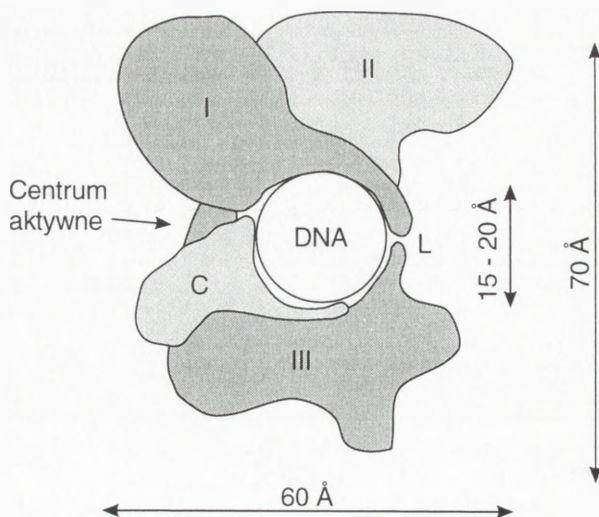
wielu leków przeciwnowotworowych. Topoizomerazy biorą udział we wszystkich związanych z rozplataniem komplementarnych nici DNA procesach komórkowych, takich jak: replikacja, transkrypcja, rekombinacja i reperacja. Rozdzieleniu dwóch nici DNA towarzyszy rozkręcenie cząsteczki (jedno na każde 10 par nukleotydów). Zmiana ta wywołuje w sąsiednich fragmentach łańcucha naprężenia spowodowane powstawaniem nowych superhelikalnych skrętów. Dotyczy to zarówno kolistego genomu prokariotów, jak i tworzącego struktury wyższego rzędu DNA eukariotów. Rolą topoizomeraz jest usuwanie takich naprężeń poprzez relaksację DNA, czyli nacinanie jednej lub obu jego nici, przeplatanie ich i ponowne łączenie. Wszelkie zaburzenia tego procesu, szczególnie w momencie naruszenia ciągłości DNA, mogą być niebezpieczne dla komórki, wywoływać mutacje (insercje i delecje) oraz aberracje chromosomowe lub nawet powodować jej śmierć [1, 16]. Dlatego spośród inhibitorów topoizomeraz najbardziej cytotoksycznymi okazały się te, które uniemożliwiają lub utrudniają przywrócenie ciągłości DNA. Dla odróżnienia od pozostałych inhibitorów zwanych katalitycznymi nazwano je „blokerami” (ang. *blockers*) lub „truciznami” (*poisons*).

Ze względu na sposób przecinania DNA (jednej lub obu nici) topoizomerazy zaklasyfikowano do dwóch grup: typu I (topo I) i II (topo II). Ludzka topo I jest monomerycznym białkiem o masie cząsteczkowej 100 kD, kodowanym przez jeden gen na dłuższym ramieniu chromosomu 20. w locus 20q12-13.2 [8, 32]. Występuje w jąderku w liczbie około 10^6 cząsteczek [28]. Obecność topo I stwierdzono również w mitochondriach: oocytów *Xenopus laevis*, komórek ludzkiej leukemii i grasiccy cielęcej [22, 31]. Enzym ten katalizuje relaksację dodatnich i ujemnych superhelikalnych skrętów w cząsteczkach DNA. W odróżnieniu od topo II, topo I może zrelaksować DNA bez udziału dostarczających energię nukleozydotrifosforanów i dwuwartościowych kationów, chociaż obecność jonów Mg^{2+} ułatwia dysocjację kompleksu enzym-DNA i w ten sposób podwyższa szybkość reakcji [48]. Jest fosfoproteiną – jej aktywność jest hamowana przez defosforylację i ADP-rybozylację [22], które wydają się być ze sobą ściśle powiązane [56]. Ostatnie odkrycia wskazują na istnienie dodatkowych topoizomeraz typu I w komórkach ludzkich. Na chromosomie 17p11.2-12 zidentyfikowano gen *TOP3* kodujący białko homologiczne z bakteryjną topo I – enzymem odmiennym pod względem struktury i sposobu działania od eukariotycznej topo I [23].

BUDOWA TOPOIZOMERAZY I

Ludzka topo I jest pojedynczym łańcuchem polipeptydowym złożonym z 765 aminokwasów, z których 40% stanowią aminokwasy zjonizowane [8]. Najnowsze badania rentgenokrytalograficzne i rekonstrukcyjne [50] wykazały, że łańcuch ten

zawiera cztery główne domeny: N-kończową, korową, łącznikową (*linker*) i C-kończową. Dwie z nich, korowa i C-kończowa są to globularne regiony o wysokiej konserwatywności i mają kluczowe znaczenie dla katalitycznej funkcji enzymu. Topo I pozbawiona domeny N-kończowej i łącznikowej zachowuje nie zmienioną aktywność właściwą. W skład części korowej wchodzi trzy subdomeny, które wraz z regionem C-kończowym tworzą „klamrę” otaczającą heliks DNA (rys. 1). Wewnątrz tej klamry znajdują się dodatkowo naładowane aminokwasy (15 lizyn i 8 arginin) oddziałujące z resztami fosforanowymi łańcucha fosfocukrowego. Dolną część klamry buduje subdomena III zawierająca wszystkie reszty aminokwasowe centrum aktywnego enzymu oprócz katalitycznej Tyr 723, która znajduje się w domenie C-kończowej. W skład subdomeny III wchodzi między innymi dwa długie łańcuchy o strukturze α helisy, pełniące rolę zawiasów otwierających i zamykających topoizomerazową klamrę wokół heliksu DNA. Miejsce zamknięcia zwane „wargami” (*lips*) jest połączeniem subdomeny I i III wiązaniem typu soli pomiędzy resztą lizyny i kwasu glutaminowego (rys. 1).

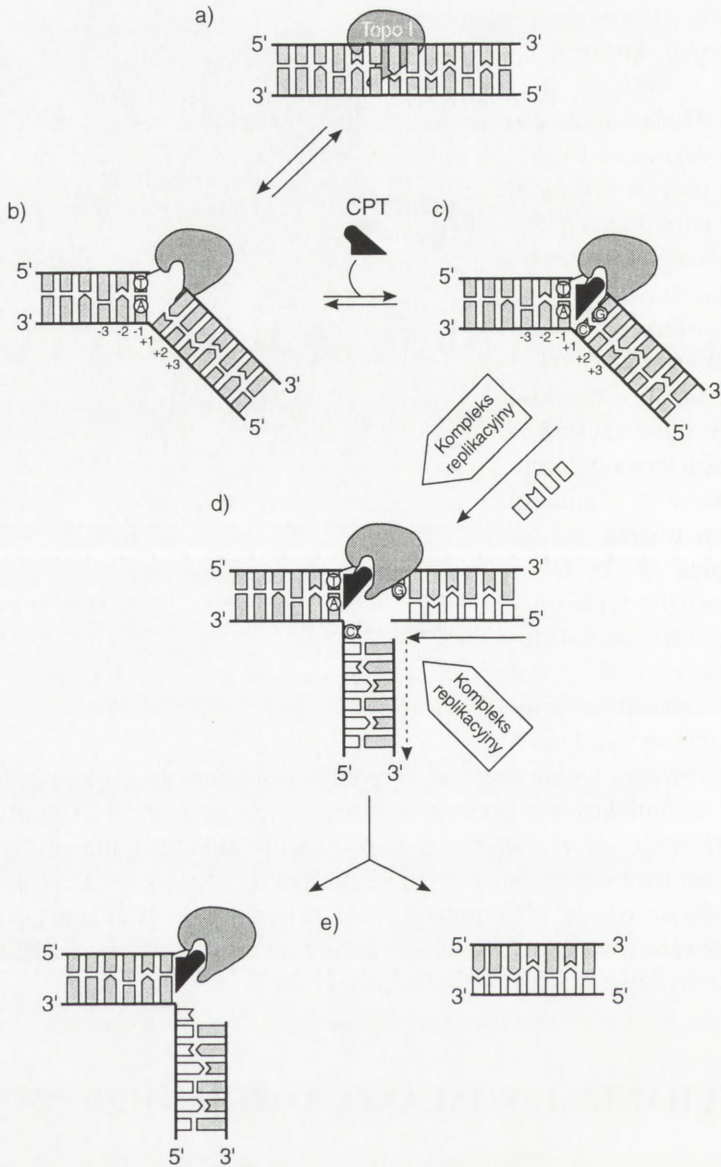


RYSUNEK 1. Schemat budowy kompleksu ludzkiej topo I z DNA: I, II, III – subdomeny I, II i III enzymu korowego, C – domena C-kończowa, L (*lips*) – „wargi” zamykające enzym wokół heliksu DNA; dla większej przejrzystości rysunku nie zaznaczono domeny N-kończowej i łącznikowej

MECHANIZM DZIAŁANIA TOPOIZOMERAZY I

W reakcji katalizowanej przez topo I można wyróżnić cztery etapy: 1) przyłączenie enzymu do DNA (rys. 2a), 2) przecięcie jednej nici z jednoczesnym kowalencyjnym związaniem się enzymu z DNA (rys. 2b), 3) przejście nieprzeciętej nici przez utworzone w drugiej pęknięcie, 4) ligacja przeciętej nici.

Eukariotyczna topo I przyłącza się tylko do dwuniciowego DNA tworząc z nim kompleks niekowalencyjny. Przyłączony enzym oddziałuje z heliksem na odcinku 10 par zasad [50]. W większości tych oddziaływań uczestniczą reszty fosforanowe

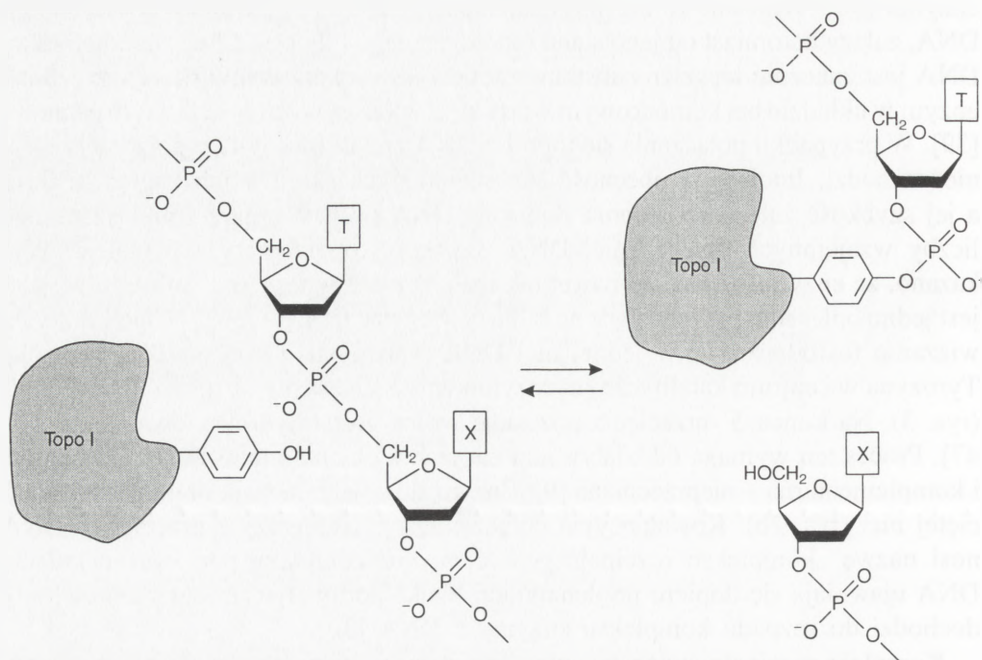


RYSUNEK 2. Mechanizm powstawania dwuniciowych pęknięć DNA indukowanych przez kamptotecynę: a) Topo I przyłącza się niekowalencyjnie do DNA („kompleks nierozcinalny”). b) Topo I przecina jedną nić heliksu, wiążąc się kowalencyjnie z końcem 3' przecięcia i niekowalencyjnie z jego końcem 5' („kompleks rozcinalny”). W warunkach fizjologicznych kompleks rozcinalny pozostaje w równowadze z nierozcinalnym utworzonym przed lub po topoizomeryzacji. c) Stabilizacja rozcinalnego kompleksu przez kamptotecynę, która przyłącza się do niego odwracalnie w miejscu kontaktu enzymu z DNA. Preferowaną przez CPT zasadą na końcu 5' jest guanina. CPT zakłóca równowagę pomiędzy kompleksem nierozcinalnym i rozcinalnym podwyższając stężenie ostatniego. d i e) Kolidza pomiędzy widelkami replikacyjnymi i kompleksem topo I-DNA-CPT: gdy posuwające się widelki replikacyjne dochodzą do stabilizowanego przez CPT kompleksu topo I z DNA, przecięta nić związana niekowalencyjnie z enzymem ulega odłączeniu, co prowadzi do utworzenia dwuniciowego pęknięcia DNA

łańcucha fosfocukrowego DNA oraz aminokwasy I i III subdomeny korowej części enzymu [50]. Wiązanie to nie wykazuje specyficzności w stosunku do sekwencji DNA, zależy natomiast od jego stanu topologicznego [39, 60]. Choć superhelikalny DNA jest znacznie lepszym substratem topo I niż zrelaksowany [6, 41], to jednak enzym w układzie bezkomórkowym wiąże się z większą wydajnością z tym ostatnim [39]. W przypadku połączenia się topo I z DNA zrelaksowanym, topoizomeryzacja nie zachodzi. Inicjuje ją obecność superhelikalnych skrętów lub zagięć heliksu, a jej szybkość zależy od stopnia skręcenia DNA [39]. W miarę zmniejszania się liczby wzajemnych opleceń nici DNA, szybkość topoizomeryzacji maleje. Wykazano, że enzym rozpoznaje nawet tak małą różnicę w topologii substratów, jaką jest jedno oplecenie przypadające na kilka tysięcy par zasad [39, 67]. Topo I rozrywa wiązanie fosfodiesterowe w jednej nici DNA wiążąc się z końcem 3' przecięcia. Tyrozyna w centrum katalitycznym enzymu wiąże się estrowo z resztą fosforanową (rys. 3). Na końcu 5' przecięcia pozostaje wolna grupa hydroksylowa [8, 22, 32, 47]. Proces ten wymaga oddziaływania enzymu z obiema niemi DNA: przecinaną i komplementarną – nieprzecinaną [9]. Enzym służy jako łącznik obu końców przeciętej nici (rys. 2b). Kowalencyjne połączenie topoizomerazy z przeciętym DNA nosi nazwę „kompleksu rozcinalnego” (*cleavable complex*), ponieważ pęknięcia DNA ujawniają się dopiero po denaturacji białka pod wpływem detergentów, gdy dochodzi do rozpadu kompleksu enzymu z DNA [32].

Kompleks rozcinalny pozostaje w równowadze z „kompleksem nierozcinalnym”, czyli z enzymem połączonym niekowalencyjnie z DNA przed lub po topoizomeryzacji [32]. Struktura przestrzenna kowalencyjnego i niekowalencyjnego kompleksu jest prawie identyczna. Różnica dotyczy głównie katalitycznej tyrozyny oraz grupy fosforanowej miejsca przecięcia, które w kompleksie rozcinalnym są lekko przesunięte [50].

Przecinanie łańcucha DNA przez topo I charakteryzuje się selektywnością sekwencyjną i wykazuje silną preferencję do tymidyny, z którą enzym wiąże się kowalencyjnie [8, 47]. Tymina w mniejszym rowku DNA rozpoznawana jest przez centrum aktywne enzymu poprzez lizynę subdomeny III. Grupa aminowa ε tego aminokwasu tworzy wiązanie wodorowe z O-2 grupy karbonylowej tyminy [50]. Przecięcie może powstać również wówczas, gdy tymina zastąpiona jest cytozyną lub nawet w przypadku braku zasady azotowej w tym miejscu [67]. Nie stwierdzono natomiast tworzenia kompleksu rozcinalnego topo I z DNA poprzez nukleotyd purynowy [67]. Istotny wpływ na aktywność tnącą enzymu może mieć również metylacja cytozyn sąsiadujących z miejscem przecięcia. Metylacja Cyt-4 stymuluje ją, a Cyt-3 hamuje [67]. Koniec przeciętej nici niekowalencyjnie związany z enzymem obraca się wokół nici komplementarnej zmieniając liczbę opleceń o 1. Topo I może się także przyłączać do podwójnego heliksu w miejscu jednoniciowego pęknięcia DNA i przecinać nić komplementarną, co prowadzi do nieuprawnionej rekombinacji DNA [9, 49].



RYSUNEK 3. Transestryfikacja katalizowana przez topo I. Grupa hydroksylowa tyrozyny w centrum aktywnym topo I atakuje wiązanie fosfodiesterowe DNA, w wyniku czego enzym przez resztę tyrozynową wiąże się z końcem 3' fosforanowym uwalniając koniec 5'. Preferowaną zasadą na końcu 3' przecięcia jest tymina

Ostatnim etapem relaksacyjnego cyklu topo I jest zszycie przeciętej nici. Jest to następna reakcja transestryfikacji, w której grupa hydroksylowa z końca 5' przecięcia działa jako nukleofil atakując wiązanie fosfotyrozynowe i ponownie łącząc przerwana nić [22]. Szybkość tego etapu zależy od sekwencji DNA w miejscu przecięcia [47].

Inhibitory topo I działają albo przez stabilizację kompleksu rozcinalnego, albo przez hamowanie wiązania się enzymu z DNA. Największą aktywność przeciwnowotworową wykazują inhibitory stabilizujące kompleks rozcinalny topo I z DNA. Związki te mogą wiązać się z jednym lub obydwoma składnikami tego kompleksu, uniemożliwiając ligację przeciętej nici. Obok kamptotecyny i jej pochodnych, które nie wiążą się z samym DNA lub oddziałują z nim bardzo słabo, należą tu związki silnie się z nim wiążące bądź przez interkalację (aktynomycyna D, morfolinodokсорubicyna, saintopina), bądź kowalencyjnie (1-nitroakrydyny). Stabilizacja roz-

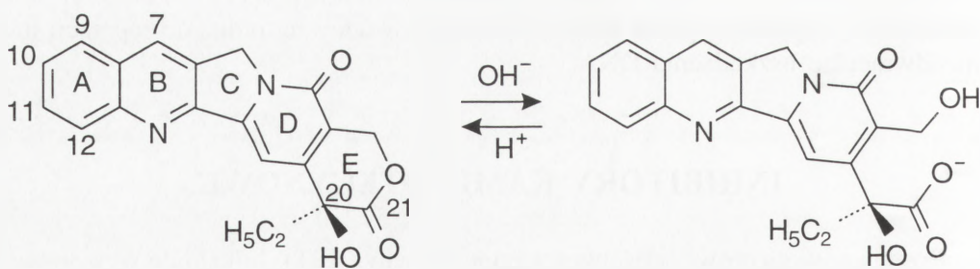
cinalnych kompleksów przez te związki może powodować trudne do reperacji lub nieodwracalne uszkodzenia DNA.

INHIBITORY KAMPTOTECYNOWE

Przeciwnowotworowe właściwości kamptotecyny (CPT) – alkaloidu wyizolowanego z drzewa *Camptotheca acuminata*, znane są od ponad 30 lat [65]. Pomimo zachęcających rezultatów prób przedklinicznych oraz I fazy badań klinicznych, próby fazy II przeprowadzone z CPT oraz ze znacznie lepiej rozpuszczalną jej solą sodową wykazały wysoką toksyczność leku i spowodowały jego wycofanie z lecznictwa [5]. Dopiero w późnych latach osiemdziesiątych, kiedy Hsiang i Liu [27] wykazali, że komórkowym receptorem CPT jest topo I, wzrosło zainteresowanie tym związkiem i dokonano syntezy wielu jego analogów [66]. Kamptotecynowe inhibitory topo I stanowią obecnie nową, obiecującą klasę leków przeciwnowotworowych. Dwa z nich: topotecan oraz irinotecan zostały zarejestrowane do użytku klinicznego, a trzy inne przechodzą badania I i II fazy [12, 18]. Ponawiane są również próby kliniczne ze związkiem macierzystym, podawanym obecnie doustnie, który został dopuszczony do II ich fazy [12, 38]. Eukariotyczna topo I jest, jak dotąd, jedynym znanym komórkowym receptorem CPT oraz jej pochodnych. Komórki drożdży z delecją genu topo I pozostają odporne na tę klasę związków [32].

MECHANIZM HAMOWANIA TOPOIZOMERAZY I PRZEZ KAMPTOTECYNĘ

CPT nie wiąże się ani z oczyszczoną topo I, ani z samym DNA [24]. Oddziałuje natomiast z każdym z nich, gdy są ze sobą połączone kowalencyjnie na etapie kompleksu rozczinalnego [22, 24]. CPT stabilizuje ten kompleks przez zablokowanie ligacji przeciętej nici [10]. Należy zaznaczyć, że stabilizacja ta nie polega na nieodwracalnym zablokowaniu kompleksu, lecz jedynie na zaburzeniu równowagi tego etapu reakcji [24, 32] (rys. 2c). Po usunięciu CPT z hodowli komórkowej natychmiast maleje częstość jednoniciowych pęknięć indukowanych przez topo I. Także w układzie bezkomórkowym ilość kompleksu rozczinalnego stabilizowanego przez CPT ulega obniżeniu, gdy zastosuje się warunki ułatwiające dysocjację leku z kompleksu (podwyższenie siły jonowej, dodanie nadmiaru DNA, rozcieńczenie mieszaniny reakcyjnej lub krótkie jej ogrzanie w temperaturze 65°C) [11, 24, 27, 32]. Nie wszystkie kompleksy topo I z naciętym DNA są jednakowo wrażliwe na CPT. Związek ten wykazuje silną preferencję do tych spośród nich, w których w miejscu

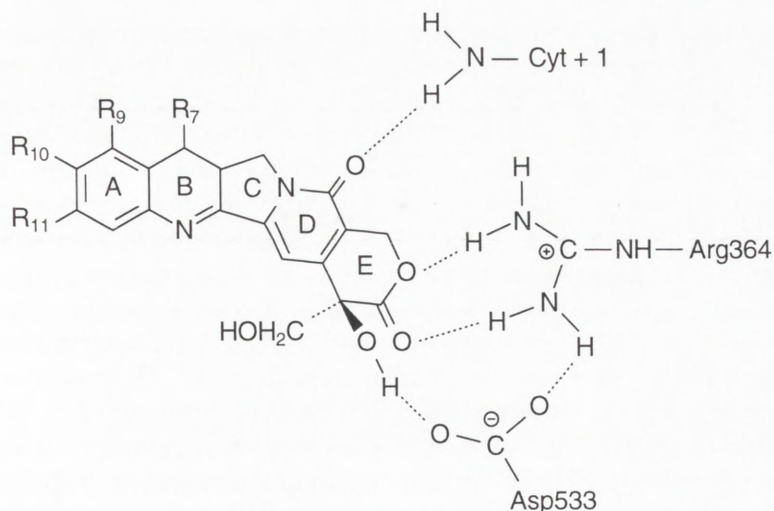


RYSUNEK 4. Przekształcenie laktonowej formy kamptotecyny w hydroksykarboksylan: otwarcie pierścienia E kamptotecyny w pH 7 jest reakcją odwracalną i prowadzi do utworzenia rozpuszczalnej w wodzie, lecz nieaktywnej biologicznie soli sodowej kamptotecyny

przecięcia na końcu 5' związanym przez enzym niekowalencyjnie znajduje się guanozyna [22, 30, 47]. Ponieważ 90% kompleksów rozcinalnych na związanym kowalencyjnie końcu 3' zawiera tymidynę, w konsekwencji CPT „rozpoznaje” indukowane przez topo I przecięcia sekwencji TpG (rys. 2c). Lek oddziałuje również z białkiem enzymatycznym w kompleksie rozcinalnym. W oddziaływaniu tym uczestniczą niewielkie fragmenty subdomeny I i III oraz domeny C-końcowej. O ich udziale w wiązaniu CPT świadczy fakt, że mutacje w tych fragmentach wywołują oporność na CPT [17, 50].

Oddziaływanie leku z miejscem wiążącym kompleksu rozcinalnego charakteryzuje się stereospecyficznością. CPT jest cząsteczką asymetryczną: atom C20 pierścienia laktonowego (E) ma konfigurację S (rys. 4). Syntetyczny enancjomer leku (20-R CPT) okazał się nieaktywny zarówno jako inhibitor topo I, jak i związek przeciwnowotworowy [43, 47]. Modyfikacje pierścienia A również modulują aktywność CPT. Podstawienie dużymi podstawnikami w pozycjach 11 lub 12 ją znosi, a w pozycjach 7, 9 lub 10 podwyższa [43, 47]. Pochodna CPT z grupą chlorometylową w pozycji 7 alkiluje N-3 guaniny obecnej w miejscu przecięcia [45].

Na podstawie tych obserwacji oraz badań struktury topo I połączonej z 22-nukleotydowym fragmentem DNA, Redinbo i wsp. [50] zaproponowali model kompleksu rozcinalnego stabilizowanego przez CPT. Według tego modelu pierścień A kamptotecyny wsunięty jest między guanozynę z końca 5' przecięcia oraz resztę asparaginy sąsiadującej z katalityczną tyrozyną. Komplementarna do tej guanozyny cytydyna+1 tworzy wiązanie wodorowe z tlenem grupy karbonylowej pierścienia D leku (rys. 5). Pierścień laktonowy CPT związany jest trzema mostkami wodorowymi z arginina subdomeny I i kwasem asparaginowym subdomeny III (rys. 5). Utworzenie tych wiązań jest niemożliwe w przypadku enancjomeru 20-R CPT. W proponowanym modelu wolna grupa hydroksylowa na końcu 5' przecięcia oddalona jest od reszty fosforanowej końca 3' o 4,5 Å, co uniemożliwia religację przeciętej nici.



Związek	R ₁₁	R ₁₀	R ₉	R ₇
CPT	-H	-H	-H	-H
Irinotecan (CPT-11)	-H		-H	-C ₂ H ₅
SN-38	-H	-OH	-H	-C ₂ H ₅
Topotecan	-H	-OH		-H
9-aminoCPT	-H	-H	-NH ₂	-H
GI1427211C			-H	

RYSUNEK 5. Struktura kamptotecyny i jej pochodnych oraz model wiązania tych związków przez kompleks rozczalny topo I z DNA

MECHANIZM CYTOTOKSYCZNOŚCI KAMPTOTECYNY

Cytotoksyczność inhibitorów topo I nie jest związana z hamowaniem relaksacji DNA, lecz z zablokowaniem enzymu na etapie kompleksu rozczalnego. Sama

jednak stabilizacja tego kompleksu nie wystarcza do śmierci komórki. Koniecznym warunkiem letalnego efektu CPT jest równoczesna synteza DNA [26]. Najwyższą wrażliwość na CPT wykazują komórki proliferujące, znajdujące się w fazie S cyklu komórkowego [32, 53, 62, 66]. Inhibitory syntezy DNA jak afidykolina czy hydroksymocznik niemal całkowicie „znoszą” cytotoksyczność CPT pomimo niezmiennionej ilości jednoniciowych pęknięć DNA indukowanych przez lek [5, 26, 47]. Na podstawie tych obserwacji Hsiang i Liu [26] zaproponowali, że letalnym uszkodzeniem w komórce są dwuniciowe pęknięcia DNA powstałe w wyniku kolizji widełek replikacyjnych z kompleksem rozcinalnym stabilizowanym przez CPT. Wskutek nieodwracalnego zablokowania widełek, przecięta nić, związana z enzymem niekowalencyjnie, po replikacji ulega odłączeniu (rys. 2D). W konsekwencji, indukowane przez topo I jednoniciowe pęknięcia DNA przekształcane są w dwuniciowe [8, 26, 47, 53, 57]. Delecje genu odpowiedzialnego za reperację dwuniciowych pęknięć DNA, jakie mają miejsce w komórkach drożdży RAD52 lub ssaków: *ataxia telangiectasia* oraz syndromu Cockayne’a powodują znaczny wzrost wrażliwości na CPT [8, 29, 46]. Naprawa tych uszkodzeń jest zwykle dość powolna i towarzyszy jej przedłużenie fazy S lub blok w fazie G2 cyklu, co spowodowane jest zahamowaniem aktywacji kompleksu p34cdc2/cyklina B potrzebnego do przejścia z fazy G2 do mitozy [20, 22, 53]. Komórki, które pomimo uszkodzeń dość szybko przechodzą fazę S oraz nie zostają zatrzymane w punkcie kontrolnym G2, wykazują podwyższoną wrażliwość na CPT [20, 53]. Nienaprawione dwuniciowe pęknięcia DNA mogą być sygnałem do uruchomienia mechanizmu śmierci programowanej – apoptozy. Komórki HL60, znane z nadwrażliwości na różne czynniki z inhibitorami topoizomeraz łącznie, charakteryzuje duża łatwość wchodzenia w apoptozę [3, 46]. Apoptoza indukowana w tych komórkach przez CPT jest ściśle związana z uszkodzeniami powstałymi w czasie replikacji, ponieważ afidykolina skutecznie je chroni przed apoptotyczną fragmentacją DNA [3]. Ochronnego efektu afidykoliny nie obserwuje się w przypadku indukcji apoptozy w komórkach HL60 przez klasyczny inhibitor topo II, jakim jest tenipozyd [3]. Podczas naprawy pęknięć DNA, topo I może indukować rekombinacje odpowiedzialne za liczne mutacje. CPT jest rzeczywiście aktywnym induktorem wymiany chromatyd siostrzanych i aberracji chromosomowych [1], jak również silnym inhibitorem transkrypcji. Zahamowanie tego ostatniego procesu wynika z zablokowania polimerazy RNA na etapie elongacji przez zawadę, jaką stanowi dla niej kompleks: topo I-CPT-matrycowy DNA [22, 33, 34, 43]. Zablokowanie elongacji RNA prowadzi do utworzenia jednoniciowych pęknięć DNA i ma miejsce wówczas, gdy kompleks rozcinalny zlokalizowany jest na nici transkrybowanej [70]. Podczas gdy zahamowanie transkrypcji DNA przez CPT jest odwracalne, inhibicja syntezy DNA wysokimi stężeniami leku jest procesem nieodwracalnym [32]. Potwierdza to słuszność modelu kolizji widełek replikacyjnych z kompleksem rozcinalnym stabilizowanym przez CPT (rys. 2d i e). Model ten nie wyjaśnia jednak wszystkich

komórkowych efektów CPT. Lek ten podwyższa ilość mRNA protoonkogenów *c-fos* i *c-jun*. Indukcja ta jest niezależna od syntezy DNA [8]. CPT wywołuje również różnicowanie się komórek [8]. W przypadku niektórych linii komórkowych nie zaobserwowano korelacji pomiędzy cytotoksycznością leku a ilością komórek w fazie S [19, 53]. Zaburzenie replikacji DNA nie jest więc jedynym sposobem działania CPT. Całkowite wyjaśnienie mechanizmu cytotoksyczności leku wymaga dalszych badań. Nie jest również w pełni zrozumiała selektywna cytotoksyczność CPT w stosunku do komórek nowotworowych, jako że topo I o identycznej sekwencji aminokwasowej występuje zarówno w komórkach prawidłowych, jak i zmienionych nowotworowo [43, 67]. Wrażliwość na CPT może zależeć od poziomu enzymu w różnych liniach nowotworowych. Podwyższony poziom topo I stwierdzono w raku okrężnicy, przełyku, prostaty i jajnika, nie obserwuje się natomiast tego podwyższenia w raku nerek [22, 43, 66]. Jednak te różnice nie są wystarczającym wyjaśnieniem preferencyjnej cytotoksyczności CPT wobec komórek nowotworowych [19]. Krytyczne wydają się różnice w zdolności do naprawy dwuniciowych pęknięć DNA [8, 21, 43, 46, 53], w kontroli cyklu komórkowego [13, 20, 46, 53] oraz w skłonności komórek do uruchomienia apoptozy [13, 61].

Biorąc pod uwagę, że komórki nowotworowe pozbawione są wielu szlaków metabolicznych, można pokusić się o spekulację, że upośledzenie w nich mechanizmów naprawy uszkodzeń DNA, wszelkie zaburzenia działania cyklin, kinaz i fosfataz regulujących cykl komórkowy oraz niezdolność uniknięcia apoptozy mogą decydować o ich nadwrażliwości na CPT.

POCHODNE KAMPTOTECYNY STOSOWANE W LECZNICTWIE

Ponieważ CPT w formie laktonu ma niską rozpuszczalność, do badań klinicznych stosowano jej formę z otwartym pierścieniem – w postaci soli sodowej (rys. 4). Zrezygnowano z tych prób z powodu znacznej toksyczności leku [5]. Obecnie wiadomo, że forma z otwartym pierścieniem E jest nieaktywna wobec topo I. Resztkową aktywność soli sodowej kamptotecyny związek ten zawdzięcza zależnej od pH konwersji w formę laktonową [47] (rys. 4). Poszukiwania nowych pochodnych CPT zmierzały w kierunku uzyskania związków lepiej rozpuszczalnych w wodzie i oczywiście mniej toksycznych. Spośród przebadanych kilkudziesięciu analogów CPT udało się znaleźć kilka o korzystniejszych właściwościach terapeutycznych. Dwa z nich, topotecan i irinotecan (CPT-11) weszły do rejestru leków i są stosowane w leczeniu raka jajnika i okrężnicy, a trzy inne, tj. 9-aminokamptotecyna (9-amino-CPT), 9-nitrokamptotecyna i 7-(4-metylopiperazynometyleno)-10,11-etylenodiosy-CPT (GI 147211C) poddawane są próbom klinicznym I i II fazy [4, 5, 12,

14, 18, 38]. Związki te otrzymano przez modyfikację pierścieni A i/lub B kamptotecyny prowadzącą do podwyższenia ich hydrofilowości oraz aktywności wobec topo I (rys. 5). Irinotecan uzyskuje tę aktywność dopiero w wyniku katalizowanej przez esterazę metabolicznej przemiany w 10-hydroksy pochodną: SN-38 [43, 51] (rys. 5). Związki te są laktonami w konfiguracji S. W pH 7 i wyższym, tak jak w przypadku CPT, pierścień E ulega otwarciu w wyniku przemiany w hydroksykarboksylan (rys. 4). Pochodne te nie różnią się mechanizmem działania od CPT. Wszystkie one stabilizują kompleks rozczaliny topo I z DNA [4, 43, 58]. Najsilniejszym stabilizatorem okazał się SN-38, a najsłabszym topotecan [58, 59]. Zaobserwowano również niewielkie różnice w selektywności sekwencyjnej kamptotecyn w stosunku do DNA [43]. Cenną cechą tych leków jest ich znacznie niższa toksyczność w porównaniu ze związkiem macierzystym. Żaden z nich nie wywołuje krwotocznego zapalenia pęcherza, objawu tak dokuczliwego w przypadku dożylnego stosowania CPT [5, 12, 18, 36, 52, 54]. Toksyczność topotecanu, irinotecanu i amino-CPT jest odwracalna i ograniczona do szybko proliferujących tkanek: szpiku kostnego i nabłonka przewodu pokarmowego [5, 36, 54, 69]. Stosowanie leków wspomagających w dużej mierze chroni przed szkodliwym działaniem ubocznym pochodnych CPT i pozwala na podwyższenie ich dawki [5, 69].

Przeciwnowotworowe inhibitory topo I charakteryzują się bardzo szerokim spektrem działania. Wykazują aktywność zarówno wobec nowotworów szybko proliferujących (np. białaczek), jak i wolno rosnących guzów litych [5, 12, 18, 36, 52, 69]. Nie ustają poszukiwania nowych aktywnych analogów CPT. W ostatnich latach koncentrują się one na kilku grupach związków. Są to: 7-(aminoacylohydrazono)formylokamptotecyny, pochodne GI 147211C, 7-karboksylkamptotecyny, cykloheksakamptotecyny [15, 66] oraz alkilujące pochodne CPT [45, 63].

OPORNOŚĆ NA KAMPTOTECYNY

Oporność na kamptotecyny może wynikać z ograniczenia ich akumulacji w komórce, z mutacji genu topo I prowadzącej do zmian w strukturze i funkcji enzymu oraz obniżenia jego aktywności. Leki te nie indukują oporności wielolekowej związanej ze wzmożoną ekspresją genu *MDR1*, wręcz przeciwnie, długotrwałe ich stosowanie wydaje się podwyższać skuteczność terapii [18]. Komórki z nabytą opornością wielolekową pozostają wrażliwe na te związki, ponieważ CPT, amino-CPT i GI 1147211C nie są substratami glikoproteiny P-170, a topotecan oraz irinotecan są stosunkowo słabo przez nią rozpoznawane [12, 37, 46, 54]. Obniżenie wrażliwości na irinotecan może wynikać z upośledzenia jego aktywacji do SN-38 [43, 46]. Mutacje genu *TOP 1* dotyczące dziesięcioaminokwasowego fragmentu subdomeny I, dwuaminokwasowego fragmentu subdomeny III oraz sześćoamino-

kwasowego fragmentu domeny C-końcowej wywołują oporność na kamptotecyny [2, 17, 35, 50, 68]. Zaburzenia fosforylacji i ADP-rybozylacji enzymu mogą również w istotny sposób modyfikować jego wrażliwość na inhibitory [22, 46, 56, 57]. Innym mechanizmem odpowiedzialnym za oporność na kamptotecyny może być obniżenie stężenia topo I w komórkach w wyniku rearanżacji, delecji lub hipermetylacji jednego z jej alleli [1, 22, 43]. Obniżenie ilości topo I przy jednoczesnym podwyższeniu poziomu topo II zaobserwowano w niewrażliwych na CPT komórkach białaczki P388 [22].

INNE INHIBITORY

Odkrycie, że topoizomeraza I jest receptorem związków przeciwnowotworowych, spowodowało wzmożenie poszukiwania dalszych jej inhibitorów. Okazało się, że wiele znanych wcześniej leków może hamować topo I. Większość z nich działa jednak na nią niespecyficznie. Niektóre blokują również topo II. Inhibicja topo I polega bądź na stabilizacji kompleksu rozcinalnego, bądź na ochronie DNA przed dostępem enzymu, przy czym w pierwszym wypadku rośnie, w drugim maleje ilość jednoniciowych pęknięć DNA. Bez względu jednak na ten efekt, niemal wszystkie poznane dotychczas inhibitory, w odróżnieniu od kamptotecyn, mogą oddziaływać z samym DNA. Oddziaływania te mają różny charakter: interkalacja, wiązanie w mniejszym rowku, wiązanie kowalencyjne. Interkalatory mogą hamować relaksację DNA przez zmianę jego konformacji. Związki te interkalując powodują rozkręcenie heliksu i zmniejszenie liczby superhelikalnych zwojów, co prowadzi do obniżenia powinowactwa enzymu do DNA. Działają tak np.: 9-aminoakrydyny, bromek etydyny i silny inhibitor topo II – amsakryna [44]. Niektóre interkalatory (aktynomycyna D, morfolinodoksorubicyna, saintopina, intoplicyna, indolokarbazole i protoberberyny) stabilizują kompleks rozcinalny enzymu z DNA [42, 66]. Wiele z nich indukuje pęknięcia DNA katalizowane zarówno przez topo I, jak i topo II. Inna grupa inhibitorów topo I, to związki wiążące się w mniejszym rowku DNA. Należą do nich Hoechst 33258 i 33342, które wykazują powinowactwo do miejsc bogatych w AT, powodując rozszerzenie rowka. Barwniki te stabilizują odwracalnie kompleks rozcinalny topo I z DNA [66] z niezwykle specyficzną sekwencją: 5'-T*CATTTTT-3' (gwiazdka pokazuje miejsce nacięcia) [8]. Z mniejszym rowkiem DNA oddziałują również takie inhibitory topo I, jak: nogalamycyna, mitramycyna, chromomycyna A3 (resztami cukrowymi) i aktynomycyna (łańcuchami peptydowymi) oraz protoberberyny, bulgareina i indolochinolinodion (azaIQD) [8, 42, 47, 66]. Niektóre stabilizatory kompleksu rozcinalnego wykazują „mieszany” mechanizm oddziaływania z DNA. Należą do nich aktynomycyna D, morfolinodoksorubicyny i protoberberyny. Związki te jednym fragmentem cząsteczki interkalują

do DNA, a innym wiążą się w mniejszym jego rowku. Spośród nich jedynie protoberberyny hamują specyficznie topoizomerazę I [42].

Niejasny jest wpływ siły wiązania leku z DNA na jego aktywność inhibitorową. Ani w przypadku interkalatorów, ani związków oddziałujących z mniejszym rowkiem nie obserwuje się korelacji pomiędzy siłą ich wiązania z DNA i zdolnością do stymulacji jednoniciowych jego pęknięć katalizowanych przez topo I [8, 42]. Natomiast wśród kamptotecyn, które łączą się z DNA tylko wówczas, gdy jest on związany z enzymem, stwierdzono wyraźną zależność ich aktywności indukującej kompleks rozcinalny od stabilności tego kompleksu [59]. Miarą tej stabilności było zmniejszenie szybkości ligacji przeciętych nici DNA w wyniku oddysocjowania leku z kompleksu rozcinalnego pod wpływem soli.

Nasuwa się pytanie, czy związki wiążące się z DNA nieodwracalnie, mogą hamować katalizowaną przez topo I jego relaksację. Alkilujące pochodne CPT okazały się być zarówno aktywnymi inhibitorami topo I, jak i silnymi „stabilizatorami” kompleksu rozcinalnego, choć alkilacja zachodziła wyłącznie w obecności enzymu. Związki te wykazują podwyższoną cytotoksyczność w porównaniu z niealkilującymi pochodnymi CPT [45, 63]. Badania przeprowadzone w naszej pracowni wykazały, że nitrakryna (1-nitro-9-(3,3-N,N-dimetyloaminopropylamino)-akrydyna), związek, który wysoką aktywność cytotoksyczną uzyskuje w wyniku reduktywnej aktywności prowadzącej do utworzenia kowalencyjnego adduktu z DNA, hamuje katalizowaną przez topo I relaksację DNA przez stabilizację kompleksu rozcinalnego [7]. Ponieważ efekt ten obserwowany jest wyłącznie w obecności związków sulfhydrylowych, sądzić należy, że warunkiem koniecznym tego hamowania jest utworzenie kowalencyjnego wiązania nitrakryny, a raczej jej aktywnego metabolitu z DNA.

UWAGI KOŃCOWE

Inhibitory topoizomeraz stanowią nową, obiecującą grupę leków przeciwnowotworowych różniących się mechanizmem działania od dotąd stosowanych. Działanie to sprowadza się do przekształcenia potrzebnego do proliferacji komórki enzymu w narzędzie jej zniszczenia. W ostatnim czasie obserwuje się gwałtowny wzrost zainteresowania inhibitorami topo I. Wynika to być może z pewnej przewagi, jaką mają one nad stosowanymi w klinikach inhibitorami topo II (antracykliny, epipodofylotoksyny, amsakryna). Terapia przy udziale tych ostatnich stwarza bowiem szereg problemów:

1. Topo II jest enzymem zależnym od cyklu komórkowego i najwyższą aktywność osiąga w logarytmicznej fazie wzrostu [32, 67], dlatego jej inhibitory aktywne

są wobec szybko proliferujących komórek, natomiast wolno rosnące guzy lite pozostają na nie niewrażliwe [54].

2. W komórkach nowotworowych obserwuje się obniżenie poziomu topo II lub rozwój mutacji powodujących zaburzenia struktury jej miejsc wiążących, co prowadzi do zmniejszenia ich wrażliwości na inhibitory tego enzymu [16, 36, 54].

3. Ponieważ inhibitory topo II są substratami glikoproteiny P, stosowanie ich wywołuje oporność wielolekową [8, 46, 54].

4. Mechanizm cytotoksyczności inhibitorów topo II nie jest jednolity. Przeciwnowotworowe działanie niektórych z nich, np. dokсорubicyny i etopozydu, polega nie tylko na stabilizacji rozcinalnego kompleksu topo II z DNA, ale i na tworzeniu wolnych rodników powodujących uszkodzenia DNA oraz białka enzymatycznego [36, 54]. Etopozyd i antrachinony mogą ponadto tworzyć kowalencyjne addukty z DNA, a także indukować w nim międzyniciowe wiązania sieciujące [55].

5. Wysoka toksyczność leków hamujących topo II, szczególnie kardiotoksyczność antrycyklin, ogranicza ich kliniczne zastosowanie [1, 36].

W przeciwieństwie do inhibitorów topo II, leki, których komórkowym receptorem jest topo I, oferują wiele klinicznych korzyści w terapii nowotworów, z następujących względów:

1. Aktywność topo I nie zmienia się w czasie wzrostu komórki, prawdopodobnie dlatego jej inhibitory działają na wolno rosnące guzy lite [52, 54]. W wielu tkankach nowotworowych enzym ten występuje w znacznie większej ilości niż w komórkach prawidłowych, czego nie obserwuje się w przypadku topo II [5, 22, 43, 66]. Pomimo jednak, że ani stężenie tego enzymu, ani jego aktywność nie zmieniają się w czasie trwania cyklu, inhibitory topo I wykazują wysoką specyficzność fazową. Komórki w fazie S są 1000 razy bardziej wrażliwe na CPT niż komórki w fazie G1 i G2 [18, 32, 53, 66]. Z punktu widzenia selektywności działania jest to zdecydowanie korzystna cecha leku.

2. Rozważając przydatność kamptotecyn w chemioterapii należy podkreślić, że pozostają one aktywne nawet wobec zaawansowanych nowotworów, wykazujących oporność wielolekową. Nowotwory niewrażliwe na dokсорubicynę, 5-fluorouracyl, cyklofosamid i etopozyd odpowiadają pozytywnie na kamptotecyny, ponieważ nie są one dobrymi substratami glikoproteiny P [25, 40, 52]. Nawet jeśli nadekspresja genu kodującego jest silna, to białko wywołuje w komórkach nowotworowych 3–5-krotny wzrost oporności na topotecan, pozostają one przeszło 100 razy bardziej wrażliwe na tę pochodną CPT niż na inhibitory topo II [25, 54].

3. Leki hamujące topo I nie działają przez wolne rodniki i dlatego wykazują cytotoksyczność także wobec nowotworów, takich jak rak jelita grubego, prostaty czy wątroby, które odznaczają się wysoką zawartością enzymów związanych z metabolizmem glutationu (peroksydazy i S-transferazy glutationu) [54].

Ponieważ nie stwierdzono dotąd jednoczesnej oporności na inhibitory topo I i topo II, lecz przeciwnie obniżeniu wrażliwości na jedną z tych grup towarzyszy

jej wzrost na drugą, podejmowane są próby terapii skojarzonej, prowadzonej z użyciem leków należących do obu tych grup [64, 67].

Uzyskanie pochodnych kamptotecyny o korzystniejszych właściwościach terapeutycznych oraz powrót tej grupy związków do klinik doskonale ilustrują znaczenie badań nad molekularnym mechanizmem działania leków, nawet takich, które nie sprawdziły się w warunkach klinicznych. Odkrycie, że CPT jest selektywnym inhibitorem topo I, nastąpiło prawie 20 lat po jej wycofaniu z lecznictwa i stało się podstawą do rozwoju nowej klasy leków.

PODZIĘKOWANIE

Serdecznie dziękuję Prof. M. Gniazdowskiemu i Dr hab. L. Szmigiero za krytyczną korektę i pomoc w przygotowaniu pracy.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ANDERSON RD, BERGER NA. Mutagenicity and carcinogenicity of topoisomerase-interactive agents. *Mut Res* 1994; **309**: 109–142.
- [2] ANDOH T, OKADA K. Drug resistance mechanism of topoisomerase I drugs. *Adv Pharmacol* 1994; **29B**: 93–103.
- [3] BERTRAND R, SOLARY E, JENKINS J, POMMIER Y. Apoptosis and its modulation in human promyelocytic HL-60 cells treated with DNA topoisomerase I and II inhibitors. *Exp Cell Res* 1993; **207**: 388–397.
- [4] BESTERMAN JM. Topoisomerase I inhibition by the camptothecin analog G114721 IC. From the laboratory to the clinic. *Ann N Y Acad Sci* 1996; **803**: 202–209.
- [5] BURRIS HA, FIELDS SM. Topoisomerase I inhibitors. An overview of the camptothecin analogs. *New Drug Therapy* 1994; **8**: 333–355.
- [6] CASERTA M, CAMILLONIG, VENDITTI S, VENDITTI P, Di MAURO E. Conformational information in DNA: its role in the interaction with DNA topoisomerase I and nucleosomes. *J Cell Biochem* 1994; **8**: 333–355.
- [7] CIESIELSKA E, PASTWA E, SZMIGIERO L. Inhibition of mammalian topoisomerase I by 1-nitro-9-aminoacridines. Dependence on thiol activation. *Acta Biochim Polon* 1997; **44**: 775–780.
- [8] CHEN AY, LIU LF. DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1994; **34**: 191–218.
- [9] CHRISTIANSEN K, SVEJSTRUP AB, ANDERSEN AH, WESTERGAARD O. Eukaryotic topoisomerase I-mediated cleavage requires bipartite DNA interaction. Cleavage of DNA substrates containing strand interruptions implicates a role for topoisomerase I in illegitimate recombination. *J Biol Chem* 1993; **268**: 9690–9701.
- [10] CHRISTIANSEN K, WESTERGAARD O. The effect of camptothecin on topoisomerase I catalysis. *Ann N Y Acad Sci* 1996; **803**: 50–59.
- [11] CODERONI S, PAPARELLI M, GIANFRANCESCHI GL. Effect of CPT on the calf thymus Topoisomerase I-mediated DNA breakage-reunion reaction: Optimal conditions for the formation and reversal of the CPT trapped Topoisomerase I cleavable complex. *Mol Biol Reports* 1993; **17**: 129–134.

- [12] DANCEY J, EISENHAUER EA. Current perspectives on camptothecins in cancer treatment. *Br J Cancer* 1996; **74**: 327–338.
- [13] DARZYNKIEWICZ Z, BRUNO S, DEL-BINO G, TRAGANOS F. The cell cycle effects of camptothecin. *Ann N Y Acad Sci* 1996; **803**: 93–100.
- [14] EDER JP, RUBIN E, STONE R, BRYANT M, XU-G, SUPKO J, KINCHLA N, LYNCH T, HURWITZ S, RODRIGUEZ D, SHAPIRO C, TOPPMEYER D, GROSSBARD M, VOSBURG E, HUBERMAN M, SCHNIPPER L, SHULMAN L, KUFE DW. Trials of 9-amino-20(S)-camptothecin in Boston. *Ann N Y Acad Sci* 1996; **803**: 247–255.
- [15] EMERSON DL, BESTERMAN JM, BROWN HR, EVANS MG, LEITNER PP, LUZZIO MJ, SHAFFER JE, STERNBACH DD, UEHLING D, VUONG A. In vivo antitumor activity of two new seven-substituted water-soluble camptothecin analogues. *Cancer Res* 1995; **55**: 603–609.
- [16] FROELICH-AMMON SJ, OSHEROFF N. Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism. *J Biol Chem* 1995; **270**: 21429–21432.
- [17] FUJIMORI A, HARKER WG, KOHLHAGEN G, HOKI Y, POMMIER Y. Mutation at the catalytic site of topoisomerase I in CEM/C2, a human leukemia cell line resistant to camptothecin. *Cancer Res* 1995; **55**: 1339–1346.
- [18] GERRITS CJH, De JONGE MJA, SCHELLENS JHM, STOTER G, VERWEIJ J. Topoisomerase I inhibitors: the relevance of prolonged exposure for present clinical development. *Br J Cancer* 1997; **76**: 952–962.
- [19] GOLDWASSER F, BAE I, VALENTI M, TORRES K, POMMIER Y. Topoisomerase I-related parameters and camptothecin activity in the colon carcinoma cell lines from the National Cancer Institute anticancer screen. *Cancer Res* 1995; **55**: 2116–2121.
- [20] GOLDWASSER F, SHIMIZU T, JACKMAN J, HOKI Y, O[U+2019]CONNOR PM, KOHN KW, POMMIER Y. Correlations between S and G2 arrest and the cytotoxicity of camptothecin in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 1996; **56**: 4430–4437.
- [21] GRADZKA I, SZUMIEL I. Discrepancy between the initial DNA damage and cell survival after camptothecin treatment in two murine lymphoma L5178Y sublines. *Cell Biochem Funct* 1996; **14**: 163–171.
- [22] GUPTA M, FUJIMORI A, POMMIER Y. Eukaryotic DNA topoisomerases I. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1262**: 1–14.
- [23] HANAI R, CARON PR, WANG JC. Human TOP 3: A single-copy gene encoding DNA topoisomerase III. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 3653–3657.
- [24] HERTZBERG RP, CARANFA MJ, HECHT SM. On the mechanism of topoisomerase I inhibition by camptothecin: evidence for binding to an enzyme-DNA complex. *Biochemistry* 1989; **28**: 4629–4638.
- [25] HOKI Y, FUJIMORI A, POMMIER Y. Differential cytotoxicity of clinically important camptothecin derivatives in P-glycoprotein-overexpressing cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997; **40**: 433–438.
- [26] HSIANG Y-H, LIHOU MG, LIU LF. Arrest of DNA replication forks by drug-stabilized topoisomerase I DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Res* 1989; **49**: 5077–5082.
- [27] HSIANG Y-H, LIU LF. Identification of mammalian DNA topoisomerase I as an intercellular target of the anticancer drug camptothecin. *Cancer Res* 1988; **48**: 1722–1726.
- [28] KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ L. *Cytobiochemia* Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 1995; rozdz. 12.5, str. 397.
- [29] LEVIN NA, BJORNSTI MA, FINK GR. A novel mutation in DNA topoisomerase I of yeast causes DNA damage and RAD 9-dependent cell cycle arrest. *Genetics* 1993; **133**: 799–814.
- [30] LETEURTRE F, FESEN M, KOHLHAGEN G, KOHN KW, POMMIER Y. Specific interaction of camptothecin, a topoisomerase I inhibitor, with guanine residues of DNA detected by photoactivation at 365 nm. *Biochemistry* 1993; **32**: 8955–8962.

- [31] LIN J-H, CASTORA FJ. Response of purified mitochondrial DNA topoisomerase I from bovine liver to camptothecin and m-AMSA. *Archiv Biochem Biophys* 1995; **324**: 293–299.
- [32] LIU LF. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu Rev Biochem* 1989; **58**: 351–375.
- [33] LIU LF, DUANN P, LIN CT, D'ARPA P, WU J. Mechanism of action of camptothecin. *Ann N Y Acad Sci* 1996; **803**: 44–49.
- [34] LJUNGMAN M, HANAWALT PC. The anticancer drug camptothecin inhibits elongation but stimulates initiation of RNA polymerase II transcription. *Carcinogenesis* 1996; **17**: 31–35.
- [35] MEGONIGAL MD, FERTALA J, BJORNSTI MA. Alterations in the catalytic activity of yeast DNA topoisomerase I result in cell cycle arrest and cell death. *J Biol Chem* 1997; **272**: 12801–12808.
- [36] MUGGIA FM, BURRIS HA. Clinical development of topoisomerase-interactive drugs. *Advanc Pharmacol* 1994; **29B**: 1–31.
- [37] NAKATSU S, KONDO S, KONDO Y, YIN D, PETERSON JW, KAKAJIR, MORIMURA T, KIKUCHI H, TAKEUCHI J, BARNETT GH. Induction of apoptosis in multi-drug resistant (MDR) human glioblastoma cells by SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997; **39**: 417–423.
- [38] NATELSON EA, GIOVANELLA BC, VERSCHRAEGEN CF, FEHIR KM, De-IPOLYI PD, HARRIS N, STEHLIN JS. Phase I clinical and pharmacological studies of 20-(S)-camptothecin and 20-(S)-9-nitrocampothecin as anticancer agents. *Ann N Y Acad Sci* 1996; **803**: 224–230.
- [39] NEGRI R, COSTANZO G, BUTTINELLI M, VENDITTI S, Di MAURO E. Effects of DNA topology in the interaction with histone octamers and DNA topoisomerase I. *Biophys Chem* 1994; **50**: 161–181.
- [40] PEREZ-SOLER R, GLISSON BS, LEE JS, FOSSELLA FV, MURPHY WK, SHIN DM, HONG WK. Treatment of patients with small-cell lung cancer refractory to etoposide and cisplatin with the topoisomerase I poison topotecan. *J Clin Oncol* 1996; **14**: 2785–2790.
- [41] PERINI R, CASERTA M, DiMAURO E. DNA tridimensional context affects the reactivity of eucariotic DNA topoisomerase I. *J Mol* 1993; **231**: 634–645.
- [42] PILCH DS, YU C, MAKHEY D, LaVOIE EJ, SRINIVASAN AR, OLSON WK, SAUERS RR, BRESLAUER KJ, GEACINTOV NE, LIU LF. Minor groove-directed and intercalative ligand-DNA interactions in the poisoning of human DNA topoisomerase I by protoberberine analogs. *Biochemistry* 1997; **36**: 12542–12553.
- [43] POMMIER Y. Eukaryotic DNA topoisomerase I: genome gatekeeper and its intruders, camptothecins. *Semin - Oncol* 1996; **23** (1 Suppl 3): 3–10.
- [44] POMMIER Y, COVEY JM, KERRIGAN D, MARKOVITS J, PHAM R. DNA unwinding and inhibition of mouse leukemia L1210 DNA topoisomerase I by intercalators. *Nucl Acids Res* 1987; **15**: 6713–6731.
- [45] POMMIER Y, KOHLHAGEN G, KOHN KW, LETEURTRE F, WANI MC, WALL ME. Interaction of an alkylating camptothecin derivative with a DNA base at topoisomerase I-DNA cleavage sites. *Proc Natl Sci USA* 1995; **92**: 8861–8865.
- [46] POMMIER Y, LETEURTRE F, FESEN MR, FUJIMORI A, BERTRAND R, SOLARY E, KOHLHAGEN G, KOHN KW. Cellular determinants of sensitivity and resistance to DNA topoisomerase inhibitors. *Cancer Invest* 1994; **12**: 530–542.
- [47] POMMIER Y, TANIZAWA A, KOHN KW. Mechanisms of topoisomerase I inhibition by anticancer drugs. *Advances in Pharmacology* 1994; **29B**: 73–92.
- [48] POND CD, HOLDEN JA, SCHNABEL PC, BARROWS LR. Surface plasmon resonance analysis of topoisomerase I-DNA binding: effect of Mg²⁺ and DNA sequence. *Anticancer Drugs* 1997; **8**: 336–344.
- [49] POURQUIER P, PILON AA, KOHLHAGEN G, MAZUMDER A, SHARMA A, POMMIER Y. Trapping of mammalian topoisomerase I and recombinations induced by damaged DNA containing nicks or gaps. *J Biol Chem* 1997; **272**: 26441–26447.

- [50] REDINBO MR, STEWART L, KUHN P, CHAMPOUX JJ, HOL GJ. Crystal structures of human topoisomerase I complexes with DNA. *Science* 1998; 1504–1513.
- [51] RIVORY LP. Irinotecan (CPT-11): a brief overview. *Clin Exp Pharmacol Phys* 1996; **23**: 1000–1004.
- [52] ROUGIER P, BUGAT R, DOUILLARD JY, CULINE S, SUC E, BRUNET P, BECOUARN Y, YCHOU M, MARTY M, EXTRA JM, BONNETERRE J, ADENIS A, SEITZ JF, GANEM G, NAMER M, CONROY T, NEGRIER S, MERROUCHE Y, BURKI F, MOUSSEAU M, HERAIT P, MAHJoubi M. *J Clin Oncol* 1997; **15**: 251–260.
- [53] RYAN AJ, SQUIRES S, STRUTT HL, EVANS A, JOHNSON RT. Different fates of camptothecin-induced replication fork-associated double-strand DNA breaks in mammalian cells. *Carcinogenesis* 1994; **15**: 823–828.
- [54] SINHA BK. Topoisomerase inhibitors. A review of their therapeutic potential in cancer. *Drugs* 1995; **49**: 11–19.
- [55] SKŁADANOWSKI A, KONOPA J. Interstrand DNA crosslinking induced by anthracyclines in tumour cells. *Biochem Pharmacol* 1994; **47**: 2269–2278.
- [56] STAROŃ K, KOWALSKA-LOTH B, NIEZNAŃSKI K, SZUMIEL I. Phosphorylation of topoisomerase I in L5178Y-S cell is associated with poly(ADP-ribose) metabolism. *Carcinogenesis* 1996; **17**: 383–387.
- [57] STAROŃ K, KOWALSKA-LOTH B, SZUMIEL I. Lowered phosphorylation of topoisomerase I is a direct reason for reduced sensitivity of L5178Y-S cells to camptothecin. *Ann N Y Acad Sci* 1996; **803**: 321–323.
- [58] TANIZAWA A, FUJIMORI A, FUJIMORI Y, POMMIER Y. Comparison of topoisomerase I inhibition, DNA damage, and cytotoxicity of camptothecin derivatives presently in clinical trials. *J Natl Cancer Inst* 1994; **86**: 836–842.
- [59] TANIZAWA A, KOHN KW, KOHLHAGEN G, LETEURTRE F, POMMIER Y. Differential stabilization of eukaryotic DNA topoisomerase I cleavable complexes by camptothecin derivatives. *Biochemistry* 1995; **34**: 7200–7206.
- [60] TAN RK-Z, HARVEY SC, Di MAURO E, CAMILLONI G, VENDITTI P. DNA topological context affects access to eukaryotic DNA topoisomerase I. *J Biomolec Struct Dynamics* 1996; **13**: 855–872.
- [61] TRAGANOS F, SEITER K, FELDMAN E, HALICKA HD, DARZYNKIEWICZ Z. Induction of apoptosis by camptothecin and topotecan. *Ann N Y Acad Sci* 1996; **803**: 101–110.
- [62] TSAO YP, RUSSO A, NYAMUSAWA G, SILBER R, LIU LF. Interaction between replication forks and topoisomerase I-DNA cleavable complexes: studies in a cell-free SV40 DNA replication system. *Cancer Res* 1993; **53**: 5908–5914.
- [63] VALENTI M, NIEVESNEIRA W, KOHLHAGEN G, KOHN KW, WALL ME, WANI MC, POMMIER Y. Novel 7-alkyl methylenedioxy-camptothecin derivatives exhibit increased cytotoxicity and induce persistent cleavable complexes both with purified mammalian topoisomerase I and in human colon carcinoma SW620 cells. *Mol Pharmacol* 1997; **52**: 82–87.
- [64] VASEY PA, KAYE SB. Combined inhibition of topoisomerases I and II -is this a worthwhile/feasible strategy ? *Br J Cancer* 1997; **76**: 1395–1397.
- [65] WALL ME, WANI MC, COOKE CE, PALMER KH, Mc PFAIL AT, SIM GA. Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J Am Chem Soc* 1966; **88**: 3888–3890.
- [66] WANG H-K, MORRIS-NATSCHKE SL, LEE K-H. Recent advances in the discovery and development of topoisomerase inhibitors as antitumor agents. *Med Res Rev* 1997; **17**: 367–425.
- [67] WANG JC. DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* 1996; **65**: 635–692.
- [68] WANG LF, TING CY, LO CK, SU IS, MICKLEY LA, FOJO AT, WHANG-PENG J, HWANG J. Identification of mutations at DNA topoisomerase I responsible for camptothecin resistance. *Cancer Res* 1997; **57**: 1516–1522.

- [69] WEISS GR, BURRIS II HA, ECKARDT JR, ECKHARDT SG, FIELDS SM, O'ROURKE T, RODRIGUEZ GI, ROTHENBERG ML, VALLEY AJ. New anticancer agents. *Cancer Chemother Biol Response Modifiers Annu* 1996; **16**: 132-167.
- [70] WU J, LIU LF. Processing of topoisomerase I cleavable complexes into DNA damage by transcription. *Nucleic Acids Res* 1997; **25**: 4181-4186.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 19.05. 1989 r.

Przyjęto: 03.06. 1998 r.

Adres autora: ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź

UŁATWIONA DYFUZJA GLUKOZY W KOMÓRKACH SSACZYCH. I. BUDOWA, MECHANIZM DZIAŁANIA I LOKALIZACJA Glut*

FACILITATIVE GLUCOSE DIFFUSION IN MAMMALIAN CELLS. I. STRUCTURE, MECHANISM OF TRANSPORT AND DISTRIBUTION OF Gluts

Leszek SZABLEWSKI

Zakład Biologii Ogólnej i Parazytologii, Instytut Biostruktury,
Akademia Medyczna, Warszawa

Streszczenie: Spożycie węglowodanów powoduje wzrost stężenia glukozy we krwi przy jednoczesnym odkładaniu jej nadmiaru w mięśniach szkieletowych i adipocytach. Homeostaza glukozowa jest warunkowana równowagą między uwalnianiem glukozy z wątroby a jej pobieraniem przez tkanki. Glukoza jest podstawowym źródłem energii dla większości komórek ssaczych, a stały dopływ tego substratu jest podstawą normalnego funkcjonowania komórek. Heksoza jest transportowana do komórek za pomocą transportu aktywnego lub ułatwionej dyfuzji. Ten drugi mechanizm jest warunkowany obecnością specyficznych białek błonowych. Dotychczas opisano u ssaków sześć izoform transporterów glukozy. Każda izoforma charakteryzuje się specyficzną kinetyką reakcji, specyficznością substratową i lokalizacją w tkankach lub narządach.

Słowa kluczowe: ułatwiona dyfuzja, Glut, ssaki, struktura, mechanizm transportu, lokalizacja.

Summary: In mammals, ingestion of carbohydrates causes an increase in blood glucose concentrations, and increased glucose disposal into skeletal muscle and adipocytes. Glucose homeostasis is maintained within a normal range by the adjustment of glucose production in the liver and glucose uptake by peripheral tissues. Glucose is a fundamental energy-yielding substrate for most mammalian cells and a continuous supply of this substrate is essential to maintain normal cellular function. Hexose is transported into cells by a sodium dependent-mechanism or by facilitative diffusion. The latter process is mediated by a family of integral membrane proteins of which there are least six different isoforms. Each glucose transporter has distinct kinetic and substrate specificities and their relative distributions determine the characteristic glucose regulatory potential of that particular tissue.

*Badania finansowano z tematu własnego Uczelni IId/8.

Key words: Glut, mammals, a sodium dependent-mechanism of transport, facilitative diffusion

Wykaz stosowanych skrótów: Aminokwasy, skróty w kodzie jednoliterowym: **A** – alanina, **C** – cysteina, **D** – kwas asparginowy, **E** – kwas glutaminowy, **F** – fenyloalanina, **G** – glicyna, **H** – histydyna, **I** – izoleucyna, **K** – lizyna, **L** – leucyna, **M** – metionina, **N** – asparagina, **P** – prolina, **Q** – glutamina, **R** – arginina, **S** – seryna, **T** – treonina, **V** – walina, **W** – tryptofan, **Y** – tyrozyna, **X** – dowolny aminokwas; aminokwasy – skróty w kodzie trójliterowym: **Arg** – arginina, **Asn** – asparagina, **Gln** – glutamina, **Pro** – prolina, **Ser** – seryna, **Thr** – treonina, **Trp** – tryptofan; **BBB** – bariera krew-mózg, **FGF** – czynnik wzrostu fibroblastów, **GIP** – glukozozależny insulinotropowy polipeptyd, **GLP-1** – peptyd glukagonopodobny-1, **IGF-1** – czynnik wzrostu insulinopodobny-1, **IDDM** (*insulin-dependent diabetes mellitus*) – cukrzyca insulinozależna, **K_m** – stała Michaelisa, **NIDDM** (*non-insulin-dependent diabetes mellitus*) – cukrzyca niezależna od insuliny, **PI-3K** – 3-kinaza fosfatydylo-inozytolu, **PKA** – kinaza białkowa A, **PDGF** – czynnik wzrostu pochodzący z płytek krwi, **TGF-β** – transformujący czynnik wzrostu β, **TNFα** – czynnik martwicy nowotworu α

I. WSTĘP

Glukoza odgrywa ważną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu. Stanowi podstawowe źródło energii dla komórek. Jej metabolizm dostarcza ATP zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych [42, 70]. Pośrednio może także oddziaływać na wiele procesów zachodzących w komórce. Wykazano, że glukoza indukuje sekrecję insuliny przez komórki β trzustki. Heksoza pobrana przez te komórki ulega fosforylacji pod wpływem glukokinazy (heksokinazy typu IV). Dalsze przemiany metaboliczne cukru powodują sekrecję insuliny wskutek depolaryzacji błony komórkowej, wnikięcia jonów wapniowych i fuzji pęcherzyków sekrecyjnych z błoną komórkową [19]. Uwolniony hormon przyłącza się do receptora insuliny zlokalizowanego na powierzchni komórek. Efektem dalszych przemian jest indukowana przez insulinę synteza DNA [15, 37, 79]. Omawiany hormon może wpływać także na ekspresję niektórych genów [17, 79].

Transport cukru przez błonę plazmatyczną umożliwiają białka, które są produktami dwu odrębnych rodzin genów. Pierwsza rodzina nośników heksoz jest reprezentowana przez tzw. kotransporter (*Na⁺/glucose cotransporter*, Sglt 1), który warunkuje transport glukozy i galaktozy wbrew gradientowi stężeń cukru. Prawidłowe funkcjonowanie kotransportera jest uzależnione od elektrochemicznego gradientu jonów sodowych. Jego obecność stwierdzono u ssaków w nabłonku jelita cienkiego i kanalika proksymalnego nefronu (w obu przypadkach od strony światła przewodu). Umożliwia on wchłanianie nawet śladowych ilości wymienionych heksoz z pożywienia oraz reabsorpcję cukru z moczu w nefronie [1, 4, 14, 40, 66, 72, 82].

Drugą grupą nośników glukozy są tzw. Glut (*facilitative glucose transporter*). Transport zachodzący przy udziale tych białek odbywa się zgodnie z gradientem stężeń cukru, bez nakładów energetycznych (ułatwiona dyfuzja). Jest on stereose-

lektywny i dwukierunkowy. Białka Glut są obecne we wszystkich dotychczas zbadanych komórkach ssaczy [2, 20, 54, 61].

Pierwszy nośnik glukozy transportujący cukier drogą ułatwionej dyfuzji wyizolowano w roku 1977 z ludzkich erytrocytów. W roku 1985 uzyskano klony cDNA transporterów glukozy z ludzkiej linii komórkowej HepG2 [55] i mózgu szczura [56]. Dotychczas u ssaków zidentyfikowano sześć izoform transporterów glukozy. Geny kodujące te białka są określane jako *GLUT 1–5* i *GLUT 7*. *GLUT 6* jest pseudogenem opisanym wyłącznie u człowieka. Nie ulega ekspresji ze względu na dużą zawartość sekwencji terminalnych [54, 58, 61]. Produkty białkowe tych genów są oznaczane odpowiednio Glut 1, Glut 2 itd. Jakkolwiek nośniki te są określane jako transportery glukozy, mogą one transportować także inne heksozy. Przykładem może być Glut 5 odpowiedzialny przede wszystkim za transport fruktozy do komórek [38, 50, 58, 59, 67]. Lokalizacja poszczególnych izoform jest charakterystyczna dla tkanek, a określone komórki mogą wykazywać ekspresję dwu lub więcej izoform [49, 75].

Ssacze geny *GLUT* należą do dużej nadrodziny genów, których produkty białkowe są odpowiedzialne za transport różnych substratów do komórki. Na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasów, do tej nadrodziny zalicza się wiele białkowych nośników błonowych. Oprócz ssaków obecność homologicznych transporterów i/lub odpowiednich genów stwierdzono np. u bakterii (*araE*, *xylE* i *galP* u *Escherichia coli*, *araE* u *Bacillus subtilis*), drożdży (*SNF3*, *GAL2*), pierwotniaków pasożytniczych (*LTP* u *Leishmania enrietti*, *TcrHT1* u *Trypanosoma cruzi*), pierwotniaków wolno żyjących (*Tetrahymena thermophila*, Szablewski – dane niepublikowane), glonów, roślin wyższych, w oocytach *Xenopus laevis* [7, 20, 54, 63, 64, 69]. U wymienionych przykładowo organizmów, homologi ssacych Glut mogą transportować oprócz glukozy także inne heksozy, pentozy, disacharydy, kwasy karboksylowe, antybiotyki, pochodne chininy. Przenoszenie przez błonę komórkową wymienionych przykładowo substratów może zachodzić drogą ułatwionej dyfuzji (charakterystycznej dla Glut), jak i transportu aktywnego [2, 20]. Wykazano także, że geny ssacych transporterów mogą również ulegać ekspresji w komórkach innych gatunków. Przykładem mogą być szcurze geny *GLUT* wykazujące ekspresję u ameby *Dictyostelium discoideum* i u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [9, 29, 30] oraz ludzki *GLUT-1* u *Saccharomyces cerevisiae* [68].

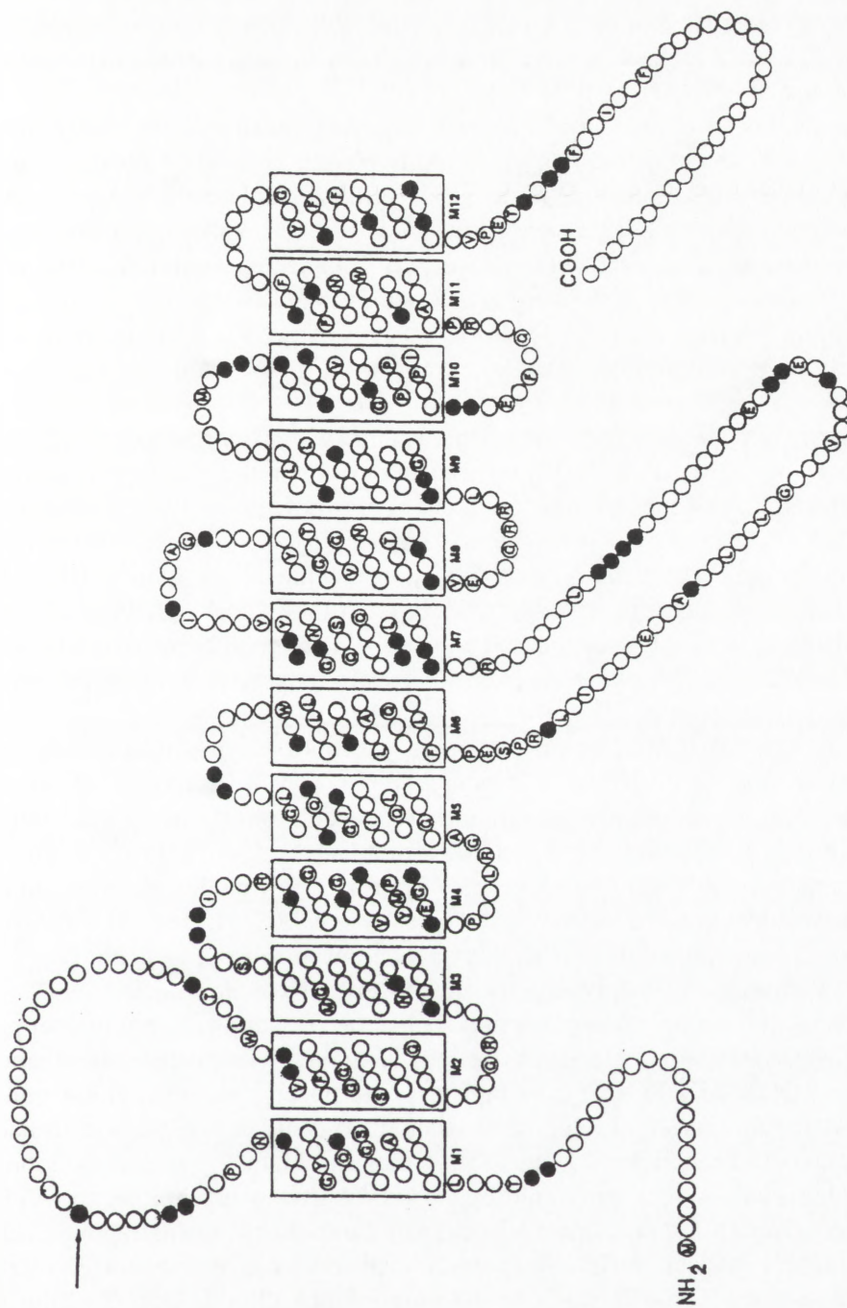
II. BUDOWA TRANSPORTERA GLUKOZY

Ssacze nośniki glukozy (Glut) wykazują w stosunku do siebie bardzo wysoki stopień homologii. Na przykład sekwencja aminokwasów ludzkiego Glut 1 jest podobna na poziomie 97–98% do sekwencji stwierdzonej w transporterze u szczura,

myszy, królika i świni. Porównanie pod tym względem ludzkiego Glut 2 ze szczurzym i mysim wykazuje około 82% identyczności [54]. Analiza sekwencji aminokwasów w poszczególnych transporterach, ale w obrębie tego samego gatunku, także wykazuje wysoki stopień homologii. Ludzkie Glut 1–5 wykazują identyczną sekwencję aminokwasów w granicach 39–65%, a podobieństwo sekwencji na poziomie 50–76% [2]. Ponieważ GLUT 6 nie koduje żadnego białka, analogiczne badania wykonano porównując sekwencję nukleotydów GLUT 6 cDNA z sekwencją nukleotydów cDNA poszczególnych GLUT. Największy stopień homologii (79,6%) stwierdzono między GLUT 6 cDNA i GLUT 3 cDNA [20]. Natomiast na temat sekwencji aminokwasów Glut 7 brak jest szczegółowych danych [54], mimo to niektórzy autorzy [20] sugerują, że podobieństwo między Glut 7 i Glut 2 na poziomie aminokwasów wynosi 68%. Jednocześnie sądzi się, że Glut 1 wydaje się być najbardziej konserwatywną izoformą [54].

Stosunkowo najlepiej poznano budowę Glut 1 [2, 19, 20, 54, 58, 61]. Białko to składa się z 492 aminokwasów i może być rozpatrywane jako struktura złożona z 25 odcinków (rys. 1). Trzyście odcinków ma charakter silnie hydrofilowy i najprawdopodobniej wykazuje powinowactwo do wodnego środowiska pozakomórkowego i wewnątrzkomórkowego. Występują one na przemian z 12 hydrofobowymi odcinkami, wykazującymi najprawdopodobniej powinowactwo do lipidowego środowiska błony komórkowej. Łańcuch jest tak ułożony, że oba końce (N i C) znajdują się w cytoplazmie. W strukturze transportera występują dwie duże pętle: między helisą 1 i 2 oraz między 6 i 7. Duża pętla między helisami 6 i 7 dzieli strukturę na dwie części: domenę N-kończową i C-kończową. Pętle między pozostałymi helisami w środowisku cytoplazmatycznym są bardzo krótkie (około 8 aminokwasów) i ich skład jest konserwatywną cechą całej rodziny. Te krótkie pętle warunkują strukturę trzeciorzędową i sugerują bardzo ściśle upakowanie helis w wewnętrznym środowisku komórki w każdej połowce białka. Długość i sekwencja aminokwasowa pętli w środowisku ekstracelularnym tych białek jest bardzo różna, ale generalnie są dłuższe niż pętle w środowisku wewnętrznym. Spektroskopia w podczerwieni sugeruje ponadto wysoką (ponad 80%) helikoidalną strukturę białka Glut 1.

Konserwatywne motywy w transporterach glukozy zawierają GRR(K) między helisami 1 i 2 na końcu N i stosownie do tego między helisami 7 i 8 na końcu C. Podobnie, EXXXXXXR występuje między helisami 4 i 5 na końcu N i odpowiednio między helisami 10 i 11 na końcu C. Motywy te mogą być konserwowane, aby zachować stabilność konformacyjną białka i być może tworzą mostki między dwiema połówkami. Powtórzenie tych motywów między dwiema połówkami białka może sugerować również co innego, że nastąpiła duplikacja genu odziedziczonego po przodkach. Gen, który początkowo kodował białko błonowe 6-członowe, obecnie warunkuje dwie domeny 12-członowej helikoidalnej struktury błonowej. Przeciwnicy tej koncepcji, którzy nadają znaczenie krótkim pętlom cytoplazmatycznym, także sądzą, że pojedyncza grupa 12 helis jest nieprawdopodobna. Sugerują natomiast,



RYSIUNEK 1. Schemat budowy ssaczego transportera glukozy: 12 helis transbionowych zaznaczono ramkami i oznaczono odpowiednimi literami, miejsca chemicznego podobieństwa (D,E: F,Y,W; I,L,V,M; K,R,N,Q,S,T) oznaczono na czarno, strzałka wskazuje miejsce glikozylacji; oba końce (N i C) są

że 6 helis, z których każda zawiera domeny N- i C-końcowe, każda tworząca strukturę dwupłatkową (bilobular), mogły zostać silnie upakowane i obecnie zachowują się jak jedno białko. Potwierdzeniem tej teorii może być struktura permeazy laktozowej u *Escherichia coli* [2].

Transporter zawiera przynajmniej jeden łańcuch oligosacharydowy, który może być zlokalizowany na końcu C lub N, ale nigdy na obu końcach. Sekwencja aminokwasów zawiera dwa potencjalne miejsca N-glikozylacji: Asn⁴⁵ i Asn⁴¹¹. Ale tylko jedno miejsce może być glikozylowane. Asn⁴¹¹ jest zlokalizowana wewnątrz-błonowo, co sugeruje, że glikozylacji ulega Asn⁴⁵. Ponadto, wyniki doświadczeń, w których transporter był przecinany w miejscu cysteiny, wskazują, że fragment 31 kDa odpowiadający reszcie 133 do 420 (lub 133 do 428), nie zawiera węglowodanu. To bezpośrednio wskazuje, że miejscem glikozylacji jest asparagina 45 (Asn⁴⁵).

Jaka jest rola poszczególnych fragmentów Glut w transporcie heksozy? Aby odpowiedzieć na to pytanie, indukowano mutacje w tym białku, a następnie badano kinetykę reakcji, czyli szybkość transportu cukru oraz powinowactwo do ligandów. Jako ligandów używano cytochalazynę B, która przyłącza się w (lub w pobliżu) miejsca przyłączania cukru na wewnętrznej powierzchni błony (helisy 10 i 11). Jest więc kompetytywnym inhibitorem ucieczki cukru z komórki. IAPS-forskolina i ATB-BMPA, pochodne bis-mannozy, przyłączają się w pobliżu miejsca wiązania cukru (helisy 6 i 7), ale po stronie zewnętrznej. Są więc kompetytywnymi inhibitorami wnikania cukru do komórki [12].

Odcięcie regionu C-końcowego powoduje w zmutowanym transporterze obniżenie powinowactwa do ligandów zewnątrzkomórkowych (mimo że region ten znajduje się w środowisku wewnątrzkomórkowym) oraz obniża aktywność transportową nośnika. Każda mutacja konserwowanych Gln¹⁶¹, Gln²⁸², Pro³⁸⁵ i Trp⁴¹² zlokalizowanych odpowiednio w helisach 5, 7, 10 i 11 powoduje całkowitą utratę powinowactwa do ligandów zewnątrzśrodowiskowych [22, 31, 56, 73]. Niektóre z tych mutacji mogą ponadto obniżać aktywność transportową białka (np. Gln²⁸²). Natomiast w zasadzie nie wpływają na znakowanie cytochalazyną B.

Konserwowane regiony szczególnie interesujące występują w C-terminalnej połowie białka i prawdopodobnie mogą być odpowiedzialne za rozpoznawanie liganda [85]. Motyw QXSGXNXXYY w helisie 7 jest obecny we wszystkich transporterach ssaczy i jest wysoce konserwowany u wszystkich przedstawicieli nadrodziny transporterów glukozy. Pierwsza glutamina (Gln²⁸²) prawdopodobnie odgrywa istotną rolę w rozpoznawaniu liganda zewnątrzpowierzchniowego (ATB-BMPA), a cały motyw jest podobny do tworzącego istotną część zewnątrzpowierzchniowego miejsca wiązania cukru. Bezpośrednio poprzedzają tę sekwencję reszty QLS, które są wysoce konserwatywne w transporterach Glut 1, Glut 3 i Glut 4, wykazujących duże powinowactwo do D-glukozy. Brak jest natomiast tej sekwencji w transporterach Glut 2 i Glut 5 oraz u trypanosomy, akceptujących D-fruktozę.

Główna różnica między D-glukozą i D-fruktozą jest widoczna odpowiednio w pozycji C-1 i C-2. Reszty QLS mogą więc być odpowiedzialne za dokowanie pozycji C-1 D-glukozy.

Przylegające do zachowawczych regionów w helisie 7 są serie konserwatywnych reszt treoninowych i asparaginowych w helisie 8. Mogą one być odpowiedzialne za wytworzenie części wiazań wodorowych kanału, który heksozom, przyłączonym w miejscu wiązania na zewnętrznej powierzchni, pozwala na przyłączenie ich w odpowiednim miejscu wewnątrz transportera. Uwalnianie cukru wewnątrz komórki może być kontrolowane przez zmiany konformacyjne występujące w helisach 10 i 11, gdzie są wysoce konserwatywne reszty tryptofanowe i prolinowe. Modelowanie molekularne i badania dynamiki molekularnej sugerują, że proliny 383 i 385 są szczególnie istotne w ułatwianiu następującego po sobie otwierania i zamykania zewnętrznej części transportera [15].

Zamiana seryny 294 w pętli między helisami 7 i 8 na alaninę lub treoninę blokuje aktywność transportową nośnika oraz przyłączanie cytochalazyny B. Nie wpływa natomiast na znakowanie za pomocą ATB-BMPA. Mutacja polegająca na zamianie treoniny 295 na alaninę daje podobne efekty. Te dane sugerują, że Ser²⁹⁴ i Thr²⁹⁵ są odpowiedzialne za zmiany konformacyjne Glut podczas transportu glukozy [13]. Zamiana w Glut 4 Arg⁹² lub Arg^{333/334} na inne aminokwasy obniża lub wręcz blokuje aktywność transportową nośnika, nie wpływa natomiast (lub tylko w nieznacznym stopniu) na przyłączenie ATB-BMPA lub cytochalazyny B. Wynik ten wskazuje, że te aminokwasy warunkują indukowane substratem zmiany konformacyjne białka podczas transportu cukru. Podobną funkcję spełniają także Glu³²⁹, Glu³⁹³ i Arg⁴⁰⁰ [65, 86].

III. MECHANIZM TRANSPORTU CUKRU

Jak mogłaby taka struktura przenosić glukozę do komórki? Zakłada się, że musi powstać por w błonie komórkowej. Architekturę takiego pora sugeruje pofałdowane ułożenie łańcucha polipeptydowego i rozmieszczenie aminokwasów w odcinkach transbłonowych. Badania spektroskopowe wskazują, że każdy odcinek jest zwinięty w helisę (prawie 80% łańcucha). Ponieważ helisa przybiera kształt cylindra, chemicznie reaktywne grupy aminokwasów są rozmieszczone periodycznie wzdłuż jego powierzchni. Okazuje się, że w pięciu odcinkach transbłonowych (3, 5, 7, 8 i 11) grupy te są hydrofilne po jednej stronie cylindra i hydrofobowe po drugiej. Tych pięć odcinków powiązanych razem, zwróconych swymi hydrofobowymi stronami na zewnątrz wspólnej osi – w kierunku pozostałych odcinków transbłonowych i lipidowego środowiska błony – tworzyłoby por, którego wewnętrzna powierzchnia mogłaby wiązać glukozę [19, 20, 54].

Przedstawiony trójwymiarowy model struktury nośnika glukozy jest jedynie teoretyczny. Aby określić rzeczywistą strukturę metodami krystalografii rentgenowskiej, trzeba przekształcić te nośniki w dobrze uporządkowane struktury krystaliczne. Jednak lipofilna natura tych białek zniechęca na razie do takich prób. Tworząc model nośnika opierano się częściowo na przykładach nielicznych białek błonowych, które poddają się krystalizacji i dzięki temu zostały zobrazowane. Jedno z nich, zwane bakteryjnym centrum reakcji fotosyntezy, zawiera trzy oddzielne łańcuchy białkowe: dwa przechodzą przez błonę pięciokrotnie, a trzeci przechodzi przez nią raz. Każdy z tych 11 odcinków transbłonowych ma helikoidalną strukturę, podobną do zaproponowanej dla nośnika glukozy [39].

Procesy zachodzące podczas przenikania glukozy przez błonę komórkową są bardzo skomplikowane. Zakłada się, że nośnik „manipuluje” glukozą utrzymując ją w słabych, krótkotrwałych wiązaniach wodorowych. Transbłonowe odcinki: 3, 5, 7, 8 i 11 zawierają wiele aminokwasów mających grupy wodorotlenowe (OH) i karbamidowe (CONH_2), które mogą tworzyć wiązania wodorowe z grupami wodorotlenowymi glukozy [2, 19, 20, 39, 54]. Dane doświadczalne wskazują, że pobieranie glukozy przez komórkę zachodzi w czterech etapach. W pierwszym etapie glukoza przyłącza się do skierowanego na zewnątrz miejsca wiążącego. Wskutek tego kompleks nośnik-glukoza zmienia konformację w ten sposób, że miejsce wiążące wraz z glukozą kieruje się do wnętrza komórki. Jest to drugi etap. W trzecim etapie transporter uwalnia glukozę do wnętrza komórki. W ostatnim, czwartym etapie, wolny nośnik zmienia konformację na taką, w której miejsce wiązania glukozy ponownie jest skierowane na zewnątrz. Dzięki temu Glut jest zdolny do transportu następnej cząsteczki glukozy.

Struktura wspomnianych dwóch postaci konformacyjnych nośnika nie jest znana. Jednak wydaje się wysoce prawdopodobne, że w każdej z tych postaci, utworzony por jest otwarty na jednym końcu i zwężony na drugim. Zakłada się przy tym, że glukoza jest wiązana przy otwartym końcu. Glukoza przesuwałaby się w miarę, jak otwarty koniec zamykałby się za nią, a zwężony koniec otwierał przed nią. W przedstawionym modelu nośnik funkcjonowałby jako konformacyjny oscylator. Badania kinetyczne wskazują, że taka oscylacja jest bardzo szybka. Przy braku glukozy w środowisku cząsteczka nośnika w błonie erythrocytu przechodzi z jednego w drugi stan konformacyjny około 100 razy na sekundę (w temp. 20°C). Kiedy glukoza jest związana z nośnikiem, szybkość ta wzrasta do około 900 razy na sekundę. Zakłada się, że glukoza przyspiesza oscylację transportera przez obniżenie bariery energetycznej między dwiema konformacjami [39].

IV. LOKALIZACJA TRANSPORTERÓW GLUKOZY I CHARAKTERYSTYKA

1. Glut 1

Gen jest zlokalizowany w pierwszym chromosomie. Nośnik składa się z 492 aminokwasów. Jest pierwotnym transporterem w tkankach płodowych. U osobników dorosłych jego najwyższy poziom stwierdzono w erytrocytach, mózgu, nerwach, jelicie grubym i komórkach śródbłonna BBB. Mniejsze ilości Glut 1 stwierdzono w tkance mięśniowej i tłuszczowej. Występuje jako dwie formy: 45 kDa i 55 kDa, różniące się stopniem glikozylacji. Lokalizacja poszczególnych izoform Glut 1 w mózgu jest bardzo charakterystyczna. Ekspresja genu uzależniona jest od czynników egzogennych, takich jak np.: estry forboleu, wanadianu, glukozy, cAMP, hormony tarczycy i wzrostu, surowicy, insuliny, IGF-1, PDGF, EGF, TNF α , TGF β , onkogeny. Zasadniczą rolę w wewnątrzkomórkowej translokacji Glut 1 odgrywa PI-3-kinaza [2, 5, 19, 23, 28, 33, 43, 45, 46, 48, 49, 53, 62, 71, 80, 81, 87, 88, 92].

2. Glut 2

Gen jest zlokalizowany w 3 chromosomie, a w skład transportera wchodzi 524 aminokwasy. Jest zlokalizowany przede wszystkim w wątrobie, kanalikule proksymalnym nefronu, nabłonku jelita cienkiego, komórkach β trzustki, oocytach *Xenopus*. W niewielkich ilościach także w mózgu. Ekspresja Glut 2 w komórkach β trzustki jest skorelowana z poziomem glukozy we krwi. Prawdopodobnie współdziała z GIP i GLP-1 w sekrecji insuliny. W komórkach β trzustki ulega fosforylacji pod wpływem PKA. Rola tego procesu nie jest jednak do końca wyjaśniona. Podczas podwyższonej glukoneogenezy i glikogenolizy w hepatocytach, Glut 2 może uwalniać cukier z wątroby do krwi. Oprócz glukozy może transportować także fruktozę [2, 8, 10, 11, 16, 18, 19, 21, 24, 25, 34, 54, 58, 76, 77, 78, 84, 90, 92, 93, 94].

3. Glut 3

Gen jest zlokalizowany w 12 chromosomie. Białko składa się z 496 aminokwasów. Wysoki poziom tego transportera stwierdzono w mózgu i wydaje się być specyficzny dla neuronów. W mniejszej ilości występuje w łożysku, wątrobie, sercu, nerkach i mięśniach zarodka. Niewiele jest danych dotyczących wpływu czynników egzogennych na ekspresję GLUT 3. Wyniki niektórych doświadczeń wskazują na możliwość regulacji ekspresji pod wpływem glukozy, insuliny, IGF-1 [3, 5, 6, 19, 20, 27, 35, 36, 41, 44, 47, 49, 52, 57, 75, 89, 92].

4. Glut 4

Gen kodujący białko jest zlokalizowany w 17 chromosomie, natomiast nośnik składa się z 509 aminokwasów. Jest to główny transporter glukozy w mięśniach szkieletowych i sercowym oraz w komórkach tkanki tłuszczowej. W niewielkich ilościach stwierdzany jest także w mózgu. Ogromny wpływ na aktywność transportową białka ma insulina. Ze względu na bardzo złożone procesy zachodzące podczas translokacji Glut 4 pod wpływem insuliny, jak również na ogromne znaczenie tego transportera w stanach patologicznych, zagadnienie to zostanie szerzej omówione w osobnym artykule [2, 12, 19, 20, 26, 58, 92].

5. Glut 5

Gen jest zlokalizowany w pierwszym chromosomie. W skład nośnika wchodzi 501 aminokwasów. Wysoki poziom tej izoformy stwierdzono w jelicie cienkim, jądrach i spermie. W mniejszych ilościach był identyfikowany w nerkach, mięśniach szkieletowych i mózgu. Występowanie Glut 5 w oocytach *Xenopus*, jak również jego wyższe powinowactwo do fruktozy niż do glukozy sugerują, że jest on odpowiedzialny głównie za transport fruktozy do komórki. Glut 5 prawdopodobnie nie ulega stymulacji insuliną. Transport glukozy przy udziale Glut 5 nie zostaje zahamowany pod wpływem cytochalazyny B [2, 19, 20, 49, 51, 54, 58, 60, 92].

6. Glut 7

Stwierdzony wyłącznie w hepatocytach jako mikrosomalny transporter glukozy, jakkolwiek niektóre doniesienia wskazują na jego lokalizację także w mózgu. Glut 7 wykazuje duże podobieństwo pod względem składu aminokwasów do Glut 2 (68% identyczności). Szczególne podobieństwo dotyczy pierwszych 4 domen membranowych, a także rejonów transbłonowych helisy 9 i 10. Ponadto, sekwencja nukleotydów cDNA Glut 7 jest w 100% identyczna z cDNA Glut 2 w trzech miejscach. Jednak te regiony identyczności nie pokrywają się z zakresami intron-egzon [2, 20, 54, 83, 92].

7. GLUT 6

Niefunkcjonalny pseudogen został zidentyfikowany dotychczas wyłącznie u człowieka. Ponieważ cDNA zawiera wiele kodonów terminalnych, jest niemożliwe kodowanie przez GLUT 6 funkcjonalnego transportera glukozy [2, 20, 32].

V. UWAGI KOŃCOWE

Poznanie budowy i w pewnym stopniu mechanizmu działania transporterów glukozy przyczyniło się znacznie do zrozumienia powodów cukrzycy. Już obecnie

wiadomo, że za występowanie cukrzycy typu 1 (cukrzyca insulinozależna, IDDM) odpowiedzialne są przeciwciała skierowane m.in. przeciwko Glut 2 (choroba autoimmunologiczna). Jednak dotychczas nie udało się jednoznacznie stwierdzić, czy miejscem działania przeciwciał w komórkach β trzustki jest Glut 2, czy też białko, które modyfikuje aktywność omawianego transportera. Z kolei cukrzyca typu 2 (niezależna od insuliny, NIDDM) związana jest m.in. z nieprawidłową budową i/lub funkcją Glut 4. U chorych stwierdza się normalną lub tylko nieznacznie obniżoną zawartość tego białka. Lecz Glut 4 może spowodować oporność komórek na insulinę w inny sposób, być może przez kierowanie się do niewłaściwego kompartmentu wewnątrzkomórkowego – takiego, z którego nie może nastąpić rekrutacja na powierzchnię komórki. Inna możliwość wiąże się z uszkodzeniem jakiejś części szlaku sygnalizacji, przez który insulina stymuluje egzocytozę Glut 4. Takie uszkodzenie może dotyczyć receptora insuliny na powierzchni komórek lub jednego z białek, które przekazuje sygnał od receptora do pęcherzyków zawierających Glut 4 [12, 19, 20, 30, 37, 61]. Obecnie prowadzone są bardzo intensywne badania mające na celu wyjaśnienie roli transporterów glukozy w stanach chorobowych.

LITERATURA

- [1] BAGGA K, DYER J, SIMMONDS R, SCOTT D, BEECHEY RB, SHIRAZI-BEECHEY SP. Synthesis of a membrane impermeable D-glucose analogue: studies on the mechanism of nutrient regulation of the intestinal Na^+ /glucose cotransporter (SGLT 1). *Biochem Soc Trans* 1997; **25**: 477S.
- [2] BELL GI, BURANT CF, TAKEDA J, GOULD GW. Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J Biol Chem* 1993; **268**: 19161–19164.
- [3] BILAN PJ, MITSUMOTO Y, MAHER F, SIMPSON IA, KLIP A. Detection of the GLUT 3 glucose transporter in rat L6 muscle cells: regulation by cellular differentiation, insulin and insulin-like growth factor I. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **186**: 1129–1137.
- [4] BINDSLEV N, HIRAYAMA BA, WRIGHT EM. Na^+ /D-glucose cotransport and SGLT 1 expression in hen colon correlates with dietary Na^+ . *Comp Biochem & Physiol, Part A Physiol* 1997; **118**: 219–227.
- [5] BOADO RJ, BLACK KK, PARDRIDGE WM. Gene expression of GLUT 3 and GLUT 1 glucose transporters in human brain tumors. *Mol Brain Res* 1994; **27**: 51–57.
- [6] BRANT AM, JESS TJ, MILLIGAN G, BROWN CM, GOULD GW. Immunological analysis of glucose transporters expressed in different regions of the rat brain and central nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **192**: 1297–1302.
- [7] CAIRNS BR, COLLARD MW, LANDFEAR SM. Developmentally regulated gene from *Leishmania* encodes a putative membrane transport protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 7682–7686.
- [8] CHEN L, ALAM T, JOHNSON JH, HUGHES S, NEWGARD CB, UNGER RH. Regulation of beta-cell glucose transporter gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; **87**: 4088–4092.
- [9] COHEN NR, KNECHT DA, LODISH HF. Functional expression of rat GLUT 1 glucose transporter in *Dictyostelium discoideum*. *Biochem J* 1996; **315**: 971–975.

- [10] COLVILLE CA, SEATTER MJ, JESS TJ, GOULD GW, THOMAS HM. Kinetic analysis of the liver-type (GLUT 2) and brain-type (GLUT 3) glucose transporters in *Xenopus* oocytes: substrate specificities and effects of transport inhibitors. *Biochem J* 1993; **290**: 701–706.
- [11] CREUTZFELD W, NAUCK M. Gut hormones and diabetes mellitus *Diab Metab Rev* 1992; **8**: 149–177.
- [12] CZECH MP. Molecular action of insulin on glucose transport. *Annu Rev Nutr* 1995; **15**: 441–471.
- [13] DOEGE H, SCHURMANN A, OHNIMUS H, MONSER V, HOLMAN GD, JOOST HG. Serine-294 and threonine-295 in the exofacial loop domain between helices 7 and 8 of glucose transporters (GLUT) are involved in the conformational alterations during the transport process. *Biochem J* 1998; **329** (Pt2): 289–293.
- [14] DYER J, GARNER A, WOOD IS, de la HORRA C, ILLUNDAIN AA, SHIRAZI-BEECHEY SP. Changes in the levels of intestinal Na^+ /glucose cotransporter (SGLT 1) in experimental diabetes. *Biochem Soc Trans* 1997; **25**: 479S.
- [15] EVANS JL, HONER CM, WOMELSDORF BE, KAPLAN EL, BELL PA. The effects of wortmannin, a potent inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, on insulin-stimulated glucose transport, GLUT 4 translocation, antilipolysis, and DNA synthesis. *Cell Signal* 1995; **7**: 365–376.
- [16] FERBER S, BETRANELRIO H, JOHNSON JH, NOEL RJ, CASSIDY LE, CLARK S, BECKER TC, HUGHES SD, NEWGARD CB. GLUT-2 gene transfer into insulinoma cells confers both low and high affinity glucose-stimulated insulin release. Relationship to glucokinase activity. *J Biol Chem* 1994; **269**: 11523–11529.
- [17] GABBAY RA, SUTHERLAND C, GNUDI L, KAHN BB, OBRIEN RM, GRANNER DK, FLIER JS. Insulin regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression does not require activation of the Ras/Mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Biol Chem* 1996; **271**: 1890–1897.
- [18] GERMAN MS. Glucose sensing in pancreatic islet beta-cells: the key role of glucokinase and the glycolytic intermediates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 1781–1785.
- [19] GOULD GW, BELL GI. Facilitative glucose transporters: an expanding family. *TIBS* 1990; **15**: 18–23.
- [20] GOULD GW, HOLMAN GD. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem J* 1993; **295**: 329–341.
- [21] GREMLICH S, PORRET A, HANI EH, CHERIF D, VIONNET N, FREGUEL P, THORENS B. Cloning, functional expression and chromosomal localization of the human pancreatic islet glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor. *Diabetes* 1994; **44**: 1202–1208.
- [22] HASHIRAMOTO M, KADOWAKI T, CLARK AE, MURAOKA A, MOMO MURA K. Site-directed mutagenesis of Glut 1 in helix 7 residue 282 results in perturbation of exofacial ligand binding. *J Biol Chem* 1992; **267**: 17502–17507.
- [23] HIRAKI Y, MC MORROW IM, BIRNBAUM MJ. The regulation of glucose transporter gene expression by cyclic adenosine monophosphate in NIH3T3 fibroblasts. *Mol Endocrinol* 1989; **3**: 1470–1476.
- [24] HUGHES SD, QUADE C, JOHNSON JH, FERBER S, NEWGARD CB. Transfection of AtT-20ins cells with GLUT-2 but not GLUT-1 confers glucose-stimulated insulin secretion. Relationship to glucose metabolism. *J Biol Chem* 1993; **268**: 15205–15212.
- [25] INAGAKI N, YASUDA K, INOUE G, OKAMOTO Y, YANO H, SOMEYA Y, OHMOTO Y, DEGUCHI K, IMAGAWA K, IMURA H, SEINO Y. Glucose as regulator of glucose activity and glucose-transporter mRNA in hamster beta-cell line. *Diabetes* 1992; **41**: 592–597.
- [26] KAHN BB. Glucose transport: pivotal step in insulin action. *Diabetes* 1996; **45**: 1644–1655.
- [27] KAINULAINEN H, JÄRVINEN T, HEINONEN PK. Placental glucose transporters in fetal intrauterine growth retardation and macrosomia. *Gynec Obstet Invest* 1997; **44**: 89–92.

- [28] KALIMAN P, VIÑALS F, TESTAR X, PALACIN M, ZORZANO A. Disruption of GLUT 1 glucose carrier trafficking in L6E9 and Sol 8 myoblasts by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin. *Biochem J* 1995; **312**: 471–477.
- [29] KASAHARA T, KASAHARA M. Expression of the rat GLUT 1 glucose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 1996; **315**: 177–182.
- [30] KASAHARA T, KASAHARA M. Characterization of rat Glut 4 glucose transporter expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: comparison with Glut 1 glucose transporter. *Biochim Biophys Acta* 1997; **1324**: 111–119.
- [31] KATAGIRI H, ASANO T, SHIBASAKI Y, LIN JL, TSUKUDA H, ISIHARA H, AKAMUMA Y, TAKAKU F, OKA Y. Substitution of leucine for tryptophan 412 does not abolish cytochalasin B labeling but marked decreases the intrinsic activity of GLUT 1 glucose transporter. *J Biol Chem* 1991; **266**: 7769–7773.
- [32] KAYANO T, BURANT CF, FUKUMOTO H, GOULD GW, FAN YS, EDDY RL, BYERS MG, SHOWS TB, SEINO S, BELL GI. Human facilitative glucose transporters. Isolation, functional characterization of cDNA encoding an isoform (GLUT 5) expressed in small intestine, kidney, muscle, and adipose tissue and an unusual glucose transporter pseudogene-like sequence (GLUT 6). *J Biol Chem* 1990; **265**: 13276–13282.
- [33] KITAGAWA T, MASUMI A, AKAMATSU Y. Transforming growth factor-beta 1 stimulates glucose uptake and the expression of glucose transporter mRNA in quiescent Swiss mouse 3T3 cells. *J Biol Chem* 1991; **266**: 18066–18071.
- [34] KITASATO H, KAI R, WEI-GUANG D, OMATSU-KANBE M. The intrinsic rhythmicity of spike-burst generation in pancreatic β -cells and intercellular interaction within an islet. *Jap J Physiol* 1996; **46**: 363–373.
- [35] KNOTT RM, ROBERTSON M, FORRESTER JV. Regulation of glucose transporter (Glut 3) and aldose reductase mRNA in bovine retinal endothelial cells and retinal pericytes in high glucose and high galactose culture. *Diabetologia* 1993; **36**: 808–812.
- [36] KNOTT RM, ROBERTSON M, MUCKERSIE E, FORRESTER JV. Regulation of glucose transporters (GLUT-1 and GLUT-3) in human retinal endothelial cells. *Biochem J* 1996; **318**: 313–317.
- [37] KONARSKA L, POREMBSKA Z. Receptor insuliny W: Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce. PWN. 1995: 77–103.
- [38] KRISTIANSEN S, DARAKHSHAN F, RICHTER EA, HUNDAL HE. Fructose transport and GLUT-5 protein in human sarcolemmal vesicles. *Am J Physiol (Endocrinol Metab)* 1997; **273**: E543–E548.
- [39] LIENHARD GE, SLOT JW., JAMES DE, MUECKLER MM. Jak komórki wchłaniają glukozę. W: *Świat Nauki* 1992; Marzec: 34–40.
- [40] LO B, SILVERMAN M. Replacement of Ala-166 with cysteine in the high affinity rabbit sodium/glucose transporter alters transport kinetics and allows methanethiosulfonate ethylamine to inhibit transport function. *J Biol Chem* 1998; **273**: 903–909.
- [41] LONGO N, GRIFFIN LD, LANGLEY SD, ELSAS LJ. Glucose transport by cultured human fibroblasts: regulation by phorbol esters and insulin. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1104**: 24–30.
- [42] LOPASCHUK GD, STANLEY WC. Manipulation of energy metabolism in the heart. *Sci and Med* 1997; **4**: 42–51.
- [43] MAHER F. Cellular localization of GLUT 3 and GLUT 1 glucose transporters in primary cultured neurons and glia. *Soc Neurosci Abstr* 1993; **19**: 898.
- [44] MAHER F. Immunolocalization of GLUT 1 and GLUT 3 glucose transporters in primary cultured neurons and glia. *J Neurosci Res* 1995; **42**: 459–469.
- [45] MAHER F, CLARK S, HARRISON LC. Chronic stimulation of glucose transporter gene expression in L6 myocytes via the insulin-like growth factor-1 receptor. *Mol Endocrinol* 1989; **3**: 2128–2135.

- [46] MAHER F, DAVIES-HILL TM, LYSKO PG, HENNEBERG RC, SIMPSON IA. Expression of two glucose transporters, GLUT 1 and GLUT 3, in cultured cerebral neurons: evidence for neuron-specific expression of GLUT 3. *Mol Cell Neurosci* 1991; **2**: 351–360.
- [47] MAHER F, DAVIES-HILL TM, SIMPSON IA. Substrate specificity of GLUT 3 in rat cerebellar granule neurons. *Biochem J* 1996; **315**: 827–831.
- [48] MAHER F, VANNUCCI SJ, SIMPSON IA. Glucose transporter isoforms in brain: absence of GLUT 3 from the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993; **13**: 342–345.
- [49] MAHER F, VANNUCCI SJ, SIMPSON IA. Glucose transporter proteins in brain. *FASEB J* 1994; **8**: 1003–1011.
- [50] MALIDE D, DAVIES-HILL TM, LEVINE M, SIMPSON IA. Distinct localization of GLUT-1, -3 and -5 in human monocyte-derived macrophages: effects of cell activation. *Am J Physiol (Endocrinol Metab)* 37. 1998: E516–E526.
- [51] MANTYCH GJ, JAMES DE, DEVASKAR SV. Jejunal/kidney glucose transporter isoform (Glut-5) is expressed in the human blood-brain barrier. *Endocrinology* 1993; **132**: 35–40.
- [52] MANTYCH GJ, JAMES DE, CHUNG HD, DEVASKAR SV. Cellular localization and characterization of GLUT 3 glucose transporter isoform in human brain. *Endocrinology* 1993; **131**: 1270–1278.
- [53] MOUNTJOY KG, FLIER JS. Vanadate regulates glucose transporter (Glut-1) expression in NIH3T3 mouse fibroblasts. *Endocrinology* 1990; **127**: 2025–2034.
- [54] MUECKLER M. Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* 1994; **219**: 713–725.
- [55] MUECKLER M, CARUSO C, BALDWIN S.A., PANICO M, BLENCH I, MORRIS HR, ALLARD WJ, LIENHARD GE, LODISH HF. Sequence and structure of human glucose transporter. *Science* 1985; **229**: 941–945.
- [56] MUECKLER M, WENG W, KRUSE M. Glutamine 161 of Glut 1 glucose transporter is critical for transport activity and exofacial ligand binding. *J Biol Chem* 1994; **269**: 20533–20538.
- [57] NAGAMATSU S, SAWA H, KAMADA K, NAKAMICHI Y, YOSHIMOTO K, HOSHINO T. Neuron-specific glucose transporter (NSGT): CNS distribution of GLUT 3 rat glucose transporter (RGT3) in rat central neurons. *FEBS Lett* 1993; **334**: 289–295.
- [58] OLSON AL, PESSIN JE. Structure, function and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Annu Rev Nutr* 1996; **16**: 235–256.
- [59] OAYNE J, MAHER F, SIMPSON I, MATTICE L, DAVIES P. Glucose transporter Glut 5 expression in microglial cells *GLIA*. 1997; **21**: 327–331.
- [60] PAYNE J, MATTIACI LA, MAHER F, SIMPSON IA, DAVIES P. Expression of GLUT 5 on microglia in normal and AD brain. *Soc Neurosci Abstr* 1993; **19**: 1042.
- [61] PESSIN JE, BELL GI. Mammalian facilitative glucose transporter family: structure and molecular regulation. *Annu Rev Physiol* 1992; **54**: 911–930.
- [62] ROLLINS BJ, MORRISON ED, USHER P, FLIER JS. Platelet derived growth factor regulates glucose transporter expression. *J Biol Chem* 1988; **263**: 16523–16526.
- [63] SA-NOGUIERA I, RAMOS SS. Cloning, functional analysis and transcriptional regulation of the *Bacillus subtilis* araE gene involved in L-arabinose utilization. *J Bacteriol* 1997; **179**: 7705–7711.
- [64] SANDERSON NM, MARTIN GE, RUTHERFORD NG, HENDERSON PJ. Purification, reconstitution and circular dichroism of the galactose-H⁺ transporter protein [GalP(His)6] of *Escherichia coli*. *Biochem Soc Trans* 1997; **25**: 470S.
- [65] SCHURMANN A, DOEGE H, OHNIMUS H, MONSER V, BUCHS A, JOOST HG. Role of conserved arginine and glutamate residues on the cytosolic surface of glucose transporters for transporter function. *Biochemistry* 1997; **36**: 12897–12902.
- [66] SHIRAZI-BEECHEY SP, DYER J, BAGGA K, SIMMONDS R, WOOD IS, ALLISON GG, SCOTT D, KING TP. Molecular events involved in glucose-induced intestinal Na⁺/D-glucose co-transporter (SGLT 1) expression. *Biochem Soc Trans* 1997; **25**: 958–962.

- [67] SHU R, DAVIES ES, FERRARIS RP. Luminal fructose modulates fructose transport and GLUT-5 expression in small intestine of weaning rats. *Amer J Physiol* 1998; **274** (2Pt1): G232–G239.
- [68] SIMONS CH, WEINGLASS AB, BALDWIN S.A. Studies on the expression of the human erythrocyte glucose transporter (GLUT 1) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Soc Trans* 1997; **25**: 463S.
- [69] SNAPP EL, LANDFEAR SM. Cytoskeletal association is important for differential targeting of glucose transporter isoforms in *Leishmania*. *J Cell Biol* 1997; **139**: 1775–1783.
- [70] STANLEY WC, LOPASCHUK GD, MC CORMACK JG. Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart. *Cardiovasc Res* 1997; **34**: 25–33.
- [71] STEPHENS JM, CARTER BZ, PEKALA PH, MALTER JS. Tumor necrosis factor α -induced glucose transporter (GLUT-1) mRNA stabilization in 3T3-L1 preadipocytes. Regulation by the adenosine-uridine binding factor. *J Biol Chem* 1992; **267**: 8336–8341.
- [72] TAKEUCHI S, ANDO M. Marginal cells of the stria vascularis of gerbils take up glucose via the facilitated transporter GLUT: application of autofluorescence. *Hearing Res* 1997; **114**: 69–74.
- [73] TAMORI Y, HASHIRAMOTO M, CLARK AE, MORI H, MURAOKA A, KADOWAKI T, HOLMAN GD, KASUGA M. Substitution at Pro 385 of GLUT 1 perturbs the glucose transport function by reducing conformational flexibility. *J Biol Chem* 1994; **269**: 2982–2986.
- [74] TETAUD E, CHABAS S, GIROUD C, BARRET MP, BALTZ T. Hexose uptake in *Trypanosoma cruzi*: structure-activity relationship between substrate and transporter. *Biochem J* 1996; **317**: 353–359.
- [75] THOMAS DM, MAHER F, ROGERS SD, BEST D. Expression and regulation by insulin of Glut 3 in UMR 106-01, a clonal rat osteosarcoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **218**: 789–793.
- [76] THORENS B. Expression cloning of the pancreatic β cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon like peptide 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 8641–8645.
- [77] THORENS B, CHENG ZQ, BROWND, LODISH HF. Liver glucose transporter: a basolateral protein in hepatocytes and intestine and kidney cells. *Am J Physiol* 1990; **259**: C279–C285.
- [78] THORENS B, DÉRIAZ N, BOSCO D, DE VOS A, PIPELEERS D, SCHUIT F, MEDA P, PORRET A. Protein kinase A-dependent fosforylation of GLUT 2 in pancreatic β cells. *J Biol Chem* 1996; **271**: 8075–8081.
- [79] TODAKA M, NISHIYAMA T, MURAKAMI T, SAITO S, ITO K, KANAIE F, KAN M, ISHII K, HAYASHI H, SHICHERI M, EBINA Y. The role of insulin in activation of two enhancers in the mouse GLUT 1 gene. *J Biol Chem* 1994; **269**: 29265–29270.
- [80] TORDJMAN KM, LEINGANG KA, JAMES DE, MUECKLER M. Differential regulation of two distinct glucose transporter species expressed in 3T3L1 adipocytes: effect of chronic insulin and tolbutamide treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 7761–7765.
- [81] TROCINO RA, AKAZAWA S, TAKINO H, TAKAO Y, MATSUMOTO K. Cellular-tissue localization and regulation of the GLUT-1 protein in both the embryo and the visceral yolk sac from normal and experimental diabetic rats during the early postimplantation period. *Endocrinology* 1994; **134**: 869–878.
- [82] TURK E, WRIGHT EM. Membrane topology motifs in the SGLT cotransporter family. *J Membr Biol* 1997; **159**: 1–20.
- [83] WADDELL ID, ZOMERSCHOE AG, VOICE MW, BURCHEL A. Cloning and expression of a hepatic microsomal glucose transporter protein. *Biochem J* 1992; **286**: 173–177.
- [84] WANG JL, CORBETT JA, MARSHAL CA, MC DANIEL ML. Glucose-induced insulin secretion from purified β -cells. A role for modulation of Ca^{2+} influx by cAMP- and protein kinase C-dependent signal transduction pathways. *J Biol Chem* 1993; **268**: 7785–7791.
- [85] WANDEL S, BUCHS A, SCHURMANN A, SUMMERS S.A., POWERS AC, SHANAHAN MF, JOOST HG. Glucose transport activity and ligand binding (cytochalasin B, IAPS-forskolin)

- of chimeric constructs of GLUT 2 and GLUT 4 expressed in COS-7-cells. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1284**: 56–62.
- [86] WANDEL S, SCHURMANN A, BECKER W, SUMMERS S.A., SHANA HAN MF, JOOST HG. Mutation of two conserved arginine residues in the glucose transporter GLUT 4 suppresses transport activity, but not glucose-inhibitable binding of inhibitory ligands. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1995; **353**: 36–41.
- [87] WEINSTEIN SP, WATTS J, GRAVES PN, HABER RS. Stimulation of glucose transport by thyroid hormone in ARL 15 cells: increased abundance of glucose transporter protein and messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 1990; **126**: 1421–1429.
- [88] WERTHEIMER E, SASSEN S, CERASI E, BEN NY. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 belongs to the glucose-regulated protein family of stress-inducible proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 2525–2529.
- [89] WHITE MK, RALL TB, WEBER MJ. Differential regulation of glucose transporter isoforms by the *src* oncogene in chicken embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1991; **11**: 4448–4454.
- [90] WIDMANN C, BÜRKI E, DOLCI W, THORENS B. Signal transduction by the cloned glucagon-like peptide-1 receptor: comparison with signaling by the endogenous receptors of the β cell lines. *Mol Pharmacol* 1994; **45**: 1029–1035.
- [91] VANNUCCI SJ. Developmental expression of GLUT 1 and GLUT 3 glucose transporters in rat brain. *J Neurochem* 1994; **62**: 240–246.
- [92] VANNUCCI SJ, MAHER F, SIMPSON IA. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *GLIA* 1997; **21**: 2–21.
- [93] YADA T, ITOH K, NAKATA M. Glucagon-like peptide-1-(7-36) amide and a rise in cyclic adenosine 3,5-monophosphate increase cytosolic free Ca^{2+} in rat pancreatic β -cells by enhancing Ca^{2+} channel activity. *Endocrinology* 1993; **133**: 1685–1692.
- [94] YASUDA K, YAMADA Y, INAGAKIN, YANO N, OKAMOTO Y, TSUJIK, FUKUMOTO H, IMURA H, SEINO S, SEINO Y. Expression of GLUT 1 and GLUT 2 glucose transporter isoforms in rat islets of Langerhans and their regulation by glucose. *Diabetes* 1992; **41**: 76–81.

Redaktor prowadzący – Jacek Kuźnicki

Otrzymano: 02.06. 1998 r.

Przyjęto: 22.06. 1998 r.

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

PROGRAMOWANA ŚMIERĆ KOMÓREK (PCD) W ORGANIZMACH JEDNOKOMÓRKOWYCH I U BEZKRĘGOWCÓW

PROGRAMMED CELL DEATH (PCD) IN UNICELLULAR ORGANISMS AND INVERTEBRATES

Dorota WŁOGA

Zakład Cytofizjologii, Instytut Zoologii, Uniwersytet Warszawski

Streszczenie: W ciągu ostatnich kilku lat dokonał się znaczący postęp w zrozumieniu biochemicznego i genetycznego podłoża procesu programowanej śmierci komórek (PCD). Artykuł jest próbą przedstawienia obecnego stanu wiedzy na temat mechanizmów PCD u nicienia *Ceanorhabditis elegans* i muszki owocowej *Drosophila melanogaster*, przy jednoczesnym wskazaniu na elementy homologiczne z elementami PCD ssaków. Pewne aspekty programowanej śmierci komórek zostały również wykryte u organizmów jednokomórkowych, zarówno wolnożyjących (*Tetrahymena thermophila*) jak i form pasożytniczych (*Trypanosoma crusi* i *Trypanosoma brucei rhodesiense*) oraz w wielokomórkowej fazie rozwoju śluzowca *Dictyostelium discoideum*. W przypadku *Trypanosoma* w sposób programowany giną całe komórki, natomiast w przypadku *Tetrahymena*, w trakcie procesu płciowego tego orzęska, w sposób podobny do apoptozy eliminowane jest jedynie jedno z jąder (przedkoniugacyjny makronukleus).

Słowa kluczowe: programowana śmierć komórki, apoptoza, *Tetrahymena thermophila*, koniugacja, *C. elegans*, *Drosophila melanogaster*.

Summary: The great progress in understanding of the biochemical and genetical background of the programmed cell death (PCD) was achieved in last few years. This paper shows a current knowledge concerning the mechanisms of PCD in nematode *C. elegans* and fruit fly *Drosophila melanogaster* and simultaneously the homology between PCD in invertebrates and mammals. Some features of PCD were discovered also in free living (*Tetrahymena thermophila*) and parasitic (*Trypanosoma crusi* and *Trypanosoma brucei rhodesiense*) unicellular organisms and in multicellular stage of development in *Dictyostelium discoideum*. In the case of trypanosoma the whole cells die in programmed process. In the case of tetrahymena, during the sexual process of this ciliate, apoptotic-like degradation of only one nucleus (preconjugational macronucleus) is observed.

Key words: programmed cell death, apoptosis, *Tetrahymena thermophila*, conjugation, *C. elegans*, *Drosophila melanogaster*.

WSTĘP

Determinacja losów komórek w organizmach wielokomórkowych zależy od sygnałów docierających do komórek oraz od zdolności (kompetencji) komórek do odpowiedzi na określone sygnały. W ramach tej odpowiedzi komórki mogą się np. dzielić, różnicować lub ginąć śmiercią samobójczą. Wszystkie te procesy prowadzą, w efekcie, do zdumiewającej przemiany – powstania z jednej, zapłodnionej komórki jajowej wielokomórkowego organizmu, który jako całość jest zdolny do odpowiedzi na bodźce środowiska.

Programowana śmierć komórek jest jednym z procesów zaangażowanych w kształtowanie rozwijającego się organizmu. Początkowo terminem „programowana śmierć komórki” (PCD ang. *programmed cell death*) określano śmierć komórek indukowaną przez określone bodźce fizjologiczne podczas prawidłowego rozwoju organizmu. W miarę postępu badań nad genetycznymi aspektami PCD, terminem tym zaczęto określać każdą śmierć komórki sterowaną przez produkty własnych genów (czyli zaprogramowaną genetycznie), niezależnie od bodźca wywołującego te zmiany [72].

W 1972 roku zostały opisane charakterystyczne zmiany morfologiczne towarzyszące programowanej śmierci komórek ssaków, które określono terminem „apoptoza” [43, 103]. Zmiany apoptotyczne komórki dotyczą zarówno cytoplazmy, jak i jądra komórkowego. Cytoplazma komórek apoptotycznych ulega zagęszczeniu, a cała komórka traci kontakt z sąsiednimi komórkami i obkurcza się. Jednocześnie w jądrze komórkowym chromatyna ulega kondensacji i tworzy skupienia tuż pod błoną jądrową. W miarę zaawansowania procesu apoptozy od umierającej komórki odrywają się obłonione fragmenty, tzw. ciała apoptotyczne, zawierające organella komórkowe i fragmenty jądra. Ciała apoptotyczne są fagocytowane przez makrofagi lub komórki sąsiadujące. Biochemicznym wskaźnikiem apoptozy jest fragmentacja DNA na odcinki nukleosomalne i ich wielokrotności (charakterystyczny obraz drabinki apoptotycznej na żelu agarozowym) [102]. Później wykazano, że DNA jest cięte również na odcinki 30–50 kb i 200–300 kb [21, 94].

Od czasu opisanego zjawiska apoptozy, terminy: programowana śmierć komórki i apoptoza zaczęto używać wymiennie. Należy jednak podkreślić, że terminy te nie są równoznaczne. Apoptoza odnosi się do zespołu określonych cech morfologicznych towarzyszących śmierci komórek i nie każda programowana śmierć komórki ma cechy morfologiczne charakterystyczne dla apoptozy. Tak np. programowana śmierć komórek mięśniowych w czasie przeobrażenia u ćmy *Manduca sexta* nie ma cech morfologicznych charakterystycznych dla apoptozy i nie towarzyszy jej fragmentacja DNA [73].

Celem poniższego artykułu jest przedstawienie przykładów programowanej śmierci komórek w rozwoju niektórych bezkręgowców oraz zwrócenie uwagi na występowanie pewnych elementów programowanej śmierci u organizmów jedno-

komórkowych. Wśród bezkręgowców szerzej zostanie omówiona PCD u nicienia *Caenorhabditis elegans* i muszki owocowej *Drosophila melanogaster*, u których proces ten został poznany nie tylko pod względem morfologicznym i rozwojowym, ale również częściowo pod względem genetycznym. Z kolei, poznanie biochemicznego i genetycznego podłoża PCD u tych bezkręgowców, pozwala na pokazanie podobieństw między procesem programowanej śmierci komórek bezkręgowców i ssaków.

1. ORGANIZMY JEDNOKOMÓRKOWE

W ciągu ostatnich kilku lat pojawiły się prace mówiące o programowanej śmierci organizmów jednokomórkowych: orzęska *Tetrahymena thermophila* [18, 55] i pasożytniczych wiciowców *Trypanosoma cruzi* [4] i *Trypanosoma brucei rhodensiense* [97], przy czym we wszystkich tych przypadkach widać wyraźne podobieństwo do apoptozy obserwowanej u organizmów wielokomórkowych. W przypadku *Trypanosoma* programowaną śmiercią ginie cała komórka pasożyta, w przypadku *Tetrahymena* w sposób apoptotyczny degradowane jest jedynie jedno z jąder komórkowych.

U śluzowca *Dictyostelium discoideum* [16] PCD jest obserwowana w wielokomórkowej fazie rozwoju w komórkach budujących trzonek „owocnika” i nie ma charakteru śmierci apoptotycznej.

Tetrahymena thermophila – podobna do apoptotycznej degradacja jądra wegetatywnego podczas procesu płciowego

Tetrahymena thermophila jest wolno żyjącym orzęskiem. W środowisku bogatym w pokarm rozmnaża się przez wegetatywne podziały komórki. W przypadku braku pożywienia w środowisku (głodzenie) i w obecności odpowiedniego partnera, inicjowany jest proces płciowy (koniugacja), pozwalający na odnowienie materiału genetycznego. W końcowym etapie procesu płciowego dochodzi do degradacji przedkoniugacyjnego jądra wegetatywnego podobnej (patrz niżej) do degradacji jąder w komórkach apoptotycznych ssaków [18, 55].

Jak wszystkie orzęski *Tetrahymena* ma dwa rodzaje jąder: generatywny mikronukleus i wegetatywny makronukleus. Obecność mikro- i makronukleusa w komórce orzęska jest przykładem najprostszego zróżnicowania jąder na linię płciową i somatyczną [107].

Diploidalny mikronukleus, poza krótkim okresem we wczesnym etapie procesu płciowego, jest nieaktywny transkrypcyjnie. Natomiast makronukleus jest jądrem aktywnym transkrypcyjnie, w którym, w porównaniu do mikronukleusa, doszło

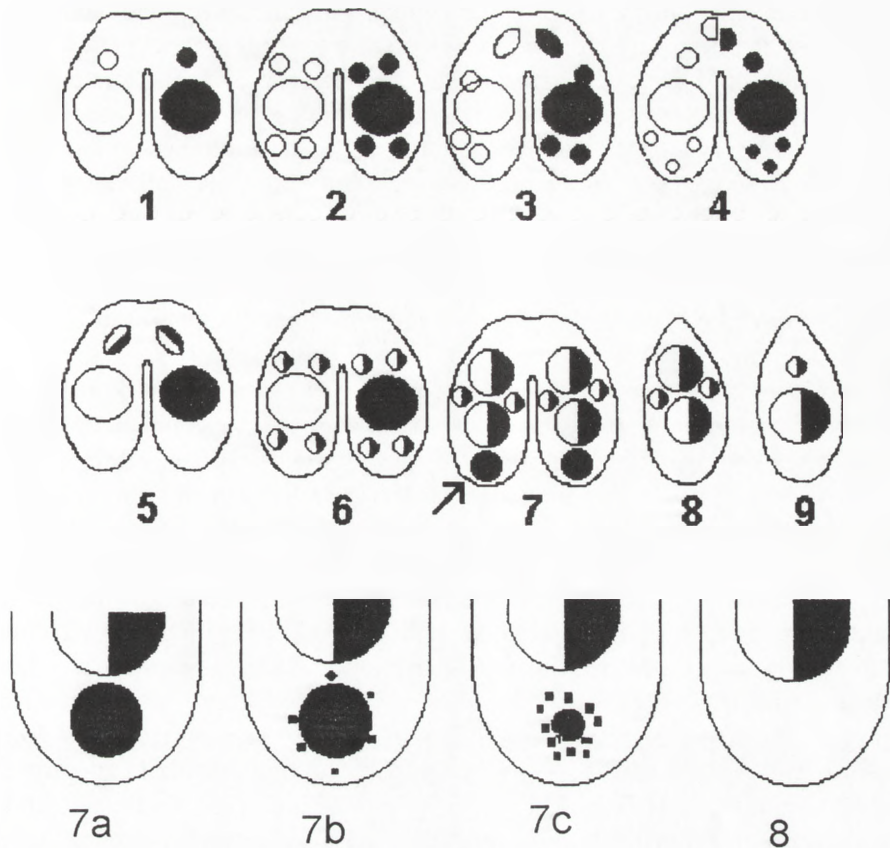
do wycięcia i zniszczenia pewnych sekwencji DNA, zwielokrotnienia (amplifikacji) pewnych odcinków DNA (średnio 45 razy), zwłaszcza genów rDNA oraz fragmentacji chromosomów na odcinki subchromosomalne (od 21 kbp do 1 500 kbp) i wymiany białek towarzyszących DNA [61]. Oba jądra, tj. mikro- i makronukleus, wywodzą się z tego samego jądra zygotycznego powstającego w komórce w trakcie koniugacji.

Przebieg procesu płciowego (koniugacji) u *T. thermophila*

W przebiegu procesu płciowego *Tetrahymena* na szczególną uwagę zasługuje fakt, że podziałom jąder (mikronukleusów) nie towarzyszy podział cytoplazmy (cytokineza), co prowadzi do powstania stadiów wielojądrowych, przy czym niektóre jądra dzielą się i różnicują, zaś inne podlegają degradacji. Tak różne zatem procesy, jak podziały, różnicowanie i programowana degradacja, które w organizmach wielokomórkowych mogą zachodzić jednocześnie, ale w różnych komórkach organizmu, u koniugujących orzęsków odbywają się w tym samym czasie w jednej komórce (na terenie wspólnej cytoplazmy). Świadczy to o istnieniu dobrze wyodrębnionych kompartmentów komórkowych i o bardzo ścisłej kontroli przebiegających procesów. Z drugiej strony, współwystępowanie tych procesów w jednej komórce umożliwia badanie wzajemnych wpływów i powiązań pomiędzy różnymi szlakami sygnałowymi w komórce oraz badanie kompetencji poszczególnych jąder do odpowiedzi na konkretny sygnał na danym etapie rozwoju.

Brak pożywienia w środowisku powoduje zmianę w metabolizmie pierwotniaków i przygotowanie do rozpoczęcia procesu płciowego (koniugacji). Komórki różnych typów płciowych *Tetrahymena* łączą się ze sobą przez częściową fuzję błon przedniej części koniugujących komórek. Powstałe połączenie (ang. *conjugation junction*) umożliwia nie tylko kontakt cytoplazm obu komórek (wymiana białek, RNA), ale także pozwala, na pewnym etapie koniugacji, na wymianę jąder między koniugującymi partnerami.

W każdej komórce powstałej pary (rys. 1) mikronukleus dzieli się mejotycznie dając cztery haploidalne jądra. Jedno z nich, położone w przedniej części komórki, dzieli się mitotycznie dając dwa przedjądrza: stacjonarne, czyli to które pozostaje w danej komórce koniugującej pary i migracyjne, czyli to, które zostanie przekazane drugiej komórce pary. Pozostałe trzy jądra postmejotyczne są przesuwane ku tyłowi komórki i degradowane. Po wzajemnej wymianie przedjądrzy, przedjądrze stacjonarne łączy się z otrzymanym od partnera przedjądrzem migracyjnym, tworząc jądro zygotyczne. Po dwóch podziałach mitotycznych zygoty powstają cztery jądra potomne, które w zależności od ich lokalizacji w cytoplazmie pozostają mikronukleusami lub różnicują się w nowe makronukleusy (wiąże się to z rearanżacją i amplifikacją DNA, wymianą białek jądrowych [61]). W czasie różnicowania nowych



RYSUNEK 1. Schemat przemian jądrowych podczas koniugacji orzęska *Tetrahymena thermophila*: 1 – para tuż po połączeniu komórek dwóch różnych typów płciowych, 2 – produkty mejozy, 3 – mitozę prezygotyczną, 4 – wymiana przedjądrzy pomiędzy koniugującymi komórkami, 5 – podział jądra zygotycznego (I podział postzygotyczny), 6 – produkty II podziału postzygotycznego, 7 – różnicowanie zawiązków nowych makronukleusów i kondensacja przedkoniugacyjnego makronukleusa, 8 – wczesny ekskoniugant, 9 – późny ekskoniugant; strzałka wskazuje przedkoniugacyjny makronukleus zlokalizowany w tyle komórki; poniżej pokazano tylny fragment koniugującej komórki i etapy resorpcji przedkoniugacyjnego makronukleusa (wg [50] zmodyfikowane)

makronukleusów, „stary” makronukleus, zwany dalej „przedkoniugacyjnym”, przesuwa się ku tyłowi komórki, gdzie ulega kondensacji i resorpcji [50].

Podobna do apoptozy degradacja przedkoniugacyjnego makronukleusa

Degradacja przedkoniugacyjnego makronukleusa odbywa się w sposób podobny do degradacji jąder komórek apoptotycznych w organizmach wielokomórkowych.

Chromatyna przedkoniugacyjnego makronukleusa ulega bardzo silnej kondensacji. Jednocześnie zanikają pory jądrowe i ciągłość zewnętrznej otoczki jądrowej z ER. W odróżnieniu od apoptozy u organizmów wielokomórkowych, skondensowany, stary makronukleus jest otaczany przez spłaszczone pęcherzyki (cysterny), a następnie zamykany w tzw. wodniczce autofagosomalnej (autofagosomia) i degradowany w jej wnętrzu [96]. W organizmach wielokomórkowych ciała apoptotyczne są otaczane przez komórki fagocytyjące. Być może odpowiednikiem tego procesu jest odizolowywanie degradowanego makronukleusa przez, opisany wyżej, system błon wewnętrznych, co pozwala na odizolowanie degradowanego jądra od reszty cytoplazmy, podobnie jak degradowane fragmenty komórki są izolowane od pozostałych komórek tkanki.

Przyżyciowy barwnik, oranż akrydyny, pozwala na odróżnienie komórek apoptotycznych od komórek żywych [1]. W końcowym etapie koniugacji, skondensowany, przedkoniugacyjny makronukleus jest barwiony przez oranż akrydyny podobnie jak jądra komórek apoptotycznych *Metazoa*. Jednocześnie, w tych samych koniugantach, mikronukleusy i nowe makronukleusy zabarwione są na kolor żółtozielony (jak jądra w żywych komórkach *Metazoa*) – Włoga, obserwacje niepublikowane. Różnice w barwieniu jąder *Tetrahymena* uzyskano również stosując mieszaninę oranżu akrydyny i barwnika Hoechst 33342 [56]. DNA wyizolowane ze skondensowanych, przedkoniugacyjnych makronukleusów dawało po elektroforezie na żelu agarozowym charakterystyczny dla apoptozy wzór drabinki apoptotycznej [18]. Również znakowanie metodą TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling*) potwierdziło apoptotyczny charakter degradacji przedkoniugacyjnego makronukleusa [55]. Zarówno etap kondensacji przedkoniugacyjnego makronukleusa, jak i sama resorpcja zależą od ekspresji pewnych genów. Podanie inhibitora transkrypcji – aktynomycyny D [55] lub translacji – CHX [42, 55] tuż po drugim podziale postzygotycznym, zatrzymuje kondensację i resorpcję starego makronukleusa.

Kontrola degradacji przedkoniugacyjnego makronukleusa

Jak się wydaje, kondensacja i resorpcja przedkoniugacyjnego makronukleusa jest kontrolowana zarówno przez sam przedkoniugacyjny makronukleus, jak i przez nowopowstałe zawiązki jąder wegetatywnych („nowe” makronukleusy). W przypadku tzw. koniugacji poronnej (koniugacja między komórką prawidłową a komórką z defektywnym mikronukleusem) i mutantów *bcd* (*broadened cortical domains*) koniugujące komórki nie rozwijają zawiązków nowych makronukleusów, wobec czego przedkoniugacyjny makronukleus nie jest degradowany i nadal pełni funkcje jądra wegetatywnego w ekskoniugantach [2, 15].

W prawidłowej koniugacji, w parach, które utworzyły nowe makronukleusy, stary, przedkoniugacyjny makronukleus jest zawsze przesuwany ku tyłowi komórki,

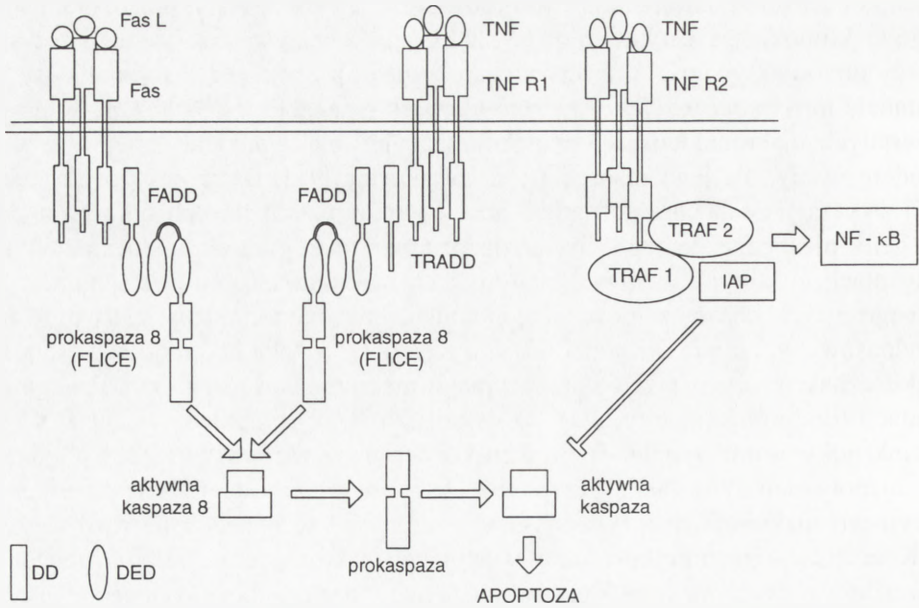
gdzie kondensuje i następnie jest resorbowany. Etap kondensacji przedkoniugacyjnego makronukleusa jest kontrolowany przez jego własny genom, ale etap resorpcji zależy już od aktywności transkrypcyjnej podjętej przez nowe makronukleusy. W mutancie *mra* (*macronuclear resorption arrest* – mutacja jest wyrażana w nowopowstałych makronukleusach) przedkoniugacyjny makronukleus jest prawidłowo kondensowany, ale jego resorpcja jest zatrzymana [41]. Badania cytogenetyczne [95] wykazały, że na chromosomie 3 oraz lewym ramieniu chromosomu 2 znajdują się geny niezbędne do tego, by zaszła resorpcja starego makronukleusa. W koniugantach, u których w zawiązkach nowych makronukleusów występuje delecja jednego z tych chromosomów, przedkoniugacyjny makronukleus jest wprawdzie kondensowany, ale nie dochodzi do jego resorpcji. W takich komórkach, pomimo braku oznak resorpcji przedkoniugacyjnego makronukleusa, jego DNA ulega degradacji (drabinka apoptotyczna), co świadczy o tym, że nukleazy tnące DNA na odcinki nukleosomalne działają w trakcie kondensacji makronukleusa [18]. Uzyskane do tej pory dane pozwalają przypuszczać, że dwa etapy degradacji przedkoniugacyjnego makronukleusa (kondensacja i resorpcja) są genetycznie rozdzielone.

Kondensacja i resorpcja przedkoniugacyjnego makronukleusa, pomimo obecności zawiązków nowych makronukleusów, może być znacząco opóźniona lub całkowicie zahamowana pod wpływem inhibitora kinaz serynowo-treoninowych, 6-DMAP. Sugeruje to, że zmiany w ufosforylowaniu białek (kontrolowane przez kinazę wrażliwą na 6-DMAP) są konieczne do tego, by nastąpiła kondensacja przedkoniugacyjnego makronukleusa (Włoga, dane niepublikowane).

Pojawiły się również doniesienia o śmierci komórek wegetatywnych *Tetrahymena* w hodowlach o zbyt niskiej gęstości komórek [12]. W tym przypadku brak jednak dowodów, że śmierć komórek odbywa się w sposób podobny do apoptozy.

U organizmów wielokomórkowych w sposób programowany usuwane są całe komórki. W przypadku *Tetrahymena*, w końcowym stadium procesu płciowego (które jest stadium wielojądrowym) dochodzi do programowanej degradacji przedkoniugacyjnego makronukleusa. Degradacja ta odbywa się w określonym regionie komórki, na tym samym etapie rozwoju (koniugacji) i ma cechy degradacji apoptotycznej (drabinka apoptotyczna i TUNEL). Podobnie jak apoptoza w organizmach wielokomórkowych, degradacja przedkoniugacyjnego makronukleusa jest procesem wieloetapowym, kontrolowanym przez szereg czynników. Te podobieństwa do apoptozy u organizmów wielokomórkowych świadczą o bardzo wczesnym pojawieniu się tego procesu w ewolucji oraz o konserwatywnym charakterze przynajmniej niektórych jego elementów [3].

U niektórych organizmów jednokomórkowych udało się odnaleźć elementy programowanej śmierci komórek charakterystyczne dla organizmów wielokomórkowych. Trudno jednak powiedzieć, czy proces ten jest kontrolowany przez te same geny, co u *Metazoa*, bowiem jak do tej pory nie znaleziono u organizmów jedno-



RYSUNEK 2. Indukcja apoptozy przez pobudzenie receptorów Fas i TNF (ang. *tumor necrosis factor*): związanie liganta Fas lub TNF powoduje aktywację receptorów (odpowiednio) Fas i TNF R1, aktywne receptory oddziałują domeną cytoplazmatyczną (tzw. domena śmierci, ang. *death domain* – DD) z podobną domeną śmierci białek adaptorowych – FADD (ang. *Fas-associating protein with death domain*) w przypadku receptora Fas i TRADD (ang. *TNF R1-associated death domain protein*) i FADD w przypadku receptora TNF; z kolei białka adaptorowe za pośrednictwem domeny DED (ang. *death effector domain*) oddziałuje z podobną domeną prokaspazy 8 (prokaspaza FLICE) (ang. *FADD – like ICE*); w wyniku tego oddziaływania prokaspaza zostaje aktywowana i jako taka może aktywować przez proteolizę inne kaspazy; aktywny receptor TNF R2 oddziałuje z białkami cytoplazmatycznymi TRAF1 i TRAF2, a za ich pośrednictwem z antyapoptotycznym białkiem IAP (wg [6, 57] zmodyfikowane)

komórkowych białek homologicznych do białek kluczowych dla PCD organizmów wielokomórkowych.

2. PCD U BEZKRĘGOWCÓW

Programowana śmierć komórek w trakcie rozwoju bezkręgowców była opisywana od bardzo dawna. Obserwowano, na przykład: śmierć komórek mięśniowych w trakcie rozwoju ćmy *Antheraea polyphemus* [74, 75] i konika polnego [5], śmierć komórek nerwowych u ćmy *Manduca sexta* [88] i pijawek [49, 83, 84], śmierć nieodróżnicowanych komórek we wczesnym rozwoju pijawek [79] oraz zanikanie nematocytów podczas regeneracji u *Hydra* [26].

Nicień *Caenorhabditis elegans* i muszka owocowa *Drosophila melanogaster* należą do tych bezkręgowców, u których programowana śmierć komórek została poznana nie tylko pod względem morfologicznym. Doskonale rozwinięte techniki badań biochemicznych i genetycznych pozwoliły na określenie niektórych elementów kontroli mechanizmów procesu programowanej śmierci w komórkach w trakcie rozwoju tych organizmów.

Caenorhabditis elegans

Nicień *Caenorhabditis elegans* jest wspaniałym modelem do badań nad programowaną śmiercią komórek. Jego przezroczyste ciało pozwala na przeżyciowe obserwacje komórek i śledzenie ich losów: podziałów, migracji, różnicowania i programowanej śmierci na każdym etapie rozwoju. Jednocześnie zaawansowane badania biochemiczne i genetyczne pozwalają na powiązanie obserwowanych zmian morfologicznych ze zmianami na poziomie molekularnym.

U formy hermafrodytycznej nicienia w trakcie rozwoju na skutek programowanej śmierci ginie 131 z 1090 komórek [44, 86, 87]. Wykazano, że w każdym osobniku eliminowane są te same komórki, na tym samym, ściśle określonym etapie rozwoju. Pod pewnymi względami morfologia ginących komórek nicienia jest zbliżona do morfologii komórek apoptotycznych. Komórki zaokrąglały się, obserwuje się początkowo kondensację cytoplazmy i agregację chromatyny w jądrze komórkowym, a następnie rozpad komórki na fragmenty otoczone błoną komórkową. Ginąca komórka jest bardzo wczesnie rozpoznawana przez komórki sąsiadujące, a po fagocytowaniu przeważnie szybko degradowana (nawet w ciągu 1 godz. od ostatniego podziału komórki macierzystej) [64, 87]. Obserwowano rozpoznanie komórki przeznaczonej w rozwoju do śmierci już na etapie późnej telofazy, przy czym komórka siostrzana (nieco większa) przeżywała i dalej się dzieliła [64]. To wczesne rozpoznanie komórki umierającej programowaną śmiercią powoduje, że fragmentacja ginącej komórki odbywa się często już we wnętrzu komórki fagocytującej. W trakcie PCD u *Caenorhabditis elegans* obserwuje się powstawanie autofagicznych wakuol oraz tworzenie okółków z błon wewnętrznych i błony komórkowej [64], czego nie stwierdzono w ssaczych komórkach apoptotycznych.

Do tej pory poznano 14 genów kontrolujących programowaną śmierć komórek w rozwoju *C. elegans*, które można podzielić na cztery grupy:

- 1) geny odpowiedzialne za podjęcie decyzji o dalszych losach komórki (przeżycie lub programowana śmierć),
- 2) geny zaangażowane w kontrolę wykonania (ang. *execution*) procesu programowanej śmierci,
- 3) geny kontrolujące fagocytozę,
- 4) geny kontrolujące degradację DNA, [19, 82].

Poniżej zostanie omówione działanie genów *ced-3*, *ced-4* i *ced-9* (ang. *cell death abnormal*), mających zasadnicze znaczenie dla etapu wykonawczego w procesie programowanej śmierci komórek nicienia.

CED-9 jest białkiem homologicznym do obecnego u ssaków białka Bcl-2 [67, 70] i powstrzymuje działanie białek CED-3 i CED-4 [35, 37]. CED-3 należy do rodziny proteaz cysteinowych [109] zwanych kaspazami [58, 60, 91]. CED-3, wraz z białkiem CED-4, aktywuje śmierć komórek w rozwoju nicienia [10, 11, 22, 34, 76, 108].

Białko CED-4

Przez wiele lat CED-4 stanowił prawdziwą zagadkę dla badaczy. Dopiero badania ostatniego roku rzuciły nieco światła na budowę i funkcję tego białka. Okazało się, przede wszystkim, że transkrypt *ced-4* może podlegać alternatywnemu dojrzeniu (ang. *splicing*). Tak więc, prócz od dawna znanej formy stymulującej śmierć komórki (CED-4S), określanej po prostu jako CED-4, istnieje również forma antyapoptyczna (CED-4L). Wykazano, że nadekspresja białka CED-4L hamuje programowaną śmierć komórek podczas prawidłowego rozwoju nicienia oraz hamuje śmierć komórek w przypadku inaktywacji genu *ced-9* [77].

Przez szereg lat trwały poszukiwania białka ssaków, homologicznego do białka CED-4 nicienia. Ostatnio zostały one uwieńczone sukcesem. Okazuje się, że ludzki gen *APAF-1* (ang. *apoptotic protease activating factor*) koduje białko, które ma odcinki homologiczne zarówno do białka CED-4, jak i CED-3. 85 początkowych aminokwasów na końcu N-terminalnym białka APAF-1 wykazuje 21% identyczności i 53% podobieństwa do N-końcowej prodomeny kaspazy CED-3, zaś kolejnych 320 aminokwasów ma 22% identyczności i 48% podobieństwa do białka CED-4 [111]. Ludzkie białko APAF-1 jest pierwszym poznanym białkiem ssaczym wykazującym tak znaczną homologię z białkiem CED-4 nicienia.

W tym samym czasie pojawiły się również doniesienia dwóch niezależnych grup badaczy o występowaniu na końcu N białka CED-4 motywu, specyficznego dla białek adaptorowych i oddziałujących z nimi kaspaz. Pierwsza grupa badaczy wykazała podobieństwo motywu znalezionego w CED-4 do tzw. domeny DED (*death effector domain*) białka adaptorowego FADD i kaspazy 8 (FLICE) [7] (białko adaptorowe FADD i kaspaza 8 uczestniczą w ścieżce sygnałowej biegnącej od receptora Fas – rys. 2) [57]. Druga grupa badaczy pokazała homologię tego samego regionu białka CED-4 do domeny CARD (ang. *Caspase Recruitment Domain*) obecnej w innym białku adaptorowym i w kaspazie 2 (ICH-1) [38]. W obu pracach porównywano sekwencję w tym samym rejonie białka CED-4, w podobnym zakresie aminokwasów (odpowiednio 17–87 i 2–89).

Być może, za pomocą opisanego wyżej motywu białko CED-4 mogłoby oddziaływać z kaspazą CED-3, tak jak oddziałują ze sobą białka adaptorowe i kaspazy w komórkach ssaczych.

W oddziaływanie CED-3/CED-4 zaangażowany jest również odcinek CED-4, zwany pętlą P. Pętla P ma, przypuszczalnie, właściwości ATP-azy i może dostarczać energii do oddziaływań pomiędzy CED-3 a CED-4 [10]. Jest to prawdopodobne, gdyż mutacja w rejonie pętli P, inaktywuje białko CED-4 [10, 39, 76].

Białko CED-3

Jak już wspomniano, CED-3 należy do rodziny kaspaz [109]. Mutacje w genie *ced-3*, podobnie jak w *ced-4*, hamują śmierć komórek, a więc powodują wzrost liczby komórek w organizmie nicienia. Przeżywające komórki ze zmutowanym, nieaktywnym genem *ced-3* lub *ced-4*, w odróżnieniu od swoich komórek siostrzanych, nie dzielą się, ale mogą się różnicować i przynajmniej niektóre z nich dostosowują się do pełnienia, choć w sposób niedoskonały, funkcji wynikających z ich lokalizacji w danym regionie ciała. W ten sposób zostaje zwiększona np. liczba komórek w układzie nerwowym [22]. Mutacje w genie *ced-3* lub *ced-4* nie są letalne. Zatem programowana śmierć 131 komórek nie jest konieczna do rozwoju nicienia. Jakie, wobec tego, korzyści ma organizm usuwając te komórki? Obserwowano, że mutanty nieco wolniej reagują na bodźce ze środowiska (chemotaksja), prawdopodobnie przez wydłużenie szlaku przekazywania sygnału nerwowego, spowodowane wstawieniem dodatkowych neuronów, a także wolniej rosną i nieco później dojrzewają płciowo [71]. Pozwoliło to na wysunięcie hipotezy o korzyściach behawioralnych wynikających ze śmierci komórek.

O ile mutacja inaktywująca geny *ced-3* lub *ced-4* powodowała wzrost liczby komórek w dorosłym organizmie nicienia, to nadekspresja genu *ced-3* lub *ced-4* wystarczy, by zabić część komórek, które normalnie przeżywają. Nadekspresja kaspazy CED-3 powoduje śmierć nie tylko komórek nicienia, ale również, sztucznie wprowadzona, może indukować apoptozę fibroblastów szczura [54].

By sprawdzić, czy produkty genów *ced-3* i *ced-4* działają niezależnie, czy też współdziałają ze sobą, mutantom z nieaktywnymi genami *ced-3* i *ced-4* wprowadzano odpowiednio tylko gen *ced-3* lub tylko gen *ced-4*. Okazało się, że ekspresja *ced-3* przy braku funkcjonalnego, endogennego *ced-4* może indukować PCD, zaś białko CED-4 wymaga działania kaspazy CED-3, by indukować śmierć komórek [78].

Białko CED-9

W odróżnieniu od CED-3 i CED-4 białko CED-9 jest inhibitorem programowanej śmierci u *C. elegans* [35]. Antyapoptotyczne właściwości CED-9 zawdzięcza swojej podwójnej aktywności [105]: jest substratem dla kaspazy CED-3 [105] oraz oddziałuje z CED-3 podobnie jak białko Bcl-2 (patrz niżej) [36, 37].

Działania białka CED-9 jako substratu dla kaspazy CED-3 jest możliwe dzięki obecności na N-terminalnym końcu białka CED-9 specyficznych sekwencji roz-

poznawanych przez CED-3. Jak się okazuje, delecja tych miejsc zmniejsza (o około 2/3) antyapoptotyczne właściwości białka CED-9. Drugi mechanizm działania, któremu CED-9 zawdzięcza swój antyapoptotyczny charakter, związany jest z właściwościami końca C-terminalnego CED-9. W regionie tym znajdują się domeny BH1 i BH2 (*bcl* homology domain) homologiczne do domen białka Bcl-2 [105]. Za pośrednictwem regionu C-terminalnego białko CED-9 oddziałuje z białkiem CED-4 [81].

Mutacja zwiększająca aktywność *ced-9* (*ced-9gf* – *gain of function*) [35, 36] podobnie jak nadekspresja *ced-9* [37] hamuje śmierć komórek, które w prawidłowym rozwoju powinny umrzeć. Porównywano mutantą *ced-9(gf)* z mutantami, które mają inaktywowane geny *ced-3* lub *ced-4*. Okazało się, że w obu przypadkach pojawia się podobna liczba dodatkowych komórek (podobna liczba komórek nie ulega programowanej śmierci).

Z kolei, mutacja inaktywująca działanie genu *ced-9* (*ced-9lf* – *loss of function*) powoduje uogólnienie PCD również na te komórki, które przeżywają w prawidłowym rozwoju nicienia. Spowodowana inaktywacją *ced-9* nadmierna umieralność komórek prowadzi do śmierci nicienia na wczesnym etapie rozwoju [35]. Działanie białka CED-9 może być częściowo zastąpione przez białko Bcl-2, co wskazuje na bardzo silnie konserwowaną ewolucyjnie funkcję tych białek. Nadekspresja *bcl-2* podobnie jak nadekspresja *ced-9* w dzikich komórkach *C. elegans* powodowała przeżywanie komórek, które w prawidłowym rozwoju nicienia powinny umrzeć. Z kolei, wprowadzenie genu *bcl-2* do komórek mutantą *ced-9lf* hamowało masową śmierć komórek mutantą [36, 37, 90].

Wirusowe białko P35 jako inhibitor PCD u *C. elegans*

Śmierć komórek mutantą *ced-9lf* może być również zahamowana przez ekspresję wirusowego białka P35 [85]. P35 hamuje apoptozę w różnych typach komórek [13]. Ponieważ P35 wstrzymuje śmierć komórek nicienia spowodowaną przez mutację inaktywującą gen *ced-9*, oznacza to, że P35 działa później w stosunku do białka CED-9 w szlaku kontroli PCD u nicienia. Jak wykazano, antyapoptotyczne właściwości białka P35 są związane z występowaniem w tym białku miejsc cięć specyficznych dla kaspazy CED-3 [104]. W badaniach *in vitro* wykazano, że kaspaza CED-3 łączy białko P35 pomiędzy aminokwasami: Asp 87 a Gly 88. *In vivo*, ekspresja *p35* chroni komórki przed programowaną śmiercią i prowadzi do powstania nicieni z dodatkowymi komórkami (jak w przypadku mutacji inaktywujących *ced-3* i *ced-4*). Natomiast ekspresja *p35* zmutowanego właśnie w miejscu specyficznie rozpoznawanym przez CED-3 (tzn. w 87-88 aminokwasie), nie hamuje już śmierci komórek.

W odróżnieniu od P35 inne białko wirusowe – Crm A, będące inhibitorem kaspazy-1 [63], nie hamuje działania CED-3, a w związku z tym ekspresja *crm A* nie chroni komórek nicienia przed śmiercią. Dopiero wbudowanie do genu *crm A* części genu *p35* kodującego miejsca specyficznego cięcia dla CED-3 spowodowało,

że produkt tak zmienionego genu *crm A* zyskiwał antyapoptotyczne właściwości [104].

Ekspresja *p35* znacznie wzmacnia antyapoptotyczne działanie specyficznego dla ssaków białka Bcl-2 w przypadku wprowadzenia go do komórek nicienia. Podobne skutki wywołuje jednoczesna ekspresja *bcl-2* i N-terminalnego (1–80) końca *ced-9* (P35 i N-koniec CED-9 zawierają miejsce cięć dla kaspazy CED-3) [105].

Współdziałanie proapoptotycznych białek CED-3 i CED-4 i antyapoptotyczne działanie CED-9

Jak już wspomniałam, CED-3 i CED-4 są białkami proapoptotycznymi i choć oba białka pobudzają śmierć komórek nicienia, to mechanizm ich działania jest różny. Nadekspresja *ced-3* indukuje apoptozę niezależnie od obecności endogennego białka CED-4, ale do tego, by nadekspresja *ced-4* spowodowała PCD, potrzebna jest jednoczesna obecność funkcjonalnej kaspazy CED-3 w komórce. Ochronna rola, jaką pełni białko CED-9 w komórce antagonizując działanie CED-3, jest zmniejszona w przypadku mutacji redukującej aktywność białka CED-4. Wynika stąd, że do pełnienia swej ochronnej funkcji w komórce białko CED-9 potrzebuje częściowo białka CED-4 [78].

Jak się wydaje, CED-4 jest białkiem adaptorowym i jako takie oddziałuje bezpośrednio z białkiem CED-9 [11, 39, 81, 101] i kaspazą CED-3 [11, 76], przy czym CED-9 i CED-3 mogą być związane przez CED-4 jednocześnie [11, 28, 34]. W ten sposób CED-4 pośredniczy w działaniu CED-9 i CED-3.

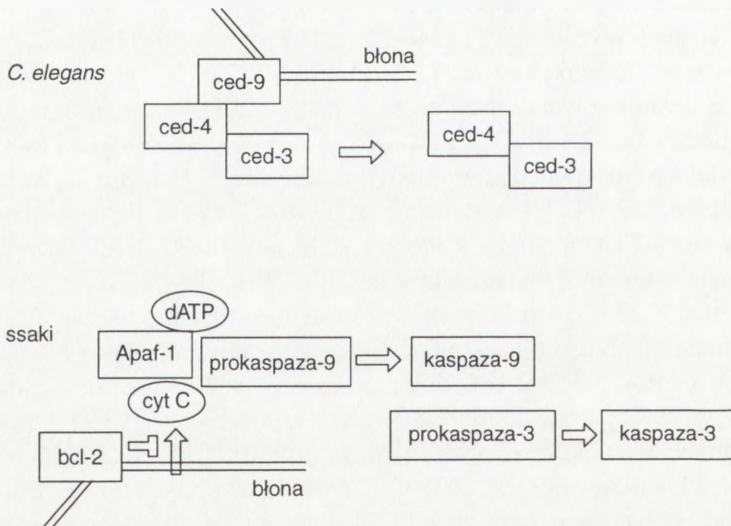
W badaniach prowadzonych *in vitro* wykazano, że mutacje w CED-9, uniemożliwiające oddziaływanie białka CED-9 z białkiem CED-4, redukują lub znoszą antyapoptotyczne właściwości CED-9. Zatem fizyczne oddziaływanie tych dwóch białek jest ważne dla funkcjonowania CED-9 [39, 81, 101]. Oddziaływanie CED-4 / CED-9 jest uwarunkowane obecnością w białku CED-9 domen homologicznych do domen białka Bcl-2 – BH1 i BH2 (*Bcl-2* homologous domain) [11, 81]. Dzięki obecności właśnie tych domen inne białko z rodziny białek Bcl: Bcl-xL precypitowało razem z białkiem CED-4. Alternatywna forma Bcl-x: Bcl-xS, nie mająca tych domen nie wiązała się z CED-4 [101]. Podobnie delecja z białka CED-9 domen BH1 i BH2 całkowicie uniemożliwiała wiązanie CED-9/ CED-4S [81].

W komórkach 293 T, do których wprowadzono plazmid z genem *ced-4* bądź *ced-9*, wykazano (mikroskopia konfokalna) różną subkomórkową lokalizację produktów tych genów. CED-9 był zlokalizowany w rejonie perinuklearnym i ER, zaś CED-4 w cytoplazmie komórki. Koekspresja CED-9 i CED-4 powodowała wyraźną zmianę w subkomórkowej lokalizacji białka CED-4 (przemieszczenie w rejon, gdzie zlokalizowany jest CED-9) [39, 101]. Wszystkie przytoczone powyżej wyniki badań świadczą o tym, że CED-9 pełni swoje antyapoptotyczne funkcje przez związanie z CED-4.

Z kolei, oddziaływanie między białkami CED-3 i CED-4 zależy, prawdopodobnie, od obecności w białku CED-3, dwóch rejonów: jednego w prodomecie kaspazy i drugiego w domenie katalitycznej kaspazy [11]. Białko CED-4 katalizuje samoaktywację CED-3, przy czym w proces ten zaangażowane są: prodomena białka CED-3 i prawdopodobnie pętla P w białku CED-4. Pętla P pełni, prawdopodobnie, funkcję ATP-azy. Delecja tego regionu w białku CED-4 uniemożliwia aktywację CED-3 przez CED-4.

Jednoczesna koekspresja CED-9 z CED-3 i CED-4 zapobiega aktywacji CED-3 przez CED-4 [10, 76]. Dodatkowych argumentów za funkcjonalnymi powiązaniem pomiędzy tymi białkami dostarczają badania genetyczne nad mutantami *C. elegans*. Okazuje się, że nadekspresja *ced-3* w komórkach nicienia powoduje znacznie większą śmiertelność komórek w przypadku pojedynczego mutantu *ced-9 (lf)* niż w przypadku podwójnej mutacji – *ced-9 (lf)/ced-4*. A więc obecność białka CED-4 wzmacnia proapoptotyczne działanie CED-3 [78].

Obecnie proponowany model oddziaływań (rys. 3) między trzema kluczowymi dla PCD *C. elegans* białkami zakłada, że zakotwiczone w błonach końcem hydrofobowym białko CED-9 jest związane z CED-3 za pośrednictwem CED-4. Kompleks ten pozostaje nieaktywny aż do czasu odebrania przez komórkę bodźca stymulującego PCD. Wówczas CED-4 stymuluje samoaktywację CED-3 (być może odłączenie CED-3/CED-4 od CED-9), w wyniku czego uruchamiany jest etap wykonawczy programu apoptozy [34]. Dodatkowo, CED-9 hamuje działanie kaspazy CED-3 dzięki posiadaniu miejsc cięć specyficznych dla CED-3 [105].



RYSUNEK 3. Udział CED-4 (*C. elegans*) i Apaf-1 (ssaki) w indukcji śmierci komórki (wg [34, 47] zmodyfikowane)

Częściowe poznanie mechanizmu kontrolującego programowaną śmierć komórek *C. elegans*, wykrycie białek homologicznych do białek komórek ssaków oraz wykazanie możliwości wzajemnej substytucji funkcji tych białek może pomóc w zrozumieniu pewnych mechanizmów kontrolujących apoptozę ssaków. Jednocześnie wskazuje to na wysoką konserwatywność procesu PCD w procesie ewolucji.

Drosophila melanogaster

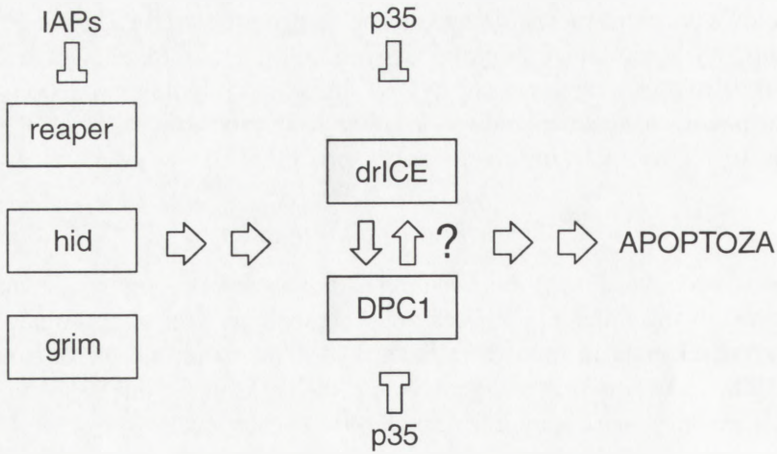
Muszka owocowa *Drosophila melanogaster* jest atrakcyjnym obiektem badań nad programowaną śmiercią komórek oraz rolą tego procesu w rozwoju organizmu. Śmierć komórek muszki owocowej może być indukowana np. przez zmiany hormonalne [40, 65, 66] czy przez oddziaływanie między komórkami [53]. W normalnym rozwoju zarodka śmierć komórek jest obserwowana począwszy od ~ 7 godz. po AEL (*after egg laying*) i obszar o szczególnie nasilonej apoptozie zmienia się dynamicznie wraz z przechodzeniem przez kolejne stadia embriogenezy [1]. PCD jest procesem powszechnie występującym również na późniejszych etapach rozwoju *Drosophila melanogaster*, np. w trakcie rozwoju oka [100], układu nerwowego [65] w dyskach imaginalnych skrzydeł [53], śliniankach i gruczołach jelita środkowego (*midgut glands*) [40]. Jednakże, w odróżnieniu od nicienia *C. elegans*, brak lub zmniejszenie liczby komórek, ulegających programowanej śmierci w trakcie embriogenezy, mogą być letalne [98].

Apoptotyczne cechy PCD u *D. melanogaster*

Śmierć komórek *Drosophila* ma cechy śmierci apoptotycznej. Świadczą o tym obserwowane zmiany w morfologii komórek [1, 24, 46, 59, 62, 100] różnice w barwieniu oranżem akrydyny [1] fragmentacja DNA na odcinki nukleosomowe, dające obraz drabinki apoptotycznej na żelu agarozowym [31, 80] oraz znakowanie umierających komórek metodą TUNEL [9, 30, 40, 46, 52, 53, 80, 98, 99].

Działanie białek Reaper, Grim i Hid

Badania genetyczne [98] wykazały, że obecność regionu 75C na jednym z chromosomów ma zasadnicze znaczenie dla realizacji programu apoptozy u *Drosophila melanogaster*. W regionie tym zlokalizowano trzy geny: *reaper* (*rpr*) [98], *hid* (*head involution defective*) [30] i *grim* [9] kodujące niezależnie działające produkty. Niewielki odcinek na N-terminalnym końcu białka Grim wykazuje znaczące podobieństwo do sekwencji w białku Reaper, nieco mniejsze zaś do białka Hid [9]. Ekspresja mRNA *grim*, podobnie jak ekspresja mRNA *reaper* i *hid* pokrywała się ze wzorem rozmieszczenia komórek apoptotycznych w zarodku [9, 30, 98] z pewnym wyjątkiem w przypadku ekspresji *hid* [30]. W przypadku wszystkich trzech genów, indukowana przez nie śmierć komórki może być zatrzymana przez koekspresję wirusowego genu *p35* [9, 30, 99, 110]. Wskazuje to, że wszystkie



RYSUNEK 4. Schemat powiązań pomiędzy białkami zaangażowanymi w przebieg apoptozy u *Drosophila* (wg [51] zmodyfikowane)

trzy białka, tj. Reaper, Grim i Hid, indukują śmierć komórek przez kaspazy oraz że w ścieżce sygnałowej kontrolującej PCD działają one powyżej kaspaz (rys. 4).

Wiecej światła na działanie białka Reaper rzuciły doświadczenia z białkiem Fas. Transdukcja sygnału apoptotycznego od receptora Fas [67] jest obecnie najlepiej poznanym szlakiem przekazywania sygnału do apoptozy w komórkach ssaków. Po pobudzeniu receptora (indukcja procesu) sygnał zostaje przekazany przez białka pośredniczące do efektorów (kaspazy i endonukleaza aktywowana przez kaspazę). W pobudzeniu białek pośredniczących (adaptorowych) uczestniczy cytoplazmatyczna domena receptora Fas (FasC), tzw. domena śmierci (ang. *death domain*) [57]. Fragment genu *fas* kodujący jedynie domenę cytoplazmatyczną (FasC), wprowadzony do komórek *Drosophila* może indukować apoptozę i fragmentację DNA. Równolegle prowadzone badania nad białkiem Reaper wykazały, że FasC i Reaper pobudzają różne kaspazy w komórkach *Drosophila*. W obu przypadkach śmierć komórek była hamowana przez białka wirusowe: P35 i Crm A, co wskazuje, że FasC wprowadzony do komórek owada pobudza działanie jego kaspaz. Śmierć komórek indukowana przez nadekspresję FasC była niezależna od białka Reaper [46]. W komórkach ssaczy Fas pobudza działanie kaspaz przez białka adaptorowe [57]. Być może w aktywacji apoptozy przez FasC w komórkach *Drosophila* pośredniczyły białka Hid lub Grim.

Jak wspomniałam, cytoplazmatyczna domena receptora Fas, tzw. domena śmierci, pośredniczy w przekazywaniu sygnału do białek adaptorowych i następnie kaspaz. Wykryta, ewentualna homologia białka Reaper do domeny śmierci białka Fas pozostaje jednak kwestią sporną. Pojawiły się doniesienia potwierdzające [14, 29], jak i przeczące działaniu domniemanej domeny śmierci białka Reaper [8, 93].

Wprowadzenie do ekstraktu z jaj *Xenopus* genu *reaper* indukowało aktywację kaspaz i zmiany apoptotyczne. W aktywacji kaspaz przez białko Reaper pośredniczył uwolniony z mitochondriów cytochrom C, z tym że białko Reaper nie było bezpośrednio odpowiedzialne za uwolnienie cytochromu C (udział endogennej makrocząsteczki cytoplazmatycznej). Z badań nad komórkami ssaczymi wiadomo, że uwalnianie cytochromu C z mitochondriów jest hamowane przez antyapoptotyczne białko Bcl-2 [45, 106]. W ekstraktach z jaj *Xenopus* Bcl-2 zatrzymywał zmiany apoptotyczne jedynie w przypadku niskiego poziomu syntezy białka Reaper [23].

Białka wirusowe i ich komórkowe homologii w kontroli PCD u *Drosophila*

Wirusowe białko P35, podobnie jak w przypadku PCD u *C. elegans*, hamuje apoptotyczną śmierć komórek *Drosophila* [9, 17, 24, 30, 32, 33, 40, 59, 92, 99, 110]. P35 nie jest jedynym białkiem wirusowym wstrzymującym proces apoptozy. Do wirusowych inhibitorów PCD należy również wspomniane już wcześniej białko Crm A oraz białka IAP (*inhibitor of apoptosis protein*). Zarówno białka IAP, jak i poznane niedawno ich komórkowe odpowiedniki – cIAP (*cell IAP*) hamują apoptotyczną śmierć komórek *Drosophila*. Do tej pory białka cIAP znaleziono u ssaków [20, 48, 68, 69 89] oraz u *Drosophila* (Diap 1 i Diap 2 (ang. *Drosophila IAP*) / Dih A (ang. *Drosophila IAP homolog A*) / Dilp (ang. *Drosophila IAP like protein*) [20, 32, 89]. Wirusowe białka IAP charakteryzują się występowaniem na końcu N-terminalnym dwukrotnie powtórnego motywu BIR (*baculovirus IAP repeat motifs*). W homologach komórkowych, z wyjątkiem Diap1[32], motyw ten jest powtórzony trzy razy [20, 32, 48, 68, 89]. Na końcu C-terminalnym białek IAP z wyjątkiem ludzkiego białka NAIP (ang. *neuronal apoptosis inhibitory protein*) [48] występuje domena wiążąca cynk (palec cynkowy – *RING finger motif*).

W komórkach ludzkich ekspresja c IAP zachodzi w wielu typach tkanek. Jak wykazano w badaniach nad komórkami ludzkimi (komórki embrionalne nerki 293), IAP asocjuje z białkami TRAF1 i TRAF2 (ang. *TNF receptor associated factor 1 and 2*) biorącymi udział w przekazywaniu sygnału od receptora TNF2 zaangażowanego w proliferację i przetrwanie komórek [68]. O ogromnym znaczeniu, jakie mają te białka, świadczy chociażby fakt, że częściowa delecja genu NAIP powoduje groźną chorobę SMA (ang. *spinal muscular atrophy*) [69].

U *Drosophila* ekspresja komórkowych białek IAP zachodzi we wszystkich komórkach ciała, ale z różnym nasileniem [20, 32]. Nadekspresja Diap1 i Diap2 hamuje programowaną śmierć komórek podczas rozwoju oka oraz śmierć komórek indukowaną przez nadekspresję genu *reaper* (całkowicie) i *hid* (umiarkowanie). Delecja C-terminalnego odcinka zawierającego domenę RING zwiększa antyapoptotyczne właściwości białka Diap. Być może domena RING jest negatywnym regulatorem aktywności białek z rodziny IAP [32]. Z kolei, domeny BIRs umożliwiają oddziaływanie białek IAP z innymi białkami. Za pośrednictwem domen BIRs, wi-

rusowe białka IAP oraz białko komórkowe *Drosophila* (Diap2) oddziałują fizycznie z białkiem Reaper i powstrzymują indukowaną przez białko Reaper apoptozę.

Ustalono, że białko Reaper pojawia się w komórkach około 80 min po indukcji apoptozy, a zanika po około 4 godz od indukcji. Koekspresja Reaper z Diap lub IAP nie tylko powstrzymywała apoptozę komórek, ale również spowodowała, że białko Reaper nie zanikało. Białka Reaper i Diap (lub IAP) mają odmienną lokalizację w komórce. Białko Reaper znajduje się w cytosolu, zaś Diap i IAP w rejonie jądra komórkowego. Podobnie jak w przypadku białek CED-4 i CED-9 nicienia *C. elegans*, koekspresja *reaper* z *diap* lub *iap* powodowała zmianę lokalizacji białka Reaper (z cytoplazmatycznej na okołojądrową zgodnie z perinuklearną lokalizacją białek Diap i IAP). Koekspresja *reaper* wraz z *p35* powstrzymywała wprawdzie zanikanie białka Reaper po 4 godz. od indukcji apoptozy, ale nie powodowała zmian w lokalizacji białka Reaper [92].

Kaspazy i ich działanie

Pobudzenie apoptozy w komórkach muszki owocowej pod wpływem działania cytoplazmatycznej domeny receptora Fas [46], doświadczenia z białkiem Reaper [46, 62] oraz blokowanie śmierci komórek przez białka wirusowe: P35 [24, 32, 99] i IAP [92] i komórkowe homologii cIAP [32, 40] sugerują działanie proteaz cysteinowych (kaspaz) na etapie egzekucji programowanej śmierci. W porównaniu z ssakami i nicieniem *C. elegans*, u *Drosophila* kaspazy zostały znalezione stosunkowo późno. Jak do tej pory znaleziono dwie kaspazy, są to: DCP-1 (od *Drosophila caspase -1*) [80] i drICE (od *Drosophila ICE*) [24]. Porównując sekwencję nowopoznanych kaspaz z innymi proteazami tej rodziny stwierdzono identyczność drICE rzędu 38,9% do ludzkiej kaspazy 3 i 30,4% do CED-3 [24] oraz identyczność DCP-1 rzędu 37% do kaspazy 3 i 28% do CED-3 [80]. DCP-1 i drICE są identyczne w 55%, zaś ich końce C-terminalne w 42% [25].

Analiza metodą *northern blot* wykazała wysoką ekspresję *drICE* między 2 a 6 godz. po AEL, tj. znacznie wcześniej niż pojawia się pierwsza fala programowanej śmierci komórek w rozwoju zarodka *Drosophila*. Wskazuje to na syntezę drICE jako nieaktywnego proenzymu [24].

Podobnie jak w kaspazie CED-3 koniec N-terminalny kaspazy drICE jest bogaty w serynę i glicynę, przy czym zarówno w CED-3, jak i w drICE sekwencja ta jest zlokalizowana przed kluczową dla aktywacji kaspaz asparaginą [24]. Nadekspresja *drICE* w linii komórkowej S2 *Drosophila* nie powoduje śmierci komórek, a jedynie uwrażliwia je na indukcję apoptozy pod wpływem CHX lub etopozydu. Sugeruje to, że kaspaza drICE jest obecna w komórkach w formie nieaktywnej i postranslacyjna aktywacja jest konieczna do indukcji apoptozy. W przeciwieństwie do drICE nadekspresja konstruktu drICE, pozbawionego N-terminalnego końca, pobudza apoptozę. Wskazuje to na rolę domeny N-terminalnej w hamowaniu proteolitycznych właściwości drICE. W wyniku ekspresji genu *reaper* oraz działania

etopozydu lub CHX, endogenna drICE jest cięta na fragmenty 21kd i 12 kd [24]. Badania *in vitro* wykazały specyficzność substratów kaspazy drICE w stosunku do białka wirusowego P35 oraz w stosunku do białka DmO (homolog laminy B u *Drosophila*), przy czym lamina była cięta mniej wydajnie [24, 25]. Jak wykazano, kaspaza drICE jest również zdolna do autoproteolizy [25].

Podobnie jak drICE, kaspaza DCP-1 jest produkowana jako forma nieaktywna. Obcięcie 33 początkowych aminokwasów (prodomena) aktywuje kaspazę DCP-1. Aktywna kaspaza tnie specyficznie białko PARP (polimeraza poli - ADP rybozy) i P35. Ekspresja DCP-1 w komórkach ssaczy lub ekstraktach z tych komórek, wystarcza do aktywacji zmian apoptotycznych i degradacji DNA (drabinka apoptotyczna) [80]. Świadczy to o wysokiej konserwatywności funkcji kaspaz w ewolucji.

Metodą hybrydyzacji *in situ* wykazano obecność mRNA *dcp-1* w zarodku *Drosophila* jeszcze przed włączeniem transkrypcji własnych genów zarodka. Wskazuje to, że obecny mRNA *dcp-1* jest produktem matczynym. Na tym etapie embriogenezy, *dcp-1* był rozmieszczony równomiernie w całym zarodku. Wraz z zaawansowaniem procesu embriogenezy obszar występowania mRNA *dcp-1* staje się coraz bardziej ograniczony. Uzyskane tą metodą wyniki dobrze korelują ze wzrastającą opornością zarodka na indukcję śmierci komórek pod wpływem promieniowania X i ekspresji reaper [80].

DCP-1 pełni ważną rolę rozwojową począwszy już od oogenezy [52]. Larwy mutantów *dcp-1* są pozbawione dysków imaginalnych i gonad oraz mają bardzo delikatne tchawki. W larwach, które przeżyły do późniejszych stadiów rozwoju, obserwowano powstawanie guzów czerniaczkowych (*melanotic tumors*) zlokalizowanych w różnych częściach ciała. Ich powstanie było spowodowane prawdopodobnie autoimmunoagresją przeciwko własnym komórkom. Brak dysków imaginalnych w larwach mutantów *dcp-1* wskazuje nie tylko na zaangażowanie tego genu w regulację śmierci komórek, ale także na jego znaczenie rozwojowe [80].

3. PODSUMOWANIE

Programowana śmierć komórek odgrywa istotną rolę w rozwoju organizmu i utrzymaniu homeostazy osobników dorosłych. Opisane powyżej przykłady PCD u bezkręgowców oraz u organizmów jednokomórkowych, świadczą nie tylko o powszechnym występowaniu tego procesu, ale również wskazują, że jest to proces wysoce konserwatywny w ewolucji. To z kolei świadczy o tym, jak PCD jest istotna dla życia organizmu jako całości. Niewątpliwie nasza wiedza na temat kontroli procesu apoptozy jest nadal niepełna. W przypadku organizmów jedno-

komórkowych nie znaleziono żadnego białka homologicznego do białek kontrolujących przebieg tego procesu u organizmów wielokomórkowych. W przypadku niczenia zagadką pozostaje, w jaki sposób sygnał zewnątrzkomórkowy „dociera” do kompleksu białek CED-9/ CED-4/ CED3. U *Drosophila* nie znaleziono białek homologicznych do białek z rodziny bcl. Również jest sprawą otwartą, czy wykryte u *Drosophila* białka homologiczne do Myc i Max [27] wzorem białek z komórek ssaków są zaangażowane w kontrolę programowanej śmierci komórek?

Jak się wydaje, przy obecnym stanie wiedzy, ciągle jest jeszcze więcej pytań niż odpowiedzi, a odkrycie każdego nowego ogniwa w łańcuchu kontroli procesu PCD nasuwa, głównie, kolejne pytania.

LITERATURA

- [1] ABRAMS JM, WHITE K, FESSLER LI, STELLER H. Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 1993; **117**: 29–43.
- [2] ALLEN SL. Genomic exclusion: a rapid means for inducing homozygous diploid lines in *Tetrahymena pyriformis*, Syngen 1. *Science* 1967; **155**: 575–577.
- [3] AMEISEN JC. The origin of programmed cell death. *Science* 1996; **272**: 1278–1279.
- [4] AMEISEN JC, IDZIOREK T, BILLAUT-MULOT O, LOYENS M, TISSIER JP, PONTIER A, OUAISSI A. Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma crusi*): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell Death Differnt* 1995; **2**: 285–300.
- [5] BALL EE, HO RK, GOODMAN CS. Muscle development in the grasshopper embryo. I. Muscles, nerves and apodemes in the metathoracic leg. *Dev Biol* 1985; **111**: 383–398.
- [6] BARINAGA M. Forging a path to cell death. *Science* 1996; **273**: 735–737.
- [7] BAUER MKA, WESSELBORG S, SCHULZE-OSTHOFF K. The *Caenorhabditis elegans* death protein ced-4 contains a motif with similarity ti the mammalian 'death effector domain'. *FEBS Lett* 1997; **402**: 256–258.
- [8] CHEN P, LEE P, OTTO L, ABRAMS J. Apoptotic activity of REAPER is distinct from signaling by the tumor necrosis factor receptor 1 death domain. *J Biol Chem* 1996; **271**: 25735–25737.
- [9] CHEN P, NORDSTROM W, GISH B, ABRAMS JM. Grim, a novel cell death gene in *Drosophila*. *Gen Dev* 1996; **10**: 1773–1782.
- [10] CHINNAIYAN AM, CHAUDHARY D, O'ROURKE K, KOONIN EV, DIXIT VM. Role of CED-4 in the activation of CED-3. *Nature* 1997; **388**: 728–729.
- [11] CHINNAIYAN AM, O'ROURKE K, LANE BR, DIXIT VM. Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science* 1997; **275**: 1122–1126.
- [12] CHRISTENSEN ST, WHEATLEY DN, RASMUSSEN MI, RASMUSSEN L. Mechanisms controlling death, survival and proliferation in a model unicellular eukaryote *Tetrahymena thermophila*. *Cell Death Differnt* 1995; **2**: 301–308.
- [13] CLEM RJ, FECHHEIMER M, MILLER LK. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science* 1991; **254**: 1388–1390.
- [14] CLEVELANDJL, IHLEJN. Contenders in FasL/TNF death signaling. *Cell* 1995; **81**: 479–482.
- [15] COLE ES. Conjugal blocks in *Tetrahymena* pattern mutants and their cytoplasmic rescue. *Dev Biol* 1991; **148**: 403–419.

- [16] CORNILLON S, FOA C, DAVOUST J, BUONAVISTA N, GROSS JD, GOLSTEIN P. Programmed cell death in *Dictyostelium*. *J Cell Sci* 1994; **107**: 2691–2704.
- [17] DAVIDSON FF, STELLER H. Blocking apoptosis prevents blindness in *Drosophila* retinal degeneration mutants. *Nature* 1998; **391**: 587–591.
- [18] DAVIS MC, WARD JG, HERRCK G, ALLIS CD. Programmed nuclear death: apoptotic-like degradation of specific nuclei in conjugating *Tetrahymena*. *Dev Biol* 1992; **154**: 419–432.
- [19] DRISCOLL M. Cell death in *C. elegans*: molecular insights into mechanisms conserved between nematodes and mammals. *Brain Pathology* 1996; **6**: 411–425.
- [20] DUCKETT CS, NAVA VE, GEDRICH RW, CLEM RJ, VAN DONGEN JL, GILFILLAN MC, SHIELS H, HARDWICK JM, THOMPSON CB. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J* 1996; **15**: 2685–2694.
- [21] DUSENBURY CE, DAVIS MA, LAWRENCE TS, MAYBAUM TS. Induction of megabase DNA fragments by 5-fluorodeoxyuridine in human colorectal tumor (HT29) cells. *Mol Pharmacol* 1991; **39**: 285–289.
- [22] ELLIS HM, HORVITZ HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 1986; **44**: 817–829.
- [23] EVANS EK, KUWANA T, STRUM SL, SMITH JJ, NEWMAYER DD, KORNBLUTH S. Reaper-induced apoptosis in a vertebrate system. *EMBO J*. 1997; **16**: 7372–7381.
- [24] FRASER AG, EVAN GI. Identification of a *Drosophila melanogaster* ICE/CED-3-related protease, drICE. *EMBO J* 1997; **16**: 2805–2813.
- [25] FRASER AG, MCCARTHY NJ, EVAN GI. drICE is an essential caspase required for apoptotic activity in *Drosophila* cells. *EMBO J* 1997; **16**: 6192–6199.
- [26] FUJISAWA T, DAVID CN. Loss of differentiating nematocytes induced by regeneration and wound healing in *Hydra*. *J Cell Sc* 1984; **68**: 243–255.
- [27] GALLANT P, SHIHO Y, CHENG PF, PARKHURST SM, EISENMAN RN. Myc and max homologs in *Drosophila*. *Science* 1996; **274**: 1523–1527.
- [28] GOLSTEIN P. Controlling Cell Death. *Science* 1997; **275**: 1081–1082.
- [29] GOLSTEIN P, MARGUET D, DEPRAETERE V. Homology between Reaper and the Cell Death Domains of Fas and TNFR1. *Cell* 1995; **81**: 185–186.
- [30] GRETHER ME, ABRAMS JM, AGAPITE J, WHITE K, STELLER H. The head involution defective gene of *Drosophila melanogaster* functions in programmed cell death. *Gen Dev* 1995; **9**: 1694–1708.
- [31] HARVEY AJ, BIDWAI AP, MILLER LK. Doom, a product of the *Drosophila* mod (mdg4) gene, induces apoptosis and binds to baculovirus inhibitor-of-apoptosis protein. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 2835–2843.
- [32] HAY BA, WASSERMAN DA, RUBIN GM. *Drosophila* homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death. *Cell* 1995; **83**: 1253–1262.
- [33] HAY BA, WOLFF T, RUBIN GM. Expression of baculovirus p35 prevents cell death in *Drosophila*. *Development* 1994; **120**: 2121–2129.
- [34] HENGARTNER MO. CED-4 is a stranger no more. *Nature* 1997; **388**: 714–715.
- [35] HENGARTNER MO, ELLIS RE, HORVITZ HR. *Caenorhabditis elegans* gene ced-9 protects cells from programmed cell death. *Nature* 1992; **356**: 494–499.
- [36] HENGARTNER MO, HORVITZ HR. Activation of *C. elegans* cell death protein CED-9 by an amino-acid substitution in a domain conserved in Bcl-2. *Nature* 1994; **369**: 318–320.
- [37] HENGARTNER MO, HORVITZ HR. *C. elegans* cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell* 1994; **76**: 665–676.
- [38] IRMLER M, HOFMANN k, VAUX D, TSCHOPP J. Direct physical interaction between the *Caenorhabditis elegans* „death proteins” CED-3 and CED-4. *FEBS Lett* 1997; **406**: 189–190.

- [39] JAMES C, GSCHMEISSNER S, FRASER A, EVAN GI. CED-4 induces chromatin condensation in *Schizosaccharomyces pombe* and is inhibited by direct physical association with CED-9. *Curr Biol* 1997; **7**: 246–252.
- [40] JIANG C, BAEHRECKE EH, THUMMEL CS. Steroid regulated programmed cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Development* 1997; **124**: 4673–4683.
- [41] KACZANOWSKI A. Mutation affecting cell separation and macronuclear resorption during conjugation in *Tetrahymena thermophila*: early expression of the zygotic genotype. *Dev Genetics* 1992; **13**: 58–65.
- [42] KACZANOWSKI A, KACZANOWSKA J. Induction of blocks in nuclear divisions and overcondensation of meiotic chromosomes with cycloheximide during conjugation of *Tetrahymena thermophila*. *J Euk Microbiol* 1996; **43**: 380–388.
- [43] KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; **26**: 239–257.
- [44] KIMBLE J, HIRSH D. The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 1979; **70**: 396–417.
- [45] KLUCK RM, BOSSY-WETZEL E, GREEN DR, NEWMYER DD. The release of cytochrome C from mitochondria: a primary site for bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; **275**: 1132–1136.
- [46] KONDO T, YOKOKURA T, NAGATA S. Activation of distinct caspase-like proteases by Fas and reaper in *Drosophila* cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 11951–11956.
- [47] LI P, NIJHAWAN D, BUDIARDJO I, SRINIVASULA SM, AHMAD M, ALNEMRI ES, WANG X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/ caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; **91**: 479–489.
- [48] LISTON P, ROY N, TAMAI K, LEFEBVRE C, BAIRD S, CHERTON-HORVAT G, FARAHANI R, MCLEAN M, IKEDA JE, MACKENZIE A, KORNELUK RG. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 1996; **379**: 349–353.
- [49] MACAGNO ER, STEWART RR. Cell death during gangliogenesis in the leech: competition leading to the death of PMS neurons has both random and nonrandom components. *J Neurosci* 1987; **7**: 1911–1918.
- [50] MARTINDALE DW, ALLIS CD, BRUNS PJ. Conjugation in *Tetrahymena thermophila*. A temporal analysis of cytological stages. *Exp Cell Res* 1982; **140**: 227–236.
- [51] MCCALL K, STELLER H. Facing death in the fly: genetic analysis of apoptosis in *Drosophila*. *TIG* 1997; **13**: 222–226.
- [52] MCCALL K, STELLER H. Requirement for DCP-1 caspase during *Drosophila* oogenesis. *Science* 1998; **279**: 230–234.
- [53] MILAN M, CAMPUZANO S, GARCIA-BELLIDO A. Developmental parameters of cell death in the wing disc of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 5691–5696.
- [54] MIURA M, ZHU H, ROTELLO R, HARTWIEG EA, YUAN J. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 β -converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene ced-3. *Cell* 1993; **75**: 653–660.
- [55] MPOKE SS, WOLFE J. DNA digestion and chromatin condensation during nuclear death in *Tetrahymena*. *Exp Cell Res* 1996; **225**: 357–365.
- [56] MPOKE SS, WOLFE J. Differential staining of apoptotic nuclei in living cells: application to macronuclear elimination in *Tetrahymena*. *J Histochem Cytochem* 1997; **45**: 675–683.
- [57] NAGATA S. Apoptosis: telling cells their time is up. *Curr Biol* 1996; **6**: 1241–1243.
- [58] NICHOLSON DW, THORNBERRY NA. Caspases: killer proteases. *TIBS* 1997; **22**: 299–306.
- [59] NORDSTROM W, CHEN P, STELLER H, ABRAMS JM. Activation of the reaper gene during ectopic cell killing in *Drosophila*. *Dev Biol* 1996; **180**: 213–226.
- [60] PORTER AG, NG P, JANICKE RU. Death substrates come alive. *Bioessays* 1997; **19**: 501–507.

- [61] PRESCOTT DM. The DNA of ciliated protozoa. *Microbiol Rev* 1994; **58**: 233–267.
- [62] PRONK GJ, RAMER K, AMIRI P, WILLIAMS LT. Requirement of an ICE-like protease for induction of apoptosis and ceramide generation by REAPER. *Science* 1996; **271**: 808–810.
- [63] RAY CA, BLACK RA, KRONHEIM SR, GREENSTREET TA, SLEATH PR, SALVESEN GS, PICKUP DJ. Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1B converting enzyme. *Cell* 1992; **69**: 597–604.
- [64] ROBERTSON AMG, THOMSON JN. Morphology of programmed cell death in the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans* larvae. *J Embryol Exp Morph* 1982; **67**: 89–100.
- [65] ROBINOW S, DRAIZEN TA, TRUMAN JW. Genes that induce apoptosis: transcriptional regulation in identified, doomed neurons of the *Drosophila* CNS. *Dev Biol* 1997; **190**: 206–213.
- [66] ROBINOW S, TALPOT WS, HOGNESS DS, TRUMAN JW. Programmed cell death in the *Drosophila* CNS is ecdysone-regulated and coupled with a specific ecdysone receptor isoform. *Development* 1993; **119**: 1251–1259.
- [67] ROLIŃSKI J. Apoptoza w układzie odpornościowym – rola Fas, bcl-2 i interleukiny 2. *Post Biol Kom* 1997; **24**: 561–575.
- [68] ROTHE M, PAN MG, HENZEL WJ, AYRES TM, GOEDEL DV. The TNFR2- TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 1995; **83**: 1243–1252.
- [69] ROY N, MAHADEVAN M, MCLEAN M, SHUTLER G, YARAGHI Z, FARAHANI R, BAIRD S, BESNER - JOHNSTON A, LEFEBVRE C, KANG X, SALIH M, AUBRY H, TAMAI K, GUAN X, IOANNOU P, CRAWFORD TO, JONG PJ, SURH L, IKEDAJE, KORNELUK RG, MACKENZIE A. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 1995; **80**: 167–178.
- [70] RUPNIEWSKA M, ROŻYŃKOWA D, KUROWSKA M. Rodzina genów bcl-2. *Post Biol Kom* 1997; **24**: 33–49.
- [71] SANDERS EJ, WRIDE MA. Programmed cell death in development. *Int Rev Cytology* 1995; **163**: 105–173.
- [72] SCHWARTZ LM, OSBORNE BA. Programmed cell death, apoptosis and killer genes. *Immunology Today* 1993; **14**: 582–590.
- [73] SCHWARTZ LM, SMITH SW, JONES MEE, OSBORNE BA. Do all programmed cell death occur via apoptosis? *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 980–984.
- [74] SCHWARTZ LM, TRUMAN JW. Peptide and Steroid regulation of muscle degeneration in an insect. *Science* 1982; **215**: 1420–1421.
- [75] SCHWARTZ LM, TRUMAN JW. Cyclic GMP may serve as a second messenger in peptide-induced muscle degeneration in an insect. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 6718–6722
- [76] SESHAGIRI S, MILLER LK. *Caenorhabditis elegans* CED-4 stimulates CED-3 processing and CED-3-induced apoptosis. *Curr Biol* 1997; **7**: 455–460.
- [77] SHAHAM S, HORVITZ HR. An alternative spliced *C. elegans* ced-4 RNA encodes a novel cell death inhibitor. *Cell* 1996; **86**: 201–208.
- [78] SHAHAM S, HORVITZ HR. Developing *Caenorhabditis elegans* neurons may contain both cell-death protective and killer activities. *Gen Dev* 1996; **10**: 578–591.
- [79] SHANKLAND M. Positional determination of supernumerary blast cell death in the leech embryo. *Nature* 1984; **307**: 541–543.
- [80] SONG Z, MCCALL K, STELLER H. DCP-1, a *Drosophila* cell death protease essential for development. *Science* 1997; **275**: 536–540.
- [81] SPECTOR MS, DESNOYERS S, HOEPPNER DJ, HENGARTNER MO. Interaction between the *C. elegans* cell-death regulators CED-9 and CED-4. *Nature* 1997; **385**: 653–656.
- [82] STELLER H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995; **267**: 1445–1449.
- [83] STEWART RR, GAO WQ, PEINADO A, ZIPSER B, MACAGNO R. Cell death during gangliogenesis in the leech: bipolar cells appear and then degenerate in all ganglia. *J Neurosci* 1987; **7**: 1919–1927.

- [84] STUART DK, BLAIR SS, WEISBLAT DA. Cell lineage, cell death and the developmental origin of identified serotonin - and dopamine - containing neurons in the leech. *J Neurosci* 1987; **7**: 1107–1122.
- [85] SUGIMOTO A, FRIESEN PD, ROTHMAN JH. Baculovirus p35 prevents developmentally programmed cell death and rescue a ced-9 mutant in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* 1994; **13**: 2023–2028.
- [86] SULSTON JE, HORVITZ HR. Post-embryonic cell lineages of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 1977; **56**: 110–156.
- [87] SULSTON JE, SCHIERENBERG E, WHITE JG, THOMPSON JN. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 1983; **100**: 64–119.
- [88] TRUMAN JW. Programmed cell death in the nervous system of an adult insect. *J Comparative Neurology* 1983; **216**: 445–452.
- [89] UREN AG, PAKUSCH M, HAWKINS CJ, PULS KL, VAUX DL. Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 4974–4978.
- [90] VAUX DL, WEISSMAN IL, KIM SK. Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* 1992; **258**: 1955–1957.
- [91] VILLA P, KAUFMANN SH, EARNSHAW WC. Caspases and caspase inhibitors. *TIBS* 1997; **22**: 388–393.
- [92] VUCIC D, KAISER W, HARVEY AJ, MILLER LK. Inhibition of Reaper- induced apoptosis by interaction with inhibitor of apoptosis proteins (IAPs). *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 10183–10188.
- [93] VUCIC D, SESHAGIRI S, MILLER LK. Characterization of reaper- and FADD-induced apoptosis in a Lepidopteran cell line. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 667–676.
- [94] WALKER PR, SMITH C, YOUNG T, LEBLANC J, WHITFIELD JF, SIKORSKA M. Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. *Cancer Res* 1991; **51**: 1078–1085.
- [95] WARD JG, DAVIS MC, ALLIS CD, HERRICK G. Effects of nullisomic chromosome deficiencies on conjugation events in *Tetrahymena thermophila*: insufficiency of the parental macronucleus to direct postzygotic development. *Genetics* 1995; **140**: 989–1005.
- [96] WEISKE-BENNER A, ECKERT WA. Differentiation of nuclear structure during the sexual cycle in *Tetrahymena thermophila*. Degradation and autolysis of macro- and micronuclei. *Differentiation* 1987; **34**: 1–12.
- [97] WELBURN SC, DALE C, ELLIS D, BEECROFT R, PEARSON TW. Apoptosis in procyclic *Trypanosoma brucei rhodesiense* in vitro. *Cell Death Differ* 1996; **3**: 229–236.
- [98] WHITE K, GREYER ME, ABRAMS JM, YOUNG L, FARRELL K, STELLER H. Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science* 1994; **264**: 677–683.
- [99] WHITE K, TAHAOGLU E, STELLER H. Cell killing by the *Drosophila* gene reaper. *Science* 1996; **271**: 805–807.
- [100] WOLFF T, READY DF. Cell death in normal and rough eye mutants of *Drosophila*. *Development* 1991; **113**: 825–839.
- [101] WU D, WALLEN HD, NUNEZ G. Interaction and regulation of subcellular localization of CED-4 by CED-9. *Science* 1997; **275**: 1126–1129.
- [102] WYLLIE AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980; **284**: 555–556.
- [103] WYLLIE AH, KERR JFR, CURRIE AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; **68**: 251–305.
- [104] XUE D, HORVITZ HR. Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell-death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. *Nature* 1995; **377**: 248–251.
- [105] XUE D, HORVITZ R. *Caenorhabditis elegans* CED-9 protein is a bifunctional cell-death inhibitor. *Nature* 1997; **390**: 305–308.

- [106] YANG J, LIU X, BHALLA K, KIM CN, IBRADO AM, CAI J, PENG TL, JONES DP, WANG X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; **275**: 1129–1132.
- [107] YAO MC. Programmed DNA deletions in *Tetrahymena*: mechanisms and implications. *TIG* 1996; **12**: 26–30.
- [108] YUAN J, HORVITZ HR. The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development* 1992; **116**: 309–320.
- [109] YUAN J, SHAHAM S, LEDOUX S, ELLIS HM, HORVITZ HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1B-converting enzyme. *Cell* 1993; **75**: 641–652.
- [110] ZHOU L, SCHNITZLER A, AGAPITE J, SCHWARTZ LM, STELLER H, NAMBU JR. Cooperative functions of the reaper and head involution defective genes in the programmed cell death of *Drosophila* central nervous system midline cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 5131–5136.
- [111] ZOU H, HENZEL WJ, LIU X, LUTSCHG A, WANG X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997; **90**: 405–413.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 20.05. 1998 r.

Przyjęto: 20.06. 1998 r.

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

KOMUNIKATY

IV KONFERENCJA POLSKIEGO TOWARZYSTWA CYTOMETRII PRZEPEŁYWOWEJ

Konferencja nt. „Cytometria przepływową w badaniach naukowych i diagnostyce” 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, prosimy zatem o oddzielne zaznaczenie zamiaru udziału w tej części Konferencji. Osoby zainteresowane udziałem prosimy o nadsyłanie zgłoszeń uczestnictwa w terminie do 30 kwietnia 1998 roku na adres Komitetu Organizacyjnego:

Dr hab. **Jacek Bigda**
Sekretarz Komitetu Organizacyjnego
Katedra Histologii i Immunologii AM Gdańsk
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk
tel/fax 058-3023673
e-mail: jjbigd@amed01.amg.gda.pl

Prof. dr hab. **Andrzej Myśliwski**
Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego
E-mail: anmys@amed01.amg.gda.pl

.....
Poniższy formularz proszę odciąć i przesać na adres Komitetu Organizacyjnego

Zgłoszenie uczestnictwa
w IV Konferencji Polskiego Towarzystwa Cytometrii Przepływowej

Imię i nazwisko

Adres

Telefon Fax

E-mail

Jestem zainteresowana/y/ udziałem w warsztatach metodycznych
(właściwe zakreślić):

tak / nie

.....

podpis

XXVIII KONFERENCJA SZKOLENIOWA Z ZAKRESU BIOLOGII KOMÓRKI

Uprzejmie zawiadamiamy, że Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Histo- i Cytochemików, Redakcja Postępów Biologii Komórki oraz prof. dr hab. L. Kaczmarek z Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego organizują doroczną konferencję szkoleniową na temat:

„NEURODEGENERACJA”,

która odbędzie się w dniu 5 grudnia 1998 r. (sobota) w Warszawie, w sali wykładowej im. L. Paszkiewicza w Anatomicum Akademii Medycznej przy ul. Chałubińskiego 5.

Początek obrad o godz. 10.00. Opłata za uczestnictwo 5 zł płatna na miejscu obrad. W ramach opłaty uczestnicy otrzymają suplement 11/98 PBK zawierający materiały Konferencji.

PROGRAM:

Maria Barcikowska (Instytut-Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa):

Choroba Alzheimera jako przykład schorzenia neurodegeneracyjnego

Bożena Kamińska (Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa): *Biologia molekularna apoptozy*

Jacek Kuźnicki (Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa): *Wapń a apoptoza*

Ewa M. Urbańska, Waldemar A. Turski (Katedra i Zakład Farmakologii, Akademia Medyczna, Lublin, Zakład Toksykologii Klinicznej, Instytutu Medycyny Wsi, Lublin): *Toksyny mitochondrialne – neurodegeneracja i drgawki*

Izabela Figiel (Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa): *Apoptoza neuronów w hodowli in vitro*

Leszek Kaczmarek – *Podsumowanie*

Uczestnikom Konferencji zostaną udostępnione po niższej cenie zeszyty PBK.

VII OGÓLNOPOLSKA KONFERENCJA BIOLOGII KOMÓRKI THE VIIITH 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 Przestalski.

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 Przestalski 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.

DRUGA MIĘDZYNARODOWA SZKOŁA CYTOMETRII

W dniach 07–12 czerwca 1998 r. odbyła się w Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie Druga Międzynarodowa Szkoła Cytometrii. Została zorganizowana przez Laboratorium Mikroskopii Konfokalnej i Analizy Obrazu w Instytucie Biologii Molekularnej UJ przy współudziale International Society for Analytical Cytology (ISAC), Polskiego Towarzystwa Cytometrii, Sieci Biologii Molekularnej i Komórkowej UNESCO/PAN i Komitetu Cytobiologii PAN. Zajęcia prowadziło 14 wykładowców i wzięło w nich udział 44 uczestników z Polski oraz Hiszpanii, Holandii, Republiki Czeskiej i USA.

Wygłoszone zostały następujące *wykłady*:

1. The Physics of Flow Cytometry – *J. V. Watson* (Addenbrooke's Hospital, Cambridge, UK)
2. Confocal microscopy – principles and instrumentation – *F. Brakenhoff* (University of Amsterdam, Institute for Molecular Cell Biology, Amsterdam, The Netherlands)
3. Fluorescent probes for flow and image cytometry – *J. W. Dobrucki* (Uniwersytet Jagielloński, Instytut Biologii Molekularnej, Kraków, Poland)
4. Confocal microscopy – technological progress and new applications – *F. Brakenhoff* (University of Amsterdam, Institute for Molecular Cell Biology, The Netherlands)
5. Functional T-cell Cytometry – *A. Radbruch* (Deutsches Rheuma-Forschungszentrum, Berlin, Germany)
6. Flow cytometric analysis of platelet activation and function – *G. Schmitz* (Klinikum der Universität Regensburg, Institut für Klinische Chemie, Regensburg, Germany)
7. Multiparametric analysis of lymphocyte phenotype: Clinical perspectives – *A. Cossarizza* (Department of Biomedical Sciences, Section of General Pathology, Modena, Italy)
8. Green fluorescent protein – *D. Galbraith* (Department of Plant Sciences, University of Arizona, Tucson, Arizona, USA)
9. Absolute count of CD34 positive and other immunolabelled cells – *W. Göhde* (Westfälische Wilhelms-Universität, Institut für Strahlenbiologie, Münster, Germany)
10. DNA content and cell cycle analysis – *V. Shankey* (Loyola University, Medical Center, Maywood, IL, USA)
11. Characterization apoptosis and necrosis – *Z. Darzynkiewicz* (New York Medical College, The Cancer Center Institute, New York, USA)
12. New frontiers in flow and image cytometry – *J. P. Robinson* (Purdue University Cytometry Laboratories, Purdue University, West Lafayette, IN, USA)

Zajęcia praktyczne ilustrowały podstawowe i niektóre wybrane zaawansowane techniki używane w cytometrii przepływowej i obrazowej, m.in.:

1. Flow cytometry principles and instrumentation
2. Multidimensional immunophenotyping including analysis of intracellular antigens
3. Functional cell studies using fluorogenic probes, fluorescent ligands and FRET
4. Analysis of activation, proliferation and cell cycle progression
5. Characterisation of apoptosis and necrosis

6. Analysis of rare events including pre-enrichment
7. Confocal microscopy – principles and instrumentation
8. Optimizing data collection in image cytometry
9. Multiphoton confocal imaging
10. Principles of image processing and deconvolution of 3D data
11. Ratio imaging

W czasie zajęć praktycznych korzystano z cytometrów przepływowych firm Becton-Dickinson i Partec oraz mikroskopów konfokalnych BioRad MRC1024 i BioRad MicroRadiance.

Szkola odbyła się dzięki pomocy wielu organizacji i firm. Organizatorzy są szczególnie wdzięczni za pomoc okazaną przez firmy: Becton-Dickinson, BioRad i Partec. Szkoła otrzymała również wsparcie z następujących źródeł: AutoQuant, BioD srl, BUIK „GAMBIT”, Beckman-Coulter, Cytomation, Dako/ALAB, Gruppo di Cooperazione in Immunologia, Uniwersytet Jagielloński, Miltenyi Biotec GmbH, Molecular Probes, National Sciences Foundation (USA), Phoenix Flow Labs, Purdue University Cytometry Laboratories, Schering AG, Sigma-Aldrich, University of Arizona, Wilov.

Informacje o następnej Szkole Cytometrii:

dr J. Dobrucki

Uniwersytet Jagielloński,
Instytut Biologii Molekularnej, Z-d Biofizyki,
Laboratorium Mikroskopii Konfokalnej i Analizy Obrazu
tel. (48-12) 634-14-42 w. 268
fax. (48-12) 633-69-07
Internet: dobrucki@mol.uj.edu.pl

NR 1

W tym Zeszyście	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., JAŹDŻEWSKA E. MAJEWSKA-SAWKA A.: Poliaminy w komórce roślinnej: synteza, mechanizm 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 samonieźgodności 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

NR 2

W tym Zeszyście	153
SZCZEPANIK M., PLYTYCZ B. Limfocyty o receptorach gamma/delta ($\gamma\delta$ T)	155
WÓJCIK C. Znaczenie proteasomów w prezentacji antygenów	171
DZIEWIĄTKOWSKI J., KOWIAŃSKI P., MORYŚ J. Jak mierzyć, aby mierzyć dobrze – Zasady stereologiczne w badaniach morfometrycznych	193
WÓJTOWICZ R. Jak wirusy unikają odpowiedzi immunologicznej? Blokowanie cząsteczek MHC klasy I	211
TRETYN A., WIŚNIEWSKA J., JAWORSKI K. Mechanizm działania fitochromu WOJSA-ŁUGOWSKA U., STRZYŻEWSKA I., JERKA-DZIADOSZ M. γ -Tubulina i jej rola w nukleacji i dynamice mikrotubul	225
JAGLARZ M. K. Molekularne podłoże różnicowania linii płciowej i formowanie gonady zarodkowej <i>Drosophila melanogaster</i>	251
HONCZARENKO M., MACHALIŃSKI B. Udział chemokin oraz receptorów chemokinowych w patogenezie zakażenia wirusem AIDS	263
KUŹNICKI J. Udział jonów wapnia w przekazywaniu sygnałów w jądrze komórkowym	283
Abstracts of III Conference of Flow Cytometry, Warsaw, June 14–15 1997	311
Komunikaty	317
Listy do Redakcji	338
Wskazówki przygotowania rysunków	340
	340

NR 3

W tym Zeszytcie	313
MOTYL T. Apoptoza – śmierć warunkująca życie	315
STRZYŻEWSKA I., WOJSA-ŁUGOWSKA U., JERKA-DZIADOSZ M. Septyny – nowa rodzina białek cytoszkieletowych. Udział septyn w cytokinezie	335
BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA Z. Indukcja embrionalna w zarodkach <i>Xenopus laevis</i>	349
POREBA E. Biologia molekularna wirusów <i>Papilloma</i>	379
HEJNOWICZ Z. Siły i naprężenia mechaniczne we wrzecionie mitotycznym; ich role w rozdzielaniu chromosomów	403
JAKUBOWSKI W. Efekty stresu oksydacyjnego u drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	429
SOBKOWIAK A., WIERZBICKI A., TRZECIAK W. H. Cytotoksyczne ribonukleazy o szczególnym działaniu biologicznym (Rysbazy): Rysbazy zwierzęce i ludzkie	449
KOCHAŃSKI A. M. Patologia molekularna choroby Charcot-Marie-Tooth	469
Sprawozdanie z działalności zarządu Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej	477
Komunikaty	480
Listy do Redakcji	482
Wskazówki przygotowania rysunków	483
Errata	483

NR 4

W tym Zeszytcie	485
BYCZYŃSKA A., LORENC-PLUCIŃSKA G.: Status energetyczny komórek roślinnych oraz jego regulacja w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska	487
LIBIK M.: Kalretikulina – charakterystyka biochemiczna i funkcje w komórkach roślinnych	501
SMÓL J., TWARDOWSKI T.: Ferrytyna – specyficzne białko ochronne	511
KOZŁOWSKA-SZERNOS B., MALESZEWSKI S.: Wewnątrzkomórkowy transport i akumulacja nieorganicznego węgla jako wstępne etapy fotosyntezy	525
JACKOWSKI G.: Specyficzne białka chromoplastowe	539
CIEMERYCH M. A.: Regulacja dojrzewania mejotycznego oocytów oraz pierwszych cykli mitotycznych w zarodkach myszy	549
MASZEWSKI J., POLIT J.: Kontrola replikacji DNA w cyklu komórkowym	571
ZUWAŁA-JAGIEŁŁO J., OSADA J.: Fizjologiczna rola receptorów glikoprotein	591
CIESIELSKA E.: Inhibitory topoizomerazy I – Nowa klasa leków przeciwnowotworowych	613
SZABLEWSKI L.: Ułatwiona dyfuzja glukozy w komórkach ssaczych. I. Budowa, mechanizm działania i lokalizacja Glut	633
WŁOGA D.: Programowana śmierć komórek (PCD) w organizmach jednokomórkowych i u bezkręgowców	649
Komunikaty	675
Wskazówki przygotowania rysunków	676

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 i do 100 pozycji bibliograficznych w zasadzie z ostatnich 5 lat (do 10% pozycji bibliograficznych starszych);

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

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

Tekst pracy i załączniki należy przesyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 z podwójną interlinią i marginesem 4 cm po lewej stronie. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki na s. 676) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub 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). Następna strona 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 zamieszczać tabel, schematów lub rysunków, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

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

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

Tabele, opisy schematów i rysunków powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie powinny być kontrastowe i wykonane na blyszczącym 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. 676.

Redakcja prosi o propozycję do 5 osób (nazwisko, imię, adres, fax), które byłyby odpowiednimi recenzentami maszynopisu, nie powinny jednak być pracownikami instytucji, w której pracuje autor, ani jego współpracownikami. 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 wysłana do innej redakcji.	tak	nie	tak	nie
Dołączono kopie pracy na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM	tak	nie	tak	nie
Odpowiadam za całość pracy opisanej w zał. maszyn.	tak	nie	tak	nie

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

podpis

TREŚĆ

W tym Zeszyście	485
BYCZYŃSKA A., LORENC-PLUCIŃSKA G.: Status energetyczny komórek roślinnych oraz jego regulacja w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska	487
LIBIK M.: Kalretikulina – charakterystyka biochemiczna i funkcje w komórkach roślinnych	501
SMÓL J., TWARDOWSKI T.: Ferrytyna – specyficzne białko ochronne	511
KOZŁOWSKA-SZERNOS B., MALESZEWSKI S.: Wewnątrzkomórkowy transport i akumulacja nieorganicznego węgla jako wstępne etapy fotosyntezy	525
JACKOWSKI G.: Specyficzne białka chromoplastowe	539
CIEMERYCH M. A.: Regulacja dojrzewania mejotycznego oocytów oraz pierwszych cyklów mitotycznych w zarodkach myszy	549
MASZEWSKI J., POLIT J.: Kontrola replikacji DNA w cyklu komórkowym	571
ZUWAŁA-JAGIEŁŁO J., OSADA J.: Fizjologiczna rola receptorów glikoprotein	591
CIESIELSKA E.: Inhibitory topoizomerazy I – Nowa klasa leków przeciwnowotworowych	613
SZABLEWSKI L.: Ułatwiona dyfuzja glukozy w komórkach ssaczyh. I. Budowa, mechanizm działania i lokalizacja Glut	633
WŁOGA D.: Programowana śmierć komórek (PCD) w organizmach jednokomórkowych i u bezkręgowców	649
Komunikaty	675
Wskazówki przygotowania rysunków	676

Warunki prenumeraty kwartalnika POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Prenumerata na rok 1999

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1999 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 1999:

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

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 1999 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