

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

VOL. 26, ISSUE 2/1999
(217-444)

Postępy
Biologii
Komórki

Advances
in Cell
Biology

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, cytoskielet, 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. 8340 344, fax 8340470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl.

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

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

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

Ark. wyd. 16,5. Ark. druk. 14.25 Podpisano do druku w lutym 1999 r. Druk ukończono w marcu 1999 r.

W tym Zeszycie Postępów Biologii Komórki

- Nagrodę Nobla z fizjologii i medycyny w 1998 r. przyznano RF Furchgottowi, LJ Ignarro i F Muradowi za odkrycie roli tlenku azotu jako cząsteczki sygnałowej. Krótkie omówienie tego osiągnięcia naukowego znajdzie Czytelnik na stronie 219.
- Dwa artykuły o mechanizmach kwitnienia roślin są na stronach 231 i 249.
- Białka szoku termicznego są obecne w komórkach *Prokaryota* i *Eukaryota*. Rozmieszczenie w komórce i rolę tych białek omówiono w artykule na stronie 267.
- Dalszy artykuł w „Postępach” o apoptozie (uprzednie artykuły: 22,247,1995; 23,299,1996; 24,561,1997; 25,315,1998; 25,649,1998) znajdzie Czytelnik na stronie 285.
- Omówienie podłoża molekularnego częstego schorzenia uwarunkowanego genetycznie, rdzeniowego zaniku mięśni znajdzie Czytelnik na stronie 311.
- Część białkowa kryptochromów wykazuje dużą homologię do fotoliaz – enzymów uczestniczących w procesie naprawy DNA. Budowę, właściwości i mechanizm działania kryptochromów, eukariotycznych fotoreceptorów światła niebieskiego omówiono na stronie 343.
- Na stronie 375 Czytelnik znajdzie artykuł na temat leptyny, hormonu dotąd znanego jako hormon hamujący apetyt. Czynnikiem ten jest produkowany przez komórki tłuszczowe, komórki pęcherzyków jajnikowych i komórki łożyska w rozwoju zarodka. Ostatnio (*Science* 281,1683,1998) opisano jeszcze inną własność leptyny. Jest ona czynnikiem angiogennym, pobudzającym wzrost naczyń krwionośnych. To tłumaczy jej znaczenie w przebiegu gojenia się ran oraz we wczesnym rozwoju zarodka.

OD DYNAMITU DO VIAGRY, CZYLI RZECZ O NAGRODZIE NOBLA Z MEDYCYNY I FIZJOLOGII W 1998 ROKU*

FROM DYNAMITE TO VIAGRA – 1998 NOBEL PRIZE
IN MEDICINE AND PHYSIOLOGY

Cezary WÓJCIK¹, Jakub GOŁĄB^{**2}

¹Zakład Histologii i Embriologii oraz ²Zakład Immunologii, Instytutu Biostruktury
Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie: Nagrodę Nobla z fizjologii i medycyny w 1998 roku przyznano Robertowi F. Furchgottowi (*State University of New York, Health Science Center*), Louisowi J. Ignarro (*University of California Los Angeles School of Medicine*) oraz Feridowi Muradowi (*University of Texas Medical School w Houston*) za odkrycie roli tlenku azotu jako cząsteczki sygnałowej w organizmie. Niestety, wśród nagrodzonych zabrakło miejsca dla Salvadora Moncady, który pierwszy jednoznacznie zidentyfikował czynnik odpowiedzialny za rozszerzanie naczyń krwionośnych jako tlenek azotu. Obecnie wiadomo, iż tlenek azotu jest produkowany w organizmie człowieka przez trzy izoenzymy syntazy tlenku azotu (NOS, *nitric oxide synthase*) z aminokwasu argininy. Tlenek azotu jest reaktywnym wolnym rodnikiem i oddziałuje z szeregiem cząsteczek w komórce, w tym z grupą hemową rozpuszczalnej formy cyklicznej guanylowej, co prowadzi do jej aktywacji. Cykliczne GMP jest wtórnym przekaźnikiem odpowiedzialnym za większość fizjologicznego działania tlenku azotu. Tlenek azotu uczestniczy m.in. w rozkurczu naczyń krwionośnych, utrzymywaniu prawidłowego ciśnienia tętniczego, prawidłowym działaniu układu odpornościowego, a zwłaszcza w zwalczaniu infekcji, przekazywaniu sygnałów między neuronami, czynnościach mięśni poprzecznie prążkowanych szkieletowych i serca, erekcji prącia itd.

Słowa kluczowe: tlenek azotu, syntaza tlenku azotu, wolne rodniki, cykliczna guanylanowa, cytrynian sildenafilu, Nagroda Nobla, naczynia krwionośne, układ nerwowy, układ odpornościowy, mięśnie poprzecznie prążkowane

Summary: The 1998 Nobel Prize in Physiology and Medicine was granted to Robert F. Furchgott (State University of New York Health Science Center), Louis J. Ignarro (University of California Los Angeles

*Artykuł napisany w związku z Nagrodą Nobla z fizjologii i medycyny w 1998 r.

**J. Gołąb jest stypendystą Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej

School of Medicine) and Ferid Murad (University of Texas Medical School in Houston), for their achievements which lead to the discovery, that a simple gas, namely nitric oxide, is an important signal molecule in our bodies. However, Salvador Moncada, who first proved that the endothelium derived relaxing factor is indeed nitric oxide was omitted by the Nobel committee. Nitric oxide is produced in the organism by three isozymes of nitric oxide synthase (NOS). Nitric oxide is a free radical, which readily reacts with various chemical groups in the cell. Among them, is the heme group of the soluble guanylate cyclase. Nitric oxide binding to this enzyme causes its activation and therefore cGMP production. cGMP is indeed the main second messenger of the physiological action of nitric oxide. Among the many roles of nitric oxide is the relaxation of blood vessels, maintenance of the normal blood pressure, normal functioning of the immunological system, antimicrobial action, neuronal transmission, function of the striated skeletal and cardiac muscles, penile erection, etc.

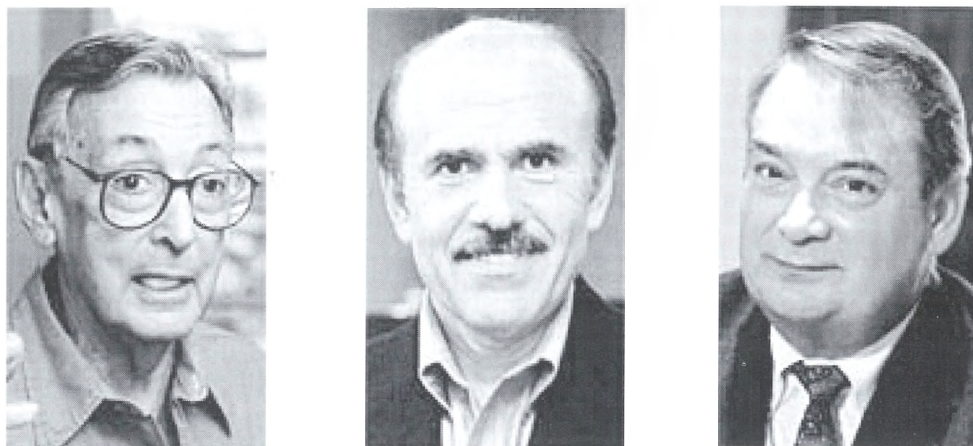
Key words: nitric oxide, nitric oxide synthase, free radicals, guanylate cyclase, sildenafil citrate, Nobel Prize, blood vessels, nervous system, immunological system, striated muscles

HISTORIA ODKRYCIA ROLI TLENKU AZOTU

Alfred Nobel uzyskał sławę i majątek dzięki wynalezieniu sposobu związania niebezpiecznej nitrogliceryny z ziemią krzemionkową w stabilny dynamit. Na mocy jego testamentu, majątek ten umożliwił po śmierci wynalazcy ustanowienie Nagród Nobla. Zakrawa na ironię fakt, iż gdy pod koniec życia cierpiącemu na chorobę wieńcową Noblowi lekarz przepisywał nitroglicerynę ten odmawiał jej przyjmowania, nie dowierzając, by substancja o tak silnych właściwościach wybuchowych mogła mieć działanie lecznicze. Tymczasem w sto lat później Nagroda Nobla z dziedziny fizjologii i medycyny przypadła w udziale trzem amerykańskim farmakologom za odkrycie biologicznej roli tlenku azotu (NO), który jest między innymi odpowiedzialny za rozszerzające działanie nitrogliceryny na naczynia wieńcowe. Uczni uwieńczeni noblowskim laurem w 1998 roku to Robert F. Furchgott z State University of New York Health Science Center, Louis J. Ignarro z University of California Los Angeles School of Medicine i Ferid Murad z University of Texas Medical School w Houston (rys. 1).

R.F. Furchgott wraz z J.V. Zawadzkim opublikowali w 1980 roku pracę, w której udowodniono, iż acetylocholina rozkurcza naczynia krwionośne działając na komórki śródbłonna. Jeżeli natomiast naczynie pozbawiono śródbłonna, to acetylocholina wywoływała efekt przeciwny – jego skurcz [16]. Tajemniczy czynnik uwalniany pod wpływem acetylocholiny przez komórki śródbłonna został nazwany EDRF, czyli czynnikiem rozkurczającym pochodzącym ze śródbłonna (*endothelium-derived relaxing factor*).

Wiele grup badaczy rozpoczęło wówczas wyścig mający na celu identyfikację EDRF. L.J. Ignarro opublikował w 1987 roku wyniki wskazujące na to, iż czynnik rozkurczający uwalniany przez śródbłonek jest tożsamy z tlenkiem azotu [23]. Wkrótce potem ostateczne dowody potwierdzające tę hipotezę dostarczył S. Moncada



RYSUNEK 1. Laureaci nagrody Nobla z fizjologii i medycyny w roku 1998, od lewej kolejno: Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro i Ferid Murad (wg The Nobel Prize Internet Archive)

z University College London [40]. Wielu wybitnych uczonych uważa, iż S. Moncada co najmniej w tym samym stopniu co trzej nobliści przyczynił się do odkrycia roli tlenu azotu i zasłużył na jednakowe wyróżnienie. Jego pominięcie wywołało duży niesmak, gdyż może świadczyć o uprzedzeniu komitetu noblowskiego względem naukowców pracujących w Europie i będących w dodatku pochodzenia latynoskiego (Moncada jest narodowości honduraskiej) [50].

W czasie gdy Ignarro i Moncada dowiedli, iż tlenek azotu pełni w organizmie ważną fizjologiczną rolę, wiadomo już było, iż jest on uwalniany przez nitroglicerynę i inne azotany, odpowiadając za ich efekty farmakologiczne. Wykazał to F. Murad wraz ze współpracownikami [2]. Działanie rozkurczające w miocytach ściany naczyń krwionośnych okazało się zależeć od aktywacji cyklazy guanylanowej [25, 36].

Rozgłosu laureatom Nagrody Nobla w środkach masowego przekazu dodał fakt, iż ich odkrycia wiążą się z mechanizmem działania Viagry®, leku na impotencję budzącego duże zainteresowanie opinii publicznej. Wśród komórek mięśni gładkich ludzkiego organizmu, które rozkurczają się pod wpływem tlenu azotu, znajdują się także te, które tworzą belecзки w obrębie ciał jamistych prącia. Ich rozkurcz umożliwia napływ krwi do światła ciał jamistych i erekcję prącia, a co za tym idzie, możliwość odbycia stosunku płciowego. Nadmiernej aktywacji cyklazy guanylanowej w komórkach mięśni gładkich ciał jamistych prącia przeciwdziała fosfodiesteraza 5 (PDE5) rozkładająca cGMP do nieaktywnego GMP. Cytrynian sildenafilu, znany lepiej pod handlową nazwą Viagra®, jest wybiórczym inhibitorem PDE5, zapobiega więc rozkładowi cGMP i wzmacnia w ten sposób działanie tlenu azotu [3, 6, 7, 35, 41].

SYNTEZA TLENKU AZOTU

Tlenek azotu jest bardzo nietrwałym gazem o charakterze wolnego rodnika, reagującym szybko z cząsteczkami zawierającymi niesparowane elektrony, takimi jak: cząsteczkowy tlen, anion nadtlenny, jony metali, zredukowany glutation, wywołując powstawanie nietrwałych związków wchodzących w reakcje ze składnikami komórki [15]. Głównym fizjologicznym mediatorem tlenku azotu są grupy hemowe rozpuszczalnej formy cyklicznej guanylanowej. Pod wpływem nanomolarnych stężeń tego gazu aktywność cyklicznej guanylanowej zwiększa się kilkusetkrotnie. Tlenek azotu wiąże się także z grupą hemową hemoglobiny tworząc S-nitrohemoglobinę w płucach, z której tlenek azotu jest uwalniany w postaci S-nitroglutationu w tkankach [15, 33].

Tlenek azotu powstaje w organizmie pod wpływem jednego z trzech izoenzymów syntazy tlenku azotu, czyli NOS (*nitric oxide synthase*). Dwa spośród tych enzymów ulegają konstytutywnej ekspresji, odpowiednio w neuronach (NOS I, nNOS, 150 kDa) i w komórkach śródbłonna (NOS III, eNOS, 21–22 kDa). Produkują one tlenek azotu pod wpływem czynników zwiększających wewnątrzkomórkowe stężenie jonów Ca^{2+} . Trzeci izoenzym (NOS II, iNOS, 37 kDa) ulega indukcji w makrofagach i innych komórkach pod wpływem licznych cytokin, zaś jego aktywność jest niezależna od wahań wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} . Każda z izoform NOS może występować w różnych wariantach powstałych wskutek alternatywnego cięcia i składania pierwotnego transkryptu [12–14, 30, 33].

Syntezę tlenku azotu katalizują homodimeryczne kompleksy poszczególnych NOS. Substratem są L-arginina i dwie cząsteczki tlenu przy udziale tetrahydrobiopteryny, NADPH, FAD, FMN i kompleksu Ca^{2+} /kalmoduliny. Pośrednim produktem reakcji jest N^G -hydroksy-L-arginina, ostatecznie zaś uwalniana jest L-cytrulina, tlenek azotu i dwie cząsteczki wody [22, 33, 52].

ZNACZENIE TLENKU AZOTU W UKŁADZIE KRAŻENIA

Tlenek azotu jest wydzielany w układzie krążenia przez śródbłonek naczyń oraz przez kardiomiocyty [4]. Syntetyzowany przez NOS III i wydzielany przez śródbłonek z pewną stałą częstotliwością, tlenek azotu przyczynia się do utrzymywania się prawidłowego ciśnienia tętniczego. Wzrost wydzielania tlenku azotu, a co za tym idzie, rozkurcz naczyń następuje pod wpływem mediatorów, takich jak: acetylocholina, trombina, ADP i bradykinina oraz czynników fizykochemicznych, takich jak rozciąganie naczyń [30]. Wszystkie te czynniki prowadzą do wzrostu stężenia Ca^{2+} w komórkach śródbłonna, a co za tym idzie aktywacji NOS III.

Enzym ten jest regulowany także przez fosforylację reszty tyrozynowej, która powoduje spadek jego aktywności o 50% [17] oraz przez odpowiednią lokalizację w komórkach. W śródbłonku NOS III jest zlokalizowany w okolicy aparatu Golgiego oraz kaweoli błony komórkowej, gdzie oddziałuje z białkiem okrywającym – kaweoliną 1 powodującym obniżenie jego aktywności [17, 18]. Zakotwiczenie w błonach komórki NOS III zawdzięcza myristylacji i/lub palmitylacji w pobliżu końca aminowego [11, 45]. Sygnały, takie jak: acetylocholina, kompleks Ca^{2+} /kalmodulina powodują uwolnienie NOS III z kaweoli [11]. W kardiomiocytach NOS III lokalizuje się w obrębie kaweoli oraz wstawek, oddziałując z kaweoliną 3 [10]. Tlenek azotu w kardiomiocytach inaktywuje rianodynowe kanały Ca^{2+} w gładkiej siateczce śródplazmatycznej, modulując w ten sposób kurczliwość mięśnia sercowego [54].

Działanie inhibitorów NOS [42] oraz badania myszy pozbawionych NOS III wykazały, że brak aktywności tego enzymu prowadzi do znaczącego wzrostu ciśnienia tętniczego u zwierząt doświadczalnych. Upośledzenie aktywności NOS III w komórkach śródbłonka może być ważnym czynnikiem przyczyniającym się do rozwoju samoistnego nadciśnienia u ludzi [34]. U dzieci z nadciśnieniem tętniczym stwierdzono zwiększone stężenie w surowicy naturalnych inhibitorów NOS, takich jak symetryczna i asymetryczna dimetylarginina [19].

ZNACZENIE TLENKU AZOTU W UKŁADZIE ODPORNOŚCIOWYM

Niekiedy trudno uwierzyć, że tlenek azotu o masie cząsteczkowej zaledwie 30 Da może uczestniczyć zarówno w obronie naszego organizmu przed drobnoustrojami patogennymi, jak i w rozwoju śmiertelnych niekiedy reakcji związanych z infekcją. Jest to najmniejsza, najlepiej rozpuszczalna w wodzie i tłuszczu cząsteczka produkowana w żywym organizmie, „opiekująca” się niesparowanym elektronem. Mimo tych „najmniejszości”, a być może właśnie dzięki nim, NO z łatwością wnika do wnętrza wielu komórek, w tym komórek bakteryjnych i zakażonych wirusem, i modyfikuje aktywność wielu makromolekuł. Może na przykład regulować aktywność kanałów jonowych, kinaz tyrozynowych, fosfataz, GTPaz i czynników transkrypcyjnych [38].

W przebiegu infekcji, produkowany głównie przez makrofagi i neutrofile, pod wpływem mediatorów zapalnych, takich jak: IFN- γ , TNF- α , IL-1 i LPS, tlenek azotu jest mediatorem odpowiedzi nieswoistej [27]. Reaktywne rodniki tlenowe produkowane jednocześnie z NO tworzą wraz z nim jeszcze silniej działające substancje, takie jak: peroksyazotyny (ONOO^-), S-nitrozotiole (RSNO), dwutlenek azotu (NO_2^*), N_2O_3 , N_2O_4 i wiele innych [8]. Te niezwykle aktywne substancje mogą bezpośrednio zabijać wiele drobnoustrojów. Mogą hamować replikację wi-

rusów i indukować apoptozę komórek nowotworowych [44, 53]. Tlenek azotu odgrywa także ważną rolę w obronie naszego organizmu przed bakteriami, pierwotniakami, grzybami i robakami [37]. W przebiegu infekcji niektórymi drobnoustrojami, takimi jak: prątki gruźlicy czy *Leishmania major*, tlenek azotu wydaje się odgrywać najistotniejszą rolę w odpowiedzi przeciwwakaźnej. W przebiegu innych infekcji, na przykład w toksoplazmozie, salmonellozie, w zakażeniach pikornawirusami oraz HSV-1 (*herpes simplex virus*), tlenek azotu odgrywa ważną, ale nie niezastąpioną rolę [37].

Tlenek azotu może być również produkowany przy udziale niektórych bakterii komensalnych, fizjologicznie zasiedlających błony śluzowe i skórę człowieka. Na przykład w jamie ustnej bakterie te redukują azotany, znajdujące się w pokarmie, do azotynów, które po połknięciu przekształcane są w kwaśnym środowisku żołądka w tlenek azotu [5]. Bakterie znajdujące się w skórze redukują azotany wydzielane wraz z potem, a powstające azotyny ulegają spontanicznej, nieenzymatycznej redukcji do tlenku azotu, ponownie dzięki kwaśnemu odczynowi na powierzchni skóry [49]. W komórkach nabłonkowych błony śluzowej nosa, NOS II jest aktywna konstytutywnie i nieustannie katalizuje produkcję tlenku azotu, który w zatokach obocznych nosa osiąga stężenie przekraczające wszelkie dopuszczalne normy skażenia środowiska [31]. Dzięki temu tlenek azotu może uczestniczyć w reakcjach obronnych organizmu – zabijaniu drobnoustrojów chorobotwórczych, zanim jeszcze drobnoustroje te zdołają przedrzeć się przez nabłonkowe bariery skóry i błon śluzowych.

Układ odpornościowy musi się jednak postugiwać tak silnie działającą substancją z niezwykłą ostrożnością, bowiem nadmierna produkcja tlenku azotu prowadzi niekiedy do nadmiernego rozszerzenia naczyń, spadku ciśnienia tętniczego, załamania się krążenia i śmierci. Do sytuacji takich dochodzi na przykład w przebiegu wstrząsu endotoksycznego [28].

Tlenek azotu wydaje się odgrywać istotną rolę w przebiegu niektórych chorób autoimmunizacyjnych. Jest odpowiedzialny między innymi za niszczenie komórek β trzustki w przebiegu cukrzycy oraz destrukcję chrząstki stawowej w reumatoidalnym zapaleniu stawów [26]. Ponadto, reaktywne pochodne azotowe mogą uszkadzać DNA i indukować mutacje, co z kolei sprzyja transformacji nowotworowej [9].

Tlenek azotu nie jest jednak jedynie substancją efektorową układu odpornościowego. W ostatnim okresie zaobserwowano, że jest to również silnie działający immunomodulator [29]. Działając na limfocyty T, hamuje ich proliferację. Wynika to między innymi z hamowania produkcji IL-2, jednego z najsilniejszych endogennych mitogenów dla tych komórek. Dość intrygujące jest to, że tlenek azotu wydaje się silniej hamować namnażanie limfocytów T pomocniczych typu Th1, wspomagających odpowiedź typu komórkowego, a znacznie słabiej antyproliferacyjnie działa na limfocyty Th2, wspomagające odpowiedź typu humoralnego [47]. Mało tego, tlenek azotu może wręcz sprzyjać aktywacji limfocytów Th2. Pobudza

między innymi produkcję IL-4 przez te komórki. Zgodnie z tymi obserwacjami tlenek azotu może interferować z odpowiedzią przeciwwirusową, sprzyjając replikacji wirusów grypy, która w prawidłowych warunkach jest skutecznie kontrolowana przez odpowiedź typu komórkowego [1]. Z drugiej strony, tlenek azotu jest częściowo odpowiedzialny za powstawanie chorób alergicznych.

ZNACZENIE TLENKU AZOTU W UKŁADZIE NERWOWYM

Tlenek azotu jest syntetyzowany przez neurony w wielu częściach ośrodkowego układu nerwowego. Aktywacja NOS I zachodzi w częściach postsynaptycznych pod wpływem zależnej od glutaminianu aktywacji receptorów NMDA (*N-methyl-D-aspartate*) prowadzącej do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} . Podejrzewa się, iż tlenek azotu uczestniczy w długoterminowym wzmocnieniu postsynaptycznym (LTP – *long term potentiation*), gdyż inhibitory NOS zmniejszały zarówno wydzielanie glutaminianu, jak i samo LTP [32]. Okazało się jednak, że myszy pozbawione genu dla NOS I miały normalne LTP [39]. W neuronach jednak występuje także izoforma NOS III, a podwójnie znokautowane myszy pozbawione NOS I i NOS III mają upośledzone LTP [46, 51].

Trwają dyskusje na temat tego, czy tlenek azotu wpływa korzystnie czy też niekorzystnie w uszkodzeniach mózgu na tle niedokrwienia i reperfuzji. U myszy pozbawionych NOS I rzadziej występuje udar mózgu, natomiast u myszy pozbawionych NOS III zwiększa się obszar objęty niedokrwieniem. Wydaje się więc, że podczas gdy tlenek azotu produkowany przez śródbłonek działa ochronnie, to tlenek azotu produkowany przez neurony wpływa niekorzystnie na uszkodzenia w przebiegu epizodów niedokrwieniowych [33].

TLENEK AZOTU W MIĘŚNIACH SZKIELETOWYCH

Zarówno NOS I, jak i NOS III występuje także we włóknach mięśniowych poprzecznie prążkowanych. Podczas gdy NOS I występuje w powiązaniu z całą sarkolemmą, głównie włókien szybkich (typu I), NOS III występuje jedynie na drobnych plamkowatych obszarach sarkolemy oraz w powiązaniu z mitochondriami [48]. NOS I często tworzy makrokompleksy razem z kaweoliną 3 w powiązaniu z kompleksem dystroglikanów [20]. Występuje także w szczególnie dużym stężeniu w obrębie połączeń nerwowo-mięśniowych w połączeniu z podjednostką R1 receptora NMDA, zwłaszcza we włóknach wolnych (typu II) [21]. Pod wpływem

szkodliwych bodźców, takich jak endotoksyny, w mięśniach pojawia się także NOS II [24].

Mięśnie poprzecznie prążkowane wzmagają produkcję tlenu azotu w czasie skurczów. Tlenek azotu pełni w mięśniach poprzecznie prążkowanych szereg ważnych funkcji. Prowadzi on do poszerzenia się naczyń włosowatych i zapobiega adhezji leukocytów, zmienia także bezpośrednio metabolizm włókien mięśniowych wpływając na insulinozależny transport glukozy, glikolizę, zużycie tlenu przez mitochondria i aktywność kinazy kreatyniny. Tlenek azotu osłabia siłę skurczu mięśnia oraz reguluje powiązanie między pobudzeniem włókna mięśniowego a jego skurczem. Tlenek azotu oddziałuje zarówno bezpośrednio na białka wrażliwe na jego działanie utleniające, jak i przez wolne rodniki oraz przez cGMP [43].

PODSUMOWANIE

Odkrycie, iż prosta cząsteczka nietrwałego, toksycznego gazu, jakim jest tlenek azotu, nie tylko jest odpowiedzialna za działanie nitrogliceryny i innych azotanów, lecz jest wytwarzana w naszym organizmie w warunkach fizjologicznych odgrywając istotną rolę w jego homeostazie, stanowi niewątpliwie przełom w naszym pojmowaniu mechanizmów działania hormonów i przekazywania sygnałów w komórkach. W związku z tym odkrywcy fizjologicznego działania tlenu azotu w pełni zasługują na uhonorowanie najwyższą nagrodą, jaką jest Nagroda Nobla. Kontrowersje wokół przyznania tego wyróżnienia są znamienne dla odkryć naukowych w dzisiejszych czasach, które w o wiele mniejszym stopniu opierają się na przeblaskach geniuszu poszczególnych jednostek niż na ciężkiej, zespołowej pracy wielu grup badawczych, często zażarcie ze sobą współzawodniczących. Po raz kolejny okazało się, iż związek chemiczny znany wprawdzie jako silna trucizna, może w rzeczywistości wywierać silne działanie lecznicze, korzystne dla organizmu, potwierdzając znaną jeszcze od czasów Paracelsusa doktrynę, iż w odpowiedniej dawce każda trucizna jest lekarstwem.

LITERATURA

- [1] AKAIKE T, NOGUCI Y, IJIRI S, SETOGUCHI K, SUGA M, ZHENG YM, DIETSCHOLD B, MAEDA H. Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia: involvement of both nitric oxide and oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 2448–2453.
- [2] ARNOLD WP, MITTAL CK, KATSUKI S, MURAD F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; **74**: 3203–3207.

- [3] BALLARD SA, GINGELL CJ, TANG K, TURNER LA, PRICE ME, NAYLOR AM. Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue *in vitro* and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes. *J Urol* 1998; **159**: 2164–2171.
- [4] BALLIGAND JL, CANNON PJ. Nitric oxide synthases and cardiac muscle. Autocrine and paracrine influences. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 1997; **17**: 1846–1858.
- [5] BENJAMIN O, O'DRISCOLL F, DOUGALL H, DUNCAN C, SMITH L, GOLDEN M, MCKENZIE H. Stomach NO synthesis. *Nature* 1994; **368**: 502.
- [6] BOOLELL M, ALLEN MJ, BALLARD SA, GEPI-ATTEE S, MUIRHEAD GJ, NAYLOR AM, OSTERLOH IH, GINGELL C. Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. *Intl J Impot Res* 1996; **8**: 47–52.
- [7] CHUANG AT, STRAUSS JD, MURPHY RA, STEERS WD. Sildenafil, a type-5 CGMP phosphodiesterase inhibitor, specifically amplifies endogenous cGMP-dependent relaxation in rabbit corpus cavernosum smooth muscle *in vitro*. *J Urol* 1998; **160**: 257–261.
- [8] FANG FC. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J Clin Invest* 1997; **99**: 2818–2825.
- [9] FELLE-Y-BOSCO E. Role of nitric oxide in genotoxicity: implication for carcinogenesis. *Cancer Metastas Rev* 1998; **17**: 25–37.
- [10] FERON O, BELHASSEN L, KOBZIK L, SMITH TW, KELLY RA, MICHEL T. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem* 1996; **271**: 22810–22814.
- [11] FERON O, SALDANA F, MICHEL JB, MICHEL T. The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. *J Biol Chem* 1998; **273**: 3125–128.
- [12] FORSTERMANN U, BOISSEL JP, KLEINERT H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* 1998; **12**: 773–790.
- [13] FORSTERMANN U, KLEINERT H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1995; **352**: 351–364.
- [14] FORSTERMANN U, KLEINERT H, GATH I, SCHWARZ P, CLOSS EL, DUN NJ. Expression and expressional control of nitric oxide synthases in various cell types. *Adv Pharmacol* 1995; **34**: 171–186.
- [15] FUKUTO JM. Chemistry of nitric oxide: biologically relevant aspects. *Adv Pharmacol* 1995; **34**: 1–15.
- [16] FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; **288**: 373–376.
- [17] GARCIA-CARDENA G, FAN R, STERN DF, LIU J, SESSA WC. Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *J Biol Chem* 1996; **271**: 27237–27240.
- [18] GARCIA-CARDENA G, MARTASEK P, MASTERS BS, SKIDD PM, COUET J, LI S, LISANTI MP, SESSA WC. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain *in vivo*. *J Biol Chem* 1997; **272**: 25437–25440.
- [19] GOONASEKERA CD, SHAH V, REES DD, DILLON MJ. Nitric oxide activity in childhood hypertension. *Arch Dis Child* 1997; **77**: 11–16.
- [20] GOSSRAU R. Caveolin-3 and nitric oxide synthase I in healthy and diseased skeletal muscle. *Acta Histochem* 1998; **100**: 99–112.
- [21] GROZDANOVIC Z, GOSSRAU R. Co-localization of nitric oxide synthase I (NOS I) and NMDA receptor subunit 1 (NMDAR-1) at the neuromuscular junction in rat and mouse skeletal muscle. *Cell Tiss Res* 1998; **291**: 57–63.
- [22] HIBBS JB, JR., TAINTOR RR, VAVRIN Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 1987; **235**: 473–476.

- [23] IGNARRO LJ, BYRNS RE, BUGA GM, WOOD KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circul Res* 1987; **61**: 866–879.
- [24] KAPUR S, BEDARD S, MARCOTTE B, COTE CH, MARETTE A. Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle: a novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action. *Diabetes* 1997; **46**: 1691–1700.
- [25] KATSUKI S, ARNOLD WP, MURAD F. Effects of sodium nitroprusside, nitroglycerin, and sodium azide on levels of cyclic nucleotides and mechanical activity of various tissues. *J Cyclic Nucl Res* 1977; **3**: 239–247.
- [26] KOLB H, KOLB-BACHOFEN V. Nitric oxide in autoimmune disease: cytotoxic or regulatory mediator? *Immunol Today* 1998; **19**: 556–561.
- [27] KRONCKE KD, FEHSEL K, KOLB-BACHOFEN V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol* 1998; **113**: 147–156.
- [28] LIP, ALLEN H, BANERJEE S, FRANKLIN S, HERZOG L, JOHNSTON C, MCDOWELL J, PASKIND M, RODMAN L, SALFELD J. Mice deficient in IL-1 β converting enzyme are deficient in production of mature IL-1 β and resistant to endotoxic shock. *Cell* 1995; **80**: 401–411.
- [29] LIEW FY. Regulation of lymphocyte functions by nitric oxide. *Curr Opin Immunol* 1995; **7**: 396–399.
- [30] LOSCALZO J. Nitric Oxide and Vascular Disease. *New Engl J Med* 1998; **333**: 251–253.
- [31] LUNDBERG JON, FARKAS-SZALLASI T, WEITZBERG E, RINDER J, LINDHOLM J, ANGGARD A, LUNDBERG JM, ALVING K. High nitric oxide production in human paranasal sinuses. *Nature Med* 1995; **1**: 370–373.
- [32] MALENKA RC. Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Cell* 1994; **78**: 535–538.
- [33] MAYER B, HEMMENS B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *T Biochem Sci* 1997; **22**: 477–481.
- [34] MCINTYRE M, HAMILTON CA, REES DD, REID JL, DOMINICZAK AF. Sex differences in the abundance of endothelial nitric oxide in a model of genetic hypertension. *Hypertension* 1997; **30**: 1517–1524.
- [35] MORELAND RB, GOLDSTEIN I, TRAISH A. Sildenafil, a novel inhibitor of phosphodiesterase type 5 in human corpus cavernosum smooth muscle cells. *Life Sci* 1998; **62**: PL 309–318.
- [36] MURAD F, MITTAL C, ARNOLD WP, ICHIHARA K, BRAUGHLER M, EL-ZAYAT M. Properties and regulation of guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds and hydroxyl radical and effects of heme containing proteins. [w] Folco G, Paoletti R [red.] ed. *Molecular biology and pharmacology of cyclic nucleotides*. Amsterdam: Elsevier/North Holland 1978: 33–42.
- [37] NATHAN C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 1997; **100**: 2417–2423.
- [38] NATHAN C. Natural resistance and nitric oxide. *Cell* 1995; **82**: 873–876.
- [39] ODELL TJ, HUANG PL, DAWSON TM, DINERMAN JL, SNYDER SH, KANDEL ER, FISHMAN MC. Endothelial NOS and the blockade of LTP by NOS inhibitors in mice lacking neuronal NOS. *Science* 1994; **265**: 542–546.
- [40] PALMER RM, FERRIGE AG, MONCADA S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; **327**: 524–526.
- [41] PARK K, MORELAND RB, GOLDSTEIN I, ATALA A, TRAISH A. Sildenafil inhibits phosphodiesterase type 5 in human clitoral corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem Biophys Res Comm* 1998; **249**: 612–617.
- [42] REES DD, PALMER RM, MONCADA S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 3375–3378.

- [43] REID MB. Role of nitric oxide in skeletal muscle: synthesis, distribution and functional importance. *Acta Physiol Scand* 1998; **162**: 401–409.
- [44] REISS CS, KOMATSU T. Does nitric oxide play a critical role in viral infections? *J Virol* 1998; **72**: 4547–4551.
- [45] SHAUL PW, SMART EJ, ROBINSON LJ, GERMAN Z, YUHANNA IS, YING Y, ANDERSON RG, MICHEL T. Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem* 1996; **271**: 6518–6522.
- [46] SON H, HAWKINS RD, MARTIN K, KIEBLER M, HUANG PL, FISHMAN MC, KANDEL ER. Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. *Cell* 1996; **87**: 1015–1023.
- [47] TAYLOR-ROBINSON AW, LIEW FY, SEVERN A, XU D, MCSORLEY S, GARSIDE P, PADRON J, PHILIPS RS. Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T-helper type-1 and T-helper type-2 cells. *Eur J Immunol* 1994; **24**: 980–984.
- [48] TEWS DS, GOEBEL HH, SCHNEIDER I, GUNKEL A, STENNERT E, NEISS WF. Expression of different isoforms of nitric oxide synthase in experimentally denervated and reinnervated skeletal muscle. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; **56**: 1283–1289.
- [49] WELLER R, PATTULLO S, SMITH L, GOLDEN M, ORMEROD A, BENJAMIN N. Nitric oxide is generated on the skin surface by the reduction of sweat nitrate. *J Invest Dermatol* 1996; **107**: 327–331.
- [50] WILLIAMS N. NO news is good news – but only for three Americans. *Science* 1998; **282**: 610.
- [51] WILSON RI, YANOVSKY J, GODECKE A, STEVENS DR, SCHRADER J, HAAS HL. Endothelial nitric oxide synthase and LTP [letter]. *Nature* 1997; **386**: 338.
- [52] WU G, MORRIS SM. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 1998; **336**: 1–17.
- [53] XIE K, HUANG S, DONG Z, S-H. J, WANG Y, FIEDLER IJ. Destruction of bystander cells by tumor cells transfected with inducible nitric oxide (NO) synthase gene. *J Natl Cancer Inst* 1997; **89**: 421–427.
- [54] ZAHRADNIKOVA A, MINAROVIC I, VENEMA RC, MESZAROS LG. Inactivation of the cardiac ryanodine receptor calcium release channel by nitric oxide. *Cell Calcium* 1997; **22**: 447–454.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano 30,12,1998 r.

Przyjęto: 10.01.1999 r.

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

e-mail: cwojcik@ib.amwaw.edu.pl

MECHANIZMY KWITNIENIA ROŚLIN. I. UWARUNKOWANIA FIZJOLOGICZNO-ŚRODOWISKOWE*

REGULATION OF FOWERING IN PLANTS. I. PHYSIOLOGICAL AND ENVIRONMENTAL IMPLICATIONS

Andrzej TRETYN^{1,2}, Jan KOPCEWICZ¹

¹Zakład Fizjologii i Morfogenezy Roślin, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń, ²Zakład Biologii Komórki, Akademia Rolniczo-Techniczna im. M. Oczapowskiego, Kortowo-Olsztyn

Streszczenie. U wielu roślin kwitnienie jest uzależnione od termoindukcji (wernalizacji) bądź działania odpowiedniego fotoperiodu – indukcji fotoperiodycznej. Badania fizjologiczne wykazały, że miejscem percepcji sygnałów fotoperiodycznych są liście lub/i liścienie. Obniżona temperatura działa bezpośrednio na merystemy wierzchołkowe pędów. Zarówno w przypadku termo-, jak i fotoindukcji wierzchołki wzrostu stają się kompetentne do tworzenia kwiatów. Efekt wernalizacyjny jest stabilny w trakcie kolejnych podziałów mitotycznych, nawet długo po zakończeniu termoindukcji. Wykazano, że zmiany we wzorcu metylacji DNA w dzielących się komórkach merystemów wierzchołkowych odgrywają kluczową rolę w procesie wernalizacji. Molekularne mechanizmy fotoperiodycznej indukcji kwitnienia są bardzo złożone. Ważnym składnikiem biorącym udział w odbiorze bodźców fotoperiodycznych jest fitochrom, który rejestruje włączenie i wyłączenie światła w cyklu dobowym, a także współdziała z endogennym zegarem biologicznym. Przypuszcza się, że zarówno labilna, jak i stabilna pula fitochromu odgrywają kluczową rolę w mechanizmie pomiaru czasu u roślin dnia długiego. Natomiast indukcja kwitnienia roślin krótkodniowych wydaje się być głównie pod kontrolą fitochromu stabilnego. Droga szczepli wykazano, że w organach odpowiadających za odbiór bodźców fotoperiodycznych syntetyzowane są substancje, które transportowane do merystemów wierzchołkowych pędu stymulują bądź hamują powstawanie zawiązków kwiatowych. Jednakże jak dotąd nie ustalono chemicznej natury tych substancji.

*Praca ta powstała w trakcie realizacji badań finansowanych przez Unię Europejską (INCO-Copernicus Programme, Grant IC 15-CT96-0920) oraz Uniwersytet M. Kopernika (Grant JM Rektora UMK).

Słowa kluczowe: wernalizacja, fotoperiodyczna indukcja kwitnienia.

Summary. In many plant species flowering is promoted by exposure to low temperature (vernalization) or to exact photoperiod (photoperiodic induction). By using different physiological approaches it has been demonstrated that leaves are the sites of photoperiodic perception. Cold is perceived at the shoot apex. However, in both cases cold- or photoperiod treatment causes the shoot apex to become competent to formation of flower. Received low temperature information at the shoot apices stable through mitotic cell division even in the absence of cold. It has been shown that changes in the DNA methylation pattern of the dividing merystematic cells play a critical role in plant vernalization. The molecular mechanism of photoperiodic flower induction is very complex. Photoreceptors are essential components of the daylength-measuring mechanism, where they set the phase of, and interact with, the circadian rhythms acting as biological timekeepers. Both labile and stable phytochromes play an important role in the daylength-sensing mechanism in long-day-plants. On the other hand, daylength sensitivity in short-day-plants seems to be controlled by stable phytochrome. The results of grafting experiments provide evidences for the existence of transmissible flower-inducing and flower-inhibiting signals, which formation is under phytochrome control. The identities of the flowering signals have been the subjects of much research from which no clear-cut answers have emerged.

Key words: vernalization, photoperiodic flower induction.

1. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA KWITNIENIA

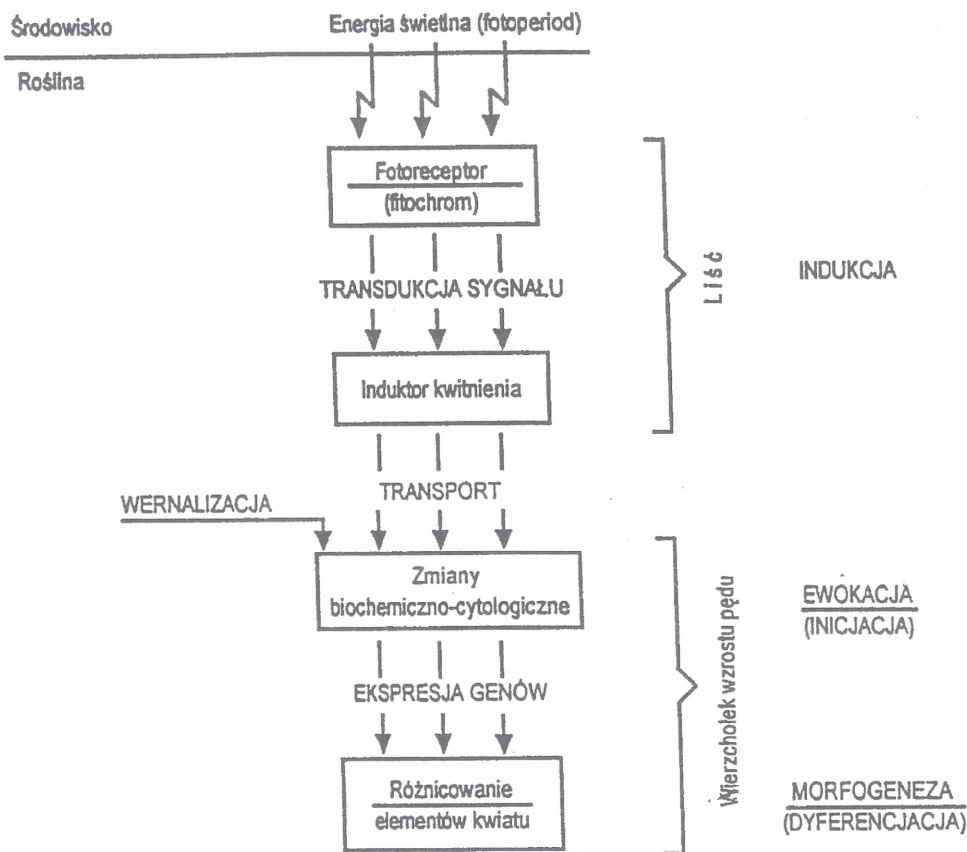
Po zakończeniu okresu młodocianego, w którym następuje różnicowanie wegetatywne, roślina osiąga stan gotowości do kwitnienia i wchodzi w okres różnicowania generatywnego. Gotowość do kwitnienia polega prawdopodobnie na uzyskaniu zdolności do tworzenia poza wierzchołkami wzrostu określonych sygnałów, impulsów czy induktorów kwitnienia, które przemieszczając się w roślinie, indukują w wierzchołkach wzrostu pędu tworzenie zawiązków kwiatowych [27,36]. Zawiązki te powstają z przekształcenia pąka wierzchołkowego w pojedynczy kwiat terminalny lub tworzą się zamiast zawiązków liściowych i pąków pachwinowych [6,27].

U roślin okrytonasiennych wyróżnia się dwa odmienne wzorce rozwojowe związane z przejściem od fazy wegetatywnej do generatywnej. W pierwszym przypadku nieodróżniony merystem wegetatywny bezpośrednio przekształca się w merystem generatywny. W przypadku drugim, merystem wegetatywny przekształca się w kwiatostanowy, z którego następnie powstają rozgałęzione pędy kwiatostanowe zakończone licznymi merystemami kwiatowymi [18,43]. Rośliny w zależności od przynależności systematycznej wytwarzają merystemy kwiatostanowe zdeterminowane (o ustalonej, genetycznie uwarunkowanej architekturze) i niezdedeterminowane (o kształcie zależnym od modulacyjnego wpływu czynników zewnętrznych na określone geny kwiatowe). Do pierwszego typu roślin zaliczyć można kukurydzę oraz słonecznik, które zawsze tworzą kwiatostany w kształcie kolby i główki. U innych roślin, jak na przykład rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*), powstające kwiatostany nie mają zdeterminowanego kształtu i wielkości, które w dużej mierze zależą od warunków środowiskowych [42].

U roślin jednorocznych czy wieloletnich kwitnących i owocujących tylko jeden raz w ich cyklu życiowym (monokarpicznych) tworzenie kwiatów inicjuje proces ich starzenia się i obumierania. Natomiast u roślin wieloletnich, kwitnących wielokrotnie (polikarpicznych), każdego roku (lub sezonu wegetacyjnego) tylko część merystemów wegetatywnych przekształca się w generatywne. Przejście rośliny z fazy wegetatywnej do generatywnej, czyli tzw. proces morfogenezy generatywnej, jest sterowany genetycznie [2,29,32]. Rośliny podzielić można na te, których kwitnienie indukowane jest jedynie czynnikami wewnętrznymi (rośliny neutralne) oraz takie u których kwitnienie uzależnione jest przez warunki temperaturowo-światłne [19,27,36]. Rośliny drugiego typu pozostają wegetatywne w niesprzyjających warunkach środowiskowych. Rośliny neutralne przechodzą więc w stan generatywny bez wyraźnego udziału bodźców termicznych czy fotoperiodycznych, zaś rośliny wrażliwe na czynniki środowiskowe wkraczają w fazę rozwoju generatywnego w wyniku indukcji kwitnienia, która może być spowodowana temperaturą (termoindukcja, wernalizacja, jaryzacja) bądź światłem (indukcja fotoperiodyczna, fotoindukcja generatywna) [25,26,35]. Indukcja kwitnienia jest więc początkowym etapem przejścia roślin do fazy generatywnej, która rozpoczyna proces morfogenezy generatywnej, a jego dalszymi etapami są ewokacja i morfogeneza kwiatu (rys. 1).

2. TERMICZNA INDUKCJA KWITNIENIA (WERNALIZACJA)

Kwitnienie niektórych roślin (tzw. jarych) jest niezależne od działania temperatury. U wielu roślin ozimych okresowe działanie obniżonej temperatury ma istotny wpływ na przejście z fazy wegetatywnej do generatywnej. Jednakże dla jednych czynnik ten jest całkowicie niezbędny (obligatoryjny), dla innych zaś stanowi jedynie element przyspieszający (fakultatywny) kwitnienie. Rośliny wymagające wernalizacji przechodzą okres chłódów późną jesienią lub/i zimą w formie spęczniałych nasion lub młodych siewek (jednoroczne oziminy) bądź w stadium dojrzałości wegetatywnej (rośliny dwu- i wieloletnie). Temperatury indukujące kwitnienie wahają się w granicach od 0 do +10°C. Długość okresu wernalizacji, to jest niezbędna liczba dni trwania obniżonej temperatury, jest zróżnicowana w zależności od gatunku. Najczęściej wynosi on od kilkunastu do kilkudziesięciu dni. Wernalizacji mogą ulegać różne organy roślin, jednakże efektywna indukcja kwitnienia zachodzi w dzielących się lub zdolnych do podziału komórkach [26,27,36]. W nasionach miejscem percepcji bodźca temperaturowego są zarodki, natomiast w przypadku siewek i dojrzałych wegetatywnie roślin są nim merystemy wierzchołkowe pędów. Po odbiorze efekt wernalizacji zostaje na pewien czas utrwalony. Przykładowo zwernalizowane rośliny



RYSUNEK 1. Schemat ilustrujący przebieg kolejnych faz fotoperiodycznej indukcji kwitnienia; dodatkowo zaznaczono miejsca, w których proces kwitnienia może być indukowany przez niską temperaturę (wernalizację); w tym przypadku synteza czynnika stymulującego kwitnienie może zajść na terenie wierzchołka wzrostu pędu lub też jest on transportowany do tego organu z innych części rośliny

Hyoscyamus niger mogą utrzymać efekt wernalizacyjny przez okres około 100 dni, jeżeli rozwijają się w warunkach nieindukcyjnego fotoperiodu. Po pewnym czasie jednak efekt wernalizacji zanika i rośliny ulegają dewernalizacji, która zachodzi również w wyniku ich traktowania podwyższoną temperaturą (ok. 40°C przez okres 1–2 dni).

Jak wykazano, efekt wernalizacji nie podlega przekazaniu następnym pokoleniom roślin. Zdobyte podczas wernalizacji zdolności do kwitnienia zanikają podczas procesu mejozy, prowadzącego do powstawania komórek linii generatywnej. Wykazano także, że rośliny namnażane drogą mikropropagacji z materiału poddanego wcześniej wernalizacji są zdolne do kwitnienia [10].

Mechanizmy leżące u podstaw wernalizacji nie są do końca poznane. Nie ma jednak wątpliwości, iż wiążą się one z wpływem niskich temperatur na przepuszczalność błon komórkowych oraz ekspresję tzw. genów wernalizacyjnych. Dużą rolę w tym procesie odgrywają również fitohormony, a zwłaszcza gibereliny [4,31,42,60]. Badania nad genetyczną kontrolą wernalizacji wskazują, że odpowiedzialne za wymagania wernalizacyjne, w zależności od gatunku, są pojedyncze bądź wielokrotne geny o charakterze dominującym bądź recesywnym. Na przykład u pszenicy wymagania wernalizacyjne są kontrolowane przez kilka genów z rodziny *VRN*. Zmienność pomiędzy tymi genami jest w głównej mierze przyczyną różnic w wymaganiach wernalizacyjnych odmian ozimych i jarych. Recesywne allele powodują „ozimność” i wrażliwość na działanie niskich temperatur. Zidentyfikowanie u roślin szeregu genów związanych z wymaganiami wernalizacyjnymi, stawia pytanie o charakter molekularnych zmian, które powstają w wyniku ich ekspresji. Jedną z pierwszych prac na ten temat była publikacja [10], w której wykazano, że późnokwitnące mutanty dwóch roślin z rodziny krzyżowych – *Arabidopsis thaliana* i *Thlaspi arvense* zakwitają znacznie wcześniej po potraktowaniu ich chłodem. Z drugiej strony rośliny poddane działaniu 5-azacytydyną (związkiem hamującym aktywność metylotransferazy DNA) zakwitwały bez uprzedniej termoindukcji. Jednakże następne ich pokolenie do zakwitania wymagały ponownego traktowania chłodem [10]. Zablokowanie transkrypcji metylotransferazy przez wprowadzenie antysensownego mRNA doprowadziło do około 70% spadku poziomu metylacji DNA, podczas gdy u roślin kontrolnych, poddanych wernalizacji wartość ta sięga jedynie 15% [18]. Transgeniczne rośliny rzodkiewnika zakwitwały znacznie szybciej od kontrolnych, nawet bez ich uprzedniego traktowania chłodem. Właściwość tę utrzymywały w dwóch kolejnych pokoleniach. Również u mutantu *ddml* (od *decreased DNA methylation*), charakteryzującego się obniżonym poziomem metylacji DNA, indukowane chłodem zakwitanie obserwowano znacznie wcześniej niż u roślin kontrolnych. Jednakże, podobnie jak u form dzikich, potomstwo wspomnianego mutantu nie było zdolne do zakwitania bez uprzedniej termoindukcji [18].

Jakie konsekwencje biologiczne może mieć proces metylacji DNA? Szacuje się, że u roślin wyższych około 30% reszt cytozynowych wchodzących w skład DNA ulega metylacji [44]. Biorąc pod uwagę, że u zwierząt metylacja DNA prowadzi do hamowania ekspresji pewnych genów [23], można sądzić, że podobny proces ma również miejsce w komórkach roślinnych. Jest zatem prawdopodobne, że w warunkach obniżonej temperatury w komórkach, które przechodzą fazę S, dochodzi do spadku poziomu metylacji nukleotydów cytozynowych. Prowadzi to do odblokowania genów związanych z indukcją kwitnienia, wśród nich kodującego hydroksylazę kwasu kaurenowego, kluczowego enzymu uczestniczącego w biosyntezie giberelin [10]. Inne geny potencjalnie biorące udział w procesie wernalizacji zostały nazwane odpowiednio *FCA* i *VRN12* i 3. [13,31,32]. Mutacja w pierwszym z nich prowadzi do znacznego przyspieszenia procesu kwitnienia późno kwitnących eko-

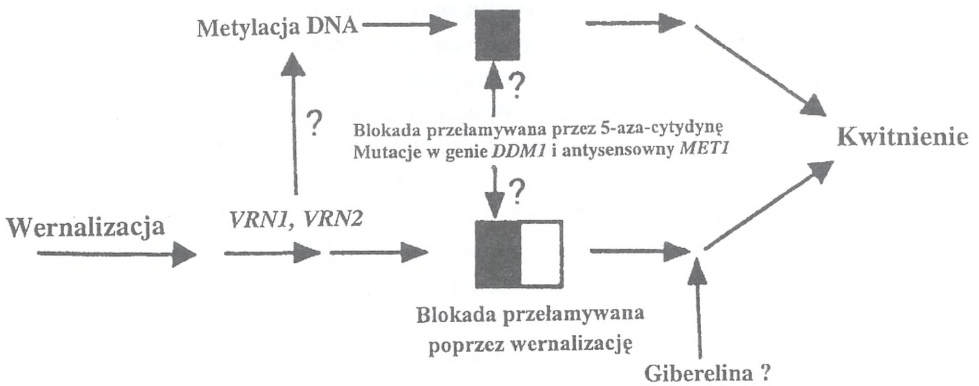
typów rzodkiewnika po ich traktowaniu przez okres od 2 do 8 tygodni temperaturą 4°C [31,32]. Z kolei mutacja w *loci VRNI* powodowała, że termoindukowane rośliny zakwitały wcześniej, gdy wytwarzały o połowę mniej liści niż formy typu dzikiego [13]. Jak dotąd, nie poznano struktury białek kodowanych przez wszystkie wyżej wymienione geny. Ostatnio przebadano ekspresję genów podczas procesu wernalizacji *Brassica campestris* [24]. W tym celu z merystemów oraz liści roślin kontrolnych i poddanych termoindukcji wyizolowano Poly(A)mRNA, a na jego bazie skonstruowano bibliotekę cDNA. Porównując obie uzyskane biblioteki stwierdzono, że dwa z czternastu otrzymanych opisaną drogą klonów cDNA ulega wybiorniejszej ekspresji w tkankach szczytowego pąka kwiatowego. Po zsekwencjonowaniu tych klonów okazało się, że nie wykazują one istotnego podobieństwa do żadnego z już poznanych genów [24].

Jak wiadomo, do zajścia procesu wernalizacji wymagana jest obecność w merystemie wierzchołkowym dzielących się komórek. Im dłuższy jest okres chłodu, tym większa ich liczba poddana jest jego działaniu, a tym samym odpowiedź wernalizacyjna jest większa. Indukowana chłodem demetylacja może efektywnie zachodzić podczas fazy S cyklu komórkowego, kiedy zachodzi proces replikacji DNA. Powoduje to, iż po kolejnych rundach replikacji przybywa komórek z zdemetylowanym DNA, co prowadzi do zmian struktury przestrzennej chromatyny i odblokowania określonych genów. Po osiągnięciu ponadprogowego poziomu białek (prawdopodobnie specyficznych czynników transkrypcyjnych), będących produktami tych genów, dochodzi do zainicjowania morfogenezy kwiatów, w których, jak można przypuszczać, utrzymuje się niski poziom metylacji DNA.

Wernalizacja może prowadzić do demetylacji jedynie pewnych specyficznych odcinków chromatyny. Może mieć ona charakter przejściowy, gdyż przeniesienie roślin rzodkiewnika do podwyższonej temperatury powoduje ponowną metylację DNA [18]. Aby po zakończeniu okresu chłodu uzyskane właściwości mogły pozostawać trwałe w trakcie wzrostu roślin w wyższej temperaturze (od zakończenia wernalizacji do inicjacji zawiązków kwiatowych może upłynąć wiele miesięcy), istotne dla kwitnienia odcinki DNA muszą być blokowane przez specyficzne białka (czynniki transkrypcyjne) lub podlegać konformacyjnym zmianom uniemożliwiającym ich ponowną metylację. Na podstawie dostępnej wiedzy można zaproponować następujący schemat ilustrujący mechanizm procesu wernalizacji u rzodkiewnika (rys. 2).

3. FOTOPERIODYCZNA INDUKCJA KWITNIENIA

Fotoperiodyzm jest reakcją roślin na zmieniający się w cyklu dobowym czas trwania i periodyczne następstwo okresów światła i ciemności. Poza strefą równikową, na całej kuli ziemskiej długość dnia i nocy zmienia się sezonowo. Dlatego fotoperiodyzm jest ewolucyjnym przystosowaniem się roślin do życia w strefach



RYSUNEK 2. Schemat ilustrujący przypuszczalny przebieg procesu wernalizacji u rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*); w wyniku traktowania nasion lub siewek chłodem dochodzi do aktywacji specyficznych genów (*VRN1* i *VRN2*), których produkty przez zróżnicowany wpływ na aktywność innych genów (związanych z metabolizmem giberelin) inicjują proces kwitnienia; podobny efekt można uzyskać traktując rośliny gibereliną lub manipulując procesami odpowiedzialnymi za kontrolę metylacji DNA; w wyniku obniżenia poziomu metylacji reszt cytozynowych można doprowadzić do zakwitnięcia roślin; efekt ten można uzyskać traktując je 5-aza-cytydyną, indukując mutacje *ddm1* kodującym metylotransferazę DNA lub wprowadzając do roślin sekwencje antysensowną w stosunku do *MET1* mRNA (dalsze szczegóły w tekście, na podstawie [18], zmienione)

o określonym następstwie pór roku, co wywiera zasadniczy wpływ na długość trwania okresu światła i ciemności. Po raz pierwszy zjawisko fotoperiodyzmu u roślin zostało opisane prawie 80 lat temu [19]. Od tego czasu opublikowano znaczną liczbę prac doświadczalnych i monografii dotyczących tego zagadnienia. Istotny postęp w poznaniu podstaw fotoperiodyzmu u organizmów żywych nastąpił dopiero po odkryciu mechanizmu działania zegarów biologicznych [20,38].

Biorąc pod uwagę wymagania fotoperiodyczne, wyróżnia się rośliny dnia krótkiego (SDP, od ang. *Short Day Plants*) i długiego (LDP, od ang. *Long Day Plants*), rośliny krótko-długo-dniowe (SLDP), długo-krótko-dniowe (LSDP) oraz fotoperiodycznie neutralne (DNP, od ang. *Day Neutral Plants*)[36]. Rośliny dnia krótkiego (np. *Pharbitis nil*, *Chenopodium rubrum*) indukowane są do kwitnienia, gdy okres ciemności (nocy indukcyjnej) przekroczy krytyczną wartość [27]. Tego typu rośliny kwitną zazwyczaj wczesną wiosną lub wczesną jesienią. Rośliny dnia długiego (np. *Arabidopsis thaliana*, *Hyoscyamus niger*) kwitną latem, gdyż do indukcji kwitnienia wymagają odpowiednio długiej fazy jasnej (dnia) i krótkiego okresu ciemności (nocy)[1,27]. U roślin typu SLDP i LSDP inicjacja kwitnienia jest uzależniona od ekspozycji roślin na określone fotoperiody w odpowiedniej kolejności. Kwitnienie roślin fotoperiodycznie neutralnych (np. pomidora, kukurydzy) jest niezależne od fotoperiodu, a ich przejście z fazy rozwoju wegetatywnego do generatywnego jest indukowane czynnikami natury wewnętrznej (osiągnięciem określonego stadium dojrzałości i reagowaniem na induktory kwitnienia)[26,27,36].

U roślin o ilościowej reakcji fotoperiodycznej (wrażliwości względnej) ekspozycja na indukcyjny fotoperiod tylko przyspiesza kwitnienie, podczas gdy u roślin o jakościowej reakcji fotoperiodycznej (wrażliwości bezwzględnej) ekspozycja na odpowiedni fotoperiod bezwzględnie warunkuje indukcję fotoperiodyczną [36]. Niektórym roślinom o bezwzględnej wrażliwości wystarczy tylko jeden indukcyjny fotoperiod do zakwitnięcia (np. *Pharbitis nil*, *Chenopodium rubrum*), inne zaś wymagają kilku odpowiednich fotoperiodów (np. *Hyoscyamus niger*). U tych ostatnich często obserwuje się efekt sumowania indukcyjnych fotoperiodów, nawet gdy przerywane są one nieindukcyjnymi warunkami świetlnymi [27,36].

Indukcja fotoperiodyczna polega na percepcji przez roślinę właściwego dla niej fotoperiodu, co w konsekwencji powoduje uruchomienie łańcucha reakcji metabolicznych prowadzących do morfogenezy kwiatu. Roślina zaindukowana zakwitnie nawet po zmianie warunków fotoperiodycznych na nieindukcyjne. W wyniku indukcji fotoperiodycznej dochodzi do powstania w roślinie pewnych trwałych zmian, które początkowo nie są zauważalne zarówno na poziomie anatomicznym, jak i morfologicznym. Ten przejściowy stan nazywany jest często okresem ewokacji [6].

Najefektywniejszymi organami percepcji bodźca fotoperiodycznego są młode liście bądź liścienie [6,7,27,36,41]. W wyniku indukcji fotoperiodycznej powstaje w liściach określony impuls, często nazywany „induktorem kwitnienia”, który następnie transportowany jest do wierzchołków wzrostu pędu, gdzie zapoczątkowuje zmiany o naturze biochemicznej, cytologicznej, anatomicznej i morfologicznej, zakończone wytworzeniem kwiatów [6,7].

3.1. Odbiór bodźców fotoperiodycznych

W indukcji fotoperiodycznej występuje pewna podstawowa sekwencja zdarzeń (rys. 1). Światło (jakość, fotoperiod) jest absorbowane przez specyficzny fotoreceptor – fitochrom, którego właściwości ulegają zmianie. W wyniku zajścia tych zmian dochodzi do inicjacji określonych procesów metabolicznych (łańcuch transdukcji sygnału), prowadzących do zróżnicowanej ekspresji genów oraz powstania hipotetycznego induktora kwitnienia. Miejscem percepcji bodźców fotoperiodycznych są liście lub znacznie rzadziej liścienie [6,41]. W organach tych powstaje induktor (natury chemicznej bądź fizycznej) informujący roślinę o zaistnieniu indukcji generatywnej. Sygnał ten wiązkami przewodzącymi (prawdopodobnie floemem) przemieszcza się z liści do wierzchołków wzrostu, gdzie uruchamia proces ewokacji i morfogenezy kwiatu [6,7,41].

3.1.1. Fitochrom i zegar biologiczny

Rośliny reagują na bodźce fotoperiodyczne dzięki wykształceniu systemu fotoreceptorów zdolnych do recepcji natężenia, barwy i czasu trwania promieniowania. Podstawowym barwnikiem uczestniczącym w odbiorze informacji niesionych przez

światło jest fitochrom [25,34], który wspólnie z receptorem światła niebieskiego – kryptochromem [46,49] reguluje procesy fotomorfogenezy roślin [11,15].

Wiedza na temat budowy i mechanizmu działania fitochromu jest ogólnie dostępna zarówno w piśmiennictwie zagranicznym [25], jak i polskojęzycznym [34,45–46,48,54], w związku z czym w niniejszym artykule omówimy tylko podstawowe właściwości tego fotoreceptora.

Fitochrom (Phy) jest chromoproteina zbudowaną z części białkowej i chromoforowej. Masa cząsteczkowa apoproteiny, w zależności od gatunku, waha się w granicach od 120 do 130 kDa. Grupa chromoforowa fitochromu zbudowana jest z otwartego pierścienia tetrapirołowego, o budowie zbliżonej do barwników fotosyntetyzujących (fikobilin) niektórych glonów. Grupa chromoforowa przyłączona jest do łańcucha polipeptydowego przez resztę cysteinową [46,48].

Fitochrom występuje w dwóch fotoodwracalnych formach molekularnych. Pierwsza z nich, określana jako Pr absorbująca światło czerwone (maksimum ok. 660 nm) przekształca się w formę Pfr. Ta zaś pochłaniając daleką czerwień przekształca się ponownie do Pr [55]. Zjawisko to, o kluczowym znaczeniu biologicznym, nazwane jest fotokonwersją fitochromu. W zależności od warunków świetlnych (to jest od tego, która barwa światła – czerwona czy też daleka czerwień – przeważa w środowisku wzrostu rośliny), w tkankach roślinnych ilościowo dominuje jedna ze wspomnianych form fitochromu (w tych okolicznościach ustanawia się tzw. stan fotostacjonarny)[33,54]. Aby w pełni zrozumieć mechanizm percepcji światła przez Phy, należy pamiętać, że u roślin funkcjonują dwie fizjologiczno-genetycznie odmienne pule fitochromu Pfr. W roślinach etiolowanych (wyrosłych w ciemności) lub poddanych długotrwałej ciemniowej adaptacji (reetiolacji) przeważa labilna pula fitochromu, określana jako PI lub PhyA [55]. Charakteryzuje się ona drugim okresem półtrwania w ciemności, natomiast po naświetleniu światłem białym lub czerwonym (fotokonwersji Pr do Pfr) fitochrom labilny ulega szybkiej degradacji (dotyczy to formy Pfr). Procesowi temu towarzyszy zahamowanie ekspresji genu kodującego białkowy składnik fotoreceptora [48]. Z drugiej strony fitochrom stabilny (PII lub PhyB) jest trwały zarówno w ciemności, jak i na świetle. Obie pule fitochromu kodowane są przez różne grupy (rodziny) genów, których ekspresja podlega odmiennej (foto)regulacji [48].

Istnienie dwu form fitochromu Pfr u roślin wynika z ekofizjologicznych funkcji, jakie pełni ten barwnik. Fitochrom labilny wyspecjalizowany jest w percepcji bardzo niskich (reakcje bardzo niskoenergetyczne) i wysokich (reakcje wysokoenergetyczne) dawek światła (głównie dalekiej czerwieni). Natomiast fitochrom stabilny absorbuje światło czerwone o pośrednich zakresach natężenia promieniowania [46,55]. Fitochrom labilny zaangażowany jest w kontrolę kiełkowania nasion oraz zachodzące pod powierzchnią gleby pierwsze etapy wzrostu siewek, a także fotomorfogenezę roślin rozwijających się pod baldachimem (w zacienieniu) innych roślin. W obu tych warunkach środowiskowych dominuje światło dalekiej czerwieni. Z drugiej

strony fitochrom stabilny kontroluje tzw. klasyczne (fotoodwracalne) reakcje fotomorfogenetyczne, takie jak kiełkowanie nasion na powierzchni gleby i wzrost roślin na wolnej przestrzeni [55]. Obie pule fitochromu mogą również współdziałać ze sobą, czego przykładem jest fotoperiodyczna kontrola kwitnienia roślin [57].

Poza systemem fotoreceptorów fotoperiodyczna indukcja kwitnienia bezpośrednio związana jest z funkcjonowaniem zegara biologicznego. Ten zaś jest następstwem ruchu obrotowego Ziemi wokół własnej osi powodującego dobowe zmiany zarówno w długości dnia i nocy, jak i temperatury. Zegar biologiczny pełni podstawowe funkcje regulatorowe u wszystkich organizmów żywych, od jednokomórkowych po samego człowieka. Każda komórka wyposażona jest w swój indywidualny miernik czasu, a niektóre nawet w dwa lub większą ich liczbę [20]. Przykładem może być *Gonyaulax*, jednokomórkowy glon (obiekt wieloletnich zainteresowań chronobiologów), u którego stwierdzono funkcjonowanie co najmniej dwóch niezależnych zegarów biologicznych. W ostatnim czasie poczyniono ogromny postęp w badaniach nad mechanizmem działania zegarów biologicznych u sinic, owadów (*Drosophila melanogaster*), grzybów (*Neurospora crassa*) oraz organizmów bez- i kręgowych, a ostatnio również u roślin wyższych [20,38].

W skład zegara biologicznego wchodzi trzy elementy. Pierwszy z nich to oscylator, który generuje 24-godzinny rytm. Kolejną składową tego systemu to czujnik sygnałów świetlnych (ang. the *input signalling pathway*), który uczestniczy w dostrajaniu (ang. *reset*) oscylatora. W wyniku współdziałania obu wymienionych elementów powstaje zintegrowany sygnał wyjściowy (ang. *output pathway*) oddziałujący na procesy regulowane przez zegar biologiczny [38]. U roślin wyższych, w tym u *Arabidopsis thaliana*, aktywność wielu genów regulowana jest przez zegar biologiczny. Wśród nich jednym z najlepiej poznanych jest gen *CAB* (wcześniej określany jako *lhcb*), kodujący integralny składnik wewnętrznej błony chloroplastów – białko wiążące chlorofil a/b (LHCB). Aktywność tego genu podlega dobowym oscylacjom, a maksimum jego ekspresji obserwuje się 4 do 6 godzin po wschodzie słońca. Sam gen *CAB* nie jest jednak składnikiem systemu odmierzającego czas, a jedynie podlega jego kontroli [38]. Ostatnio wykryto, że nadrzędną w stosunku do niego rolę pełnią dwa inne geny: *CCA1* i *LHY*, kodujące czynniki transkrypcyjne z rodziny *myb* [38]. Ich ekspresja podlega dobowym oscylacjom, a ponadto białko CCA1 wiąże się z promotorem odcinkiem genu *CAB*, a jego poziom regulowany jest przez system fitochromowy. Ze względu na swoje molekularne właściwości (czynników transkrypcyjnych) produkty obu wymienionych genów mogą regulować aktywność genów wykazujących dobowe oscylacje swojej aktywności. Z drugiej strony te same właściwości wskazują, że również one podlegają regulacji wyższego rzędu. Dlatego u roślin poszukuje się odpowiedników (ortologów) genów: *frequency* (*frq*) u *Neurospora* oraz *timeless* (*tim*) i *period* (*per*) u *Drosophila* [20]. U *Neurospora* *frq* jest transkrypcyjnie aktywny na początku dnia. Białkowy produkt tego genu transportowany jest do jądra około 3–4 godziny po tym, jak *frq* mRNA osiąga

maksymalny poziom. Powoduje to szybkie obniżenie jego ekspresji pod koniec każdego dnia. Jednakże pod koniec nocy rezydujące w jądrze białko FRQ podlega fosforylacji, a następnie degradacji, co przyczynia się do ponownego odblokowania genu *frq* przed nastaniem kolejnego dnia [20]. U *Drosophila* odkryto inny od wyżej opisanego, molekularny mechanizm powstawania dobowych oscylacji. Na początku fazy jasnej obserwuje się niski poziom transkrypcji genów *per* i *tim*, który następnie wzrasta osiągając swoje maksima krótko po rozpoczęciu się fazy ciemnej. Najwyższy poziom białek PER i TIM występuje 4–6 godzin później. Białka te oddziałują ze sobą na terenie cytoplazmy, a następnie, około północy, przedostając się do jąder powodują stopniowe blokowanie kodujących je genów. Podobnie jak FRQ również białka PER i TIM podlegają w jądrze stopniowej fosforylacji, która poprzedza ich degradację. Prowadzi to do ponownego odblokowania genów *per* i *tim* [20].

Uważa się, że białkowe produkty opisanych genów u *Neurospora* i *Drosophila* funkcjonują jako czynniki transkrypcyjne. Czy są one odpowiednikami odkrytych u rzodkiewnika białek CCA1 i LHY? Odpowiedź jest negatywna. Ekspresja obu tych czynników transkrypcyjnych regulowana jest przez jeszcze inne geny. Jednym z kandydatów do tej funkcji jest gen *ELF3* (od *early-flowering3*) [59]. Mutacja w tym genie prowadzi do zakwitania *A. thaliana* niezależnie od warunków świetlnych otoczenia (fotoperiodu). Choć nie jest to mutant fitochromowy, jego wzrost na świetle, jak i oscylacyjne zmiany w ekspresji genu *CAB* ulegają zaburzeniom [38,58]. Na tej podstawie można przypuszczać, że gen *ELF3*, w jakiś, dotąd nieznan sposób, zaangażowany jest w funkcjonowanie zegara biologicznego [58]. Jak można przypuszczać, hipoteza ta zostanie wkrótce zweryfikowana, gdyż trwają prace mające na celu sklonowanie tego genu. Rzuci to nowe światło na molekularne podstawy zjawiska fotoperiodyzmu u roślin. Niewątpliwie cechą, która ułatwi poszukiwanie roślinnych genów zaangażowanych w funkcjonowanie zegara biologicznego, jest obecność we wszystkich ich białkowych produktach domeny określanej jako PAS (od *Per*, *Arnt* i *Singleminded*). Sekwencje te wykryto również w prokariotycznych białkach fotoreceptorowych oraz w cząsteczkach fitochromu [20,38,46]. Przypuszcza się więc, że z ewolucyjnego punktu widzenia produkty genów regulowanych przez zegar biologiczny mogą być elementami łączącymi procesy fotorecepcji z mechanizmami umożliwiającymi odmierzanie komórkowego upływu czasu [20].

3.1.2. Łańcuch transdukcji sygnału fotoperiodycznego

Mechanizm fotoperiodycznej kontroli indukcji kwitnienia jest związany z właściwościami fizykochemicznymi fitochromu, który reguluje wiele reakcji o charakterze metabolicznym. Po pochłonięciu światła przez ten fotoreceptor dochodzi do zapoczątkowania kaskady uporządkowanych w czasie i przestrzeni określonych

reakcji (łańcucha transdukcji sygnału), które prowadzą do powstania stanu indukcji generatywnej.

Elementy wchodzące w skład indukowanego przez fitochrom łańcucha transdukcji sygnału są stosunkowo mało znane. Przypuszcza się, że jego istotnymi ogniwami są białka wiążące GTP (G-białka, Gp), fosfoinozytole, jony wapnia, a także kinazy i fosfatazy białkowe [39,55].

Badania prowadzone w pracowni N.-H. Chua [8,9,39,40] doprowadziły do bliższego poznania szlaków transdukcji sygnałów świetlnych. Stwierdzono, że fitochrom A kontroluje trzy szlaki transdukcji sygnałów świetlnych. Pierwszy z nich jest bezpośrednio zależny od jonów wapnia, a jego uruchomienie prowadzi do indukcji aktywowanej przez Ca^{2+} i kalmodulinę kinazy białkowej oraz aktywacji genów kodujących białka fotosystemu II i częściowego rozwoju chloroplastów [40]. Drugi szlak, zależny od cyklicznego GMP stymuluje aktywność odpowiedniej kinazy białkowej oraz kontroluje aktywność transkrypcyjną syntazy chalkonowej, kluczowego enzymu w biosyntezie antocyjanów [8,9]. Szlak trzeci zależny jest zarówno od Ca^{2+} , jak i cGMP, zaś jego aktywacja jest niezbędna dla ekspresji genów kodujących składniki fotosystemu I i hamowania aktywności genu syntazy asparaginianowej [8,9,39]. Fakt istnienia kilku różnych, kontrolowanych przez fitochrom A szlaków transdukcji sygnału został również potwierdzony u mutantu *Arabidopsis*, którego defekt dotyczył genu *FHY1* [5]. Do listy genów kontrolowanych przez fitochrom A dołączono kolejne: *CHI* (izomeryzy chalkonowej), *NR* (reduktazy azotanowej) oraz *PORA* (oksydoreduktazy NADPH: protochlorofilid) [5].

Jak dotąd, bardzo mało wiadomo o szlakach transdukcji sygnału świetlnego kontrolowanych przez fitochrom B (stabilny). Wyselekcjonowano jednak mutant *Arabidopsis*, u którego defekt dotyczył genu *RED1*, uczestniczącego w zależnej od PhyB transdukcji sygnału [56]. Jak można się spodziewać, w najbliższym czasie większość uwagi fotobiologów zwrócona będzie na poznanie mechanizmów działania stabilnej puli fitochromu.

Łańcuch transdukcji sygnału fotoperiodycznego w indukcji kwitnienia nie jest w chwili obecnej dobrze poznany. Założyć jednak można, że istnieją różne kaskady dla PhyA i PhyB. Nie można jednak wykluczyć możliwości, że łańcuchy transdukcji u różnych roślin nie są przynajmniej w szczegółach identyczne. Dokładne badania przeprowadzono na modelowej roślinie dnia krótkiego *Pharbitis nil*. Stosując związki modulujące aktywność różnych składników szlaków transdukcyjnych wykazano, że poza fitochromem w transdukcji sygnałów świetlnych uczestniczy białko(a) G, wapń i cGMP [33,52,54]. Postuluje się także, że fotoperiodycznej indukcji kwitnienia u *Pharbitis nil* towarzyszy aktywacja dwóch różnych szlaków transdukcyjnych - zależnego od wapnia i kalmoduliny [50–53] oraz zależnego od cGMP [39,54]. Szlaki te wiodą przez odpowiednie kinazy do fosforylacji specyficznych białek docelowych odpowiedzialnych za powstanie odpowiedzi metabolicznej, której przejawem jest synteza specyficznego induktora kwitnienia [33,54].

Tak więc łańcuch transdukcji sygnału fotoperiodycznego w liściu prowadzi zarówno do istotnych zmian fizykochemicznych błon komórkowych, jak i do inicjowania subtelných zmian w ekspresji genów. Umożliwia to powstanie specyficznego stanu indukcji generatywnej oraz wytworzenie się w liściu induktora(ów) kwitnienia.

4. INDUKTORY KWITNIENIA

Badania poświęcone mechanizmowi fotoperiodycznej indukcji kwitnienia świadczą jednoznacznie o wytworzeniu się w liściach specyficznego sygnału/induktora(ów) kwitnienia, który po przemieszczeniu się do wierzchołka wzrostu inicjuje w nim procesy generatywne [7]. Charakter induktora kwitnienia pozostaje jednak całkowicie nieznany. Sześćdziesiąt trzy lata temu powstała koncepcja istnienia uniwersalnego hormonu kwitnienia – florigenu [12]. Hormon taki nie został jednak nigdy wyizolowany i zidentyfikowany. Trudności te spowodowały pojawienie się koncepcji, że induktor kwitnienia jest kompleksem zarówno stymulatorów, jak i inhibitorów kwitnienia [27,35]. Uznaje się również rolę czynników pokarmowych [27]. W rezultacie zaproponowano tzw. wieloczynnikowy model kontroli kwitnienia uważając, że o zaistnieniu indukcji generatywnej decydują różne czynniki natury zarówno chemicznej, jak i fizycznej, wśród których ważną rolę odgrywają naturalnie występujące regulatory wzrostu oraz asymilaty [7,8]. Tak więc charakter powstającego w wyniku indukcji fotoperiodycznego sygnału (induktora kwitnienia), pomimo kilkudziesięciu lat intensywnych badań, pozostaje nieznany. Nie można zanegować jego istnienia, ponieważ obecność zarówno stymulatora, jak i inhibitora kwitnienia została potwierdzona pośrednio u wielu gatunków roślin metodą szczepień. Doświadczenia prowadzone ostatnio na mutantach grochu również świadczą o istnieniu stymulatora(ów) i inhibitora(ów) kwitnienia [57].

O ile stymulator wydaje się specyficznie promować zakwitanie, to inhibitor wpływa zarówno na wzrost wegetatywny, jak i różnicowanie generatywne. Poziom inhibitora jest regulowany przez szereg czynników, wśród których najważniejszym jest fotoperiod i układ fitochromowy. Fitochrom A hamuje, zaś fitochrom B – stymuluje powstanie inhibitora [57]. Doświadczenia nad szczepieniami świadczą natomiast, że u ziemniaka PhyB kontroluje powstanie zarówno stymulatora, jak i inhibitora kwitnienia [22].

Istotnym postępowaniem w drodze poznania natury induktorów byłoby sklonowanie i zsekwencjonowanie genów odpowiedzialnych za syntezę modulatorów kwitnienia. Jak dotąd okazało się to jednak niemożliwe. Mutantów mobilnego induktora (promotora czy inhibitora) kwitnienia uzyskać się nie udało [16,30–32]. Poznane dotychczas mutanty kwitnieniowe *Arabidopsis thaliana* są mutantami fotoreceptorów (fitochromu), interakcji z zegarem okołodobowym bądź procesów bezpośrednio związanych z morfogenezą kwiatu. Badania nad wpływem różnych związków che-

micznych na kwitnienie roślin wykazały, że wiele substancji w zróżnicowany sposób oddziałuje na ten proces. Niektóre z nich wykazują także endogenną korelację z procesami kwitnienia [26]. Do substancji aktywnych zaliczyć trzeba fitohormony, poliaminy, brassinosteroidy, sterydy, fenole, oligosacharydy, witaminy. Niewątpliwie ważnymi składnikami kompleksu regulującego kwitnienie są naturalne substancje wzrostowe (fitohormony)[6,7]. Rola poszczególnych fitohormonów w indukcji, ewokacji i morfogenezie kwiatów była wielokrotnie badana i chociaż wyniki są bardzo różne i niejednoznaczne, to jednak zauważyć można, iż gibereliny i cytokiny często stymulują, zaś auksyny, etylen i kwas abscysynowy hamują tworzenie kwiatów [7,33]. Szczególną rolę wydają się odgrywać gibereliny [59]. W przypadku pewnych roślin są one w stanie zastąpić wernalizację oraz długi indukcyjny fotoperiod [4,59]. Natomiast u roślin krótkiego dnia gibereliny stymulują kwitnienie w warunkach niepełnej (podprogowej) indukcji [33]. U wielu roślin stwierdza się jednocześnie podwyższenie zawartości endogennych giberelin w czasie indukcji generatywnej [59]. W badaniach przeprowadzonych na mutantach *Brassica*, *Sorgum*, *Arabidopsis* stwierdzono również, iż obniżona zawartość PhyB (fitochromu stabilnego) w tkankach tych roślin jest związana z podwyższonym poziomem endogennych giberelin i zwiększoną wrażliwością na działanie giberelin [4,32,42].

Obecnie nie budzi więc wątpliwości pogląd, że gibereliny, przynajmniej u niektórych roślin, włączone są w kontrolny mechanizm zakwitania. Istnieje jednak potrzeba precyzyjnego określenia ich roli w różnych etapach kwitnienia, jak również u roślin o różnej wrażliwości fotoperiodycznej. Oczywiście jest, że w kontroli indukcji fotoperiodycznej, niezależnie od czynników natury chemicznej, udział biorą również czynniki fizyczne oraz znajdująca się u podstaw informacja genetyczna zawierająca ogólny schemat rozwojowy rośliny. Dopóki jednak nie zostanie definitywnie rozstrzygnięta natura induktorów kwitnienia, mechanizm indukcji fotoperiodycznej pozostanie niejasny.

W świetle ostatnich badań poza teorią florigenu [3] nowego blasku nabiera również hipoteza sugerująca troficzne podłoże procesu indukcji kwitnienia [14]. Od dawna było wiadomo, że cukry, a zwłaszcza sacharoza mogą odgrywać istotną rolę w indukcji kwitnienia zarówno u roślin krótko- [21], jak i długodniowych [36]. Jednakże uważano, że zmiany w tempie transportu węglowodanów w trakcie indukcyjnego fotoperiodu odgrywają jedynie drugorzędową rolę. W ostatnim czasie wyselekcjonowano jednak kilka mutantów rzodkiewnika, które wykazują zaburzenia w metabolizmie cukrowców i procesach fotoperiodycznej indukcji kwitnienia [31].

Znane są dwa typy mutacji, które przez wpływ na ogólny metabolizm węglowodanów powodują późniejsze zakwitanie *A. thaliana*. Z jednej strony są to takie mutacje jak *pgm* (od *phosphoglucosmutase*) lub *adg1* (od *ADP glucose pyrophosphorylase 1*), które prowadzą do zaburzeń w powstawaniu ziaren skrobi w komórkach liści. Z drugiej natomiast strony u mutantów *sex1* (od *starch excess 1*) i *cam1* (od *carbohydrate accumulation mutant 1*) obserwuje się jej nadmierną akumulację

[31]. Dwa spośród wymienionych mutantów, *pgm* i *sex1* zostały dokładnie przebadane [14]. Rośliny poddawano jednemu indukcyjnemu długiemu fotoperiodowi (LD) lub krótkiemu dniowi o tak dobranych warunkach świetlnych (DSD, od *displaced short day*), które zapewniały uzyskanie podobnej wydajności procesu fotosyntezy. Okazało się, że oba typy mutantów indukowane były do kwitnienia, gdy okres światła był dłuższy od 16 godzin. W wyniku ekspozycji roślin na LD (prowadzącej do podwyższonego kwitnienia) obserwowano szybki i przejściowy wzrost transportu węglowodanów z liści. Natomiast po zastosowaniu pojedynczego DSD, który tylko w niewielkim stopniu stymulował kwitnienie, nie zauważono istotnych zmian w transporcie tych związków poza liście [14]. Wykazano również, że w przypadku stosowania LD przejściowy wzrost transportu węglowodanów nie wymaga ich mobilizacji z ziaren skrobi. Tego typu proces obserwowano jednak podczas traktowania roślin *A. thaliana* DSD. Na podstawie przytoczonych, jak i wcześniejszych wyników [21,37] ich autorzy sugerują, że transportowane przez floem węglowodany są jednym z ważniejszych składników kompleksu substancji wpływających na indukcję kwitnienia roślin fotoperiodycznie wrażliwych.

Przedstawiony wyżej pogląd znajduje poparcie w wynikach badań dotyczących współzależności między fitochromem (głównym fotoreceptorem roślin) a węglowodanowymi szlakami transdukcji sygnałów. Od dawna wiadomo było, że cukry regulują aktywność niektórych enzymów uczestniczących w fotosyntezie oraz innych procesach metabolicznych [28]. Jednak dopiero ostatnio wykazano, że ich ufosforylowane formy mogą pełnić funkcje sygnałowe, prowadzące do zmian ekspresji wielu genów [27]. Na szczególne zainteresowanie zasługuje rola sacharozy w modulowaniu efektów wywołanych przez światło, a kontrolowanych przez układ fitochromowy. Stwierdzono, że sacharoza blokuje ekspresję genów indukowanych przez światło [17]. Wyselekcjonowano także mutant, u którego nie występuje represja przez sacharozę genów indukowanych przez fitochrom A [17].

Mimo silnych argumentów przemawiających za bezpośrednim wpływem węglowodanów na proces indukcji kwitnienia, należy wyjaśnić, czy transport asymilatów z liści do merystemów ma charakter przyczynowy, czy też jest jedynie procesem wspomagającym lub wzmagającym działanie induktorów kwitnienia.

PODSUMOWANIE

Ostatnie lata przyniosły znaczący postęp w badaniach nad mechanizmem indukcji kwitnienia [47]. Wykazano, że zmiany we wzorcu metylacji DNA w dzielących się komórkach merystemów wierzchołkowych pędów odgrywają kluczową rolę w procesie wernalizacji. Określono udział różnych pul fitochromu (labilnej i stabilnej) w kontroli fotoperiodycznej indukcji kwitnienia. Częściowo opisano elementy łańcuchów transdukcji sygnałów fitochromowych. U pewnych roślin (zwłaszcza rzodkiewnika) poznano niektóre geny odpowiedzialne za powstanie odpowiedzi

fotoperiodycznych [47]. Mimo nasilenia badań jak dotąd nie odkryto chemicznej natury hipotetycznej substancji (florigenu), której synteza (lub uwalnianie) i transport do merystemów wierzchołkowych pędów prowadziłyby do indukcji kwitnienia. Istotnym krokiem na tej drodze będzie prawdopodobnie sklonowanie i zsekwencjonowanie genów, których białkowe produkty są bezpośrednio zaangażowane w metabolizm poszukiwanego od 63 lat florigenu. Rozstrzygnięciem tej zagadki zajmuje się obecnie wiele laboratoriów na całym świecie.

LITERATURA

- [1] AMASINO RM. Control of flowering time in plants. *Curr Opin Genet Dev* 1996; **6**: 480–487.
- [2] AUKERMAN MJ, AMASINO RM. Molecular genetic analysis of flowering time in *Arabidopsis*. *Semin Cell Dev Biol* 1996; **7**: 427–433.
- [3] AUKERMAN MJ, AMASINO RM. Floral induction and florigen. *Cell* 1998; **93**: 491–494.
- [4] BAGNALL DJ. The control of flowering of *Arabidopsis thaliana* by light, vernalisation and gibberellins. *Aust J Plant Physiol* 1992; **19**: 401–409.
- [5] BARNES S.A., QUAGGIO RB, WHITELMAN GC, CHUA N-H. *fhy1* defines a branch point in phytochrome A signal transduction pathways for gene expression. *Plant J* 1996; **10**: 1155–1161.
- [6] BERNIER G. The control of floral evocation and morphogenesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1988; **39**: 175–219.
- [7] BERNIER G, HAVELANGE A, HOUSSA C, PENTITJEAN A, LEJEUNE P. Physiological signals that induce flowering. *Plant Cell* 1993; **5**: 1147–1155.
- [8] BOWLER C, NEUHAUS G, YAMAGATA H, CHUA N-H. Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell* 1994a; **77**: 73–81.
- [9] BOWLER C, YAMAGATA H, NEUHAUS G, CHUA N-H. Phytochrome signal transduction pathways are regulated by reciprocal control mechanisms. *Genes Dev* 1994b; **8**: 2188–2202.
- [10] BURN JB, BAGNALL DJ, METZGER JD, DENNIS ES, PEACOCK WJ. DNA methylation, vernalization, and the initiation of flowering. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 287–291.
- [11] CASHMORE AR. The cryptochrome family of photoreceptors. *Plant Cell Environ* 1997; **20**: 764–767.
- [12] CHAILAKHYAN MK. On the hormonal theory of plant development. *C R (Dokl) Acad Sci USSR* 1936; **3**: 443–447.
- [13] CHANDLER J, WILSON A, DEAN C. *Arabidopsis* mutants showing an altered response to vernalization. *Plant J* 1996; **10**: 637–644.
- [14] CORBESIER L, LEJEUNE P, BERNIER G. 1998. The role of carbohydrates in the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison between the wild type and a starchless mutant. *Planta* 1998; **206**: 131–137.
- [15] CHORY J. Light modulation of vegetative development. *Plant Cell* 1997; **9**: 1225–1234.
- [16] COUPLAND G. Regulation of flowering by photoperiod in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* 1997; **20**: 785–789.
- [17] DIJKWEL PP, HUIJSER C, WEISBEEK PJ, CHUA N-H, SMEEKENS SCM. Sucrose control of phytochrome signalling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1997; **9**: 583–595.
- [18] FINNEGAN EJ, GENDER RK, KOVAC K, PEACOCK WJ, DENNIS ES. DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 5824–5829.
- [19] GARNER WW, ALLARD HA. Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. *J Agric Res* 1920; **18**: 506–553.
- [20] GREEN CB. How cells tell time. *Trends Cell Biol* 1998; **8**: 224–230.

- [21] HOUSSA P, BERNIER G, KINET JM. Qualitative and quantitative analysis of carbohydrates in leaf exudate of the short-day plant, *Xanthium strumarium* L. during flowering transition. *J Plant Physiol* 1991; **138**: 24–28.
- [22] JACKSON S, THOMAS B. Photoreceptors and signals in the photoperiodic control of development. *Plant Cell Environ* 1997; **20**: 790–795.
- [23] KASS SU, PRUSS D, WOLFFE AP. Does DNA methylation repress transcription? *Trends Genet* 1997; **13**: 444–449.
- [24] KATASHIBA H, IWAI T, TORIYAMA K, WATANABE M, HINTA K. Identification of genes expressed in the shoot apex of *Brassica campestris* during floral transition. *Sex Plant Reprod* 1996; **9**: 186–188.
- [25] KENDRICK RE, KRONENBERG GHM (red). *Photomorphogenesis in Plants*. 2nd ed, Martinus Nijhoff, Dordrecht, 1994.
- [26] KINET J-M. Environmental, chemical, and genetic control of flowering. *Hort Rev* 1993; **15**: 279–334.
- [27] KINET J-M, SACHS RM, BERNIER G. *The Physiology of Flowering*, Vol. III, Boca Raton, CRC, 1985.
- [28] KOCH KE. Carbohydrate-mediated gene expression in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1996; **47**: 509–540.
- [29] KOORNNEEF M. Timing when to flower. *Curr Biol* 1997; **7**: R651–R652.
- [30] KOORNNEEF M, PEETERS A JM. Floral transition mutants in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* 1997; **20**: 779–784.
- [31] KOORNNEEF M, ALONSO-BLANCK C, PEETERS AJM, SOPPE W. Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1998; **49**: 345–370.
- [32] KOORNNEEF M, DERVEEN JH. A genetic and physiological analysis of late-flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 1991; **229**: 57–66.
- [33] KOPCEWICZ J, TRETYN A. Physiological and cytochemical investigations on photoperiodic flower induction in *Pharbitis nil*. *Flowering Newslett* 1998; **25**: 26–34.
- [34] KOPCEWICZ J, TRETYN A, CYMERSKI M. *Fitochrom i Morfogeneza Roślin*. PWN, Warszawa, 1994.
- [35] KREKULE J. Stimulation and inhibition of flowering. [W:] *La Physiologie de la Floraison*, Champagnat P., Jacques R. (red.), CNRS, Paris, 1979; str. 19–57.
- [36] LANG A. 1965. Physiology of flower initiation. [W:] *Encyclopedia Plant Physiology*, Ruhland W., Springer-Verlag, Berlin, 1965; **15**: 1379–1536.
- [37] LEJEUNE P, BERNIER G, REQUIER M-C, KINET J-M. Sucrose increase during floral induction in the phloem sap collected at the apical part of the shoot of the long-day plant *Sinapis alba* L. *Planta* 1993; **190**: 71–74.
- [38] MILLAR AJ. Molecular intrigue between phototransduction and the circadian clock. *Ann Bot* 1998; **81**: 581–587.
- [39] MILLAR AJ, MCGRATH RB, CHUA N-H. Phytochrome phototransduction pathways. *Annu Rev Genet* 1994; **28**: 325–349.
- [40] NEUHAUS G, BOWLER C, KERN R, CHUA N-H. Calcium/calmodulin-dependent and -independent phytochrome signal transduction pathways. *Cell* 1993; **73**: 937–952.
- [41] OGAWA Y. Movement of floral stimulus in the cotyledon and petiole of *Pharbitis nil* seedlings. *Bull Fac Bioresources Mie Univ* 1993; **10**: 200–207.
- [42] PIÑERIO M, COUPLAND G. The control of flowering time and floral identity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 1998; **117**: 1–8.
- [43] SIMON R, IGENO MI, COUPLAND G. Activation of floral meristem identity genes in *Arabidopsis*. *Nature* 1996; **384**: 59–62.
- [44] SMITH JG, HILL SR, BALDWIN JP. Plant chromatin structure and post-translational modifications. *Crit Rev Plant Sci* 1995; **14**: 299–328.

- [45] TRETYN A. Fitochromopodobne systemy fotorecepcji u sinic. *Post Biochem* 1998; **44**: 113–117.
- [46] TRETYN A, KOPCEWICZ J. Fitochrom i kryptochrom: receptory regulujące fotomorfogenezę roślin. *Zeszyty Naukowe Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Skierniewicach*, 1995; **2**: 91–99.
- [47] TRETYN A, KOPCEWICZ J. Mechanizmy kwitnienia roślin. II. Genetyczna i molekularna kontrola indukcji kwitnienia. *Post Biol Kom* 1999; **26**:
- [48] TRETYN A, WIŚNIEWSKA J. Fitochrom – struktura i właściwości. *Post Biochem* 1996; **42**: 57–64.
- [49] TRETYN A, WIŚNIEWSKA J. Budowa, właściwości i mechanizm działania kryptochromów – eukariotycznych receptorów światła niebieskiego. *Post Biol Kom* 1999; **26**:
- [50] TRETYN A, CYMERSKI M, CZAPLEWSKA J, ŁUKASIEWICZ H, PAWLAK A, KOPCEWICZ J. Calcium and photoperiodic flower induction in *Pharbitis nil*. *Physiol Plant* 1990; **80**: 388–392.
- [51] TRETYN A, CZAPLEWSKA J, CYMERSKI M, KOPCEWICZ J, KENDRICK RE. . The mechanism of calcium action on flower induction in *Pharbitis nil*. *J Plant Physiol* 1994; **144**: 562–568.
- [52] TRETYN A, KENDRICK RE, FUJIOKA S, SAKURAI A. Cytochemical and histochemical characterization of cotyledonary bodies from *Pharbitis nil* seedlings. *Protoplasma* 1996; **191**: 205–214.
- [53] TRETYN A, CYMERSKI M, CZAPLEWSKA J, ŁUKASIEWICZ H, PAWLAK A, KOPCEWICZ J. Calcium and photoperiodic flower induction in *Pharbitis nil*. *Physiol Plant* 1990; **80**: 388–392.
- [54] TRETYN A, ŁUKASZEWSKA H, KOPCEWICZ J, OLEŃCZUK A, NOWAKOWSKA A. The role of cotyledons in photoperiodic flower induction of *Pharbitis nil*. W: *Travelling Shot on Plant Development*, Greppin H., Penel C., Simon P. (red.). Univ. Geneva Press, str. 51–62.
- [55] TRETYN A, WIŚNIEWSKA J, JAWORSKI K. Mechanizm działania fitochromu. *Post Biol Kom* 1997; **25**: 225–250.
- [56] WAGNER D, HOECKER U, QUAIL PH. *RED1* is necessary for phytochrome B-mediated red light-specific signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1996; **8**: 859–871.
- [57] WELLER JL, REID JB, TAYLOR SA, MURFET SA, MURFET IC. The genetic control of flowering in pea. *Trends Plant Sci* 1997; **2**: 412–418.
- [58] ZAGATTA MT, HIKS KA, JACOBS CI, YOUNG JC, HANGARTEN RP, MEEKS-WAGNER DR. The *Arabidopsis* *ELF3* gene regulates vegetative photomorphogenesis and the photoperiodic induction of flowering. *Plant J* 1996; **10**: 691–702.
- [59] ZAGATTA MT, SHANNON S, JACOBS CI, MEEKS-WAGNER DR. Early-flowering mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Austr J Plant Physiol* 1992; **19**: 411–418.
- [60] ZEEVAART JAD. Gibberellins and flowering. [W:] *The Biochemistry and Physiology of Gibberellins*. Vol 2, Crozier A. (red.), Praeger Publ, New York, 333–374.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 13.10.1998 r.

Przyjęto: 13.11. 1998 r.

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

MECHANIZMY KWITNIENIA ROŚLIN. II. GENETYCZNA I MOLEKULARNA KONTROLA INDUKCJI KWITNIENIA*

REGULATION OF FOWERING IN PLANTS. II. GENETIC
AND MOLECULAR CONTROL OF FLOWER INDUCTION

Andrzej TRETYN^{1,2}, Jan KOPCEWICZ¹

¹Zakład Fizjologii i Morfogenezy Roślin, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń, ²Zakład Biologii Komórki, Akademia Rolniczo-Techniczna im. M. Oczapowskiego, Kortowo-Olsztyn

Streszczenie: Najbardziej dramatyczną zmianą fazy rozwojowej u roślin kwiatowych jest przejście od wzrostu wegetatywnego do rozwoju generatywnego. Zjawisko to, kontrolowane przez czynniki zarówno wewnętrzne, jak i środowiskowe, nazywane jest indukcją kwitnienia. Ostatnie osiągnięcia genetyki i biologii molekularnej wskazują na bezpośrednią zależność między oddziaływaniem czynników rozwojowych i środowiskowych na roślinę a zróżnicowaną ekspresją specyficznych genów, bezpośrednio zaangażowanych w proces indukcji kwitnienia oraz samą morfogenezę kwiatów. Badania prowadzone na różnego typu mutantach rozwojowych doprowadziły do uzyskania roślin charakteryzujących się przyspieszonym (w stosunku do roślin typu dzikiego) lub opóźnionym kwitnieniem. Analiza tego typu mutantów, zwłaszcza u rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) i grochu (*Pisum sativum*) zwiększa szansę szybkiego poznania mechanizmów indukcji kwitnienia. W prezentowanej pracy szczegółowo omówiono genetyczne i molekularne mechanizmy indukcji kwitnienia roślin dnia krótkiego (*Pharbitis nil*) i długiego (*A. thaliana* i *P. sativum*) oraz fotoperiodycznie neutralnych (*Zea mays*).

Słowa kluczowe: fotoperiodyczna indukcja kwitnienia, *Arabidopsis thaliana*, *Pharbitis nil*, *Pisum sativum*, *Zea mays*.

Summary: The most dramatic phase change that flowering plants undergo is the transition from vegetative to reproductive development. A complex process termed floral induction, which is controlled by both

*Praca ta powstała w trakcie realizacji badań finansowanych przez Unię Europejską (INCO-Copernicus Programme, Grant IC 15-CT96-0920) oraz Uniwersytet M. Kopernika (Grant JM Rektora UMK).

endogenous and environmental signals, causes the transition between the two phases. Recent development in plant molecular genetics has revealed a direct relationship between gene structure and its function in plant response to environmental stimuli and metabolic pathways. Physiological approaches to study the molecular details of flower induction have recently been complemented by genetic studies, which have led to the recognition of a large group of flowering mutations that either reduce or lengthen the time to flowering. The rapid progress in this field depends mainly on intensive efforts at isolation of mutants using selected model plants like *Arabidopsis thaliana* or *Pisum sativum*. The steadily increasing use of mutants of floral induction in morphological, physiological, biochemical and genetic studies will undoubtedly increase the chances for progress in understanding the complexity of the mechanism involved in control of flowering. In the presented paper the detailed genetic and molecular mechanisms of floral induction in short-day (*Pharbitis nil*), long-day (*A. thaliana* and *P. sativum*), as well as day-neutral (*Zea mays*) plants have been described.

Key words: photoperiodic flower induction, *Arabidopsis thaliana*, *Pharbitis nil*, *Pisum sativum*, *Zea mays*.

WSTĘP

W naszym poprzednim artykule [33] opisaliśmy ogólne, fizjologiczne i środowiskowe aspekty procesu indukcji kwitnienia. Niniejszy artykuł poświęcony został genetycznej i molekularnej kontroli indukcji kwitnienia. W ostatnich latach poczyniono znaczący postęp w tej dziedzinie badań. Stał się on możliwy dzięki zastosowaniu prostych, modelowych układów roślinnych (np. *Arabidopsis thaliana*, *Anthirrhinum majus*), metod biologii molekularnej oraz naturalnych i sztucznie uzyskiwanych mutantów [4,6,13,15,21,28].

1. KONTROLA INDUKCJI KWITNIENIA ROŚLIN KRÓTKODNIOWYCH

Jedną z modelowych i najczęściej badanych roślin krótkodniowych jest *Pharbitis nil* (ang. *Morning Glory*). Jej japońska odmiana Violet indukowana jest do kwitnienia pojedynczym, 16-godzinnym okresem ciemności w stadium młodocianym, 4–6 dni od skielkowania nasion. Pierwsze zawiązki kwiatowe są już widoczne 12–14 dni od zakończenia indukcji, natomiast cały cykl rozwojowy (który można przeprowadzić w fitotronie) nie trwa dłużej niż 2–3 miesiące [17]. Naświetlanie daleką czerwienią przed zapadnięciem nocy (zgaszeniem światła) lub krótki puls światła czerwonego w połowie 16-godzinnego okresu ciemności całkowicie hamuje kwitnienie. Przez szczepienia i stosowanie technik mikrochirurgicznych ustalono, że miejscem percepcji bodźców fotoperiodycznych są liście, a syntetyzowany tam, domniemany induktor transportowany jest do wierzchołka wzrostu, gdzie inicjuje powstawanie zawiązków kwiatowych [24]. Wykazano również, że wewnątrz

liścieni omawianej rośliny występują struktury zwane ciałami liścieniowymi [38,40], które wraz z otaczającymi je komórkami miękiszowi mogą stanowić miejsce syntezy bądź uwalniania induktora kwitnienia [40]. Ustalono ponadto, że podczas indukcyjnej nocy w liścieniach *P. nil* dochodzi do istotnych zmian w akumulacji jonów wapnia i endogennym poziomie poszczególnych fitohormonów [17,36–39].

Intensywnie prowadzone badania cytologiczne, fizjologiczne i biochemiczne nie dały jednak odpowiedzi na wiele istotnych pytań. Nie wiadomo było także, jaki jest pierwotny mechanizm indukcji fotoperiodycznej. Istotnym przełomem w tych badaniach są wyniki prac opublikowanych ostatnio przez badaczy japońskich. Już ponad 10 lat temu udało się wykazać istnienie zasadniczych ilościowych i jakościowych różnic mRNA izolowanego z roślin rosnących na ciągłym świetle i traktowanych indukcyjną długą nocą [18]. Przerwanie indukcyjnej nocy pulsem światła czerwonego prowadzi do obniżenia się poziomu jednego z typów mRNA [18]. Następnie odkryto, że ekspresja niektórych genów modulowana jest przez indukcyjny fotoperiod i ich aktywność wykazuje dobowe oscylacje [25–27,45]. Dokładna analiza bibliotek cDNA uzyskanych z liścieni roślin rosnących na ciągłym świetle (kontrolnych) i poddanych indukcyjnemu okresowi ciemności pozwoliła na zidentyfikowanie kilku genów, które wydają się być bezpośrednio zaangażowane w mechanizm fotoperiodycznej indukcji kwitnienia *P. nil*.

Stosując techniki dwukierunkowej elektroforezy zauważono, że zawartość jednego z polipeptydów (o molekularnej masie 22 kDa) wzrasta w drugiej połowie indukcyjnej nocy [26]. Białko to zostało więc użyte do przeszukiwania bibliotek cDNA uzyskanych z liścieni roślin rosnących na ciągłym świetle i poddanych indukcyjnemu fotoperiодowi. Zidentyfikowany klon cDNA został następnie zsekwencjonowany, a na podstawie odtworzonego składu nukleotydów określono budowę kodowanego białka, nazwanego PnGLP (od *Pharbitis nil germin-like protein*). Białko to wykazuje duży stopień homologii do GLP wykrytego w liściach *Sinapis alba*. Podobnie jak u gorczycy, również u *P. nil* zawartość mRNA dla GLP podlegała dobowym oscylacjom, z tą różnicą, że u pierwszej z wymienionych roślin maksimum aktywności genu kodującego to białko przypadało na 14-tą godzinę okresu światła, a u drugiej miało to miejsce 10 godzin po rozpoczęciu indukcyjnej nocy [25]. Ponadto stwierdzono, że u *P. nil* mRNA *PnGLP* występuje na terenie liścieni i młodych liści, a jego zawartość znacząco wzrasta w czasie indukcyjnej nocy. Akumulacja PnGLP podczas okresu ciemności hamowana jest przez krótki puls światła czerwonego zastosowany w połowie indukcyjnego okresu ciemności [25]. Autorom omówionej pracy nie udało się określić fizjologicznej funkcji GLP. Tego samego typu białko występujące u pszenicy funkcjonuje jako oksydaza szczawianowa. W surowych ekstraktach uzyskanych z liścieni *P. nil* nie wykryto jednak aktywności tego enzymu [25].

Zastosowanie do analiz bibliotek cDNA uzyskiwanych z liścieni *P. nil* techniki *differential display* pozwoliło na identyfikację kolejnych genów zaangażowanych

w fotoperiodyczną indukcję tej rośliny. Jednym z nich okazał się gen *PnC401*, który ulegał preferencyjnej ekspresji podczas indukcyjnej nocy. Gen ten występuje w pojedynczej kopii, a jego aktywność nie jest zbyt wysoka nawet w warunkach pełnej indukcji fotoperiodycznej [30]. Koduje on białko zbudowane z 665 reszt aminokwasowych o łącznej masie 74 kDa, które wykazuje wysoki stopień homologii do fragmentu jednego z polipeptydów rzodkiewnika o nie poznanej dotąd funkcji. Pomiar poziomu mRNA *PnC401* wykazały dobowe fluktuacje jego zawartości. Po przeniesieniu roślin z warunków nieindukcyjnych (ciągłe światło) do ciemności obserwowano stopniowy wzrost poziomu transkryptu, który osiągał maksimum w czasie 12–16 godzin, a następnie ulegał obniżeniu. Rośliny przetrzymywane przez dłuższy czas w ciemności wykazywały dobowe oscylacje ekspresji analizowanego genu. 10-minutowy puls światła czerwonego zastosowany w 8 godzinie indukcyjnej nocy obniżał poziom akumulacji mRNA *PnC401*. Jeszcze silniejszy wpływ na badany proces miało naświetlenie siewek *P. nil* przed przeniesieniem ich do ciemności, światłem dalekiej czerwieni [30]. Wyniki te jednoznacznie wskazują, że aktywność genu *PnC401* kontrolowana jest przez system fitochromowy, a jego ekspresja bezpośrednio związana jest z fotoperiodyczną indukcją kwitnienia u *P. nil*. Tę hipotezę potwierdza również preferencyjna aktywacja transkryptu omawianego genu w tkankach liści. Wspomniana grupa japońskich badaczy [31] zidentyfikowała u *Pharbitis nil* jeszcze jeden gen, oznaczony jako *PnTCTP*, którego produkt jest prawdopodobnie związany z mechanizmem fotoperiodycznej indukcji kwitnienia. Ekspresja tego genu powoduje powstanie polipeptydu zbudowanego ze 168 aminokwasów o łącznej masie wynoszącej 18,7 kDa. Białko to wykazuje bardzo wysoki stopień podobieństwa do tzw. transkrypcyjnie kontrolowanych białek tumorowych; TCTP (od ang. *transcriptionally controlled tumor protein*) zidentyfikowanych wcześniej w grochu, ryżu, lucerny i ziemniaka, a w mniejszym stopniu do podobnego typu polipeptydów występujących w komórkach drożdży, kur, myszy i ludzi [31]. Na ciągłym świetle lub w warunkach długiego dnia obserwowano niewielką akumulację mRNA *PnTCTP*. Natomiast u roślin traktowanych długą indukcyjną nocą lub trzymanyh przez dłuższy czas w ciemności odnotowano stopniowy wzrost poziomu tego informacyjnego RNA. Proces ten rozpoczynał się w 4. godzinie i osiągał swoje maksimum w 12. godzinie, a następnie utrzymywał się na wysokim poziomie aż do 48. godziny ciemności [31]. Ekspresja analizowanego genu kontrolowana jest przez fitochrom. Podczas gdy poziom mRNA *PnTCTP* nie ulegał zmianie po naświetleniu siewek *P. nil* w połowie indukcyjnej nocy pulsem światła czerwonego lub dalekiej czerwieni, zastosowanie dalekiej czerwieni pod koniec fazy jasnej hamowało ekspresję. Na tej podstawie przypuszcza się, że ekspresja genu *PnTCTP* bezpośrednio lub pośrednio regulowana jest przez stabilną pulę fitochromu. Jak dotąd nie ustalono, jaką funkcję może pełnić produkt opisanego genu w procesie fotoperiodycznej indukcji u *P. nil*. Biorąc pod uwagę zdolność ludzkiego TCTP do wiązania jonów wapnia wyniki opisanych badań mogą rzucić

nowe światło na rolę wapnia w procesie kwitnienia. Wielkie znaczenie wapnia w kwitnieniu było wielokrotnie sugerowane już wcześniej przez Tretyna i wsp. [17,36–40]. Jak można się spodziewać, w najbliższym czasie nastąpi nasilenie badań nad molekularnymi mechanizmami fotoperiodycznej indukcji u *Pharbitis nil*. Zapowiedzią tego jest ukazanie się streszczenia referatu, jaki wygłoszony został na ostatnim zjeździe Amerykańskiego Towarzystwa Fizjologów Roślin (Madison, USA) wygłoszonego przez grupę badaczy kierowaną przez J.A.D. Zeevaarta. Ich osiągnięciem było uzyskanie bibliotek cDNA z liścieni siewek *P. nil* rosnących na ciągłym świetle i poddanych fotoperiodycznej indukcji [20]. Różnice między obiema bibliotekami analizowano techniką *differential display*. Tą drogą zidentyfikowano aż 150 genów, których aktywność spada lub ulega podwyższeniu w trakcie indukcyjnej nocy [20]. Wśród nich znalazły się geny kodujące różne enzymy związane z metabolizmem węglowym (biorących udział w procesie fotosyntezy). Dużym zaskoczeniem było wykrycie u *P. nil* jednego klonu cDNA homologicznego do genu *CONSTANS (CO)*, funkcjonującego u *Arabidopsis thaliana* (patrz poniżej). Z tym, że u rzodkiewnika jego aktywność stymulowana jest w trakcie długiego, a u *P. nil* krótkiego fotoperiodu. Jak zapowiadają autorzy przytoczonego doniesienia [20], połowa ze 150 uzyskanych genów może kodować nigdzie nie opisane dotąd białka.

2. KONTROLA INDUKCJI KWITNIENIA ROŚLIN DŁUGIEGO DNIA

Spośród wielu roślin długiego dnia molekularny mechanizm fotoperiodycznej indukcji poznano najlepiej w odniesieniu do dwóch gatunków: grochu (*Pisum sativum*) i rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*). Druga z nich jest również modelową rośliną stosowaną w badaniach nad morfogenezą różnych organów roślinnych, a zwłaszcza kwiatów.

2.1. Regulacja kwitnienia u grochu

Pierwszą osobą, która podjęła systematyczne badania nad procesem kwitnienia grochu, był G. Mendel. To on jako pierwszy stwierdził wpływ czynników środowiskowych na ten proces. Jednakże dopiero pod koniec lat sześćdziesiątych obecnego stulecia podjęte zostały systematyczne badania nad mechanizmami kwitnienia tego gatunku. Ich wyniki pozwoliły ustalić, że w liściach tej rośliny, w zależności od warunków środowiskowych, powstaje induktor bądź inhibitor kwitnienia. Obie te substancje, o niepoznanej budowie, mogą przemieszczać się z liści do wierzchołków wzrostu wpływając na indukcję procesu kwitnienia.

Większość odmian grochu to rośliny fakultatywnie długiego dnia. Niektóre z nich są również fotoperiodycznie neutralne lub do kwitnienia, oprócz odpowiedniego fotoperiodu, wymagają także wernalizacji. Zawiązki kwiatów powstają w pachwinach na kolejnych węzłach. Jednak jeszcze przed ich pojawieniem się roślina w stadium wegetatywnym musi wytworzyć określoną liczbę międzywęzli, wahającą się od czterech (u wcześniej kwitnących odmian) do ponad 100 (u późno kwitnących odmian rosnących w nieindukcyjnych warunkach). Roślina raz zaindukowana do kwitnienia tworzy kolejne zawiązki kwiatowe, choć znane są również przypadki rewersji kwitnienia w warunkach utrzymującego się przez dłuższy czas niekorzystnego fotoperiodu [42].

Znaczący postęp w poznaniu molekularnych podstaw indukcji kwitnienia u grochu stał się możliwy po zastosowaniu do badań różnego typu mutantów. Pozwoliło to na ustalenie sekwencji zdarzeń, jaka prowadzi od procesu indukcji kwitnienia, przez ewokację do wytwarzania kwiatów. Załączona tabela przedstawia nazwy oraz funkcje genów zaangażowanych w proces indukcji kwitnienia grochu. Doświadczenia, w których stosowano naświetlanie siewek grochu światłem czerwonym i daleką czerwień, wykazały, że barwnikiem uczestniczącym w odbiorze bodźców fotoperiodycznych jest fitochrom [42].

W warunkach długiego dnia mutant fitochromu labilnego, *fun1* (od *far-red unresponsive*) kwitnie później niż rośliny typu dzikiego, co może sugerować, że ta pula fotoreceptora odpowiada za syntezę stymulatora kwitnienia. Podobnego typu odpowiedź fizjologiczną (późne kwitnienie) obserwuje się również u dwóch innych mutantów *pcd1* i *pcd2* (od *phytochrome chromophore deficient*), u których cząsteczki fitochromu pozbawione są funkcjonalnej grupy chromoforowej [42]. Obok fitochromu labilnego w kontrolę kwitnienia grochu zaangażowana jest również stabilna pula tego fotoreceptora. Przypuszcza się, że aktywna forma PhyB działa hamująco na kwitnienie grochu, gdyż u mutantu fitochromu stabilnego, *lv* (od *late flowering*), obserwuje się wcześniejsze kwitnienie w porównaniu do WT. Jednakże ten hamujący wpływ PhyB ograniczony jest jedynie do warunków krótkiego dnia. Na tej podstawie przypuszcza się, że fitochrom stabilny nie uczestniczy bezpośrednio w procesie mierzenia czasu, a jedynie w wykrywaniu barw światła. Obok mutacji prowadzących u grochu do zaburzeń w procesie percepcji bodźców fotoperiodycznych uzyskano również takie, które mogą dotyczyć procesu syntezy stymulatora bądź inhibitora kwitnienia [42].

Usunięcie jednego z liścieni grochu prowadzi do opóźnienia procesu kwitnienia. Przypuszczać więc można, że w liścieniu produkowana jest substancja stymulująca ten proces. (Nie można jednak wykluczyć, że jest to reakcja stresowa prowadząca do hamowania kwitnienia.) We wczesnych etapach wzrostu siewek grochu dominuje jednak synteza inhibitorów kwitnienia [42]. Ten pogląd potwierdzają wyniki badań przeprowadzonych na mutancie *gigas* (*gi*), u którego obserwuje się opóźnienie kwitnienia (tab. 1) bez względu na warunki świetlne otoczenia. Jednakże kwitnienie

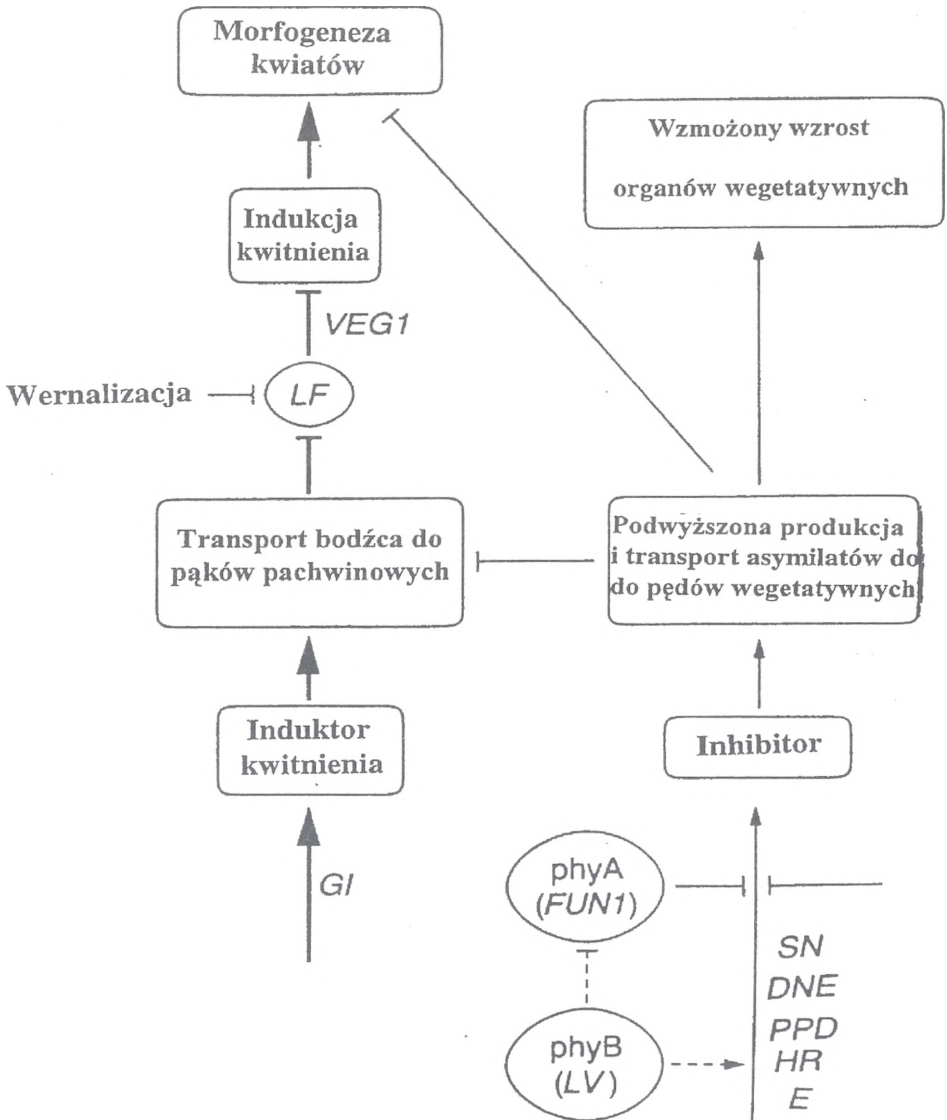
TABELA 1. Lista genów uczestniczących w kontroli kwitnienia grochu oraz ich przypuszczalne funkcje (na podstawie [42], zmodyfikowane)

Gen	Jego fizjologiczna funkcja
<i>FUN1</i>	Percepcja światła przez fitochrom labilny (PhyA)
<i>LV</i>	Percepcja światła przez fitochrom stabilny (PhyB)
<i>SN</i>	Synteza inhibitora kwitnienia w pędach i liścieniach
<i>DNE</i>	Synteza inhibitora kwitnienia w pędach i liścieniach
<i>PPD</i>	Synteza inhibitora kwitnienia w pędach i liścieniach
<i>HR</i>	Synteza inhibitora kwitnienia w pędach
<i>E</i>	Synteza inhibitora kwitnienia w liścieniach
<i>GI</i>	Synteza stymulatora kwitnienia w pędach, korzeniach i/lub liścieniach
<i>LF</i>	Określenie wrażliwości wierzchołka pędu na stymulator kwitnienia
<i>VEGI</i>	Niezbędny do inicjacji kwiatów w wierzchołku wzrostu pędu

można w znacznym stopniu przyspieszyć przez szczepienie mutantu *gi* na roślinach typu dzikiego poddanych działaniu długiego dnia. Sugeruje to, że gen *GI* może kontrolować syntezę induktora kwitnienia w obrębie liścieni i liści pędowych. Natomiast inny gen grochu *VEGI* (od *vegetative*) odpowiada prawdopodobnie za kontrolę morfogenezy kwiatów już po dotarciu do merystemu wierzchołkowego stymulatora kwitnienia. U mutantów *veg1* uprawianych przy długim fotoperiodzie nie obserwuje się powstawania zawiązków kwiatowych. Zamiast nich pąki pachwinowe rozwijają się w ulistnione odgałęzienia boczne pędu [42].

U grochu zidentyfikowano także kilka genów, które mogą brać udział w powstawaniu inhibitora kwitnienia (tab. 1, rys. 1). Mutacje powstające na ich terenie prowadzą do przyspieszonego kwitnienia. Pierwszy z tego typu mutantów, *sn* (od *sterile nodes*) zakwita wcześniej od form typu dzikiego bez względu na stosowany fotoperiod i termoindukcję. Prowadząc szczepienia wykazano, że gen *SN* odpowiada za syntezę w liścieniach i liściach pędowych inhibitora kwitnienia. Poziom inhibitora może być modelowany w wyniku eksponowania roślin na oddziaływanie długiego fotoperiodu lub poddawania wernalizacji [42]. U kolejnego mutantu, nazwanego *lf* (od *late flowering*), podczas indukcyjnego fotoperiodu obserwuje się znaczne przyspieszenie powstawania kwiatów w porównaniu z formami dzikimi. U roślin homozygotycznych kwiaty pojawiają się wtedy, kiedy rośliny mają jedynie 5 węzłów – to jest najwcześniej, jak może rozpocząć się kwitnienie tego gatunku rośliny. Choć niewątpliwie gen *LF* odpowiada za syntezę inhibitora kwitnienia, to jego aktywność ograniczona jest jedynie do pędu bądź jego wierzchołkowej części. Przez szczepienie pędów zmutowanych roślin na zaindukowanych uprzednio roślinach typu dzikiego nie udało się doprowadzić do powstawania kwiatów.

Ostatni z genów wymienionych w tabeli 1, którego produkt może brać udział w syntezie inhibitorów kwitnienia nazwano *HR* (od *high response*). Gen ten jest



RYSUNEK 1. Przebieg zależnej od temperatury (wernalizacji) i warunków świetlnych (fotoperiodu) indukcji kwitnienia u grochu; funkcje wszystkich genów uczestniczących w tym procesie, a zaznaczonych na schemacie zostały opisane w tabeli 1, dalsze szczegóły w tekście (na podstawie [42], zmienione)

aktywny jedynie w pędzie, a jego ekspresja podlega fotoregulacji. U roślin rosnących w warunkach długiego dnia dochodzi do znacznego obniżenia hamującego wpływu produktu genu *HR* na kwitnienie grochu. Podobny wpływ wywiera wiek rośliny. Ustalono, że u mutantu *hr* synteza inhibitora kwitnienia gwałtownie spada, gdy osiągnie on wiek 4 tygodni [42].

Na podstawie przedstawionych wyników zaproponowano następujący mechanizm indukcji kwitnienia u grochu [42]. W jego młodych siewkach przeważa synteza inhibitora nad syntezą stymulatora kwitnienia. Proces inhibicji jest szczególnie silny przy niekorzystnym dla rośliny fotoperiodzie. Za recepcję bodźców fotoperiodycznych odpowiadają obie pule fitochromu – labilna i stabilna. Pierwsza z nich (PhyA) ma hamujący, a druga (PhyB) stymulujący wpływ na proces kwitnienia. W warunkach niesprzyjającego fotoperiodu rośliny produkują inhibitor kwitnienia, który wpływając na transport asymilatów pobudza rozwój wegetatywny rośliny. Prawdopodobnie substancja ta działa hamująco na produkcję lub/i transport induktora kwitnienia z liścieni i liści pędowych do wierzchołka wzrostu pędu. W warunkach długiego fotoperiodu sytuacja ulega zmianie. Następuje obniżenie aktywności genów uczestniczących w syntezie inhibitora i aktywacja tych, które odpowiadają za produkcję stymulatora kwitnienia. Po dotarciu do wierzchołka pędu induktor blokuje aktywność genu *LF*, co prowadzi do zapoczątkowania ewokacji i morfogenezy kwiatu. Wernalizacja może wpływać na kwitnienie grochu przez obniżenie tempa syntezy inhibitora tego procesu. Natomiast bezpośrednie działanie niskiej temperatury na wierzchołek pędu może zwiększać jego wrażliwość na obecność induktora kwitnienia. Na rysunku 1 strzałkami zaznaczono pozytywny, a tępo zakończonymi odcinkami negatywny wpływ różnych czynników i produktów genów na proces kwitnienia.

3.2. Regulacja kwitnienia u rzodkiewnika

Rzodkiewnik jest rośliną fakultatywnie długiego dnia [5,12]. Oznacza to, że gdy rośnie w warunkach długiego dnia, zakwita znacznie wcześniej niż rozwijając się w warunkach krótkiego dnia. U większość linii genetycznych *A. thaliana* również wernalizacja przyspiesza zakwitanie. W warunkach naturalnych do inicjacji kwitnienia dochodzi około 25 dni po skielkowaniu nasion. Natomiast odmiany laboratoryjne, uprawiane w warunkach długiego dnia (16 godzin światła/8 godzin ciemności), zakwitają o kilka dni wcześniej [5,12]. Jeżeli rośliny tych samych odmian (linii genetycznych) traktowane są krótkim fotoperiodem (8–10 godzin światła na dobę), proces kwitnienia rozpoczyna się po 6 tygodniach wzrostu wegetatywnego, czemu towarzyszy wytworzenie się większej liczby liści w różyczce (rozecie) i na pędzie [10,13,28]. Już z tego pobieżnego opisu widać, że indukcja kwitnienia u rzodkiewnika jest procesem bardzo złożonym. Najbardziej sprzyjające warunki naturalne, prowadzące do wczesnego zakwitania, a co za tym idzie wydania nasion,

TABELA 2. Mutanty rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) charakteryzujące się wczesnym i późnym zakwitaniem (na podstawie [3,28], uzupełnione i zmodyfikowane)

Mutant	Fenotyp	Przypuszczalna funkcja genu
Wczesne zakwitanie		
<i>elf3</i>	Długi hypokotyl, brak wrażliwości na fotoperiod	Hamowanie kwitnienia przy nieindukcyjnym fotoperiodzie
<i>emf 2</i>	Brak fazy wegetatywnej, kwiaty o zaburzonej budowie	Regulacja przebiegu wczesnych faz rozwoju wegetatywnego
<i>tlf</i>	Zdeterminowany kwiatostan, rośliny karłowate	Represor autonomicznego szlaku indukcji kwitnienia
Późne zakwitanie		
<i>co, gi, fha</i>	Obniżenia wrażliwości na działanie fotoperiodu i chłodu	Promuje kwitnienie w odpowiedzi na indukcyjny fotoperiod
<i>fd, fe, ft, fwa</i>	Niska wrażliwość na fotoperiod, bardzo mała na działanie chłodu	Promuje kwitnienie w odpowiedzi na indukcyjny fotoperiod
<i>fca, fpa, fve, ld</i>	Wykazują wrażliwość na fotoperiod i działanie chłodu	Regulują przebieg autonomicznej indukcji kwitnienia
<i>gal, gai</i>	Późne kwitnienie przy nieindukcyjnym fotoperiodzie	Udział w syntezie i wrażliwości na działanie gibereliny, która indukuje kwitnienie przy SD

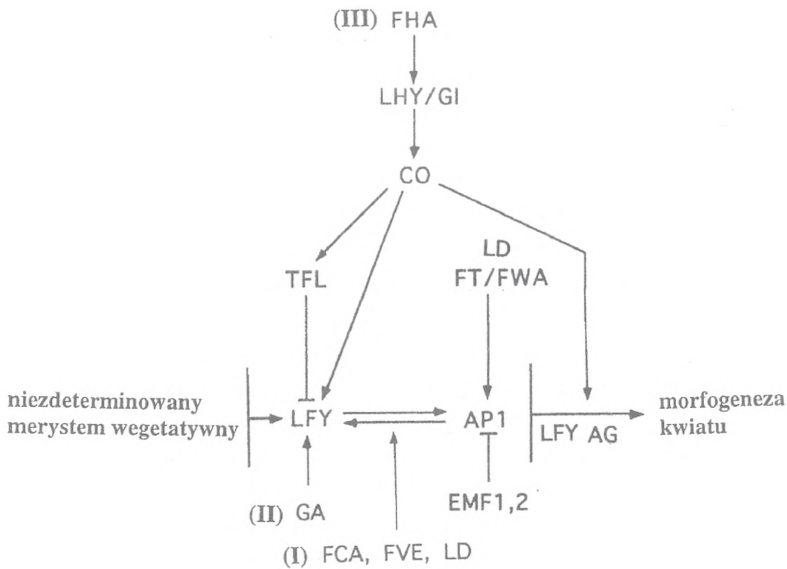
które mogą jeszcze rozwinąć się w kolejne pokolenie roślin, panuje wiosną. Wyprodukowane poprzedniego roku nasiona, które przeszły proces wernalizacji, kiełkują, a powstałe z nich rośliny kwitną i owocują nawet w warunkach niesprzyjającego fotoperiodu. Natomiast następne pokolenie roślin, rozwijające się z nasion powstałych tego samego roku, indukowane są do kwitnienia długim fotoperiodem i do jesieni mają wystarczającą ilość czasu, by zakończyć cały swój cykl rozwojowy [12].

Fotoperiodyczna indukcja kwitnienia *Arabidopsis thaliana* kontrolowana jest przez dwa układy fotoreceptorów: fitochrom [34] i kryptochrom [1,35]. Absorbowane przez kryptochrom światło niebieskie (od ok. 400 do 500 nm) stymuluje, podczas gdy operujące przez fitochrom światło czerwone (od ok. 600 do 700 nm) hamuje kwitnienie rzodkiewnika. Rośliny typu dzikiego rosące na ciągłym świetle niebieskim zakwitają już w 15 dni, natomiast gdy rosną na ciągłym świetle czerwonym (o tym samym natężeniu co niebieskie) dopiero 30 dni po skiełkowaniu nasion [11]. W ostatnim czasie opublikowano dane świadczące o korelacyjnym udziale obu wymienionych fotoreceptorów w regulacji kwitnienia. Badania te prowadzono na mutancie rzodkiewnika, niezdolnym do akumulacji białkowego (CRY) składnika kryptochromu 2 [11]. Rośliny homozygotyczne pod względem zmutowanej cechy kwitły później, podczas gdy heterozygotyczne w tym samym czasie co rośliny typu dzikiego. Tym samym *cry2* zachowuje się jak wiele spośród późnokwitających mutantów, takich jak: *gi, co, fha, fca, fd, fe, ft, fwa, fve* i *ld* (patrz tab. 2). Po

analizie poziomu transkrypcji *CRY2* u wszystkich wymienionych mutantów okazało się, że mutacja *fha*, prowadząca do obniżenia wrażliwości na fotoperiod, w rzeczy samej dotyczy genu kodującego kryptochrom 2. Z kolei u mutantu *co* rosnącego w warunkach długiego dnia zarejestrowano trzy razy niższy poziom mRNA *CRY2* w porównaniu do roślin typu dzikiego, podczas gdy u obu typów roślin rosnących na krótkim fotoperiodzie wartości te były podobne [11]. Z drugiej strony rośliny transgeniczne wykazujące nadekspresję *CRY2* zawierały jedynie wyższy poziom *CO* mRNA od WT, gdy uprawiane były przy krótkim fotoperiodzie. Prowadziło to również do ich wcześniejszego zakwitania. Wyniki przedstawionych badań jednoznacznie wskazują, że *Cry2* jest pozytywnym regulatorem aktywności genu *CO* (*CONSTANS*), którego ekspresja stymulowana jest przez indukcyjny fotoperiod [29]. Aktywność tego samego genu, ale w drodze negatywnej regulowana jest również przez fitochrom B (*PhyB*). Mutanty pozbawione tej puli fitochromu (*hy1* i *hy2*), ale zawierające funkcjonalny *PhyA* kwitną wcześniej od roślin typu dzikiego, czemu towarzyszy podwyższona ekspresja *CO* [9]. Biorąc pod uwagę dostępną wiedzę oraz wyniki wyżej przedstawionych badań zaproponowano następujący model działania *Cry2* i *PhyB* w procesie fotoperiodycznej indukcji kwitnienia *A. thaliana* [11]. Działanie obu fotoreceptorów polega na regulacji aktywności transkrypcyjnej *CO*. *PhyB* byłby więc tym spośród czterech pozostałych fitochromów funkcjonujących u rzodkiewnika [34], który blokując ekspresję *CO* opóźnia jego kwitnienie. Natomiast w obecności światła niebieskiego, absorbujący je *Cry2* znosząc inhibicyjny wpływ *PhyB* indukuje akumulację *CO* mRNA prowadząc do wcześniejszego zakwitania rośliny.

Istnieje wiele typów mutacji, które w warunkach określonego typu fotoperiodu (krótkiego lub długiego) charakteryzują się opóźnionym lub przedwczesnym kwitnieniem w porównaniu z formami dzikimi. Mutanty te można podzielić na dwie grupy: wcześnie i późno kwitnące (tab. 2).

Obecnie znanych jest szereg mutacji (wszystkie o charakterze recesywnym) prowadzących do nienormalnego, przedwczesnego zakwitania *A. thaliana*. Najbardziej ekstremalnym przykładem tego typu roślin są mutanty *emf1* i *emf2* (od *embryogenic flower 1-2*), które są niewrażliwe na fotoperiod i wernalizację oraz kwitną w bardzo wczesnych stadiach rozwojowych, bez uprzedniego wytworzenia różyczki (rozetty)[43,44]. Badania anatomiczne wykazały, że jeszcze w stadium rozwoju embrionalnego mutacja *emf* prowadzi do powstania merystemu kwiatostanowego, z pominięciem stadium merystemu wegetatywnego (rys. 2). Omawiana mutacja ma charakter plejotropowy, gdyż poza przedwczesnym zakwitaniem *emf1* i *emf2* mają nienormalnie zbudowane liście i kwiaty [43,44]. Wydaje się, że geny *EMF1* i *2* są niezbędne do normalnego rozwoju wegetatywnego rzodkiewnika [3,28,43,44]. W wyniku ich „wyłączenia” rośliny zachowują się tak jakby już przeszły to stadium rozwojowe. Jak dotąd nie znany jest produkt aktywności transkrypcyjnej *EMF*. Przyjmuje się jednak, że omawiane geny pełnią kluczową rolę w blokowaniu przed-



RYSUNEK 2. Udział produktów różnych genów w regulacji kwitnienia rzodkiewnika. Do inicjacji zawiązków kwiatowych może dojść w wyniku aktywacji trzech odmiennych szlaków: autonomicznego (I), zależnego od gibereliny (II) lub długiego fotoperiodu (III). Długi fotoperiod działając przez FHA i LHY/GI indukuje akumulację *CO* mRNA, którego białkowy produkt wpływa na ekspresję genu tożsamości merystemowej – *LFY*. Jego aktywację indukują z kolei geny *AP1* i *AG* bezpośrednio odpowiedzialne za morfogenezę kwiatu. Prawdopodobnie bezpośrednio na *LFY* wpływa giberelina. Natomiast niezależnie od *CO* i *LFY* długi fotoperiod przez produkty genów *FT* i *FWA* mogą aktywować gen *AP1*. Najmniej znana jest rola produktów genów *FCA*, *FVE* i *LD* aktywowanych podczas realizacji szlaku autonomicznego. Wydaje się, że ich białkowe produkty (będące czynnikami transkrypcyjnymi lub białkami wiążącymi RNA) działają przez dotąd niezidentyfikowany gen. Funkcje poszczególnych genów zaznaczonych na schemacie zostały opisane w tabeli 1, dalsze szczegóły w tekście (na podstawie [28], zmienione)

wczesnego kwitnienia, a ich aktywność ulega stopniowemu obniżaniu podczas rozwoju, aż do podprogowego poziomu umożliwiającego przekształcenie merystemu vegetatywnego w kwiatostanowy. Jednym z genów, którego aktywność wydaje się być regulowana przez *EMF1* i *2*, jest *APETALA1* (*AP1*) [23]. Jest on bezpośrednio zaangażowany w proces morfogenezy kwiatów [23,28].

Kolejne mutanty, u których obserwuje się przedwczesne kwitnienie, to *elf3* (od *early flowering 3*), *esd4* (od *early short day 4*) i *tfl* (od *terminal flower*). Mutant typu *tfl* charakteryzuje się krótkimi pierwotnymi pędami kwiatostanowymi (na których powstaje od 1 do 5 kwiatów) zakończonymi organami przypominającymi kwiaty szczytowe [2,4]. W warunkach długiego dnia wymaga on krótszej fotoperiodycznej indukcji w porównaniu do form dzikich rzodkiewnika. Gen *TFL* został ostatnio sklonowany, a jego produkt przypomina zwierzęce białko wiążące fosfatydyloetanolaminę [7]. Ponadto ustalono, że jego ekspresja zachodzi w grupie komórek leżących pod zasadniczą częścią merystemu wierzchołkowego. *TLF* mRNA wy-

krywany jest począwszy od 2–3 dnia po skielkowaniu, a jego akumulacja w wyżej wspomnianych komórkach rośnie po siódmym dniu wzrostu [7]. Uważa się, że ulegający ekspresji podczas wzrostu wegetatywnego gen *TLF* przez odbiór sygnałów środowiskowych reguluje czas wejścia rośliny w stadium rozwoju generatywnego [28].

Również w przypadku trzech innych genów: *COP* (od *constitutive photomorpho-genetic*), *DET* (od *de-etiolated*) i *PHYB* (od *phytochrome B*), których mutacje prowadzą do przedwczesnego zakwitania rzodkiewnika, poznano białkowe produkty ich aktywności. Białka kodowane przez te geny pełnią ogólne funkcje w kontroli morfogenezy roślin [3,9,28].

Warto jeszcze wspomnieć o mutantach, które wykazują wrażliwość na działający na nie fotoperiod. Mutant *early short day 4* kwitnie po wytworzeniu 2 lub 4 liści, odpowiednio w warunkach długiego i krótkiego fotoperiodu. Nieco później zakwitają podobne do niego mutanty *early short day 3 i 4* [3,4,13,14].

Wszystkie mutacje prowadzące do późnego zakwitania rzodkiewnika można podzielić na trzy grupy. W skład pierwszej wchodzi takie mutanty, jak: *fca*, *fpa*, *ld*, *fve* i *fy* [15,16]. Bez względu na fotoperiod kwitną one później od form dzikich, natomiast wernalizacja przyspiesza ten proces. Z drugiej strony traktowanie chłodem nie wywiera istotnego wpływu na kwitnienie drugiej grupy mutantów, do której należą: *co*, *fd*, *fe*, *fha*, *ft*, *fwa* i *gi* [28]. Ich kwitnienie jest odwleczone w czasie w warunkach długiego fotoperiodu. Natomiast opóźnienie kwitnienia przedstawicieli trzeciej ze wspomnianych grup mutantów wynika z zaburzeń w syntezie i wrażliwości komórek na działanie giberelin. Uważa się, że przedstawiona klasyfikacja jest odzwierciedleniem istniejących u rzodkiewnika trzech różnych szlaków wiodących do kwitnienia: autonomicznego, zależnego od długiego fotoperiodu i zachodzącego przy pośrednictwie giberelin [15,16,28].

Pierwsza odkryta i dobrze udokumentowana mutacja, jaka wpływa na kwitnienie rzodkiewnika, została nazwana *gal* (od *gibberellic acid 1*) [15]. Wykazano, że zaburzenia w funkcjonowaniu genu *GAI* prowadzą do 2–3-tygodniowego opóźnienia kwitnienia. Również mutacja w genie *GAI* (od *gibberellic acid insensitive*), powodująca obniżenie wrażliwości roślin na działanie giberelin, indukuje u nich syndrom późnego kwitnienia [15].

Ostatnio udało się sklonować dwa geny zaangażowane w funkcjonowanie autonomicznego szlaku wiodącego do kwitnienia. Pierwszy z nich, *LUMINODEPENDENS (LD)* koduje białko zbudowane z 953 reszt aminokwasowych, zawierające dwie domeny pozwalające mu na oddziaływanie z kwasami nukleinowymi [19]. Z kolei *FCA (FLOWERING CA)* koduje białko, które zawiera dwa miejsca wiążące RNA oraz tzw. domenę WW odpowiedzialną za oddziaływania z innymi polipeptydami [22]. Gen *FCA* charakteryzuje się niecodzienną budową. W jego skład wchodzi aż z 21 egzonów (o łącznej długości 8,1 kb), kodujących średniej wielkości białko zbudowane z 747 reszt aminokwasowych [22]. Ponadto powstający na bazie

FCA transkrypt podlega procesowi składania (ang. *splicing*), prowadzącego do powstawania czterech odmiennych produktów, charakteryzujących się różną długością. Tylko najdłuższy z nich, zawierający sekwencje kodującą domenę WW wykazuje aktywność biologiczną, polegającą na stymulacji wczesnego zakwitania [22].

Jednym z najciekawszych i najlepiej poznanych genów kontrolujących kwitnienie rzodkiewnika jest *CONSTANS* (*CO*). Koduje on białko (składające się z 373 aminokwasów) zawierające dwa tzw. palce cynkowe, które swą budową przypomina czynniki transkrypcyjne z rodziny GATA-1 [29]. *CO* mRNA ulega stopniowej akumulacji w merystemie wierzchołkowym roślin traktowanych długim fotoperiodem. Mutanty *co* uprawiane przy długim dniu kwitną później, natomiast rośliny transgeniczne zawierające więcej kopii tego genu kwitną wcześniej niż formy typu dzikiego [29]. Kończąc przegląd mutacji wpływających na opóźnienie kwitnienia *A. thaliana* warto wspomnieć jeszcze o dwu innych: *pha* (o którym była mowa powyżej) oraz *lhy* (od *late elongated hypocotyl*). Jak się okazało, gen *FHA* koduje białkowy składnik kryptochromu [11]. Z kolei na bazie *LHY* powstaje czynnik transkrypcyjny z rodziny *myb*. Mutacja powstająca w tym genie prowadzi do zaburzeń w funkcjonowaniu zegara biologicznego [28].

Jak dotąd, nie uzyskano mutantu całkowicie pozbawionego zdolności do kwitnienia. Może to świadczyć o złożoności tego procesu i sugerować, że wyłączenie któregoś z genów zaangażowanych w proces indukcji kwitnienia prowadzi do kompensacji jego aktywności przez inne geny [28].

Podsumowaniem rozważań na temat roli różnych genów w procesie kontroli kwitnienia może być schemat zaproponowany przez ostatnio przez Piñero i Couplanda [28], z którego usunięto te elementy, które nie były dyskutowane w niniejszej pracy.

Kwitnienie rzodkiewnika kontrolowane jest przez trzy odmienne, aczkolwiek częściowo kompensujące się szlaki. Pierwszy z nich, zależny od metabolizmu gibbereliny, prowadzi do aktywacji genu *LEAFY* (*LFY*) bezpośrednio odpowiedzialnego za przekształcanie merystemu wegetatywnego w kwiatostanowy [32,41]. Drugi ze szlaków, tzw. autonomiczny, indukowany jest w wyniku wernalizacji, a jego przebieg kontrolowany jest przez takie geny, jak: *FCA*, *FVE* i *LD* [16,22]. Trzeci szlak uruchamiany jest w warunkach długiego fotoperiodu. Na jego przebieg antagoniczny wpływ wywierają kryptochrom i fitochrom typu B, które w zróżnicowany sposób oddziałują na ekspresję genu *CO* [11]. Akumulacja *CO* mRNA prowadzi do stymulacji aktywności genu *LFY* oraz przypuszczalnie wpływa na ekspresję genu *AGAMOUS* (*AG*), bezpośrednio zaangażowanego w morfogenezę kwiatów [21,41]. Na rysunku 2 strzałkami zaznaczono stymulacyjny, natomiast tępo zakończonymi odcinkami hamujący wpływ jednych genów na aktywność innych.

4. KONTROLA INDUKCJI KWITNIENIA ROŚLIN FOTOPERIODYCZNIE NEUTRALNYCH

Do tej pory mało było wiadomo na temat mechanizmów kontrolujących kwitnienie roślin fotoperiodycznie neutralnych. Przypuszczano, że wraz ze wzrostem stopnia dojrzałości rośliny w jej merystemie wegetatywnym zachodzą stopniowo odpowiednie procesy metaboliczne lub strukturalne umożliwiające zmianę wzorca rozwojowego, co prowadzi do pobudzenia morfogenezy kwiatów. Osiągnięcie takiej dojrzałości miałyby wynikać między innymi z odpowiedniego „dokarmiania” merystemów wierzchołkowych pędów substancjami produkowanymi w fotosyntetyzujących liściach. Stąd też liczba liści miałyby zasadniczy wpływ na przebieg samej indukcji kwitnienia. Nowe światło na mechanizm kwitnienia roślin fotoperiodycznie neutralnych rzuciły badania przeprowadzone na kukurydzy [8].

Wywodząca się z tropików kukurydza kwitnie po wytworzeniu określonej liczby liści. Odmienne od tego wzorca rozwojowego zachowuje się mutant *idl* (*indeterminate*). W początkowym okresie rozwoju tworzy on znacznie więcej liści w porównaniu z roślinami typu dzikiego. Mimo to nie jest on zdolny do osiągnięcia etapu pełnej dojrzałości poprzedzającego inicjację kwiatów. W miejsce kwiatostanów rozwijających się w pachwinach liści powstają rozgałęzione pędy wegetatywne. Po sklonowaniu genu okazało się, że koduje on białko mające tzw. palce cynkowe. Na tej podstawie można sądzić, że produkt genu *ID1* działa jako regulator transkrypcji i może być bezpośrednio zaangażowany w proces indukcji kwitnienia. Hipotezę tę potwierdziły wyniki badań nad wzorcem ekspresji tego genu [8]. Okazało się, że ulega on aktywacji w najmłodszych, niedojrzałych liściach trzydniowych siewek kukurydzy i ekspresja jego rośnie aż do momentu osiągnięcia przez roślinę wieku dojrzałości generatywnej. Ponadto jest ona ograniczona do pewnych regionów liści, a mianowicie najmłodszych ich zawiązków (primordiów), przy zupełnym jej braku w komórkach merystemu wierzchołkowego. Opisywany gen nie podlega również ekspresji w innych tkankach i organach, takich jak: dojrzałe liście i korzenie oraz elementy kwiatostanu i kwiatów [8]. Można więc sądzić, że w niedojrzałych liściach kukurydzy syntetyzowana jest cząsteczka sygnałowa, która po dotarciu do merystemu wierzchołkowego inicjuje proces przekształcania go z wegetatywnego w generatywny. Substancja ta syntetyzowana jest w wyspecjalizowanych częściach liści (*revertant somatic sectors*), w miejscach aktywności genu *ID1*. Nie wyklucza się możliwości, że bezpośredni produkt tego genu ma zdolność przemieszczania się z liści do wierzchołka wzrostu. Do indukcji kwitnienia dochodzi po osiągnięciu przez produkt genu *ID1* pewnej wartości w komórkach wchodzących w skład merystemu kwiatostanowego. *ID1* jest pierwszym zidentyfikowanym i sklonowanym genem roślin jednoliściennych, którego produkt może bezpośrednio uczestniczyć w procesie indukcji kwitnienia [8]. Jego ekspresja na terenie niedojrzałych liści przeczy tzw. troficznnej teorii kwitnienia. Popiera natomiast hipotezę funkcjonowania

u roślin naturalnego induktora, to jest zdolnej do swobodnego przemieszczania się cząsteczki sygnałowej, której synteza zachodzi w liściach (lub liścieniach), a jej miejscem docelowego działania jest wegetatywny wierzchołek wzrostu pędu [8].

PODSUMOWANIE

Metody biologii molekularnej oraz zastosowanie odpowiednich mutantów pozwoliły poznać podstawowe mechanizmy kontrolujące przebieg indukcji kwitnienia. Zarówno u roślin fotoperiodycznie wrażliwych (krótko- i długodniowych), jak i niewrażliwych (fotoperiodycznie neutralnych) zidentyfikowano szereg genów zaangażowanych w kontrolę fotoperiodycznej indukcji kwitnienia. Aktywność niektórych z tych genów jest kontrolowana przez system fitochromowy lub kryptochrom. Znaczący postęp w poznaniu molekularnych mechanizmów indukcji kwitnienia został uczyniony dzięki użyciu do badań różnego typu mutantów. U rzodkiewnika wyselekcjonowano szereg mutantów charakteryzujących się wczesnym lub późnym zakwitaniem, jak i określono produkty genów, w których doszło do tych mutacji. Niektóre białka kodowane przez te geny pełnią ogólne funkcje kontroli morfogenezy roślin. Jak dotąd nie uzyskano mutantu całkowicie pozbawionego zdolności do kwitnienia. Świadczyć to może, że wyłączenie któregoś z genów zaangażowanych w kontrolę kwitnienia prowadzi do kompensacji jego funkcji przez inne geny.

Molekularne mechanizmy indukcji kwitnienia są związane z pojawianiem się stymulatorów i inhibitorów kwitnienia. Natura tych substancji sygnałowych, przemieszczających się w końcowej fazie indukcji kwitnienia z liści do wierzchołków wzrostu, pozostaje ciągle nieznaną.

LITERATURA

- [1] AHMAD M, CASHMORE AR. *HY4* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* 1993; **366**: 162–166.
- [2] ALVAREZ J, GULI CL, YU X-H, SMYTH DR. Terminal flower: A gene affecting inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 1992; **2**: 103–116.
- [3] AMASINO RM. Control of flowering time in plants. *Curr Opin Genet Dev* 1996; **6**: 480–487.
- [4] AUKERMAN MJ, AMASINO RM. Molecular genetic analysis of flowering time in *Arabidopsis*. *Semin Cell Dev Biol* 1996; **7**: 427–433.
- [5] BAGNALL DJ. The control of flowering of *Arabidopsis thaliana* by light, vernalisation and gibberellins. *Aust J Plant Physiol* 1992; **19**: 401–409.
- [6] BERNIER G, HAVELANGE A, HOUSSA C, PENTITJEAN A, LEJEUNE P. Physiological signals that induce flowering. *Plant Cell* 1993; **5**: 1147–1155.

- [7] BRADLEY D, RATCLIFFE O, CINCENT C, CARPENTER R, COEN E. Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science* 1997; **275**: 80–83.
- [8] COLASANTI J, YUAN Z, SUNDESAN V. The *indeterminate* gene encodes a zinc finger protein and regulates a leaf-generated signal required for the transition to flowering in maize. *Cell* 1998; **93**: 593–603.
- [9] CHORY J. Light modulation of vegetative development. *Plant Cell* 1997; **9**: 1225–1234.
- [10] COUPLAND G. Regulation of flowering by photoperiod in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* 1997; **20**: 785–789.
- [11] GUO H, YANG H, MOCKLER TC, LIN C. Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science* 1998; **279**: 1360–1363.
- [12] HAMMAD I, VAN TIENDEREN PH. Natural variation in flowering time among populations of the crucifer *Arabidopsis thaliana*. *Plant Spec Biol* 1997; **12**: 15–23.
- [13] KOORNNEEF M. Timing when to flower. *Curr Biol* 1997; **7**: R651–R652.
- [14] KOORNNEEF M, PEETERS AJM. Floral transition mutants in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* 1997; **20**: 779–784.
- [15] KOORNNEEF M, ALONSO-BLANCK C, PEETERS AJM, SOPPE W. Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1998; **49**: 345–370.
- [16] KOORNNEEF MN, DERVEEN JH. A genetic and physiological analysis of late-flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 1991; **229**: 57–66.
- [17] KOPCEWICZ J, TRETYN A. Physiological and cytochemical investigations on photoperiodic flower induction in *Pharbitis nil*. *Flowering Newslett* 1998; **25**: 26–34.
- [18] LAY-YEE M, SACHS RM, REID MS. Changes in cotyledon mRNA during floral induction of *Pharbitis nil* cv. Violet. *Planta* 1987; **171**: 104–109.
- [19] LEEI, AUKERMAN MJ, GORE SL, LOHMAN KN, MICHAELS SD, WEAVER LM, JOHN MC, FELDMANN KA, AMASINO RM. Isolation of *LUMINIDEPENDENTS*: a gene involved in the control of flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1994; **6**: 75–83.
- [20] LIU J, YU J, KENDE H, MCINTOSH L, ZEEVAART JAD. A molecular approach toward understanding photoperiodic induction of flowering. *Annu Meet American Soc Plant Physiol Plant Biol '98* str. 12, abstrakt 11019.
- [21] MA H. To be, or not to be, a flower-control of flower meristem identity. *Trends Genet* 1998; **14**: 26–32.
- [22] MACKNIGHT R, BONCROFT I, PAGE T, LISTER C, SCHMIDT R, LOVE K, WESTPHAL L, MURPHY G, SHERSON S, COBBETT C, DEAN C. *FCA*, a gene controlling flowering time in *Arabidopsis*, encodes a protein containing RNA-binding domains. *Cell* 1997; **89**: 737–745.
- [23] MANDEL MA, GUSTAFSON-BROWN C, SAVIDGE B, YANOFSKY MF. Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Nature* 1992; **360**: 273–277.
- [24] OGAWA Y. Movement of floral stimulus in the cotyledon and petiole of *Pharbitis nil* seedlings. *Bull Fac Bioresources Mie Univ* 1993; **10**: 200–207.
- [25] O'NEILL SD, ZHANG XS, ZHENG CC. Dark and circadian regulation of mRNA accumulation in the short-day plant *Pharbitis nil*. *Plant Physiol* 1994; **104**: 569–580.
- [26] ONO M, SAGE-ONO K, YASUI M, OKAZAKI M, HARADA H. Changes in polipeptides in *Pharbitis nil* cotyledons during the first flower-inductive photoperiod. *Plant Sci* 1993; **89**: 135–145.
- [27] ONO M, SAGE-ONO K, INOUE M, KAMADA H, HARADA H. Transient increase in the level of mRNA for a germin-like protein in leaves of the short-day plant *Pharbitis nil* during the photoperiodic induction of flowering. *Plant Cell Physiol* 1996; **37**: 855–861.
- [28] PIÑERIO M, COUPLAND G. The control of flowering time and floral identity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 1998; **117**: 1–8.

- [29] PUTTERILL J, ROBSON F, LEE K, SIMON R, COUPLAND G. The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* 1995; **80**: 847–857.
- [30] SAGE-ONO K, ONO M, HARADA H, KAMADA H. Accumulation of a clock-regulated transcript during flower-inductive darkness in *Pharbitis nil*. *Plant Physiol* 1998a; **116**: 1479–1485.
- [31] SAGE-ONO K, ONO M, HARADA H, KAMADA H. Dark-induced accumulation of mRNA for a homolog of translationally controlled tumor protein (TCTP) in *Pharbitis*. *Plant Cell Physiol* 1998b; **39**: 357–360.
- [32] SIMON R, IGENO MI, COUPLAND G. Activation of floral meristem identity genes in *Arabidopsis*. *Nature* 1996; **384**: 59–62.
- [33] TRETYN A, KOPCEWICZ J. Mechanizmy kwitnienia roślin. I. Uwarunkowania wewnętrzne i środowiskowe. *Post Biol Kom* 1999; **26**: 231–248.
- [34] TRETYN A, WIŚNIEWSKA J. Fitochrom – struktura i właściwości. *Post Biochem* 1996; **42**: 57–64.
- [35] TRETYN A, WIŚNIEWSKA J. Budowa, właściwości i mechanizm działania kryptochromów – eukariotycznych fotoreceptorów światła niebieskiego. *Post Biol Kom* 1999; **26**:
- [36] TRETYN A, CYMERSKI M, CZAPLEWSKA J, ŁUKASIEWICZ H, PAWLAK A, KOPCEWICZ J. Calcium and photoperiodic flower induction in *Pharbitis nil*. *Physiol Plant* 1990; **80**: 388–392.
- [37] TRETYN A, CZAPLEWSKA J, CYMERSKI M, KOPCEWICZ J, KENDRICK RE. The mechanism of calcium action on flower induction in *Pharbitis nil*. *J Plant Physiol* 1994; **144**: 562–568.
- [38] TRETYN A, KENDRICK RE, FUJIOKA S, SAKURAI A. Cytochemical and histochemical characterization of cotyledonary bodies from *Pharbitis nil* seedlings. *Protoplasma* 1996; **191**: 205–214.
- [39] TRETYN A, CYMERSKI M, CZAPLEWSKA J, ŁUKASIEWICZ H, PAWLAK A, KOPCEWICZ J. Calcium and photoperiodic flower induction in *Pharbitis nil*. *Physiol Plant* 1990; **80**: 388–392.
- [40] TRETYN A, ŁUKASZEWSKA H, KOPCEWICZ J, OLEŃCZUK A, NOWAKOWSKA A. The role of cotyledons in photoperiodic flower induction of *Pharbitis nil*. W: *Travelling Shot on Plant Development*, Greppin H., Penel C., Simon P. (red.). Univ. Geneva Press, str. 51–62.
- [41] WEIGEL D, ALVAREZ J, SMYTH DR, YANOFSKY MF, MEYEROWITZ EM. *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* 1992; **69**: 843–859.
- [42] WELLER JL, REID JB, TAYLOR S.A., MURFET S.A., MURFET IC. The genetic control of flowering in pea. *Trends Plant Sci* 1997; **2**: 412–418.
- [43] ZAGATTA MT, HIKS KA, JACOBS CI, YOUNG JC, HANGARTEN RP, MEEKS-WAGNER DR. The *Arabidopsis* *ELF3* gene regulates vegetative photomorphogenesis and the photoperiodic induction of flowering. *Plant J* 1996; **10**: 691–702.
- [44] ZAGATTA MT, SHANNON S, JACOBS CI, MEEKS-WAGNER DR. Early-flowering mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Austr J Plant Physiol* 1992; **19**: 411–418.
- [45] ZHENG CC, BUI AQ, O'NEILL SD. Abundance of an mRNA encoding a high mobility group DNA-binding protein is regulated by light and an endogenous rhythm. *Plant Mol Biol* 1993; **23**: 813–823.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano 13.10.1998 r.

Przyjęto 13.11. 1998 r.

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

ROZMIESZCZENIE I ROLA BIAŁEK SZOKU TERMICZNEGO W KOMÓRCIE ZWIERZĘCEJ

LOCALIZATION AND FUNCTION OF HEAT SHOCK PROTEINS IN THE ANIMAL CELL

Joanna JAKUBOWICZ-GIL, Antoni GAWRON

Zakład Anatomii Porównawczej i Antropologii, Instytut Biologii, UMCS, Lublin

Streszczenie: Białka szoku termicznego odnajdywane są w komórkach organizmów *Procaryota* i *Eucaryota* zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i w warunkach stresowych. Obecne są na terenie cytoplazmy, wiążą się z cytoszkieletem oraz występują w wielu organellach komórkowych. Podstawową funkcją białek szoku jest kontrola prawidłowego zwijania polipeptydów oraz ich ochrona przed denaturacją, agregacją i precypitacją. Są także odpowiedzialne za utrzymanie rozwiniętej struktury białek transportowanych przez błony. Regulują aktywność kinaz oraz receptorów sterydowych. Mogą być induktorami lub też inhibitorami apoptozy. Białka szoku termicznego są również zaangażowane w nabywanie termotolerancji.

Słowa kluczowe: białka szoku termicznego, białka opiekuńcze, termotolerancja, apoptoza.

Summary: Heat shock proteins are found in *Procaryota* and *Eucaryota* cells in normal environment and in response to stress conditions. They are present in cytoplasm and in many intracellular organells. They are connected with cytoskeleton. Heat shock proteins control polypeptides folding and protect them from denaturation, aggregation and precipitation. They are responsed for keeping unfolded structure of transported proteins. They regulate kinases and steroid receptors activity. They can induce or inhibit apoptosis. Heat shock proteins are also involved in acquiring thermotolerance.

Key words: heat shock proteins, molecular chaperones, thermotolerance, apoptosis.

I. WSTĘP

Gwałtowne podwyższenie temperatury indukuje w organizmach *Procaryota* i *Eucaryota* wzrost syntezy określonej grupy białek, nazwanej białkami szoku ter-

micznego Hsp (ang. *Heat shock proteins*). Hsp pojawiają się także w komórkach poddanych działaniu analogów aminokwasów, metali ciężkich, alkoholi, wolnych rodników i wielu trucizn metabolicznych. Białka szoku termicznego znaleziono również w tkankach gorączkujących osobników, uszkodzonych narządach oraz u pacjentów z chorobą nowotworową, u których zastosowano chemioterapię. Ponieważ Hsp indukowane są przez tak różnorodne czynniki nazwano je białkami stresowymi, a proces, w którego wyniku są syntetyzowane – reakcją stresową [75].

Rodzina białek Hsp charakteryzuje się niezwykle stabilnością w procesie ewolucji. Analiza genów kodujących białka stresowe u bakterii, drożdży, *Drosophila melanogaster* i człowieka pozwoliła wykazać, że są one w wysokim stopniu homologiczne [75].

Wielość oraz różnorodność białek stresu pojawiających się w komórkach po szoku termicznym zrodziła potrzebę ich sklasyfikowania. Za kryterium podziału uznano masę cząsteczkową i wyróżniono kilka rodzin [36,61,75]:

Hsp100 (m. cz. 100–110 kDa)

Hsp90 (80–100 kDa)

Hsp70 (68–78 kDa)

Hsp20 (18–32 kDa)

Istnieje także szereg białek stresu nie dających się zakwalifikować do żadnej z wymienionych grup, np.:

Hsp10 i Hsp60 (homologi bakteryjnych GroES i GroEL) obecne w mitochondriach i chloroplastach

Hsp40 (homolog bakteryjnego DnaJ) zlokalizowane w cytoplazmie i we wszystkich organellach komórkowych

Problem szoku, towarzysząca mu synteza Hsp oraz struktura genów kodujących te białka od lat znajdują się w centrum uwagi naukowców. Również w polskich czasopismach pojawiły się na ten temat artykuły przeglądowe [30,31,36,37]. Celem niniejszej pracy było zebranie najważniejszych informacji dotyczących rozmieszczenia oraz funkcji poszczególnych rodzin białek szoku w komórce zwierzęcej.

II. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA POSZCZEGÓLNYCH RODZIN Hsp

1. Rodzina białek Hsp100/Clp

Hsp100 stanowią niedawno wyodrębnioną rodzinę białek szoku, wykrytą w komórkach ssaków, drożdży oraz bakterii (bakteryjna rodzina białek Clp – ang. *Caseinolytic protease*). Białka tej rodziny charakteryzują się niezwykle odpornością

na działanie czynników fizycznych i chemicznych. Nie tracą swojej aktywności nawet w temperaturze 50°C i w obecności 20% etanolu [61].

Ze względu na mnogość i różnorodność białek Hsp100, rodzina ta została podzielona na dwie główne klasy: 1 i 2, w których dodatkowo wyróżniono 8 podrodzin: A, B, C i D oraz M, N, X i Y. Białka należące do klasy 1 mają dwie domeny wiązania nukleotydów NBD (ang. *Nucleotide-Binding Domain*), w przeciwieństwie do białek klasy 2, które mają krótszy łańcuch polipeptydowy i tylko 1 domenę NBD [52,61].

Struktura białek z rodziny Hsp100 wykazuje duże zróżnicowanie. Przy braku ADP czy ATP, białka Hsp100: ClpA oraz Hsp104, odnajdywane są w formie mono-, di- i trimerycznej. W obecności nukleotydów oba białka tworzą pierścieniowy układ heksameryczny [53].

2. Rodzina białek Hsp90

Białka z rodziny Hsp90 są syntetyzowane zarówno w warunkach normalnych, jak i pod wpływem szoku. Są to białka, których sekwencja aminokwasowa w dużym stopniu pozostała nie zmieniona w czasie ewolucji. Na podstawie analizy DNA stwierdzono, że homologia sekwencji aminokwasowych w białkach Hsp90 różnych organizmów eukariotycznych wynosi ok. 50% oraz że sekwencje te są homologiczne z Hsp90 z *E. coli* w co najmniej 40% [36].

U drożdży *S. cerevisiae* stwierdzono dwa geny typu *hsp90*: *hsp83* i *hsc83*, przy czym ekspresja *hsc83* jest słabiej indukowana przez wzrost temperatury. Ostatnie doniesienia sugerują, że mutacje w genach *hsp83* są odpowiedzialne za podwyższenie śmiertelności komórek [32].

U kręgowców znajduje się kilka genów kodujących białka z rodziny Hsp90. W komórkach ssaków białko Hsp90 występuje w dwóch izoformach – Hsp90 alfa i Hsp90 beta, które tworzą oligomeryczne kompleksy [49].

Oprócz Hsp90, stanowiącego 1–2% całkowitej zawartości białek cytoplazmatycznych, wewnątrz retikulum endoplazmatycznego znajduje się nieco większe białko – endoplazmina Grp94 (ang. *Glucose regulated protein*) [30,36]. Białko to reguluje najprawdopodobniej sekrecję białek. Zaobserwowano bowiem gwałtowny wzrost stężenia Grp94 w komórkach potraktowanych związkami zaburzającymi transport polipeptydów [75].

3. Rodzina białek Hsp70

Białka szoku termicznego o masie ok. 70 kDa należą do najlepiej poznanych. U *E. coli* występują dwa białka należące do tej rodziny: Hsp70, będące produktem genu *dnaK* oraz Hsc66, produkt genu *hscA* [31,70]. Natomiast u *S. cerevisiae*, *Drosophila melanogaster* i ssaków występuje szereg odmian Hsp70, złożonych

z wielu białek o podobnych sekwencjach aminokwasów [31,37]. W warunkach *in vitro* białka Hsp70 wykazują aktywność ATP-azową i reagują z wieloma substratami białkowymi w sposób ATP-zależny [9,58]. Aktywność Hsp70 regulowana jest przez białko Hsp40, które zarówno aktywuje hydrolizę ATP związanego z Hsp70, jak i umożliwia tworzenie stabilnego kompleksu Hsp70-substrat [3,23,42]. Za usuwanie produktu hydrolizy ATP odpowiedzialne jest białko GrpE (Mge1p) występujące u bakterii i w mitochondriach [14].

Białkiem syntetyzowanym w komórkach, nie tylko w szoku, jest Hsc70 (ang. *Heat shock cognate*), czyli Hsp73. Występuje ono w jądrze i cytoplazmie na stałym poziomie, niezależnie od fazy cyklu komórkowego [25]. Hsp73 towarzyszą 3 białka regulujące jego aktywność:

Hip/ p48 (ang. *Hsc70 interacting protein*) – zapobiegające dysocjacji ADP-Hsc70 [56],

Hop/ p60 (ang. *Hsc70/Hsp90 organizing protein*) – białko wymiany ADP/ATP [29],

Hup/ p16 (ang. *Hsc70 unbinding protein*), kinaza NDP (ang. *Nm23/nucleoside diphosphate kinase*) – odpowiedzialne za odłączanie polipeptydowych substratów od Hsc70 i oddysocjowywanie multimerów Hsc70 [33].

Ostatnie badania wykazały obecność kolejnego białka regulującego aktywność Hsc70 - BAG1. Białko to wiążąc się z ATP-azową domeną Hsc70 hamuje aktywność białka szoku jako białka opiekuńczego (ang. *molecular chaperone*) [27,67].

Innymi, stale syntetyzowanymi białkami szoku z rodziny Hsp70 są białka Grp78 (ang. *Glucose regulated protein*), czyli Bip (ang. *Binding protein*) [30,46] oraz Grp75 [41].

W przeciwieństwie do wymienionych białek z rodziny Hsp70, stale rezydujących w komórce, obecność Hsp72 jest ściśle związana z szokiem. Dlatego też białka te często nazywane są diagnostycznymi markerami stresu [43]. Ich poziom zależy od fazy cyklu komórkowego i najwyższe stężenie osiąga w fazie S [25]. Ekspresja genów *hsp72* jest regulowana przez czynniki transkrypcyjne HSF1-4 (ang. *Heat Shock Factors*), które wiążąc się ze specyficznym fragmentem DNA tzw. HSE (ang. *Heat Shock Element*) dają sygnał do rozpoczęcia transkrypcji genów i biosyntezy białek Hsp72 [25,48].

Ważnym induktorem ekspresji genów *hsp72/73* może okazać się białko p-53. Zaobserwowano, że w komórkach nowotworowych jelita grubego mutacja w genie p-53 powoduje konformacyjne zmiany w strukturze białka p-53 oraz jego akumulację, czemu towarzyszy silna ekspresja genu *hsp72* [71].

4. Rodzina białek Hsp20

Rodzina oligomerycznych białek Hsp20 (sHsp – ang. *small Hsp*) jest, jak do tej pory, najmniej poznana. Składa się z różnorodnej grupy białek o masach od

18 do 32 kDa. Geny *shsp* występują u niższych i wyższych *Eucaryota*. U ssaków wykryto tylko jeden typ genu kodujący białka o masach 25–27 kDa. Małe Hsp odnajdywane są w homo- i heteropolimerycznych kompleksach o masie od 500 do 800 kDa. W skład tych kompleksów mogą wchodzić m.in. Hsp27, Hsp25, α -B-kryształina, ubikwityna. Hsp25 i α -B-kryształina są najprawdopodobniej produktami proteolitycznego rozpadu Hsp27. Są bowiem rozpoznawane przez przeciwciała anti-Hsp27, co świadczy o ich immunologicznym podobieństwie [44].

Wiadomo, że białka Hsp20 są stale syntetyzowane w organizmach, a ich stężenie gwałtownie rośnie po szoku. Białka te mogą występować w 3 izoformach, w różnym stopniu ufosforylowania. Za fosforylacyjną modyfikację Hsp20 odpowiedzialna jest specyficzna dla tej grupy białek kinaza i fosfataza. Izoforny Hsp20 zawierają 2 potencjalne miejsca fosforylacji w resztach serynowych [11,44,75]. Nieufosforylowana izoforma występuje w dużej ilości w komórkach nie poddanych działaniu szoku. Po ekspozycji tkanek na wysoką temperaturę już w ciągu pierwszych minut rośnie poziom form ufosforylowanych, a obniża się zawartość postaci nieufosforylowanej. Ufosforylowane Hsp20 chronią komórki przed szkodliwym działaniem szoku termicznego i innych toksycznych związków. Komórki zawierające Hsp20, które nie mogą ulegać fosforylacji, mają zmniejszoną odporność na działanie czynników uszkadzających [44].

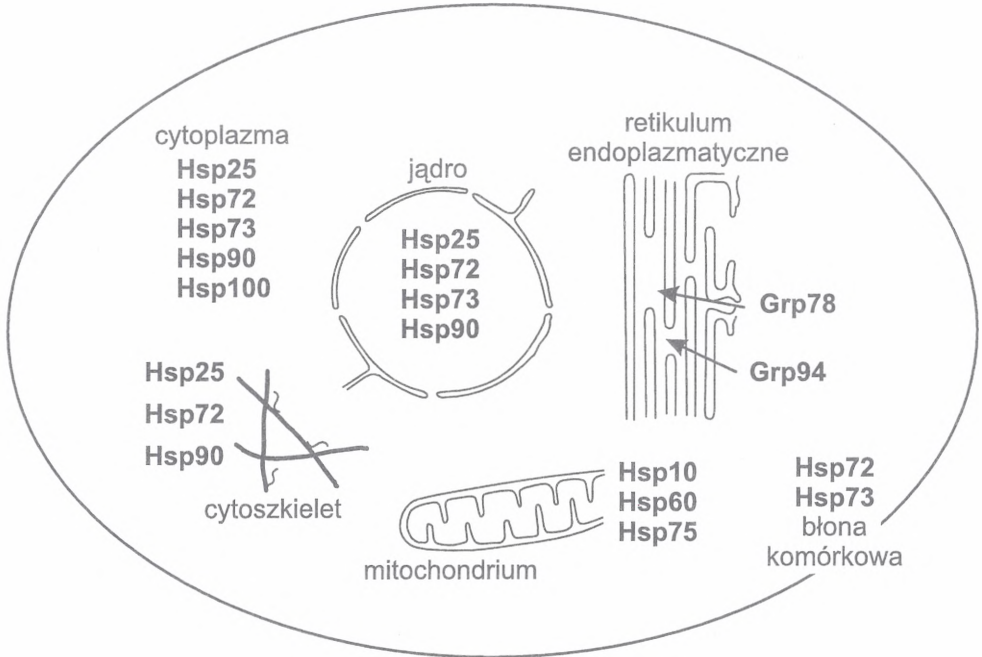
Do rodziny Hsp20 należy też białko Hsp32 występujące u kręgowców. Syntetyzowane jest w warunkach podwyższonej temperatury w obecności metali ciężkich, związków sulfhydrylowych i promieniowania UV. Białko to zostało zidentyfikowane jako oksygenaza-1 hemu [4,45].

Pomimo niskiej masy cząsteczkowej (8 kDa) do małych Hsp zaliczana jest też ubikwityna. Jest to białko o mało zmienionej sekwencji aminokwasowej, odnalezione u *Eucaryota*. Ubikwityna wiąże się z uszkodzonymi białkami i uczestniczy w ich degradacji [5,51].

III. ROZMIESZCZENIE BIAŁEK SZOKU W KOMÓRCIE

Lokalizacja białek szoku termicznego w komórkach jest zdeterminowana ich powinowactwem do określonego organellum komórkowego lub obszaru cytoplazmy, w którym znajduje się substrat.

W warunkach fizjologicznych białka z rodziny Hsp70 wykrywane są głównie w cytoplazmie (Hsp73), w regionach, w których odbywa się proces biosyntezy polipeptydów. Odnajdywane są też w mitochondriach (Grp75) oraz w retikulum endoplazmatycznym (Grp78), gdzie uczestniczą w transporcie polipeptydów przez błony. Hsp70 lokalizują się też na powierzchni komórek niektórych nowotworów,



RYSUNEK 1. Rozmieszczenie białek szoku w komórce

stając się antygenami rozpoznawanymi przez komórki NK (ang. *Natural Killers*) [8,47].

Białka z rodziny Hsp20 odnajdywane są głównie w cytoplazmie komórek mięśni gładkich, włókien mięśni szkieletowych i mięśniu sercowym, gdzie zasocjowane są z miofilamentami aktynowymi. Występują, ponadto, w mniejszej ilości w jądrze komórkowym [26,69].

Z cytoszkieletem związane są też białka szoku o masie 90 kDa. Zaobserwowano, że wyizolowane Hsp90 łączy się z F-aktyną w sposób zależny od stężenia jonów Ca^{2+} . Są również zasocjowane z mikrotubulami na wszystkich etapach cyklu komórkowego. Tworzą też kompleksy z cytokeratynowymi filamentami pośrednimi. Białka Hsp90 łączą się z wieloma enzymami komórkowymi, jak np. z pp60src, kinazą zależną od hemu (HRI) czy kinazą zależną od dsDNA oraz receptorami sterydowymi. Odnajdywane są też w jądrze komórkowym [17].

Pod wpływem szoku obserwuje się wzrost poziomu białek stresu na terenie cytoplazmy oraz wzmożoną translokację Hsp z cytoplazmy do jądra i jąderka. W jądrze podczas stresu następuje bowiem akumulacja i agregacja ziarnistości perichromatyny, składającej się głównie z niedojrzałego mRNA. W jąderku natomiast agregacji ulegają preribosomy i inne nukleoproteinowe kompleksy, co prowadzi do zahamowania biogenezy rybosomów. Zadaniem przemieszczonych z cytoplazmy

do jądra białek szoku jest zatem ochrona struktur jądra i jąderka oraz przywracanie utraconych funkcji [6,75,77].

Szok termiczny powoduje też niekorzystne zmiany w strukturze cytoszkieletu, a przede wszystkim w organizacji filamentów pośrednich (IFs). Zjawisku temu towarzyszy zwiększona asocjacja pozostających w cytoplazmie oraz nowo syntetyzowanych Hsp25, 72 i 90 z cytoszkieletem [6,35,59,62].

IV. ROLA BIAŁEK SZOKU TERMICZNEGO W KOMÓRCIE

1. Białka szoku jako białka opiekuńcze

Podstawą prawidłowego funkcjonowania białek jest ich odpowiednia, trójwymiarowa konformacja. Asocjacja powstających podczas translacji łańcuchów polipeptydowych z białkami opiekuńczymi zapobiega przypadkowej agregacji i wpływa na prawidłowe ich kształtowanie po opuszczeniu rybosomów. Do grupy białek opiekuńczych należą niektóre białka szoku termicznego z rodzin Hsp20, 70, 90 i 100 [16,63].

Białka z rodziny Hsp70 wykazują duże powinowactwo do całkowicie rozwiniętych fragmentów białka, pojawiających się podczas translacji jako nowo powstający łańcuch polipeptydowy lub podczas translokacji łańcucha przez błony mitochondrialne i retikulum endoplazmatycznego (ER). Translokacja ta może zachodzić równocześnie z procesem translacji lub też potranslacyjnie. Mechanizm działania cytoplazmatycznego, mitochondrialnego czy też obecnego na terenie ER Hsp70 polega najprawdopodobniej na ATP-zależnym rozwijaniu i utrzymywaniu rozwiniętej struktury transportowanych białek. Natomiast translokacja zwiniętych białek do wnętrza organellum wymaga interakcji między mitochondrialnym (ewentualnie obecnym na terenie ER) Hsp70 i białkiem błonowym Tim 44 (Sec 63 w ER) [7,72,80]. W ponownym zwijaniu i tworzeniu przestrzennej struktury przetransportowywanych białek uczestniczą, oprócz Hsp70, również białka Hsp60 i Hsp10 [38]. Częsteczką Hsp60 składa się z dwóch siedmioczłonowych pierścieni ułożonych jeden na drugim. Stanowi to powierzchnię roboczą, do której wiążą się rozwinięte białka i na której uzyskują swą ostateczną trójwymiarową strukturę. Proces ten jest bardzo dynamiczny i składa się z szeregu reakcji wiązania i uwalniania. Każda reakcja wymaga energii pochodzącej z hydrolizy ATP oraz udziału Hsp10 [18,24,50,57].

Białka z rodziny Hsp70 odgrywają ważną rolę w eliminacji uszkodzeń, takich jak nieprawidłowe zwinięcie białka czy denaturacja. Istnieją przypuszczalnie dwa sposoby usuwania tych uszkodzeń na poziomie molekularnym:

- Hsp mogą wiązać się z nieprawidłowo uformowanym białkiem, umożliwiając mu odzyskanie prawidłowej struktury.

TABELA 1. Rola białek szoku w komórce

Rodzina Hsp	Rola w komórce
Hsp 100/ Clp: Klasa1: A,B,C,D Klasa2: M,N,X,Y	rozpuszczanie agregatów białkowych przekształcanie formy PrP ^C białka prionowego w formę zakaźną PrP ^{Sc}
Hsp 90: Hsp 90 Grp 94	hamowanie agregacji białek regulacja aktywności i transportu kinaz wewnątrzkomórkowych regulacja aktywności receptorów steroidowych indukcja apoptozy komórkowej redukcja cytochromu C regulacja sekrecji białek
Hsp70: Hsp72 Hsp73 Grp78	kontrola prawidłowego zwijania białek zapobieganie denaturacji i agregacji polipeptydów utrzymywanie rozwiniętej struktury białek transportowanych przez błony hamowanie apoptozy uczestniczenie w rozpoznawaniu komórek nowotworowych przez komórki NK
Hsp20: Hsp25/27 Hsp32 Ubikwityna α -B-krystalina	regulacja polimeryzacji aktyny ochrona białek przed agregacją i precypitacją ochrona komórek przed stresem oksydacyjnym hamowanie apoptozy
Hsp 10 i Hsp 60	regulacja prawidłowego zwijania białek

- Hsp mogą też angażować się w ratowanie źle zwiniętych białek przez rozpad powstających agregatów białkowych.

Jak wynika z prowadzonych obserwacji, oba mechanizmy są wykorzystywane w komórkach [63].

Szczegółową hipotezę działania białek opiekuńczych przedstawił Pelham na przykładzie Hsp72 [55]. W czasie szoku termicznego białka ulegają częściowej denaturacji, eksponując rejony hydrofobowe, które oddziałują ze sobą i tworzą nierozzerwalne agregaty białkowe. Hsp72 wiążąc się z hydrofobowymi rejonami może ograniczać te interakcje. Następnie, wykorzystując energię hydrolizy ATP, białka szoku przypuszczalnie zmieniają swoją konformację i dysocjują z kompleksu. Zmiana konformacji Hsp może z kolei indukować zmianę struktury związanego z nim białka i powrót do konformacji sprzed szoku termicznego. Pelham zaobserwował również, że jeśli białka te nie osiągają prawidłowego zwinięcia pozostają związane z białkiem szoku i ulegają degradacji.

W warunkach, w których następuje nadmierna akumulacja nieprawidłowo zwiniętych białek, komórka reaguje wzmożoną syntezą białek szoku. Jeżeli jednak

ilość nie zwiniętych polipeptydów przewyższa możliwości Hsp72 do zapobiegania akumulacji agregatów białkowych w komórce, funkcję ochronną przejmują wówczas Hsp100. Wykazują one bowiem bardzo wysokie powinowactwo do powstających pod wpływem szoku agregatów białkowych, indukując tym samym ich rozpuszczanie w sposób ATP-zależny [54]. Mechanizm tego procesu opiera się najprawdopodobniej na przerywaniu niekowalencyjnych połączeń między poszczególnymi polipeptydami [22]. Losy powstających w tej reakcji produktów uzależnione są m.in. od obecności dodatkowych białek cytoplazmatycznych, takich jak: Hsp70, Hsp40 czy enzymu-proteazy. Hsp100 współpracując z Hsp70 i Hsp40 umożliwiają reaktywację polipeptydów. Natomiast obecność proteaz w kompleksie z Hsp100 powoduje ich proteolizę [22,61,73].

Aktywność niezależną lub tylko częściowo zależną od ATP wykazują białka z rodziny Hsp90 [60]. Białka te hamują agregację i ułatwiają renaturację źle zwiniętych białek [63]. Cytoplazmatyczne Hsp90 tworzą kompleksy z szeregiem białek o aktywności kinaz tyrozynowych, np.: pp60src, białkiem wirusa RSV odpowiedzialnym za transformację nowotworową. Pp60src po zsyntetyzowaniu w cytoplazmie natychmiast łączy się z Hsp90. Dysocjacja Hsp90 z kompleksu zbiega się w czasie z fosforylacją onkoproteiny, podwyższeniem jej aktywności kinazowej oraz wbudowaniem do błony cytoplazmatycznej. Hsp90 bierze więc udział w wewnątrzkomórkowym transporcie kinaz oraz reguluje aktywność tych enzymów [36].

W innych badaniach odkryto powiązania Hsp90 z receptorami steroidowymi m.in. progesteronu, estrogenów, glukokortykoidów, androgenów i mineralokortykoidów. Wiązanie odpowiedniego hormonu do receptora i jego oddziaływanie z DNA inicjuje aktywację lub represję określonych genów. Za utrzymanie receptora w stanie gotowości do związania hormonu odpowiedzialne jest Hsp90, które wiążąc się dodatkowo z białkami cytoplazmatycznymi: Hsp73, p23, p48 (Hip), p60 (Hop) oraz immunofilinami (FKBP51, FKBP52 i Cyp-40) tworzy wieloskładnikowy kompleks receptor-Hsp90–białka towarzyszące. Jeżeli proces tworzenia kompleksu zostanie zahamowany, to receptor pozostaje w stanie nieaktywnym. Związanie hormonu powoduje dysocjację kompleksu, co z kolei odsłania domenę receptora wiążącą DNA. Hsp90 zapobiega więc interakcjom między receptorem a DNA przy braku sygnału-hormonu [15,64,79].

Do białek opiekuńczych należą też białka z rodziny Hsp20. α -B-kryształina wiąże się z nie zwiniętymi lub tylko częściowo zwiniętymi polipeptydami. Stabilizuje w ten sposób białka i chroni je przed wywołaną szokiem agregacją i precypitacją [12]. Mechanizm tej aktywności nie jest jeszcze dokładnie poznany.

Hsp27 odgrywa ważną rolę w regulacji polimeryzacji aktyny. W komórkach nie poddanych szokowi, nieufosforylowane Hsp27 przyłącza się do haczykowatego końca prawidłowo zsyntetyzowanego filamentu aktynowego, ograniczając jego dalszą polimeryzację. Szok termiczny oraz fosforylacja Hsp27 powoduje odłączanie białek szoku od tych końców, umożliwiając w ten sposób wiązanie kolejnych mo-

nomerów aktywnych z odblokowanymi filamentami. Przyspiesza to powrót uszkodzonych mikrofilamentów do prawidłowego stanu fizjologicznego sprzed szoku [44].

2. Białka szoku a termotolerancja

Istnieje szereg doniesień sugerujących, że białka szoku termicznego odgrywają kluczową rolę w nabywaniu termotolerancji. Stan ten, wywołany subletalnym szokiem termicznym lub chemicznym, określa odporność komórki na działanie wysokiej, normalnie letalnej temperatury [34]. *In vitro*, termotolerancja może być indukowana przez krótką ekspozycję komórek na temperaturę ponad 43°C, poprzedzającą następną inkubację w temperaturze 37°C (tzw. termotolerancja ostra). Termotolerancja może być też indukowana ciągłym ogrzewaniem w temperaturze powyżej 43°C (tzw. termotolerancja chroniczna) [78]. Na osiągnięcie przez komórki ssaków termotolerancji, oprócz podwyższonej temperatury, ma wpływ wiele dodatkowych czynników, takich jak: długość działania wysokiej temperatury, warunki powrotu do stanu fizjologicznego sprzed szoku, stan proliferacji oraz stan odżywczy komórek. Ogromną rolę odgrywa pH zewnątrzkomórkowe. Jego obniżenie może częściowo zahamować indukcję oraz ekspresję termotolerancji [34]. Nabywania odporności na wysokie temperatury zależy też od fazy cyklu, w jakiej komórka się znajduje. Komórki w S-fazie są szczególnie wrażliwe na podwyższoną temperaturę i nie rozwijają żadnego typu termotolerancji. Aby uzyskać chroniczną termotolerancję, komórki muszą być zablokowane w fazie G1 [78].

Mechanizm termotolerancji nie jest do końca poznany. Jednak wiele badań sugeruje, że Hsp są zaangażowane w ten proces. Zaobserwowano bowiem, że:

- szok termiczny wzmacnia syntezę Hsp, co ma związek z chwilowym rozwojem termotolerancji;
- trwałość termotolerancji jest związana ze stabilnością Hsp;
- czynniki indukujące syntezę Hsp indukują też termotolerancję i odwrotnie;
- komórki trwale odporne na szok termiczny wykazują stałą, wysoką ekspresję Hsp [34,78].

Z odpornością termiczną ściśle związane są białka szoku termicznego o masie 70 kDa. Świadczy o tym fakt wyprowadzenia całkowicie odpornej na wysoką temperaturę chemicznej linii komórkowej HR-1, charakteryzującej się nadekspresją *hsc70* w normalnych, jak i w stresowych warunkach. Nadekspresję uzyskano przez amplifikację genu *hsc70* [10]. Bezpośrednim dowodem na udział białek szoku o masie 70 kDa w nabywaniu termotolerancji są też doświadczenia wykorzystujące anty-sensowne oligonukleotydy *hsc70*. Wykazano, że transfekcja komórek takim anty-sensem powodowała ograniczoną ekspresję genów *hsp70* i *hsc70*, zwiększała wrażliwość komórek na szok termiczny oraz ograniczała zdolność rozwijania ter-

motolerancji [34]. Ostatnie badania wskazują, że termotolerancja komórkowa jest bezpośrednio związana z lokalizacją Hsp72 i Hsp73 w jądrze komórkowym [68].

Białka szoku termicznego są też zaangażowane w ochronę maszynerii składania genów (ang. *splicing*) przed działaniem czynnika termicznego. Wysokie temperatury powodują akumulację prekursorów mRNA, co wiąże się z zahamowaniem procesu składania genów. W komórkach z nabytą termotolerancją proces ten nie jest zaburzony i powstaje dojrzała mRNA [34].

Problem termotolerancji był też rozpatrywany na poziomie embrionalnym. Termotolerancja wywołana nieletalnym szokiem termicznym obniżała śmiertelność komórkową, zwiększała przeżywalność embrionów, wpływała na ich lepszy wzrost i rozwój. W nabywanie termotolerancji embrionalnej zaangażowane jest przede wszystkim Hsp27 [44].

3. Białka szoku a apoptoza

Apoptoza – zaprogramowana śmierć komórki – odgrywa ogromną rolę w embriogenezie i metamorfozie oraz w rozwoju nowotworów u organizmów wielokomórkowych [74].

Doskonałym modelem do badania apoptozy *in vitro* jest linia monoblastyczna U937. W linii tej można zarówno wywołać apoptozę, jak i uzyskać syntezę Hsp, stosując szeroką gamę czynników, takich jak: szok termiczny, TNF α czy cykloheksimid [20]. Ponieważ apoptoza i ekspresja białek szoku są indukowane przez te same czynniki, zaczęto doszukiwać się korelacji między tymi dwoma procesami. Zaobserwowano, że warunki stresowe powodują aktywację kinaz białkowych JNK i p38, które wchodzą w skład wewnątrzkomórkowej drogi przekazywania sygnałów, prowadzącej do zaprogramowanej śmierci komórki. Nadekspresja białek Hsp72 wywołana szokiem lub dodatek oczyszczonego Hsp72, hamują aktywację JNK i p38, zapobiegając tym samym apoptozie [19,40].

Potwierdzeniem hamującego wpływu Hsp70 na apoptozę są badania wykorzystujące kwercetynę jako czynnik wywołujący zaprogramowaną śmierć w komórkach nowotworowych. Ciągłe traktowanie komórek nowotworowych kwercetyną powoduje czasowo zależne obniżenie poziomu Hsp70, jak również hamuje późniejszą odpowiedź Hsp70 na szok termiczny. Umożliwia to kwercetynie indukcję apoptozy. Jeżeli natomiast komórki nowotworowe były najpierw poddane szokowi i dochodziło w nich do syntezy Hsp70, późniejsze traktowanie kwercetyną nie wywoływało śmierci komórki [74].

Odmienne wpływy na indukcję apoptozy w linii U937 mają białka szoku o masie 90 kDa. Obecność Hsp90 zwiększa wrażliwość linii U937 na apoptozę wywołaną przez TNF α i cykloheksimid, natomiast obniżenie poziomu Hsp90 chroni komórki U937 przed apoptozą. Przymuszcza się, że Hsp90 wiąże się z inhibitorem apoptozy, przez co hamuje jego działanie [20].

Do wewnątrzkomórkowych inhibitorów apoptozy należy białko szoku o masie 27 kDa. Wykazano, że w komórkach poddanych działaniu czynników wywołujących zaprogramowaną śmierć Hsp27 blokuje błonowy receptor Fas/APO-1. Obecność Hsp27 i α -B-kryształiny chroni ludzkie komórki przed apoptotycznym wpływem staurosporyny – inhibitora kinazy C oraz stresem oksydacyjnym [1,28,39].

V. PODSUMOWANIE

Czynniki fizyczne, chemiczne i biologiczne oraz towarzyszący im wzrost poziomu białek stresowych od ponad 30 lat jest obiektem badań w wielu ośrodkach całego świata. Wyniki prowadzonych doświadczeń umożliwiły wyjaśnienie mechanizmów licznych procesów wewnątrzkomórkowych, takich jak np. dojrzewanie białek czy działanie białek opiekuńczych. Wykazano, że białka stresu wybiórczo łączą się z niekompletnymi lub nieprawidłowo zwiniętymi białkami, zapobiegając ich agregacji. Uczestniczą też w kształtowaniu prawidłowej struktury białek i przywracają natywną formę białkom zdenaturowanym. Kontrolują wejście polipeptydów na szlak wydzielania, zatrzymując białka nieprawidłowo zwinięte. Regulują proliferację i różnicowanie komórek. Są odpowiedzialne za stabilizację cytoszkieletu.

Istnieje szereg możliwości praktycznego wykorzystania białek szoku w medycynie. Liczne próby kliniczne wykazały, że podwyższony poziom białek stresu w komórkach chroni organizmy przed uszkodzeniami wynikającymi z niedokrwienia tkanek podczas zabiegów chirurgicznych np. przed paralizem [66,76]. Wzrost stężenia białek szoku wywołany np. środkami farmakologicznymi mógłby stanowić dodatkową ochronę narządów zranionych oraz organów używanych do transplantacji [2].

Odkryto również powiązania między białkami stresowymi a chorobami autoimmunologicznymi. Reumatoidalne zapalenie stawów czy układowy liszaj rumieniowaty charakteryzują się podwyższonym poziomem przeciwciał skierowanych przeciwko własnym białkom stresowym chorego. Obserwacja ta może mieć kluczowe znaczenie w diagnostyce i leczeniu zaburzeń immunologicznych [21,75]. Odpowiedź stresowa może też okazać się pomocna w walce z rakiem. Niektóre guzy nowotworowe są bowiem bardziej wrażliwe na działanie wysokiej temperatury niż tkanki normalne. Mechanizm tej reakcji opiera się najprawdopodobniej na zdolności niektórych białek szoku termicznego do wywoływania apoptozy w stransformowanych komórkach [78]. Bardzo obiecujące wydają się być też badania, z których wynika, że zdrowe myszy immunizowane białkami szoku, wyizolowanymi z komórek nowotworowych, uzyskują częściową oporność na transformację nowotworową [65]. Czasem jednak białka stresu mogą stanowić przeszkodę w walce z rakiem, gdyż chronią tkanki nowotworowe przed stosowanymi onkostatykami [74].

Białka szoku mogą też w przyszłości odegrać ważną rolę w walce z chorobami wywołanymi przez priony. Zaobserwowano bowiem, że białka Hsp104 uczestniczą w indukcji konformacyjnych zmian białek ssaków PrP^C w ich formę zakaźną PrP^{Sc} [13].

Tak więc synteza białek szoku jest przykładem interesującego modelu odpowiedzi komórkowej na różnorodny stres zewnętrzny. Wykorzystując wysoką immunogenność białek szoku wiele firm biotechnologicznych pracuje nad zastosowaniem ich do produkcji szczepionek, które w przyszłości mogą odegrać ważną rolę w transplantologii, w zapobieganiu i leczeniu chorób autoimmunologicznych, zakaźnych i nowotworów.

LITERATURA

- [1] ARRIGO AP. Small stress proteins: Chaperones that act as regulators of intracellular redox state and programmed cell death. *J Biol Chem* 1998; **379** (1): 19–26.
- [2] BABA HA, SCHMID KW, SCHMID C, BLASIUS S, HEINECKE A, KERBER S, SCHELD HH, BOCKER W, DENG MC. Possible relationship between heat shock protein 70, cardiac hemodynamics and survival in early period after heart transplantation. *Transplantation* 1998; **65** (6): 799–804.
- [3] BANECKI B, ŻYLICZ M. Real time kinetics of the DnaK/ DnaJ/ GrpE molecular chaperone machine action. *J Biol Chem* 1996; **721**: 6137–6143.
- [4] BAUER I, WANNER GA, RENSING H, ALTE G, MIESCHER EA, WOLF B, PANNEN BHJ, CLEMENS MG, BAUER M. Expression pattern of heme oxygenase isoenzymes 1 and 2 in normal and stress-exposed rat liver. *Hepatology* 1998; **27** (3): 829–838.
- [5] BERCOVICH B, STANCOVSKI I, MAYER A, BLUMENFELD N, LASZLO A, SCHWARTZ AL., CIECHANOVER A. Ubiquitin-dependent degradation of certain protein substrates *in vitro* requires the molecular chaperone Hsc70. *J Biol Chem* 1997; **272** (14): 9002–9010.
- [6] BIOGGIOGERA M, TANGUAY RM, MARIN R, WU Y, MARTIN TE, FAKAN S. Localization of heat shock proteins in mouse germ cells: An immunoelectron microscopical study. *Exp Cell Res* 1996; **229**: 77–85.
- [7] BOMER U, MAARSE AC, MARTIN F, GEISSLER A, MERLIN A, SCHONFISCH B, MEIJER M., PFANNER N, RASSOW J. Separation of structural and dynamic functions of the mitochondrial translocase. *EMBO J* 1998; **17** (15): 4226–4237.
- [8] BOTZLER C, LI G, ISSELS RD, MULTHOFF G. Definition of extracellular localized epitopes of Hsp70 involved in an NK immune response. *Cell Stress Chap* 1998; **3** (1): 6–11.
- [9] BUKAU B, HORWICH AL. The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines. *Cell* 1998; **92**: 351–366.
- [10] CHEN MS, FEATHERSTONE T, LASZLO A. Amplification and altered expression of the *hsc70/U14* snoRNA gene in a heat resistant Chinese hamster cell line. *Cell Stress Chap* 1996; **1** (1): 47–61.
- [11] CHIESA R, NOGUERA I, SREDY J. Phosphorylation of Hsp25 during lens cells differentiation. *Exp Eye Res* 1997; **65** (2): 223–229.
- [12] DAS BK, LIANG JJ-N. Detection and characterization of α -crystallin intermediate with maximal chaperone-like activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **236**: 370–374.

- [13] DebBURMAN SK, RAYMOND GJ, CAUGHEY B, LINDQUIST S. Chaperone-supervised conversion of prion protein to its protease-resistant form. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 13938–13943.
- [14] DEKKER PJT, PFANNER N. Role of mitochondrial GrpE and phosphate in the ATPase cycle of matrix Hsp70. *J Mol Biol* 1997; **270** (3): 321–327.
- [15] DITTMAR KD, DEMADY DR, STANCATO LF, KRISHNA P, PRATT WB. Folding of the glucocorticoid receptor by the heat shock protein 90-based chaperone machinery. *J Biol Chem* 1997; **272**: 21213–21220.
- [16] ELLIS RJ. Steric chaperones. *TiBS* 1998; **23**: 43–45.
- [17] FOSTINIS Y, THEODOROPOULOS PA, GRAVINIS A, STOURNARAS Ch. Heat shock protein Hsp90 and its association with the cytoskeleton: a morphological study. *Biochem Cell Biol* 1992; **70**: 779–786.
- [18] FRYDMAN J, HARTL FU. Principles of chaperone-assisted protein folding: Differences between *in vitro* and *in vivo* mechanisms. *Science* 1996; **272**: 1497–1502.
- [19] GABAI VL, MERIIN AB, MOSSER DD, CARON AW, RITS S, SHIFRIN VJ, SCHERMAN MY. Hsp70 prevents activation of stress kinases. *J Biol Chem* 1997; **272** (29): 18033–18037.
- [20] GALEA-LAURI J, RICHARDSON AJ, LATCHMAN DS, KATZ DR. Increased Heat shock protein 90 expression leads to increased apoptosis in the monoblastoid cell line U937 following induction with TNF α and cycloheximide. *J Immunol* 1996; **157**: 4109–4118.
- [21] GASTON JSH. Heat shock proteins as potential targets in the therapy of inflammatory arthritis. *Biotherapy* 1998; **10** (3): 197–203.
- [22] GLOVER JR, LINDQUIST S. Hsp 104, Hsp 70 and Hsp 40: A novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* 1998; **94**: 73–82.
- [23] GREENE MK, MASKOS K, LANDRY SJ. Role of J-domain in the cooperation of Hsp 40 with Hsp70. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95** (11): 6108–6113.
- [24] HARTL FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 1996; **381**: 571–580.
- [25] HE L, FOX MH. Comparison of flow cytometry and western blotting to measure Hsp70. *Cytometry* 1996; **25**: 280–286.
- [26] HOCH B, LUTSCH G, SCHLEGEL W-P, STAHL J, WALLUKAT G, BARTEL S, KRAUSE E-G, BENNDORF R, KARCZEWSKI P. Hsp25 in isolated perfused rat hearts: Localization and response to hyperthermia. *Mol Cell Biochem* 1996; **160/161**: 231–239.
- [27] HOHFELD J. Regulation of the heat shock cognate Hsc70 in the mammalian cell: The characterization of the anti-apoptotic protein BAG-1 provides novel insights. *Biol Chem* 1998; **379** (3): 269–274.
- [28] HUOT J, HOULE F, MARCEAU F, LANDRY J. Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ Res* 1997; **80** (3): 383–392.
- [29] JOHNSON BD, SCHUMACHER RJ, ROSS ED, TOFT DO. Hop modulates Hsp70 / Hsp90 interactions in protein folding. *J Biol Chem* 1998; **273** (6): 3679–3686.
- [30] KRAWCZYK Z. Struktura, regulacja ekspresji i funkcja białek siateczki śródplazmatycznej Grp78 i Grp95. *Post Bioch* 1991; **32**: 70–75.
- [31] KRAWCZYK Z. Struktura i ekspresja genów należących do rodziny genów szoku termicznego HSP70. *Post Bioch* 1991; **37**: 62–69.
- [32] LAKHOTIA SC, RAY P. Hsp83 mutation is a dominant enhancer of lethality associated with absence of the non-protein coding hsr omega locus in *Drosophila melanogaster*. *J Biosci* 1996; **21** (2): 207–219.
- [33] LEUNG SM, HIGHTOWER LE. A 16-kDa protein functions as a new regulatory protein for Hsc70 molecular chaperone and is identified as member of the Nm23/nucleoside diphosphate kinase family. *J Biol Chem* 1996; **272**: 2607–2614.

- [34] LI GC, NUSSENZWEIG A. Thermotolerance and heat shock proteins: Possible involvement of Ku autoantigen in regulating Hsp70 expression. [w] Feige U, Morimoto RI, Yahara I, Polla B [red.] Stress-Inducible Cellular Responses. Basel/ Switzerland 1996: 425–449.
- [35] LIANG P, MACRAE TH. Molecular chaperones and cytoskeleton. *J Cell Sci* 1997; **110**: 1431–1440.
- [36] LIPIŃSKA B. Rola białek szoku termicznego. *Post Bioch* 1990; **1–2**: 32–42.
- [37] LISOWSKA K, KRAWCZYK Z. Rodzina genów stresu *hsp70* ssaków. *Post Bioch* 1998; **44**: 179–192.
- [38] MARTIN J. Molecular chaperones and protein folding. *J Bioenergetics and Biomembranes* 1997; **29** (1): 35–43.
- [39] MEHLEN P, SCHULZEOSTHOFF K, ARRIGO AP. Small stress proteins as novel regulators of apoptosis – Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1 and staurosporine-induced cell death. *J Biol Chem* 1996; **271** (28): 16510–16514.
- [40] MERIIN AB, GABAI VL, YAGLOM J, SHIFRIN VI, SCHERMAN MY. Proteasome inhibitors active stress kinases and induce Hsp72: Diverse effects on apoptosis. *J Biol Chem* 1998; **273** (11): 6373–6379.
- [41] MERRICK BA, WALKER VR, HE CY, PATTERSON RM, SELKIRK JK. Induction of novel Grp75 isoforms by 2-deoxyglucose in human and murine fibroblasts. *Cell* 1997; **119**: 185–190.
- [42] MICHELS AA, KANON B, KONINGS AWT, OHTSUKA K, BENSANAUDE O, KAMPINGA HH. Hsp70 and Hsp40 chaperone activities in cytoplasm and the nucleus of mammalian cells. *J Biol Chem* 1997; **272** (52): 33283–33289.
- [43] MIRKES PE, DOGGETT B. Accumulation of Heat shock protein 72 (Hsp72) in postimplantation rat embryos after exposure to various periods of hyperthermia (40–43°C) *in vitro*: Evidence that Hsp72 is a biomarker of heat induced embryotoxicity. *Teratology* 1992; **46**: 301–309.
- [44] MIRKES PE, LITTLE SA, CORNELL L, WELSH MJ, LANEY T-NN, WRIGHT FH. Induction of Heat shock protein 27 in rat embryos exposed to hyperthermia. *Mol Reprod and Dev* 1996; **45**: 276–284.
- [45] MOERMAN AM, KLEIN C. Developmental regulation of Hsp32, a small heat shock protein in *Dictyostelium discoideum*. *Exp Cell Res* 1997; **237** (1): 149–157.
- [46] MORRIS JA, DORNER AJ, EDWARDS CA, HENDERSHOT LM, KAUFMAN RJ. Immunoglobulin binding protein (BiP) function is required to protect cells from endoplasmic reticulum stress but is not required for secretion of selective proteins. *J Biol Chem* 1997; **272** (7): 4327–4334.
- [47] MULTHOFF G, BOTZLER C, ISSELS R. The role of heat shock proteins in the stimulation of an immune response. *J Biol Chem* 1998; **379** (3): 297–300.
- [48] NAKAI A, TANABE M., KAWAZOE Y, INAZAWA J, MORIMOTO RI, NAGATA K. HSF4, a new member of the human heat shock factor family which lacks properties of a transcriptional activator. *Mol Cell Biol* 1997; **17** (1): 469–481.
- [49] NEMOTO T, SATO N. Oligomeric forms of the 90 kDa heat shock protein. *Biochem J* 1998; **330**: 989–995.
- [50] NETZER WJ, HARTL FU. Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and independent mechanisms. *TIBS* 1998; **23**: 68–73.
- [51] OUGHTRED R, BEDARD N, VRIELINK A, WING SS. Identification of amino acid residues in a class I ubiquitin-conjugating enzyme involved in determining specificity of conjugation of ubiquitin to proteins. *J Biol Chem* 1998; **273**: 18435–18442.
- [52] PARSELL DA, SANCHEZ Y, STITZEL JD, LINDQUIST S. Hsp104 is highly conserved protein with two essential nucleotide-binding sites. *Nature* 1991; **353**: 270–273.
- [53] PARSELL DA, KOWAL AS, LINDQUIST S. *Saccharomyces cerevisiae* Hsp104 protein. *J Biol Chem* 1994; **269**: 29537–29545.

- [54] PARSELL DA, KOWAL AS, SINGER MA, LINDQUIST S. Protein disaggregation mediated by heat shock protein Hsp104. *Nature* 1994; **372**: 475–478.
- [55] PELHAM HRB. Speculations on the functions of the major heat shock and glucose regulated proteins. *Cell* 1986; **46**: 959–961.
- [56] PRAPAPANICH V, CHEN SY, SMITH DF. Mutation of Hip's carboxy-terminal region inhibits a transitional stage of progesterone receptor assembly. *Mol Cell Biol* 1998; **18** (2): 944–952.
- [57] RICHARDSON A, LANDRY SJ, GEORGOPOULOS C. The ins and outs of molecular chaperone machine. *TiBS* 1998; **23** (4): 138–143.
- [58] RUDIGER S, BUCHBERGER A, BUKAU B. Interaction of Hsp70 chaperones with substrates. *Nat Struct Biol* 1997; **4** (5): 342–349.
- [59] SATO K, SAITO H, MATSUKI N. Hsp70 is essential to neuroprotective effect of heat shock. *Brain Res* 1996; **740**: 117–123.
- [60] SCHEIBEL T, NEUHOFEN S, WEIKL T, MAYR CH, REINSTEIN J, VOGEL PD, BUCHNER J. ATP-binding properties of human Hsp90. *J Biol Chem* 1997; **272** (30): 18608–18613.
- [61] SCHIRMER EC, GLOVER JR, SINGER MA, LINDQUIST S. Hsp100/ Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *TiBS* 1996; **21**: 289–296.
- [62] SCHOBER A, MÜLLER E, THURAU K, BECK FX. The response of heat shock proteins 25 and 72 to ischemia in different kidney zones. *Eur J Physiol* 1997; **434**: 292–299.
- [63] SCHWARZ E, HAUKE L, RAINER R. The effect of molecular chaperones on *in vivo* and *in vitro* folding processes. *J Biol Chem* 1996; **377**: 411–416.
- [64] SMITH DF. The pathway of assembly of progesterone receptor. [w] Gething M-J [red.] *Guidebook to Molecular Chaperones and Protein Folding Catalysis*. Oxford: University Press 1997: 519–522.
- [65] SUTO S, SRIVASTAVA PK. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science* 1995; **269**: 1585–1588.
- [66] TAGGART DP, BAKKENIST CJ, BIDDOLPH SC, GRAHAM AK, MC GEE JO. Induction of myocardial heat shock protein 70 during cardiac surgery. *J Pathol* 1997; **182** (3): 362–366.
- [67] TAKAYAMA S, BIMSTON DN, MATSUZAWA S, FREEMAN BC, AIMESEMPE C, XIE ZH, MORIMOTO RJ, REED JC. BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70. *EMBO J* 1997; **16** (16): 4887–4896.
- [68] THAYER JM, MIRKES PE. Induction of Hsp72 and transient nuclear localization of Hsp73 and Hsp72 correlate with the acquisition and loss of thermotolerance in postimplantation rat embryos. *Dev Dyn* 1997; **208**: 227–243.
- [69] van de KLUNDERT FAJM, GIJSEN MLJ, van den IJSSEL PRLA, SNOECKX LHEH, de JONG. Alpha-B-crystallin and Hsp25 in neonatal cardiac cells – differences in cellular localization under stress conditions. *Eur J Cell Biol* 1998; **75** (1): 38–45.
- [70] VICKERY LE, SILBERG JJ, Ta DT. Hsc66 and Hsp20, a new heat shock cognate molecular chaperone system from *E. coli*. *Protein Sci* 1997; **6** (5): 1047–1056.
- [71] VILLASECA MA, ROA I, ARAYA JC, FLORES P. Double immunostaining for p53 and molecular chaperone Hsp72/73 in gastric carcinoma. *J Clin Pathol-Mol Pathol* 1997; **50** (6): 317–321.
- [72] VOOS W, von AHSEN O, MULLER H, GUIARD B, RASSOW J, PFANNER N. Differential requirement for the mitochondrial Hsp70-Tim44 complex in unfolding and translocation of preproteins. *EMBO J* 1996; **15** (11): 2668–2677.
- [73] WAWRZYNOW A, BANECKI B, ŻYLICZ M. The Clp ATPases define a novel class of molecular chaperones. *Mol Microbiol* 1996; **21** (5): 895–899.
- [74] WEI Y, ZHAO X, KARIYA Y, FUKATA H, TESHIGAWARA K, UCHIDA A. Induction of apoptosis by quercetin: Involvement of heat shock proteins. *Cancer Res* 1994; **54**: 4952–4957.
- [75] WELCH WJ. Mammalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress proteins and implication for medicine and disease. *Physiol Rev* 1992; **72** (4): 1063–1081.

- [76] WICKELGREN I. Heat shock proteins linked to stroke protection. *Science* 1997; **278**: 1405.
- [77] XU M, WRIGHT WD, HIGASHIKUBO R, ROTI JR. Intracellular distribution of Hsp70 during long duration moderate hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 1998; **14** (2): 211–225.
- [78] XU M, WRIGHT WD, HIGASHIKUBO R, ROTI ROTI JL. Chronic thermotolerance with continued cell proliferation. *Int J Hyperthermia* 1996; **12** (5): 645–660.
- [79] YAMASHITA S. Localization and functions of of steroid hormone receptors. *Hist Histopat* 1998; **13** (1): 255–270.
- [80] ZIMMERMANN R. The role of molecular chaperones in protein transport into the mammalian endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1998; **379** (3): 275–282.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 28.04.1998 r.

Przyjęto: 26.11.1998 r.

Adres autora: ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

APOPTOZA POPROMIENNA – MECHANIZMY, ROLA BIOLOGICZNA I MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA W TERAPII NOWOTWORÓW*

RADIATION-INDUCED APOPTOSIS: MECHANISMS, BIOLOGICAL RELEVANCE AND POTENTIAL APPLICATION TO RADIOTHERAPY OF CANCER

Marek Krzysztof JANIĄK, Jolanta WREMBEL-WARGOCKA, Aneta CHEDA

Zakład Ochrony Radiologicznej i Radiobiologii,
Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii, Warszawa

Streszczenie: Ostatnie dwie dekady, a zwłaszcza lata dziewięćdziesiąte są świadkiem ogromnego postępu w badaniach nad mechanizmami i biologiczną rolą zaprogramowanej śmierci (apoptozy) komórek wywołanej działaniem promieniowania jonizującego. Niniejsze opracowanie dokonuje przeglądu najnowszych danych dotyczących szlaków sygnalizacyjnych oraz czynników regulacyjnych i efektorowych programu apoptotycznego uruchamianego w napromieniowanych komórkach prawidłowych i nowotworowych, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów zależnych i niezależnych od ekspresji białka p53. Poznanie czynników modyfikujących podatność i nasilenie procesu apoptozy w komórkach stwarza nadzieję na ich wykorzystanie w terapii nowotworów. W ostatniej części niniejszego przeglądu opisano próby doświadczalne i kliniczne indukcji i/lub zwiększenia stopnia apoptozy w komórkach nowotworowych jako nową strategię leczniczą wspierającą tradycyjne formy radioterapii.

Słowa kluczowe: Promieniowanie jonizujące, apoptoza, p53, radioterapia.

Summary: Programmed (apoptotic) cell death has been on the forefront of biomedical studies for the last two decades. Indeed, during the nineties we have witnessed the unparalleled accumulation of new data describing the mechanisms and biological relevance of the programmed cell death (apoptosis) induced by ionizing radiation. The present paper reviews most of the recent results from studies of the signaling pathways, molecular regulators, and effectors of the apoptotic program triggered by radiation in normal and tumor cells with special emphasis on the p53-dependent and p53-independent mechanisms. The establishment that apoptotic propensity is under genetic regulation opens new avenues in the treatment of cancer. In the final section of the review potential therapeutic strategies aimed at stimulation of the programmed cell death in tumor cells *in vivo* are discussed.

Key words: Ionizing radiation, apoptosis, p53, radiotherapy.

*Praca finansowana ze środków budżetowych WIHiE/KBN 0006.

WPROWADZENIE

Od roku 1972, kiedy to J.F.R. Kerr, A.H. Willie i A.R. Currie nadali tzw. zaprogramowanej śmierci komórkowej (ang. *programmed cell death*, *PCD*) nazwę apoptoza (od greckiego słowa oznaczającego opadanie liści drzew lub płatków kwiatów) [70], intensywne badania prowadzone na roślinach, robakach, owadach i ssakach wykazały znaczenie i rolę tego zjawiska zarówno w rozwoju embrionalnym i utrzymaniu dojrzałego organizmu w homeostazie, jak i w patogenezie całego szeregu chorób i zaburzeń ustrojowych (tab. 1) [9,29,44,51,59,112,139,156]. Obecnie

TABELA 1. Choroby związane z zahamowaniem lub nasileniem apoptozy

Zahamowanie apoptozy	Nasilenie apoptozy
Nowotwory: Chłoniaki Białaczki Nowotwory ze zmutowanym <i>p53</i> Nowotwory hormonozależne: rak sutka rak prostaty rak jajnika	Zaburzenia układu odpornościowego: AIDS Cukrzyca typu I Zaburzenia neurologiczne: Choroba Alzheimera Choroba Parkinsona Stwardnienie zanikowe boczne Stwardnienie rozsiane Barwnikowe zwyrodnienie siatkówki Zwyrodnienie mózdzku Choroby prionowe <i>Ataxia teleangiectasia</i>
Choroby z auto- i alloagresji: Liszaj rumieniowaty układowy Immunogenne zapalenie kłębków nerkowych Reumatoidalne zapalenie stawów Choroba Gravesa Zespół Canale'a-Smitha (autoagresywny zespół limfoproliferacyjny) Ostra choroba przeszczep - przeciw gospodarzowi (GvH)	Zespoły mielodysplastyczne: <i>Niedokrwistość aplastyczna</i> Niedokrwienie tkanek: Zawał mięśnia sercowego Udary Uszkodzenia po reperfuzji Nowotwory: Czerniak Wątrobiak Rak okrężnicy Nabłoniak nerwowy (retinoblastoma)
Infekcje wirusowe wywołane: wirusami typu <i>Herpes</i> adenowirusami wirusami typu <i>Pox</i>	Zaburzenia jelitowe: Wrzodziejące zapalenie jelit Czerwonka Biegunki indukowane promieniowaniem jonizującym lub wirusem HIV Torbielowość nerek Toksyczne uszkodzenie wątroby Choroba Wilsona Przewlekła neutropenia Choroba Hashimoto

przeważa pogląd, że apoptoza jest najważniejszym, jeżeli nie jedynym, mechanizmem eliminacji pojedynczych grup komórek zarówno prawidłowych, wyprodukowanych w nadmiarze lub nadmiernie pobudzonych w swej aktywności, jak i tych, których materiał genetyczny został zmieniony lub uszkodzony pod wpływem działania czynników zewnętrznych. Nic więc dziwnego, że ten rodzaj śmierci komórkowej odgrywa istotną rolę w zapobieganiu powielaniu się zaburzeń w materiale genetycznym wywołanych działaniem promieniowania jonizującego i innych czynników klastogennych (uszkodzających DNA). Istotnie, wiele danych dotyczących charakterystycznych cech i mechanizmów molekularnych apoptozy pochodzi z badań radiobiologicznych, w których całe zwierzęta lub wyizolowane komórki poddawane były działaniu promieniowania jonizującego. Co więcej, na długo przed powstaniem terminu apoptoza, bo już w roku 1952, C. A. Trowell opisał występowanie pyknotycznych jąder limfocytów węzłów chłonnych myszy, które napromieniano *in vitro* promieniami X w zakresie dawek od 0,5 do 8,0 Gy [140] (tab. 2). Tego typu morfologiczne zmiany w jądrze, polegające na kondensacji i zmianie barw-

TABELA 2. Historia badań dotyczących apoptozy indukowanej przez promieniowanie jonizujące

1952	opis pyknotycznych limfocytów węzłów chłonnych po napromienieniu <i>in vitro</i> dawkami 0,5–8,0 Gy [Trowell C.A., <i>J. Pathol. Bacteriol.</i> 64: 687, 1952]
1955	zmiany w jądrach limfocytów poddanych <i>in vitro</i> działaniu promieni X opisywane jako półksiężycowate, pyknotyczne i pofragmentowane [Schrek R., <i>Radiology</i> 65: 912, 1955]
1972	Kerr i wsp. definiują zjawisko apoptozy [Kerr J.F.R., Willie A.H., Currie A.R., <i>Br. J. Cancer</i> 26:239, 1972] opis ciał apoptotycznych w komórkach przytarczyc szczura poddanych działaniu promieni X [Pratt N., Sodicoff M., <i>Arch. Oral Biol.</i> 17: 1177, 1972]
1975	opis apoptozy w komórkach nowotworowych indukowanej przez czynniki chemiczne i promieniowanie jonizujące [Searle J., et al. <i>J. Pathol.</i> 116: 129, 1975]
1977	opis zmian typu apoptotycznego w komórkach krypt jelitowych poddanych działaniu promieni X i gamma [Potten C., <i>Nature</i> 269: 518, 1977]
1980	opis apoptozy w napromienionych limfocytach (napromienione fibroblasty nie ulegają apoptozie) [Willie A.H., Kerr J.F.R., Currie A.R., <i>Int. Rev. Cytol.</i> 68:251, 1980]
1982	opis apoptozy w napromienionych komórkach krypty jelita [Hendry J.H. & Potten C.S., <i>Int. J. Radiat. Biol.</i> 42: 621, 1982]
1986–1989	opisy apoptozy, jako głównego rodzaju śmierci, w napromienionych pomiotycznych komórkach ślinianek
Od 1990	apoptoza popromienna opisywana w różnych liniach komórkowych <i>in vitro</i> i komórkach nowotworowych <i>in vivo</i> ; pierwsze próby klinicznego wykorzystania czynników modyfikujących nasilenie apoptozy w komórkach nowotworowych

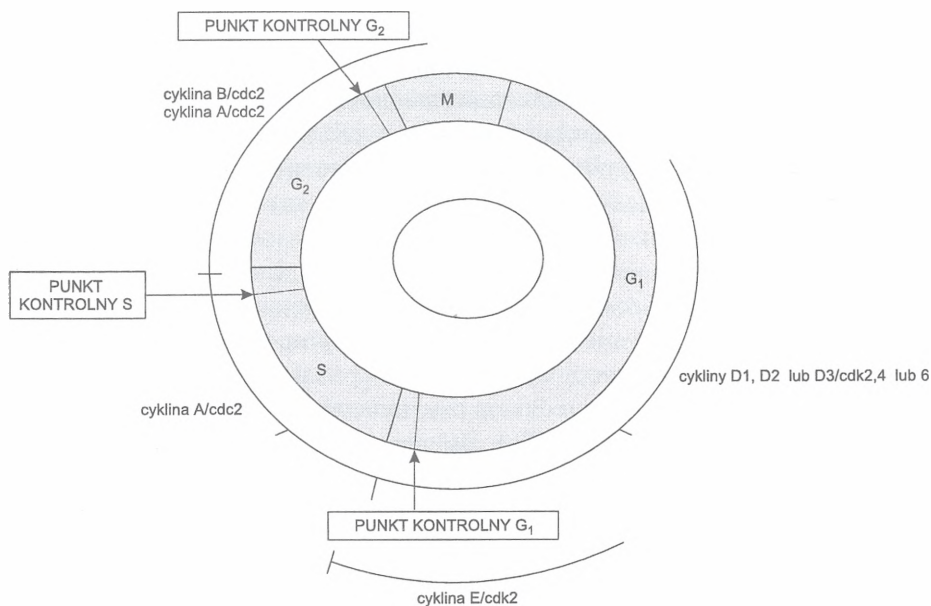
liwości chromatyny, są charakterystycznym zjawiskiem towarzyszącym śmierci apoptotycznej komórek.

W ostatnich latach intensywnie prowadzone badania dostarczają ciągle wielu nowych szczegółów na temat roli biologicznej i molekularnego podłoża apoptozy, co jest na bieżąco podsumowywane w licznych opracowaniach autorów polskich i zagranicznych [29, 85,106,121,139,156]. W obecnej pracy skupiliśmy się więc na prezentacji aktualnych danych dotyczących wyłącznie funkcji i mechanizmów zaprogramowanej śmierci komórkowej indukowanej i/lub nasilanej przez promieniowanie jonizujące i wynikających stąd nowych możliwości terapeutycznych.

APOPTOZA POPROMIENNA

Krytyczną strukturą komórkową uszkodzaną przez promieniowanie jonizujące jest materiał genetyczny. W komórkach aktywnie rozmnażających się, czyli znajdujących się w cyklu komórkowym, materiał ten jest nieustannie powielany i przekazywany komórkom potomnym. Zaburzeniami wywołanymi przez promieniowanie jonizujące, które mają największe znaczenie biologiczne, są tzw. jedno-, a zwłaszcza dwuniciowe pęknięcia łańcucha DNA (ang. *single-* oraz *double-strand breaks*) [10, 68, 149]. Jeżeli takie uszkodzenia nie zostaną naprawione lub w inny sposób „unieszkodliwione”, ich powielenie w fazie S cyklu i rozdział w mitozie prawdopodobnie doprowadzi do ich utrwalenia i pojawienia się aberracji chromosomalnych w komórkach potomnych [10]. Nic więc dziwnego, że – zgodnie z prawem Bergonie i Tribondeau – najbardziej radiowrażliwe są komórki aktywnie dzielące się i najmniej zróżnicowane. Istotnie, promieniowanie jonizujące na ogół nie indukuje zaprogramowanej śmierci komórkowej w większości dojrzałych, nieproliferujących komórek; wyjątkiem od tej reguły są postmitotyczne komórki ślinianek [132] oraz spoczynkowe lub aktywowane limfocyty obwodowe [27].

W radiobiologii, promieniowrażliwość komórek proliferujących mierzona jest ich zdolnością do kontynuacji podziałów po napromienieniu i tworzenia kolonii złożonych z co najmniej 50 komórek potomnych [50]. Blokada tworzenia takich kolonii wynikać może z przejściowego albo trwałego popromiennego zahamowania cyklu komórkowego w tzw. punktach kontrolnych (ang. *check points*) fazy G1, S lub G2 cyklu komórkowego (rys. 1). Rola punktów kontrolnych polega na rejestracji sygnałów płynących zarówno z wnętrza, jak i z otoczenia komórki oraz „podejmowaniu decyzji” o możliwości kontynuowania cyklu [57, 89]. Do najważniejszych sygnałów endogennych, które regulują cykl komórkowy, należy informacja o stanie integralności genomu. Na przykład informacja (sygnał) o powstaniu uszkodzenia w łańcuchu DNA w fazie G1 doprowadzi do zablokowania przejścia komórki do fazy S (blokada w punkcie kontrolnym G1) po to, aby nie doszło do powielenia i utrwalenia uszkodzenia w trakcie replikacji materiału genetycznego. Jeżeli sygnał taki odebrany zostanie w fazie S lub G2, cykl komórkowy zatrzyma się w jednej



RYSUNEK 1. Cykl komórkowy, punkty kontrolne i czynniki regulacyjne. cdk = kinaza zależna od cykliny (ang. *cyclin-dependent kinase*)

z tych faz (odpowiednio w punktach kontrolnych S i G₂), co zapobiegać ma podziałowi uszkodzonego DNA w mitozie i związanej z tym indukcji aberracji chromosomalnych.

Każde uszkodzenie nici DNA uruchamia w komórce mechanizmy naprawcze. Dzięki dużej wydajności i sprawności tych mechanizmów większość endogennych oraz znaczna część egzogennych uszkodzeń materiału genetycznego (w tym również pęknięć dwuniciowych) jest szybko i precyzyjnie usuwana [68]. Wykrycie uszkodzenia i związane z tym zatrzymanie podziału komórki w określonym punkcie kontrolnym daje komórce czas potrzebny na naprawę swej nici DNA [57]. Jeżeli jednak uszkodzenie jest zbyt duże i/lub naprawa jest nieskuteczna, to jedynym sposobem „unieszkodliwienia” tego uszkodzenia, a więc i potencjalnych skutków powstania aberracji chromosomalnych (w tym transformacji nowotworowej), jest eliminacja komórki mającej takie nieusuwalne zaburzenie materiału genetycznego. Uruchamiany jest wtedy mechanizm zaprogramowanej śmierci komórkowej [19]. Ponieważ komórka ginie, zanim jeszcze wejdzie w fazę podziałową, mówimy o tzw. *interfazalnej śmierci popromiennej*. Obecnie uważa się, że typowym rodzajem śmierci napromienianych komórek w interfazie jest apoptoza [40,159].

Jednakże apoptoza uruchamiana jest również wtedy, gdy – mimo istnienia uszkodzeń popromiennych w DNA – nie dochodzi do zablokowania cyklu komórkowego i komórka przechodzi przez kolejne fazy podziałowe. Prowadzi to do

nagromadzenia się różnych aberracji chromosomalnych, których ilość i jakość jest letalna dla komórki. Odpowiada to od dawna znanemu w radiobiologii terminowi *śmierci mitotycznej* [138]. Ponieważ napromienione i dalej dzielące się komórki giną ostatecznie zarówno śmiercią apoptotyczną, jak i nekrotyczną [27, 138], nie jest do końca wyjaśnione, czy aberracje chromosomalne są bezpośrednim induktorem procesu apoptotycznego i czy martwica komórek nie ma charakteru wtórnego w stosunku do apoptozy.

Nie do końca ustalony jest również udział (rola) apoptozy w określaniu stopnia radiowrażliwości komórek ocenianej za pomocą ich potencjału klonogennego po napromienieniu. Wiele danych sugeruje, że istnieje proporcjonalna, odwrotna zależność między nasileniem apoptozy popromiennej a zdolnością tworzenia kolonii [6, 48], czego wyrazem ma być redukcja tzw. ramienia na krzywej przeżywalności populacji komórek klonogennych [86]. Istotnie, jeżeli obserwacje prowadzone są wystarczająco długo, śmiercią apoptotyczną ginie niemal cała populacja napromienianych komórek [100]. Inni autorzy twierdzą jednak, że zaprogramowana, popromienna śmierć komórek nie jest związana lub tylko częściowo jest odpowiedzialna za utratę potencjału klonogennego (a więc radiowrażliwość) populacji komórkowych poddanych działaniu promieniowania [6, 27, 63], co może być związane z naturalną podatnością tych komórek na indukcję popromiennej apoptozy [119].

Nasilenie apoptozy wywołanej działaniem promieniowania jonizującego w podatnych na jej indukcję komórkach zmienia się w zależności od fazy cyklu komórkowego. W odróżnieniu jednak od klasycznej radioczułości mierzonej zdolnością tworzenia kolonii *in vitro*, w której najbardziej odporne na promieniowanie są komórki w trakcie syntezy DNA [50, 51], apoptoza jest najsilniej wyrażona po ekspozycji komórek znajdujących się w fazie S i G_2 cyklu, najsłabiej natomiast w komórkach w fazie G_1 [48, 87, 111]. Co więcej, odwrotnie niż w klasycznych testach przeżywalności, w których podział dawki całkowitej na frakcje prowadzi do wzrostu radiooporności komórek wskutek działania mechanizmów naprawczych (tzw. efekt Elkinda-Sutтона) [30], apoptoza ulega nasileniu w przypadku stosowania dawek frakcjonowanych w porównaniu z jednorazową dawką promieniowania (tzw. odwrócony efekt dawki podzielonej; ang. *inverse split-dose effect*) [84, 86, 101]. Efekt ten wynika prawdopodobnie z oddziaływania promieniowania na subpopulacje komórek podatnych na apoptozę, które pojawiają się kolejno po każdej frakcji dawki ogólnej [101]. Należy zaznaczyć, że wyniki te odnosić się mogą tylko do niektórych typów komórek nowotworowych i/lub transfekowanych onkogenami. I tak, w przypadku komórek potworniaka (linia F9), dla których apoptoza jest podstawowym rodzajem śmierci popromiennej, nie obserwowano różnic w stopniu apoptozy zależnych od fazy cyklu komórkowego czy frakcjonowania dawki całkowitej [80]. Co ciekawe, w badaniach tych i innych autorów nie stwierdzono zmian nasilenia apoptozy wynikających ze stosowania różnych mocy dawek promieniowania, co

również odróżnia ten rodzaj śmierci komórkowej od „śmierci” klonogennej [80, 86].

Indukcja apoptozy przez promieniowanie nie zależy również od stopnia utleniania komórek, których potencjał klonogeny po napromienieniu jest większy w warunkach hipoksji niż przy normalnym stężeniu tlenu. Rzeczywiście, w niektórych badaniach nie stwierdzono żadnej korelacji między stężeniem tlenu komórkowego a stopniem apoptozy popromiennej [109], w innych natomiast zarówno hiper-, jak i hipoksja indukowały proces zaprogramowanej śmierci komórek [5, 43, 109]; w niektórych z tych badań prowadzonych na komórkach mózgowych apoptoza wywołana niedotlenieniem związana była z pobudzeniem ekspresji genów tzw. reakcji wczesnej (ang. *immediate early response genes*), należących do rodzin *jun* i *fos* [5]. Istnieją jednak również dane wskazujące, że w komórkach nerwowych hipoksja prowadzi do ekspresji takich genów, jak: *c-jun*, *bFGF* i *NGF*, czemu towarzyszy zahamowanie lub opóźnienie procesu apoptotycznego [161]. Z kolei, zdolność indukcji apoptozy przez promieniowanie jonizujące o różnym współczynniku liniowego przenoszenia energii (ang. *linear energy transfer*; LET) koreluje ze względną efektywnością biologiczną (ang. *relative biological effectiveness*, RBE) tego promieniowania. I tak, Palayoor i wsp. wykazali, że 4 razy więcej komórek chłoniaka mysiego podlegało blokadzie w fazie G2 cyklu i ginęło śmiercią apoptotyczną po napromienieniu tych komórek cząstkami alfa w porównaniu z ekspozycją na promienie gamma [113], natomiast Hendry i wsp. stwierdzili, że neutrony o energiach od 14 do 600 MeV są 3–4 razy bardziej skuteczne w indukcji apoptozy w komórkach krypt jelitowych myszy niż promienie gamma [58]. Te ostatnie wyniki nie znalazły jednak potwierdzenia w badaniach Warenius i Downa, którzy nie wykryli różnic w stopniu apoptozy indukowanej w mysich tymocytach przez szybkie neutrony o energii 62,5 MeV oraz fotony o energii 4 MeV [150].

Apoptoza zależna od funkcji białka p53

Jednym z najważniejszych czynników wewnątrzkomórkowych związanych z regulacją odpowiedzi komórki na promieniowanie jonizujące jest białko o masie cząsteczkowej 53 kDa, będące produktem genu *p53* [13]. Gen ten należy do grupy tzw. supresorów nowotworzenia, czego świadectwem jest m.in. obecność jego zmutowanej, nieczynnej formy w ok. 60% wszystkich nowotworów człowieka [62]. Białko p53 jest z kolei aktywnym czynnikiem jądrowym, który stymuluje (transaktywuje) lub hamuje (transrepresjonuje) transkrypcję wielu różnych genów [148] (tab. 3). W warunkach prawidłowych, białko p53 jest mało stabilne i nie pełni swej funkcji regulatora transkrypcji. Aktywacja genu *p53* prowadzi do nasilenia translacji mRNA, stabilizacji i translokacji produktu do jądra komórkowego, co indukuje aktywność transkrypcyjną białka p53. Ostatnio wykazano, że dwufazowe

TABELA 3. Geny, których funkcja jest pobudzana i hamowana przez aktywność transkrypcyjną białka p53

Geny aktywowane	Geny hamowane
<i>p21^{waf1/cip1}</i>	<i>Bcl-2</i>
<i>GADD45</i>	<i>PCNA</i>
<i>MDM-2</i>	<i>IL-6</i>
<i>Bax</i>	<i>Rb</i>
<i>Fas</i>	<i>c-fos</i>
<i>Mck</i>	<i>MDR1</i>
<i>TGF-α</i>	<i>p53</i>
<i>cyklina G1</i>	<i>NOS-2</i>
<i>IGF-BP3</i>	<i>trombospondyna 1</i>

rych produkty biorą, odpowiednio, udział w naprawie DNA i indukują blokadę cyklu komórkowego w punkcie kontrolnym G1 [2, 20]. Zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G2 może również zależeć od aktywacji genu *p53* [2, 47, 126]. Nic więc dziwnego, że białko p53 nazwano „strażnikiem genomu” [79].

Alternatywnie, wzrost poziomu białka p53 w komórce prowadzić może do indukcji zaprogramowanej śmierci komórkowej. Apoptoza zależna od p53, indukowana przez promieniowanie jonizujące o niskim LET w zakresie dawek od 1 do 10 Gy, zachodzi przede wszystkim w limfoblastach [91, 111, 157], komórkach macierzystych krypt jelitowych [99] oraz w różnych komórkach nowotworowych *in vitro* i *in vivo* [15, 77, 97, 113], natomiast napromieniane tymi samymi dawkami fibroblasty nie giną śmiercią apoptotyczną, ale ich wzrost ulega zahamowaniu [91, 139].

Obecnie uważa się, że – przynajmniej w niektórych typach nowotworów – funkcja supresyjna nowotworzenia genu *p53* wiąże się z jego działaniem proapoptotycznym, a nie z indukcją blokady cyklu komórkowego [11, 56, 136]. Co więcej, unieczynnienie funkcji tego genu w drodze mutacji prowadzi do spadku proinwazyjności komórek [81, 97], a także do wybiórczego wzrostu w guzie nowotworowym liczby komórek niepodatnych na indukcję apoptozy pod wpływem niedotlenienia [43]. Co ciekawe, w niektórych badaniach wykazano, że pochłonięcie tzw. małych, „środowiskowych” dawek promieniowania jonizującego (0,025–0,5 Gy) nie tylko nie nasila, ale prowadzi do obniżenia spontanicznego poziomu apoptozy w tymocytach pobranych od napromienianych myszy oraz w hodowli komórek chłoniaka EL4 poddanych działaniu promieniowania jonizującego *in vitro* [88, 128]. Ponadto, w komórkach napromienionych promieniami gamma najpierw w dawce 0,01 Gy, a następnie w dawkach od 4 do 12 Gy, nasilenie charakterystycznej dla apoptozy fragmentacji DNA było znamienne mniejsze niż w komórkach nie poddanych działaniu pierwszej dawki (0,01 Gy) promieniowania [72].

przemieszczanie się tego białka z cytoplazmy do jądra stymulowane jest przez wolne rodniki generowane w komórce przez promieniowanie jonizujące [96].

Głównym czynnikiem, który sam w sobie wystarcza dla aktywacji funkcji genu *p53*, jest uszkodzenie nici DNA; p53 może rozpoznawać to uszkodzenie bezpośrednio lub za pośrednictwem innych detektorów, np. produktu genu *ATM* (*ataxia teleangiectasia mutated*) [8, 158]. Dochodzi wtedy do wzrostu poziomu białka p53 w komórce, co prowadzi do pobudzenia transkrypcji m.in., takich genów jak *GADD45* i *p21^{WAF-1/CIP-1}*, któ-

Mimo iż zahamowanie cyklu komórkowego w którymś z punktów kontrolnych, które ma umożliwiać eliminację wykrytych uszkodzeń DNA, powinno – w przypadku niemożności usunięcia tego uszkodzenia – prowadzić do uruchomienia mechanizmu zaprogramowanej śmierci komórkowej, wiele danych wskazuje, że blokada cyklu i apoptoza są zjawiskami niezależnymi od siebie [87, 144]. Jak dotąd, nie znaleziono przekonującej odpowiedzi na pytanie, dlaczego w jednych warunkach stabilizacja p53 indukuje blokadę cyklu komórkowego, w innych natomiast prowadzi do uruchomienia sygnałów proapoptotycznych. Istnieją dane wskazujące na to, że istotną rolę – poza rodzajem komórek – może odgrywać stopień uszkodzenia DNA: przy niewielkim uszkodzeniu dochodzić ma do przejściowej, krótkotrwałej stabilizacji p53 i związanej z tym blokady w fazie G1 (lub G2) cyklu, natomiast większe uszkodzenie indukować ma bardziej trwałą kumulację dużej liczby cząsteczek tego białka, prowadząc do zapoczątkowania procesu apoptotycznego [31]. Istotnie, w niektórych rodzajach komórek nowotworowych podwyższony poziom białka p53 prowadzi do indukcji apoptozy [129]. Wydaje się również prawdopodobne, że równoczesna ekspresja p53 (co prowadzi do blokady cyklu komórkowego) oraz niektórych produktów onkogenów wirusowych w stransformowanych komórkach (np. pochodzącego z adenowirusa peptydu E1A, który stymuluje proliferację) prowadzić może do „konfliktu interesów”, czego końcowym wyrazem jest wejście komórki na drogę zaprogramowanej śmierci [37].

Nie wiadomo również dokładnie, jaki jest molekularny mechanizm indukcji apoptozy zależnej od p53. Być może, p53 pobudza transkrypcję genów, których produkty działają proapoptotycznie. Istotnie, uszkodzenie genomu komórki indukuje zależną od p53 ekspresję genu *bax*, którego produkt jest stymulatorem apoptozy [152]. O tym, że *bax* może być jednym z mediatorów popromiennej apoptozy *in vivo* świadczą wyniki badań, w których wykazano, że w komórkach narządów limfatycznych i nabłonku jelita cienkiego myszy poddanych działaniu 8 Gy promieniowania gamma dochodzi do gwałtownego wzrostu poziomu tego białka, czemu towarzyszy masywna apoptoza obserwowana w tych narządach [74].

Stabilizacja p53 prowadzi również do pobudzenia i/lub nasilenia w komórce ekspresji receptora Fas (Apo-1; CD95), który – po połączeniu ze swoim ligandem na powierzchni komórki (FasL; CD95L) – jest jednym z najsilniejszych generatorów sygnałów prowadzących do apoptozy [110]. Ostatnio wykazano, że podwyższona ekspresja receptora Fas występuje po napromienieniu tylko w tych w komórkach nowotworowych, które mają czynny (tzw. dziki) gen *p53*; co ciekawe, w napromienianych komórkach prawidłowych nie obserwowano wzrostu poziomu białka Fas [130]. Białko p53 aktywuje wreszcie gen *IGF-BP3*, którego produkt wiąże się z czynnikiem IGF (*insulin-like growth factor*) i blokuje jego funkcję; pozbawienie komórek wpływu tego czynnika może być wystarczającym bodźcem proapoptotycznym [14]. Ponieważ jednak wykazano, że do uruchomienia programu własnej śmierci nie jest konieczna ekspresja nowych genów (mRNA) ani synteza nowych

białek w komórce, w grę może wchodzić również blokada transkrypcji genów odpowiedzialnych za utrzymanie komórki w cyklu życiowym i/lub działających antyapoptotycznie. Rzeczywiście, p53 hamuje ekspresję takich genów, jak: *bcl-2* [105], *IL-6* [125], *PCNA* [98], *Rb* [131] oraz *c-fos* [75] (tab. 3).

Obecnie uważa się, że niezależnie od funkcji transkrypcyjnej i/lub represyjnej czynnika p53 w mechanizmie jego działania proapoptotycznego istotną rolę odgrywa bezpośrednia interakcja tego białka z już istniejącymi wewnątrzkomórkowymi czynnikami regulatorowymi. Ostatnio, w badaniach prowadzonych na ludzkich fibroblastach *in vitro* wykazano, że helikazy DNA – XPB i XPD, które wchodzi w skład kompleksu transkrypcyjno-naprawczego TFIIH, swoiście wiążą się z p53, co prowadzi do blokady aktywności tych enzymów [146] oraz uruchomienia wewnątrzkomórkowego szlaku proapoptotycznego [145, 147].

Ponieważ apoptozę zależną od funkcji białka p53 wywołują – poza uszkodzeniem DNA – niedobór niektórych czynników wzrostowych [14, 69] oraz ekspresja onkogenów wirusowych lub ich komórkowych odpowiedników (protoonkogenów) [16, 64, 144, 160], wydaje się, że zaprogramowana śmierć komórki wywołana działaniem popromieniowania jonizującego dominować będzie w komórkach pozabawionych wystarczającej ilości składników odżywczych i/lub zakażonych onkowirusem, którego geny stymulują nadmierną proliferację [37, 82].

Apoptoza niezależna od funkcji białka p53

Gdy w roku 1995 Han i wsp. wykazali, że komórki ludzkiej białaczki promielocytarnej (linia HL-60), które nie wykazują ekspresji białka p53, ale mają czynny produkt genu *bcl-2*, giną zaprogramowaną śmiercią pod wpływem promieniowania X, okazało się, że p53 nie jest niezbędnym mediatorem indukcji popromiennej apoptozy [54]. W tym samym roku inna grupa badaczy stwierdziła, że aktywowane mitogenem mysie limfocyty T zabijane są promieniami gamma, które indukują proces apoptotyczny niezależnie od ekspresji białka p53 w tych komórkach [137]. Podobnie, w enterocytach jelita cienkiego myszy homozygotycznie ujemnych pod względem ekspresji genu *p53* (*p53^{-/-}*), apoptoza występowała po poddaniu tych zwierząt działaniu promieni gamma w dawkach równych lub wyższych od 8 Gy [100]. Dane te wskazują, że popromienne uruchomienie procesu apoptotycznego nie musi być związane z indukcją funkcji białka p53 pod wpływem uszkodzającego działania promieniowania na DNA. Istotnie, w badaniach Tamury i wsp. [137] wykazano, że popromienne uszkodzenie DNA w pobudzonych limfocytach T prowadziło do niezależnej od p53 aktywacji czynnika transkrypcyjnego IRF-1 (ang. *interferon regulatory factor-1*), którego funkcja korelowała z indukcją apoptozy w tych komórkach.

Popromienne uruchomienie procesu apoptotycznego może jednakże przebiegać niezależnie od pierwotnych zmian wywołanych przez promieniowanie w jądrze

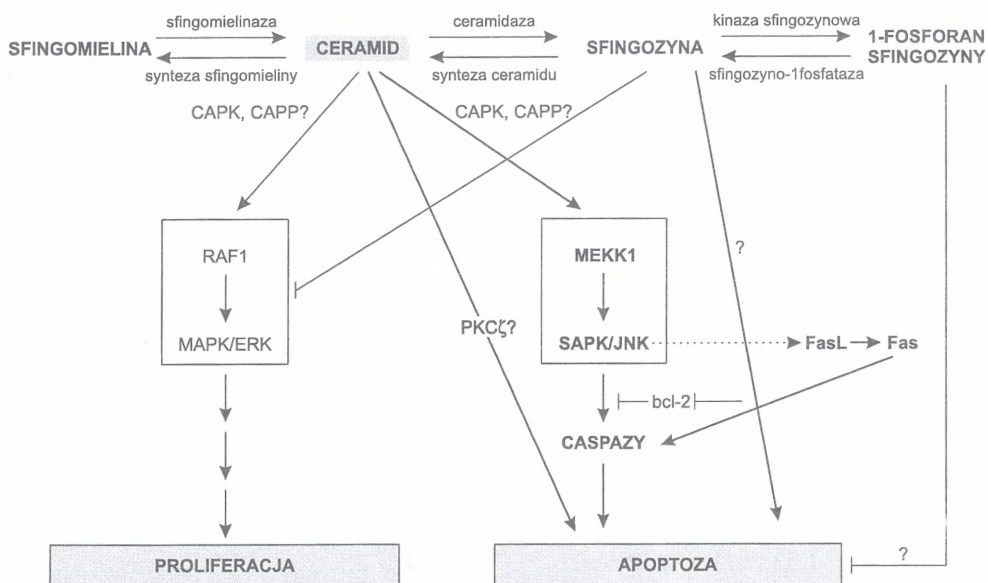
komórkowym. Istotnie, jedną z najwcześniej obserwowanych zmian w komórkach poddanych działaniu tzw. stresorów, w tym promieniowania jonizującego, jest pobudzenie szlaków sygnalizacyjnych rozpoczynających się w błonie komórkowej i prowadzących do uruchomienia ekspresji genów reakcji wczesnej, takich jak protoonkogeny *c-fos*, *c-jun* oraz *Egr-1* [151]. Geny te kodują białka transkrypcyjne, które są ważnymi regulatorami odpowiedzi komórki na działanie czynników zewnętrznych. Produkt protoonkogeny *c-fos* łączy się z przedstawicielami rodziny Jun, tworząc funkcjonalny kompleks transkrypcyjny AP-1. Wiele danych wskazuje na związek funkcji genów *c-fos* i/lub *c-jun* z zaprogramowaną śmiercią komórkową indukowaną różnymi stresorami, w tym promieniami X i gamma [32, 36, 94, 135]. Na przykład, w ludzkich komórkach białaczkowych oraz w mysich limfocytach T poddanych działaniu promieniowania jonizującego fragmentacji DNA i apoptozie towarzyszyła nasilona ekspresja genów *c-jun* oraz/lub *c-fos* [117, 135]. Wybiórczy wzrost poziomu białka Jun wraz z nasiloną apoptozą obserwowano także w komórkach mózgowych szczurzych noworodków, które napromieniano promieniowaniami gamma (2 Gy) [36]. Jednakże, wyniki tych i innych badań sugerują, że w napromienianych komórkach nowotworowych ekspresja protoonkogenów *c-fos* oraz *c-jun* i/lub funkcja ich produktów, chociaż towarzyszy procesowi apoptotycznemu, nie jest przyczynowo związana z indukcją tego procesu [41, 135]. Promieniowanie jonizujące prowadzi również do ekspresji genu *EGR-1* (ang. *early growth response-1*), którego produkt należy do rodziny czynników transkrypcyjnych Egr. Wykazano, że blokada tego genu w ludzkich komórkach czerniaka związana jest z indukcją radiooporności, mimo prawidłowej ekspresji białka p53 w tych komórkach [3]. Ostatnio, ta sama grupa badaczy stwierdziła, że apoptoza indukowana przez promienie X w komórkach raka prostaty, które nie mają czynnego (dzikiego) genu *p53*, związana jest z ekspresją czynnika transkrypcyjnego EGR-1 [4]. W tych badaniach, aktywacja EGR-1 prowadziła do uruchomienia funkcji genu kodującego czynnik martwicy nowotworów (TNF- α), który jest znanym induktorem zarówno auto-, jak i parakrynej śmierci komórek [4, 52].

Od roku 1994 wiadomo, że promieniowanie jonizujące może indukować również inny szlak metaboliczny (sygnalizacyjny) rozpoczynający się w błonie cytoplazmatycznej, tzw. drogę sfingomielinowo-ceramidową [49]. Pod wpływem takich „stresorów”, jak: TNF α , IL-1 β , FasL, czy promieniowanie UV i gamma dochodzi do pobudzenia kwaśnej i/lub obojętnej sfingomielinazy, które trawią cząsteczkę sfingomieliny, jednego z głównych lipidów błon komórkowych u ssaków, prowadząc do powstania ceramidu, który funkcjonuje jako tzw. wtórny przekaźnik [49, 55, 76, 95, 142, 155]. Ceramid z kolei – prawdopodobnie za pośrednictwem zależnej od siebie kinazy CAPK (ang. *ceramide-activated protein kinase*) lub fosfatazy CAPP (ang. *ceramide-activated protein phosphatase*) – aktywuje kaskadę kinaz SAPK/JNK (ang. *stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase*), co prowadzi do uruchomienia funkcji caspaz odpowiedzialnych za indukcję apoptozy [17, 114, 142].

Ceramid bezpośrednio stymuluje również izoformę ζ (dzeta) kinazy białkowej C (PKC ζ) [108], prowadząc do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [92], którego funkcja może wiązać się z indukcją apoptozy popromiennej w niektórych rodzajach komórek [141]. Również, produkt metabolizmu ceramidu, sfingozyna, działa proapoptotycznie w różnych komórkach nowotworowych [134], ale efekt ten nie zależy w tym przypadku od aktywacji kompleksu SAPK/JNK; w grę może wchodzić natomiast indukowana przez sfingozynę blokada białek bcl-2 i/lub bcl-x_L [66]. Z kolei, powstający ze sfingozyny 1-fosforan sfingozyny (ang. *sphingosine-1-phosphate*), zapobiega degradacji DNA i rozwojowi zmian morfologicznych typowych dla apoptozy, które uruchamiane są przez zwiększone stężenie ceramidu w komórce [25] (rys. 2).

W badaniach grupy Kolesnicka wykazano, że generacja ceramidu jest koniecznym warunkiem indukcji apoptozy w bydłęczych komórkach endotelialnych oraz ludzkich komórkach białaczkowych (linia U937) poddanych działaniu promieniowania gamma w dawkach od 0,5 do 10 Gy [49, 142]. Generacja ceramidu występowała w czasie od kilkunastu sekund do kilku minut od napromienienia, co wyraźnie poprzedzało apoptozę, którą obserwowano w tych komórkach po 6–12 godzinach. Co ważne, wzrost poziomu ceramidu wykrywano również w preparatach komórkowych pozbawionych jądra komórkowego, co świadczy o tym, że efekt ten był niezależny od wpływu promieniowania na materiał genetyczny komórki. W tych badaniach, hydroliza sfingomieliny do ceramidu zależała prawdopodobnie od pobudzenia funkcji sfingomielinazy aktywnej przy pH obojętnym, podczas gdy w innych badaniach tej samej grupy, a także w badaniach innych autorów, napromienienie ludzkich komórek limfoidalnych prowadziło do aktywacji sfingomielinazy kwaśnej [21, 124]. Nie wiadomo dokładnie, jakie czynniki regulacyjne i efektorowe uruchamiane są w tym mechanizmie apoptozy popromiennej, ale istnieją dane wskazujące, że w grę wchodzić może pobudzenie funkcji kaskady kinaz typu JNK [17, 18]. Niedawno, Herr i wsp. stwierdzili, że generacja ceramidu pod wpływem promieniowania gamma w komórkach ludzkich białaczek wywodzących się z limfocytów T (T-limfatycznych) wiąże się z indukcją liganda dla receptora Fas (FasL, CD95L), aktywacją kompleksu SAPK/JNK oraz pobudzeniem funkcji caspaz [60]. Ostatnio wykazano, że ekspresja FasL oraz uruchomienie apoptozy w ludzkich komórkach białaczkowych (linia Jurkat) związane są z aktywacją kaskady kinaz typu JNK [34]. W ten sposób, dwie dotychczas uważane za niezależne drogi stymulacji procesu apoptotycznego, czyli szlak sfingomielinowo-ceramidowy oraz sygnalizacja zależna od interakcji CD95-CD95L, zostały ze sobą powiązane w mechanizmie komórkobójczego działania promieniowania jonizującego (rys. 2).

Wśród dróg indukcji apoptozy popromiennej niezależnej od ekspresji białka p53 wymienić należy też opisywaną w ostatnim okresie rolę płytkopochodnego czynnika wzrostowego PDGF (ang. *platelet-derived growth factor*). Okazało się bowiem, że czynnik ten pobudza zaprogramowaną śmierć mysich fibroblastów poddanych



RYSUNEK 2. Szlak sfingomielionowo-ceramidowy i sygnalizacja wewnątrzkomórkowa prowadząca do proliferacji lub apoptozy: CAPK – kinaza zależna od ceramidu (ang. *ceramide-activated protein kinase*), CAPP – fosfataza zależna od ceramidu (ang. *ceramide-activated protein phosphatase*), RAF1 – kinaza serynowo-treoninowa aktywowana przez produkt onkogenu *Ras* (ang. *Ras-activated factor 1*), MAPK/ERK – kinaza aktywowana przez mitogeny/kinaza zależna od sygnałów zewnątrzkomórkowych (ang. *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase*), MEKK1 – kinaza kinazy MAP (ang. *MAP kinase kinase kinase 1*), SAPK/JNK – kinaza aktywowana przez stresory/N-terminalna kinaza c-Jun (ang. *stress-activated protein kinase/c-Jun NH₂-terminal protein kinase*); PKCζ – izoforma ζ (dzeta) kinazy białkowej C (ang. *protein kinase C*), FasL – ligand dla receptora proapoptotycznego Fas (CD95); ↓ – stymulacja lub indukcja aktywności, ⊥ – hamowanie aktywności

działaniu promieniowania jonizującego niezależnie od ekspresji dzikiego genu *p53* w tych komórkach [71]. Podobnie, w ludzkich komórkach raka prostaty, które są radiooporne ze względu na mutację genu *p53*, indukcja apoptozy popromiennej była możliwa po wywołaniu ektopowej ekspresji receptorów alfa i beta dla PDGF (PDGFRα, PDGFRβ) na powierzchni tych komórek [72]. Mechanizm działania proapoptotycznego PDGF nie został jak dotąd wyjaśniony, ale nie jest wykluczone, że wykorzystywane są tu te same szlaki sygnalizacyjne i metaboliczne, które uruchamiane są w komórkach poddanych działaniu czynników uszkodzających DNA i/lub innych stresorów prowadzących do apoptozy [154].

IMPLIKACJE TERAPEUTYCZNE

Coraz lepsza znajomość mechanizmów molekularnych leżących u podstaw procesu zaprogramowanej śmierci komórek, a zwłaszcza poznanie czynników o działaniu regulacyjnym na szlaki sygnalizacyjne i efekторы tego procesu, stwarza potencjalne możliwości wykorzystania tych czynników w terapii chorób zależnych od zaburzeń apoptozy, w tym przede wszystkim nowotworów złośliwych. Obecnie duże nadzieje wiąże się z doświadczalnymi próbami pobudzenia procesu apoptotycznego i/lub uczulenia komórek nowotworowych na indukcję zaprogramowanej śmierci przez promieniowanie jonizujące i/lub cytostatyki chemiczne.

Wiele danych wskazuje, że podatność różnych komórek nowotworowych na apoptozę wywołaną działaniem promieniowania jonizującego jest wprost proporcjonalna do wyjściowego, spontanicznego poziomu apoptozy w tych komórkach [83, 152, 163]. Ocena tego wyjściowego poziomu może więc mieć istotne znaczenie przy określaniu wrażliwości danego typu nowotworu na radioterapię. Istnieją sugestie, że oporność na indukcję apoptozy przez promienie X i gamma oraz/lub cytostatyki leży u podstaw niskiej skuteczności radio- i chemioterapii w wielu typach nowotworów [37, 53, 61].

W nowotworach, w których niski spontaniczny poziom apoptozy oraz/lub radio- i chemooporność są wynikiem zaburzonego działania białka p53, korzystne efekty przynieść powinna reaktywacja prawidłowej funkcji tego czynnika (patrz przegląd aktualnych danych na ten temat w [35]). Indukcja aktywności dzikiego genu p53 w komórkach nowotworowych może z jednej strony pobudzać apoptozę spontaniczną, a z drugiej, uczulać te komórki na cytobójcze działanie promieniowania jonizującego i cytostatyków [11]. Obiecującą metodą indukcji tej aktywności jest wprowadzanie genu p53 do komórek przy użyciu rekombinowanego adenowirusa jako wektora [38]. Taka restytucja prawidłowej czynności białka p53 w warunkach eksperymentalnych prowadziła do apoptozy i hamowała *in vitro* i/lub *in vivo* wzrost komórek szeregu nowotworów złośliwych człowieka, takich jak: czerniak, glejak, raki sutka, jajnika, płuc i prostaty oraz łuskowatokomórkowy rak głowy i szyi [7, 23, 39, 42, 107, 115]. Wektorem wprowadzającym syntetyczne fragmenty białka p53 do komórek nowotworowych mogą być też liposomy lub peptydy penetrujące błony cytoplazmatyczne [65, 120, 127]. Co ważne z terapeutycznego punktu widzenia, przeniesienie dzikiego genu p53 do komórek prawidłowych (tj. niestransformowanych nowotworowo) nie prowadziło do indukcji apoptozy w tych komórkach zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [115, 164]. Ostatnio wykazano również, że sztucznie zmutowana postać adenowirusa wybiórczo zakaża i zabija komórki nowotworowe pozbawione funkcjonalnego białka p53 [12].

Rekonstrukcja funkcji białka p53 może być również osiągnięta w drodze interwencji farmakologicznej. Istotnie, dokładne poznanie budowy cząsteczki tego białka umożliwia sporządzenie leków o działaniu naśladującym i/lub przywracającym

funkcję p53 [153]. I tak, Abarzua i wsp. wykazali, że chemicznie zmodyfikowany koniec karboksylowy monomeru cząsteczki p53 przywraca prawidłową czynność transkrypcyjną zmutowanej formy tego białka w ludzkich komórkach nowotworowych *in vitro* [1]. Co więcej, okazało się że kotransfekcja dzikiego genu *p53* z syntetycznym peptydem odpowiadającym końcowi karboksylowemu białka p53 pobudza wiązanie się zarówno dzikiej, jak i zmutowanej formy tego białka z odpowiednim obszarem DNA i prowadzi do indukcji apoptozy (127). Inną możliwością jest stosowanie czynników, które zmieniają *in vivo* konformację zmutowanej cząsteczki p53 i w ten sposób przywracają prawidłową funkcję tego białka [103].

Ponieważ ekspozycja komórek na promieniowanie jonizujące prowadzi do zahamowania cyklu komórkowego w którymś z punktów kontrolnych, korzystne efekty przynieść może stosowanie leków o działaniu swoistym dla poszczególnych faz cyklu [93]. Na przykład, metyloksantyny, takie jak: kofeina i pentoksyfilina, a także popularny ostatnio cytostatyk – paklitaksel (Taxol), prowadząc do redukcji bloku w punkcie G2/M, nasilają popromienną apoptozę w komórkach nie wykazujących ekspresji białka p53 [33, 90, 116, 118, 122]. Co więcej, czynniki te mogą działać z dużą wybiórczością na guz nowotworowy, jako że komórki prawidłowych tkanek otaczających wykazują normalną ekspresję p53 i ulegają pod wpływem napromienienia blokadzie w punkcie G1 cyklu [93]. Kofeina jest, niestety, zbyt toksyczna, aby mogła być stosowana z powodzeniem w klinice, ale wyniki z Taxolem są na tyle obiecujące, że w ostatnim okresie rozpoczęto udane próby skojarzonego stosowania tego leku i radioterapii w zaawansowanych nowotworach u ludzi [123]. Proapoptotycznie działać może także radioterapia skojarzona z cytostatykami działającymi w fazie S cyklu; napromieniane komórki ze zmutowaną formą p53 nie ulegają bowiem zahamowaniu w punkcie G1/S cyklu, przechodzą do fazy S i stają się podatne na cytobójcze działanie takich leków, jak: metotreksat, hydroksymocznik czy adriamycyna [13].

W komórkach z zaburzoną funkcją białka p53 potencjalne zastosowanie terapeutyczne znaleźć mogą też mediatory apoptozy popromiennej niezależnej od ekspresji genu *p53*. Takimi mediatorami, których wykorzystanie w klinice prowadzić powinno do uczulenia lub zwiększenia podatności komórek nowotworowych na radioterapię, mogą okazać się sfingomielina, ceramid i/lub sfingomielinazy [55, 124; 142], PDGF [72], wewnątrzkomórkowe helikazy XPB i XPD [146] albo/i przeciwciała anty-Fas (anty-CD95) [67]. Ostatnio, dużo uwagi poświęca się wykorzystaniu czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF α), który – podobnie jak ligand dla receptora Fas (FasL) – jest jednym ze znanych induktorów procesu apoptotycznego w komórkach [26, 145]. Istotnie, w modelach doświadczalnych u zwierząt wykazano, że skojarzone stosowanie TNF α i promieniowania jonizującego jest dużo skuteczniejsze w leczeniu takich nowotworów ludzkich, jak gruczolakorak płuc i glejak, niż każdy z tych czynników osobno [45, 46].

Alternatywną strategią terapeutyczną może okazać się blokowanie funkcji inhibitorów apoptozy w komórkach nowotworowych, które wykazują często wyraźną ekspresję białek *bcl-2* i *bcl-x_L* [28, 78]. Wykazano, że blokada lub opóźnienie indukcji popromiennej apoptozy w różnych stransformowanych komórkach związane jest m.in. z ekspresją genu *bcl-2* [78, 133], którego produkt działa hamująco na mechanizmy proapoptotyczne uruchamiane przez białko p53. W celu zniesienia funkcji genu *bcl-2* stosowane być mogą oligonukleotydy typu anty-sens, które blokując translację hamują ekspresję genu, „przeciw” któremu są skierowane. I tak, przy użyciu oligonukleotydu anty-*bcl-2*, udało się w warunkach eksperymentalnych zniwelować oporność komórek chłoniaka na cytostatyki [73]. Z kolei, taki związek farmakologiczny jak maślan sodu jest w stanie blokować indukowaną przez promieniowanie jonizujące ekspresję genu *bcl-x_L* i – stosowany w skojarzeniu z radioterapią – uruchamiać apoptozę w komórkach opornych na indukcję zaprogramowanej śmierci komórek [22]. Alternatywnie, przeniesienie do komórek białaczkowych wariantu genu *bcl-x* o działaniu proapoptotycznym – *bcl-x_S* – przy użyciu adenowirusa prowadziło wybiórczo do indukcji zaprogramowanej śmierci tych komórek, czego nie obserwowano w przypadku prawidłowych komórek hematopoetycznych [24].

Kończąc te rozważania należy wymienić niektóre z zagrożeń, jakie niesie ze sobą terapia przeciwnowotworowa oparta o indukcję zjawiska popromiennej apoptozy. Ponieważ w większości typów nowotworów (wyjątkiem są białaczki i chłoniaki) apoptoza występuje po 72–120 godzinach od jednorazowej ekspozycji na promienie X lub gamma [143], istnieje niebezpieczeństwo kompensacyjnego wzrostu liczby klonogenów wywodzących się z komórek, w których nie doszło do uszkodzenia DNA i indukcji procesu zaprogramowanej śmierci [143]. Efekt ten odpowiadać ma za wskazaną przez Deweya i wsp. niezgodność pomiędzy różnicą w podatności szeregu komórek nowotworowych na popromienną apoptozę, a różnicą w radiowrażliwości tych komórek mierzoną liczbą tworzonych kolonii *in vitro* [27, 102]. Częściowym rozwiązaniem tego problemu może być stosowanie radioterapii frakcjonowanej, która – jak już wcześniej wspomniano – umożliwia „odnowę” populacji komórek wrażliwych na apoptozę po każdej kolejnej dawce promieniowania [102], co powinno eliminować efekt nadmiernej proliferacji nieuszkodzonych przez to promieniowanie komórek klonogennych. Ponadto, wykazano, że utrata dużej liczby komórek guza w drodze zaprogramowanej śmierci indukowanej promieniowaniem jonizującym może być istotną przyczyną poprawy utlenowania (reoksygenacji) i związanego z tym wzrostu radiowrażliwości tych komórek [104].

PODSUMOWANIE

Przedstawiony wyżej – z konieczności niepełny i uproszczony – zarys mechanizmów i funkcji apoptozy poradiacyjnej wyraźnie wskazuje na ten rodzaj śmierci komórkowej jako istotną metodę obrony ustroju przed utrwalaniem mutacji i transformacją nowotworową, najgroźniejszymi skutkami ekspozycji na promieniowanie jonizujące. Niezależnie od tego, badania nad apoptozą popromienną mają inne ważne aspekty poznawcze i aplikacyjne. Po pierwsze, są one źródłem nowych danych na temat interakcji promieniowania jonizującego z materiałem biologicznym na poziomie komórkowym i subkomórkowym, a także poszerzają naszą znajomość podstawowych szlaków sygnalizacyjnych i metabolicznych związanych z prawidłowym lub patologicznym zachowaniem się komórek w organizmie. Po drugie, uświadomienie sobie faktu, że proces zaprogramowanej śmierci komórkowej może być modyfikowany przez czynniki zewnętrzne, coraz lepsza znajomość mechanizmów regulacyjnych i efektorowych apoptozy, a także dowody, że podatność na indukcję apoptozy w znacznym stopniu determinuje radiowrażliwość różnych populacji komórek nowotworowych, uzasadniają podejmowanie prób doświadczalnych i klinicznych modyfikacji tego procesu w celu zwiększenia skuteczności i/lub obniżenia toksyczności klasycznych metod radio- i/lub chemioterapeutycznych. Jakkolwiek jesteśmy dopiero na początku drogi wiodącej do w pełni racjonalnego i ukierunkowanego stosowania czynników modyfikujących przebieg i nasilenie aktywnej, zaprogramowanej śmierci komórek *in vivo*, niezwykle tempo badań w tym zakresie pozwala żywić uzasadnione nadzieje na rychłe wykorzystanie tych czynników w praktyce klinicznej.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ABARZUA P, LOSARDO JE, GUBLER ML, SPATHIS R, LU Y-A, FELIX A, NERI A. Restoration of the transcriptional activation function to mutant p53 in human cancer cells. *Oncogene* 1996; **13**: 2477–2482.
- [2] AGARWAL ML, AGARWAL A, TAYLOR WR, STARK GR. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **91**: 8493–8497.
- [3] AHMED MM, VENKATASUBBARAO K, FRUITWALA S, MUTHUKKUMAR S, WOOD DP, jr, SELLS SF, MOHIUDDIN M, RANGNEKAR VM. EGR-1 induction is required for maximal radiosensitivity in A375-C6 melanoma cells. *J Biol Chem* 1996; **271**: 29231–29237.
- [4] AHMED MM, SELLS SF, VENKATASUBBARAO K, FRUITWALA SM, MUTHUKKUMAR S, HARP C, MOHIUDDIN M, RANGNEKAR VM. Ionizing radiation-inducible apoptosis in the absence of p53 linked to transcription factor EGR-1. *J Biol Chem* 1997; **272**: 33056–33061.
- [5] AKINS PT, LIU PK, HSU CY. Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia. *Stroke* 1996; **27**: 1682–1687.

- [6] ALDRIDGE DR, ARENDS M.J, RADFORD IR. Increasing the susceptibility of the rat 208F fibroblasts cell line to radiation-induced apoptosis does not alter its clonogenic survival dose-response. *Br J Cancer* 1995; **71**: 571–577.
- [7] ASGARI K, SESTERHENN IA, MCLEOD DG, COWAN K, MOUL JW, SETH P, SRIVASTAVA S. Inhibition of the growth of pre-established subcutaneous tumor nodules of human prostate cancer cells by single injection of the recombinant adenovirus p53 expression vector. *Int J Cancer* 1997; **71**: 377–382.
- [8] BARLOW C, BROWN KD, DENG C-X, TAGLE DA, WYNshaw-BORIS A. Atm selectively regulates distinct p53-dependent cell-cycle checkpoint and apoptotic pathways. *Nature Genetics* 1997; **17**: 453–456.
- [9] BARR PJ, TOMEI LD. Apoptosis and its role in human disease. *Bio/Technology* 1994; **12**: 487–493.
- [10] BEDFORD JS. Sublethal damage, potentially lethal damage, and chromosomal aberrations in mammalian cells exposed to ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991; **21**: 1457–1462.
- [11] BELLAMY CO, MALCOMSON R, WYLLIE AH. The roles of p53 in apoptosis and cancer. *W: Apoptosis and Cancer*, Martin, S.J. (wyd.), Karger Landes Systems, Basel, 1997; 116–140.
- [12] BISCHOFF JR, KIM DH, WILLIAMS A, HEISE C, HORN S, MUNA M, NG L, NYE JA, SAMPSON-JOHANNES A, FATTAEY A, MCCORMICK F. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 1996; **274**: 373–375.
- [13] BRISTOW RG, BENCHIMOL S, HILL RP. The p53 gene as a modifier of intrinsic radiosensitivity: implications for radiotherapy. *Radiother Oncol* 1996; **40**: 197–223.
- [14] BUCKBINDER L, TALBOTT R, VELASCO-MIGUEL A, TAKENAKA I, FAHA B, SEIZINGER BR, KLEY N. Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature* 1995; **377**: 646–649.
- [15] CHANG EH, JANG Y-J, HAO Z, MURPHY G, RAIT A, FEE, JR.W.E., SUSSMAN HH, RYAN P, CHIANG Y, PIROLLO KF. Restoration of the G₁ checkpoint and the apoptotic pathway mediated by wild-type p53 sensitizes squamous cell carcinoma of the head and neck to radiotherapy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; **123**: 507–512.
- [16] CHEN CH, ZHANG J, LING CC. Transfected c-myc and c-Ha-ras modulated radiation-induced apoptosis in rat embryo cells. *Radiat Res* 1994; **139**: 307–315.
- [17] CHEN Y-R, MEYER CF, TANT-H. Persistent activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in gamma radiation-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1996; **271**: 631–634.
- [18] CHEN Y-R WANG X, TEMPLETON D, DAVIS RJ, TAN T-H. The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and γ radiation. *J Biol Chem* 1996; **271**: 31929–31936.
- [19] CHERBONNEL-LASSERRE C, GAUNY S, KRONENBERG A. Suppression of apoptosis by Bcl-2 or Bcl-x_L promotes susceptibility to mutagenesis. *Oncogene* 1996; **13**: 1489–1497.
- [20] CHIN PL, MOMAND J, PFEIFER GP. *In vivo* evidence for binding of p53 to consensus binding sites in the p21 and GADD45 genes in response to ionizing radiation. *Oncogene* 1997; **15**: 87–99.
- [21] CHMURA SJ, NODZENSK E, BECKETT MA, KUFE DW, QUINTAS J, WEICHSELBAUM RR. Loss of ceramide production confers resistance to radiation-induced apoptosis. *Cancer Res* 1997; **57**: 1270–1275.
- [22] CHUNG DH, ZHANG F, CHEN F, MCLAUGHLIN WP, LJUNGMAN M. Butyrate attenuates BCLX₁ expression in human fibroblasts and acts in synergy with ionizing radiation to induce apoptosis. *Radiat Res* 1998; **149**: 187–194.
- [23] CIRIELLI C, RICCIONI T, YANG C, PILI R, GLOET T, CHANG J, INYAKU K, PASSANITI A, CAPOGROSSI MC. Adenovirus-mediated gene transfer of wild-type p53 results in melanoma cell apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *Int J Cancer* 1995; **63**: 673–679.

- [24] CLARKE MF, APEL I.J, BENEDICT MA, EIPERS PG, SUMANTRAN, V, GONZALEZ-GARCIA M, DOEDENS M, FUKUNAGA N, DAVIDSON B, DICK JE, MINN AJ, BOISE LH, THOMPSON CB, WICHA M, NUNEZ G. A recombinant bcl-x(s) adenovirus selectively induces apoptosis in cancer cells but not in normal bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 11024–11028.
- [25] CUVILLIER O, PIRIANOV G, KLEUSER B, VANEK PG, COSO O, GUTKIND JS, SPIEGEL S. Suppression of ceramide-mediated cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* 1996; **381**: 800–803.
- [26] DARNAY BG, AGGARWAL BB. Early events in TNF signaling: a story of associations and dissociations. *J Leukoc Biol* 1997; **61**: 559–566.
- [27] DEWEY WC, LING CC, MEYNER. Radiation-induced apoptosis: Relevance to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; **33**: 781–796.
- [28] DOLE MG, JASTY R, COOPER MJ, THOMPSON CB, NUNEZ G, CASTLE VP. Bcl-X_L is expressed in neuroblastoma cells and modulates chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 1995; **55**: 2576–2582.
- [29] DRISCOLL M. Cell death in *C. elegans*: Molecular insights into mechanisms conserved between nematodes and mammals. *Brain Pathol* 1996; **6**: 411–425.
- [30] ELKIND MM, SUTTON H. X-ray damage and recovery in mammalian cells in culture. *Nature* 1959; **184**: 1293–1295.
- [31] ENOCH T, NORBURY C. Cellular responses to DNA damage: cell-cycle checkpoints, apoptosis and the roles of p53 and ATM. *Trends Biol Sci* 1995; **20**: 426–434.
- [32] ESTUS S, ZAKS WJ, FREEMAN RS, GRUDA M, BRAVO R, JOHNSON EJ. Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of *c-jun* as necessary for neuronal apoptosis. *J Cell Biol* 1994; **127**: 1717–1727.
- [33] FAN SJ, SMITH ML, RIVET DJ, DUBA D, ZHAN QM, KOHN KW, FORNACE AJ, O'CONNOR PM. Disruption of p53 function sensitizes breast cancer MCF 7 cells to cisplatin and pentoxifylline. *Cancer Res* 1995; **55**: 649–1654.
- [34] FARIS M, KOKOT N, LATINIS K, KASIBHATLA S, GREEN DR, KORETZKY GA, NEL A. The c-Jun N-terminal kinase cascade plays a role in stress-induced apoptosis in Jurkat cells by up-regulating Fas ligand expression. *J Immunol* 1998; **160**: 134–144.
- [35] FAVROT M, COLL J-L, LOUIS N, NEGOESCU A. Cell death and cancer: replacement of apoptotic genes and inactivation of death suppressor genes in therapy. *Gene Therapy* 1998; **5**: 728–739.
- [36] FERRER I, OLIVE M, BLANCOR, CINOS C, PLANAS AM. Selective c-Jun overexpression is associated with ionizing radiation-induced apoptosis in the developing cerebellum of the rat. *Mol Brain Res* 1996; **38**: 91–100.
- [37] FISHER DE. Apoptosis in cancer therapy: Crossing the threshold. *Cell* 1994; **78**: 539–542.
- [38] FUJIWARA T, GRIMME, MUKHOPADHYAY T, CAID, OWEN-SCHAUB L, ROTH JA. A retroviral wild-type p53 expression vector penetrates human lung cancer spheroids and inhibits growth by inducing apoptosis. *Cancer Res* 1993; **53**: 4129–413.
- [39] FUJIWARA T, CAI DW, GEORGES RN, MUKHOPADHYAY T, GRIMM EA, ROTH JA. Therapeutic effect of a retroviral wild-type p53 expression vector in an orthotopic lung cancer model. *J Natl Cancer Inst* 1994; **86**: 1458–1462.
- [40] FUKS Z, PERSAUD RS, ALFIERI A, MCLOUGHLIN M, EHLEITER D, SCHWARTZ JL, SEDDON AP, CORDON-CARDO C, HAIMOWITZ-FRIEDMAN A. Basic fibroblast growth factor protects endothelial cells against radiation-induced programmed cell death *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 1994; **54**: 2582–2590.
- [41] GOLDSTONE SD, LAVIN MF. Prolonged expression of c-jun and associated activity of the transcription factor AP-1 during apoptosis in a human leukaemic cell line. *Oncogene* 1994; **9**: 2305–2311.

- [42] GOMEZ-MANZANO C, FUEYO J, KYRITSIS P, STECK PA, ROTH JA, MCDONNELL TJ, STECK KD, LEVIN VA, YUNG WKA. Adenovirus-mediated transfer of the p53 gene produces rapid and generalized death of human glioma cells via apoptosis. *Cancer Res* 1996; **56**: 694–699.
- [43] GRAEBER TG, OSMANIAN C, JACKS T, HOUSMAN DE, KOCH CJ, LOWE SW, GIACCIA AJ. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996; **379**: 88–91.
- [44] GREENBERG JT. Programmed cell death: A way of life for plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 12094–12097.
- [45] GRIDLEY DS, ANDRES ML, GARNER C, MAO XW, SLATER J.M. Evaluation of TNF-alpha effects on radiation efficacy in a human lung adenocarcinoma model. *Oncol Res* 1996; **8**: 485–495.
- [46] GRIDLEY DS, ARCHAMBEAU JO, ANDRES MA, MAO XW, WRIGHT K, SLATER JM. Tumor necrosis factor-alpha enhances antitumor effects of radiation against glioma xenografts. *Oncol Res* 1997; **9**: 217–227.
- [47] GUILLOUF C, ROSSELLI F, KRISHNARAJU K, MOUSTACCHI E, HOFFMAN B, LIEBERMANN DA. p53 involvement in control of G2 exit of the cell cycle: Role in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* 1995; **10**: 2263–2270.
- [48] GUO M, CHEN C, VIDAIR C, MARINO S, DEWEY WC, LING CC. Characterization of radiation-induced apoptosis in rodent cell lines. *Radiat Res*. 1997; **147**: 295–303.
- [49] HAIMOVITZ-FRIEDMAN A, KAN C-C, EHLEITER D, PERSAUD RS, MCLOUGHLIN M, FUKS Z, KOLESNICK RN. Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J Exp Med* 1994; **180**: 525–535.
- [50] HALL EJ. Radiobiology for the Radiologist, 4th ed. J.B. Lippincott, Philadelphia, 1994.
- [51] HALL PA, LANE DP. Genetics of growth arrest and cell death: Key determinants of tissue homeostasis. *Europ J Cancer* 1994; **30A**: 2001–2012.
- [52] HALLAHAN DE, SPRIGGS DR, BECKETT MA, KUFEL DW, WEICHSELBAUM RR. Increased tumor necrosis factor alpha mRNA after cellular exposure to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 10104–10107.
- [53] HAMADA M, FUJIWARA T, HIZUTA A, GOCHI A, NAOMOTO Y., TAKAKURA N, TAKAHASHI K, ROTH JA, TANAKA N, ORITA K. The p53 gene is a potent determinant of chemosensitivity and radiosensitivity in gastric and colorectal cancers. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; **122**: 360–365.
- [54] HAN Z, CHATTERJEE D, HE DM, EARLY J, PANTAZIS P, WYCHE JH, HENDRICKSON EA. Evidence for a G2 checkpoint in p53-independent apoptosis induction by X-irradiation. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 5849–5857.
- [55] HANNUN YA. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* 1996; **274**: 1855–1859.
- [56] HANSEN RS, BRAITHWAITE AW. The growth-inhibitory function of p53 is separable from transactivation, apoptosis and suppression of transformation by E1a and Ras. *Oncogene* 1996; **13**: 995–1007.
- [57] HARTWELL LH, WEINERT TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989; **246**: 629–634.
- [58] HENDRY JH, POTTEN CS, MERRIT A. Apoptosis induced by high- and low-LET radiations. *Radiat Environ Biophys* 1995; **34**: 59–62.
- [59] HENGARTNER MO. Programmed cell death in invertebrates. *Curr Opin Genet Dev* 1996; **6**: 34–38.
- [60] HERR I, WILHELM D, BOHLER T, ANGEL P, DEBATIN K-M. Activation of CD95 (APO-1/Fas) signaling by ceramide mediates cancer therapy-induced apoptosis. *EMBO J* 1997; **16**: 6200–6208.

- [61] HIEKEN TJ, DAS GUPTA T. Mutant p53 expression: A marker of diminished survival in well-differentiated soft tissue sarcoma. *Clin Cancer Res* 1996; **2**: 1391–1395.
- [62] HOLLSTEIN M, RICE K, GREENBLATT MS, SOUSSI T, FUCHS R, SORLIE T, HOVIG E, SMITH-SORENSEN B, MONTESANO R, HARRIS CC. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 1994; **22**: 3551–3555.
- [63] HOPCIA KL, MCCAREY YL, SYLVESTER FC, HELD KD. Radiation-induced apoptosis in HL60 cells: oxygen effect, relationship between apoptosis and loss of clonogenicity, and dependence of time to apoptosis on radiation dose. *Radiat Res* 1996; **145**: 315–323.
- [64] HOWES KA, RANSOM N, PAPERMASTER DS, LASUDRY JGH, ALBERT DM, WINDLE J.J. Apoptosis or retinoblastoma: alternative fates of photoreceptors expressing the HPB-16 E7 gene in the presence or absence of p53. *Genes Dev* 1994; **8**: 1300–1310.
- [65] HSIAO M, TSE V, CARMEL J, TSAI Y, FELGNER PL, HAAS M., SILVERBERG GD. Intracavitary liposome-mediated p53 gene transfer into glioblastoma with endogenous wild-type p53 *in vivo* results in tumor suppression and long-term survival. *Bioch Biophys Res Commun* 1997; **233**: 359–364.
- [66] IGARASHI Y. Functional roles of sphingosine, sphingosine-1-phosphate, and methylsphingosines: in regard to membrane sphingolipid signaling pathways. *J Biochem* 1997; **122**: 1080–1087.
- [67] IJIMA N, MIYAMURA K, ITOU T, TANIMOTO M, SOBUE R, SAITO H. Functional expression of Fas (CD95) in acute myeloid leukemia cells in the context of CD34 and CD38 expression: possible correlation with sensitivity to chemotherapy. *Blood* 1997; **90**: 4901–4909.
- [68] ILIAKIS G. The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *BioEssays* 1991; **13**: 641–648.
- [69] JOHNSON P, CHUNG S, BENCHIMOL S. Growth suppression of Friend virus-transformed erythroleukemia cells by p53 protein is accompanied by hemoglobin production and is sensitive to erythropoietin. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 1456–1463.
- [70] KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wider ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; **24**: 239–275.
- [71] KIM H-RC, UPADHYAY S, LI G, PALMER KC, DEUEL TF. Platelet-derived growth factor (PDGF) induces apoptosis in growth arrested murine fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 9500–9504.
- [72] KIM JH, HYUN S-J, YOON M-Y, JI Y-H, CHO C-K, YOO S-Y. Pretreatment of low dose radiation reduces radiation-induced apoptosis in mouse lymphoma (EL4) cells. *Arch Pharm Res* 1997; **20**: 212–217.
- [73] KITADA S, TAKAYAMA S, DE RIEL K, TANAKA S, REED JC. Reversal of chemoresistance of lymphoma cells by antisense-mediated reduction of bcl-2 gene expression. *Antisense Res Develop* 1994; **4**: 71–79.
- [74] KITADA S, KRAJEWSKI S, MIYASHITA T, KRAJEWSKA M, REED JC. γ -radiation induces upregulation of Bax protein and apoptosis in radiosensitive cells *in vivo*. *Oncogene* 1996; **12**: 187–192.
- [75] KLEY N, CHUNG RY, FAY S, LOEFFLER JP, SEIZINGER BR. Repression of the basal c-fos promoter by wild-type p53. *Nucleic Acids Res* 1992; **20**: 4083–4087.
- [76] KOLESNICK R, GOLDE DW. The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling. *Cell* 1994; **77**: 325–328.
- [77] KONDO Y, KONDO S, LIU J, HAQQI T, BARNETT GH, BARNA BP. Involvement of p53 and WAF1/CIP1 in γ -irradiation-induced apoptosis of retinoblastoma cells. *Exp Cell Res* 1997; **236**: 51–56.
- [78] KYPRIANOU N, KING ED, BRADBURY D, RHEE JG. bcl-2 over-expression delays radiation-induced apoptosis without affecting the clonogenic survival of human prostate cancer cells. *Int J Cancer* 1997; **70**: 341–348.
- [79] LANE D. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; **358**: 15–16.

- [80] LANGLEY RE, QUARTUCCIO SG, KENNEALEY PT, COLEMAN CN, BUMPEA. Effect of cell cycle stage, dose rate and repair of sublethal damage on radiation-induced apoptosis in F9 teratocarcinoma cells. *Radiat Res* 1995; **144**: 90–96.
- [81] LEE JM, BERNSTEIN A. p53 mutations increase resistance to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 5742–5746.
- [82] LEVINE AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; **88**: 323–331.
- [83] LEVINE EL, DAVIDSON SE, ROBERTS SA, CHADWICK CA, POTTEN CS, WEST CML. Apoptosis as predictor of response to radiotherapy in cervical carcinoma. *Lancet* 1994; **344**: 472.
- [84] LI YQ, WONG CS. Radiation-induced apoptosis in the rat spinal cord: lack of equal effect per fraction. *Int J Radiat Biol* 1997; **71**: 413–420.
- [85] LINCZ LF Deciphering the apoptotic pathway: All roads lead to death. *Immunol Cell Biol* 1998; **76**: 1–19.
- [86] LING CC, CHEN CH, LI WX. Apoptosis induced at different dose rates: implication for the shoulder region of cell survival curves. *Radiother Oncol* 1994; **32**: 129–136.
- [87] LING CC, GUO M, CHEN CH, DELOHERY T. Radiation-induced apoptosis: effects of cell age and dose fractionation. *Cancer Res* 1995; **55**: 5207–5212.
- [88] LIU S-Z, ZHANG Y-C, YING M, XU S, LIU J-X. Thymocyte apoptosis in response to low-dose radiation. *Mutation Res* 1996; **358**: 185–191.
- [89] LIU VF, BOUBNOV NV, WEAVER DT. Cell cycle checkpoints and repair of ionizing radiation damage. *Stem Cells* 1995; **13** (Suppl.1): 117–128.
- [90] LOCK RB, GALPERINA OV, FELDHOFF RC, RHODES L.J. Concentration-dependent differences in the mechanism by which caffeine potentiates etoposide cytotoxicity in HeLa cells. *Cancer Res* 1994; **54**: 4933–4939.
- [91] LOWE SW, SCHMITT EM, SMITH SW, OSBORNE BA, JACKS T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993; **362**: 847–849.
- [92] LOZANO J, BERRA E, MUNICIO MM, DIAZ-MECO MT, DOMINIQUEZ I, SANZ L, MOSCAT J. Protein kinase C ζ isoform is critical for κ B-dependent promoter activation by sphingomyelinase. *J Biol Chem* 1994; **269**: 19200–19202.
- [93] MAITY A, KAO GD, MUSCHEL RJ, MCKENNA WG. Potential molecular targets for manipulating the radiation response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; **37**: 639–653.
- [94] MARTI A, JEHN B, COSTELLO E, KEON N, KE G, MARTIN F, JAGGI R. Protein kinase A and AP-1 (c-Fos/JunD) are induced during apoptosis of mouse mammary epithelial cells. *Oncogene* 1994; **9**: 1213–1223.
- [95] MARTIN SJ, NEUMEYER DD, MATHIAS S, FARSCHEON DM, WANG HG, REED JC, KOLESNICK RN, GREEN DR. Cell-free reconstitution of Fas-, UV radiation- and ceramide-induced apoptosis. *EMBO J* 1995; **14**: 5191–5200.
- [96] MARTINEZ JD, PENNINGTON ME, CRAVEN MT, WARTERS RL, CRESS AE. Free radicals generated by ionizing radiation signal nuclear translocation of p53. *Cell Growth Differentiation* 1997; **8**: 941–949.
- [97] McILWRATH AJ, VASEY PA, ROSS GM, BROWN R. Cell cycle arrest and radiosensitivity of human tumor cell lines: dependence on wild-type p53 for radiosensitivity. *Cancer Res* 1994; **54**: 3718–3722.
- [98] MERCER WE, SHIELDS MT, LIN D, APPELLA E, ULLRICH SJ. Growth suppression induced by wild type p53 protein is accompanied by selective down regulation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 1958–1962.
- [99] MERRITT AJ, POTTEN CS, KEMP CJ, HICKMAN JA, BALMAIN A, LANE DP, HALL PA. The role of p53 in spontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53-deficient mice. *Cancer Res* 1994; **54**: 614–617.

- [100] MERRITT A, ALLEN TD, POTTEN CS, HICKMAN JA. Apoptosis in small intestinal epithelia from p53-null mice: evidence for a delayed, p53-independent G2/M-associated cell death after γ -irradiation. *Oncogene* 1997; **14**: 2759–2766.
- [101] MEYN RE, STEPHENS LC, HUNTER N, ANG KK, MILAS L. Reemergence of apoptotic cells between fractionated doses in irradiated murine tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; **30**: 619–624.
- [102] MEYN RE, MILAS L. The role of apoptosis in tumor response to radiation. W: *Radiation Research* 1895–1995. Congress Proceedings, U. Hagen, D. Harder, H. Jung i C. Streffer (wyd.), 10th ICRR Society, Würzburg 1995, tom 2, 653–656.
- [103] MILNER J. DNA damage, p53 and anticancer therapies. *Nat Med* 1995; **1**: 879–881.
- [104] MILROSS CG, MILAS L. Apoptosis and tumor reoxygenation. W: *Radiation Research* 1895–1995. Congress Proceedings, Hagen, U., Harder, D., Jung, H., Streffer, C. (wyd.), 10th ICRR Society, Würzburg, 1995, tom 2: 669–672.
- [105] MIYASHITA T, HARIGAI M, HANADA M, REED JC. Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res* 1994; **54**: 3131–3135.
- [106] MOTYL T. Apoptoza – śmierć warunkująca życie. *Post Biol Kom* 1998; **25**: 315–334
- [107] MUJOO K, MANEVAL DC, ANDERSON SC. Adenoviral-mediated p53 tumor suppressor gene therapy of human ovarian carcinoma. *Oncogene* 1996; **12**: 1617–1623.
- [108] MULLER G, AYOUB M, STORZ P, RENNECKE J, FABBRO D, PFIZENMAIER K. PKC ζ is a molecular switch in signal transduction of TNF- α , bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *EMBO J* 1995; **14**: 1961–1969.
- [109] MUSCHEL R, BERNHARD E, GARZA L, MCKENNA WG, KOCH C. Induction of apoptosis at different oxygen tensions: Evidence that oxygen radicals do not mediate apoptotic signalling. *Cancer Res* 1995; **55**: 995–998.
- [110] NAGATA S, GOLSTEIN P. The Fas death factor. *Science* 1995; **267**: 1449–1455.
- [111] OLIVE PL, BANATH JP, DURANDRE. Development of apoptosis and polyploidy in human lymphoblast cells as a function of position in the cell cycle and the time of irradiation. *Radiat Res* 1996; **146**: 595–602.
- [112] OSBORNE BA. Apoptosis and the maintenance of homeostasis in the immune system. *Curr Opin Immunol* 1996; **8**: 245–254.
- [113] PALAYOOR ST, HUMM JL, ATCHER RW, HINES JJ, MACKLIS RM. G2M arrest and apoptosis in murine T lymphoma cells following exposure to ²¹²Bi alpha particle irradiation. *Nucl Med Biol* 1993; **20**: 795–805.
- [114] PENA LA, FUKS Z, KOLESNICK R. Stress-induced apoptosis and the sphingomyelin pathway. *Bioch Pharmacol* 1997; **53**: 615–621.
- [115] PIROLLO KF, HAO ZM, RAIT A, JANG YJ, FEE WE, RYAN P, CHIANG YW, CHANG EH. p53 mediated sensitization of squamous cell carcinoma of the head and neck to radiotherapy. *Oncogene* 1997; **14**: 1735–1746.
- [116] POWELL SN, DeFRANK JS, CONNELL P, EDGAN M, PREFFER F, DOMBKOWSKI D, TANG, W, FRIEND S. Differential sensitivity of p53- and p53+ cells to caffeine-induced radiosensitization of G₂ delay. *Cancer Res* 1995; **55**: 1643–1648.
- [117] PRUSCHY M, SHI Y-Q, CROMPTON NEA, STEINBACH J, AGUZZI A, GLANZMANN C, BODIS S. The proto-oncogene c-fos mediates apoptosis in murine T-lymphocytes induced by ionizing radiation and dexamethasone. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **241**: 519–524.
- [118] PULKKINEN JO, PEKKOLA-HEINO K, GRENMAN R. Paclitaxel and irradiation induce apoptosis in squamous cell carcinoma cell lines in an additive way. *Anticancer Res* 1996; **16**: 2923–2930.
- [119] RADFORD IR. Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. Part I. Sensitivity to killing by ionizing radiation, rate of loss of viability, and cell type of origin. *Int J Radiat Biol* 1994; **65**: 203–215.

- [120] ROEMER K, FRIEDMANN T. Mechanisms of action of the p53 tumor suppressor and prospects for cancer gene therapy by reconstitution of p53 function. *Ann NY Acad Sci* 1994; **716**: 265–282.
- [121] ROLIŃSKI J. Apoptoza w układzie odpornościowym – rola Fas, bcl-2 i interleukiny 2. *Post Biol Kom* 1997; **24**: 561–574
- [122] RUSSELL KJ, WIENS LW, DEMERS GW, GALLOWAY DA, PLON SE, GROUDINE M. Abrogation of the G₂ checkpoint results in differential radiosensitization of G₁ checkpoint-deficient and G₁ checkpoint-competent cells. *Cancer Res* 1995; **55**: 1639–1642.
- [123] SAFRAN H, KING TP, CHOY H, HESKETH PJ, WOLF B, ALTENHEIN E, SIKOV W, ROSMARIN A, AKERLEY W, RADIEKEANE K, CICCETTI G, LOPEZ F, BLAND K, WANEBO H.J. Paclitaxel and concurrent radiation for locally advanced pancreatic and gastric cancer: A phase I study. *J Clin Oncol* 1997; **15**: 901–907.
- [124] SANTANA P, PENA LA, HEIMOVITZ-FRIEDMAN A, MARTIN S., GREEN D, MCLOUGHLIN M, CORDON-CARDO C, SCHUCHMAN EH, FUKS Z, KOLESNICK R. Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell* 1996; **6**: 189–199.
- [125] SANTHANAM U, RAY A, SEHGAL PB. Repression of the interleukin 6 gene promoter by p53 and the retinoblastoma susceptibility gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 7605–7609.
- [126] SCHWARTZ D, ALMOG N, PELED A, GOLDFINGER N, ROTTER V. Role of wild type p53 in the G₂ phase: regulation of the γ -irradiation-induced delay and DNA repair. *Oncogene* 1997; **15**: 2597–2607.
- [127] SELIVANOVA G, IOTSOVA V, OKAN I, FRITSCHKE M, STROM M, GRONER B, GRAFSTROM RC, WIMAN KG. Restoration of the growth suppression function of mutant p53 by a synthetic peptide derived from the p53 C-terminal domain. *Nature Med* 1997; **3**: 632–638.
- [128] SHAPOSHNIKOVA VV, KORYSTOV YN. Thymocyte proliferation and apoptosis induced by ionizing radiation. *Scan Microscopy* 1995; **9**: 1203–1206.
- [129] SHAW P, BOVEY R, TARDY S, SAHLI R, SORDAT B, COSTA J. Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 4495–4499.
- [130] SHEARD MA, VOJTESEK B, JANAKOVA L, KOVARIK J, ZALOUDIJK J. Up-regulation of Fas (CD95) in human p53^{WILD-TYPE} cancer cells treated with ionizing radiation. *Int J Cancer* 1997; **73**: 757–762.
- [131] SHIIO Y, YAMAMOTO T, YAMAGUCHI N. Negative regulation of Rb expression by the p53 gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 5206–5210.
- [132] STEPHENS LC, SCHULTHEISS TE, ANG KK, PETERS LJ. Pathogenesis of radiation injury to the salivary glands and potential methods of protection. *Cancer Bull* 1989; **41**: 106–114.
- [133] STORY M, VOEHRINGER D, MALONE C, HOBBS M, MEYN R. Radiation-induced apoptosis in sensitive and resistant cells isolated from a mouse lymphoma. *Int J Radiat Biol* 1994; **66**: 659–668.
- [134] SWEENEY EA, SAKAHURA C, SHIRAHAMA T, MASAMUNE A, OHTA H, HAKAMORI S, IGARASHI Y. Sphingosine and *N,N*-dimethylsphingosine induce apoptosis in a variety of human cancer cell lines. *Int J Cancer* 1996; **66**: 358–366.
- [135] SYLJUASEN RG, HONG J-H, MCBRIDE WH. Apoptosis and delayed expression of *c-jun* and *c-fos* after gamma irradiation of Jurkat T cells. *Radiat Res* 1996; **146**: 276–282.
- [136] SYMONDS H, KRALL L, REMINGTON L, SAENZ-ROBLES, M., LOWE S, JACKS T, VAN DYKE T. p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell* 1994; **78**: 703–711.

- [137] TAMURA T, ISHIHARA M, LAMPHIER MS, TANAKA N, OISHI AIZAWA S, MATSUYAMA T, MAK TK, TAKI S, TANIGUCHI T. An IRF-1-dependent pathway of DNA damage-induced apoptosis in mitogen-activated T lymphocytes. *Nature* 1995; **376**: 596–599.
- [138] TAUCHI H, SAWADA S. Analysis of mitotic cell death caused by radiation in mouse leukemia L5178Y cells: apoptosis is the ultimate cell death following mitotic failure. *Int J Radiat Biol* 1994; **65**: 449–455.
- [139] THOMPSON CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; **267**: 1456–1462.
- [140] TROWELL CA. The sensitivity of lymphocytes to ionizing radiation. *J Pathol Bacteriol* 1952; **64**: 687–704.
- [141] UCKUN FM, SCHIEVEN GL, TUEL-AHLGREN L, DIBIRDIK U, MYERS DA, LEDBETTER JA, SONG CW. Tyrosine phosphorylation is a mandatory proximal step in radiation-induced activation of the protein kinase C signaling pathway in B-lymphocyte precursors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 252–255.
- [142] VERHEIJ M, BOSE R, LIN XH, YAO B, JARVIS WD, GRANT S, BIRRER M.J, SZABO E, ZON LI, KYRIAKIS JM, HAIMOVITZ-FRIEDMAN, A, FUKS Z, KOLESNICK RN. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* 1996; **380**: 75–79.
- [143] VIDAIR CA, CHEN CH, LING CC, DEWEY WC. Apoptosis induced by X-irradiation of rec-myc cells is postmitotic and not predicted by the time after irradiation or behavior of sister cells. *Cancer Res* 1996; **56**: 4116–4118.
- [144] WAGNER AJ, KOKONTIS JM, NISSAM H. Myc-mediated apoptosis requires wild-type p53 in a manner independent of cell cycle arrest and the ability of p53 to induce p21 (WAF1/cip1). *Genes Dev* 1994; **8**: 2817–2830.
- [145] WANG C-Y, MAYO MW, BALDWIN AS.JR. TNF- α and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF- κ B. *Science* 1996; **274**: 784–787.
- [146] WANG XW, YEH H, SCHAEFFER L, ROY R, MONCOLLIN V, EGLY JM, WANG Z, FRIEDBERG EC, EVANS MK, TAFFE BG, BOHR VA, HOEIJMAKERS JH, FORRESTER K, HARRIS CC. p53 modulation of TFIIF-associated nucleotide excision repair activity. *Nature Genet* 1995; **10**: 188–195.
- [147] WANG XW, VERMEULEN W, COURSEN JD, GIBSON M, LUPOLD, SE, FORRESTER K, XU G, ELMORE L, HOEIJMAKERS JHJ, HARRIS CC. The XPB and XPD DNA helicases are components of the p53-mediated apoptosis pathway. *Genes Develop* 1996; **10**: 1219–1232.
- [148] WANG XW, HARRIS CC. p53 tumor-suppressor gene: Clues to molecular carcinogenesis. *J Cell Physiol* 1997; **173**: 247–255.
- [149] WARD JF. The complexity of DNA damage: relevance to biological consequences. *Int J Radiat Biol* 1994; **66**: 427–432.
- [150] WARENIUS HM, DOWN JD. RBE of fast neutrons for apoptosis in mouse thymocytes. *Int J Radiat Biol* 1995; **68**: 625–629.
- [151] WEICHELBAUM RR, HALLAHAN D, FUKS Z, KUFE D. Radiation induction of immediate early genes of the radiation-stress response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; **30**: 229–234.
- [152] WHEELER JA, STEPHENS LC, TORNOS C, EIFEL PJ, ANG KK, MILAS L, ALLEN PK, MEYN RE. Apoptosis as predictor of tumour response to radiation in stage IB cervical carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; **32**: 1487–1493.
- [153] WIMAN KG. p53: emergency brake and target for cancer therapy. *Exp Cell Res* 1997; **237**: 14–18.
- [154] WOLOSCHAK GE. Different pathways for radiation-induced apoptosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; **39**: 951–952.

- [155] WRIGHT S, ZHENG H, ZHONG J. Tumor cell resistance to apoptosis due to a defect in the activation of sphingomyelinase and the 24 kda apoptotic protease (AP24). *FASEB J* 1996; **10**: 325–332.
- [156] WYLLIE AH. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 1997; **53**: 451–465.
- [157] XIA F, WANG X, WANG Y, TSANG N, YANDELL DW, KELSEY KT, LIBER HL. Altered p53 status correlates with differences in sensitivity to radiation-induced mutation and apoptosis in two closely related human lymphoblast lines. *Cancer Res* 1995; **55**: 12–15.
- [158] XIE G, HABBERSETT RC, JIA Y, PETERSON SR, LEHNERT B.E., BRADBURY EM, DANNA JA. Requirements for p53 and the ATM gene product in the regulation of G1/S and S phase checkpoints. *Oncogene* 1998; **16**: 721–736.
- [159] YAMADA T, OHYAMA H. Radiation-induced interphase death of rat thymocytes is internally programmed (apoptosis). *Int J Radiat Biol* 1988; **53**: 65–75.
- [160] YU Y, LI C-Y, LITTLE JB. Abrogation of p53 function by HPV 16 E6 gene delays apoptosis and enhances mutagenesis but does not alter radiosensitivity in TK6 human lymphoblast cells. *Oncogene* 1997; **14**: 1661–1667.
- [161] YUN JK, MCCORMICK TS, JUDWARE R, LAPETINA EG. Cellular adaptive responses to low oxygen tension: Apoptosis and resistance. *Neurochem Res* 1997; **22**: 517–521.
- [162] ZHAN Q, FAN S, BAEI, GUILLOUFC, LIEBERMANN DA, OCONNOR PM, FORNACE AJ jr. Induction of *bax* by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene* 1994; **9**: 3743–3751.
- [163] ZHAN Q, ALAMO I, YU K, BOISE LH, CHERNEY B, TOSATO G, OCONNOR PM, FORNACE AJ, jr. The apoptosis-associated γ -ray response of *BCL-X_L* depends on normal p53 function. *Oncogene* 1996; **13**: 2287–2293.
- [164] ZHANG W-W, ALEMANY R, WANG J, KOCH PE, ORDONEZ NG, ROTH JA. Safety evaluation of Ad5CMV-p53 *in vitro* and *in vivo*. *Gene Ther* 1995; **6**: 155–164.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 09. 1998 r.

Przyjęto: 11.12. 1998 r.

Adres autora: ul. Bora-Komorowskiego 52 m. 36, 03-982 Warszawa

RDZENIOWY ZANIK MIĘŚNI – PODŁOŻE MOLEKULARNE CHOROBY

SPINAL MUSCULAR ATROPHY – MOLECULAR BACKGROUND OF THE DISEASE

Janusz G. ZIMOWSKI

Zakład Genetyki, Instytut Psychiatrii i Neurologii, Warszawa,

Streszczenie: Rdzeniowy zanik mięśni jest jedną z najczęstszych chorób uwarunkowanych genetycznie dziedziczających się w sposób autosomalny recesywny. Choroba polega na postępującym zwyrodnieniu i obumieraniu obwodowych neuronów ruchowych rdzenia kręgowego. Posługując się kryterium nasilenia objawów przyjęto podział choroby na trzy grupy: typ I (choroba Werdniga-Hoffmanna), typ II (postać pośrednia) i typ III (choroba Kugelberga-Welander). Stosując analizę sprzężeń powiązano chorobę z rejonem q11.2-13.3 chromosomu 5. W obszarze tym wykryto i scharakteryzowano zduplikowane trzy geny: gen przeżycia neuronów ruchowych (*survival of motor neuron gene*), gen białkowego inhibitora apoptozy neuronów (*neuronal apoptosis inhibitory protein gene*) i gen podjednostki p44 podstawowego czynnika transkrypcyjnego TFIID. Wykrycie mutacji punktowych i wysoka korelacja zachorowań z wystąpieniem delecji (>95%) mogą wskazywać, że molekularnym podłożem rdzeniowego zaniku mięśni są uszkodzenia genu przeżycia neuronów ruchowych. Różny obraz kliniczny w typie I, II i III choroby może być wywołany, powstałymi w wyniku rearanżacji, zmodyfikowanymi allelami. Białkowy produkt genu wykrywany zarówno w cytoplazmie, jak i jądrze komórkowym współtworzy nowe struktury jądrowe *gems*.

Słowa kluczowe: rdzeniowy zanik mięśni, SMA, SMN, NAIP.

Summary: Spinal muscular atrophy is the one of the most common genetically-based disease inherited as an autosomal recessive. The disease involves progressive degeneration and mortification of the peripheral motor neurons of the spinal cord. There is an accepted division of this disease into three groups using a criteria based on the severity of symptoms: type I (Werdnig-Hoffmann disease), type II (the intermediate form) and type III (Kugelberg-Welander disease). By means of linkage analysis the disease has been mapped to chromosome 5q11.2-13.3. In this region three genes with their respective and highly homologous copies were discovered and characterized: the survival of motor neuron gene, the neuronal apoptosis inhibitory protein and p44, a subunit of the basal transcription factor TFIID gene. The discovery

*Praca finansowana z grantu KBN 4P05E00112.

of point mutations and a high correlation of disease with the presence of deletions (>95%) in the damages of survival of motor neuron gene suggests that defects within this gene are the molecular basis of spinal muscular atrophy. The modified alleles of spinal muscular atrophy may be due to rearrangements that result in the various clinical severity represented in type I, II and III. The expressed protein of this gene is present in the cytoplasm and in the nucleus where it is found in new nuclear structures called „gems”.

Key words: spinal muscular atrophy, SMA, SMN, NAIP.

1. OBRAZ KLINICZNY CHOROBY

Rdzeniowy zanik mięśni (ang. *spinal muscular atrophy* – SMA) jest chorobą uwarunkowaną genetycznie dziedziczącą się w sposób recesywny autosomalny. Polega na zwyrodnieniu i obumieraniu neuronów ruchowych rogów przednich rdzenia kręgowego, co prowadzi do postępującego niedowładu i zaniku mięśni. SMA występuje z częstością 1 na 6000–10000 urodzeń [31]. Ocenia się więc, że co 40–50 człowiek jest nosicielem recesywnej mutacji wywołującej chorobę. Obraz kliniczny choroby jest bardzo zróżnicowany. W najostrzejszych przypadkach choroby objawy rozpoczynają się jeszcze przed urodzeniem – kobiety ciężarne zwracają uwagę na słabnięcie ruchów płodu pod koniec ciąży. W przypadkach najłagodniejszych niedowład występuje dopiero w wieku dorosłym. W celach praktycznych proponuje się obecnie następującą uproszczoną klasyfikację [29]:

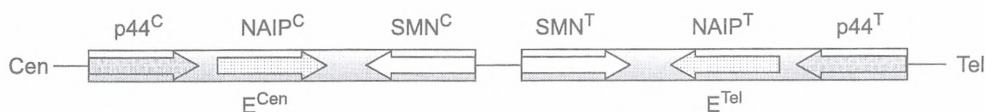
Typ I – Choroba Werdniga-Hoffmanna (postać ciężka); wiek zachorowania od 0 do 6 miesięcy życia, dziecko nigdy nie osiąga zdolności do samodzielnego siadania (bez podparcia); zgon następuje przed ukończeniem 2 roku życia.

Typ II – Postać pośrednia; wiek zachorowania przed 18 miesiącem życia, dziecko zaczyna samodzielnie siadać, lecz nigdy nie osiąga zdolności do stania i chodzenia bez pomocy; zgon następuje po 2 roku życia.

Typ III – Choroba Kugelberga-Welander, postać młodzieńcza; wiek zachorowania po 18 miesiącu życia; dziecko osiąga zdolność samodzielnego stania i chodzenia; zgon w wieku dorosłym.

2. POSZUKIWANIA GENU ODPOWIEDZIALNEGO ZA CHOROBE – REGION SMA

W 1990 roku stosując analizę sprzężeń powiązано wszystkie trzy typy rdzeniowego zaniku mięśni z obszarem 11.2-13.3 długiego ramienia chromosomu 5 sugerując ich alleliczność [4,27]. W 1993 roku skonstruowano częściową fizyczną mapę regionu 5q13 obejmującą *locus* choroby i w roku następnym wykazano obecność w nim delecji (dziedziczonych lub powstałych *de novo*) swoistych dla pa-



RYSUNEK 1. Schemat rejonu SMA (5q11.2-13.3), wyszczególniono fragmenty: centromerowy – E^{Cen} i telomerowy – E^{Tel}, geny p44, NAIP i SMN (na schemacie nie zachowano proporcji przedstawionych elementów)

cientów dotkniętych SMA [15,28]. W 1995 roku w badanym *locus* wykryto obecność dwóch powtórzonych i położonych w stosunku do siebie przeciwnie – „głowa-głowa” fragmentów wielkości 500 kpz, obszarów E^{Tel} – telomerowego i E^{Cen} – centromerowego. W każdym z nich zidentyfikowano i scharakteryzowano po trzy geny [21,33,7]. Są to w obszarze telomerowym gen przeżycia neuronów ruchowych SMN^T (*survival of motor neuron gene*), gen białkowego inhibitora apoptozy neuronów NAIP^T (*neuronal apoptosis inhibitory protein gene*) oraz gen p44^T (gen podjednostki p44 podstawowego czynnika transkrypcyjnego TFIID), a w obszarze centromerowym ich kopie SMN^C, NAIP^C i p44^C (rys. 1). Obszar 5q11.2-13.3 zawiera ponadto liczne sekwencje powtórzone i elementy retrotranspozony odpowiedzialne za jego znaczną niestabilność [16].

3. TRZY GENY – SMN, NAIP, p44 I ICH BIAŁKOWE PRODUKTY

Gen SMN^T – gen przeżycia neuronów ruchowych (kopia telomerowa)

Gen SMN^T, którego wielkość określono na 28 kpz, zbudowany jest z 9 eksonów; łączna ich długość wynosi 1575 pz. mRNA o długości 1,7 kpz, w tym otwarta ramka odczytu długości 882 nukleotydów, koduje białko zbudowane z 294 aminokwasów o przewidywanej masie cząsteczkowej 32 kDa. Na poziomie sekwencji aminokwasowej białko SMN nie wykazuje homologii z dotychczas poznanymi białkami [21,6,11]. Jego wysoką ekspresję stwierdzono w mózgu, wątrobie i nerkach, umiarkowany poziom w mięśniu sercowym i mięśniach szkieletowych, a niski w fibroblastach i limfocytach.

Gen SMN^C – gen przeżycia neuronów ruchowych (kopia centromerowa)

Gen SMN^C zawiera niemal identyczną sekwencję jak gen SMN^T i różni się od niego pięcioma jednonukleotydowymi substytucjami, po jednej w 7 i 8 eksonie (ostatnia w regionie niekodującym) oraz jedną w 6 i dwoma w 7 intronie; nie zmieniają one sekwencji aminokwasowej. Gen ten ulega ekspresji, jednak większa

część powstającego mRNA w wyniku alternatywnego składania nie zawiera sekwencji eksonu 7 [21]. Białkowy produkt jest znajdujący w tych samych tkankach co białko SMN^T.

Gen NAIP^T – gen białkowego inhibitora apoptozy neuronów (kopia telomerowa)

Wielkość genu NAIP^T określono na 56 kpz. Zbudowany jest z 17 eksonów, których łączna długość wynosi 6124 pz. Otwarta ramka odczytu długości 4212 nukleotydów zawiera informacje o sekwencji 1403 aminokwasów, a przewidywana masa cząsteczkowa białka wynosi 156 kDa [11]. Wysoki poziom ekspresji genu, mierzony ilością odpowiadającego mu mRNA, stwierdzono w wątrobie i łożysku, znacznie niższy w rdzeniu kręgowym, fibroblastach i limfoblastach [33].

Na podstawie analizy sekwencji aminokwasowej wyróżniono w domniemanym białku 3 motywy BIR (od ang. *baculoviral inhibitor of apoptosis protein repeat*) charakterystyczne dla wykrytych w bakulowirusach białkowych inhibitorów apoptozy i miejsce wiązania ATP/GTP [33,11]. W hodowlach komórkowych stwierdzono, że ekspresja wprowadzonego egzogennie genu NAIP zmniejsza poziom indukowanej apoptozy [23]. Pozostaje to w zgodzie z oczekiwanym działaniem genu, którego mutacje mogłyby wywoływać SMA, gdyż zanik mięśni wywołuje apoptotyczny zanik obwodowych neuronów ruchowych.

Gen NAIP^C – gen białkowego inhibitora apoptozy neuronów (kopia centromerowa)

Centromerowo położony gen NAIP^C (niekiedy oznaczany Ψ-NAIP) nie zawiera sekwencji odpowiadających eksonom 4 i 5 genu NAIP^T [33,11]. Ulega on prawdopodobnie transkrypcji (odnajdywane są krótsze mRNA) i być może ulega translacji [33]. Nie był on przedmiotem intensywnych badań, dlatego wiedza o nim jest znikoma.

Gen p44^T – gen podjednostki p44 TFIIH (kopia telomerowa)

Gen p44^T (inaczej określanej T-BTF2p44) zlokalizowany jest dystalnie w stosunku do pozostałych genów obszaru SMA. Jego wielkość szacuje się na 20–30 kpz. Tworzy go 16 eksonów o łącznej długości 1237 pz [10] kodujących białko złożone z 395 aminokwasów o łącznej masie cząsteczkowej 44 kDa [20]. Białko to pełni rolę podjednostki p44 podstawowego czynnika transkrypcyjnego TFIIH, który jest częścią wielofunkcyjnego kompleksu polimerazy II RNA biorącego udział w transkrypcji, naprawie DNA i prawdopodobnie kontroli cyklu komórkowego [19]. Uszkodzenia tego kompleksu spowodowane mutacjami w innych podjednostkach (p89 i p80) odpowiedzialne są za choroby dziedziczące się w sposób autosomalny recesywny: *Xeroderma pigmentosum*, zespół Cockayne'a i trichotiodystrofia [17].

p44^C – gen podjednostki p44 TFIIH (kopia centromerowa)

Kopia centromerowa p44^C umiejscowiona jest na końcu proksymalnym regionu SMA. W sekwencji nukleotydowej tej kopii w porównaniu z kopią telomerową występują cztery substytucje: w pozycjach 397 i 453 (ekson 7) oraz w pozycji 706 (ekson 10) zmieniające sekwencję aminokwasową oraz jedna w 3' UTR [7,10]. Ekspresję p44^C obserwuje się, podobnie jak kopii telomerowej, w szeregu płodowych i dojrzałych narządach: trzustce, nerkach, mięśniach szkieletowych, wątrobie, płucach, łożysku, mózgu i sercu [7]. Nie wiadomo dotychczas, jakie jest znaczenie różnic między dwoma postaciami produktów białkowych genu telomerowego i centromerowego.

4. PODŁOŻE MOLEKULARNE A OBRAZ KLINICZNY SMA

4.1. Mutacje w genach obszaru SMA

U 98% osób dotkniętych SMA wykrywa się homozygotyczne delecje w obrębie genu SMN^T – stwierdza się brak eksonów 7 i 8 lub brak eksonu 7 [21]. U pozostałych chorych na ogół odnajduje się mutacje punktowe. Jak dotychczas opisano: mikrodelecje w eksonie 3 [8,3] i duplikację 11 pz w eksonie 6 [30] powodujące przesunięcie ramki odczytu, mutację miejsca składania (*splice site mutation*) powodującą usunięcie eksonu 7 [21] oraz mutacje zmiany sensu grupujące się w eksonie 7 [34]. Te ostatnie uszkadzają motyw YxxGYxxGYxxG charakterystyczny dla białek wiążących RNA. Wśród rodziców pacjentów opisano bardzo rzadkie przypadki (1%) zdrowych nosicieli homozygotycznych delecji eksonów 7 i 8 [36]. Delecje genu SMN^C nie wywołują objawów chorobowych – spotyka się je u 5% osób zdrowych [21].

U osób dotkniętych SMA nie wykrywa się białka SMN^T, a liczba jądrowych struktur, w których ono występuje, jest silnie zredukowana [12] (patrz rozdz. 5). Ilość białka SMN^C jest różna, u osób dotkniętych SMA typu I jest zmniejszona, u osób dotkniętych SMA typu III pozostaje na niezmienionym poziomie [22].

U 45% chorych dotkniętych ostrą postacią SMA i 18% chorych dotkniętych postaciami II i III wykrywa się homozygotyczne delecje w obrębie genu NAIP^T – stwierdza się brak eksonów 4 i 5. Delecje takie wykryto również u osób zdrowych.

Mutacjom w genie p44^T nie przypisuje się obecnie wywoływania jakichkolwiek zmian chorobowych. Delecje obejmujące oba allele genu p44^T wykrywa się natomiast u 15% osób dotkniętych SMA (głównie w ostrej postaci choroby), ale także u osób zdrowych. Uszkodzenia telomerowej kopii genu nie wydają się więc być związane z klinicznymi objawami SMA – nie obserwuje się także cech uszkodzenia systemu naprawy DNA [7,10].

4.2. Hipotezy tłumaczące obraz kliniczny SMA

Poznanie budowy i sekwencji, a także białkowych produktów trzech genów SMN^T , $NAIP^T$ i $p44^T$ wywołało dyskusję nad ich rolą w patogenezie rdzeniowego zaniku mięśni. Brak objawów uszkodzenia systemu naprawy DNA u chorych dotkniętych SMA prawdopodobnie wyklucza udział obu kopii genów $p44$ w powstawaniu tej choroby [7,10]. Obserwowane u chorych zaprogramowane obumieranie komórek nerwowych rogów przednich rdzenia kręgowego oraz doświadczenia wykazujące inhibicyjne działanie białka $NAIP$ na apoptozę sugerują istotny udział mutacji telomerowej kopii tego genu w powstawaniu SMA, przynajmniej u części pacjentów [23]. Przeczy temu jednak obecność homozygotycznych delecji genu $NAIP^T$ u 5% zdrowych osób z grupy kontrolnej [33]. Wykrycie mutacji punktowych w genie SMN^T i wysoka korelacja zachorowań z wystąpieniem delecji (ponad 95%) przemawia za trafnością hipotezy mówiącej, że molekularnym podłożem rdzeniowego zaniku mięśni są uszkodzenia genu SMN^T , a gen $NAIP^T$ ma jedynie działanie modyfikujące. Nasilenie intensywności objawów SMA wiązano z wielkością delecji sugerując, że duże delecje obejmujące dwa, a nawet trzy geny obszaru telomerowego E^{tel} , mogą wywoływać ostrą postać choroby (typ I SMA), zaś delecje obejmujące jedynie gen SMN^T postacie: pośrednią (typ II SMA) i łagodną (typ III SMA) [13]. Późniejsze badania nie potwierdziły tej hipotezy.

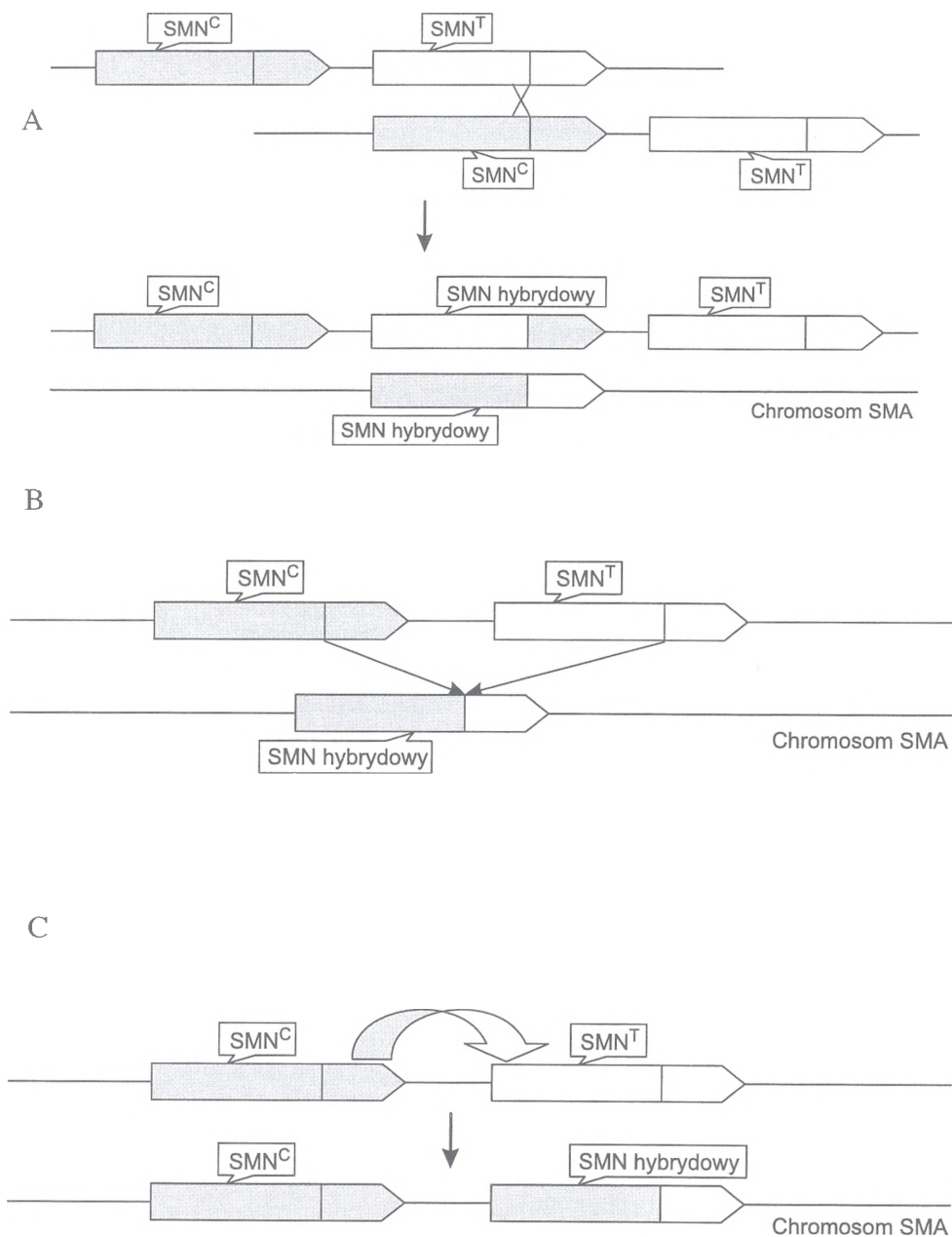
W związku z powyższym zaproponowano hipotezę tłumaczącą nasilenie objawów choroby dawką genu SMN^C [37,35]. Ponieważ produkty białkowe obu kopii genu są bardzo podobne i różnią się sekwencją C-końca, przyjęto, że białko SMN^C (nie zawiera 17 aminokwasów kodowanych przez ekson 7) może częściowo kompensować brak białka SMN^T . Przyjęto również, że odnajdywane u osób zdrowych homozygotyczne delecje centromerowej kopii genu SMN [21] świadczą, iż białko SMN^C może być w pełni zastąpione białkiem SMN^T . Zaproponowano, że co najmniej podwojenie liczby kopii genu SMN^C (łącznie 4 kopie, dwie w miejsce kopii SMN^T) mogłoby całkowicie zapobiec rozwinięciu się choroby i byłoby wytłumaczeniem istnienia homozygotycznych delecji genu SMN^T u niektórych zdrowych osób. Według tej hipotezy postać pośrednia i łagodna SMA powstawałyby wówczas, gdy delecjom obu alleli SMN^T towarzyszyłyby dwie bądź trzy kopie genu SMN^C . Obecność tylko jednej kopii genu SMN^C powodowałaby ostrą postać choroby. Ponieważ jak dotychczas nie napotkano przypadku, w którym homozygotycznej delecji genu SMN^T towarzyszyłyby całkowity brak genu SMN^C , uznano, że mutacja taka jest letalna już w okresie płodowym [9].

Niestabilność obszaru $q11.2-13.3$ chromosomu 5 sugeruje możliwość istnienia zmiennej liczby występujących tam genów, mogą więc zdarzać się przypadki zastępowania telomerowej kopii genu SMN kopią centromerową. Hipotezę tę wydają się potwierdzać wyniki analizy polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych (powtórzenia CA) ściśle sprzężonych z genami SMN . U osób dotkniętych typem II

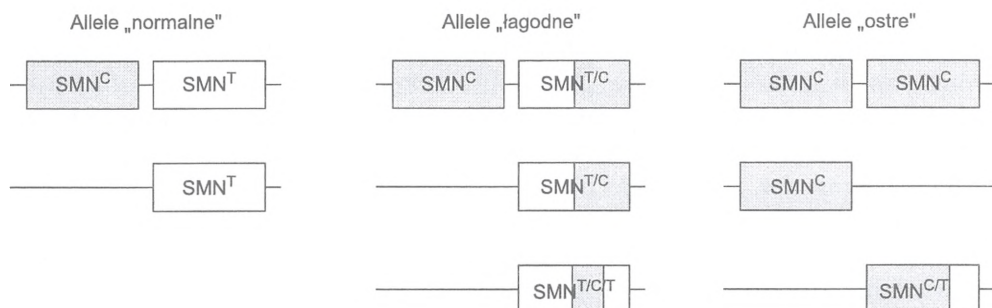
i III SMA, u których stwierdzono delecję obu kopii genu SMN^T , analizując liczbę powtórzeń CA, wykrywa się więcej niż dwie kopie genu SMN^C [37]. U 5–12% pacjentów dotkniętych SMA wykrywa się delecję eksonu 7, której nie towarzyszy delecja eksonu 8 [21,8,35]. Fakt ten tłumaczy się powstawaniem w czasie rearanżacji obszaru SMA hybrydowych genów, których część 5' pochodząca z kopii centromerowej sięga eksonu 7 i jest połączona z końcem 3' części telomerowej. Brane są pod uwagę trzy możliwe mechanizmy powstawania hybrydowych genów SMN : nierówna rekombinacja, wewnątrzchromosomowa delecja i konwersja genu (rys. 2) [18]. Białkowy produkt hybrydowego genu jest w istocie białkiem SMN^C , dlatego nieco częściej opisywane są przypadki występowania takich genów u osób dotkniętych typem II i III SMA [9].

Powyższa hipoteza nie tłumaczy wystarczająco dobrze przypadków odnajdywania dwóch kopii genu SMN^C u chorych dotkniętych typami: I, II i III SMA. Wy-tłumaczeniem takiego zjawiska jest rozszerzenie hipotezy dawki genu SMN^C zaproponowane w ubiegłym roku przez Artura Burghesa [5]. Punktem wyjścia jest postulat Beckera z 1964 roku mówiący o możliwej modyfikacji genu [2], jak również sugestia DiDonato z 1994 roku [13] istnienia dwóch typów alleli wywołujących rdzeniowy zanik mięśni – „ostrego” i „łagodnego”. Typ I SMA wywołany byłby allelami „ostry/ostry”, typ II SMA allelami „ostry/łagodny”, zaś typ III SMA allelami „łagodny/łagodny”. Burghes zaproponował powstawanie alleli „ostrych” i „łagodnych” w wyniku opisanej powyżej rearanżacji. Allelami „ostrymi” byłyby niezmiennione kopie SMN^C lub hybrydowe geny $SMN^{C/T}$, których jedynie mały fragment końca 3' (być może ekson 8) pochodziłby z genu SMN^T . Allelami „łagodnymi” byłyby hybrydowe geny $SMN^{T/C}$ lub $SMN^{T/C/T}$, które powstałyby z kopii telomerowej na skutek wymiany w nich części końca 3' (rys. 3).

Ostatnie badania wykazały, że cząsteczki białka SMN^T oddziałują z sobą. Stwierdzono, że fragmentem odpowiedzialnym za tworzenie kompleksu jest sekwencja 30 aminokwasów kodowana przez eksony 6 i 7. Wykryto, że mutacje punktowe w genie SMN^T mogą częściowo lub całkowicie znosić takie oddziaływania upodabniając zmutowane białko do białka SMN^C (tworzy ono jedynie nietrwałe kompleksy). Oznacza to, że mutacje takie prowadzą, co prawda inną drogą, do powstawania alleli „ostrych” i „łagodnych” analogicznych do postulowanych przez Burghesa. Wydaje się więc, że mutacje w genie SMN^T zmieniają właściwości kodowanego białka ograniczając w różnym stopniu jego zdolność do agregacji, co powoduje różny obraz kliniczny SMA (im mniej trwałe kompleks białek SMN , tym ostrzejsze objawy choroby) [26].



RYSUNEK 2. Hipotetyczny mechanizm odpowiedzialny za powstanie hybrydowych genów SMN (wg E. Hahnen [18]): A – nierówna rekombinacja, B – wewnątrzchromosomowa delecja, C – konwersja genu



RYSUNEK 3. Hipotetyczny schemat alleli „normalnych” oraz „łagodnych” i „ostrych” wariantów mutacji genu SMN wywołujących różne postacie kliniczne SMA (wg AHM Burghesa [5]): Typ I SMA wywołany byłby kombinacją alleli – „ostry/ostry”, typ II SMA kombinacją – „ostry/łagodny”, zaś typ III SMA kombinacją – „łagodny/łagodny”; allelami „łagodnymi” byłyby hybrydowe geny $SMN^{T/C}$ lub $SMN^{T/C/T}$, które powstawałyby z kopii telomerowej na skutek wymiany części końca 3'; allelami „ostrymi” byłyby niezmienione kopie SMN^C lub hybrydowe geny $SMN^{C/T}$ mające jedynie mały fragment końca 3' (ekson 8) pochodzący z genu SMN^T .

5. WEWNĄTRZKOMÓRKOWA LOKALIZACJA BIAŁKA SMN

Badania nad wewnątrzkomórkową lokalizacją białka SMN – z użyciem monoklonalnych przeciwciał – doprowadziły do jego wykrycia zarówno w cytoplazmie, jak i jądrze komórkowym; za pomocą metody *Western blot* określono masę cząsteczkową natywnego białka na ~38 kDa. Stwierdzono, że białko SMN gromadzi się w nowo odkrytych strukturach jądra komórkowego, które odkrywcy z powodu znacznego podobieństwa i bliskiego usytuowania w stosunku do znanych od 1903 roku *coiled bodies* [32] nazwali *gems* (od ang. *gemini of coiled bodies*) [24]. Liczbę struktur *gems* występujących w zdrowych komórkach określono na 2 do 6 na jądro, a wielkość na 0,1 do 1,0 μm . Zaobserwowano, że zależnie od zmian środowiskowych i warunków metabolizmu komórki *coiled bodies* i *gems* podlegają tym samym zmianom (agregacja i zanik). Ich liczba i wielkość zależą od temperatury. Ponieważ *coiled bodies* wydają się być odpowiedzialne za metabolizm snRNA (małe jądrowe RNA), wysunięto hipotezę, że *gems* mogą odgrywać podobną rolę.

Znaczna ilość białka SMN w *gems* jest charakterystyczna dla komórek intensywnie dzielących się (odkryto je w hodowlach komórek HeLa). W komórkach zróżnicowanych, jakimi są neurony, większość tego białka znajduje się w cytoplazmie [1].

Ubiegłoroczne badania przyniosły odkrycie nowego białka, zbudowanego z 279 aminokwasów, o masie cząsteczkowej 32 kDa, nazwanego SIP1 (od ang. *SMN interacting protein 1*). Ustalono, że białko to tworzy trwałe kompleksy z białkiem

SMN występujące zarówno w strukturach *gems*, jak i w cytoplazmie. Oba białka wchodzi w skład dużego kompleksu białkowego wielkości ~300 kDa zawierającego również białka snRNP, budujące spliceosom oraz szereg innych jeszcze niezbadanych białek. Ustalono, że N-koniec białka SMN odpowiedzialny jest za wiązanie białka SIP1, zaś C-koniec przylączya białka z grupy Sm tworzące rdzeń snRNP [25]. Udowodniono, również, że kompleks białek SMN-SIP1 jest bezpośrednio zaangażowany w cytoplazmatyczną biogenezę spliceosomalnych snRNP. Immunologiczne zablokowanie kompleksu SMN-SIP1 nie dopuszcza do łączenia się białek Sm z odpowiednimi snRNA i hamuje ich transport do jądra [14]. Być może mutacje w eksonach 6 i 7 oraz brak aminokwasów kodowanych przez ekson 7 w białku SMN^C powodują, iż jedynie białko SMN^T może budować funkcjonalnie czynny kompleks z białkiem SIP1. Zauważono również, że neurony ruchowe rdzenia kręgowego zawierają zdecydowanie większą niż inne tkanki ilość białek SMN i SIP1 i że występują w nich wyraźniejsze struktury *gems* i *coiled bodies* [25]. W neuronach ruchowych osób z typem I SMA nie wykrywa się w ogóle *gems*, podczas gdy *coiled bodies* wydają się być nie zmienione. Można przypuszczać, że neurony te wykazując wrażliwość na brak lub zmniejszenie ilości białka SMN i liczby *gems* ulegają degeneracji. Możliwe, że białko SMN pełni jakąś swoistą dla nich funkcję.

Opisane powyżej wyniki prowadzonych badań wydają się zbliżać nas do poznania molekularnych mechanizmów leżących u podstaw rdzeniowego zaniku mięśni. Niestety nie wiemy jeszcze, dlaczego brak powszechnie występującego białka SMN wywołuje tak dramatyczną reakcję tylko w komórkach rogów przednich rdzenia kręgowego. Nie wiemy również, jaką rolę pełni białkowy produkt centromerowej kopii genu SMN. Być może poznanie odpowiedzi na te i inne pytania umożliwi w przyszłości zaproponowanie skutecznej terapii. Do chwili obecnej dysponujemy jedynie diagnostyką prenatalną opartą na możliwości wykrywania homozygotycznych delecji eksonu 7 i 8 w genie SMN^T.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BATTAGLIA G, PRINCIVALLE A, FORTI F, LIZIER C, ZEVIANI M. Expression of the SMN gene, the spinal muscular atrophy determining gene, in mammalian central nervous system. *Hum Mol Genet* 1997; **6**: 1961–1971.
- [2] BECKER PE. Atrophia musculorum spinalis pseudomyopathical: hereditare neurogene proximale Amyotrophie von Kugelberg and Welander. *Z Menschliche Verebungsforschung-Konstitutionslehre* 1964; **37**: 193–220.
- [3] BRAHE C, CLERMONT O, ZAPPATA S, TIZIANO F, MELKI J, NERI G. Frameshift mutation in the survival of motor neuron gene in a severe case of type I SMA. *Hum Mol Genet* 1996; **5**: 1971–1976.
- [4] BRZUSTOWICZ LM, LEHNER T, CASTILLA LH, PENCHASZADEH GK, WILHELMSSEN KC, DANIELS RJ, DAVIES KE, LEPPERT M, ZITER F, WOOD D et al. Genetic mapping of

- chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-q13.3. *Nature* 1990; **344**: 540–541.
- [5] BURGHEES AHM. When is a deletion not a deletion? When it is covered. *Am J Hum Genet* 1997; **61**: 9–15.
- [6] BURGLER L, LEFEBVRE S, CLERMONT O, BURLET PH, VIOLLET L, CRUAUD C, MUNNICH A, MELKI J. Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene. *Genomics* 1996; **32**: 479–482.
- [7] BURGLER L, SEROZ T, MINIQU P, LEFEBVRE S, BURLET P, MUNNICH A, VIEGAS-PEQUIGNOT E, EGLY JM, MELKI J. The gene encoding p44, a subunit of the transcription factor TFIIH, is involved in large scale deletions associated with Werdnig-Hoffmann disease. *Am J Hum Genet* 1997; **60**: 72–79.
- [8] BUSSAGLIA E, CLERMONT O, TIZZANO E, LEFEBVRE S, BURGLER L, CRUAUD C, URTIZBEREA JA, COLOMER J, MUNNICH A, BAIGET M, MELKI J. A frame-shift deletion in the survival motor neuron gene in Spanish spinal muscular atrophy patients. *Nature Genet* 1995; **11**: 335–337.
- [9] CAMPBELL L, POTTER A, IGNATIUS J, DUBOWITZ V, DAVIES K. Genomic variation and gene conversion in spinal muscular atrophy: Implications for disease process and clinical phenotype. *Am J Hum Genet* 1997; **61**: 40–50.
- [10] CARTER TA, BONNEMANN CG, WANG CH, OBICI S, PARANO E, DE FATIMA BONALDO M, ROSS BM, PENCHASZADEH GK, MACKENZIE A, BENTO SOARES M, KUNKEL LM, GILLIAM TC. A multicopy transcription-repair gene, BTF2p44, maps to SMA region and demonstrates SMA associated deletions. *Hum Mol Genet* 1997; **6**: 229–236.
- [11] CHEN Q, BAIRD SD, MAHADEVAN M, BESNER-JOHNSTON A, FARAHANI R, XUAN JY, KANG X, LEFEBVRE CH, IKEDA J, KORNELUK RG, MACKENZIE A. Sequence of 131-kb region of 5q13.1 containing the spinal muscular atrophy candidate genes SMN and NAIP. *Genomics* 1998; **48**: 121–127.
- [12] COOVERT DD, LE TT, MCANDREW PE, STRASSWIMMER J, CRAWFORD TO, MENDELL JR, COULSON SE, ANDROPHY EJ, PRIOR TW, BURGHEES AHM. The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 1997; **6**: 1205–1214.
- [13] DIDONATO CJ, MORGAN K, CARPTEN JD, FUERST P, INGRAHAM SE, PRESCOTT G, MCPHERSON JD, et al. Association between Ag1-CA alleles and severity of autosomal recessive proximal spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 1994; **55**: 1218–1229.
- [14] FISCHER U, LIU Q, DREYFUSS G. The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell* 1997; **90**: 1023–1029.
- [15] FRANCIS MJ, MORRISON KE, CAMPBELL L, GREWAL PK, CHRISTODOULOU Z, DANIELS RJ, MONACO AP, FRISCHAUF AM, MCPHERSON J, WASMUTH JJ, DAVIES KE. A contig of non-chimaeric YACs containing the spinal muscular atrophy gene in 5q13. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 1161–1167.
- [16] FRANCIS MJ, NESBIT MA, THEODOSIOU AM, RODRIGUES NR, CAMPBELL L, CHRISTODOULOU Z, QURESHI SJ et al. Mapping of retrotransposon sequences in the unstable region surrounding the spinal muscular atrophy locus in 5q13. *Genomics* 1995; **27**: 366–369.
- [17] FRIEDBERG EC. *Xeroderma Pigmentosum*, Cockayne Syndrome, Helicases, and DNA repair: Whats the relationship? *Cell* 1992; **71**: 887–889.
- [18] HAHNEN E, SCHONLING J, RUDNIK-SCHONEBORN S, ZERRES K, WIRTH B. Hybrid survival motor neuron genes in patients with autosomal recessive spinal muscular atrophy: New insights into molecular mechanisms responsible for the disease. *Am J Hum Genet* 1996; **59**: 1957–1965.
- [19] HOEIJMAKERS JHJ, EGLY JM, VERMEULEN W. TFIIH: a key component in multiple DNA transactions. *Curr Opin Genet Devel* 1996; **6**: 26–33.

- [20] HUMBERT S, VAN VUUREN H, LUTZ Y, HOEIJMAKERS JHJ, EGLY J-M, MONCOLLIN V. p44 and p34 subunits of the BTF2/TFIIH transcription factor have homologies with SSL1, a yeast protein involved in DNA repair. *EMBO J* 1994; **13**: 2393–2398.
- [21] LEFEBVRE S, BURGLLEN L, REBOULLET S, CLERMONT O, BURLET P, VIOLLET L, BENICHOUB, CRUAUD C, MILLASSEAU P, ZEVIANI M, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 1995; **80**: 155–165.
- [22] LEFEBVRE S, BURLET P, LIU Q, BERTRANDY S, CLERMONT O, MUNNICH A, DREYFUSS G, MELKI J. Tight correlation of severity with the SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nature Genet* 1997; **16**: 265–269.
- [23] LISTON P, ROY N, TAMAI K, LEFEBVRE C, BAIRD S, CHERTON-HORVAT G, FARAHANI R, MCLEAN M, IKEDA J-E, MACKENZIE A, KORNELUK RG. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 1996; **379**: 349–353.
- [24] LIU Q, DREYFUSS G. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J* 1996; **15**: 3555–3565.
- [25] LIU Q, FISCHER U, WANG F, DREYFUSS G. The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell* 1997; **90**: 1013–1021.
- [26] LORSON CL, STRASSWIMMER J, YAO J-M, BALEJA JD, HAHNEN E, WIRTH B, LE T, BURGHEES AHM, ANDROPHY EJ. SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nature Genet* 1998; **19**: 63–66.
- [27] MELKI J, ABDELHAK S, SHETH P, BACHELOT MF, BURLET P, MARCADET A, AICARDI J, BAROIS A, CARRIERE JP, FARDEAU M et al. Gene for proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. *Nature* 1990; **344**: 767–768.
- [28] MELKI J, LEFEBVRE S, BURGLLEN L, BURLET P, CLERMONT O, MILLASSEAU P, REBOULLET S, BENICHOUB, ZEVIANI M, LE PASLIER D et al. *De novo* and inherited deletions of the 5q13 region in spinal muscular atrophies. *Science* 1994; **264**: 1474–1477.
- [29] MUNSAT TL, DAVIES K.E. Spinal muscular atrophy. [w] Emery AEH [red.] Diagnostic criteria for neuromuscular disorders. *European Neuromuscular Centre Bearn* 1994.
- [30] PARSONS DW, MCANDREW PE, MONANI UR, MENDELL JR, BURGHEES AHM, PRIOR TW. An 11 base pair duplication in exon 6 of the SMN gene produces a type 1 spinal muscular atrophy (SMA) phenotype: further evidence for SMN as the primary SMA-determining gene. *Hum Mol Genet* 1996; **5**: 1727–1732.
- [31] PEARN J. Classification of spinal muscular atrophies. *Lancet* 1980; **1**: 919–922.
- [32] RAMON Y CAJAL SR. Un sencillo metodo de coloracion selectiva del reticulo protoplasmico y sus electros en los diversos organos nerviosos de vertebrados y invertebrados. *Trab Lab Invest Biol* 1903; **2**: 129–221.
- [33] ROY N, MAHADEVAN MS, MCLEAN M, SHUTLER G, YARAGHI Z, FARAHANI R, BAIRD S, BESNER-JOHNSTON A, LEFEBVRE C, KANG X et al. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP), a novel protein with homology to baculoviral inhibitors of apoptosis is partially deleted in individuals with type 1, 2 and 3 spinal muscular atrophy (SMA). *Cell* 1995; **80**: 167–178.
- [34] TALBOT K, PONTING CHP, THEODOSIOU AM, RODRIGUES NR, SURTEES R, MOUNTFORD R, DAVIES KE. Missense mutation clustering in survival motor neuron gene: a role for a conserved tyrosine and glycine rich region of the protein in RNA metabolism? *Hum Mol Genet* 1997; **6**: 497–500.
- [35] VALESCO E, VALERO C, VALERO A, MORENO F, HERNANDEZ CC. Molecular analysis of the SMN and NAIP genes in Spanish spinal muscular atrophy (SMA) families and correlation between number of copies of ^CBCD541 and SMA phenotype. *Hum Mol Genet* 1996; **5**: 257–263.

- [36] WANG CH, XU J, CARTER TA, ROSS BM, DOMINSKI MK, BELLCROSS CA, PENCHASZADEH GK, MUNSAT TL, GILLIAM TC. Characterization of survival motor neuron (SMN^T) gene deletions in asymptomatic carriers of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 1996; **5**: 359–365.
- [37] WIRTH B, HAHNEN E, MORGAN K, DIDONATO CJ, DADZE A, RUDNIK-SCHONEBORN S, SIMARD LR, ZERRES K, BURGHEES AHM. Allelic association and deletions in autosomal recessive proximal spinal muscular atrophy: association of marker genotype with disease severity and candidate cDNAs. *Hum Mol Genet* 1995; **4**: 1273–1284.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 02.07.1998 r.

Przyjęto: 25.11.1998 r.

Adres autora: 02-957 Warszawa, Al. Sobieskiego 1/9.

METODY WYKRYWANIA OŁOWIU W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH

THE METHODS OF THE LEAD DETECTION IN THE PLANT CELLS

Sławomir SAMARDAKIEWICZ, Adam WOŹNY

Zakład Botaniki Ogólnej, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Uniwersytet im.
Adama Mickiewicza, Poznań

Streszczenie: Jednym z kluczowych zagadnień dotyczących badań nad reakcjami roślin na ołów jest jego lokalizacja w komórce. Ten toksyczny metal można wykrywać za pomocą metody rodizonianowej, transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) oraz metody mikroanalizy rentgenowskiej w TEM. Zalety i wady powyższych metod zaprezentowano na przykładzie lokalizacji Pb w wybranych regionach korzenia *Lemna minor* L. Ponadto przedstawiono najważniejsze cechy innych nowoczesnych metod wykrywania pierwiastków.

Słowa kluczowe: ołów, wykrywanie, tolerancja, mikroanaliza rentgenowska.

Summary: One of the key issues in the study of the reactions to lead in plants is the localization of this element in the cell. The toxic metal can be located by means of the rhodizonate method, transmission electron microscope (TEM) observations or the X-ray microanalysis method using TEM. The advantages and disadvantages of the above-mentioned methods and some other modern methods of element detection were demonstrated using as example the localization of lead in a selected region of the *Lemna minor* L. root.

Key word: lead, detection, tolerance, X-ray microanalysis.

WSTĘP

Ołów jest najbardziej rozpowszechnionym w środowisku przyrodniczym toksycznym metalem śladowym. Jest więc potencjalnym źródłem szkodliwych zmian

*Przedstawione wyniki stanowią fragment projektu badawczego KBN nr 6 PO4C 090 14.

fizycznych lub chemicznych u wielu organizmów. Jego oddziaływanie na organizmy może również powodować uruchomienie i/lub uaktywnienie określonej strategii obronnej. Jedną z nich sprowadza się do unikania zagrażającego czynnika, drugą do jego tolerancji [39]. Unikanie czynnika stresowego u roślin polega m.in. na ograniczaniu jego pobierania przez unieruchamianie w ścianie komórkowej [15,32,42,43,49,60,76,83, 86,87]. Wniknięcie czynnika stresowego do protoplastu intensyfikuje natomiast procesy tolerancji, m.in. kompartmentację w określonych strukturach komórkowych, np. w wakuoli [32,60,78,79,83,86,87].

W celu określenia rodzaju wykorzystywanych przez rośliny strategii obronnych wobec ołowiu wskazane jest m.in. zlokalizowanie tego pierwiastka na terenie komórki oraz poznanie drogi lub dróg jego rozprzestrzeniania się w organizmie i ustalenie ewentualnej bariery (lub barier) ograniczającej transport. Uzyskujemy w ten sposób również informacje, czy obserwowane zmiany w roślinie są spowodowane bezpośrednim lub pośrednim oddziaływaniem metalu na komórki. Ołów w roślinach można wykrywać różnymi sposobami:

- w mikroskopie świetlnym, np. cytochemicznie za pomocą metody rodizonianowej;
- w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM), bez dodatkowego wyposażenia, wykorzystując zdolność rozpraszania elektronów przez ten pierwiastek;
- w transmisyjnym lub skaningowym mikroskopie elektronowym z przystawką do mikroanalizy rentgenowskiej.

OBSERWACJE W MIKROSKOPIE ŚWIETLNYM

Pierwsze próby wykrywania ołowiu polegające na obserwacji w mikroskopie świetlnym zaczernionych regionów u roślin traktowanych tym metalem podejmowano na początku naszego wieku [24]. Dopiero jednak wprowadzenie metod histochemicznych pozwoliło na bardziej precyzyjne wykrywanie metali w komórkach roślinnych. Jedną z nich jest metoda Timmy'ego [11,30,90] – zwana inaczej siarczkowo-srebrą (SSM, ang. *sulphide silver method*). Polega ona na uwidacznianiu poszukiwanych metali w tkankach za pomocą srebra metalicznego. Metoda ta jest jednak mało specyficzna, ponieważ umożliwia wykrycie wielu metali, takich jak np.: Cu, Fe, Zn, Co, Ni, Hg, Cd, Pb, As, Tl, Au, Ag [11]. Znalazła ona zastosowanie głównie do badań materiału zwierzęcego, natomiast w przypadku wykrywania jonów ołowiu w materiale roślinnym lepszą wydaje się metoda rodizonianowa [20]. Rodizonian sodu ($\text{Na}_2\text{C}_6\text{O}_6$) tworzy z jonami ołowiu strąty rodizonianu ołowiu o barwie fioletowej w środowisku obojętnym lub o barwie czerwonej w środowisku lekko kwaśnym. Reakcja ta jest reakcją przyżyciową, stosunkowo czułą (w materiale

roślinnym wykrywano ołów przy jego stężeniu $16 \mu\text{g} \times \text{g}^{-1}$ suchej masy [29], a w analizie wyrobów ceramicznych czułość tej metody sięga nawet do $0,05 \mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$ [12]) i szybka, choć nie zawsze bardzo specyficzna. Trzeba bowiem pamiętać, że jony Ag^{2+} , Hg^{2+} i Cd^{2+} mogą tworzyć osad o podobnym kolorze [64,75]. Metoda rodizonianowa jest przydatna przede wszystkim do wstępnej lokalizacji jonów ołowiu w obrębie tkanek roślinnych [32,75,76,88]. Nie dostarcza jednak zbyt dokładnych informacji o rozmieszczeniu metalu wewnątrz komórki. Przykładem wykorzystania metody rodizonianowej może być wykrywanie jonów ołowiu w korzeniu *Lemna minor* [66]. Za pomocą tej metody przyżyciowo (możliwość przyżyciowej obserwacji jest niewątpliwie zaletą tej metody) stwierdzono, że istnieją rejony szczególnie aktywnie pobierające Pb, np.: nasada korzenia oraz jego część wierzchołkowa. Przeprowadzone równolegle wykrywanie kalozy w mikroskopie fluorescencyjnym wykazało jej obecność w ścianach protodermy. Występowanie wykrywalnych jonów ołowiu w korzeniu tylko na zewnątrz od strefy deponowania kalozy może świadczyć, że kaloza stanowi przeszkodę dla przenikania Pb w głąb korzenia [66].

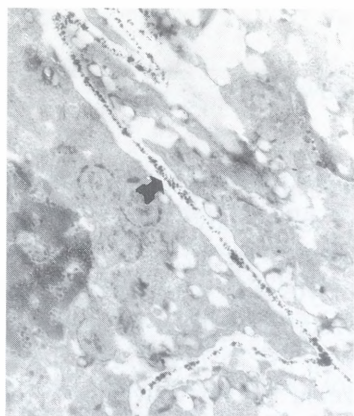
OBSERWACJE W TRANSMISYJNYM MIKROSKOPIE ELEKTRONOWYM

Obrazy w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM) uzyskuje się dzięki rozproszeniu elektronów przez struktury preparatu. Jony większości metali są widoczne w TEM po ich wytrąceniu (np. przez związki występujące w strukturach komórkowych) lub po przeprowadzeniu odpowiedniej reakcji histochemicznej (np. metoda Timmy'ego [11]). Przykładem może być ołów widoczny w strukturach komórkowych, w TEM jako czarne strąty [32,53,75,76,83,86].

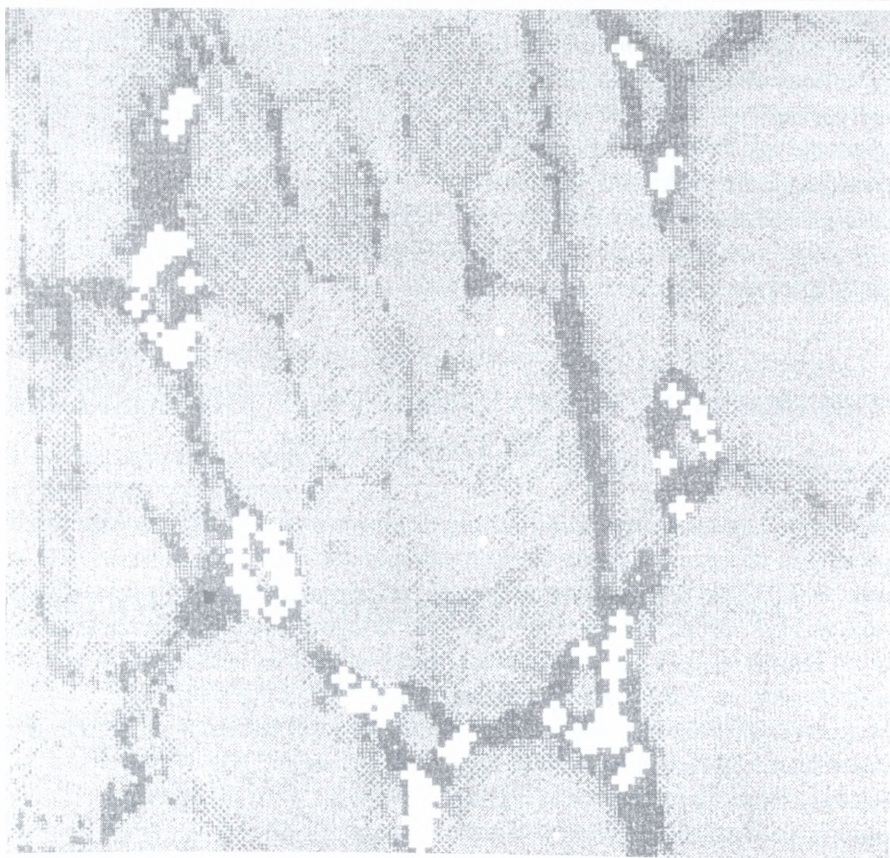
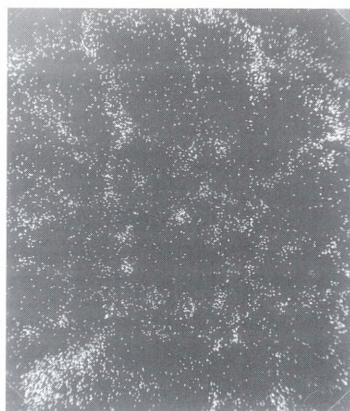
Metoda TEM pozwala obserwować pierwiastki dokładniej – na poziomie ultrastrukturalnym. Są one jednak widoczne jedynie wtedy, gdy występują w postaci wytrąconej. Ponadto metoda TEM nie daje pewności, czy strąty są obrazem szukanych pierwiastków. Istnieje bowiem i taka możliwość, że poszukiwany pierwiastek nie jest widoczny ze względu na dużą gęstość elektronową innych związków.

Metodą obserwacji w TEM można także uzyskać pewne informacje o strategiach obronnych komórek. U *Lemna minor* stwierdzono m.in. inaktywowanie jonów Pb przez ich deponowanie w wakuolach i ścianie komórkowej [32, tab. I fot. 1].

Wyniki z mikroskopu świetlnego i TEM można zweryfikować i uzupełnić metodą mikroanalizy rentgenowskiej.



1 2
3



TABLICA I: Fot. 1. Obserwacje w TEM: obraz ultrastrukturyowy przekroju poprzecznego komórek strefy merystematycznej korzenia *Lemna minor* traktowanego roztworem $Pb(NO_3)_2$ o stężeniu $Pb\ 3\ \mu g \times l^{-1}$ (24 godz.), widoczne czarne strąty Pb w ścianach komórkowych (strzałka);

Fot. 2. MAR – system WDS: mapa analogowa rozmieszczenia ołowiu (Pb widoczny w postaci jasnych punktów) na przekroju poprzecznym korzenia *Lemna minor* L. w strefie komórek zróżnicowanych; największe zagęszczenie punktów jest widoczne w ścianach komórkowych; rośliny były traktowane przez 24 godz. wodnym roztworem $Pb(NO_3)_2$ o stężeniu $Pb\ 60\ \mu g \times l^{-1}$; obserwacje wykonano w mikroskopie skaningowym JSM-50A z mikroanalizatorem rentgenowskim JXA-50A firmy JEOL;

Fot. 3. MAR – system EDS: mapa cyfrowa rozmieszczenia ołowiu (białe krzyżyki) skorelowana z obrazem ultrastrukturyowym komórek korzenia *Lemna minor* w przekroju poprzecznym na wysokości strefy komórek zróżnicowanych (położenie analogiczne do fot. 2); lokalizacja ołowiu widoczna w ścianach komórkowych jedynie na zewnątrz od endodermy i walca osiowego może sugerować barierową funkcję endodermy w przenikaniu ołowiu do walca osiowego; rośliny były traktowane przez 12 h roztworem $Pb(NO_3)_2$ o stężeniu $Pb\ 3\ \mu g \times l^{-1}$; obiekty obserwowano w transmisyjnym mikroskopie elektronowym JEM 1200EX wyposażonym w energiodispersyjny system (EDS) Link AN 10000 firmy LINK

METODA MIKROANALIZY RENTGENOWSKIEJ

Promieniowanie rentgenowskie (rtg) jest promieniowaniem elektromagnetycznym, które w mikroskopie elektronowym jest generowane w trakcie oddziaływania pierwotnej wiązki elektronowej z atomami badanej próbki. Część z tych elektronów w wyniku zderzeń z elektronami wewnętrznych powłok atomu próbki (np. powłoki K), powoduje ich wybitcie na wyższą powłokę (atom został wprowadzony w stan wzbudzenia). Aby równowaga atomu została przywrócona, konieczne jest obsadzenie zwolnionego miejsca przez jeden elektron z wyższego energetycznie poziomu, np.: L, M lub N. Taki przeskok elektronu z powłoki zewnętrznej do powłoki bliższej jądra, przyczynia się do wypromieniowania nadmiaru energii w postaci charakterystycznego promieniowania rentgenowskiego. Przejście z powłoki L do K określa się jako linie charakterystyczne $K\alpha$, przejście z M do K – $K\beta$, a przejście z M do L – $L\alpha$ [2,3,6,7,26].

Atomy różnych pierwiastków charakteryzują się odmiennymi, charakterystycznymi dla siebie wartościami energii poszczególnych powłok. Pierwiastki emitują więc promieniowanie rtg o różnej energii i odpowiadającej jej odmiennej długości fali. Stanowi to podstawę mikroanalizy rentgenowskiej (MAR; w literaturze można spotkać również oznaczenia: XMA – ang. *X-ray microanalysis* lub EPMA – ang. *electron probe microanalyser*, pol. mikrosonda elektronowa) poszczególnych pierwiastków w badanej próbce. Można ją przeprowadzać zarówno w transmisyjnym, jak i skaningowym mikroskopie elektronowym, przy użyciu odpowiedniego detektora umożliwiającego wychwytywanie emitowanego promieniowania rtg [2,3,6,7,9,26,77].

Wyróżnia się dwa podstawowe systemy MAR: spektrometrię falowo-dyspersyjną (WDS) oraz spektrometrię energo-dyspersyjną (EDS). System WDS działa na zasadzie analizy długości fali promieniowania charakterystycznego, co pozwala na analizowanie w danej chwili obecności tylko jednego, wybranego pierwiastka w badanej próbce. Jest to możliwe dzięki zastosowaniu odpowiednich kryształów analizujących, znajdujących się pomiędzy próbką a detektorem [2,3,6,7,49,77]. Przykładem ilustrującym możliwości tego systemu jest lokalizacja obecności Pb w korzeniu *Lemna minor* L. (tab. I fot. 2). Druga z metod polega na pomiarze energii promieniowania charakterystycznego [2,3,7]. Zaletą tego systemu jest możliwość jednoczesnego analizowania większej liczby różnych pierwiastków.

Istnieją trzy sposoby zbierania sygnałów rentgenowskich z badanego obszaru dla EDS i WDS. Jeden z nich to analiza punktowa: średnica analizowanego obszaru może przykładowo wynosić zaledwie 10 nm dla mikroskopu JEM 1200 EX (dla porównania średnica rybosomów wynosi od 15 do 30 nm), co umożliwia dużą precyzję odczytu w przypadku bardzo drobnych struktur. Jest to możliwe dzięki silnemu zogniskowaniu wiązki elektronów. W przypadku analizy punktowej wiązka

ta jest nieruchoma, natomiast w dwóch pozostałych metodach, a mianowicie: analizie wzdłuż wybranej linii oraz analizie z pola o regulowanej wielkości powierzchni, obserwacje przeprowadza się ruchomą wiązką skanującą.

Wyniki zliczeń można przedstawić, w zależności od sposobu zbierania sygnału, w postaci:

- widm pierwiastków (tab. II)
- map analogowych lub cyfrowych (tab. I fot. 1 i 2).

Możliwości mikroanalizy rentgenowskiej nie kończą się jednak tylko na samym ilustrowaniu składu elementarnego badanej próbki. Rozmieszczenie poszczególnych pierwiastków można bowiem skorelować z obrazem ultrastrukturalnym (tab. II).

Niezwykle cenną właściwością MAR jest możliwość jej wykorzystania do półilościowego, a nawet ilościowego oznaczania pierwiastków. Podstawą tych pomiarów jest proporcjonalna zależność między stężeniem pierwiastków a natężeniem linii widmowych ich promieniowania. W praktyce polega to często na porównaniu powierzchni odpowiednich wierzchołków (krzywych linii charakterystycznych, np. $K\alpha$), które są miarą intensywności promieniowania, a tym samym również stężenia pierwiastków. W analizie zarówno półilościowej, jak i ilościowej porównuje się znaną zawartość pierwiastka w standardzie z jego zawartością w próbce uwzględniając przy tym tło (dla próbki i standardu), a niekiedy także odpowiednie współczynniki korygujące [2,3,6,7,26,50,77].

W mikroanalizie rtg, zwłaszcza w analizie ilościowej, niezwykle ważny jest sposób przygotowania próbki i standardu. Należy bowiem tak dobrać preparatykę materiału, by zachować wiernie nie tylko jego strukturę, ale również skład chemiczny, pamiętając o tym, aby ograniczyć do maksimum wprowadzanie dodatkowych, egzogennych pierwiastków. W przypadku sprzężenia mikroanalizy rentgenowskiej z TEM często bywa stosowana rutynowa preparatyka materiału, wtedy jednak konieczne jest wyeliminowanie czterotlenku osmu (do utrwalenia materiału) i kontrastowania (np. związkami metali ciężkich). Wprawdzie ma to ujemny wpływ na jakość obrazu, jednak związki te mogą utrudniać interpretację wyników; przykładowo linia L ołowiu znajduje się zbyt blisko linii L osmu. Metoda ta jest przydatna jedynie do analizy pierwiastków wolno dyfundujących (np. niektórych metali ciężkich), występujących w trudno rozpuszczalnych związkach [2,3,6,7,26,77].

Metody chemiczne utrwalań nie nadają się jednak do analizy pierwiastków występujących w postaci jonów lub związków łatwo rozpuszczalnych. Prowadzą one bowiem często do zmian lokalizacji pierwiastka, a nawet jego wpływu z tkanek (np. K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}). W takiej sytuacji rozwiązaniem może być wprowadzenie do preparatyki dodatkowych związków unieruchamiających dany pierwiastek w postaci strątu. Przykładem może być wytrącanie wapnia za pomocą szczawianu amonowego [59].

Najskuteczniejszym przeciwdziałaniem dyfuzji są jednak metody fizyczne związane ze stosowaniem niskich temperatur, np. mrożenie z podstawianiem (*freeze substitution*), mrożenie i odwadnianie materiału przez sublimację wody w próżni (*freeze-drying*) lub mrożenie bez odwadniania próbek (*freeze-hydratation*) [3,6,7,-18,25,26,77].

W przygotowaniu i interpretacji analizy próbek roślinnych należy uwzględnić specyfikę tego materiału. Okazuje się, że jest on znacznie trudniejszy pod tym względem niż materiał zwierzęcy, ponieważ spotykamy w nim:

- barierę w postaci kutykuli pokrywającej powierzchnię niektórych ścian komórkowych;
- duże przestwory międzykomórkowe wypełnione powietrzem;
- duże, silnie uwodnione wakuole (większe ryzyko zniszczenia komórek przez kryształki lodu podczas stosowania metod zamrażania) zawierające wysoce mobilne jony;
- wreszcie duże różnice w zwartości struktur (ściana komórkowa, cytoplazma, wakuola) czy – w niektórych dojrzałych komórkach – cienki obszar przyściennej cytoplazmy itp. [77].

Podsumowując można stwierdzić, że MAR ma szereg zalet, m.in.:

- Nie wymaga zniszczenia struktury badanego materiału (np. spalania próbki, jak to ma miejsce w spektrofotometrii atomowej).
- Charakteryzuje się bardzo wysoką czułością, rzędu 10^{-15} – 10^{-18} g [7,26].
- Pozwala z dużą precyzją lokalizować pierwiastek na niewielkim obszarze rzędu nawet 10 nm (analiza punktowa).
- Może służyć do analizy ilościowej i półilościowej.
- Umożliwia analizę lokalizacji równocześnie wielu pierwiastków (EDS).
- Pozwala weryfikować wyniki z TEM: np. potwierdzać i uściślać lokalizację badanych pierwiastków, a także lokalizować pierwiastki, których nie można wykryć w TEM.

Mimo wielu zalet należy pamiętać także o pewnych minusach tej metody, a mianowicie o:

- konieczności maksymalnego ograniczania wprowadzania pierwiastków wraz z odczynnikami podczas preparatyki (co może prowadzić do zmniejszenia kontrastowości obrazów);
- wymogu stosowania odczynników o analitycznej czystości;
- możliwości zaistnienia (w czasie preparatyki) zmiany w lokalizacji substancji łatwo rozpuszczalnych; stąd zalecenie, aby w miarę możliwości stosować metody fizyczne przygotowania materiału;
- prawdopodobieństwie pokrycia się wierzchołków krzywych zawartości dwóch pierwiastków, co utrudnia interpretację wyników.

Metoda mikroanalizy rtg znalazła szerokie zastosowanie m.in. w takich dziedzinach wiedzy, jak: archeologia, biologia, chemia, farmakologia, geologia, medycyna, metalurgia, paleontologia, a nawet kryminalistyka [2,3,7,17,33,46,56,58,77]. MAR w badaniach biologicznych jest najczęściej wykorzystywana do analiz pierwiastków zarówno endogennych, jak i egzogennych oraz w śledzeniu procesów fizjologicznych [3,7,34,77]. Dynamiczny rozwój tej metody dotyczy również analizy materiału roślinnego, np.: w anatomii i histologii roślin [51], embriologii roślin [8,22,81,82], fizjologii roślin [3,19,31] itd.

W przypadku naszych doświadczeń stwierdzono również przydatność metody MAR do innych celów. Przykładem mogą być doświadczenia dotyczące lokalizacji Pb w komórkach *Lemna minor* traktowanych azotanem ołowianym o stężeniu $3 \text{ mg} \times \Gamma^{-1}$ Pb przez 1 godz. i 12 godz. Po inkubacji z ołowiem rośliny przygotowano wg rutynowej procedury do TEM, jednak nie zastosowano czterotlenku osmu (jak już wspomniano, linia L ołowiu pokrywa się z linią L osmu). Do obserwacji wybrano rejon korzenia w strefie merystematycznej znajdujący się na wysokości części wierzchołkowej czapeczki. Korzenie zatopione w żywicy o niskiej lepkości [72] były krojone na skrawki o grubości 100 nm, a następnie umieszczane na siatkach miedzianych i napyłane węglem (w celu podniesienia przewodnictwa preparatu). Obiekty obserwowano w transmisyjnym mikroskopie elektronowym JEM 1200EX wyposażonym w przystawkę skaningową i energodispersyjny system (EDS) Link AN 10000 firmy LINK do analizy rentgenowskiej pierwiastków. Analizy punktowe o średnicy 40 nm przeprowadzono przy napięciu przyspieszającym 80 keV. Czas rejestrowania sygnałów składających się na widmo wynosił każdorazowo 200 s. Zawartość Pb analizowano na podstawie wierzchołków dla linii $L\alpha 1$ (10,540 keV), $L\beta 1$ (12,611 keV), $L\beta 2$ (12,610 keV).

Po 1 godz. traktowania ołowiem, pierwiastek ten w dużych ilościach występował w rejonie merystemu jedynie w wakuolach; ściany zawierały niewiele ołowiu. Natomiast 12 godz. proporcje zmieniły się na korzyść ścian komórkowych (tab. II fot. 1–4). Wyniki te sugerują, że po krótkim czasie od podania ołowiu, główny mechanizm detoksyfikacyjny polega na umieszczeniu (kompartmentacja) w wakuolach. Rola ściany komórkowej w strategii tolerancji stresu zwiększa się natomiast po dłuższym czasie kontaktu z czynnikiem stresowym. Podobną rolę ściany komórkowej i/lub wakuoli w reakcjach odpornościowych stwierdzono za pomocą mikroanalizy rtg u wielu roślin [21,42,43,44,49,66,75,76,78,83,85]. Powyższy przykład może świadczyć o tym, że MAR nie tylko pozwala zlokalizować dany pierwiastek, jak ma to miejsce w TEM, ale pozwala również uchwycić zmiany ilościowe w jego zawartości.

Wśród reakcji obronnych komórek roślinnych wobec Pb, przy użyciu MAR, wykryto ponadto m.in.:

- barierowe funkcje endodermy w transporcie tego metalu do walca osiowego [65, tab. I fot. 3];

- unieruchamianie związków organometalicznych w neutralnych lipidach [84];
- udział szczawianów wapnia w wiązaniu Pb w obrębie kryształów [45] itd.

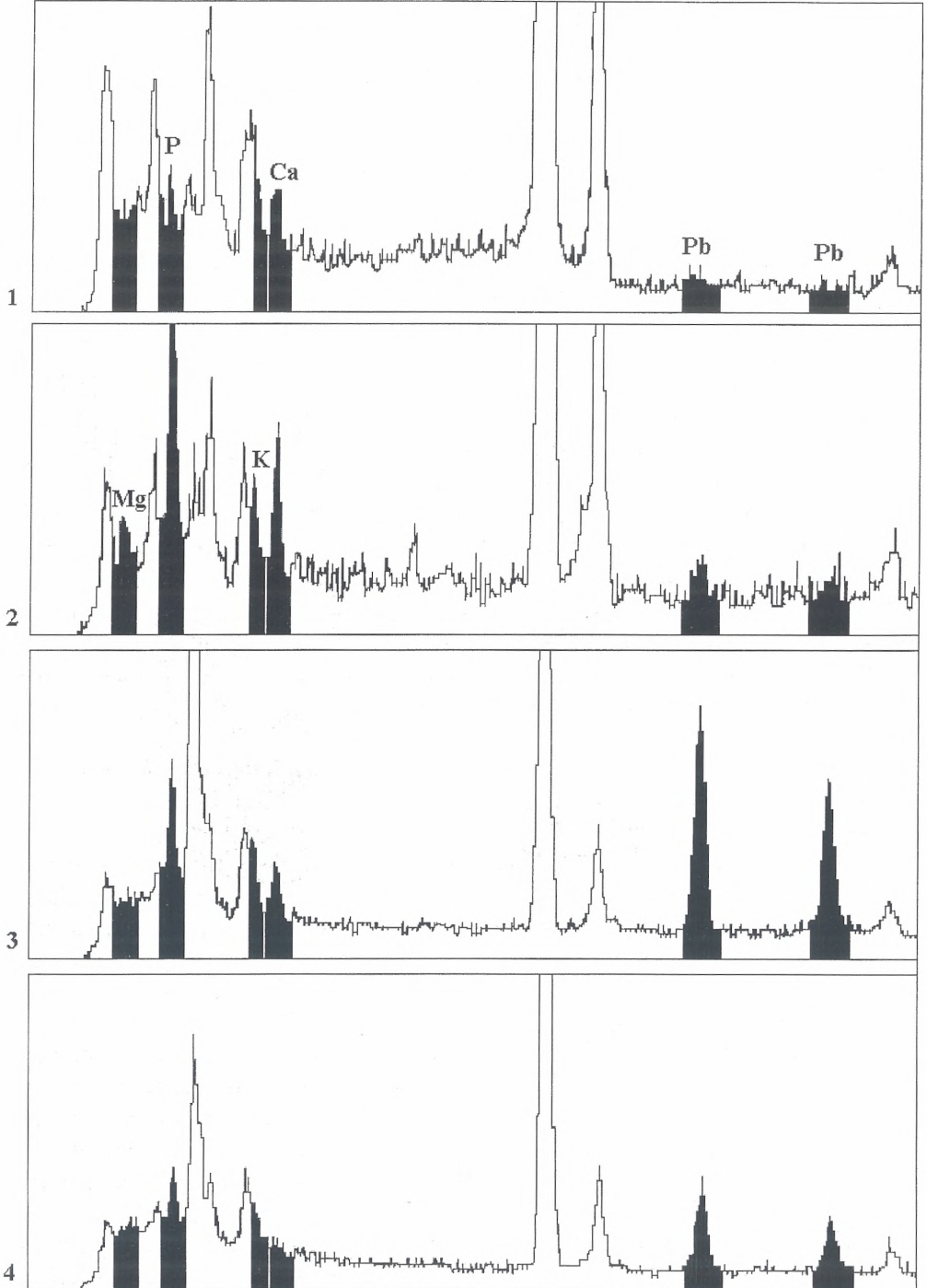
Strątom ołowiu często towarzyszą inne pierwiastki. Ich identyfikacja metodą MAR pozwala wnioskować o związkach chemicznych mogących brać udział w unieczynnianiu toksycznych metali [77,78]. Wśród takich związków wymieniane są m.in. cukry proste, aminokwasy, kwasy organiczne, związki fenolowe, polisacharydy, śluz i metalotioneiny klasy III [87 i cyt. tam lit.]. W ścianach komórkowych *Lemna minor* zauważono, że w strątach Pb zlokalizowanych na ich terenie znajdują się duże ilości Ca i P (tab. II fot. 1 i 3). Prawdopodobnie ołów jest tu wiązany m.in. przez pochodne poligalakturonianu, które wykazują duże powinowactwo do metali, zwłaszcza do ołowiu [15]. W tych doświadczeniach stwierdzono także, że w przypadku strąków ołowiu w wakuolach i drobnych pęcherzykach cytoplazmatycznych wzrastała w nich zawartość P, Ca, Mg i K (zwłaszcza po 1 godz., fot. 2). Podobny skład pierwiastków został już wcześniej odnotowany w globularnych depozytach wiążących jony cynku w wakuolach *Lemna minor* [78]. Na podstawie wzorców autorzy zidentyfikowali metodą MAR substancję odpowiedzialną za wiązanie Zn we wspomnianych depozytach – był nią kwas fitynowy. Jest to substancja, która pełni ważną rolę w magazynowaniu składników mineralnych w strukturach generatywnych (rzadziej w tkankach somatycznych). *Lemna minor* jest jedną z roślin wodnych, u której substancja ta jest syntetyzowana również w komórkach somatycznych [37 i cyt. tam lit.].

Przy zbyt wysokich dawkach ołowiu mechanizmy obronne roślin okazywały się niewystarczające, by zapobiec wnikaniu Pb do tak ważnych dla komórki roślinnej organelli, jak jądro komórkowe czy chloroplasty [53].

Omówione wyniki dotyczą reakcji roślin na toksyczne działanie pierwiastków śladowych, ale MAR jest przydatna również w badaniu innych czynników stresowych, zarówno biotycznych [10] jak i abiotycznych (ozon [19], zasolenie [23], związki chemiczne powodujące wysuszenie [55] itd.).

Na zakończenie należy wspomnieć o innych, niż porównywane powyżej, metodach analizy ołowiu w materiale roślinnym. Są nimi m.in.: absorpcyjna spektrofotometria atomowa (ASA), autoradiografia, mikroanaliza laserowa (LAMMA), mikroskopia protonowa (PIXE), fluorescencja rentgenowska (XRF) oraz metody transmisyjnej mikroskopii elektronowej, w których wykorzystuje się filtry energii (EELS, ESI).

Dzięki metodzie ASA (ang. *atomic absorption spectroscopy*) możemy uzyskać dane dotyczące globalnej zawartości Pb we wcześniej zmineralizowanych tkankach [62,69], nie otrzymamy jednak informacji, w jakich strukturach ołów jest lokalizowany. Metodą autoradiografii ołów można wykrywać jakościowo i ilościowo [5,83]. Metoda ta wymaga jednak używania izotopów promieniotwórczych i jest bardzo czasochłonna. Stosunkowo wysoką czułością charakteryzuje się mikroanaliza laserowa (LAMMA, ang. *laser microprobe mass analysis*; w praktyce wynosi ona 10^{-8} g do 10^{-14} g [36], a według innego źródła 1–3 ppm dla większości metalicznych



TABLICA 2, fot. 1–4. MAR – system EDS: przykłady punktowej mikroanalizy rtg w komórkach przekrojów poprzecznych strefy merystematycznej korzeni *Lemna minor* traktowanych roztworem $Pb(NO_3)_2$ (stężenie $Pb\ 3\ mg \times l^{-1}$); obiekty obserwowano w transmisyjnym mikroskopie elektronowym JEM 1200EX wyposażonym w energodispersyjny system (EDS) Link AN 10000 firmy LINK; szczegółowy opis warunków doświadczalnych w tekście, widmo pochodzące z analizy punktowej: fot. 1 – w ścianie komórkowej rośliny traktowanej Pb przez 1 godz., fot. 2 – w drobnej wakuoli rośliny traktowanej Pb przez 1 godz., fot. 3 – w ścianie komórkowej rośliny traktowanej Pb przez 12 godz., fot. 4 – w drobnej wakuoli rośliny traktowanej Pb przez 12 godz.

pierwiastków [27]). Metoda ta polega na działaniu wiązką promieni laserowych na odpowiednio wybrane miejsce w próbce biologicznej, czemu towarzyszy wyparowanie badanej tkanki w postaci zjonizowanych atomów. Podczas tego procesu emitowane jest promieniowanie świetlne, które z kolei analizowane jest przez spektrograf, a uzyskane tą drogą widmo spektrograficzne dostarcza informacji o składzie pierwiastkowym badanej próbki. W porównaniu z wiązką elektronów obszar analizowany przez wiązkę laserową jest większy niż w MAR i wynosi 10–30 μm [36]. Metoda ta nie jest więc tak precyzyjna jak MAR.

Na podobnej zasadzie co EDX, działa metoda PIXE (ang. *proton-induced X-ray emission* lub *particle-induced X-ray emission*). Różnica polega na tym, że atomy wchodzą w stan wzbudzenia pod wpływem protonów (nie elektronów, jak to ma miejsce w EDX) [26]. Jest to metoda czuła (10^{-12}g), ma jednak mniejszą rozdzielczość przestrzenną niż EDX. Szerokie zastosowanie znalazła metoda PIXE w medycynie, w tym m.in. w badaniu procesów apoptozy [16,28,52,54,70,73,74]. Można ją wykorzystywać nie tylko w analizie poszczególnych pierwiastków, ale również w szczegółowym określaniu stężeń metaloprotein w elektroforezie cienkowarstwowej (analiza elektroforogramów) [73]. Badania, z wykorzystaniem PIXE, działania toksycznych pierwiastków śladowych na rośliny są w znacznie mniejszym stopniu zaawansowane. Wykazano dotychczas, że np.: jony aluminium były gromadzone na powierzchni korzeni *Allium cepa* traktowanych tym metalem. Równoczesne badania zawartości Ca nie potwierdziły hipotezy, że Al istotnie wypiera Ca, przez co poważnie redukuje ilości związanego w komórkach Ca [67].

Promieniowanie X może być również wzbudzane przez oddziaływanie na próbkę promieniowaniem γ lub X. Towarzyszy temu zjawisko fluorescencji rentgenowskiej, które można wykorzystywać do badania zawartości pierwiastków w organizmach żywych [3]. Metoda fluorescencji rentgenowskiej (XRF, ang. *X-ray fluorescence*) znalazła szerokie zastosowanie w medycynie, ponieważ pozwala ona w sposób nieinwazyjny, *in vivo* wykrywać toksyczne pierwiastki śladowe (w tym również Pb) np. w kościach [1,4,71]. Dzięki tym badaniom uzyskano wiele cennych informacji o możliwych sposobach odtruwania organizmów narażonych na duże stężenia toksycznych pierwiastków śladowych, w tym Pb [63]. XRF można wykorzystywać również do badań materiału roślinnego, np. materiału zielarskiego [57] lub w biomonitoringu środowiska skażonego metalami ciężkimi (z wykorzystaniem m.in. roślin) [14,61,80].

Pewną alternatywą dla MAR może być metoda spektrometrycznej analizy charakterystycznych strat energii elektronów wiązki pierwotnej (EELS, ang. *electron energy loss spectroscopy*), które są rozpraszane nieelastycznie w wyniku zderzenia z atomami próbki [6,29,89]. Rozróżnianie odmiennych poziomów energii elektronów zachodzi przy użyciu spektrometru elektromagnetycznego. Bieg elektronów wchodzących w pole elektromagnetyczne spektrometru ulega odchyleniu (elektrony o niższej energii są odchylane na większą odległość niż elektrony o wyższej energii);

w ten sposób ogniskowe różnych grup (wiązek) elektronów są od siebie fizycznie oddzielane. Ruchoma płytką z wąską szczeliną przepuszcza do detektora tylko elektrony o specyficznej wartości energii. Metoda ta szybko rozwija się w ostatnich latach, ma ona bowiem m.in. większą czułość niż MAR (rzędu nawet do 10^{-21} g) [29,38,77], zwłaszcza dla pierwiastków o niskiej liczbie atomowej [77]. W ostatnich latach przewaga ta traci jednak na znaczeniu, ponieważ po wprowadzeniu nowych systemów detekcji, również MAR pozwala na efektywną analizę pierwiastków lekkich, takich jak np.: B i Be [77]. EELS charakteryzuje się także wysokim stopniem rozdzielczości przestrzennej [13] (np. sygnały EELS dla Al linii K można uzyskiwać przy rozdzielczości 3,3 nm w 30 nm skrawkach z $2,78 \times 10^{-21}$ g Al [89]). Użycie metody EELS ogranicza konieczność stosowania ultracienkich skrawków (30–90 nm) [6,68,77]; stąd większe możliwości uszkodzenia próbki podczas analizy. Z kolei użycie grubszych skrawków zwiększa ilość nieelastycznie rozproszonego promieniowania i poziom tła, co poważnie ogranicza czułość tej metody [68]. Nakładające się w grubszych skrawkach struktury dodatkowo wpływają niekorzystnie nie tylko na interpretację wyników mikroanalizy, ale również na jakość obrazu [6]. Wyniki otrzymywane tą metodą są ponadto bardziej złożone niż otrzymane w MAR i wymagają większej wprawy w interpretacji [77].

Metoda EELS znalazła zastosowanie m.in. w badaniach nad reakcjami obronnymi komórek na toksyczne działanie pierwiastków śladowych na komórki roślinne [40,41,48,49]. Stwierdzono m.in., że metale, takie jak: Cd i Cu, były transportowane w komórkach *Skeletonema costatum* do wakuoli. Dzięki możliwości określania stopnia utlenienia w EELS wykazano, że pierwiastki te kumulowały się jako dwuwartościowe kationy (Cd^{+2} i Cu^{+2}) [47]. Wykazano również udział S w wiązaniu Cd, stąd sugestia, że toksyczne jony kadmu były prawdopodobnie przyłączane przez związki organiczne wiązaniami S-Cd.

EELS jest jedną z metod w obrębie transmisyjnej mikroskopii elektronowej wykorzystującą filtry energii (EFTEM, ang. *energy-filtering transmission electron microscopy*) [35]. Innym przykładem EFTEM jest ESI (ang. *electron spectroscopic imaging*), która jest wykorzystywana do mapowej analizy rozmieszczenia pierwiastków [35,41,48,49,89]. Charakteryzuje się ona wysoką rozdzielczością i czułością, jednak pewnych trudności przysparza niewystarczająca specyficzność rozpoznawania niektórych pierwiastków i udział tła.

Interesujących wniosków dostarczają doświadczenia oparte na połączeniu danych z MAR, EELS, ESI i kwantowej analizy chemicznej [41,48,49,]. Zastosowanie tych metod umożliwiło m.in. stwierdzenie, że jony Zn były wiązane w ścianach komórkowych *Minuartia verna* (rośliny tolerancyjnej w stosunku do Zn) przez krzemiany; z kolei jony Cu były chelatowane przez grupy hydroksylowe związków fenolowych w wakuolach rośliny *Armeria maritima* ssp. Halleri (tolerancyjnej wobec metali ciężkich). Dzięki tej złożonej metodzie stwierdzono również, że w skład

strąków na terenie wakuoli komórek pomidora traktowanych Cd wchodziły kompleksy CdS/fitochelaty [41,48,49].

PODSUMOWANIE

Spośród omówionych metod, które z reguły są używane do wykrywania ołowiu w komórkach roślinnych, najpełniejsze informacje można uzyskać stosując mikroanalizę rentgenowską. Dzięki precyzyjnej lokalizacji tego metalu pozwala ona pośrednio określić także typy reakcji obronnych komórek traktowanych ołowiem. Tę wysoką precyzję zapewnia nie tylko duża czułość metody, ale również możliwość badania niewielkiego obszaru próbki. MAR pozwala ponadto weryfikować wyniki uzyskane za pomocą TEM. Dostarcza bowiem jednoznacznych informacji o tym, czy dane strąty są rzeczywiście strąkami badanego metalu oraz pozwala wykrywać formy metali niewidoczne w TEM. Posługując się analizą ilościową lub półilościową możemy pośrednio dowiedzieć się, która z reakcji obronnych odgrywa większą rolę po określonym czasie inkubacji w roztworze soli tego pierwiastka. U *Lemna minor* na przykład stwierdzono, że po krótszym czasie inkubacji w roztworze azotanu ołowianego większą rolę w kompartmentacji Pb odgrywa wakuola, zaś po dłuższych czasach – ściana komórkowa.

Zasadniczą jednak zaletą metody MAR jest możliwość wykrywania za jej pomocą pierwiastków towarzyszących metalom ciężkim. To z kolei pozwala określić substancje biorące udział w reakcjach obronnych komórki, a dokładniej substancje mogące unieczynniać metal na terenie komórki lub poza nią. Przykładem jest udział kwasu fitynowego w unieczynnianiu Zn, a prawdopodobnie także Pb.

Spośród innych wspomnianych metod jedynie EELS wydaje się konkurencyjną wobec MAR. Mimo szeregu zalet metody EELS metoda MAR jest jednak nadal częściej stosowana w badaniach ze względu na większą dostępność. W przypadku analizy jonów ołowiu metoda mikroanalizy rentgenowskiej jest wystarczająco dokładna i jednocześnie łatwiejsza do interpretacji uzyskiwanych wyników niż EELS. Co więcej, w praktyce okazuje się, że przy użyciu metody EELS widma atomów ołowiu pokrywają się z widmami uranu (Turnau – informacja ustna), co często uniemożliwia analizę zawartości jonów ołowiu. Stosowanie EELS może być natomiast doskonałym uzupełnieniem badań nad reakcjami obronnymi komórek roślinnych wobec ołowiu, zwłaszcza w zakresie analizy pierwiastków lekkich.

Podziękowania

Pragniemy podziękować Pani prof. dr hab. A.Przełęckiej, doc.dr hab. E.Wyrobie i jej współpracownikom, dr K. Idzikowskiej i jej współpracownikom oraz Panu mgr K. Józwiakowi za pomoc w realizacji tematów związanych z mikroanalizą rentgenowską.

LITERATURA

- [1] AO Q, LEE SH, GARDNER RP. Development of the specific purpose Monte Carlo code CEARXRF for the design and use of *in vivo* X-ray fluorescence analysis systems for lead in bone. *Appl Radiat Isot* 1997; **48**: 1403–1412.
- [2] BAER J, BARBACKI A, DOBIELIŃSKA M, JAKUBOWSKI J, JÓŹWIAK K, KACHLICKI T, KOSTRZEWA K, WIERSZYŁOWSKI J. Elektronowa mikroskopia skaningowa i mikroanaliza rentgenowska. [w] Barbacki A [red.] *Metody i techniki strukturalnych badań metali*. Poznań: Wyd. Politechniki Poznańskiej 1982; 88–126.
- [3] BOCHNIA T, HOMIŃSKA A. Zastosowanie mikros sondy elektronowej w badaniach fizjologii komórki roślinnej. *Wiad Bot* 1989; **33**: 19–32.
- [4] BORJESSON J, MATTSSON S. Toxicology; *in vivo* X-ray fluorescence for the assessment of heavy metal concentrations in man. *Appl Radiat Isot* 1995; **46**: 571–576.
- [5] BOZZOLA JJ, RUSSELL LD. Autoradiography/radioautography. [w] Bozzola JJ [red.] *Electron microscopy: principles and techniques for biologists*. Boston: Jones and Bartlett Publishers 1992: 262–276.
- [6] BOZZOLA JJ, RUSSELL LD. The analytical electron microscope. [w] Bozzola JJ [red.] *Electron microscopy: principles and techniques for biologists*. Boston: Jones and Bartlett Publishers 1992: 332–356.
- [7] BUTOWT R, BEDNARSKA E. Metoda mikroanalizy rentgenowskiej w badaniach biologicznych. *Post Biol Kom* 1993; **20**: 403–420.
- [8] BUTOWT R, RODRIGUEZGARCIA MI, ALCHE JD, GÓRSKA-BRYLASS A. Calcium in electron-dense globoids during pollen grain maturation in *Chlorophytum elatum* RBR. *Planta* 1997; **203**: 413–421.
- [9] BUTOWT R, SMOLIŃSKI DJ. Mapowanie pierwiastków w materiale biologicznym metodą mikroanalizy rentgenowskiej. *Wiad Bot* 1995; **39**: 21–30.
- [10] COOPER RM, RESENCE MLV, FLOOD J, ROWAN MG, BEALE MH, POTTER U. Detection and cellular localization of elemental sulphur in disease-resistant genotypes of *Theobroma cacao*. *Nature* 1996; **379**: 159–162.
- [11] DANSCHER G. Histochemical demonstration of heavy metals. *Histochemistry* 1981; **71**: 1–16.
- [12] DOLAN SP. Rapid abrasion test to indicate lead on the surface of ceramicware. *J ADAC Int* 1994; **77**: 718–722.
- [13] DOOR R, BREITIG D, MARTIN R. Videodensitometric analysis of electron spectroscopic micrographs – a tool for detection of biologically relevant elements with high resolution. *J Microsc* 1997; **187**: 170–183.
- [14] EBBINGHAUSE E, KREEB KH, WEINMANNKREEB R. Gis supported monitoring long-termed urban trace element load with bark of *Aesculus hippocastanum* L. *J Appl Bot – Angewandte Botanik* 1997; **71**: 205–211.
- [15] ERNST WHO, VERKLEIJ JAC, SCHAT. Metal tolerance in plants. *Acta Bot Netherl* 1992; **41**: 229–249.
- [16] FORSLIND B, LINDBERG M, ROOMANS GM, PALLON J, ERNER-LINDE Y. Aspects on the physiology of human skin: studies using particle probe analysis. *Microsc Res Tech* 1997; **38**: 373–386.
- [17] FOX CL, JUAN J, ALBERT RM. Phytolith analysis on dental calculus, enamel surface, and burial soil: information about diet and paleoenvironment. *Am J Phys Anthropol* 1996; **101**: 101–113.
- [18] FREY B, BRUNNER I, WALTHER P, SCHEIDEGGER C, ZIEROLD K. Element localization in ultrathin cryosections of high-pressure frozen ectomycorrhizal spruce roots. *Plant Cell Environ* 1997; **20**: 929–937.

- [19] FREY B, SCHEIDEGGER C, GUNTARDTGOERG MS, MATYSSEK R. The effects of ozone and nutrient supply on stomatal response in birch (*Betula pendula*) leaves as determined by digital as image-analysis and X-ray microanalysis. *New Phytologist* 1996; **132**: 135–143.
- [20] GLATER RA, HERNANDEZ L. Lead detection in living plant tissue using a new histochemical method. *J Air Pollut Control Assoc* 1972; **22**: 463–467.
- [21] GODBOLD DL, JENTSCHKE G. Aluminium accumulation in root cell walls coincides with inhibition of root growth but not with inhibition of magnesium uptake in Norway spruce. *Physiol Plant* 1998; **102**: 553–560.
- [22] GÓRSKA-BRYLASS A, BUTOWT R, RODRIGUEZGARCIA MI. Distribution of loosely-bound calcium in the vegetative and generative cells of the pollen grains in *Chlorophytum elatum*. *Biol Plant* 1998; **40**: 169–181.
- [23] GUCCI R, ARONNE G, LOMBARDINI L, TATTINI M. Salinity tolerance in *Phillyrea* species. *New Phytologist* 1997; **135**: 227–234.
- [24] HAMMETT FS. Studies in the biology of metals. The retardative influence of lead on root growth. *Protoplasma* 1928; **4**: 187–186.
- [25] HIPPE SANWALD S. Impact of freeze substitution on biological electron microscopy. *Microsc Res Tech* 1993; **24**: 400–422.
- [26] HODSON MJ. Ion localization and X-ray microanalysis. *Methods Cell Biol* 1995; **49**: 21–31.
- [27] IANCU TC, PERL DP, STERNLIEB I, LERNER A, LESHINSKY E, KOLODNY EH, HSU A. The application of laser microprobe mass analysis to the study of biological material. *Biometals* 1996; **9**: 57–65.
- [28] IWATA Y. Particle Induced X-ray Emission (PIXE) for analysis of trace elements in biological materials. *Nippon-Rinsho* 1996; **54**: 221–227.
- [29] JEANGUILLAUME C, TENCE M, ZHANG L, BALLONGUE P. Practical aspects of electron energy loss spectroscopy (EELS) in biology. *Cell Moll Biol Noisy-le-grand* 1996; **42**: 439–450.
- [30] JIN L, MURAKAMI TH, JANJUA NA, ITANO T. Histochemical demonstration of heavy metals in mouse skin. *Acta Histochem* 1995; **97**: 383–388.
- [31] KLASS S, WOHLER I, BUTTNER G. Initial effects of a NPK fertilization on the amount and distribution of nutrients in beech leaves. *Allg Forst Jagdz* 1997; **168**: 162–166.
- [32] KOCJAN G, SAMARDAKIEWICZ S, WOŹNY A. Regions of lead uptake in *Lemna minor* plants and localization of this metal within selected parts of the roots. *Biol Plant* 1996; **38**: 107–117.
- [33] KOMATSU K, IIDA K, CAI SQ, MIKAGE M, YOSHIZAWA T. Pharmacognostical studies on *Adiantum* plants. V. Classification based on spore morphology and distributional patterns of silicon and calcium in the ultimate pinnules. *Yakugaku Zasshi* 1996; **116**: 125–137.
- [34] KOYRO HW. Ultrastructural and physiological changes in root cells of *Sorghum* plants (*Sorghum bicolor* × *S. Sudanensis* cv. *Sweet Sioux*) induced by NaCl. *J Exp Bot* 1997; **48**: 693–706.
- [35] KORTJE KH. Image-EELS: a synthesis of energy-loss analysis and imaging. *Scanning Microsc Suppl* 1994; **8**: 277–287.
- [36] KOZIK M. Zastosowanie analizy laserowej w histochemii. [w] Krygier-Stojałowska A, Godlewski H. [red.] Topochemiczne metody badań komórek i tkanek. Warszawa, PWN 1982: 261–276.
- [37] LANDOLT E, KANDLER R. Physiological characteristic. [w] Landolt E, Kandler R [red.] The family *Lemnaceae* – a monographic study Vol. 2. Zürich: Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes der ETH, Stiftung Rübel 1987: 58–361.
- [38] LEAPMAN RD, SUN SQ, HUNT JA, ANDREWS SB. Biological electron energy loss spectroscopy in the field-emission scanning transmission electron microscope. *Scanning Microsc Suppl* 1994; **8**: 245–258.
- [39] LEVITT J. Responses of plants to environmental stress. Vol 2, 2-nd ed. New York: Academic Press 1980.

- [40] LEYVAL C, TURNAU K, HASELWANDTER K. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* 1997; **7**: 139–153.
- [41] LICHTENBERGER O, NEUMANN D. Analytical electron microscopy as a powerful tool in plant cell biology: examples using electron energy loss spectroscopy and X-ray microanalysis. *Europ J Cell Biol* 1997; **73**: 378–386.
- [42] MARIENFELD S, LEHMANN H, STELZER R. Ultrastructural investigations and EDX-analyses of Al-treated oat (*Avena sativa*) roots. [w] R.A. Date plant soil interactions at low pH. Netherlands: Kluwer Academic Publishers 1995; 333–339.
- [43] MARIENFELD S, STELZER R. X-ray microanalyses in roots of Al-treated *Avena sativa* plants. *J Plant Physiol* 1993; **141**: 569–573.
- [44] MARIENFELD S, LEHMANN H, STELZER R. Ultrastructural investigations and EDX-analyses of Al-treated oat (*Avena sativa*) roots. *Plant Soil* 1995; **171**: 167–173.
- [45] MAZEN AMA, ELMAGHRABY OMO. Accumulation of cadmium, lead and strontium, and a role of calcium oxalate in water hyacinth tolerance. *Biol Plant* 1998; **40**: 411–417.
- [46] MIYAUCHI H, KUMIHASHI M, SHIBAYAMA T. The contribution of trace elements from smokeless powder to post-firing residues. *J Forensic Sci* 1998; **43**: 90–96.
- [47] NASSIRI Y, MANSOT JL, WERY J, GINSBURGER-VOGEL T, AMIARD JC. Ultrastructural and electron energy loss spectroscopy studies of sequestration mechanisms of Cd and Cu in the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Arch Environ Contam Toxicol* 1997; **33**: 147–155.
- [48] NEUMANN D, NIEDEN U, LICHTENBERGER O, LEOPOLD I. How does *Armoreria maritima* tolerate high heavy metal concentrations? *J Plant Physiol* 1995; **146**: 704–717.
- [49] NEUMANN D, NIEDEN U, SCHWIEGER W, LEOPOLD I, LICHTENBERGER O. Heavy metal tolerance of *Minuartia verna*. *J Plant Physiol* 1997; **151**: 101–108.
- [50] NEWBURY DE, SWYT CR, MYKLEBUST RL. „Standardless” quantitative electron probe microanalysis with energy-dispersive X-ray spectrometry: is it worth the risk? *Anal Chem* 1995; **67**: 1866–1871.
- [51] NIKI T, THOMAS L, ROST TL, GLADISH DK. Regeneration of tissue following cavity formation in the vascular cylinders of *Pisum sativum* (*Fabaceae*) primary roots. *Am J Bot* 1998; **85**: 17–24.
- [52] OLABANJI SO, MAKANJU OV, CECCATO D, BUOSO MC, HAQUE AMI, CHERUBINI R, MOSHINI G. PIGE-PIXE analysis of medicinal plants and vegetables of pharmacological importance. *Biol Trace Elem Res* 1997; **58**: 223–236.
- [53] OPHUS EM, GULLVAG BM. Localization of lead within leaf cells of *Rhytidadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst. by means of transmission electron microscopy and X-ray microanalysis. *Cytobios* 1974; **10**: 45–58.
- [54] PALUSZKIEWICZ C, GALKA M, KWIATEK W, PARCZEWSKI A, WALAS S. Renal stone studies using vibrational spectroscopy and trace element analysis. *Biospectroscopy* 1997; **3**: 403–407.
- [55] PANCIERA MT, KRAUSE CR. Effects of chemical drying agents on the fine structure of alfalfa cuticles and epicuticular waxes. *Crop Sci* 1997; **37**: 1292–1296.
- [56] PAWLICKI R, NOWOGRODZKA-ZAGÓRSKA M. Blood vessels and red blood cells preserved in dinosaur bones. *Anat Anz* 1998; **180**: 73–77.
- [57] PIKULIKOVA A, BUMBALOVA A, KOMOVA M. Determination of Mn, Fe, Cu, Zn, Pb and Hg levels in herbal drugs using the radionuclide X-ray fluorescence method. *Ceska Slov Farm* 1994; **43**: 160–162.
- [58] PILCH J, GIEREK T, LASKAWIEC J, GRZYBEK H. Zastosowanie metod mikroanalizy rentgenowskiej i mikroskopii transmisyjnej do badań składu chemicznego i ultrastruktury w mikroobszarach tkanek stanów przedrakowych krtani. *Otolaryngol Pol* 1996; **50**: 471–478.

- [59] PRZEŁĘCKA A, ALLAKHVERDOV BŁ, GŁOWACKA SK, POGORELOV AG. Ultracytochemical localization and microprobe quantitation of calcium stores in the insect oocyte. *Histochemistry* 1986; **85**: 163–168.
- [60] PUNZ WF, SIEGHARDT H. The respons of roots of herbaceous plant species to heavy metals. *Environ Exp Bot* 1993; **33**: 85–98.
- [61] RAUTIO P, HUTTUNEN S, LAMPPU J. Element concentrations in Scots pine needles on radial transects across a subarctic area. *Water Air Soil Pollut* 1998; **102**: 389–405.
- [62] RECZYŃSKI W, BOCHNIA T. Metoda atomowej spektroskopii absorbcyjnej i jej zastosowanie w fizjologii roślin. *Wiad Bot* 1990; **34**: 37–45.
- [63] ROSEN JF. Clinical applications of L-line X-ray fluorescence to estimate bone lead values in lead-poisoned young children and in children, teenagers, and adults from lead-exposed and non-lead-exposed suburban communities in the United States. *Toxicol Ind Health* 1997; **13**: 211–218.
- [64] ROSOŁOWSKI S. Reakcje charakterystyczne kationu Pb^{2+} . [w] Sobczak J. [red.] Analiza jakościowa – pracownia chemii analitycznej. Warszawa, Wyd. Szkolne i Pedagogiczne 1990; 50–54.
- [65] SAMARDAKIEWICZ S, IDZIKOWSKA K, WOŹNY A. Confirmation by X-ray microanalysis a barrier role of endodermis in lead transport in *Lemna minor* L. *Biol Bull Poznań* 1997; **34** (Suppl.): 51–52.
- [66] SAMARDAKIEWICZ S, STRAWIŃSKI P, WOŹNY A. The influence of lead on callose formation in roots of *Lemna minor* L. *Biol Plant* 1996; **38**: 463–467.
- [67] SCHOFIELD RMS, PALLON J, FISKESJO G, KARLSSON G, MALMQVIST KG. Aluminium and calcium distribution patterns in aluminium-intoxicated roots of *Allium cepa* do not support the calcium-displacement hypothesis and indicate signal-mediated inhibition of root growth. *Planta* 1998; **205**: 175–180.
- [68] SHI S, SUN S, ANDREWS SB, LEAPMAN RD. Thickness measurement of hydrated cryosections by EELS. *Microsc Res Tech* 1996; **33**: 241–250.
- [69] SIEPAK J. Spetiation analysis of selected metals in environmental samples. *Biol Bull Poznań* 1996; **33**(Suppl.): 60.
- [70] SIT KH, PARAMANANTHAM R, BAY BH, CHAN HL, WONG KP, THONG P, WATT F. Sequestration of mitotic (M-phase) chromosomes in autophagosomes: mitotic programmed cell death in human Chang liver cells induced by an OH^* burst from vanadyl. *Anat Rec* 1996; **245**: 1–8.
- [71] SUTCLIFFE JF. A review of in vivo experimental methods to determine the composition of the human body. *Phys Med Biol* 1996; **41**: 791–833.
- [72] SPURR AR. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res* 1969; **26**: 31–43.
- [73] SZOKEFALVI-NAGY Z. Applications of PIXE in the life sciences. *Biol Trace Elem Res* 1994; **43-45**: 73–78.
- [74] THONG PS, MAKJANIC J, WATT F. A review of nuclear microscopy and applications in medicine. *Singapore Med. J* 1996; **37**: 527–531.
- [75] TUNG G, TEMPLE PJ. Histochemical detection of lead in plant tissues. *Environ Toxicol Chem* 1996; **15**: 906–914.
- [76] TUNG G, TEMPLE PJ. Uptake and localization of lead in corn (*Zea mays* L.) seedlings, a study by histochemical and electron microscopy. *Sci Total Environ* 1996; **188**: 71–85.
- [77] VAN STEVENINCK RFM, VAN STEVENINCK ME. Microanalysis. [w] Hall JL, Hawes C [red.] Electron microscopy of plant cells. London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press 1991; 415–455.
- [78] VAN STEVENINCK RFM, VAN STEVENINCK ME, WELLS AJ, FERNANDO DR. Zinc tolerance and the binding of zinc as zinc phytate in *Lemna minor*. X-Ray Microanalytical Evidence. *Plant Physiol* 1990; **137**: 140–146.

- [79] VAZQUEZEZ MD, POSCHENRIEDER CH, BARCELO J, BAKER AJM, HATTON P, COPE GH. Compartmentation of Zinc in Roots and Leaves of the Zinc Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* J & C Presl. *Bot Acta* 1994; **107**: 187–270.
- [80] VECCHI R, VALLI G, MARIANI A. Energy-dispersive X-ray fluorescence analysis applied to biomonitoring on Alps. *Biol Trace Elem Res* 1994; **43–45**: 223–228.
- [81] WADA T, LOTT JNA. Light and electron microscopic and energy dispersive X-ray microanalysis studies of globoids in protein bodies of embryo tissues and the aleurone layer of rice (*Oryza sativa* L.) grains. *Can J Bot* 1997; **75**: 1137–1147.
- [82] WHITE SL, WISE RR. Anatomy and ultrastructure of *Wolffia columbiana* and *Wolffia borealis*, two nonvascular aquatic angiosperms. *Int J Plant Sci* 1998; **159**: 297–304.
- [83] WIERZBICKA M. Lead translocation and localization in *Allium cepa* roots. *Can J Bot* 1987; **65**: 1851–1860.
- [84] WONG SL, NAKAMOTO L, WAINWRIGHT JF. Detection of toxic organometallic complexes in wastewaters using algal assays. *Arch Environ Contam Toxicol* 1997; **32**: 358–366.
- [85] WOŹNY A, GRONIKOWSKA G, RACHWAŁ L. The effect of metalliferous dust from a copper smelter on the morphological and ultrastructural changes of two selected poplar hybrids. *Arboretum Kórnickie* 1992; **37**: 84–99.
- [86] WOŹNY A, IDZIKOWSKA K, SAMARDAKIEWICZ S. Ołów a ultrastruktura komórki. [w] Woźny A [red.] Ołów w komórkach roślinnych: pobieranie, reakcje, odporność. Poznań: Wyd. Sorus 1996: 39–48.
- [87] WOŹNY A, KRZESŁOWSKA M., TOMASZEWSKA B. Odporność na ołów. [w] Woźny A [red.] Ołów w komórkach roślinnych: pobieranie, reakcje, odporność. Poznań: Wyd. Sorus 1996: 93–110.
- [88] WOŹNY A, MANIKOWSKA M. The toxic effect of lead on the *Lemna minor* L. *Bull Soc Amis Sci Lettr Poznań Ser D*, 1990; **28**: 59–63.
- [89] XIE X, YOKEL RA, MARKESBERY WR. Application of electron energy loss spectroscopy and electron spectroscopic imaging to aluminium determination in biological tissue. *Biol Trace Elem Res* 1994; **41**: 201.
- [90] YUAN XM, ANDERS WL, OLSSON AG, BRUNK UT. Iron in human atheroma and LDL oxidation by macrophages following erythrophagocytosis. *Atherosclerosis* 1996; **124**: 61–73.

Redaktor prowadzący – Jan Michejda

Otrzymano: 01.06 1998 r.

Przyjęto: 30.09. 1998 r.

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

BUDOWA, WŁAŚCIWOŚCI I MECHANIZM DZIAŁANIA KRYPTOCHROMÓW – EUKARIOTYCZNYCH FOTORECEPTORÓW ŚWIATŁA NIEBIESKIEGO*

STRUCTURE, PROPERTIES AND MECHANISM OF ACTION OF THE CRYPTOCHROMES – THE BLUE-LIGHT PHOTORECEPTORS OF EUKARYOTA

Andrzej TRETYN^{1,2}, Justyna WIŚNIEWSKA¹

¹Zakład Fizjologii i Morfogenezy Roślin, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń, ²Zakład Biologii Komórki,
Akademia Rolniczo-Techniczna im. M. Oczapowskiego, Kortowo-Olsztyn

Streszczenie: Kryptochromy (1 i 2) to grupa barwników pochłaniających światło niebieskie i bliski ultrafiolet. Ich 60–70 kDa część białkowa wykazuje dużą homologię do fotoliaz – enzymów uczestniczących w procesie naprawy DNA. Podobnie jak fotolazy również kryptochromy mają dwie grupy chromoformowe: FAD i pterynę. Jak wykazano, kryptochrom 1 kontroluje wiele zależnych od światła niebieskiego i ultrafioletowego procesów, między innymi wpływa hamująco na wydłużanie hypokotyli i ogonków liściowych, natomiast indukuje syntezę antocyjanów, proces kwitnienia i ekspresję pewnych genów. Z drugiej strony kryptochrom 2 kontroluje proces fotoperiodycznej indukcji kwitnienia oraz oddziałuje na endogenny zegar biologiczny. Obydwa typy kryptochromów regulują fototropizm rzodkiewnika. Ostatnio geny kodujące kryptochrom 1 i 2 oraz ich białkowe produkty zostały wykryte w tkankach zwierzęcych. U myszy najwyższy poziom ekspresji tych genów obserwowano w wewnętrznej warstwie siatkówki. Ponadto wykazano, że ekspresja kryptochromu 1 ulega okołodobowym oscylacjom w tej części podwzgórza, które odpowiada za funkcjonowanie zegara biologicznego. Na tej podstawie sugeruje się, że zarówno u roślin, jak i u zwierząt kryptochromy zaangażowane są w zjawisko fotoperiodyzmu i działanie zegarów biologicznych.

Słowa kluczowe: ekspresja genów, fitochrom, kryptochrom, zegar biologiczny.

Summary: Cryptochromes (1 and 2), the blue-ultraviolet A light receptors are 60–70 kDa proteins with high degree of both DNA and aminoacid homologies to DNA photolyases – the light-activated repair

*Praca ta powstała w trakcie realizacji badań finansowanych przez Unię Europejską (INCO-Copernicus Programme, Grant IC 15-CT96-0920) oraz Uniwersytet im. M. Kopernika (Grant JM Rektora UMK).

enzymes. Like photolyases, cryptochromes contain FAD and a pterine as chromophore groups. However, they do not possess DNA repair activity. Cryptochrome 1 has been shown to mediate different blue light responses, including inhibition of hypocotyl and petiole elongation, stimulation of anthocyanin accumulation and flowering process, as well as expression of blue light regulated genes. On the other hand cryptochrome 2 seems to be involved in regulation of flowering time, as well as in entraining circadian rhythms in *Arabidopsis*. Both types of the pigment are involved in phototropism. Cryptochrome 1 and 2 have been recently discovered in animal tissues too, especially, in the inner layer of mouse retina. It was shown that the expression of cryptochrome 1 gene in the suprachiasmatic nucleus oscillated in a circadian manner. It is proposed that cryptochromes may be involved in setting of the circadian clock in both, plants and animals.

Key words: cryptochrome, phytochrome, gene expression, circadian clock.

WSTĘP

Indukowane przez światło procesy wzrostu i rozwoju roślin (tzw. fotomorfogeneza) regulowane są przez fotoreceptory pochłaniające bliski ultrafiolet (UV-A), światło niebieskie oraz światło czerwone i daleką czerwień. Zarówno budowa, jak i mechanizm działania fitochromu (barwnika pochłaniającego dwie ostatnie z wymienionych długości fal świetlnych) zostały wcześniej przez nas opisane [40, 41, 42]. Do tej pory mało było wiadomo o kryptochromie, fotoreceptorze absorbującym niebieski zakres widma słonecznego [40]. Historię badań nad tym fotomorfogenetycznym barwnikiem można podzielić na dwa okresy: przed i po 1993 roku. Wiedza, jaka była dostępna na temat kryptochromu przed 1993 rokiem, została omówiona w artykułach Gallanda [18], Kaufmana [24] oraz Short i Briggsa [38]. Z szeregu prac przeglądowych, które ukazały się po tym okresie, można polecić publikację Ninnemanna [33], Whitelama [46], Ahmad i Cashmore'a [2] oraz Cashmore'a [13].

ODKRYCIE KRYPTOCHROMU

Od kilkudziesięciu lat opisywano wpływ światła niebieskiego na ekspresję genów, aktywność enzymów, wzrost i rozwój roślin [11, 18, 19, 24, 38]. Już w zeszłym stuleciu K. Darwin stwierdził, że światło niebieskie indukuje reakcje fototropiczne u roślin. Później okazało się, że odpowiada ono za indukcję syntezy antocyjanin, otwieranie się aparatów szparkowych, hamowanie wzrostu wydłużeniowego roślin. Przyjmowano, że wszystkie te procesy regulowane są przez specyficzny fotoreceptor absorbujący niebieski zakres widma słonecznego. Ze względu na powszechne występowanie reakcji indukowanych przez tę barwę światła u roślin krytogamicznych (skrytopłciowych) oraz tajemniczy (ang. *cryptic*) charakter tego fotoreceptora nazywano go kryptochromem [19].

Przed rokiem 1993, na podstawie szerokiej wiedzy dotyczącej molekularnej budowy fitochromu spekulowano, że również kryptochrom zbudowany jest z części białkowej i grupy chromoforowej. Przez wiele lat nikomu nie udało się jednak

wyzolować i oczyścić cząsteczek tego barwnika, a zatem nic nie można było powiedzieć na temat budowy jego apoproteiny. Natomiast o naturze grupy chromoforowej wnioskowano na podstawie analizy widm czynnościowych (rozkładu barw światła indukujących określony proces biologiczny). Przypuszczano, że ma ona strukturę zbliżoną do flawin lub karotenoidów [11, 21, 38].

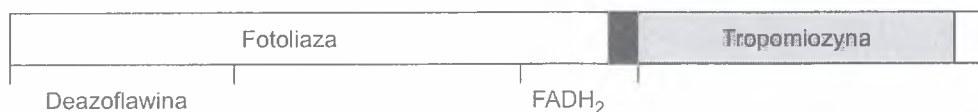
Przełomowym odkryciem w badaniach nad kryptochromem było dokonanie molekularnej charakterystyki mutanta rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) upośledzonego w reakcjach na światło niebieskie. Jednym z najłatwiej dostrzegalnych efektów oddziaływania tej barwy światła na rośliny wyższe jest szybkie zahamowanie ich wzrostu. Tego efektu nie obserwowano u mutantu *hy4* (od ang. *hypocotyl*) [24]. Wykazywał on normalne reakcje na ciągłe światło czerwone i dalekiej czerwieni (absorbowane przez fitochrom), podczas gdy hypokotyle kilkudniowych siewek roślin typu dzikiego (WT) były znacznie krótsze od siewek badanego mutantu, rosnących na ciągłym świetle niebieskim [1]. Podobny efekt uzyskano u części mutantów otrzymanych w wyniku traktowania nasion *A. thaliana* za pomocą T-DNA wyizolowanego z bakterii *Agrobacterium tumefaciens*. Pozwoliło to na odszukanie genu, do którego zostało włączone T-DNA, a następnie jego sklonowanie.

MOLEKULARNA BUDOWA KRYPTOCHROMU

Zbudowany z trzech intronów i czterech eksonów gen *HY4* koduje białko CRY1 składające się z 681 reszt aminokwasowych o łącznej masie cząsteczkowej wynoszącej 75,8 kDa [1]. Białko to ma bardzo nietypowe właściwości. Jego N-końcowa domena wykazuje wysoki stopień homologii do bakteryjnych fotoliaz (patrz poniżej). Z drugiej strony fragment C-końcowy swą budową zbliżony jest do zwierzęcej tropomiozyny (białka kurczliwego). Między obiema domenami występuje odcinek łącznikowy, nie wykazujący podobieństwa do dotąd znanych polipeptydów (rys. 1). Analiza pierwszorzędowej struktury CRY1 wykazała brak w nim potencjalnych odcinków transbłonowych [1].

Posługując się techniką *Northern blot* stwierdzono, że *HY4* mRNA ulega równomiernej akumulacji w pędach, liściach, elementach kwiatów i korzeniach dzikich form rzodkiewnika. Poziom tego transkryptu był podobny w liściach roślin zarówno etiolowanych, rosnących na ciągłym świetle białym, jak i poddanych tzw. ciemniowej adaptacji [1].

Ustalono, że kryptochrom I (CryI) jest białkiem rozpuszczalnym, mającym dwie grupy chromoformowe [26]. Zgodnie z wcześniejszymi przypuszczeniami pierwsza z nich to flawina, która może występować w formie utlenionej (FAD) oraz częściowo (FADH[•]) lub w pełni zredukowanej (FADH₂) [28]. Badania wykazały, że związana z białkiem CRY1 flawina może również funkcjonować w stosunkowo stabilnej formie semichinonowej (FAD^{•-}), która ma zdolność pochłaniania światła zielonego [13, 28].



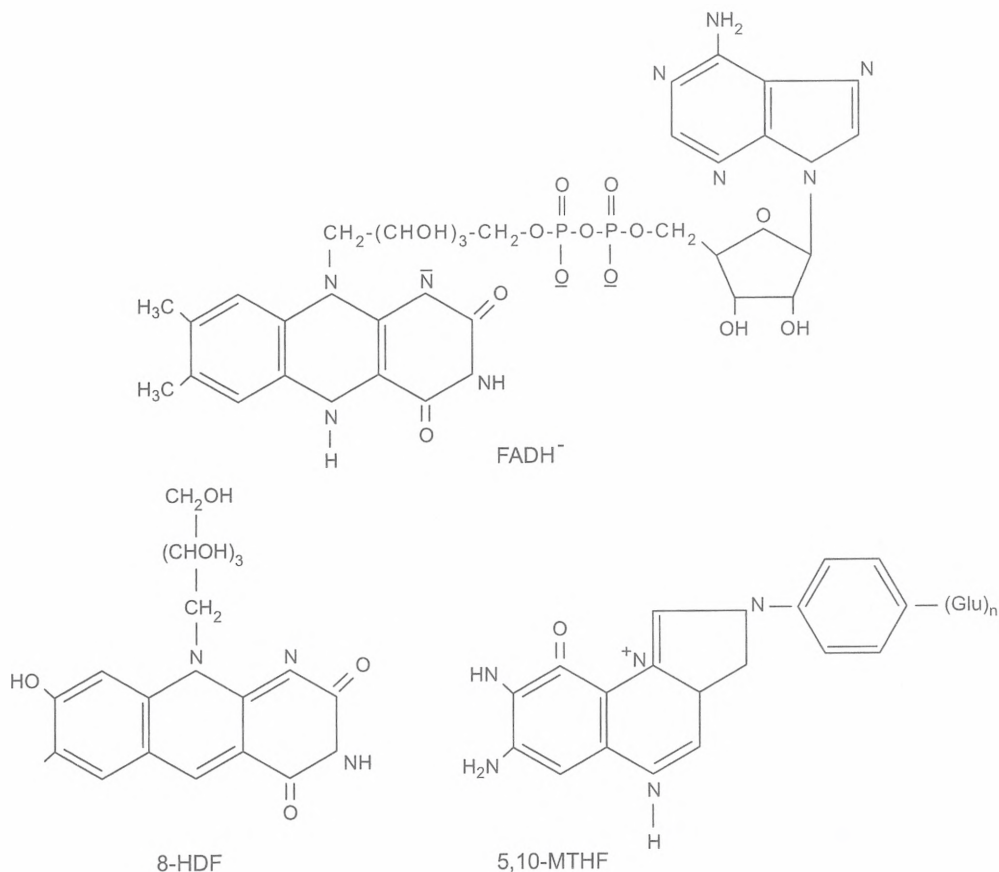
RYSUNEK 1. Domenna budowa białkowego składnika (CRY1) kryptochromu i rzodkiewnika, dalszy opis w tekście (na podstawie [1] zmodyfikowane)

Druga grupa chromoformowa kryptochromu działa jak antena zbierająca elektrony. Jej widmo adsorpcyjne rzutuje na widmo czynnościowe barwnika. W przypadku Cry1 rzodkiewnika jest to pochłaniająca światło głównie niebieskie deazoflawina [1, 13, 28]. Budowę chemiczną obu grup chromoformowych kryptochromu przedstawiono na rysunku 2.

Tego samego roku co Ahmad i Cashmore [1] również Batschauer [9] sklonował gen kodujący u gorczycy (*Sinapis alba*) białko wykazujące właściwości fotoreceptora światła niebieskiego. Na bazie tego genu (oznaczony jako *SA-PHR1*) powstaje polipeptyd (w którego skład wchodzi 501 reszt aminokwasowych o łącznej masie 57 kDa), o właściwościach zbliżonych do fotoliaz bakterii i grzybów. Porównując pierwszorzędowną strukturę wszystkich 8 w tym czasie znanych fotoliaz organizmów niższych oraz pierwszej zidentyfikowanej u gorczycy okazało się, że ich N-końcowe fragmenty wykazują wysoki, bo prawie 78% stopień homologii [9].

Analizując wyniki uzyskane przez Ahmad i Cashmore'a [1] oraz Batschauera [9] można zauważyć, że choć zidentyfikowane przez nich geny kodują białka o podobnej budowie molekularnej podlegają one odmiennej regulacji. Gen *HY4* ulega równomiernej ekspresji, na którą nie mają wpływu warunki świetlne otoczenia [1]. Natomiast gen *SA-phr1* gorczycy ulega wybiórczej ekspresji w liściach (brak jej w tkankach korzeni), a ponadto poziom jego aktywności regulowany jest przez światło [9]. Poza genem *HY4* (*CRY1*), kodującym białkowy składnik kryptochromu typu CRY1, ostatnio Lin i inni [28] sklonowali gen, którego produkt wchodzi w skład drugiego typu tego fotoreceptora. Do jego wykrycia doszło w wyniku przeszukiwania sondą zawierającą fragment genu *CRY1* (*HY4*) biblioteki cDNA uzyskanej z siewek *A. thaliana*. Po izolacji i zsekwencjonowaniu nowego genu kryptochromowego (*CRY2*) stwierdzono, że jego białkowy produkt wykazuje 52% stopień identyczności składu aminokwasów w stosunku do CRY1 [29]. Duża homologia między tymi fotoreceptorami jest zauważalna w N-końcowych fragmentach ich polipeptydów. Natomiast w przypadku końca C stopień ich podobieństwa wynosi jedynie 14% [29]. Stosując przeciwciała poliklonalne skierowane przeciw CRY1 stwierdzono, że CRY2 jest białkiem rozpuszczalnym, występującym we wszystkich organach i tkankach rzodkiewnika [31].

Zasadnicza różnica pomiędzy Cry1 i Cry2 dotyczy mechanizmu regulacji ekspresji kodujących je genów. Jak już pisano powyżej, na ekspresję genu *CRY1* nie mają



RYSUNEK 2. Budowa chemiczna podstawowych grup chromoforowych fotoliaz bakterii: fotoliazы pierwszego typu zawierają FADH- oraz 5,10-MTHF (5,10-metylnyl-tetrahydropteroylpoliglutaminian), natomiast fotoliazы drugiego typu zawierają FADH- i 8-HDF (8-hydroksy-7,8-didemetyl-5-deazoryboflawina) (na podstawie [34], zmodyfikowane)

wpływu warunki świetlne otoczenia. W przeciwieństwie do niego, poziom CRY2 spadał dramatycznie, gdy etiolowane siewki rzodkiewnika poddawano działaniu światła niebieskiego. Podobny wpływ na ekspresję CRY2 wywierały bliski ultrafiolet i światło zielone [31]. Degradacja Cry2 jest bardzo szybka, gdyż w ciągu godziny od zakończenia naświetlenia etiolowanych siewek rzodkiewnika światłem niebieskim rejestruje się znikomy poziom białkowego składnika tego fotoreceptora. Jednakże spadek poziomu CRY2 nie jest spowodowany obniżeniem ilości CRY2 mRNA ani przyspieszeniem tempa jego degradacji [31]. Poza dwoma wymienionymi genami kryptochromowymi u rzodkiewnika może funkcjonować jeszcze jeden, nazwany PHH1 (od PHR homolog) [22]. Odkryto go przeszukując bibliotekę cDNA tej rośliny za pomocą sondy sporządzonej na podstawie sekwencji występujących w genie kryptochromowym gorczyicy (SA-PHR1). Okazało się, że produkt tego

genu w 99,3% jest identyczny z białkiem kodowanym przez *CRY2* [29]. Różnica między oboma genami może polegać na odmiennej budowie niepodlegających translacji ich odcinków 5' i 3' [22]. Nie wykluczone jednak, że *CRY2* i *PHH1* kodują ten sam typ kryptochromu 2 [29].

Poza rzodkiewnikiem i gorczycą gen kodujący białkowy składnik kryptochromu wykryto i sklonowano również u jednokomórkowego glonu *Chlamydomonas reinhardtii* [37]. Na bazie funkcjonującego u tej zielenicy genu *CPH1* powstaje polipeptyd zbudowany z 867 reszt aminokwasowych. Pierwszych pięćset aminokwasów końca N omawianego białka wykazuje wysoki stopień podobieństwa do *CRY1* i fotoliaz bakteryjnych [36]. Natomiast C-końcowa domena, zbudowana z 367 reszt aminokwasowych jest znacznie dłuższa (o 167 reszt) od występującej w *CRY1* i wykazuje w stosunku do niej bardzo niski stopień podobieństwa [37].

U paproci *Adiantum capillus-veneris* odkryto aż pięć genów, które mogą kodować białko o właściwościach zbliżonych do fotoliaz i kryptochromu [13]. Poszczególne typy tych białek mogą wyróżniać się odmienną lokalizacją komórkową. Zlokalizowane wewnątrz jądra kryptochromy mogą brać udział w kontroli podziałów komórkowych. Natomiast barwniki związane z błoną komórkową mogą regulować zależne od światła niebieskiego ruchy chloroplastów [13]. Poza roślinami wyższymi ultrafiolet i światło niebieskie wywierają bardzo silny wpływ na wzrost i rozwój grzybów. Mimo zakrojonych na dużą skalę poszukiwań, jak dotąd nie udało się zidentyfikować genów kodujących fotoreceptor światła niebieskiego dla tej grupy organizmów [21].

MECHANIZM DZIAŁANIA KRYPTOCHROMU

Choć badania nad mechanizmem działania fotoreceptorów pochłaniających światło niebieskie i ultrafioletowe trwają od kilkudziesięciu lat, dopiero poznanie budowy molekularnej kryptochromu otworzyło nowe perspektywy dla ich kontynuacji. Szerokie stosowanie mutantów pozbawionych funkcjonalnych cząsteczek tego barwnika oraz uzyskiwanie transgenicznych roślin, charakteryzujących się nadekspresją genów kodujących jego białkowe składniki umożliwiły określanie molekularnych podstaw działania kryptochromu [5, 7, 10]. Nim przejdziemy do omawiania wiadomości na temat mechanizmu działania kryptochromu u roślin wyższych, warto zastanowić się nad możliwością działania tego barwnika jako typowej fotoliaz.

CZY KRYPTOCHROM JEST FOTOLIAZA?

Zważywszy, że wszystkie dotąd opisane kryptochromy są budową molekularną i obecnością grup chromoforowych przypominają bakteryjne fotoliaz, należało rozstrzygnąć, czy pełnią one podobne funkcje w procesach naprawczych DNA.

Powszechnie wiadomo, że krótkofalowe światło ultrafioletowe (UV-C, <320 nm) wywiera szkodliwy wpływ na wszystkie organizmy żywe. Spowodowane jest to wybiórczą absorpcją tej części widma słonecznego przez cząsteczki DNA, czemu towarzyszy pojawianie się zamiast nukleotydów pirymidynowych ich dimerów [35]. Akumulacja tych dimerów w DNA prowadzi do śmierci komórek. Ten szkodliwy wpływ dalekiego ultrafioletu ograniczany jest w wyniku równoległego działania bliskiego ultrafioletu (320–400 nm) oraz światła niebieskiego (400–500 nm). Te barwy światła, wykorzystywane w procesie zwanym fotoreaktywacją, absorbowane są przez fotolizy – grupę enzymów biorących udział w procesach naprawczych DNA. Pełnią one zarówno funkcję biokatalizatorów, jak i receptorów promieniowania krótkofalowego, których energia wykorzystywana jest do podtrzymywania aktywności biologicznej enzymów [36].

Poza częścią białkową (apoproteinową) fotolizy mają dwie grupy chromoforowe, które w sposób niekowalencyjny przyłączone są do łańcucha polipeptydowego. Ze względu na widmo absorpcyjne omawiane enzymy podzielić można na trzy typy [36]. Fotolizy pierwszego i drugiego typu pochłaniają światło odpowiednio w zakresie 350–370 i 450 nm. Obok nich w komórkach mikroorganizmów funkcjonują fotolizy o cechach pośrednich, wykazujące maksimum absorpcji przy 410 nm. Odmienne właściwości spektralne wymienionych typów fotoliaz są wynikiem obecności różnych grup chromoforowych związanych z N-końcowymi fragmentami ich polipeptydów [30, 36]. Fotolizy pierwszego (krótkofalowe) i pośredniego typu mają jako grupę chromoforową zredukowaną pterynę, natomiast drugiego typu (długofalowe) – deazoryboflawinę lub jej pochodne (rys. 2). Wszystkie poznane dotąd fotolizy jako drugą grupę chromoforową zawierają zredukowaną ryboflawinę (FADH₂), która niekowalencyjnie przyłączona jest do C-końcowej domeny łańcuchów polipeptydowych [30, 36]. Domena ta odpowiada również za wiązanie się enzymu z uszkodzonym DNA i przeprowadzanie reakcji naprawczej [30].

Mechanizm działania fotoliaz polega na pochłanianiu przez pierwszą grupę chromoforową światła o charakterystycznej dla niej barwie, a następnie przekazywania energii fotonów na zredukowaną flawinę. Energia ta wykorzystywana jest przez enzym do rozrywania wiązań powstających między dimerami pirymidynowymi [30, 36].

Po sklonowaniu genów *HY4* [1] u rzodkiewnika oraz *SA-PHR1* u gorczycy [9] porównano je z genami *phr* kodującymi fotolizy mikroorganizmów [30]. Ekspresja obu genów w komórkach *E. coli* pozbawionych aktywności fotoliazowej nie spowodowała jej przywrócenia. Aktywności fotoliazowej nie wykazywały również oczyszczone białka *HY4* (*CRY1*) i *SA-PHR1* w testach prowadzonych *in vitro* [8]. Prawdopodobnie jest to spowodowane brakiem w obu białkach sekwencji aminokwasowych odpowiedzialnych za wiązanie się kryptochromów z cząsteczkami DNA. Jak ustalono, białka *HY4* i *SA-PHR1* mogą wiązać podobne grupy chro-

moforowe – flawinową i deazoflawinową. Na podstawie przeprowadzonych badań można wyciągnąć szereg wniosków [30]. I tak gen *SA-PHR1* u gorczycy nie koduje fotolizy, a cząsteczki fotoreceptora światła niebieskiego (kryptochromu). Cząsteczki kryptochromu funkcjonujące u obu roślin (rzodkiewnika i gorczycy), choć wykazują wysoki stopień homologii do bakteryjnych fotoliz, pozbawione są ich aktywności biologicznej. W związku z tym nie mają one możliwości wiązania się DNA i przeprowadzania reakcji naprawczych. I choć fotolizy mikroorganizmów i receptory światła niebieskiego roślin wyższych mogą wywodzić się od wspólnego pragnu, zmodyfikowane w drodze długotrwałej ewolucji funkcje biologiczne i mechanizm działania ich białkowych produktów wydają się być odmienne [30].

ODBIÓR I PRZEMIESZCZANIE SYGNAŁÓW ŚWIETLNYCH

Absorpcja światła niebieskiego przez kryptochrom przypuszczalnie zapoczątkowuje serię zdarzeń (łańcuch przemieszczania sygnału) prowadzącą do powstania odpowiedzi komórkowych. Jednym z najszybszych procesów indukowanych przez tę barwę światła jest depolaryzacja błon komórkowych w hypokotylach ogórka [39] i rzodkiewnika [15]. Mechanizm działania światła niebieskiego na te organy może polegać na hamowaniu aktywności plazmolekowej H^+ -ATPazy (w trakcie depolaryzacji) oraz stymulacji kanałów jonowych (podczas repolaryzacji). Między depolaryzacją błony komórkowej a zahamowaniem wzrostu wydłużeniowego hypokotyli ogórka rejestrowano jedynie 15 sekund. Wpływ światła niebieskiego na właściwości elektryczne błon komórkowych potwierdzono w doświadczeniach przeprowadzonych na siewkach rzodkiewnika [14, 15]. Naświetlaniu hypokotyli etiolowanych siewek rzodkiewnika światłem niebieskim towarzyszyła przejściowa depolaryzacja błon komórkowych, poprzedzająca szybkie (w ciągu sekund) zahamowanie wzrostu tych organów. Stosując protoplasty izolowane z etiolowanych hypokotyli *A. thaliana* oraz technikę *patch clamp* wykazano, że mechanizm działania światła niebieskiego na rośliny polega na przejściowej aktywacji kanałów chlorokowych [14, 15]. Na obecnym poziomie wiedzy można przypuszczać, że pierwotny mechanizm działania światła niebieskiego na rośliny polega na hamowaniu aktywności pompy protonowej [39] oraz aktywacji kanałów jonowych zarówno anionowych [14, 15], jak i kationowych [39]. Zmiany w składzie jonowym cytoplazmy mogą natomiast prowadzić do indukcji procesów komórkowych, które ujawniają się w dłuższym okresie.

Podobnie jak w przypadku fitochromu [31, 43] przypuszcza się, że absorpcji światła niebieskiego przez kryptochrom towarzyszy aktywacja białek wiążących GTP i wzrost stężenia cytoplazmatycznego Ca^{2+} [24, 38]. Wykazano, że naświetlaniu światłem niebieskim frakcji błon komórkowych uzyskanej z wierzchołków etio-

lowanych pędów grochu towarzyszy szybki (w ciągu 30–60 sekund) wzrost aktywności GTPazy [45]. Po około 3 minutach od zakończenia pulsu światła niebieskiego badana aktywność enzymu wracała do poziomu wyjściowego. Stosując przeciwciała skierowane na dużą podjednostkę α zwierzęcego białka G zidentyfikowano 40 kDa polipeptyd, który w obecności toksyny cholery podlegał zależnej od światła niebieskiego ADP-rybozylacji [45]. Na podstawie tych, jak i innych, nie opisanych tu wyników badań wnioskowano, że wykryte białko stanowi większą podjednostkę białka G, które wchodzi w skład kontrolowanego przez światło niebieskie łańcucha przekazywania sygnału.

Istnieją uzasadnione podstawy, aby sądzić, że aktywacji kryptochromu towarzyszy fosforylacja białek [38]. Stwierdzono, że naświetlaniu pędów etiolowanych siewek grochu światłem niebieskim towarzyszy fosforylacja 120 kDa białka [17]. Polipeptyd ten został zlokalizowany na terenie plazmolemy. Jak wykazano, indukowana przez światło niebieskie fosforylacja białek błonowych może być procesem ogólnym, gdyż dotyczy wszystkich dotąd przebadanych roślin [34]. Zarówno u grochu, jak i u rzodkiewnika katalizowana przez specyficzne kinazy fosforylacja białek występujących w obrębie błony komórkowej może być jednym ze wstępnych elementów indukowanego przez światło niebieskie łańcucha przemieszczania sygnału związanego z procesem fototropizmu [34, 35, 38, 44].

MOLEKULARNE PODSTAWY DZIAŁANIA KRYPTOCHROMU

W celu lepszego poznania funkcji Cry1 do komórek rzodkiewnika i tytoniu wprowadzono gen *HY4* (*CRY1*), a następnie badano efekty jego nadekspresji [27, 29]. Uzyskane transgeniczne rośliny tytoniu fenotypowo nie odbiegały od roślin kontrolnych, gdy kiełkowanie nasion i wzrost siewek odbywały się w ciemności. Również rośliny transformowane i typu dzikiego naświetlane światłem czerwonym lub daleką czerwienią nie różniły się między sobą wyglądem. Jednakże transgeniczne siewki tytoniu były znacznie niższe od kontrolnych, gdy naświetlano je światłem niebieskim, UV-A i zielonym [27]. Zauważono, że poziom odpowiedzi na działanie tych barw światła zależy od zawartości Cry1 w komórkach. Jego podwyższenie powoduje wzrost wrażliwości nie tylko na światło niebieskie, ale również na bliski ultrafiolet i światło zielone [27]. Do podobnych efektów fenotypowych i wzrostu wrażliwości na działanie tych trzech barw światła prowadziło również wprowadzenie do roślin rzodkiewnika dodatkowej kopii genu *CRY2* [29]. Transgeniczne rośliny *A. thaliana*, charakteryzujące się nadekspresją genu *CRY2*, akumulowały znaczne ilości białka *CRY2*, podczas gdy poziom ekspresji genu *CRY1* był podobny jak u roślin kontrolnych [29]. Transgeniczne rośliny rosnące na świetle niebieskim miały krótsze hypokotyle i większe liścienie w porównaniu z WT. Udział Cry2

w regulacji wzrostu hypokotyli został potwierdzony w doświadczeniach przeprowadzonych na mutantach pozbawionych tego białka. Mutanty te (*cry2-1* i *cry2-2*) miały znacznie dłuższe hypokotyle, a ich liścienie otwierały się później niż u roślin kontrolnych, gdy naświetlono je światłem niebieskim o niskim natężeniu. Różnice te nie były jednak dostrzegalne, gdy rośliny kontrolne i mutanty poddawane były wysokim dawkom światła niebieskiego [29].

Doświadczenie przeprowadzone na mutantach *cry2* i roślinach transgenicznych charakteryzujących się nadekspresją *CRY2* wskazują, że produkt tego genu uczestniczy w regulacji procesu deetiolacji [29]. Hipotezę tę potwierdza również fakt, że poziom *CRY2* ulega szybkiemu obniżeniu po kontakcie etiolowanej siewki z światłem niebieskim, ultrafioletowym i zielonym. W warunkach niskiego natężenia tych barw światła deetiolacja wydaje się być kontrolowana przez oba typy kryptochromów rzodkiewnika. Natomiast w środowisku o dużym natężeniu światła, indukującego szybką degradację *CRY2*, główną funkcję w regulacji tego procesu zaczyna pełnić *Cry1* [27, 29].

Jak wykazano ostatnio, dotąd poznane typy kryptochromu biorą udział w regulacji fototropowego wygięcia hypokotyli rzodkiewnika. Fototropowa reakcja obserwowana jest u mutantu *cry1* (*hy4*). Nie stwierdzono jej jednak u podwójnego mutantu *cry1/cry2* [4].

W przypadku obu dotąd sklonowanych genów kryptochromowych rzodkiewnika ich białkowe produkty wykazują dużą homologię w odniesieniu do ich N-końców, w których znajdują się domeny wiążące grupy chromoformowe. Natomiast istnieją zasadnicze różnice w budowie końców C obu tych białek. W związku z tym postanowiono zbadać, jaką aktywność biologiczną będą miały białka hybrydowe, składające się z różnych fragmentów obu kryptochromów [4]. W tym celu do mutantów *hy4* wprowadzono konstrukty kodujące białka *CRY1* i *CRY2* lub składające się z fragmentów kodujących odpowiednio N-koniec kryptochromu 1 oraz domenę C-końcową kryptochromu 2 i *vice versa*. Uzyskane rośliny transgeniczne uprawiano na ciągłym świetle niebieskim. W tych warunkach najkrótsze hypokotyle miały rośliny charakteryzujące się nadekspresją *CRY1* oraz zawierające konstrukt, w którego skład wchodzi odcinek DNA kodujący N-koniec *CRY2* i C-końcową domenę *CRY1*. Podobną sytuację obserwowano, gdy analizowano zawartość antocyjanów [4]. Pozostałe linie roślin transgenicznych charakteryzowały się mniejszą wrażliwością na działanie światła niebieskiego. Efekt ten można tłumaczyć zróżnicowaną stabilnością białek powstających na bazie różnych konstruktyw. Okazało się, że za dużą labilność *Cry2* odpowiada jego domena C-końcowa. Podobne jak *Cry2* właściwości (szybka degradacja apoproteiny na świetle) ma odpowiednik *Cry1* u tytoniu i pomidora. W związku z tym można przypuszczać, że stabilność poszczególnych typów kryptochromu u różnych roślin nie jest cechą ewolucyjnie zachowawczą [4].

WSPÓŁDZIAŁANIE KRYPTOCHROMU Z FITOCHROMEM

Istnienie w tych samych komórkach różnych fotoreceptorów sugeruje, że między nimi występować mogą trzy typy oddziaływań:

(1) Ich mechanizm działania może być niezależny od siebie.

(2) Mogą one współdziałać w regulacji określonego procesu (efekt synergistyczny) lub

(3) wpływać na niego w sposób przeciwny (efekt antagonistyczny).

Jak się wydaje, większość reakcji fotomorfogenetycznych kontrolowana jest przez konkretny typ fotoreceptora. Ale poznano również procesy, które regulowane są w sposób synergistyczny lub antagonistyczny przez fitochrom i kryptochrom. Przykładem takiego typu oddziaływań między oboma fotoreceptorami jest kontrola kwitnienia rzodkiewnika [8, 20]. Światło niebieskie (400–500 nm) stymuluje, podczas gdy czerwone (600–700 nm) hamuje kwitnienie tej rośliny. Tego typu efektu nie obserwowano jednak u mutantu *hy4* (*cry1*), który charakteryzuje się późniejszym zakwitaniem (o 50–60 dni) w porównaniu z roślinami typu dzikiego [8]. Był on jednak szczególnie wyraźny, gdy oba typy roślin uprawiano w świetle wzbogaconym w niebieską i uboższym w czerwoną część widma. Natomiast jeżeli źródło światła poza niebieską barwą emitowało daleką czerwień, zarówno mutanty, jak i rośliny typu dzikiego zakwitwały w podobnym czasie [8]. Na tej podstawie można wnioskować, że kryptochrom oraz fitochrom mogą regulować w odmienny sposób kwitnienia rzodkiewnika, lecz w pewnych warunkach świetlnych mechanizm ich działania może mieć synergistyczny charakter [8]. Należy jednak dodać, że opisany mechanizm współdziałania obu fotoreceptorów może dotyczyć jedynie CryI i fitochromu stabilnego.

Bardzo gruntowne badania nad mechanizmem współdziałania omawianych fotoreceptorów przeprowadzili ostatnio Guo i in. [20]. Badacze ci uzyskali dwa mutanty kryptochromu 2 (Cry2), które charakteryzowały się późniejszym zakwitaniem w porównaniu z roślinami kontrolnymi, gdy uprawiano je w warunkach indukcyjnego, długiego fotoperiodu (LD). Natomiast w warunkach krótkiego fotoperiodu (SD) obserwowano sytuację odwrotną. Mutanty *cry2* zakwitwały nieco wcześniej w porównaniu z typem dzikim. Z drugiej strony rośliny transgeniczne charakteryzujące się nadekspresją *CRY2* kwitły nieco wcześniej w warunkach SD, lecz w tym samym czasie jak rośliny kontrolne – w warunkach LD [20]. Jednakże gdy mutanty *cry2* uprawiano na świetle wzbogaconym zarówno w niebieską, jak i czerwoną jego barwę, zakwitwały one znacznie później w porównaniu z roślinami typu dzikiego. Na tej podstawie wnioskowano, że fitochrom reguluje zależne od światła czerwonego hamowanie kwitnienia rzodkiewnika, podczas gdy Cry2 przez hamujący wpływ na działanie fitochromu indukuje ten proces. U mutantów fitochromowych (*hy1* i *hy2*) pozbawionych funkcjonalnych cząsteczek obu typów tego barwnika obserwuje się wcześniejsze zakwitanie. Analizując mutacje prowadzące do eliminacji

tylko jednej z pul fotoreceptora przedwczesne zakwitanie stwierdzono jedynie u mutantu (*phyB*) fitochromu stabilnego. Natomiast mutant fitochromu labilnego, *phyA*, kwitnie w podobnych czasie jak rośliny typu dzikiego [20]. Choć w przedstawionych badaniach wykazano bezpośrednie oddziaływanie kryptochromu 2 i fitochromu stabilnego (PhyB) w regulacji kwitnienia u rzodkiewnika, należy pamiętać, że proces ten wydaje się być również kontrolowany przez kryptochrom 1 i fitochrom labilny. Lecz w tym przypadku obydwa fotoreceptory mogą współdziałać ze sobą. Przykładem takiego synergistycznego współdziałania może być regulacja ekspresji genu kodującego u rzodkiewnika cząsteczki katalazy [47]. Z drugiej strony kontrolowane przez Cry1 hamowanie wydłużania hypocotyli wzmagane jest przez aktywną formę fitochromu B. Natomiast w procesie tym nie obserwuje się współdziałania Cry1 i PhyA [12]. Z kolei stymulacja syntezy antocyjanów zachodzi w wyniku aktywacji jednej z form fitochromu oraz Cry1 [4].

Poza omówionymi wyżej przykładami wykazano, że fitochromy i kryptochromy mogą współdziałać w regulacji wielu innych procesów. Dotyczy to między innymi kontroli ruchów chloroplastów u zielenicy *Mougeotia* [16], fototropizmu [5], syntezy antocyjanów i wzrostu powierzchniowego liścieni rzodkiewnika [10].

Nowe światło na mechanizm współdziałania fitochromu labilnego (PhyA) i kryptochromów (Cry1 i Cry2) rzodkiewnika rzucają wyniki badań opublikowanych ostatnio przez Cashmore'a i wsp. [6]. Przeprowadzono je w warunkach *in vitro*, na izolowanych cząsteczkach obu typów fotoreceptorów. Stwierdzono, że kryptochromy mogą stanowić substrat dla związanej z PhyA kinazy białkowej. Przypuszczalnym miejscem fosforylacji są C-końcowe domeny CRY. Nie wyklucza się również możliwości bezpośredniego, fizycznego oddziaływania cząsteczek fitochromu ze wspomnianą domeną kryptochromów. Jednocześnie uzyskano dowody, że podobnego typu oddziaływania między fotoreceptorami mogą zachodzić wewnątrz żywych komórek [6]. Na zależne od temperatury oddziaływania między fitochromem a kryptochromem w warunkach *in vitro*, u zielenicy *Mougeotia* wskazywała wcześniej Gabryś z współpracownikami [16].

KRYPTOCHROMY SSAKÓW

Za niecodzienne odkrycie można uznać stwierdzenie obecności kryptochromu u ssaków, a zwłaszcza u człowieka. W 1996 roku odkryto, że w genomie ludzkim funkcjonują dwa geny, które wykazują dużą homologię do fotoliaz i kryptochromów roślinnych [23]. Podobnie jak kryptochromy rzodkiewnika również produkty genów ludzkich (które nazwano hCRY1 i hCRY2) są flawoproteinami i mają dwie grupy chromoforowe, ryboflawinę i pterynę. Kryptochromy zwierzęce, podobnie jak roślinne, nie wykazują aktywności fotoliazowych [23]. Dwa geny kodujące białka o właściwościach kryptochromowych wykryto również u myszy [32]. Ostatnio opisano wzorzec ekspresji tych genów w różnych tkankach i organach tego zwierzęcia

[32]. Za pomocą techniki *Northern blot* wykazano, że ekspresja *CRY1* i *CRY2* zachodzi w większości przebadanych tkanek. Przez analogię do roślin zbadano możliwość udziału obu kryptochromów w regulacji fotoperiodyzmu u myszy. Dlatego szczególną uwagę zwrócono na ekspresję badanych genów w siatkówce oka oraz w podwzgórzu (w jego części zwanej jądrem nadskrzyżowanym – SCN od ang. *suprachiasmatic nucleus*), to jest w tkankach, które odpowiadają za odbiór sygnałów świetlnych i regulację rytmów okołodobowych. Okazało się, że w siatkówce ekspresja *CRY1* i *CRY2* zachodzi jedynie w wewnętrznej warstwie ziarnistej i warstwie zwojowej, w której nie obserwuje się ekspresji genu kodującego opsynę [32]. We wspomnianych warstwach siatkówki, jak i w całym mózgu obserwowano wyższy poziom ekspresji genu *CRY2* w porównaniu z *CRY1*. Wyjątkiem jest SCN, gdzie zarejestrowano sytuację odwrotną do opisaną [32]. Co więcej, zawartość *CRY1* mRNA w SCN podlega okołodobowym fluktuacjom. Jej szczyt przypadał na okres działania światła, natomiast w ciągu pierwszych 8 godzin ciemności obserwowano stopniowy spadek *CRY1* mRNA do prawie niewykrywalnego poziomu [32]. Ponieważ SCN pełni podstawową rolę w regulacji rytmów okołodobowych, sugeruje się, że oba typy zwierzęcych kryptochromów (w tym też i ludzkich) są poszukiwanymi od dawna fotoreceptorami, które mogą być składnikami systemów odmierzających czas – zegarów biologicznych. Jednakże to zagadnienie będzie obszernie przedyskutowane w odrębnym artykule (Tretyn i in., w przygotowaniu).

PODSUMOWANIE

Izolacja genu *HY4* (*CRY1*) okazała się kamieniem milowym w badaniach nad wpływem światła niebieskiego na morfogenezę roślin, otwierając drogę do poszukiwań nowych typów fotoreceptorów absorbujących tę barwę światła. Ponadto doprowadziła do odkrycia nieznanego dotąd mechanizmu transdukcji sygnałów świetlnych u roślin. Podobieństwo w funkcjonowaniu *Cry1* i fotoliaz sugeruje, że inicjowany przez kryptochrom szlak sygnalizacyjny może polegać na reakcjach przenoszenia elektronów z fotoreceptora na białka docelowe.

Pierwotnie terminem kryptochrom określano barwnik, który pochłania bliski ultrafiolet (UV-A) i światło niebieskie [19]. Okazało się jednak, że te dwie barwy światła mogą być absorbowane przez odmienne typy fotoreceptorów. Tylko jeden spośród nich, pochłaniający światło niebieskie został scharakteryzowany od strony molekularnej. Podobnie jak w przypadku fitochromu [40], białkowy składnik tego fotoreceptora kodowany jest przez rodzinę genów. U *Arabidopsis thaliana* funkcjonują co najmniej dwa odrębne geny kryptochromowe (*CRY1* i *CRY2*), których białkowe produkty (*CRY1* i *CRY2*) charakteryzują się odmienną trwałością przy różnym natężeniu światła niebieskiego [2, 13]. Również u innych roślin odkryto geny kodujące cząsteczki kryptochromu. W związku z tym, podobnie jak to miało miejsce w przypadku fitochromów [41, 42], zaistniała konieczność wprowadzenia

przejrzystej klasyfikacji tej rodziny fotoreceptorów. Tego typu klasyfikacja zaproponowana została przez Ahmad i Cashmore'a [2]. Jej podstawę stanowi budowa domeny C-końcowej białkowych składników kryptochromów oraz budowa chemiczna obu grup chromoforowych. Jak już pisano wyżej, Cry1 i Cry2 rzodkiewnika zawierają podobne grupy chromoforowe (jak fotolizy). Natomiast różnią się między sobą budową C-końcowej domeny białkowej [2]. W związku z tym oba te kryptochromy wchodziłyby w skład różnych klas (Cry1-1 i Cry1-2) należących do tego samego typu barwnika. Natomiast zasadniczo różniący się od nich budową domeny C-końcowej kryptochrom występujący u *Clamydomonas* tworzyłby odmienny typ kryptochromu – Cry2. W miarę poszerzania wiedzy na temat molekularnych właściwości kryptochromów występujących u innych roślin niższych i wyższych zaproponowana klasyfikacja ulegać będzie poszerzeniu, a przez porównywanie homologii poszczególnych typów tego barwnika oraz budowy jego grup chromoforowych przypisywane będą do nowych typów i klas [2].

Badania wpływu światła niebieskiego na fotomorfogenezę roślin i roli kryptochromu w regulacji tego procesu przeżywają swoją drugą młodość. Wzrastająca liczba publikacji na ten temat i ranga czasopism, w których są one publikowane świadczą o istotnym, naukowym znaczeniu tych badań.

Odkrycie u zwierząt i u człowieka odpowiedników Cry1 i Cry2 [23, 32] rzuca nowe światło na mechanizm odbioru bodźców świetlnych i funkcjonowania zegara biologicznego u zwierząt i roślin.

LITERATURA

- [1] AHMAD M, CASHMORE AR. *HY4* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* 1993; **366**: 162–166.
- [2] AHMAD M, CASHMORE AR. Seeing blue: the discovery of cryptochrome. *Plant Molecular Biol* 1996; **30**: 851–861.
- [3] AHMAD M, CASHMORE AR. The blue-light receptor cryptochrome 1 shows functional dependence on phytochrome A or phytochrome B in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 1997; **11**: 421–427.
- [4] AHMAD M, JARILLO JA, CASHMORE AR. Chimeric proteins between cry1 and cry2 *Arabidopsis* blue light photoreceptors indicate overlapping functions and varying protein stability. *Plant Cell* 1998; **10**: 197–207.
- [5] AHMAD M, JARILLO JA, SMIRNOVA O, CASHMORE AR. Cryptochrome blue-light photoreceptors of *Arabidopsis* implicated in phototropism. *Nature* 1998; **392**: 720–723.
- [6] AHMAD M, JARILLO JA, SMIRNOVA O, CASHMORE AR. The Cry1 blue-light photoreceptor of *Arabidopsis* interacts with phytochrome A *in vitro*. *Molecular Cell* 1998; **1**: 939–948.
- [7] AHMAD M, LIN C, CASHMORE AR. Mutation throughout an *Arabidopsis* blue-light photoreceptor impair blue-light-responsive anthocyanin accumulation and inhibition of hypocotyl elongation. *Plant J* 1995; **11**: 421–427.
- [8] BAGNALL DJ, KING RW, HANGARTNER RP. Blue-light promotion of flowering is absent in *hy4* mutants of *Arabidopsis*. *Planta* 1996; **200**: 278–280.

- [9] BATSCHAUER A. A plant gene for photolyase: an enzyme catalyzing the repair of UV-light-induced DNA damage. *Plant J* 1993; **4**: 705–709.
- [10] BLUM DE, NEFF MM, VAN VOLKENBURGH. Light-stimulated cotylated expansion in the *blue3* and *hy4* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 1994; **105**: 1433–1436.
- [11] BRIGGS WR, LISCUM E. The role of mutants in the search for the photoreceptor for phototropism in higher plants. *Plant Cell Environment* 1997; **20**: 768–772.
- [12] CASAL JJ, BOCCALANDRO H. Co-action between phytochrome B and HY4 in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 1995; **197**: 213–218.
- [13] CASHMORE AR. The cryptochrome family of photoreceptors. *Plant Cell Environment* 1997; **20**: 764–767.
- [14] CHO MH, SPALDING EP. An anion mediating growth-inhibition by blue-light in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol* 1995; **108**: 86.
- [15] CHO MH, SPALDING EP. An anion channel in *Arabidopsis* hypocotyls activated by blue light. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 8134–8138.
- [16] GABRYŚ H, WALCZAK T, MALEC P. Interaction between phytochrome and the blue light photo-receptor system in *Mougeotia*. Temperature dependence. *J Photochem Photobiol B – Biol* 1997; **38**: 35–39.
- [17] GALLAGHER S, SHORT TW, RAY PM, PRATT LH, BRIGGS W.R. Light-mediated changes in two proteins found associated with plasma membrane fraction from pea stem sections. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 8003–8007.
- [18] GALLAND P. Forty years of blue-light research and no anniversary. *Photochem Photobiol* 1992; **56**: 847–853.
- [19] GRESSEL J. Blue light photoreception. *Photochem Photobiol* 1979; **30**: 749–754.
- [20] GUO H, YANG H, MACKLER TC, LIN C. Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science* 1998; **279**: 1360–1363.
- [21] HOROWITZ BA, BERROCAL TGM. A spectroscopic view of some recent advances in the study of blue light photoreception. *Bot Acta* 1997; **110**: 360–368.
- [22] HOFFMAN PD, BATSCHAUER A, HAYS JB. *PHHI*, a novel gene from *Arabidopsis thaliana* that encodes a protein similar to plant blue-light photoreceptors and microbial photolyases. *Mol Gen Genet* 1996; **253**: 259–265.
- [23] HSU DS, ZHAO X, ZHAO S, KAZANTSEV A, WANG R-P, TODO T, WEI Y-F, SANCAR A. Putative human blue-light photoreceptors hCRY1 and hCRY2 are flavoproteins. *Biochemistry* 1996; **35**: 13871–13877.
- [24] KAUFMAN LS. Transduction of blue-light signals. *Plant Physiol* 1993; **102**: 333–337.
- [25] KOORNNEEF M, ROLFF E, SPRUIT C.J.P. Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Z Pflanzenphysiol* 1980; **100**: 147–160.
- [26] LIN C, AHMAD M, CASHMORE AR. *Arabidopsis* cryptochrome 1 is a soluble protein mediating blue light-dependent regulation of plant growth and development. *Plant J* 1996; **10**: 893–902.
- [27] LIN C, AHMAD M, GORSON D, CASHMORE AR. Expression of an *Arabidopsis* cryptochrome gene in transgenic tobacco results in hypersensitivity to blue, UV-A, and green light. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 8423–8427.
- [28] LIN C, ROBERTSON DE, AHMAD M, RAIBEKAS AA, JORNS MS, DUTTON PL, CASHMORE AR. Association of flavin adenine dinucleotide with the *Arabidopsis* blue-light receptor Cry1. *Science* 1995; **269**: 968–970.
- [29] LIN C, YANG H, GUO H, MACKLER T, CHEN J, CASHMORE AR. Enhancement of blue-light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 2686–2690.
- [30] MALHOTRA K, KIM S-T, BATSCHAUER A, DAWUT L, SANCAR A. Putative blue-light photoreceptors from *Arabidopsis thaliana* and *Sinapis alba* with a high degree of sequence

- homology to DNA photolyase contain the two photolyase cofactors but lack DNA repair activity. *Biochemistry* 1995; **34**: 6892–6899.
- [31] MILLAR A.J, AMGRATH RB, CHUA N-H. Photochrome phototransduction pathways. *Ann Rev Genet* 1994; **28**: 325–349.
- [32] MIYAMOTO Y, SANCAR A. Vitamin B₂-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 6097–6102.
- [33] NINNEMANN H. Some aspects of blue-light research during the last decade. *Photobiol Photochem* 1995; **61**: 22–31.
- [34] REYMOND P, SHORT TW, BRIGGS WR. Blue light activates a specific protein kinase in higher plant. *Plant Physiol* 1992; **100**: 655–661.
- [35] REYMOND P, SHORT TW, BRIGGS WR, POFF KL. Light-induced phosphorylation of a membrane protein plays an early role in signal transduction for phototropism in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 4718–4721.
- [36] SANCER A. Structure and function of DNA photolyase. *Biochemistry* 1994; **33**: 2–9.
- [37] SPALDING EP, COSGROVE DJ. Mechanism of blue light induced plasma membrane depolarization in etiolated cucumber hypocotyls. *Planta* 1992; **188**: 199–205.
- [38] SMALL DB, MIN B, LEFEVRE PA. Characterization of a *Chlamydomonas reinhardtii* gene encoding a protein of the DNA photolyase/blue light photoreceptor family. *Plant Mol Biol* 1995; **28**: 443–454.
- [39] SHORT TW, BRIGGS WR. The transduction of blue-light signals in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1994; **45**: 143–171.
- [40] TRETYN A, KOPCEWICZ J. Fitochrom i kryptochrom: receptory regulujące fotomorfoogenezę roślin. *Zeszyty Naukowe Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Skierniewicach* 1995; **2**: 91–99.
- [41] TRETYN A, WIŚNIEWSKA J. Fitochrom – struktura i właściwości. *Post Biochem* 1996; **42**: 57–64.
- [42] TRETYN A, WIŚNIEWSKA J, JAWORSKI K. Mechanizm działania fitochromu. *Post Biol Kom* 1997; **25**: 225–250.
- [43] TRETYN A, KENDRICK RE, WAGNER G. The role(s) of calcium ions in phytochrome action. *Photochem Photobiol* 1991; **54**: 1135–1156.
- [44] WARPEHA KMF, BRIGGS WR. Blue light-induced phosphorylation of a plasma membrane protein in pea: a step in the signal transduction chain for phototropism. *Aust J Plant Physiol* 1993; **20**: 393–403.
- [45] WARPEHA KMF, HAMM HE, RASENICK MM, KAUFMAN LS. A blue-light-activated GTP-binding protein in the plasma membranes of etiolated peas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 8925–8929.
- [46] WHITELAM G. A green light for cryptochrome research. *Curr Biol* 1995; **5**: 1351–1353.
- [47] ZHONG HH, RESNICK AS, STRAUME M, MCCLUNG C.R. Effects of synergistic signaling by phytochrome A and cryptochrome I on circadian clock-regulated catalase expression. *Plant Cell* 1997; **9**: 947–955.

Redaktor prowadzący – Jan Michejda

Otrzymano: 05.09. 1998 r.

Przyjęto: 30.09. 1998 r.

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

STRUKTURA I FUNKCJE RECEPTORA GABA_A

STRUCTURE AND FUNCTIONS OF GABA_A- RECEPTOR

Lilla LACHOWICZ, Tomasz PODKUL, Ludmiła ŻYLIŃSKA

Zakład Biochemii IFiB, Akademii Medycznej w Łodzi

Streszczenie: Kwas γ -aminomasłowy (GABA) jest głównym i najlepiej poznanym neuroprzekaźnikiem o właściwościach inhibitorowych w ośrodkowym układzie nerwowym. Receptor GABA_A jest związany funkcjonalnie z błonowym kanałem chlorkowym. GABA uwalniany podczas impulsu fizjologicznego oddziałuje na swoiste struktury receptorowe neuronów, powoduje ich hiperpolaryzację oraz spadek aktywności bioelektrycznej. Receptor GABA_A ma pięć różnych podjednostek nazwanych kolejno: α , β , γ , δ i ρ . Dodatkowo obecność siedemnastu podtypów daje teoretyczną możliwość istnienia wielu rozmaitych form receptora GABA_A. Podjednostki receptora GABA_A budują ścianę kanału jonowego Cl⁻ i tworzą molekularną strukturę o masie cząsteczkowej od 220–355 kDa. Na receptor GABA_A wyraźny wpływ mają agoniści i antagoniści tego receptora, a funkcje poszczególnych struktur nerwowych są w bezpośredni sposób związane z występowaniem poszczególnych typów podjednostek receptora w OUN. Celem niniejszego opracowania jest syntetyczne przybliżenie najnowszych danych dotyczących budowy i funkcji GABA_A, jednego z najważniejszych receptorów występujących w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym.

Summary: The γ -aminobutyric acid (GABA) is the major and the best known neurotransmitter with inhibitory properties in the central nervous system (CNS). GABA_A receptor is functionally connected with the Cl⁻-channel complex. GABA which is released during physiological impulse, influences neuronal receptors, leads to the hiperpolarisation of neurons and also decreases their bioelectric activity. GABA_A receptor consists of five subunits: α , β , γ , δ and ρ . In addition, the existence of 17 types of subunits makes it theoretically possible for other various forms of GABA_A receptor to occur. Subunits of GABA_A receptor create the C⁻-channel complex with a molecular weight from 220 to 355 kDa. GABA_A receptor is influenced by agonists and antagonists of this receptor, and the functions of particular nervous structures are directly connected with the existence of individual types of the receptor subunits in CNS. The aim of this paper is to present the latest data related to the structure and functions of GABA_A receptor, which is one of the most important receptors in CNS.

Wykaz stosowanych skrótów: **GABA** – kwas γ -aminomasłowy; **GABA-T** – transaminaza GABA; **GAD** – dekarboksylaza glutaminianowa; **SSADH** – dehydrogenaza semialdehydu bursztynianowego; **PKA** –

*Praca finansowana w ramach tematu AM Nr 502-11-334 (98).

kinaza zależna od cAMP; **PKG** – kinaza zależna od cGMP; **PKC** – kinaza zależna od Ca^{2+} i fosfolipidów; **PTK** – kinaza tyrozynowa; **CaM-kinaza II** – kinaza zależna od Ca^{2+} i kalmoduliny typ II; **NO** – tlenek azotu

I. WSTĘP

Kwas γ -aminomasłowy (GABA) jest głównym i najlepiej poznanym hamującym neuroprzekaznikiem w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). Jest on syntetyzowany i magazynowany w neuronach, uwalniany zaś podczas impulsu fizjologicznego działa na swoiste receptory – GABA_A i GABA_B . Receptor GABA_A jest bezpośrednio związany z błonowym kanałem chlorkowym, a jego pobudzenie wywołuje zwiększenie przepuszczalności dla jonów Cl^- . Receptory GABA_B są powiązane z wapniowym lub potasowym kanałem jonowym przez białka G. Pobudzenie receptora GABA_B powoduje:

- 1) spadek aktywności cyklicznej adenylanowej,
- 2) otwarcie kanału dla jonów K^+ oraz
- 3) zamknięcie kanału dla jonów Ca^{2+} [55].

Ostatnio, obok dwóch wymienionych wyżej typów receptorów, w siatkówce kręgowców wykazano obecność trzeciej klasy – receptora GABA_C [3,4,19]. Jest on niewrażliwy na czynniki, które modulują GABA_A i GABA_B , natomiast jest selektywnie aktywowany przez kwas *cis*-4-aminokrotonowy [24]. W skład receptora GABA_C wchodzi podjednostki ρ_1 i ρ_2 , (występujące także w GABA_A), jednakże w GABA_C podjednostki te tworzą receptor homomeryczny. Receptor GABA_C jest integralną częścią kanałów błonowych, stabilizujących potencjał spoczynkowy komórki przez wzrost przepuszczalności błony dla Cl^- . Uważa się, że inhibicja, w której pośredniczy receptor GABA_C , występuje przy niższych stężeniach GABA i trwa dłużej niż ta, która zachodzi poprzez receptor GABA_A [40]. Wykazano też, że receptor GABA_C hamuje uwalnianie transmiterów w zakończeniach bipolarnych komórki.

Celem niniejszego opracowania jest syntetyczne przybliżenie najnowszych danych dotyczących budowy i funkcji GABA_A , jednego z najważniejszych receptorów występujących w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym.

II. Zarys metabolizmu GABA

Kwas γ -aminomasłowy występuje w dużych ilościach w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). Stężenie GABA waha się w szerokich granicach od $10 \mu\text{M}$ w strukturach mózgowia, do $500 \mu\text{M}$ – 1mM w szczelinie synaptycznej, podczas

przewodzenia impulsu neuronalnego [54]. Największe stężenie GABA stwierdzono w układzie pozapiramidowym (gałka biała, istota czarna) oraz w podwzgórz. Duże stężenie GABA w tych strukturach skorelowane jest jednocześnie z odpowiednio wysoką aktywnością dekarboksylazy kwasu glutaminowego (GAD, E.C. 4.1.1.15), enzymu syntetyzującego γ -aminomaślan. W mózgu szczura i człowieka występują dwie formy dekarboksylazy kwasu glutaminowego o masie cząsteczkowej 65 kDa (GAD₆₅) i 67 kDa (GAD₆₇), będące produktem dwóch różnych genów [20,21]. Forma GAD₆₇ jest równomiernie rozmieszczona w neuronie, natomiast GAD₆₅ występuje głównie w aksonach i generalnie, w porównaniu z GAD₆₇, jest jej w komórce więcej [13]. Obecność dwóch form GAD potwierdzona została także u innych kręgowców [1,29]. GABA może powstawać również w wyniku przemiany putrescyny i homokarnozyny, jednak jest to droga o bardzo małym znaczeniu.

Za katabolizm GABA odpowiedzialne są dwa enzymy – transaminaza GABA (GABA-T, E.C. 2.6.1.19) i dehydrogenaza semialdehydu bursztynianowego (SSADH, E.C. 1.2.1.24). GABA-T wyizolowana z mózgu składa się z dwóch identycznych podjednostek o masie cząsteczkowej 55 kDa i zlokalizowana jest w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. W ludzkim mózgu SSADH występuje jako tetramer, składający się z czterech jednakowych podjednostek o masie cząsteczkowej 58 kDa. Jest to również enzym mitochondrialny [58]. Powstający bursztynian może włączać się do cyklu Krebsa, zaś GABA – oprócz pełnienia funkcji neuroprzekaźnika – stanowić może także potencjalne, alternatywne źródło energii w komórce.

GABA spełnia wszystkie warunki stawiane przez neurofizjologów substancjom, które mogą być uznane za przekaźnik hamujący w OUN [37]. GABA uwalniany z zakończenia nerwowego działa na swoiste struktury receptorowe neuronów, powodując hiperpolaryzację błony komórkowej oraz spadek aktywności bioelektrycznej. Jest to tzw. hamowanie postsynaptyczne. GABA może działać również na uwalnianie neuroprzekaźników z części presynaptycznej, łączy się wtedy ze swoistym receptorem znajdującym się w błonie zakończenia nerwowego. Działanie to określane jest jako tzw. hamowanie presynaptyczne [37].

III. Struktura receptora GABA_A

Największy postęp w badaniach nad molekularną budową receptora GABA_A nastąpił po odkryciu, że związek należący do benzodiazepin – flunitrazepam, silnie wiąże się z receptorem GABA_A [46]. Dodanie znakowanego [³H]flunitrazepamu do homogenatu uzyskanego z mózgowia powodowało jego specyficzne wiązanie z białkiem o masie cząsteczkowej ok. 51 kDa. Jak się następnie okazało, białko to stanowiło jedną ze składowych części receptora GABA_A. Receptor GABA_A to heterooligomeryczny kompleks zbudowany z pięciu polipeptydowych podjed-

TABELA 1. Charakterystyka znanych podjednostek receptora GABA_A (na podstawie [2,4,11,27,30,31,42,43])

Podjednostka	α	β	γ	δ	ρ
Liczba znanych podtypów	6	4	4	1	3
Masa cząsteczkowa podtypów [kDa]	α_1 51 α_2 53 α_3 58 α_4 ? α_5 55 α_6 57	β_1 ? β_2 56 β_3 58 β_4 ?	γ_1 ? γ_2 45 γ_3 ? γ_4 ?	δ 54	ρ_1 ? ρ_2 ? ρ_3 ?
Kinazy odpowiedzialne za fosforylację poszczególnych podtypów	PKA PKC	PKA PKC PKG CaM-kinaza II	PTK PKC		PKC

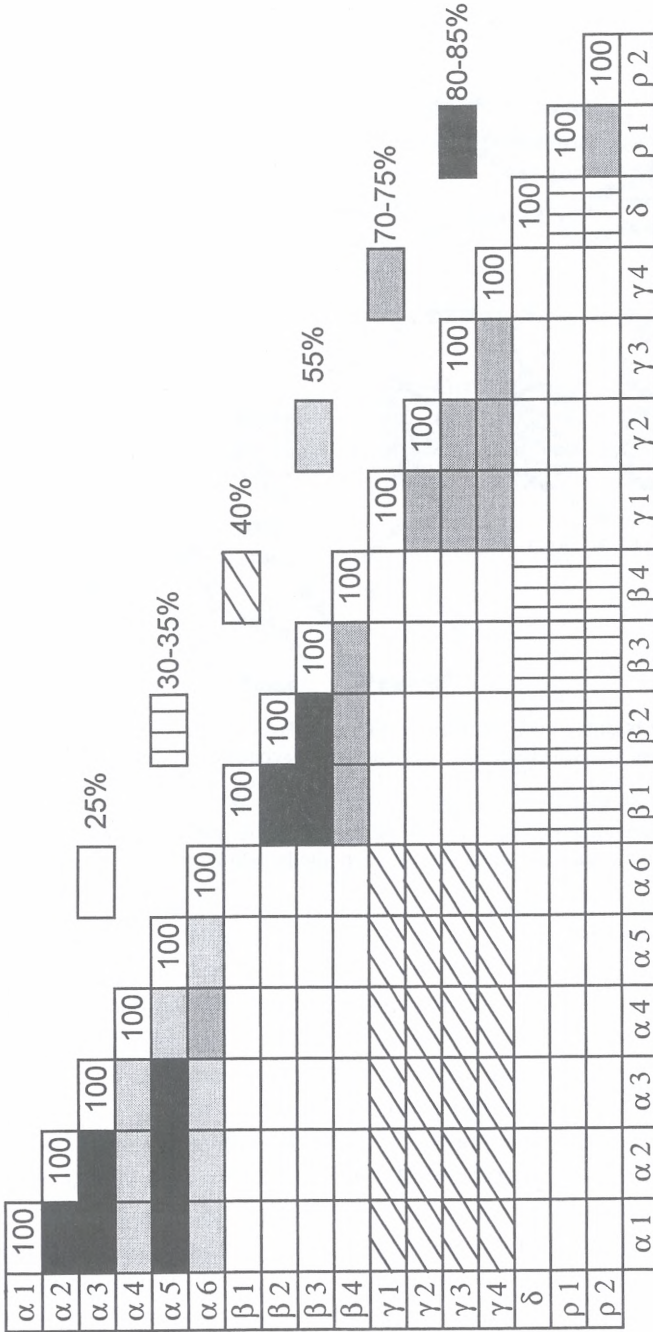
nostek, tworzących ściany kanału chlorkowego. Wyodrębniony i oczyszczony receptor jest zbudowany z dwóch głównych polipeptydów: α – o masie cząsteczkowej 51 kDa i β – o masie 56 kDa, wchodzących w skład kompleksu o całkowitej masie cząsteczkowej 220–355 kDa [9,10,54]. Kolejne prace pozwoliły na ostateczne wyodrębnienie pozostałych podjednostek receptora GABA_A nazwanych kolejno: γ , δ i ρ (tab. 1). Homologia I-rzędowej struktury podjednostek szacowana jest na 30–40% [16,45,48,62]. Wiele z podjednostek ma jeden lub więcej typów, a wśród nich homologia sekwencji aminokwasów jest bliska 80% (rys. 1).

W każdej podjednostce receptora GABA_A występują:

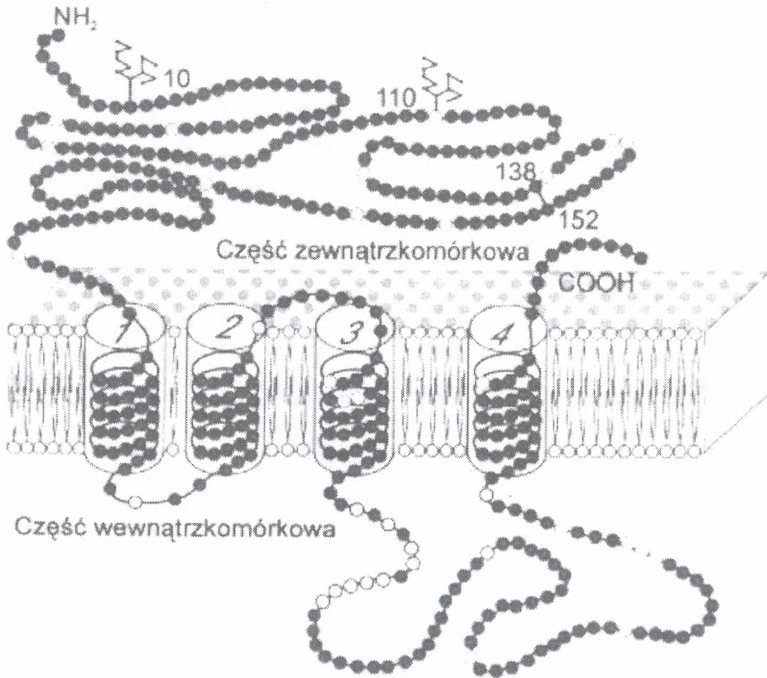
- N-końcowa zewnątrzkomórkowa część z dwoma miejscami glikozylacji w pozycji 10 i 110, z mostkiem cysteinowym łączącym pozycje 138 i 152 oraz
- cztery transbłonowe, hydrofobowe domeny o strukturze α -helisy (rys. 2).

Pomiędzy trzecią a czwartą α -helisą znajduje się wewnątrzkomórkowy, hydrofilowy łańcuch charakteryzujący się dużą zmiennością sekwencji aminokwasowej. Fragment ten ma miejsca ulegające fosforylacji, co ma duże znaczenie w regulacji funkcji receptora.

Badania z kilku ostatnich lat pozwoliły na odkrycie kolejnych izoform podjednostek receptora GABA_A. Stwierdzono także, że ekspresja poszczególnych izoform podlega zmianom podczas rozwoju organizmu [5,27,35,36]. Pritchett i wsp.[53] wykazali, że w tkankach myszy i wołu istnieją dwa rodzaje podjednostki γ_2 . Jedną z nich, γ_2S (ang. *short*), jest prawie identyczna z poprzednio wyizolowaną formą γ_2 , natomiast drugi rodzaj – γ_2L (ang. *long*), zawiera w sekwencji nukleotydowej o 24 pary zasad (8 reszt aminokwasowych) więcej niż γ_2 . Ten fragment łańcucha wbudowany jest w część wewnątrzkomórkową receptora i co ważniejsze, występuje



RYСУNEK 1. Homologia aminokwasowa podjednostek receptora GABA_A (na podstawie [28, 32, 33, 39, 41, 45, 50, 52, 56, 60])



RYSUNEK 2. Schemat budowy podjednostki receptora GABA_A: N-końcowa (zwnętrzkomórkowa) część polipeptydu ma dwa miejsca glikozylacji zaznaczone na schemacie w pozycji 10 i 110 oraz mostek cysteinowy łączący pozycje 138 i 152; każda z podjednostek budujących receptor GABA_A ma cztery transbłonowe domeny α -helisy (przedstawione na schemacie w postaci cylindrów); C-końcowa część polipeptydu znajduje się w czwartej domenie i zwrócona jest do przestrzeni zwnętrzkomórkowej; C-końcowa część nie ma wpływu na aktywność podjednostki kompleksu receptorowego; trzecia i czwarta domena połączone są długim, wwnętrzkomórkowym łańcuchem decydującym o podstawowych funkcjach receptora; masa cząsteczkowa podjednostki receptora GABA_A wynosi ok. 50 kDa (na podstawie [48], zmodyfikowane)

w nim miejsce dla działania PKC. Przeprowadzone później badania potwierdziły obecność γ_2S i γ_2L również w mózgowiu człowieka i szczura. W mózgowiu kur zidentyfikowano dodatkowy rodzaj podjednostki β_4 . Forma ta określona jako β'_4 ma o 12 par zasad więcej (4 reszty aminokwasowe) niż β_4 [27]. Najnowszym odkryciem jest wykazanie obecności 17 dodatkowych aminokwasów w rodzaju β_2L w porównaniu z β_2S oraz brak 10 reszt aminokwasowych w rodzaju α_6S w porównaniu z α_6 [27,36]. Ciekawym jest również fakt, że α_6S , która przypuszczalnie powstała w wyniku nieprawidłowego przebiegu procesów posttranslacyjnych, utraciła swoje znaczenie funkcjonalne. Związane jest to prawdopodobnie z brakiem w rodzaju α_6S pewnych aminokwasów w N-końcowej, zwnętrzkomórkowej części receptora. Podobna modyfikacja występująca w większości podjednostek dotyczy wwnętrzkomórkowego odcinka między domeną 3 i 4 [36].

IV. Kompleks receptorowy GABA_A

Kompleks receptora GABA_A składa się z kombinacji pięciu podjednostek (α , β , γ , δ , ρ), a każda z nich ma cztery transbłonowe domeny oznaczone 1–4 (rys. 3). Na ścianę kanału jonowego Cl⁻ składają się jedna lub więcej domen z każdej z podjednostek [48]. Skonstruowanie prawdopodobnego modelu kompleksu receptorowego GABA_A w znacznej mierze oparte było na podobieństwie budowy do receptora cholinergicznego-nikotynowego.

Możliwość występowania dużej liczby kombinacji w układzie domen i podjednostek w obrębie kompleksu receptorowego nasuwa szereg pytań:

(1) Jak wiele różnych odmian kompleksu receptorowego GABA_A istnieje w komórkach organizmów żywych?

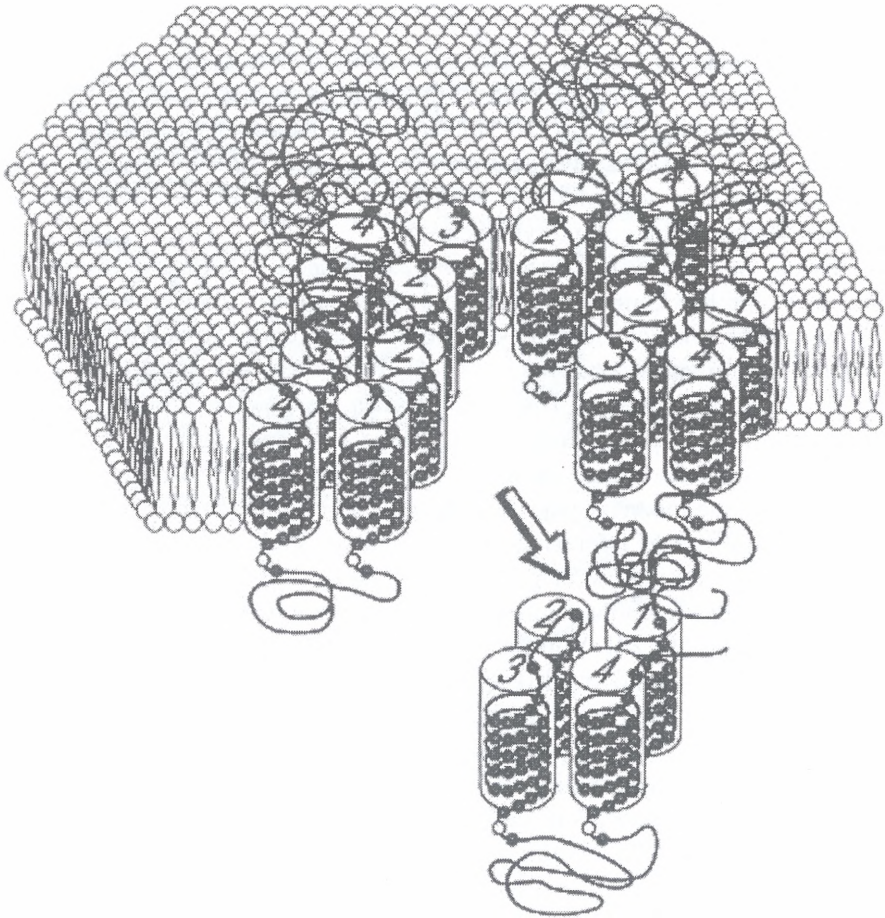
(2) Z jakich podjednostek i domen składają się kolejne odmiany kompleksu receptorowego, mające określone fizjologiczne i farmakologiczne znaczenie?

(3) W jakim zakresie zmiany struktury warunkują działanie poszczególnych form?

Na pytania te nie można dziś jeszcze udzielić wyczerpującej odpowiedzi, chociaż zgromadzono już wiele interesujących informacji. Podjednostka ρ występuje na przykład jedynie w siatkówce, podczas gdy podjednostki α , β i γ oraz jedną z podjednostek δ znaleziono w wielu różnych regionach ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego [12,27]. Widsen i wsp. [66] udowodnili, że takie podtypy, jak: α_1 , β_2 , γ_2 , α_2 , β_3 , α_3 , γ_1 , δ , α_5 , β_1 i α_6 , które wchodziły w skład kompleksu receptora GABA_A, występują najczęściej w błonach komórek nerwowych. Zastosowanie metod immunoprecypitacyjnych z wykorzystaniem przeciwciał dla poszczególnych podtypów pozwoliło na wykazanie, że podtypy: α_1 i/lub β_2 i/lub γ_2 w 60–70% stanowią podstawę budowy każdego z kompleksów receptorowych [22]. Badania przeprowadzone przez Persohna i wsp. [51] przy zastosowaniu technik histochemicznych bardziej precyzyjnie scharakteryzowały obszary występowania mRNA, odpowiedzialnego za syntezę poszczególnych podjednostek receptora GABA_A (tab. 2).

1. Wpływ procesów fosforylacji na aktywność kompleksu receptorowego GABA_A

Obecnie uważa się, że działanie kompleksu receptorowego GABA_A w dużym stopniu zależy od poziomu ufosforylowania białek, wchodzących w jego skład [38,61]. Większość podjednostek receptora GABA_A ma miejsca rozpoznawane przez trzy kinazy: zależną od cAMP (PKA), zależną od Ca²⁺ i fosfolipidów (PKC) oraz kinazę tyrozynową (PKT), choć opisano również wpływ kinazy zależnej od cGMP (PKG) i kinazy zależnej od kompleksu Ca²⁺/CaM (patrz też tabela 1). Kinazy



RYSUNEK 3. Schemat budowy kompleksu receptorowego GABA_A: kompleks receptorowy GABA_A składa się z pięciu podjednostek; każda z nich ma cztery transbłonowe domeny (cylindry) ponumerowane od 1 do 4; rysunek górny przedstawia kompleks receptorowy w formie, gdy kanał jest nieprzepuszczalny dla jonów Cl⁻, rysunek dolny przedstawia jedną z możliwych konfiguracji kompleksu receptorowego w połączeniu z błoną komórkową, dla przejrzystego przedstawienia receptora jedna z podjednostek została wysunięta (kierunek pokazuje strzałka), masa cząsteczkowa przedstawionego kompleksu wynosi ok. 220–355 kDa (na podstawie [18, 48, 54])

PKA i PKC rozpoznają charakterystyczne sekwencje aminokwasowe znajdujące się w części cytoplazmatycznej receptora, w łańcuchu łączącym trzecią i czwartą domenę [48]. Browning i wsp. [7,8] zaobserwowali *in vitro* fosforylację białka receptorowego GABA_A przy udziale PKA i PKC. Najlepszym substratem zarówno dla PKA, jak i PKC jest podjednostka β. W doświadczeniach *in vitro* reakcje

TABELA 2. Występowanie mRNA podjednostek receptora GABA_A w poszczególnych obszarach ośrodkowego układu nerwowego u szczura (na podstawie [12, 22, 47, 51, 66])

Obszar OUN	Podjednostka receptora GABA _A										
	α_1	α_2	α_3	α_5	α_6	β_1	β_2	β_3	γ_1	γ_2	δ
Kora mózgu	+	+	+	+			+	+		+	
Mózdzek	+				+		+			+	+
Hipokamp	+	+				+	+	+		+	+
Wzgórze	+		+	+			+			+	+
Istota szara	+		+				+		+	+	
Gałka błada	+						+		+	+	
Rdzeń kręgowy	+	+	+				+	+		+	

fosforylacji katalizowane przez te kinazy hamowane były w wyniku preinkubacji z przeciwciałami, skierowanymi przeciwko sekwencjom aminokwasów rozpoznawanych przez poszczególne kinazy w podjednostce β . Podwyższenie stężenia cAMP w synaptosomach oraz w hodowlach komórek nerwowych powodowało spadek aktywności receptora GABA_A. W badaniach *in vivo* prowadzonych na myszach, dordzeniowe podanie katalitycznej podjednostki PKA zmniejszało częstość otwierania kanału jonowego Cl⁻. Podobne efekty w warunkach *in vitro* obserwowano w obecności estrów forboleu aktywujących PKC [41]. Chociaż znaczenie fizjologiczne procesów fosforylacji receptora GABA_A nie zostało do końca zbadane, sugeruje się, że odgrywają one kluczową rolę w krótko- i długotrwałej regulacji działania kompleksu receptorowego GABA_A. W świetle ostatnich doniesień, dodatkowym specyficznym regulatorem procesu fosforylacji receptora GABA_A wydaje się być tlenek azotu, który w odmienny sposób wpływa na aktywność kinaz PKG i PKA, a jednocześnie wykazano, że NO działa bezpośrednio na podjednostkę γ_2S receptora [23,64]

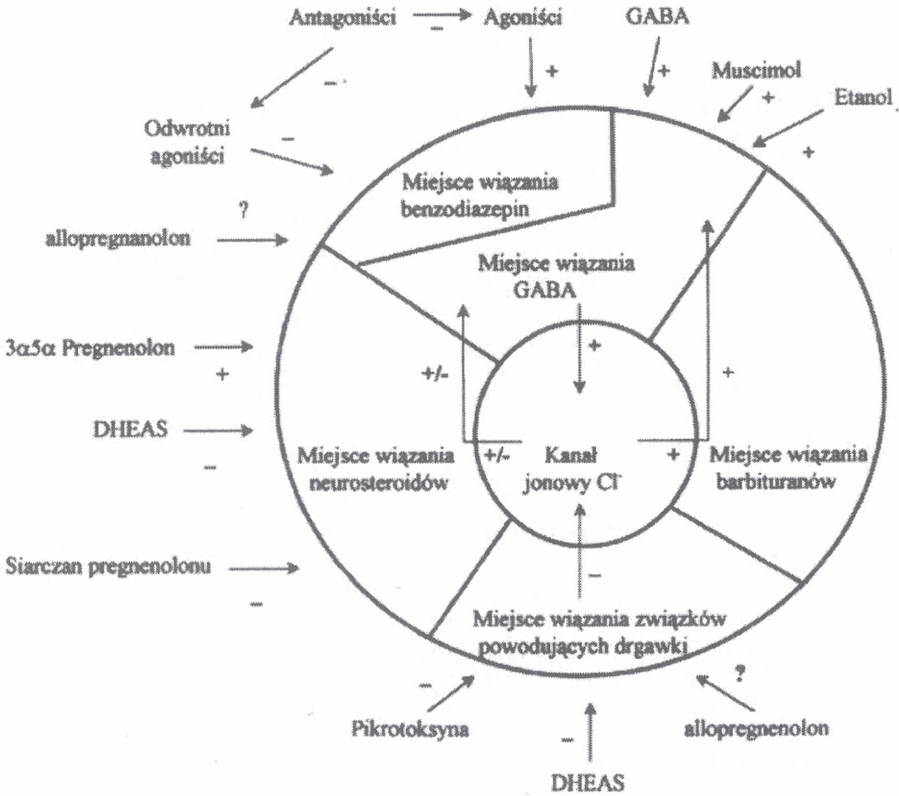
2. Agoniści i antagoniści kompleksu receptorowego GABA_A

Pierwsze doświadczenia mające na celu zbadanie funkcji receptora GABA_A wykazały, że jest on, wraz z integralnym kanałem jonowym Cl⁻, częścią składową błony komórkowej i zdolny jest do przyłączania GABA oraz, w większości przypadków, związków należących do benzodiazepin [49]. Badając wpływ muscimolu na receptor GABA_A udowodniono, że benzodiazepiny działają na błonę komórkową dokładnie w tym miejscu, w którym znajduje się receptor GABA_A. W mianownictwie farmakologicznym receptor GABA_A wraz z innymi białkami oraz kanałem chlorowym, tworzy kompleks receptorowy GABA_A. Z istnieniem tego kompleksu wiąże się działanie wielu innych związków, takich jak: pikrotoksyna, barbiturany, benzodiazepiny i steroidy (tab. 3). Wyraźny wpływ agonistów i antagonistów kom-

pleksu receptorowego GABA_A na funkcje poszczególnych struktur nerwowych jest w bezpośredni sposób związany z występowaniem określonych typów podjednostek receptora w OUN. Związki działające na receptor GABA_A mają wybiórcze powinowactwo wobec określonych podjednostek receptora, np.: benzodiazepiny, łączą się jedynie z podjednostkami α , podczas gdy GABA jedynie z podjednostkami β [22]. Ponadto obecność określonych typów podjednostek receptora GABA_A zmienia farmakologiczną funkcję danego kompleksu receptorowego [15]. Wpływ dowolnego związku z grupy benzodiazepin na receptor składający się z podjednostek α_1 , β_2 , γ_2 objawia się działaniem przeciwłękowym, a z podjednostek α_2 , β_3 , γ_2 wykazuje działanie uspokajające i przeciwdrgawkowe. Efektem przyłączenia benzodiazepiny do podjednostki α receptora GABA_A jest zmiana struktury kompleksu receptorowego i wzmocnienie siły wiązania GABA z podjednostką β . Jest to tzw. bezpośrednie działanie układu agoniści-benzodiazepina powodujące zwiększenie przepuszczalności jonów Cl⁻ przez błony komórkowe, hiperpolaryzację błony komórkowej, zmniejszenie pobudliwości neuronalnej, a w rezultacie prowadzące do działania uspokajającego i przeciwdrgawkowego. Przy zastosowaniu metody emisyjnej tomografii pozytronowej różnice w działaniu kompleksu receptorowego GABA_A (pod wpływem wybranych agonistów i antagonistów) zostały również udowodnione *in vivo* u zwierząt i ludzi [25]. Ostatnie doniesienia znacznie poszerzają listę pośrednich i bezpośrednich modulatorów receptora GABA_A. Trijodotyronina w obecności GABA działała jako niekompetycyjny antagonist, natomiast bezpośrednio aktywuje kanał chlorkowy w nieobecności kwasu γ -aminomasłowego [14]. Ciekawą obserwacją było stwierdzenie, że agonistyczny lub antagonistyczny efekt działania sulfopochodnych steroidów zależy od konfiguracji α lub β grupy siarczanowej [17]. Wykazanie bezpośredniej interakcji między somatostatyną a kompleksem receptorowym otwiera kolejną drogę regulacji receptora GABA_A [63]. Zaobserwowano również, że niektóre anestetyki, jak na przykład halotan oraz etomidat, regulują funkcjonowanie receptora GABA_A w sposób stereospecyficzny

TABELA 3. Wybrane związki działające na receptor GABA_A (na podstawie [28, 32, 33, 39, 41, 44, 45, 50, 52, 56, 80])

Agoniści selektywni	Muscimol, GABA
Agoniści (benzodiazepiny)	Diazepam, klonazepam
Agoniści (barbituriany)	Pentobarbital, fenobarbital, heksobarbital
Agoniści (steroidy o działaniu znieczulającym)	Alfaksalon, alprazolam
Antagoniści kompetytywni	Bikukulina
Antagoniści (benzodiazepiny)	Flumazenil
Antagoniści (steroidy)	Siarczan dehydroepiandrosteronu
Blokery kanału chlorkowego	Penicylina, pikrotoksyna



RYSUNEK 4. Związki lub grupy związków wykazujące powinowactwo do kompleksu receptorowego GABA_A: połączenie agonistów receptora GABA_A z odpowiednim miejscem wiązającym w receptorze powoduje nasilenie przepływu jonów Cl⁻ przez kanał jonowy, a w następstwie hiperpolaryzację i zmniejszenie przewodnictwa neuronalnego; połączenie antagonistów i odwrotnych agonistów z receptorem przez hamowanie działania GABA, zmniejsza przewodzenie jonów Cl⁻ i w następstwie zwiększa aktywność neuronalną, znakiem „+” oznaczono efekt pobudzenia przepływu jonów Cl⁻, oznakowanie „+/-” zakłada możliwość wystąpienia zarówno zwiększenia, jak i zmniejszenia przepływu jonów Cl⁻ (na podstawie [6, 34, 43, 52, 57, 65])

[26,59]. Schemat działania poznanych grup związków oddziałujących z kompleksem receptorowym przedstawiono na rysunku 4.

V. UWAGI KOŃCOWE

Ogromne zainteresowanie budową i funkcjonowaniem receptora GABA_A wynika z faktu jego dominacji w ośrodkowym układzie nerwowym kręgowców. Występowanie szeregu rodzajów podjednostek daje możliwość zróżnicowanych efektów działania kompleksu receptorowego w poszczególnych obszarach układu nerwowego. Mimo wielu lat badań nad receptorem GABA_A zapewne nie wykryto

jeszcze wszystkich jego form natywnych oraz form powstałych w wyniku modyfikacji posttranslacyjnych. Dotychczas poznano 17 różnych typów podjednostek receptora GABA_A, a odkrycie dodatkowych form, takich jak: β_2L , β_2S , β'_4 , γ_2L , γ_2S i α_6S , sugeruje możliwość tworzenia wielu różnych kombinacji w obrębie kompleksu receptorowego GABA_A. Istotna wydaje się także zbieżność częstości występowania określonych typów podjednostek receptora GABA_A oraz pewnych funkcji fizjologicznych. Ponadto zaobserwowano wpływ długotrwałego podawania leków z grupy benzodiazepin na zawartość określonych izoform podjednostek w OUN człowieka [52]. Z terapeutycznego punktu widzenia ważna jest wrażliwość receptora GABA_A i integralnie połączonego z nim kanału jonowego na działanie odmiennych farmakologicznie grup związków. Wiele z nich okazało się niezastąpionymi lekami, ale ze względu na złożoność i obszerność zagadnień dotyczących interakcji pomiędzy lekami i receptorem GABA_A, opisowi ich należałoby poświęcić odrębne opracowanie.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AHMAN AK, WAGBERG F, MATTSSON MO. Two glutamate decarboxylase forms corresponding to the mammalian GAD65 and GAD67 are expressed during development of the chick telencephalon. *Eur J Neurosci* 1996; **8**: 2111–2117.
- [2] BECKMAN ML, BERNSTEIN EM, QUICK MW. Protein kinase C regulates the interaction between a GABA transporter and syntaxin 1A. *J Neurosci* 1998; **18**: 6103–6112.
- [3] BORMAN J, FEIGENSPAN A. GABA_C receptors. *Trends Neurosci* 1995; **18**: 515–519.
- [4] BOUE-GRABOT E, ROUDBARAKI M, BASCLES L, TRAMU G, BLOCH B, GARRET M. Expression of GABA receptor rho subunits in rat brain. *J Neurochem* 1998; **70**: 899–907.
- [5] BROOKS-KAYAL AR, JIN H, PRICE M, DICHTER MA. Developmental expression of GABA(A) receptor subunit mRNAs in individual hippocampal neurons *in vitro* and *in vivo*. *J Neurochem* 1998; **70**: 1017–1028.
- [6] BROT MD, AKWA Y, PURDY RH, KOOB GF, BRITTON KT. The anxiolytic-like effects of the neurosteroid allopregnanolone: interactions with GABA(A) receptors. *Eur J Pharmacol* 1997; **325**: 1–7.
- [7] BROWNING MD, BUREAU M, DUDEK EM, OLSEN RW. Protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase phosphorylate the β -subunit of the purified GABA_A receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 1315–1318.
- [8] BROWNING MD, ENDO S, SMITH GB, DUDEK EM, OLSEN RW. Phosphorylation of the GABA_A receptor by cAMP-dependent protein kinase : analysis of the substrate domain. *Neurochem Res* 1993; **18**: 95–100.
- [9] BUREAU M, OLSEN RW. Multiple distinct subunits of the γ -aminobutyric acid-A receptor protein show different ligand-binding affinities. *Mol Pharmacol* 1990; **37**: 497–502.
- [10] BUREAU M, OLSEN RW. GABA_A receptor subtypes: ligand binding heterogeneity demonstrated by photoaffinity labeling and autoradiography. *J Neurochem* 1993; **61**: 1479–1491.
- [11] CARLSON BX, BELHAGE B, HANSEN GH, ELSTER L, OLSEN RW, SCHOUSBOE A. Expression of the GABA(A) receptor alpha6 subunit in cultured cerebellar granule cells is developmentally regulated by activation of GABA(A) receptors. *J Neurosci Res* 1997; **50**: 1053–1062.

- [12] CARUNCHO HJ, PUIA G, MOHLER H, COSTA E. The density and distribution of six GABA_A receptor subunits in primary cultures of rat cerebellar granule cells. *Neurosci* 1995; **67**: 583–593.
- [13] CHAN SO, LYMAN WD, CHIU FC. Temporal and spatial expression of glutamic acid decarboxylases in human fetal brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1997; **46**: 318–320.
- [14] CHAPELL R, MARTIN J, MACHU TK, LEIDENHEIMER NJ. Direct channel-gating and modulatory effects of triiodothyronine on recombinant GABA(A) receptors. *Eur J Pharmacol* 1998; **349**: 115–121.
- [15] DAVIES M, BATESON AN, DUNN SM. Structural requirements for ligand interactions at the benzodiazepine recognition site of the GABA(A) receptor. *J Neurochem* 1998; **70**: 2188–2194.
- [16] DE LOREY TM, OLSEN RW. γ -Aminobutyric acid A receptor structure and function. *J Biol Chem* 1992; **267**: 16747–16750.
- [17] EL-ETR M, AKWA Y, ROBEL P, BAULIEU EE. Opposing effects of different steroid sulfates on GABA_A receptor-mediated chloride uptake. *Brain Res* 1998; **790**: 334–338.
- [18] ENZ R, BRANDSTATTER JH, WASSLE H, BORMANN J. Immunocytochemical localization of the GABA_C receptor ρ subunits in the mammalian retina. *J Neurosci* 1996; **16**: 4479–4490.
- [19] FEIGENSPAN A, BORMANN J. GABA-gated Cl⁻ channels in the rat retina. *Prog Retin Eye Res* 1998; **17**: 99–126.
- [20] ESCLAPEZ M, TILLAKARATNE NJ, KAUFMAN DL, TOBIN AJ, HOUSER CR. Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. *J Neurosci* 1994; **14**: 1834–1855.
- [21] FELDBLUM S, DUMOULIN A, ANOAL M, SANDILLON F, PRIVAT A. Comparative distribution of GAD65 and GAD67 mRNAs and proteins in the rat spinal cord supports a differential regulation of these two glutamate decarboxylases *in vivo*. *J Neurosci Res* 1995; **42**: 742–757.
- [22] FRITSCHY J, BENKE D, MARTENS S, OERTEL WH, BACHI T, MOHLER H. Five subtypes of A γ -aminobutyric acid receptors identified in neurons by double and triple immunofluorescence staining with subunit-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 6726–6730.
- [23] FUKAMI S, UCHIDA I, MASHIMO T, TAKENOSHITA M, YOSHIYA I. Gamma subunit dependent modulation by nitric oxide (NO) in recombinant GABA_A receptor. *Neuroreport* 1998; **9**: 1089–1092.
- [24] GREKA A, KOOLEN JA, LIPTON SA, ZHANG D. Cloning and characterization of mouse GABA(C) receptor subunits. *Neuroreport* 1998; **26**: 229–232
- [25] HANTRAYE P, BROULLET E, FUKADA H. Benzodiazepine receptors studied in living primates by positron emission tomography: antagonist interaction. *Eur J Pharmacol* 1988; **153**: 25–32.
- [26] HARRIS BD, MOODY EJ, SKOLNICK P. Stereoselective actions of halothane at GABA_A receptors. *Eur J Pharmacol* 1998; **341**: 349–352.
- [27] HARVEY RJ, CHINCHETRO MA, DARLISON MG. Alternative splicing of a 51-nucleotide exon that encodes a putative protein kinase C phosphorylation site generates two forms of chicken gamma-aminobutyric acid_A receptor beta 2 subunit. *J Neurochem* 1994; **62**: 10–16.
- [28] HAUSER CAE, CHESNOY-MARCHEAIS D, ROBEL P, BAULIEU EE. Modulation of recombinant $\alpha_6\beta_2\gamma_2$ GABA_A receptors by neuroactive steroids. *European J Pharmacol* 1995; **289**: 249–257.
- [29] HENDRICKSON AE, TILLAKARATNE NJ, MEHRA RD, ESCLAPEZ M, ERICKSON A, VICIAN L, TOBIN AJ. Differential localization of two glutamic acid decarboxylases (GAD65 and GAD67) in adult monkey visual cortex. *J Comp Neurol* 1994; **343**: 566–581

- [30] HEUSCHNEIDER G, SCHWARTZ RD. cAMP and forskolin decrease gamma-aminobutyric acid-gated chloride flux in rat brain synaptoneuroosomes. *Proc Natl Acad USA* 1989; **86**: 2938–2942.
- [31] HUANG RQ, DILLON GH. Maintenance of recombinant type A gamma-aminobutyric acid receptor function: role of protein tyrosine phosphorylation and calcineurin. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; **286**: 243–255
- [32] ITO Y, HO K. Studies on picrotoxin binding sites of GABA_A receptors in rat cortical synaptoneuroosomes. *Brain Res Bulletin* 1994; **33**: 373–378.
- [33] JOHNSTON GAR. GABA_A receptor pharmacology. *Pharmacol. Ther* 1996; **69**: 173–198.
- [34] KAILA K. Ionic basis of GABA_A receptor channel function in the nervous system. *Progress Neurobiol* 1994; **42**: 489–537.
- [35] KOFUJI P, WANG JB, MOSS SJ, HUGANIR RL, BURT DR. Generation of two forms of the γ -aminobutyric acid_A receptor γ_2 subunit in mice by alternative splicing. *J Neurochem* 1991; **56**: 713–715.
- [36] KORPI ER, KUNER T, KRISTO P, KOHLER M, HERB A, LUDDENS H, SEEBURG PH. Small N-terminal deletion by splicing in cerebellar $\alpha 6$ subunit abolishes GABA_A receptor function. *J Neurochem* 1994; **63**: 1167–1170.
- [37] KOSTOWSKI W, PUCIŁOWSKI O. w: W.KOSTOWSKI, P.KUBIKOWSKI [red.] Farmakologia. Podstawy farmakoterapii i farmakologii klinicznej. PZWL 1991; 557–559.
- [38] KRISHEK BJ, XIE X, BLACKSTONE C, HUGANIR RL, MOSS SJ, SMART TG. Regulation of GABA_A receptor function by protein kinase C phosphorylation. *Neuron* 1994; **12**: 1081–1095.
- [39] LAMBERT JJ, BELELLI D, HILL-VENNING C, PETERS JA. Neurosteroids and GABA_A receptor function. *Trends Pharmacol Science* 1995; **16**: 295–303.
- [40] LUKASIEWICZ PD, SHIELDS CR. Different combinations of GABA_A and GABA_C receptors confer distinct temporal properties to retinal synaptic responses. *J Neurophysiol* 1998; **79**: 3157–3167.
- [41] MACDONALD RL, ANGELOTTI TP. Native and recombinant GABA_A receptor channels. *Cell Physiol Biochem* 1993; **3**: 352–373.
- [42] MCDONALD BJ, MOSS SJ. Conserved phosphorylation of the intracellular domains of GABA(A) receptor beta2 and beta3 subunits by cAMP-dependent protein kinase, cGMP-dependent protein kinase, protein kinase C and Ca²⁺/calmodulin type II-dependent protein kinase. *Neuropharmacology* 1997; **36**: 1377–1385.
- [43] MACDONALD RL, OLSEN RW. GABA_A receptor channels. *Annu Rev Neurosci* 1994; **17**: 569–602.
- [44] MACDONALD RL, TWYMAN RE. Kinetic properties and regulation of GABA_A receptor channels. W: T Narahashi (red), Ion Channels. New York: Plenum, 1992: 315–343.
- [45] MCKERNAN RM, WHITING PJ. Which GABA_A receptor subtypes really occur in the brain. *Trends Neurosci* 1996; **19**: 139–143.
- [46] MOHLER H, BATTERSBY MK, RICHARDS JG. Benzodiazepine receptor protein identified and visualized in brain tissue by a photoaffinity label. *Proc Natl Sci USA* 1980; **77**: 1666–1670.
- [47] MOHLER H, FRITSCHY JM, LUSCHER B, RUDOLPH U, BENSON J, BENKE D. The GABA_A receptors: From subunits to diverse functions. W *Ion channels*, 1996, ed. Toshio Narahashi, Plenum Press, New York, **4**: 89–113.
- [48] OLSEN RW, TOBIN AJ. Molecular biology of GABA_A receptor. *FASEB J* 1990; **4**: 1469–1480.
- [49] OSSOWSKA K. Receptory GABAergiczne. W *Receptory, struktura, charakterystyka, funkcja*. Red. Nowak J.Z. i Zawilska J.B. PWN 1997, 143–160.
- [50] PICK CG, PETER Y, PAZ L, SCHREIBER S, GAVISH M, WEIZMAN R. Effect of the pregnane-related GABA-active steroid alphaxalone on mice performance in the staircase test. *Brain Res* 1997; **765**: 129–134.

- [51] PERSOHN E, MALHERBE P, RICHARDS JG. Comparative molecular neuroanatomy of cloned GABA_A receptor subunits in the rat CNS. *J Comp Neurol* 1992; **326**: 193–216.
- [52] POTOKAR J, NUTT DJ. Anxiolytic potential of benzodiazepine receptor partial agonists. *CNS Drugs* 1994; **1**: 305–315.
- [53] PRITCHETT DB, SONTHEIMER H, SHIVERS BD, YMER S, KETTENMANN H, SCHOFIELD PR, SEEBURG PH. Importance of a novel GABA_A receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. *Nature* 1989; **338**: 582–585.
- [54] RABOW LE, RUSSEK SJ, FARB DH. From ion currents to genomics analysis: recent advances in GABA_A receptor research. *Synapse* 1995; **21**: 189–274.
- [55] SANTOS AE, CARVALHO CM, MACEDO TA, CARVALHO AP. Regulation of intracellular [Ca²⁺] and GABA release by presynaptic GABA_B receptors in rat cerebrocortical synaptosomes. *Neurochem Int* 1995; **27**: 397–406.
- [56] SCHMID G, SALA R, BONANNO G, RAITERI M. Neurosteroids may differentially affect the function of two native GABA(A) receptor subtypes in the rat brain. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1998; **357**: 401–407.
- [57] SOUSA A, TICKU MK. Interactions of the neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate with the GABA(A) receptor complex reveals that it may act via the picrotoxin site. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; **282**: 827–833.
- [58] TILLAKARATNE NJK, MEDINA-KAUWE I, GIBSON KM. Gamma-aminobutyric acid (GABA) metabolism in mammalian neural and nonneural tissues. *Comp Biochem Physiol* 1995; **112**: 247–263.
- [59] TOMLIN SL, JENKINS A, LIEB WR, FRANKS NP. Stereoselective effects of etomidate optical isomers on gamma-aminobutyric acid type A receptors and animals. *Anesthesiology* 1998; **88**: 708–717.
- [60] TYNDALE RF, BHAVE SV, HOFFMANN E, HOFFMANN PL, TABAKOFF B, TOBIN AJ, OLSEN RW. Pentobarbital decreases the gamma-aminobutyric acidA receptor subunit gamma-2 long/short mRNA ratio by a mechanism distinct from receptor occupation. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; **283**: 350–357.
- [61] VALENZUELA CF, MACHU TK, MCKERNAN RM, WHITING P, VANRENTERGHEN BB, MCMANAMAN JL, BROZOWSKI SJ, SMITH GB, OLSEN RW, HARRIS RA. Tyrosine kinase phosphorylation of GABA_A receptors. *Molec Brain Res* 1995; **31**: 165–172.
- [62] VANDENBERG RJ, SCHOFIELD PR. Inhibitory ligand-gated ion channel receptors: molecular biology and pharmacology of GABA_A and glycine receptors. W: Handbook of membrane channels. Academic Press Inc. 1994: 317–331.
- [63] VINCENS M, MAUVAIS-JARVIS F, BEHAR S. A novel recognition site for somatostatin-14 on the GABA(A) receptor complex. *Eur J Pharmacol* 1998; **344**: R1–2.
- [64] WEXLER EM, STANTON PK, NAWY S. Nitric oxide depresses GABA_A receptor function via coactivation of cGMP-dependent kinase and phosphodiesterase. *J Neurosci* 1998; **18**: 2342–2349.
- [65] WHITE G, GURLEY D. Benzodiazepine site inverse agonists can selectively inhibit subtypes of GABA_A receptor. *NeuroReport* 1995; **6**: 1313–1316.
- [66] WISDEN W, LAURIE DJ, MONYER H, SEEBURG PH. The distribution of 13 GABA_A receptor subunit mRNAs in the brain I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *J Neurosci* 1992; **12**: 1040–1062.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 16.02.1998 r.

Przyjęto: 08.01.1999 r.

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

LEPTYNA I JEJ ROLA W REGULACJI MASY CIAŁA

LEPTIN AND ITS ROLE IN THE REGULATION OF BODY WEIGHT

Leszek SZABLEWSKI

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

Streszczenie: Leptyna, peptyd kodowany przez gen *ob*, jest wydzielana przez adipocyty i bierze udział w regulacji pobierania pokarmu, wydatków energetycznych i ilości zmagazynowanego tłuszczu. Odgrywa istotną rolę w kontroli masy ciała. Przepuszczalnie przez działanie na podwzgórze hamuje apetyt. Brak funkcjonalnej leptyny u zwierząt powoduje obniżenie aktywności fizycznej, hypotermię, otyłość i inne defekty metaboliczne. Poziom leptyny w organizmie zależy przede wszystkim od ilości zmagazynowanego tłuszczu, jakkolwiek inne czynniki także wpływają na jej syntezę i wydzielanie. Korelacja między stężeniem leptyny w surowicy a masą ciała sugeruje, że adipocyty informują mózg i inne tkanki o wielkości tkanki tłuszczowej. Receptor leptyny i jego izoformy, będące efektem alternatywnego składowania, należy do rodziny klasy I receptora cytokiny.

Słowa kluczowe: leptyna, receptor leptyny, adipocyty, regulacja masy ciała

Summary: Leptin, the peptide encoded by the *ob* gene, is secreted by adipose cells and plays a role in regulating food intake, energy expenditure and adiposity. Leptin plays a vital role in controlling body weight, presumably by acting in the hypothalamus to suppress appetite. In addition, animals lacking leptin also exhibit decreased physiological activity, hypothermia, and other metabolic defects. Body fat is the most important determinant of circulating leptin levels, but other factors also acutely regulate the production and secretion of leptin. Serum leptin concentrations correlate with body mass and percent body fat, suggesting that adipocytes are signaling the brain and other tissues about the size of the adipose tissue-depot. The leptin receptor and various splice variants were cloned and found to have sequence similarity to the class I cytokine receptor family.

Key words: leptin, leptin receptor, adiposity, body weight control.

Wykaz stosowanych skrótów: ACTH – hormon adrenokortykotropowy, CRH – hormon uwalniający kortykotropinę, CART – transkrypt regulowany kokainą i amfetaminą, GCSF – czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów, G-MCSF – czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów i makrofagów, gp130 – przekaźnik sygnałów związany z receptorem np. interleukiny 6, IL-1, IL-2 ... – interleukina

1, 2 ..., **IRS-1** – substrat receptora insuliny-1, **LIF** – czynnik hamujący białaczkę, **LH** – hormon luteinizujący, **MAPK** – kinaza białkowa aktywowana przez mitogen, **MCSF** – czynnik stymulujący wzrost kolonii makrofagów, **PI-3K** – 3 kinaza fosfatydyloinozytolu, **STAT** – cytoplazmatyczny czynnik transkrypcyjny, **TGF- β** – transformujący czynnik wzrostu β , **TNF** – czynnik martwicy nowotworu.

WSTĘP

W 1953 roku Kennedy [37] przedstawił teorię dotyczącą regulacji ilości pobieranego przez organizm pokarmu. Tak zwany model lipostatyczny zakładał, że proporcjonalnie do ilości zmagazynowanego tłuszczu, generowane są sygnały humoralne. One z kolei, działając na specyficzne rejony mózgu, powodowały obniżenie ilości pobieranego pokarmu (ujemne sprzężenie zwrotne). Model lipostatyczny został uzupełniony w roku 1973 przez Colemana [10]. Autor wykonał badania na dwóch modelach genetycznie warunkowanej otyłości, powodowanej przez autosomalną, recesywną mutację, myszach *ob/ob* i *db/db*. W obu przypadkach u zwierząt występuje hiperfagia i ciężka forma otyłości. Coleman zasugerował, że mutacja genu *ob* (*obesity*) powoduje brak sygnału hamującego pobieranie pokarmu. Natomiast skutkiem mutacji *db* (*diabetes*) jest niezdolność organizmu do odpowiedzi na krążące sygnały.

Badania przeprowadzone w ostatnich latach potwierdziły teorie Kennedy'ego i Colemana. W roku 1994 zidentyfikowano gen *ob* u myszy [72]. Jego produkt nazwano leptyną. Czasami używa się określenia białko OB. Podanie leptyny myszom *ob/ob* hamuje hiperfagię oraz przywraca właściwą masę ciała [6, 27, 52, 67]. Zwiększenie stężenia leptyny u myszy typu dzikiego zmniejsza ilość pobieranego pokarmu, powoduje ubytek masy ciała i wzrost wydatków energetycznych [27, 52].

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA LEPTYNY

Dowodów pośrednich, potwierdzających omawiane teorie dostarczają także inne obserwacje dokonane na ludziach i gryzoniach. Wykazano, że poziom leptyny w surowicy jest skorelowany z ilością zmagazynowanego tłuszczu [7, 28, 41, 45]. U ludzi szczupłych stężenie leptyny we krwi wynosi $7,5 \pm 9,3$ ng/ml, natomiast u otyłych $31,3 \pm 24,1$ ng/ml [15]. Ogromny rozrzut wyników mierzony wartością SD (dla ludzi szczupłych nawet $SD > x$) wynika z celu przeprowadzonych badań. W badaniach uczestniczyło 136 szczupłych osób (84 kobiety i 52 mężczyzn) oraz 139 osób otyłych (99 kobiet i 40 mężczyzn). Autorzy pracy uśrednili uzyskane wyniki nie uwzględniając różnic w stężeniu leptyny w surowicy w zależności od płci. Chodziło wyłącznie o wykazanie korelacji między stężeniem leptyny w surowicy

a ilością zmagazynowanego tłuszczu. Stąd paradoksalny wynik, że u osób szczupłych stężenie leptyny w surowicy może mieć wartość ujemną. W bardziej szczegółowych badaniach stwierdzono, że stężenie leptyny we krwi zależy także od płci. U szczupłych kobiet wynosi $7,36 \pm 3,73$ ng/ml, a u mężczyzn $3,84 \pm 1,79$ ng/ml [46]. Natomiast u kobiet otyłych wartość ta waha się w granicach od $15,2 \pm 1,3$ ng/ml do $46,3 \pm 8,4$ ng/ml. Dla otyłych mężczyzn wartości te wynoszą od $6,9 \pm 0,3$ ng/ml do $10,0 \pm 2,3$ ng/ml [26, 33, 56]. U dzieci szczupłych, stężenie leptyny we krwi wynosi $7,8 \pm 2,3$ ng/ml, a u otyłych $38,6 \pm 21,0$ ng/ml [29]. Nie stwierdzono zależności stężenia leptyny od płci u dzieci szczupłych (wiek badanych dzieci $10,5 \pm 0,2$ roku) [2]. Natomiast u starszych, otyłych dziewcząt (12,9 \pm 2,7 lat), poziom białka jest wyższy niż u chłopców (13,2 \pm 2,5 lat) i wynosi odpowiednio 25,2 \pm 14,1 i 17,2 \pm 12,6 ng/ml [66]. Okres półtrwania leptyny we krwi wynosi 24,9 \pm 4,4 min [38].

STRUKTURA GENU *ob*

Mysi gen *ob* jest zlokalizowany w chromosomie 6-10.5 [72]. Zawiera trzy eksony rozdzielone dwoma intronami [32]. Region kodujący genu jest zawarty w eksonach 2 i 3, między którymi znajduje się intron (2.3 kZ) zlokalizowany między kodonami dla glutaminy-49 i seryny-50. Ekson 1 zawiera tylko 26 pz. Transkrypt genu *ob* u myszy stanowi mRNA o wielkości około 4,5 kZ [72].

Ludzki gen *ob* jest zlokalizowany w chromosomie 7q31.3 i strukturalnie jest podobny do opisanego u myszy [1, 11, 22, 24, 36]. Gen zawiera około 20 kZ i składa się z 3 eksonów i 2 intronów. Transkrypt ludzkiego genu *ob* o wielkości około 3,5 kZ wykazuje najwyższą ekspresję w tkance tłuszczowej [14, 24, 48]. Technika *Northern blot* stwierdzono u człowieka obecność omawianego mRNA także w sercu i łożysku [24]. Poziom tego mRNA w łożysku jest około 100 razy niższy niż w adipocytach [5]. Ekspresja *ob* mRNA została wykazana także podczas różnicowania mysich fibroblastów 3T3-L1 w adipocyty [47] oraz w mysich adipocytach 3T3-F422A [42]. Należy jednak zaznaczyć, że ekspresja genu *ob* w tych liniach komórkowych jest o wiele niższa niż stwierdzana w pierwotnie izolowanych fibroblastach [47].

BUDOWA LEPTYNY

Pierwszym produktem translacji jest białko złożone ze 167 aminokwasów. Na końcu N znajduje się sekwencja sygnałowa, składająca się z 21 aminokwasów. Warunkuje ona translokację białka do mikrosomów. Podczas obróbki potranslacyjnej

usuwana jest sekwencja sygnałowa i już jako białko złożone ze 146 aminokwasów leptyna jest uwalniana do krwi. Ludzka leptyna jest homologiczna do mysiej w 84% [12, 14, 72] i w 83% do szczurzej [51]. Masa cząsteczkowa leptyny wynosi około 16 kDa [13]. Sekwencja aminokwasów szczurzej leptyny jest w 96% identyczna z mysią [50, 51]. Leptyna owcza ma w 88% identyczną sekwencję aminokwasową w porównaniu z mysią i różni się tylko dwoma aminokwasami od leptyny bydłowej [17, 21, 71].

Strukturę drugorzędową leptyny tworzą cztery helisy α : helisa A (pozycja 3–24), helisa B (51–67), helisa C (72–94) i helisa D (122–141). Każda helisa zawiera 5–6 skrętów. Występuje jedno β -zgięcie wg Kline i wsp. [39] lub dwa wg Considine i Caro [13]. Między pozycjami 25–50 oraz 95–121 występują długie pętle, określane odpowiednio AB i CD, natomiast między pozycjami 68–71, pętla krótka [39]. Pomiedzy cysteiną-96 i cysteiną-146 występuje wiązanie dwusiarczkowe [13].

Struktura trzeciorzędowa leptyny wskazuje, że jest to białko globularne, podobne do cytokin, takich jak: interleukiny i G-MCSF. Pod względem długości helis, leptyna wykazuje największe podobieństwo do IL-2, IL-4, MCSF – przedstawicieli rodziny o krótkich helisach. Pojedynczy mostek dwusiarczkowy między początkiem pętli CD i końcem C przypomina G-MCSF, innego przedstawiciela cytokin o krótkich helisach. Struktura drugorzędowa leptyny pozwala zaliczyć ją do cytokin o krótkich helisach [16, 39].

RECEPTOR LEPTYNY

Receptor leptyny jest zaliczany do rodziny klasy I receptora cytokiny [61]. Jakkolwiek znany jest jeden gen (OB-R) zlokalizowany u człowieka w chromosomie 1p31 [8, 9], jednak w wyniku alternatywnego składowania, istnieją różne izoformy jego białkowego produktu. Dotychczas zidentyfikowano 6 funkcjonalnych izoform receptora leptyny (Ob-Ra, Ob-Rb, ..., Ob-Rf) [13, 54, 61]. Wszystkie izoformy mają domenę zewnątrzkomórkową zbudowaną z 840 aminokwasów. Domena przezbłonowa, z wyjątkiem Ob-Re, złożona jest z 34 aminokwasów. Ob-Re nie ma tej domeny, jak również domeny cytoplazmatycznej. Poszczególne izoformy różnią się wielkością domeny cytoplazmatycznej. Na tej podstawie wyróżnia się długie receptory leptyny (np. Ob-Rb) i krótkie (np. Ob-Ra) [13, 61].

Receptor leptyny zawiera fragment homologiczny do gp130. To upodabnia Ob-R do receptorów IL-6, LIF, GCSF, onkostatyny M – czyli receptorów cytokin o długich helisach [35, 39]. Jednak gp130 nie bierze udziału w transmisji sygnału leptynowego w komórce.

Ob-Rb ma najdłuższą domenę cytoplazmatyczną (302 aminokwasy), zawierającą miejsca interakcji dla kinazy tyrozynowej, kinazy Janus (kinaza Jak, Jak) i białek STAT, czyli cytoplazmatycznych czynników transkrypcyjnych, które są charakterystycznymi przekąźnikami drugiego rzędu w transmisji sygnału od receptora cytokiny. Ponadto znajdują się tu dwa wysoce konserwatywne rejony, box 1 i box 2, uczestniczące prawdopodobnie w transmisji sygnału. Ob-Ra, należący do krótkich receptorów, ma domenę cytoplazmatyczną złożoną z 34 aminokwasów, zawierającą miejsce interakcji tylko dla kinazy Jak. Inne, także krótkie receptory mogą zawierać tylko box 1 [61, 69, 70].

Początkowo sądzono, że ze względu na budowę domeny cytoplazmatycznej, tylko Ob-Rb jest zdolny do transmisji sygnału w komórce. Obecnie wiadomo, że taką rolę może spełniać także Ob-Ra [70]. Interesująca wydaje się być rola Ob-Re, który nie ma domeny przezbłonowej i cytoplazmatycznej i dlatego może być wydzielany jako rozpuszczalny receptor. Być może jego funkcja polega na przyłączaniu i inaktywacji krążącej we krwi leptyny [20, 31].

Lokalizacja poszczególnych izoform receptora leptyny wydaje się być specyficzna. Obecność Ob-Ra wykazano w podwzgórz, jądrach i tkance tłuszczowej. Podobną lokalizację opisano dla Ob-Rb, jakkolwiek największą jego ilość stwierdzono w podwzgórz i tyłomózgowiu [49]. Ob-Rc i Ob-Rd występuje przede wszystkim w tkance tłuszczowej, natomiast Ob-Re mRNA – w podwzgórz, sercu, jądrach, tkance tłuszczowej i łożysku [13, 20], a Ob-Rf w wysepkach Langerhansa trzustki [54]. Poziom poszczególnych izoform receptora w danej tkance lub narządzie jest różny [70].

Długa forma szczurzego receptora leptyny wykazuje 91% identyczności z mysim i 76% identyczności z ludzkim receptorem [53].

ROLA LEPTYNY W REGULACJI MASY CIAŁA

Leptyna wpływa na wiele procesów zachodzących w organizmie. Przede wszystkim warunkuje homeostazę wagi ciała. Ponadto wpływa na sekrecję insuliny, stymuluje system immunologiczny, wpływa na hemopoezę, u myszy pobudza dojrzewanie płciowe, warunkuje prawidłowy przebieg ciąży, podwyższa poziom hormonu luteinizującego, kontroluje wrażliwość na insulinę i wzmacnia pobieranie glukozy przez tkanki wrażliwe na ten hormon, zmienia metabolizm wodny (zatrzymuje potas w organizmie, a zwiększa wydalanie wody), podwyższa temperaturę ciała, wzmacnia aktywność fizyczną, wpływa na laktację [3, 30, 34, 41, 44, 63, 64, 65, 73]. Są to tylko przykładowo wymienione procesy, które są kontrolowane przez leptynę.

Stosunkowo najwięcej wiadomo na temat roli leptyny w regulacji masy ciała. Zgodnie z teorią Kennedy'ego, rozszerzoną następnie przez Colemana, syntetyzowana i wydzielana przez adipocyty leptyna działa na podwzgórze. Jedną z substancji, aktywną w rejonach podwzgórza, związanych z regulacją pobierania pokarmu jest neuropeptyd Y (NPY). Jest on syntetyzowany w jądrze łukowatym i uwalniany w jądrze przykorowym, gdzie zachodzi stymulacja pobierania pokarmu [4]. Te dwa rejony podwzgórza zawierają receptory leptyny. Neuropeptyd Y pobudza procesy anaboliczne w organizmie. Stymuluje pobieranie pokarmu, syntezę enzymów lipogenicznych, a tym samym zwiększa ilość zmagazynowanego tłuszczu, hamując jednocześnie wydatki energetyczne organizmu [59]. Leptyna hamuje syntezę NPY, obniżając ilość NPY mRNA w jądrze łukowatym podwzgórza [57, 58, 62]. Tym samym obniżone zostaje tempo wymienionych procesów anabolicznych. Można więc stwierdzić, że leptyna i NPY działają na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego.

Jednak wyniki badań wskazywały, że istnienie tylko tego mechanizmu byłoby niewystarczające w regulacji masy ciała. Erickson i wsp. [18] uzyskali szczep myszy z uszkodzonym genem kodującym NPY. Mimo że u tych organizmów nie wykrywano NPY mRNA w mózgu, miały one właściwą masę ciała oraz pobierały normalną ilość pokarmu. Ponadto, myszy te wykazywały właściwą reakcję na podaną leptynę, redukując ilość pobieranego pożywienia. Te i inne obserwacje sugerowały, że musi istnieć także inny mechanizm/czynnik, za pośrednictwem którego leptyna wywiera swoje fizjologiczne oddziaływanie.

Jednym z „kandydatów” jest CRH [55]. Wykazuje on przeciwne efekty w porównaniu z NPY. Hamuje pobieranie pokarmu, obniża ilość zmagazynowanego tłuszczu, podwyższa wydatki energetyczne. Pierwotnie CRH wykazuje ekspresję w jądrze przykorowym, a ten rejon jest także bardzo wrażliwy na anorektyczne i termogeniczne efekty CRH. Wykazano, że leptyna stymuluje ekspresję genu kodującego CRH w jądrze przykorowym [58]. Można więc stwierdzić, że leptyna przez CRH pobudza procesy kataboliczne w organizmie [59, 68].

Innym czynnikiem regulującym pobieranie pokarmu jest CART, peptyd zlokalizowany w mózgu. U doświadczalnych, otyłych zwierząt z uszkodzonym sygnałem leptynowym nie stwierdzono CART mRNA w jądrze łukowatym. Podanie tym zwierzętom leptyny stymuluje proces transkrypcji genu CART [40]. Rola CART w organizmie jest podobna do roli CRH i polega na pobudzeniu procesów katabolicznych.

Przedstawiony model regulacji pobierania pokarmu polega na zachowaniu równowagi między procesami anabolicznymi i katabolicznymi. Funkcję regulatora spełnia leptyna, która w zależności od stężenia, w odpowiednim stopniu pobudza procesy kataboliczne (stymulacja syntezy i wydzielania CRH i CART, przy jednoczesnym zahamowaniu syntezy i wydzielania NPY).

LEPTYNA A INNE CZYNNIKI

Opisany mechanizm regulacji masy ciała jest w rzeczywistości bardziej skomplikowany. W wielu procesach leptyna współdziała z niektórymi hormonami. Podobne do leptyny działanie na podwzgórze wykazuje także insulina. Hormon ten hamuje syntezę i/lub wydzielanie NPY [60]. Również wykazano, że leptyna hamuje wydzielanie insuliny przez komórki β trzustki [54], a jednocześnie podwyższa wrażliwość adipocytów na insulinę [63]. Z drugiej strony, insulina stymuluje produkcję i sekrecję leptyny w tkance tłuszczowej [3]. Leptyna wzmacnia indukowaną insuliną aktywność IRS-1 i PI 3-kinazy, czynniki niezbędne do aktywacji stymulowanego insuliną transportu glukozy. Ponadto leptyna wpływa na transport cukru (w badaniach *in vitro*) w komórkach mięśniowych i adipocytach nie stymulowanych insuliną [73].

Przedstawione interakcje leptyna – insulina nie są jedynymi, jakie opisano. Zależności różnego rodzaju wykazano także w przypadku ACTH [55], endotoksyny LPS, TNF [25], IL-1 [19, 25], TGF- β , IL-6, IL-11 [23], niektórych hormonów płciowych (LH, estradiol) [43] itd. Nie należy zapominać, że w regulacji ilości pobieranego pokarmu biorą udział także sygnały docierające do podwzgórza z jelita (mechaniczne i hormonalne) oraz związane z czynnikami psychicznymi [13].

ZAKOŃCZENIE

Rola leptyny w regulacji procesów zachodzących w organizmie jest intensywnie badana w wielu ośrodkach naukowych. Jakkolwiek badania prowadzone są w różnych kierunkach, zasadniczo koncentrują się na pewnej grupie zagadnień, takich jak:

- Jak mechanizmy regulują syntezę i wydzielanie leptyny na poziomie organizmu i komórki?
- Jaki jest powód różnicy w stężeniu leptyny w zależności od płci?
- Skąd tkanka tłuszczowa wie, że osobnik jest otyły lub pobiera nadmiar pokarmu?
- Jak wielkość adipocytu jest „tłumaczona” na produkcję leptyny? Czy jest to efekt rozciągnięcia błony plazmatycznej, czy produkcji specyficznego dla adipocytów metabolitu lipidowego, który aktywuje lub blokuje promotor genu *ob*?
- Jaka jest regulatorowa rola innych hormonów metabolicznych (insuliny, kortyzolu, GH itp.) i jak są te sygnały zintegrowane. Czy hormony te mają bezpośredni wpływ na promotor genu *ob*, czy też regulują produkcję leptyny przez wpływ na magazynowanie lipidów i metabolizm?
- Jak wygląda transdukcja sygnału leptynowego w mózgu od fosforylacji pierwszej molekuly po przyłączeniu leptyny do receptora do aktywacji genów. Obecnie

wiadomo, że leptyna aktywuje IRS-1, PI 3-K, uruchamia ścieżkę kinaz MAP oraz c-jun, c-fos, jun-B.

- Na czym polega integracja sygnału leptynowego z innymi przekaźnikami docierającymi do podwzgórza?
- Jaka jest przyczyna występowania oporności na leptynę u ludzi otyłych. Jaka jest rola leptyny w patogenezie niektórych chorób. Czy jest to defekt w transmisji sygnału leptynowego, czy mechanizmu efektorowego?
- Czy leptyna może być efektywnym środkiem terapeutycznym u otyłych ludzi, jak to wykazano dla zwierząt.
- Jaka jest rola receptorów leptyny zlokalizowanych w tkankach obwodowych.
- Czy leptyna reguluje metabolizm specyficznych narządów i tkanek, czy tylko przekazuje informację o zmagazynowanej energii w postaci tłuszczu, jak robi to w centralnym układzie nerwowym?
- Jak wygląda korelacja między działaniem leptyny a hibernacją?

Wymienione przykładowo kierunki badań ukazują, jak ogromną rolę spełnia leptyna w organizmie. Jednocześnie uzmysławia fakt, że dalecy jeszcze jesteśmy od odpowiedzi na postawione pytania.

LITERATURA

- [1] ALLISON DB, HEO M. Metaanalysis of linkage data under worst-case conditions: a demonstration using the human *OB* region. *Genetics* 1998; **148**: 859–865.
- [2] ARSLANIAN S, SUPRASONGSIN C, KALHAN SC, DRASH AL, BRNA D, JANOSKY JE. Plasma leptin in children: relationship to puberty, gender, body composition, insulin sensitivity, and energy expenditure. *Metab.* 1998; **47**: 309–312.
- [3] BARR VA, MALIDE D, ZARNOWSKI MJ, TAYLOR SI, CUSHMAN SW. Insulin stimulates both leptin secretion and production by rat white adipose tissue. *Endocrinol.* 1997; **138**: 4463–4472.
- [4] BECK B, KOZAK R, STRICKER-KRONGRAD A, BURLET C. Neuropeptide Y release in the paraventricular nucleus of Long-Evans rats treated with leptin. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **242**: 636–639.
- [5] BIS, GAVRILOVA O, GONG D-W, MASON MM, REITMAN M. Identification of a placental enhancer for the human leptin gene. *J Biol Chem* 1997; **272**: 30583–30588.
- [6] CAMPFIELD LA, SMITH FJ, GUISEZ Y, DEVOS R, BURN P. Recombinant mouse *OB* protein: Evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 1995; **269**: 546–549.
- [7] CARO JF, SINHA MK, KOLACZYNSKI JW, ZHANG PL, CONSIDINE RV. Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes* 1996; **45**: 1455–1462.
- [8] CHUA SC Jr, CHUNG WK, WU-PENG S, ZHANG Y, LIU SM, TARTAGLIA L, LEIBEL RL. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the *ob* (leptin) receptor. *Science* 1996; **271**: 994–996.
- [9] CHUNG WK, POWER-KEHOE L, CHUA M, LEIBEL RL. Mapping of the *OB* receptor to 1p in a region of nonconserved gene order from mouse and rat to human. *Genome Research* 1996; **6**: 431–438.

- [10] COLEMAN DL. Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia* 1973; **9**: 294–298.
- [11] COMUZZIE AG, ALLISON DB. The search for human obesity genes. *Science* 1998; **280**: 1374–1377.
- [12] CONSIDINE RV. Weight regulation, leptin and growth hormone. *Horm Res* 1997; **48** (suppl. 5): 116–121.
- [13] CONSIDINE RV, CARO JF. Leptin and the regulation of body weight. *In: J Biochem Cell Biol* 1997; **29**: 1255–1272.
- [14] CONSIDINE RV, CONSIDINE EL, WILLIAMS CJ, NYCE MR, MAGOSIN SA, BAUER TL, ROSATO EL, CARO JF. Evidence against either a premature stop codon or the absence of obese gene mRNA in human obesity. *J Clin Invest* 1995; **95**: 2986–2988.
- [15] CONSIDINE RV, SINHA MK, HEIMAN ML, KRIAUCIUNAS A, STEPHENS TW, NYCE MR, OHANNESIAN JP, MARCO CC, McKEE LJ, BAUER TL, CARO JF. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *New Engl J Med* 1996; **334**: 292–295.
- [16] DiFRANCESCO V, GARNIER J, MUNSON PJ. Protein topology recognition from secondary structure sequences: application of the hidden Markov models to the alpha class proteins. *J Mol Biol* 1997; **267**: 446–463.
- [17] DYER CJ, SIMMONS JM, MATTERI RL, KEISLER DH. cDNA cloning and tissue-specific gene expression of ovine leptin, NPY-Y1 receptor, and NPY-Y2 receptor. *Dom Anim Endocrinol* 1997; **14**: 295–303.
- [18] ERICKSON JC, CLEGG KE, PALMITER RD. Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature* 1996; **381**: 415–418.
- [19] FAGGIONI F, FANTUZZI G, FULLER J, DINARELLO CA, FEINGOLD KR, GRUNFELD C. IL-1 mediates leptin induction during inflammation. *Am J Physiol* 1998; **274**: R204–R208
- [20] GAVRILOVA O, BARR V, MARCUS-SAMUELS B, REITMAN M. Hiperleptinemia of pregnancy associated with the appearance of a circulating form of the leptin receptor. *J Biol Chem* 1997; **272**: 30546–30551.
- [21] GERTLER A, SIMMONS J, KEISLER DH. Large-scale preparation of biologically active recombinant ovine obese protein (leptin). *FEBS Lett* 1998; **422**: 137–140.
- [22] GONG DW, BI S, PRATLEY RE, WEINTRAUB BD. Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. *J Biol Chem* 1996; **271**: 3971–3974.
- [23] GRANOWITZ EV. Transforming growth factor-enhances and pro-inflammatory cytokines inhibit *ob* gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **240**: 382–385.
- [24] GREEN ED, MAFFEI M, BRADEN VV, PROENCA R, De SILVA U, ZHANG Y, CHUA SC Jr, LEIBEL RL, WEISSENBACH J, FRIEDMAN JM. The human obese (*OB*) gene: RNA expression pattern and mapping on the physical, cytogenetic, and genetic maps of chromosome 7. *Genome Res* 1995; **5**: 5–12
- [25] GRUNFELD C, ZHAO C, FULLER J, POLLOCK A, MOSER A, FRIEDMAN J, FEINGOLD KR. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the *ob* gene product, in hamster. *J Clin Invest* 1996; **97**: 2152–2157.
- [26] HAFNER SM, STERN MP, MIETTINEN H, WEI M, GINGERICH RL. Leptin concentrations in diabetic and nondiabetic Mexican-Americans. *Diabetes* 1996; **45**: 822–834.
- [27] HALAAS JL, GAJIWALA KS, MAFFEI M, COHEN SL, CHAIT BT, RABINOWITZ D, LALLONE RL, BURLEY SK, FRIEDMAN JM. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995; **269**: 543–546.
- [28] HAMANN A, MATTHAEI S. Regulation of energy balance by leptin. *Exptl Clin Endocrinol Diabetes* 1996; **104**: 293–300.

- [29] HASSINK SG, SHESLOW DV, de LANCEY E, OPENTANOVA I, CONSIDINE RV, CARO JF. Serum leptin in children with obesity: relationship to gender and development. *Pediatrics* 1996; **98**: 201–203.
- [30] HAYNES WG, MORGAN DA, WALSH SA, SIVITZ WI, MARK AL. Cardiovascular consequences of obesity: role of leptin. *Clin Exptl Pharmacol Physiol* 1998; **25**: 65–69.
- [31] HAYNES WG, SIVITZ WI, MORGAN DA, WALSH SA, MARK AL. Sympathetic and cardiorenal actions of leptin. *Hypertension* 1997; **30**, part 2: 619–623.
- [32] HE Y, CHEN J, QUON MJ, REITMAN M. The mouse obese gene. *J Biol Chem* 1995; **270**: 28887–28891.
- [33] HICKEY MS, ISRAEL RG, GARDINER SN, CONSIDINE RV, Mc CAMMON MR, TYNDALL GL, HOUMARD JA, MARKS RHL, CARO JF. Gender differences in serum leptin levels in humans. *Biochem Mol Med* 1996; **59**: 1–6.
- [34] HOUSEKNECHT KL, McGUIRE MK, PORTOCARRERO CP, McGUIRE MA, BEERMAN K. Leptin is present in human milk and is related to maternal plasma leptin concentration and adiposity. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **240**: 742–747.
- [35] IIDA M, MURAKAMI T, ISHIDA K, MIZUNO A, KUWAJIMA M, SHIMA K. Phenotype-linked amino acid alteration in leptin receptor cDNA from Zucker fatty (*fa/fa*) rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **222**: 19–26.
- [36] ISSE N, OGAWA Y, TAMURA N, MASUZAKI H, MORI K, OKAZAKI T, SATOH N, SHIGEMOTO M, YOSHIMASA Y, NISHI S, HOSODA K, INAZAWA J, NAKAO K. Structural organization and chromosomal assignment of the human obese gene. *J Biol Chem* 1995; **270**: 27728–27733.
- [37] KENNEDY GC. The role of depot fat in the hypothalamus control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond (Biol)* 1953; **140**: 579–592.
- [38] KLEIN S, COPPACK SV, MOHAMED-ALI V, LANDT M. Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans. *Diabetes* 1996; **45**: 984–987.
- [39] KLINE AD, BECKER GW, CHURGAY LM, LANDEN BE, MARTIN DK, MUTH WL, RATHNACHALAM R, RICHARDSON JM, SCHONER B, ULMER M, HALE JE. Leptin is a four-helix bundle: secondary structure by NMR. *FEBS Lett* 1997; **407**: 239–242.
- [40] KRISTENSEN P, JUDGE ME, THIM L, RIBEL U, CHRISTIANSEN KN, WULFF BS, CLAUSEN JT, JENSEN PB, MADSEN OD, VRANG N, LARSEN PJ, HALSTRUP S. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 1998; **393**: 72–76.
- [41] LANDT M, GINGERICH RL, HAVEL PJ, MUELLER WM, SCHONER B, HALE JE, HEIMAN ML. Radioimmunoassay of rat leptin: sexual dimorphism reversed from humans. *Clin Chem* 1998; **44**: 565–570.
- [42] LEROY P, DESSOLIN S, VILLAGEOIS P, MOON BC, FRIEDMAN JM, AILHAUD G, DANI C. Expression of *ob* gene in adipose cells. *J Biol Chem* 1996; **271**: 2365–2368.
- [43] LICINIO J, NEGRO JB, MANTZOROS C, KAKLAMANI V, WONG M-L, BONGIORNO PB, MULLA A, CEARNAL L, VELDHUIS JD, FLIER JS, McCANN SM, GOLD PW. Synchronicity of frequently sampled, 24-h concentrations of circulating leptin, luteinizing hormone, and estradiol in healthy women. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 2541–2546.
- [44] LOSTAO MP, URDANETA E, MARTINEZ-ANSÓ E, BARBER A, MARTINEZ JA. Presence of leptin receptors in rat small intestine and leptin effect on sugar absorption. *FEBS Lett* 1998; **423**: 302–306.
- [45] LUKE AH, ROTIMI CN, COOPER RS, LONG AE, FORRESTER TE, WILKS R, BENNETT FJ, OGUNBIYI O, COMPTON JA, BOWSHER RR. Leptin and body composition of Nigerians, Jamaicans, and US blacks. *Am J Clin Nutr* 1998; **67**: 391–396.
- [46] MA Z, GINGERICH RL, SANTIAGO JV, KLEIN S, SMITH CH, LANDT M. Radioimmunoassay of leptin in human plasma. *Clin Chem* 1996; **42**: 942–946.

- [47] MAC DOUGALD OA, HWANK CS, FAN H, LANE MD. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 9034–9037.
- [48] MASUZAKI H, OGAWA Y, ISSE N, SATOH N, OKAZAKI T, SHIGEMOTO M, MORI K, TAMURA N, HOSODA K, YOSHIMASA Y, JINGAMI H, KAWADA T, NAKAO K. Human obese gene expression: adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue. *Diabetes* 1995; **44**: 855–858.
- [49] MERCER JG, MOAR M, HOGGARD N. Localization of leptin receptor (Ob-R) messenger ribonucleic acid in the rodent hindbrain. *Endocrinol* 1998; **139**: 29–34.
- [50] MURAKAMI T, SHIMA K. Cloning of rat *obese* cDNA and its expression in obese rats. *Biochim Biophys Res Commun* 1995; **209**: 944–952.
- [51] OKAGAWA Y, MASUZAKI H, ISSE N, OKAZAKI T, MORI K, SHIGEMOTO M, SATOH N, TAMURA N, HOSODA K, YOSHIMASA Y, JINGAMI H, KAWADA T, NAKAO K. Molecular cloning of rat *obese* cDNA and augmented gene expression in genetically obese Zucker fatty (*fa/fa*) rats. *J Clin Invest* 1995; **96**: 1647–1652.
- [52] PELLEYMOUNTER M, CULLEN M, BAKER M, HECHT R, WINTERS D, BOONE T, COLLINS F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in *ob/ob* mice. *Science* 1995; **269**: 540–543.
- [53] PHILLIPS MS, LIU Q, HAMMOND HA, DUGAN V, HEY PA, CASKEY CT, HESS JF. Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nature-Genetics* 1996; **13**: 18–19.
- [54] POITOUT V, ROUAULT C, GUERRE-MILLO M, BRIAUD I, REACH G. Inhibition of insulin secretion by leptin in normal rodent islets of Langerhans. *Endocrinol* 1998; **139**: 822–826.
- [55] RABER J, CHEN S, MUCKE L, FENG L. Corticotropin-releasing factor and adrenocorticotrophic hormone as potential central mediators of *OB* effects. *J Biol Chem* 1997; **272**: 15057–15060.
- [56] ROSENBAUM M, NICOLSON M, HIRSCH J, HEYMSFIELD SB, GALLAGHER D, CHU F, LEIBEL RL. Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; **81**: 3424–3427.
- [57] SCHWARTZ MW, ERICKSON JC, BASKIN DG, PALMITER RD. Effect of fasting and leptin deficiency on hypothalamic neuropeptide Y gene transcription *in vivo* revealed by expression of a *lacZ* reporter gene. *Endocrinol* 1998; **139**: 2629–2635.
- [58] SCHWARTZ MW, SEELEY RJ, CAMPFIELD LA, BURN P, BASKIN DG. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 1996; **98**: 1101–1106.
- [59] SCHWARTZ MW, SEELEY RJ, WOODS SC. Wasting illness as a disorder of body weight regulation. *Proc Nutr Soc* 1997; **56**: 785–791.
- [60] SCHWARTZ MW, SIPOLS AJ, MARKS JL, SANACORA G, WHITE JD, SCHEURINCK A, KAHN SE, BASKIN DG, WOODS SC, FIGLEWICZ DP, PORTE D Jr. Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinol* 1992; **130**: 3608–3616.
- [61] SHARMA K, CONSIDINE RV. The *Ob* protein (leptin) and the kidney. *Kidney Internat* 1998; **53**: 1483–1487.
- [62] SHIODA S, FUNAHASHI H, NAKAJO S, YADA T, MARUTA O, NAKAI Y. Immunohistochemical localization of leptin receptor in the rat brain. *Neurosc Lett* 1998; **243**: 41–44.
- [63] SIVITZ WI, WALSH SA, MORGAN DA, THOMAS MJ, HAYNES WG. Effects of leptin on insulin sensitivity in normal rats. *Endocrinol* 1997; **138**: 3395–3401.
- [64] TAMURA T, GOLDENBERG RL, JOHNSTON KE, CLIVER SP. Serum leptin concentrations during pregnancy and their relationship to fetal growth. *Obstet Gynecol* 1998; **91**: 389–395.
- [65] URBANSKI HF, PAU K-YF. A biphasic developmental pattern of circulating leptin in male rhesus macaque (*Macaca mulatta*). *Endocrinol*. 1998; **139**: 2284–2286.

- [66] WABETSCH M, BLUM WF, MUCHE R, BRAUN M, HUBE F, RASCHER W, HEINZE E, TELLER W, HAUNER H. Contribution of androgens to the gender difference in leptin production in obese children and adolescents. *J Clin Invest* 1997; **100**: 808–813.
- [67] WEIGLE DS., BUKOWSKI TR, FOSTER DC, HOLDERMAN S, KRAMER JM, LASSER G, LOFTONDAY CE, PRUNKARD DE, RAYMOND C, KUIJPER JL. Recombinant *ob* protein reduces feeding and body weight in the *ob/ob* mouse. *J Clin Invest* 1995; **96**: 2065–2070.
- [68] WIDMAIER EP, LONG J, CADIGAN B, GURGEL S, KUNZ TH. Leptin, corticotropin-releasing hormone (CRH) and neuropeptide Y (NPY) in free-ranging pregnant bats. *Endocrine* 1997; **7**: 145–150.
- [69] YAMASHITA T, MURAKAMI T, IIDA M, KUWAJIMA M, SHIMA K. Leptin receptor of Zucker fatty rat performs reduced signal transduction. *Diabetes* 1997; **46**: 1077–1080.
- [70] YAMASHITA T, MURAKAMI T, OTANI S, KUWAJIMA M, SHIMA K. Leptin receptor signal transduction: OBRa and OBRb of *fa* type. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **246**: 752–759.
- [71] ZHANG F, BASINSKI MB, BEALS JM, BRIGGS SL, CHURGAY LM, CLAWSON DK, Di MARCHI RD, FURMAN TC, HALE JE, HSIUNG HM, SCHONER BE, SMITH DP, ZHANG XY, WERY J-P, SCHWEITZ RW. Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature* 1997; **387**: 206–209.
- [72] ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M, BARONE M, LEOPOLD L, FRIEDMAN JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; **372**: 425–432.
- [73] ZIERATH JR, FREVERTEU, RYDER JW, BERGGREN P-O, KAHN BB. Evidence against a direct effect of leptin on glucose transport in skeletal muscle and adipocytes. *Diabetes* 1998; **47**: 1–4.

Redaktor prowadzący – Jacek Kuźnicki

Otrzymano: 01.12. 1998 r.

Przyjęto: 15.01. 1999 r.

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

ROLA BIAŁEK Glut W DYFUZJI GLUKOZY DO KOMÓREK SSACZYCH. II. WPŁYW INSULINY NA AKTYWNOŚĆ Glut 1 I Glut 4

ROLE OF Glut PROTEINS IN GLUCOSE TRANSPORT
INTO MAMMALIAN CELLS. II. THE EFFECT OF INSULIN
ON ACTIVITY OF Glut 1 AND Glut 4

Leszek SZABLEWSKI

Zakład Biologii Ogólnej i Parazytologii, Instytutu Biostruktury,
Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie: Badania nad biologią transporterów glukozy dotyczą między innymi wyjaśnienia roli insuliny w regulacji funkcji nośników. Jednym z pierwszych, istotnych wyników było opisanie recykulacji Glut 4 w komórce przez system błon endosomów i błony plazmatycznej. W procesie internalizacji i eksternalizacji transportera prawdopodobnie istotną rolę odgrywa motyw dileucynowy zlokalizowany w C-końcowej części transportera. Innym, równie ważnym momentem przełomowym w badaniach, było poznanie wczesnych sygnałów uruchamianej przez insulinę ścieżki sygnałowej w komórce, mającej wpływ na regulację transportu glukozy.

Słowa kluczowe: Glut 1, Glut 4, recykulacja, aktywność katalityczna, insulina, ścieżki sygnałowe.

Summary: Studies on glucose transporter biology have focused predominantly on the insulin-regulated glucose transport system. One approach to unraveling the molecular details of the regulation of glucose transport exploits new findings indicating that Glut 4 continuously recycles through membranes of the endosomal tubulovesicular system and plasma membrane. Insulin-mediated Glut 4 occupancy of the cell-surface membrane occurs by partial depletion of Glut 4 content in intracellular membranes. A dileucine motif located in COOH-terminus appears to cause rapid endocytosis and retention of Glut 4 within intracellular membranes. Another approach to understanding insulin action on glucose transport is to discover the earliest events triggered by insulin receptor activation that specifically relate to regulation of glucose transport.

Key words: Glut 1, Glut 4, recycling, insulin.

Wykaz stosowanych skrótów: **EGF** – czynnik wzrostu naskórka; **Glut 1, Glut 4** – transportery glukozy (izoforma 1 i 4); **Grb** – białko związane z receptorem czynnika wzrostu; **GSK-3** – 3 kinaza syntazy

glikogenu, **IR** – receptor insuliny; **IRS-1** – substrat białkowej kinazy tyrozynowej receptora insuliny; **K_m** – stała Michaelisa; **MAPK** – kinaza białkowa aktywowana przez mitogen; **PI-3K** – 3 kinaza fosfatydyloinozytoli; **PDGF** – czynnik wzrostu pochodzący z płytek krwi; **PtdIns(4)P** – fosfatydyloinozytolo(4)fosforan; **PtdIns(4,5)P₂** – fosfatydyloinozytolo(4,5)bisfosforan; **PTP2** – białkowa fosfataza tyrozynowa-2; **Raf** – białkowa kinaza serynowo-treoninowa; **Ras** – rodzina białek onkogennych; **SH-2** – domena homologii z białkiem Src; **Shc** – substrat białkowych kinaz receptorów EGF, PDGF i insuliny; **Sos** – czynnik wymieniający nukleotydy guaninowe; **V_{max}** – maksymalna szybkość transportu glukozy.

WSTĘP

Szybkość pobierania glukozy przez komórki zależy m.in. od aktywności danego transportera, mierzonej wartością K_m . Jednak badania wykazały, że w przypadku niektórych narządów szybkość transportu cukru przez błonę komórkową jest uzależniona od obecności insuliny. W adipocytach ludzkich hormon ten powoduje 2–4-krotny wzrost transportu glukozy, w szczurzych nawet 20–30-krotny [35, 63, 74, 78, 83]. Podobną wrażliwość komórek na insulinę opisano w mięśniach szkieletowych i serca. U szczura hormon zwiększa V_{max} pobierania glukozy przez komórki mięśniowe 7 razy [67], u człowieka – 2 razy [14].

Istniały różne teorie próbujące wyjaśnić wzrost V_{max} pobierania glukozy pod wpływem insuliny. Jednak dopiero zastosowanie metod immunochemicznych pozwoliło zrozumieć podłoże tych zmian. Stymulowany insuliną wzrost transportu glukozy do komórek w znacznym stopniu jest spowodowany zwiększeniem stężenia nośnika w błonie komórkowej. W błonie plazmatycznej komórek nie kontaktujących się z hormonem znajduje się około 10% puli transportera. Reszta jest zlokalizowana wewnątrzkomórkowo [24]. Tak więc insulina powoduje translokację transportera do błony plazmatycznej [11, 24, 25, 42, 64, 69]. W komórkach tkanki tłuszczowej i mięśni szkieletowych transport heksoz zachodzi głównie przy udziale Glut 1 i Glut 4. Aktywność obu izoform nośników jest regulowana insuliną [11, 47].

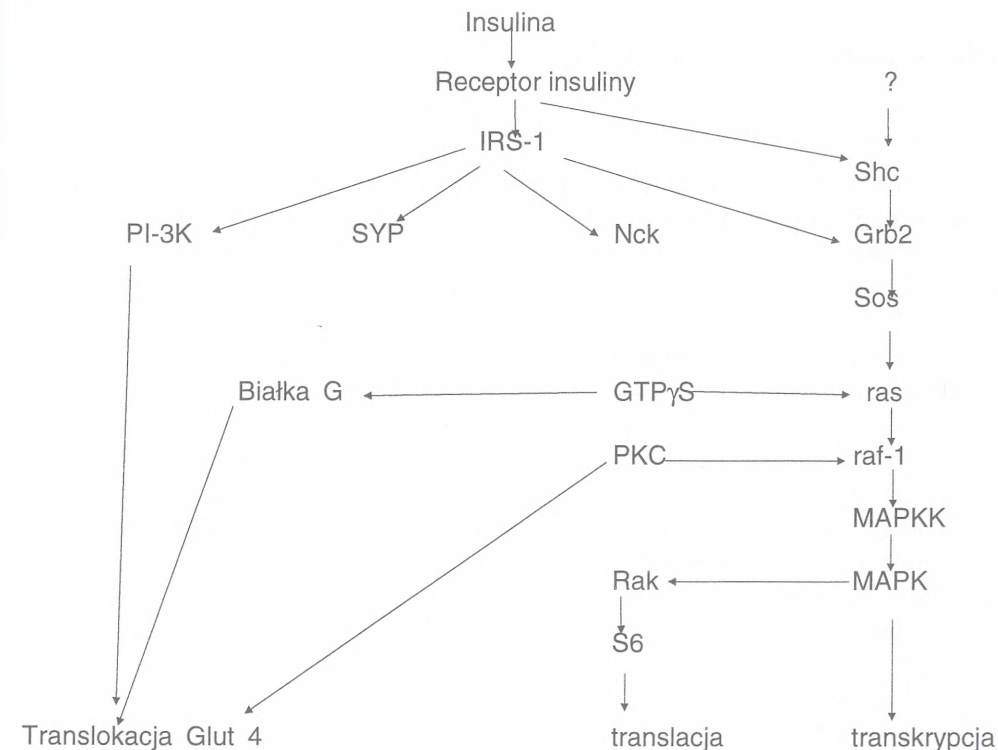
MECHANIZM DZIAŁANIA INSULINY

Insulina, hormon wydzielany przez komórki β trzustki, reguluje wiele procesów biologicznych, zarówno metabotropowych jak i mitogennych, wykazując tym samym efekt plejotropowy [50]. Hormon przyłącza się do podjednostki α receptora insuliny. Wskutek tego zachodzą zmiany konformacyjne powodujące uaktywnienie podjednostki β wykazującej aktywność kinazy tyrozynowej. Autofosforylacja miejsc tyrozynowych podjednostek β stymuluje także aktywność kinazy tyrozynowej receptora w stosunku do białkowych substratów cytoplazmatycznych. Jednym z nich jest

IRS-1. Ma on liczne miejsca tyrozynowe, serynowe i treoninowe, potencjalne miejsca fosforylacji. Fosforylacja tyrozyn IRS-1 umożliwia asocjację tego białka z innymi cytoplazmatycznymi białkami regulatorowymi, zawierającymi domeny SH2. Do takich białek należą np. PI-3K, PTP2 (SYP, SHPTP2), Grb2, Nck (rys. 1).

1. Rola p21 Ras w translokacji transportera

Insulina może stymulować aktywność biologiczną białek Ras przy udziale dwóch niezależnych włączników [11]. Fosforylacja miejsc tyrozynowych w IRS-1 i Shc ujawnia wysokie powinowactwo wobec domeny SH2 w białku Grb2, które asocjuje poprzez swoje regiony SH3 z bogatymi w prolinę białkami Sos (Sos-1 i Sos-2). Insulina powoduje gwałtowną asocjację Grb-2 zarówno z IRS-1, jak i białkami Shc. Ponadto, białka Sos tworzą kompleksy z IRS-1 i Shc w odpowiedzi na insulinę [2, 68]. Shc jest białkiem cytoplazmatycznym. Nieznany jest dotychczas mechanizm przyłączania tego białka do błony plazmatycznej w komórkach insulino-wrażliwych w odpowiedzi na hormon. Być może Shc łączy się przez swoją domenę SH2 z jakimś białkiem błonowym mającym ufosforylowaną tyrozynę.



RYSUNEK 1. Wpływ insuliny na procesy zachodzące w komórce, na schemacie przedstawiono także ścieżki sygnałowe związane z translokacją Glut 4 (wg różnych autorów)

Białko p21 Ras oddziałując z N-końcową domeną kinazy białkowej Raf powoduje uaktywnienie ścieżki MAP-kinaz (MAPKK, MAPK) [11, 50, 59]. Fosforylacja MAP-kinaz w efekcie katalizuje fosforylację GSK-3, hamując tym samym działanie enzymu [76, 82]. Uruchomienie tej ścieżki sygnałowej w komórce powoduje także uaktywnienie czynników transkrypcyjnych, odpowiedzialnych za regulację ekspresji genów w komórce (rys. 1).

Wyniki badań wskazują jednoznacznie, że udział białka Ras jest niezbędny w transmisji sygnałów komórkowych pod wpływem insuliny. Natomiast niejasna pozostaje rola tego białka w przemieszczaniu transporterów glukozy. Mikroiniekcja przeciwciał anti-p21 Ras do kardiomiocytów spowodowała obniżenie o około 50% stymulowanego insuliną pobierania glukozy [60]. Natomiast analogiczne badania wykonane na adipocytach 3T3-L1 nie wykazały żadnego wpływu przeciwciał na omawiany proces [32]. Ekspresja onkogenego mutantu p21 Ras w adipocytach [52] lub kardiomiocytach [60] powodowała wzrost pobierania glukozy przez komórki, a ponadto w adipocytach obserwowano wzrost redystrybucji Glut 1 i Glut 4 do błony plazmatycznej [36, 52]. Wyniki innych doświadczeń wskazują natomiast na udział Ras wyłącznie w mitogennej ścieżce sygnałowej [21, 28, 31]. Ponadto, EGF także aktywuje kaskadę MAP-kinaz, ale nie wpływa na transport glukozy [18, 70]. Jeśli więc p21 Ras odgrywa jakąś rolę w tym procesie, stanowić może wyłącznie jeden z dodatkowych sygnałów [11].

2. Rola PI-3K w translokacji transportera

3-kinaza fosfatydyloinozytolu składa się z podjednostki regulatorowej o masie 85 kDa (p85) i z podjednostki katalitycznej o masie 110 kDa (p110). Podjednostka regulatorowa przez swoje domeny SH2 łączy się z IRS-1. Powstałe w wyniku asocjacji zmiany konformacyjne p85 umożliwiają przyłączenie p110 i aktywację PI-3K. Czynny enzym przez fosforylację PtdIns(4)P oraz PtdIns(4,5)P₂ stymuluje biosyntezę nowych przekaźników drugiego rzędu [50]. Jednak molekularny mechanizm ich działania nie został w pełni poznany.

Wyniki doświadczeń wskazują, że aktywacja PI-3-kinazy jest konieczna w regulacji transportu glukozy [15, 20, 21, 28, 34]. Dodanie do hodowli komórek specyficznego inhibitora tego enzymu, wortmaniny, blokuje stymulowany insuliną transport glukozy w adipocytach 3T3-L1 i miocytach [17, 66]. Analogiczny wynik uzyskano po dodaniu do hodowli adipocytów inhibitora LY294002 [4]. Mikroiniekcja dominującego negatywnego mutantu podjednostki 85 kDa PI-3-kinazy do komórek 3T3-L1 także spowodowała zahamowanie translokacji Glut 4 w odpowiedzi na insulinę [51, 61].

EGF oraz PDGF także aktywują PI-3K, ale nie wpływają na transport glukozy w adipocytach [18, 65, 70, 84]. Istnieją dwie hipotezy tłumaczące ten wynik [11]. Pierwsza z nich zakłada, że aktywacja PI-3-kinazy nie wystarcza do stymulacji

transportu glukozy do komórki. Konieczne jest w tym przypadku uruchomienie innych ścieżek sygnałowych w komórce [11, 34]. Według drugiej teorii, lokalizacja PI-3-kinazy i nagromadzenie produktów fosforylacji w specyficznym kompartmentcie komórkowym warunkuje translokację transporterów glukozy w błonie plazmatycznej [11, 33, 65, 77].

WPLYW INSULINY NA RECYRKULACJĘ TRANSPORTERÓW GLUKOZY

1. Recyrkulacja transporterów glukozy

W adipocytach i komórkach mięśniowych zidentyfikowano dwie izoformy recyrkulujących transporterów. Są to Glut 1 i Glut 4 [11]. Udział Glut 4 w podstawowym, bez stymulacji insuliną pobieraniu glukozy przez komórki tkanki tłuszczowej i mięśniowej jest niewielki. Wynika to z faktu lokalizacji transportera przede wszystkim w kompartmentach wewnątrzkomórkowych. Ogólna zawartość Glut 1 w tych komórkach jest znacznie niższa niż Glut 4 [16]. Jednak ze względu na jego lokalizację przede wszystkim w błonie plazmatycznej, prawdopodobnie odgrywa on istotną rolę w transporcie glukozy do komórki w stanie podstawowym. Obie izoformy transporterów mają zdolność recyrkulacji. Pod wpływem insuliny gwałtownie wzrasta ilość Glut 4 w błonie plazmatycznej (około 50% zlokalizowanego wewnątrzkomórkowo transportera ulega eksternalizacji w ciągu około 5 minut, w temperaturze 37°C) [11]. Wówczas ta izoforma odgrywa istotną rolę w transporcie glukozy.

Większość badań dotyczy recyrkulacji Glut 4. Z tego powodu omawiany proces zostanie przedstawiony na przykładzie tej izoformy. Podczas endocytozy, cząsteczki transportera grupują się w wgłębieniach błony plazmatycznej opłaszczonych klatryną. Powstaje kompleks transporter-klatryna. W wyniku dalszego wpuklania wgłębień i ich odrywania, tworzą się endosomy. Wewnątrz komórki Glut 4 jest stwierdzany w tubularno-pęcherzykowych elementach endosomalno-trans Golgi (szczególnie w mikrosomach o niskiej gęstości elektronowej). W procesie egzocytozy następuje wbudowanie transportera w błonę plazmatyczną.

2. Model regulowanej egzocytozy [38]

Według tego modelu, mechanizm transportu Glut 4 do błony plazmatycznej w odpowiedzi na insulinę jest analogiczny do sekrecji w wyspecjalizowanych komórkach endokrynowych lub komórkach, które uwalniają neurotransmitery. Zgodnie z tym założeniem, Glut 4 jest zlokalizowany w błonie specyficznych pęcherzyków sekrecyjnych. Specyficzność tych struktur polega na obecności charakterystycznych

białek, takich jak np. synaptobrewina, VAMPs (*vesicle-associated membrane proteins*), SCAMPs (*secretory carrier membrane proteins*). W pęcherzykach zawierających Glut 4 w szczurzych adipocytach stwierdzono obecność trzech białek (36–40 kDa), które zidentyfikowano jako SCAMP [54, 79]. Ponadto wykazano, że pęcherzyki te mają podobną wielkość, współczynnik sedymentacji, gęstość i skład polipeptydowy [43], zawierają przynajmniej jedno białko, oprócz Glut, jako marker (amino-peptydaza gp 160) [42, 46, 47]. Te wszystkie dane mogą świadczyć o unikalnym, wyspecjalizowanym przedziale komórki [56, 57, 58, 59, 80, 81].

Jednak szczegółowa analiza danych doświadczalnych wskazuje, że założona analogia może być niesłuszna. Badania w mikroskopie elektronowym komórek wrażliwych na insulinę wykazały lokalizację immunoreaktywnego Glut 4 w błonach endosomalno-trans Golgi retikulum, które zawierały białka podlegające ciągłej recyrkulacji [27, 62, 72, 75, 88]. Ponadto, białka obecne w izolowanych pęcherzykach bogatych w Glut 4 regulują przemieszczanie membran i ścieżkę recyrkulacyjną we wszystkich komórkach. Przykładem takiego białka jest Rab 4, białko wiążące GTP [7, 8]. Efektem działania insuliny na adipocyty jest obniżenie poziomu zarówno białek regulatorowych, jak i Glut 4 w tych pęcherzykach. W pęcherzykach bogatych w Glut 4 stwierdzono także PI-4-kinazę, co mogłoby sugerować, że obecność ufosforylowanych pochodnych fosfatydyloinozytoli jest niezbędna w translokacji transportera. Ale PI-4-kinaza jest obecna we wszystkich innych frakcjach błonowych izolowanych adipocytów, łącznie z mitochondriami i jądrem [11]. Ponadto, wyniki badań z użyciem specyficznych inhibitorów wskazują, że za translokację transportera jest odpowiedzialna PI-3K, a nie PI-4-kinaza [11, 49, 87]. Powyższe dane raczej więc wykluczają specyficzną lokalizację Glut 4.

3. Model regulowanej recyrkulacji [38]

Alternatywny model translokacji Glut 4 sugeruje, że kompartment zawierający Glut 4 stanowi część systemu endosomalno-trans Golgi retikulum, a jego translokacja do błony komórkowej jest uwarunkowana zmianą tempa endocytozy i/lub egzocytozy.

Istotną rolę w insulinowej regulacji recyrkulacji Glut 4 odgrywa fragment C-końcowy transportera [12, 22]. Zawiera on motyw dileucynowy w pozycjach 489 i 490 [9, 85]. Jest on poprzedzony seryną (Ser 488). W wielu receptorach ta sekwencja aminokwasów wydaje się być odpowiedzialna za internalizację i dalsze losy receptora w systemie endosomalnym. Przykładem może być receptor IGF-II/Man-6-P [40, 41, 45] lub CD3 w limfocytach [13]. W tym ostatnim, internalizacja białka jest regulowana fosforylacją seryny [13]. W Glut 4 seryna 488 jest fosforylowana pod wpływem czynników podwyższających poziom cAMP w komórce i defosforylowana w odpowiedzi na insulinę [55]. Receptor IGF-II także ulega defosforylacji pod wpływem insuliny [10]. Dane te sugerują, że recyrkulacja Glut 4 jest regulowana

fosforylacją/defosforylacją Ser⁴⁸⁸, jednak bezpośrednich badań w tym kierunku dotychczas nie przeprowadzono.

Według modelu regulowanej recyrkulacji, insulina stymuluje także egzocytozę Glut 4. Również w tym procesie istotną rolę odgrywa motyw dileucynowy. Po internalizacji transportera, jego wędrówka jest ograniczona w wyniku połączenia się specyficznego receptora (*retention receptor*) z leucynami 489 i 490 transportera. Powoduje to opóźnienie egzocytozy. Natomiast insulina „uszkadzając” tę sekwencję, uniemożliwia połączenie transportera z receptorem. Jednak mechanizm, w wyniku którego hormon powoduje dezaktywację motywu dileucynowego, pozostaje nieznany [11, 38]. Potwierdzeniem tej koncepcji może być szybsze tempo recyrkulacji Glut 1, w którym brak jest sekwencji Leu-Leu, w porównaniu z Glut 4. Aby w pełni potwierdzić słuszność tej koncepcji, badano tempo endocytozy i egzocytozy w komórkach kontrolnych i stymulowanych insuliną. Niestety, uzyskiwano bardzo różne wyniki. Według jednych autorów [86] insulina, w porównaniu z kontrolą, powoduje w adipocytach wzrost egzocytozy Glut 4 o 900%, a zahamowanie tempa endocytozy transportera o 30%. Według innych badaczy [39], wartości te wynoszą odpowiednio: 300% i 70%.

Inna wersja tego modelu zakłada, że aktywacja receptora insuliny prowadzi do fosforylacji miejsc tyrozynowych IRS-1 zlokalizowanego w błonie systemu endosomalnego. Prowadzi to do pobudzenia znajdującej się w pobliżu PI-3-kinazy, czego efektem jest nagromadzenie 3' ufosforylowanych fosfoinozytoli, katalizujących ruch błony do powierzchni komórki.

Dodanie toksyny cholery [5] lub kadmu [29] do hodowli adipocytów 3T3-L1, powoduje znaczący wzrost pobierania glukozy przez komórki. Jednak te czynniki nie wpływają na zmianę stężenia Glut 1 i Glut 4 w błonie plazmatycznej. W przypadku Glut 1 stwierdzono, że pod wpływem niektórych substancji całkowita ilość transportera w błonie komórkowej nie zmienia się, wzrasta natomiast ilość aktywnego transportera [6, 19, 30]. Być może insulina powoduje, oprócz innych efektów, także wzrost wewnętrznej aktywności katalitycznej Glut 4 [23]. Możliwość wzrostu aktywności katalitycznej tego transportera wykazano np. pod wpływem wanadianu sodu [53] oraz noradrenaliny [73]. Jednak molekularny mechanizm leżący u podstaw tej regulacji nie został dotychczas poznany.

UWAGI KOŃCOWE

Poznanie roli insuliny w transporcie heksoz do komórek ma ogromne znaczenie dla medycyny. Pozwoli lepiej poznać przyczyny cukrzycy typu II, a tym samym skuteczniej leczyć chorych. Jednak przedstawione dane wskazują, że wiele pytań pozostaje na razie bez odpowiedzi, względnie istnieją teorie, które nie zostały po-

twierdzone. Jednocześnie wyniki niektórych doświadczeń jeszcze bardziej komplikują ten problem. Stwierdzono np. transmisję sygnału dla translokacji Glut 4 przez ścieżkę niezależną od insuliny [48], PI-3-kinazy [72] lub IRS-1 [1, 71]. Translokacja Glut 4 może być regulowana także przez diacylglicerol [26]. Glut 1 i Glut 4 przez kwas tiooctowy [16]. Skomplikowanym zagadnieniem wydaje się także kontrola ekspresji genu GLUT 1 [3]. Ważną rolę w aktywności katalitycznej transportera także wydaje się odgrywać N-glikozylacja transportera [37]. Przedstawione hipotezy i pytania wskazują na ogromną złożoność mechanizmów związanych z transportem glukozy do komórki. Trwają doświadczenia mające na celu pomoc chorym na cukrzycę. W bardzo szerokim zakresie prowadzone są badania dotyczące poznania przyczyn cukrzycy obu typów. Jednocześnie poszukuje się coraz skuteczniejszych metod leczenia. Bada się środki farmakologiczne, potencjalne leki, zapobiegające hiperglikemii. Duże znaczenie przypisuje się odpowiedniej diecie i wysiłkowi fizycznemu. Prowadzi się również badania, na razie laboratoryjne, wykorzystujące metody inżynierii genetycznej [11, 22, 31, 37, 42, 64, 69, 81, 88].

LITERATURA

- [1] ARAKI E, LIPES MY, PATTI M-E, BRÜNING JC, ILI BH, JOHNSON RS, KAHN CR. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 1994; **372**: 186–190.
- [2] BALTENSPERGER K, KOZMA LM, CHERNIACK AD, KLARLUND JK, CHAWLA A, BANERJEE U, CZECH MP. Binding of the Ras activator son of sevenless to insulin receptor substrate-1 signaling complexes. *Science* 1993; **260**: 1950–1952.
- [3] BEHROOZ A, ISMAIL-BEIGI F. Dual control of glut 1 glucose transporter gene expression by hypoxia and by inhibition of oxidative phosphorylation. *J Biol Chem* 1997; **272**: 5555–5562.
- [4] CHEATHAM B, VLAHOS CJ, CHEATHAM L, WANG L, BLENIS J, KAHN CR. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 4902–4911.
- [5] CLANCY B, CZECH MP. Hexose transport and membrane distribution of glucose transporter isoforms in response to cholera toxin, dibutyryl cyclic AMP and insulin in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 1990; **265**: 12434–12443.
- [6] CLOHERTY EK, DIAMOND DL, HEARD KS, CARRUTHERS A. Regulation of Glut1-mediated sugar transport by an antiport/uniport switch mechanism. *Biochem* 1996; **35**: 13231–13239.
- [7] CORMONT M, BARTOLUZZI M-N, GAUTIER N, MARI M, VAN-OBBERGHEN E, LE MARCHAND-BRUSTEL Y. Potential role of Rab 4 in the regulation of subcellular localization of Glut 4 in adipocytes. *Mol Cell Biol* 1996; **16**: 6879–6886.
- [8] CORMONT M, TANTI JF, ZAHRAONI A, VAN OBBERGHEN E, TAVITIAN A, LE MARCHAND-BRUSTEL Y. Insulin and okadaic acid induce Rab 4 redistribution in adipocytes. *J Biol Chem* 1993; **268**: 19491–19497.
- [9] CORVERA S, CHAWLA A, CHAKRABARTI R, JOLY M, BUXTON J, CZECH MP. A double leucine within the GLUT 4 glucose transporter COOH-terminal domain functions as an endocytose signal. *J Cell Biol* 1994; **126**: 979–989.

- [10] CORVERA S, FOLANDER K, CLAIRMONT KB, CZECH MP. A highly phosphorylated subpopulation of insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptors is concentrated in a clathrin-enriched plasma membrane fraction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 7567–7571.
- [11] CZECH MP. Molecular actions of insulin on glucose transport. *Annu Rev Nutr* 1995; **15**: 441–471.
- [12] DAUTERIVER, LAROUX S, BUNN RC, CHAISSON A, SANSON T, REED BC. C-terminal mutations that alter the turnover number for 3-O-methylglucose transport by GLUT 1 and GLUT 4. *J Biol Chem* 1996; **271**: 11414–11421.
- [13] DIETRICH J, HOU X, WEGENER AMK, GEISLER C. CD3 contains a phosphoserine-dependent di-leucine motif involved in down-regulation of the T cell receptor. *EMBO J* 1994; **13**: 2156–2166.
- [14] DOHM GL, TAPSCOTT EB, PORIES WJ, FLICKINGER EG, MEELHEIM D, FUSHIKI T, ATKINSON SM, ELTON CW, CARO JF. An *in vitro* human muscle preparation suitable for metabolic studies: decreased insulin stimulation of glucose transport in muscle from morbidly obese and diabetic subjects. *J Clin Invest* 1988; **82**: 486–494.
- [15] EGERT S, NGUYEN N, BROSIUS III FC, SCHWAIGER M. Effects of wortmannin on insulin- and ischemia-induced stimulation of GLUT4 translocation and FDG uptake in perfused rat hearts. *Cardiovasc Res* 1997; **35**: 283–293.
- [16] ESTRADA DE, EWART HS, TSAKIRIDIS T, VOLCHUK A, RAMLALT, TRITSCHLER H, KLIP A. Stimulation of glucose uptake by the natural coenzyme α -lipoic acid/thioctic acid. Participation of elements of the insulin signaling pathway. *Diabetes* 1996; **45**: 1798–1804.
- [17] 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.
- [18] FINGAR DC, BIRNBAUM MJ. Characterization of the mitogen-activated protein kinase/90-kilodalton ribosomal protein S6 kinase signaling pathway in 3T3 adipocytes and its role in insulin-stimulated glucose transport. *Endocrinol* 1994; **134**: 728–735.
- [19] FISHER MD, FROST SC. Translocation of Glut 1 does not account for elevated glucose transport in glucose-deprived 3T3-L1 adipocytes *J Biol Chem* 1997; **271**: 11806–11809.
- [20] FREVERT EU, KAHN BB. Differential effects of constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase on glucose transport, glycogen synthase activity, and DNA synthesis in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 190–198.
- [21] GABBAY RA, SUTHERLAND C, GNUDI L, KAHN BB, OBRIEN RM, GRANNER DK, FLIER JS. Insulin regulation phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression does not require activation of the Ras/Mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Biol Chem* 1996; **271**: 1890–1897.
- [22] GARIPPA RJ, JOHNSON A, PARK J, PETRUSH RL, MC GRAW TE. The carboxyl terminus of Glut 4 contains a serine-leucine-leucine sequence that functions as a potent internalization motif in chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1996; **271**: 20660–20668.
- [23] GOODYEAR LJ, HIRSHMAN MF, NAPOLI R, CALLES J, MARKUNS JF, LJUNQVIST O, HORTON ES. Glucose ingestion causes GLUT 4 translocation in human skeletal muscle. *Diabetes* 1996; **45**: 1051–1056.
- [24] GOULD GW, BELL GJ. Facilitative glucose transporters: an expanding family. *TIBS* 1990; **15**: 18–23.
- [25] GOULD GW, HOLMAN GD. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem J* 1993; **295**: 329–341.
- [26] GUSTAVSSON J, PAPPAL S, STRLLFORS P. Translocation of insulin-regulated glucose transporter is stimulated by long-chain 1,2-diacylglycerol in rat adipocytes. *Exptl Cell Res* 1995; **221**: 438–442.

- [27] HANPETER D, JAMES DE. Characterization of the intracellular GLUT-4 compartment. *Mol Memb Biol* 1995; **12**: 263–269.
- [28] HARA K, YONEZAWA K, SAKAUE H, ANDA A, KOTANI K, KITAMURA Y, UEDA H, STEPHENS L, JACKSON TR, HAWKINS PT, DHAND R, CLARK AE, HOLMAN GD, WATERFIELD MD, KASUGA M. 1-Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for RAS activation in CHO cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 7415–7419.
- [29] HARRISON SA, BUXTON JM, CLANCY BM, CZECH MP. Evidence that erythroid-type glucose transporter intrinsic activity is modulated by cadmium treatment of mouse 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 1991; **266**: 19438–19449.
- [30] HARRISON SA, CLANCY BM, PESSINO A, CZECH MP. Activation of cell surface glucose transporters measured by photoaffinity labeling of insulin-sensitive 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 1992; **267**: 3783–3788.
- [31] HARUTA T, MORRIS AJ, ROSE DW, NELSON JG, MUECKLER M, OLEFSKY JM. Insulin-stimulated GLUT 4 translocation is mediated by divergent intracellular signaling pathway. *J Biol Chem* 1995; **270**: 27991–27994.
- [32] HAUSDORF SF, FRANGIONI JV, BIRNBAUM MJ. Role of p21^{ras} in insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 1994; **269**: 21391–21394.
- [33] HELLER-HARISON RA, MORIN M, GUILHERME A, CZECH MP. Insulin-mediated targeting of phosphatidylinositol 3-kinase to GLUT 4-containing vesicles. *J Biol Chem* 1996; **271**: 10200–10204.
- [34] HERBST JJ, ANDREWS GC, CONTILLO LG, SINGLETON DH, GENEREUX PE, GIBBS EM, LIENHARD GE. Effect of the activation of phosphatidylinositol 3-kinase by a thiophosphotyrosine peptide on glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 1995; **270**: 26000–26005.
- [35] HOLMAN GD, KOZKA IJ, CLARK AE, FLOWER CJ, SALTIS J, HABBERFIELD AD, SIMPSON IA, CUSHMAN SW. Cell surface labeling by glucose transporter isoform GLUT 4 by bis-mannose photolabel. *J Biol Chem* 1990; **265**: 18172–18179.
- [36] HOUSEKNECHT KL, ZHU AX, GNUDI L, HAPMAN A, ZIERATH JR, TOZZO E, FLIER JS, KAHN BB. Overexpression of Haras selectively in adipose tissue of transgenic mice. Evidence for enhanced sensitivity to insulin. *J Biol Chem* 1996; **271**: 11347–11355.
- [37] ING BL, CHEN H, ROBINSON KA, BUSE MG, QUON MJ. Characterization of a mutant GLUT 4 lacking the N-glycosylation site: studies in transfected rat adipose cells. *Biochim Biophys Res Commun* 1996; **218**: 76–82.
- [38] JAMES DE, PIPER RC, SLOT JW. Insulin stimulation of GLUT-4 translocation: a model for regulated recycling. *Trends in Cell Biol* 1994; **4**: 120–126.
- [39] JHUN BH, RAMPAL AL, LIU H, LACHAAL M, JUNG CY. Effects of insulin on steady state kinetics of GLUT 4 subcellular distribution in rat adipocytes. *J Biol Chem* 1992; **267**: 17710–17715.
- [40] JOHNSON KF, KORNFELD S. A His-Leu-Leu sequence near the carboxyl terminus of the cytoplasmic domain of the cation-dependent mannose-6-phosphate receptor is necessary for the lysosomal enzyme sorting function. *J Biol Chem* 1992; **267**: 17110–17115.
- [41] JOHNSON KF, KORNFELD S. The cytoplasmic tail of the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor has two signals for lysosomal enzyme sorting in the Golgi. *J Cell Biol* 1992; **119**: 249–257.
- [42] KAHN BB. Glucose transport: pivotal step in insulin action. *Diabetes* 1996; **45**: 1644–1655.
- [43] KANDROR KV, CODERRE L, PUSHKIN AV, PILCH PF. Comparison of glucose-transporter-containing vesicles from rat fat and muscle tissues: evidence for a unique endosomal compartment. *Biochem J* 1995; **307**: 383–390.
- [44] KANDROR KV, PILCH PF. gp 160, a tissue-specific marker for insulin-activated glucose transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 8017–8021.

- [45] KANDROR KV, PILCH PF. The insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor utilizes the same membrane compartment as GLUT 4 for insulin-dependent trafficking to and from the rat adipocyte cell surface. *J Biol Chem* 1996; **271**: 21703–21708.
- [46] KANDROR KV, YU L, PILCH PF. The major protein of GLUT 4-containing vesicles, gp 160, has aminopeptidase activity. *J Biol Chem* 1994; **269**: 30777–30780.
- [47] 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.
- [48] KISHI K, HAYASHI H, WANG L, KAMOHARA S, TAMAOKA K, SHIMIZU T, USHIKUBI F, NARUMIYA S, EBINA Y. Gq-coupled receptors transmit the signal for GLUT 4 translocation via an insulin-independent pathway. *J Biol Chem* 1996; **271**: 26561–26568.
- [49] KOHN AD, SUMMERS SA, BIRNBAUM MJ, ROTH RA. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem* 1996; **271**: 31372–31378.
- [50] KONARSKA L, POREMBSKA Z. Receptor insuliny W: Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce. 1995; PWN: 77–103.
- [51] KOTANI K, CAROZZI AJ, SAKAUE H, HARA K, ROBINSON LJ, CLARK SF, YONEZAWA K, JAMES DE, KOSUGA M. Requirement for phosphoinositide 3-kinase in insulin-stimulated GLUT 4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **209**: 343–348.
- [52] KOZMA L, BALTENSPERGER K, KLARLUND J, PORRAS A, SANTOS E, CZECH MP. The Ras signaling pathway mimics insulin action on glucose transporter translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 4460–4464.
- [53] KRISTIANSEN S, YOUN J, RICHTER EA. Effect of vanadate on glucose transporter (GLUT 4) intrinsic activity in skeletal muscle plasma membrane giant vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1282**: 71–75.
- [54] LAURIE SM, CAIN CC, LIENHARD GE, CASTLE JD. The glucose transporter GLUT 4 and secretory carrier membrane proteins (SCAMPs) colocalize in rat adipocytes and partially segregate during insulin stimulation. *J Biol Chem* 1993; **268**: 19110–19117.
- [55] LAWRENCE JC Jr., HIKEN JF, JAMES DE. Stimulation of glucose transporter phosphorylation by okadaic acid in rat adipocytes. *J Biol Chem* 1990; **265**: 19768–19776.
- [56] LIVINGSTONE C, JAMES DE, RICE JE, HANPETER D, GOULD GW. Compartment ablation analysis of the insulin-responsive glucose transporter (GLUT 4) in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J* 1996; **315**: 487–495.
- [57] MALIDE D, CUSHMAN SW. Morphological effects of wortmannin on the endosomal system and GLUT4-containing compartments in rat adipose cells. *J Cell Sc* 1997; **110**: 2795–2806.
- [58] MALIDE D, ST-DENIS J-F, KELLER SR, CUSHMAN SW. Vp165 and GLUT4 share similar vesicle pools along their trafficking pathways in rat adipose cells. *FEBS Lett* 1997; **409**: 461–468.
- [59] MALIDE D, DWYER NK, BLANCHETTE-MACKIE EJ, CUSHMAN SW. Immunocytochemical evidence that GLUT4 resides in a specialized translocation post-endosomal VAMP2-positive compartment in rat adipose cells in the absence of insulin. *J Histochem Cytochem* 1997; **45**: 1083–1096.
- [60] MANCHESTER J, KONG X, LOWRY OH, LAWRENCE JC jr. Ras signaling in the activation of glucose transport by insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 4644–4648.
- [61] MARTIN SS, HARUTA T, MORRIS AJ, KLIPPEL A, WILLIAMS LT, OLEFSKY JM. Activated phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to mediate actin rearrangement and Glut 4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 1996; **271**: 17605–17608.
- [62] MARTIN S, TELLAM J, LIVINGSTONE C, SLOT JW, GOULD GW, JAMES DE. The glucose transporters (GLUT-4) and vesicle-associated membrane protein-2 (VAMP-2) are

- segregated from recycling endosomes in insulin-sensitive cells. *J Biol Chem* 1996; **134**: 625–635.
- [63] MAY JM, MIKULECKY DC. The simple model of adipocyte hexose transport. Kinetic features, effect of insulin, the network thermodynamic computer simulations. *J Biol Chem* 1982; **257**: 11601–11608.
- [64] MUECKLER M. Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* 1994; **219**: 713–725.
- [65] NAVÉ BT, HAIGH RJ, HAYWARD AC, SIDDLE K, SHEPHERD PR. Compartment-specific regulation of phosphoinositide 3-kinase by platelet-derived growth factor and insulin in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J* 1996; **318**: 55–60.
- [66] OKADA T, KAWANO Y, SAKAKIBARA T, HAZEKI O, UI M. Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. *J Biol Chem* 1994; **269**: 3568–3573.
- [67] PLOUG T, GALBO H, VINTEN J, JORGENSEN M, RICHTER EA. Kinetics of glucose transport in rat muscle: effects of insulin and contractions. *Am J Physiol* 1987; **253**: E12–E20.
- [68] PRONK GJ, DE VRIES-SMITS AMM, BUDAY L, DOWNWARD J, MAASSEN JA, BOS JL. Involvement of Shc in insulin- and epidermal growth factor-induced activation of p21^{ras}. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 1575–1581.
- [69] REA S, JAMES DE. Moving GLUT4. The biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles. *Diabetes* 1997; **46**: 1667–1677.
- [70] ROBINSON LJ, RAZZACK ZF, LAWRENCE JC jr, JAMES DE. Mitogen-activated protein kinase activation is not sufficient for stimulation of glucose transport or glycogen synthase in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 1993; **268**: 26422–26427.
- [71] RONDINONE CM, SMITH U. Okadaic acid exerts a full insulin-like effect on glucose transport and glucose transporter 4 translocation in human adipocytes. *J Biol Chem* 1996; **271**: 18148–18153.
- [72] ROSS SA, SCOTT HM, MORRIS NJ, LEUNG W-Y, MAO F, LIENHARD GE, KELLER SR. Characterization of the insulin regulated membrane aminopeptidase in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 1996; **271**: 328–3332.
- [73] SHIMIZU Y, KIELAR D, MINOKOSHI Y, SHIMAZU T. Noradrenaline increases glucose transport into brown adipocytes in culture by a mechanism different from that of insulin. *Biochem J* 1996; **314**: 485–490.
- [74] SIMPSON IA, CUSHMAN SW. Hormonal regulation of mammalian glucose transport. *Annu Rev Biochem* 1986; **55**: 1059–1089.
- [75] SLOT JW, GEUZE HJ, GIGENGACK S, LIENHARD GE, JAMES DE. Immuno-localization of the insulin regulatable glucose transport in brown adipose tissue of the rat. *J Cell Biol* 1991; **113**: 123–135.
- [76] SUTHERLAND C, LEIGHTON JA, COHEN P. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem J* 1993; **296**: 15–19.
- [77] TANTI JF, GREMEAUX T, GRILLO S, CALLEJA V, KLIPPEL A, WILLIAMS LT, VAN OBBERGHEN E, LE MARCHAND-BRUSTEL Y. Overexpression of a constitutively active form of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to promote Glut 4 translocation in adipocytes. *J Biol Chem* 1997; **271**: 25227–25232.
- [78] TAYLOR LP, HOLMAN GD. Symmetrical kinetic parameters for 3-O-methyl-d-glucose. Transport in adipocytes in the presence and in absence of insulin. *Biochim Biophys Acta* 1981; **642**: 325–335.
- [79] THOUIDIS G, KOTLIAR N, PILCH PF. Immunological analysis of GLUT 4-enriched vesicles. *J Biol Chem* 1993; **268**: 11691–11696.
- [80] THORENS B, ROTH J. Intracellular targeting of GLUT4 in transfected insulinoma cells: evidence for association with constitutively recycling vesicles distinct from synaptophysin and insulin vesicles. *J Cell Sci* 1996; **109**: 1311–1323.

- [81] TOZZO E, KAHN BB, PILCH PF, KANDROR KV. Glut 4 is targeted to specific vesicles in adipocytes of transgenic mice overexpressing Glut 4 selectively in adipose tissue. *J Biol Chem* 1996; **271**: 10490–10494.
- [82] WELSH GI, PROUD CG. Glycogen synthase kinase-3 is rapidly inactivated in response to insulin and phosphorylates eukaryotic initiation factor eIF-2B. *Biochem J* 1993; **294**: 625–629.
- [83] WHITESELL RR, GLIEMANN J. Kinetic parameters of transport of 3-*O*-methylglucose and glucose in adipocytes *J Biol Chem* 1979; **254**: 5276–5283.
- [84] WIESE RJ, CORLEY-MASTICK C, LAZAR DF, SALTIEL AR. Activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase is not sufficient for the hormonal stimulation of glucose uptake, lipogenesis, or glycogen synthesis in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 1995; **270**: 3442–3446.
- [85] VERKEY KJ, BIRNBAUM MJ. A Leu-Leu sequence is essential for COOH-terminal targeting signal of GLUT 4 glucose transporter in fibroblasts. *J Biol Chem* 1994; **269**: 2353–2356.
- [86] YANG J, HOLMAN GD. Comparison of GLUT 4 and GLUT 1 subcellular trafficking in basal and insulin stimulation 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 1993; **268**: 4600–4603.
- [87] ZIERATH JR, HOUSEKNECHT KL, GNUDI L, KAHN BB. High fat feeding impairs insulin-stimulated GLUT4 recruitment *via* an early insulin-signaling defect. *Diabetes* 1997; **46**: 215–223.
- [88] ZORZANO A, MUÑOZ P, CAMPS M, MORA M, TESTAR X, PALACÍN M. Insulin-induced redistribution of GLUT 4 glucose carriers in the muscle fiber. In search of GLUT 4 trafficking pathways. *Diabetes* 1996; **45**, Suppl. 1: S70–S81.

Redaktor prowadzący – Jacek Kuźnicki

Otrzymano: 02.06.1998 r.

Przyjęto: 22.06.1998 r.

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

BUDOWA I FUNKCJA RECEPTORA FOLITROPINY*

STRUCTURE AND FUNCTION OF FOLLITROPIN RECEPTOR

Adam SOBKOWIAK, Wiesław H. TRZECIAK

Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Poznaniu

Streszczenie: Omówiono budowę i funkcję receptora folitropiny. Dojrzałe białko zawiera długą N-końcową domenę zewnątrzkomórkową, konserwatywną domenę przezbłonową złożoną z siedmiu α -heliksów połączonych przez pętle zewnątrzkomórkowe i wewnątrzkomórkowe oraz C-końcową domenę wewnątrzkomórkową. Receptor FSH należy do klasy receptorów sprzężonych z białkiem G i przekazuje sygnał hormonalny na cyklazę adenylanową głównie przez aktywujące białko G_s. Omówiono budowę genu receptora FSH i regulację jego ekspresji. Przedstawiono wyniki badań mutacji genu receptora FSH, powodujących dziedziczne zaburzenia płodności.

Słowa kluczowe: receptor folitropiny, transdukcja sygnału, mutacje.

Summary: The follicle-stimulating hormone receptor structure and function were described. The mature protein contains a large N-terminal extracellular domain, a conserved transmembrane domain, that has 7 membrane-spanning α -helices connected by extracellular and intracellular loops, and a C-terminal intracellular domain. The FSH receptor belongs to the class of G protein-coupled receptors and transduces the hormonal signal to adenyl cyclase mainly through the stimulatory G_s protein. The structure of the FSH receptor gene and regulation of its expression were described. The results of investigation of mutations in the FSH receptor gene causing hereditary reproductive failures were discussed.

Key words: follitropin receptor, signal transduction, mutations.

WSTĘP

Hormony glikoproteinowe, do których zaliczamy tyreotropinę (TSH) oraz gonadotropiny: lutropinę (LH), gonadotropinę kosmówkową (CG) i folitropinę (FSH),

*Praca finansowana z grantu : 4PO5 E 150 14

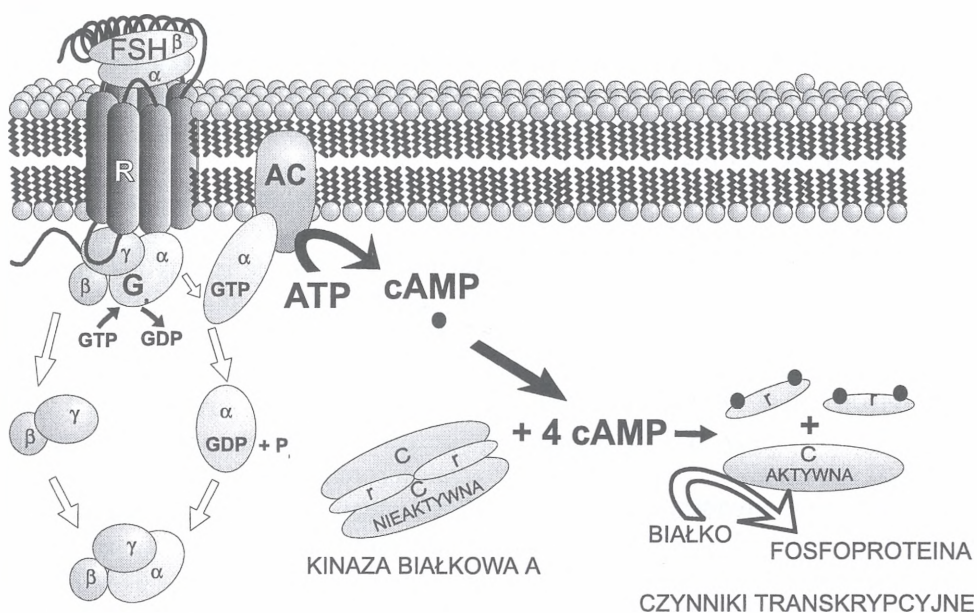
są heterodimerami zbudowanymi z identycznej dla wszystkich czterech hormonów podjednostki α i różnych dla każdego z tych białek podjednostek β . Wszystkie te hormony, z wyjątkiem CG, wydzielane są przez przedni płat przysadki mózgowej. Gonadotropiny odgrywają ważną rolę w fizjologii rozrodu regulując zarówno steroidogenezę, jak i gametogenezę w gonadach u obu płci [6, 24, 92].

Komórkami docelowymi dla LH w gonadzie żeńskiej są komórki osłonki pęcherzyka Graafa, komórki ziarniste i ciała żółtego, natomiast w gonadzie męskiej – komórki Leydiga. Syntetyzowana w komórkach trofoblastu łożyska gonadotropina kosmówkowa zastępuje działanie LH na ciało żółte.

Folitropina działa na komórki ziarniste jajnika i komórki Sertoliego jądra. Hormon ten stymuluje wzrost pęcherzyków jajnikowych, lecz jego rola w procesie dojrzewania i selekcji pęcherzyków Graafa jest słabo poznana [6, 18, 30, 68, 96, 104]. W jądrach FSH jest konieczny do zapoczątkowania i przebiegu spermatogenezy oraz funkcji komórek Sertoliego [18, 30, 80, 93]. Podczas gdy rola LH polega na stymulowaniu komórek śródmiąższowych Leydiga do syntezy androgenów, które są głównym regulatorem spermatogenezy, funkcja FSH w tym procesie i jego działanie w nabłonku plemnikotwórczym pozostaje niewyjaśniona [77, 109]. W badaniach na zwierzętach doświadczalnych wykazano, że w okresie płodowym i okołopłodowym FSH wywołuje mitozy komórek Sertoliego [62, 77] oraz że jego działanie jest zależne od stadium cyklu nabłonka plemnikotwórczego i jest skorelowane z produkcją androgenów [77]. Ponieważ FSH zwiększa liczbę spermatogonii i pobudza ich przemianę w spermatydy, hormon ten odgrywa ważną rolę w procesie spermatogenezy nie tylko podczas rozwoju jąder, ale i u osobników dorosłych [61]. Rola FSH w spermatogenezie potwierdzają wyniki badań, w których wykazano zmniejszenie liczby plemników u szczurów immunizowanych przeciw receptorom FSH i LH [20]. Niektóre doniesienia sugerują, że aczkolwiek FSH jest niezbędny dla zachowania płodności u osobników płci żeńskiej, to płodność u osobników męskich jest zachowana bez udziału tego hormonu [92].

Gonadotropiny wiążą się ze swoistymi receptorami błonowymi komórek docelowych i zjawisko to inicjuje przekazanie sygnału do wnętrza komórki. W przypadku hormonów glikoproteinowych transdukcja sygnału odbywa się za pośrednictwem białka G_s , które aktywuje cyklazę adenylnową potrzebną do produkcji cAMP. Wzrost poziomu tego związku w komórce powoduje uaktywnienie kinazy białkowej A, która fosforyluje czynniki transkrypcyjne, wpływając na ekspresję odpowiednich genów (rys. 1) [40]. W przypadku FSH wykazano również, że związanie hormonu z receptorem wzmaga przemiany fosfatydyloinozytolu i powoduje wzrost poziomu wapnia w cytozolu [19, 32, 75]. Przypuszcza się więc, że FSH uruchamia również kaskadę fosfolipazy C [64].

Przez szereg lat ustalano strukturę pierwszorzędową receptorów gonadotropin. W poprzedniej pracy, która ukazała się w tym czasopiśmie, szczegółowo omówiona została budowa i funkcja receptora lutropiny [89].



RYSUNEK 1. Schemat działania receptora FSH. Związanie hormonu wywołuje zmiany konformacyjne w cząsteczce receptora, które wpływają na białko Gs związane z domeną cytoplazmatyczną receptora. Podjednostka α białka G aktywuje cyklazę adenylanową i wzmacnia syntezę cAMP, który uaktywnia kinazę białkową: R – receptor FSH, G_s – białko wiążące GTP, AC – cyklaza adenylanowa, r – podjednostka regulatorowa kinazy białkowej, C – podjednostka katalityczna kinazy białkowej

Specyficzność tkankowa ekspresji genu receptora folitropiny w poszczególnych okresach rozwoju płodu i fazach cykliów fizjologicznych oraz mechanizm regulacji ekspresji receptora mogą wskazywać na funkcję hormonu. Dlatego ważne jest poznanie budowy i funkcji receptora.

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie najnowszych danych na temat budowy i funkcji receptora FSH, zwłaszcza omówienie jego roli w gametogenezie i wpływie zmian w strukturze receptora na rozrodczość.

BUDOWA RECEPTORA FSH

Receptor FSH należy do nadrodziny receptorów działających za pośrednictwem białek G, wśród których wyróżnia się sześć typów [21, 24, 39, 71, 83, 90]. Ligandy dla tych receptorów stanowią nie tylko hormony i neuroprzekaźniki, począwszy od małowcząsteczkowych amin biogennych przez peptydy do wielkowcząsteczkowych

hormonów glikoproteinowych [90], lecz także substancje zapachowe i smakowe oraz światło o różnej długości fali [21, 71]. W obrębie nadrodziny receptorów wiążących białko G wyróżniono rodzinę 7TMR (R7G) charakteryzującą się obecnością siedmiu segmentów przez błonowych [39]. Receptory hormonów glikoproteinowych tworzą nieliczną podklasę receptorów mających długą N-końcową domenę zewnątrzkomórkową [94].

W wyniku wieloletnich badań ustalono sekwencję aminokwasową różnych receptorów działających za pośrednictwem białka G, w tym także ludzkiego receptora FSH (FSHR) [16, 26, 38] (rys. 2). W piśmiennictwie istnieje jednak niezgodność dotycząca pozycji niektórych aminokwasów w zależności od tkanki, z której izolowano DNA, np. z jajników i jąder (112 Thr > Asn, 197 Ala > Glu, 198 Val > Leu, 307 Ala > Thr) [25].

Względna masa cząsteczkowa FSHR człowieka i małpy wynosi ok. 77 kD [26], a szczura ok. 74 kD [83], choć sądzi się, że masa cząsteczkowa tego receptora zależy od stopnia glikozylacji białka lub dojrzałości prekursora [12]. Ludzki receptor FSH zawiera 695 aminokwasów, z których 17 N-końcowych stanowi przypuszczalnie peptyd sygnałowy [26]. Stwierdzono też występowanie skróconych form jądrowego receptora o mniejszej masie cząsteczkowej (rys. 2).

W receptorze folitropiny wyróżnia się:

- N-końcową domenę zewnątrzkomórkową – ED (*extracellular domain*) o charakterze hydrofilowym,
- domenę przez błonową – TD (*transmembrane domain*), bogatą w reszty aminokwasów hydrofobowych oraz
- krótką hydrofilową domenę wewnątrzkomórkową – ID (*intracellular domain*) (rys. 2 i 3).

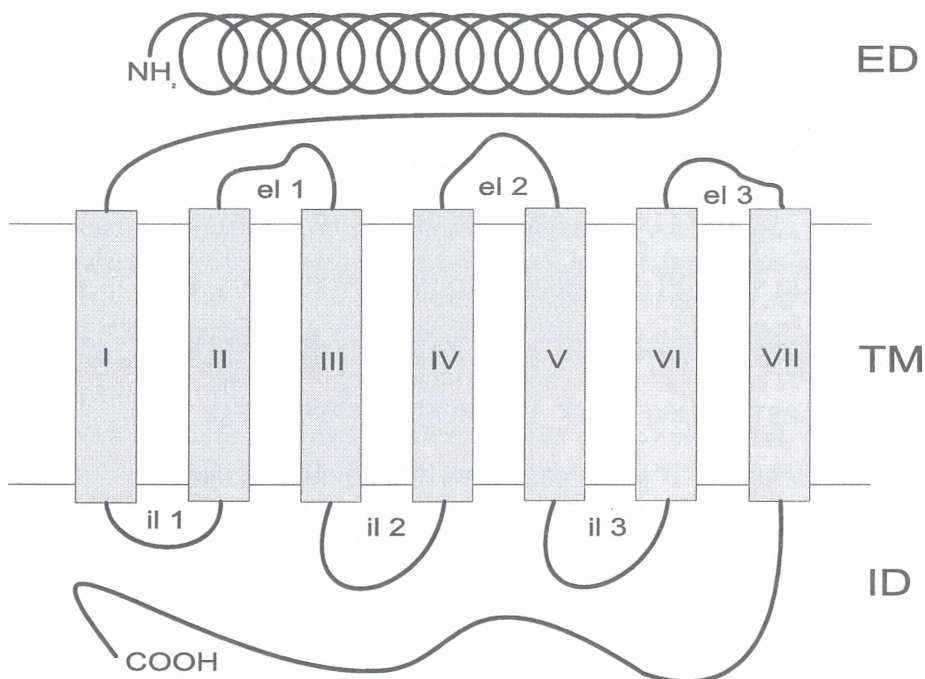
Charakterystyczna dla receptorów hormonów glikoproteinowych długa domena zewnątrzkomórkowa FSHR wraz z peptydem sygnałowym zawiera 366 aminokwasów. Podobnie jak w innych receptorach glikoproteinowych, w ED FSHR występuje 14 niedokładnie powtórzonych sekwencji po około 25 aminokwasów każda, nazywanych motywami bogatymi w Leu (*leucine-rich-motifs*) [24]. Prawie cała ED tworzy helikalną strukturę odpowiadającą motywom bogatym w Leu i bierze udział w wiązaniu hormonu.

Struktura pierwszorzędowa ED wykazuje duże podobieństwo międzygatunkowe i jest zbliżona u człowieka, owcy, świni, wołu i szczura [33, 79].

Receptor FSH podczas syntezy ulega glikozylacji, a oligosacharydy przyłączane są do ED receptora. Potencjalne miejsca glikozylacji u różnych gatunków to reszty asparaginy Asn₁₉₁, Asn₁₉₉ i Asn₂₉₃. U człowieka i małp wąskonosych stwierdzono dodatkowe, czwarte potencjalne miejsce glikozylacji Asn₃₁₈ [12, 26] (rys. 2). Nie wyjaśniona pozostaje rola glikozylacji w procesie wiązania liganda. Badania wykazały, że syntetyzowana *in vitro* domena zewnątrzkomórkowa ulega glikozylacji i wiąże hormon. Jednak w dojrzałym FSHR Asn₁₉₉ nie jest glikozylowana, co

MALLLVSLLA FLSLGS ^G GCHH RICHCSNRVF LCQESK ^V TEI	40
1 - 17 PEPTYD SYGNAŁOWY * * * * eks. 1 *	
PSDLPRNAIE L R ^F VLT ^K LRV IQKGAFSGFG DLEK IEISQN	80
eks. 2	
DVLE ^V IEADV FSNL ^P KLHE I RIEKANNLLY INPEAFQNL ^P	120
eks. 3 eks. 4	
NLQYLL ISNT GIKHLPDVHK IHS ^L LQKVLL D IQDNINIHTI	160
eks. 5	
ERNSFVGLSF ES ^V IL WLNKN GIQEIH ^N CAF NGTQLD EL ^N L	200
eks. 6 eks. 7	
SDNNNLEEL ^P NDV ^F HGASGP VIL DISR ^T RI HSLPSYGLEN	240
eks. 8 →	
LK ^K LRARSTY NL ^K KLPTLEK LVALMEASLT YPSHCCAFAN	280
eks. 9 **	
WRRQ ISELHP IC ^N KSILRQE VDYMTQTRGQ RSSL ^A E ^D NES	320
← eks. 10	
SYSRGFD ^M TY TEFDYDLCNE VVDV ^T CS ^P PK DAFN ^P CEDIM	360
* → *	
GYNILR VLIW FISILAITGN IIVLVIL TTS QYKLT ^V PR FL	400
TM I il 1	
MCNLAFADLC IGIYLLLIAS V DIHTKSQYH NYAIDWQTGA	440
* TM II * el 1	
GCD AAGFFTV FASELSVYTL TAITL ERWHT ITHAMQLDCK	480
* TM III il 2 *	
VQLRH AASVM VMGWIFAFAA ALFPIFGI SS YMKVSI ^C LPM	520
TM IV el 2 *	
DIDSPLSQ LY VMSLLVLNVL AFVVICGCYI HIYLTVRNP ^N	560
TM V #	
IVSSSSDTRI AKR MAMLIFT DFLCMAPISF FAISASL KVP	600
il 3 * TM VI #	
LITVSKAK IL LVL^FHPINSC ANPFLYAIFT KNFRDRFFIL	640
el 3 TM VII *	
LSKCGCYEMQ AQIYRTETSS TVHNTHPRNG HCSSAPRVTN	680
* *	
GSTYILVPLS HLAQN	695
←	

RYSUNEK 2. Sekwencja aminokwasów cząsteczki ludzkiego receptora FSH. Peptyd sygnałowy zawiera 17 reszt aminokwasowych. Oznaczono 10 eksonów przedzielonych kreskami oznaczającymi introny. Siedem segmentów przezbłonowych (TM) zamknięto w ramach i oznaczono łączące je pętle wewnątrzkomórkowe (il) i zewnątrzkomórkowe (el). Konserwatywne cysteiny oznaczono gwiazdkami, a krzyżykami miejsca możliwej fosforylacji przez kinazę białkową C. Podkreślono miejsca potencjalnej glikozylacji. Strzałkami oznaczono sekwencje aminokwasowe, które nie występują w dwóch krótszych formach wyizolowanych z jąder (wg [27] i danych SWISS-PROT)



RYSUNEK 3. Struktura receptora FSH: ED – domena zewnątrzkomórkowa, TM – siedem przezbłonowych odcinków α -helikalnych, ID – domena wewnątrzkomórkowa, el – pętle zewnątrzkomórkowe, il – pętle wewnątrzkomórkowe

nie wpływa na wiązanie hormonu [12]. Reszty glikozyłowe wszystkich glikoprotein przyłączane są podczas syntezy, a w aparacie Golgiego następuje ich modyfikacja polegająca na odcinaniu reszt mannozy i dołączaniu cząsteczek innych cukrów [83]. Wykazano, że fałdowanie cząsteczek receptorów gonadotropin ułatwia białko opiekuńcze (chaperonowe) – kalneksyna (ang. *calnexin*) [84]. Niedojrzałe formy zmutowanych receptorów LH i FSH zawierające wiele reszt mannozy są zatrzymywane w siateczce śródplazmatycznej przez białka chaperonowe [14, 70]. Ponadto zmutowany, szczurzy receptor LH, który jest zatrzymywany w komórce, wiąże CG, a zmutowany FSHR nie wiąże FSH [83]. Wyniki badań wskazują na to, że glikozylacja odgrywa rolę w prawidłowym fałdowaniu białka receptora, a nie w oddziaływaniu receptora z ligandem. Wyjątkiem jest szczurzy LHR, w którym glikozylacja wydaje się nie mieć znaczenia w fałdowaniu dojrzałego receptora [13].

W domenie zewnątrzkomórkowej FSHR znajdują się liczne konserwatywne reszty Cys (rys. 2) zlokalizowane głównie w N-końcowym i C-końcowym odcinku ED, a ich rola w strukturze receptora nie jest całkowicie wyjaśniona [11, 26].

Najbardziej zmienny gatunkowo region znajduje się na C-końcu ED i poprzedza domenę przezbłonową. Z kolei 53 reszty aminokwasowe od 282 do 334 stanowią sekwencję unikalną dla FSHR w porównaniu do LHR i TSHR. W tym odcinku

znajduje się też czwarte, charakterystyczne dla *Naczelných* miejsce glikozylacji [26].

Domena, przy pomocy której receptor zakotwiczony jest w błonie, złożona jest z siedmiu segmentów (TM) o strukturze α -heliksu i jest bogata w reszty aminokwasów hydrofobowych (rys. 2 i 3). Segmenty przezbłonowe połączone są ze sobą przez trzy pętle znajdujące się na zewnątrz komórki (e1) oraz trzy pętle cytoplazmatyczne (il) o różnej długości. Segmenty te, szczególnie TM III i TM VII, mają najbardziej konserwatywny skład aminokwasowy. Z kolei TM IV i TM V zawierają wiele substytucji w porównaniu z receptorem LH/CG. Reszta Asp w TM II i cząsteczka Asn w TM VII są obecne we wszystkich receptorach wiążących białko G.

Podobnie jak ED, część przezbłonowa zawiera liczne konserwatywne reszty Cys zlokalizowane zarówno w TM, jak i pętlach zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych. Konserwatywne reszty Cys w e1 i e2, występujące w wielu receptorach wiążących białko G, mogą tworzyć wiązania disiarczkowe łączące sąsiadujące ze sobą pętle [27].

Szczególnie interesująca jest budowa trzeciej pętli wewnątrzkomórkowej wszystkich receptorów hormonów glikoproteinowych, w której występuje 8 konserwatywnych reszt aminokwasowych (KDTKIAKK). Wyniki badań wykazują, że ten fragment, przylegający do TM VI, może być odpowiedzialny za wiązanie białka G [21].

W części przezbłonowej FSHR zlokalizowane są dwa miejsca potencjalnej fosforylacji przez kinazę białkową C. Są to reszty Thr₅₅₅ w il 3 oraz Ser₅₉₆ w TM VI [26] (rys. 2).

Cytoplazmatyczny C-koniec receptora FSH zawiera 65 reszt aminokwasowych i charakteryzuje się dużą zmiennością gatunkową [26]. W ludzkim FSHR stwierdzono trzy reszty Cys, z których dwie są konserwatywne i mogą brać udział w tworzeniu wiązań disiarczkowych (rys. 2).

Większość receptorów wiążących białko G, np. α_2 - i β_2 -adrenergiczne zawiera w ID konserwatywne reszty cysteiny, które mogą być kowalencyjnie palmitylowane. Mutacja Cys > Gly w receptorze β -adrenergicznym zmniejsza zdolność interakcji receptora z białkiem G. Podobnie, w wyniku badań zmutowanego szczurzego receptora LH/CG, w którym sąsiadujące ze sobą dwie reszty Cys w ID zastąpiono resztą Ala, nie stwierdzono palmitylacji receptora. Taki receptor jest zatrzymywany wewnątrz komórki, choć wykazuje zdolność wiązania hormonu i stymulacji syntezy cAMP [37, 108]. W analogicznym odcinku ID ludzkiego receptora FSH występują dwie reszty Cys (644, 646), można więc przypuszczać, że receptor może być dodatkowo zakotwiczony w błonie cytoplazmatycznej poprzez reszty palmitylanu. Jednak badań takich w odniesieniu do receptora FSH dotąd nie przeprowadzono.

Spośród 25 reszt Ser lub Thr, występujących w części wewnątrzkomórkowej FSHR, trzynaście zlokalizowanych jest w pobliżu C-końca. Stanowią one potencjalne miejsca fosforylacji receptora przez kinazę białkową C [32]. Z kolei reszty

aminokwasowe od 650 do 653, w części cytoplazmatycznej szczurzego receptora folitropiny, mogą brać udział w wiązaniu białka G [21].

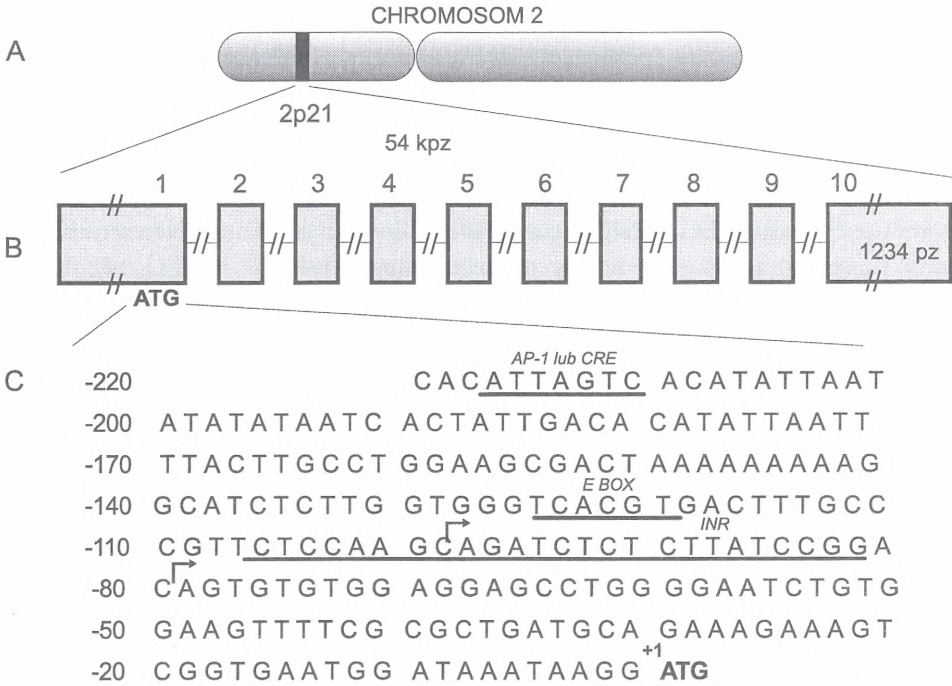
Wykazano, że domena wewnątrzkomórkowa receptora folitropiny zawiera sygnał dla podstawno-bocznej lokalizacji w błonie cytoplazmatycznej. Sygnałem tym jest sekwencja 14 reszt aminokwasowych (VTSGSTYILVPLSH) odległa o 47 aminokwasów od błony. Najważniejszą rolę w tej sekwencji odgrywają Tyr₆₈₄ i Leu₆₈₉. W wyniku delecji tego odcinka ID lokalizacja receptora zmienia się na szczytową (*apical*). Przypuszcza się, że struktura tego odcinka zawiera skręt- β (β -turn), a jego mutacje, zmieniające orientację przestrzenną receptora, mogą powodować jego nieprawidłowe działanie i prowadzić do różnych chorób [7].

Ostatnie doniesienia wykazują, że struktura siedmiu segmentów przezbłonowych w receptorze FSH nie jest konieczna do włączania receptora do błony i wiązania hormonu. Dowodem tego są wyniki badań, w których cDNA kodujący pierwsze osiem eksonów owczego FSHR ulegał ekspresji na powierzchni komórek HEK 293 (*human embryonic kidney*) i takie białko wykazywało duże powinowactwo oraz specyficzność wiązania FSH. Stwierdzono ponadto obecność podobnych transkryptów zarówno w jądrach, jak i jajnikach [85].

GEN RECEPTORA FSH

Gen ludzkiego receptora FSH znajduje się w chromosomie 2 (2p21) w pobliżu genu receptora lutropiny [1, 5, 28] i obejmuje obszar 54 kpz [29, 30] (rys. 4 A). Zawiera on 10 eksonów, z których dziewięć pierwszych, o długości od 69 do 251 pz koduje domenę zewnątrzkomórkową, a dziesiąty (1234 pz) C-końcowy fragment ED i domeny: przezbłonową oraz wewnątrzkomórkową [29] (rys. 4 B i rys. 2). Struktura ludzkiego genu FSHR wykazuje duże podobieństwo do genu szczura, również w połączeniach ekson/intron [29], które utworzone są przez sekwencje kodujące reszty leucyny i izoleucyny [25, 28]. Podobieństwo oraz położenie genów FSHR i LH/CG na tym samym chromosomie [5] wskazują na ich pochodzenie od wspólnego prekursora, z którego mogłyby powstać przez serię duplikacji odcinków kodujących motywy bogate w Leu (eksony 2 do 9) i połączenie z pierwotnym genem receptora wiążącego białko G [24].

Badania genu FSHR małpy *Macaca fascicularis* wykazały, że podobnie jak u człowieka, na końcu 5' znajduje się kodon ATG rozpoczynający otwartą ramkę odczytu złożoną z 2085 nukleotydów kodujących 695 aminokwasów. Stwierdzono też występowanie wysoce konserwatywnej sekwencji (nukleotydy 1396–1404) kodującej trzy aminokwasy Gln, Arg, Trp, które przypuszczalnie oddziałują z białkiem G [26].



RYSUNEK 4. Lokalizacja chromosomowa, budowa i fragment sekwencji nukleotydowej regionu regulatorowego genu receptora FSH: **A** – lokalizacja ludzkiego genu FSH w chromosomie 2; **B** – organizacja genu FSHR, eksony oznaczono prostokątami i ponumerowano od 1 do 10, introny oznaczono liniami przerywanymi; **C** – sekwencja nukleotydowa regionu regulatorowego szczurzego genu FSHR, podkreślono i oznaczono sekwencje regulatorowe AP-1 lub CRE, E Box i INR, strzałkami oznaczono dwa miejsca startu transkrypcji, a tustym drukiem miejsce startu translacji

Promotor genu FSHR badanych gatunków ssaków (człowiek, małpa, szczur) nie zawiera typowych sekwencji TATA lub CCAAT [18, 24, 27]. W ludzkim genie FSHR stwierdzono wiele miejsc startu transkrypcji, z których częściej używane mieszczą się między -114 i -79 pz. Analiza delecyjna wskazuje, że promotor jest zlokalizowany między -225 a -1 pz [27, 56].

Ludzki i myszy gen receptora folitropiny nie zawiera elementu odpowiedzi na cAMP (CRE) lub miejsca AP-1 (*activator protein 1-binding site*) [27], choć szczurzy gen zawiera sekwencje podobne (TTAGTCA) (rys. 4 C) [18]. Sekwencję CRE zawiera natomiast gen LH/CGR, którego ekspresja może być regulowana przez FSH za pośrednictwem cAMP [5].

Szczurzy promotor genu FSHR zawiera konserwatywne sekwencje: kasetę E (*E box*) i InR (*initiator-like region*), które są odpowiedzialne za około 75% funkcji promotora (rys. 4 C). Miejsca te są chronione przez białka jądrowe z komórek Sertoliego. Usunięcie kasety E powoduje zniesienie aktywności promotora [18]. Sekwencja kasety E (CANNTG) oddziałuje z rodziną czynników transkrypcyjnych

znanych jako białka zasadowe bHLH (heliks-pętla-heliks) [57], w których region zasadowy jest konieczny do wiązania DNA, a motyw HLH warunkuje dimeryzację białka. Z kolei InR to region bogaty w nukleotydy pirymidynowe [82], w którym znajdują się miejsca inicjacji transkrypcji. Może on współdziałać z sekwencją TATA. Region ten wiąże się z różnymi białkami regulatorowymi.

Wśród promotorów nie zawierających sekwencji TATA wyróżnia się dwie klasy: promotory bogate w GC, o ciągłej (konstrytutywnej) ekspresji, z wieloma miejscami startu transkrypcji oraz promotory nie zawierające dużej ilości CG, regulowane podczas różnicowania, zawierające jeden lub kilka blisko położonych miejsc startu transkrypcji (region inicjatorowy). Budowa promotora genu FSHR odpowiada klasie drugiej promotorów. Jego regulacja może odbywać się przez oddziaływanie białek z InR, być może kooperatywnie z kasetą E [18]. W jądrach myszy stwierdzono czynniki transkrypcyjne z rodziny bHLH np. USF (*upstream stimulatory factor*) [55], które tworzą homo- lub heterodimery i wpływają na specyficzność tkankową ekspresji genu przez oddziaływanie z białkami wiążącymi InR [18].

Różnice w ekspresji genu FSHR w poszczególnych tkankach próbowano też wyjaśnić badając poziom metylacji tego genu. Stwierdzono, że specyficzne sekwencje CCGG w promotorze genu w komórkach Sertoliego nie były metylowane, podczas gdy w innych tkankach zachodziła ich metylacja [56].

Gen receptora FSH ulega ekspresji w komórkach ziarnistych jajnika [58, 68] oraz w komórkach Sertoliego jąder [11, 24, 26, 77]. Choć w badaniach nad ekspresją genu FSHR u samców makaka mRNA tego receptora wykryto tylko w gonadach [11], u ludzi jego ekspresja następuje również w nabłonku jajników i jajowodów [106]. Ekspresja tego genu jest uzależniona od etapów rozwoju gamet [58]. W zawiązkach pęcherzyków (*primordial follicle*) nie stwierdzono mRNA FSHR. Jego synteza rozpoczyna się na etapie rozwoju pęcherzyka pierwotnego (*primary follicle*) i kontynuowana jest w dalszych stadiach rozwoju pęcherzyków. Wysoką ekspresję genu, mierzoną stężeniem mRNA dla FSHR stwierdzono również w komórkach ziarnistych we wczesnych stadiach rozwoju pęcherzyka u ptaków [105].

Wykazano, że inicjacja wzrostu pęcherzyków jajnikowych jest niezależna od FSH i ekspresja genu receptora tego hormonu nie oznacza, że dochodzi do syntezy receptora [68]. Wyniki badań jajników szczurów częściowo wyjaśniają proces inicjacji wzrostu pęcherzyków. Wykazano bowiem, że nerwy jajnikowe, poprzez neuroprzekazniki (neurotransmitery) związane z systemem produkującym cAMP, powodując ekspresję receptora FSH wpływają na proces różnicowania pęcherzyków pierwotnych (*primary follicle*) [60]. Stwierdzono też, że w pęcherzykach jajnikowych szczura następuje koekspresja mRNA receptora FSH i IGF-1 (*insuline-like growth factor-1*). Czynniki te pobudzają ekspresję FSHR i przyczyniają się do zwiększenia odpowiedzi komórek ziarnistych na działanie FSH [107].

Ekspresja FSHR w komórkach Sertoliego zmienia się *in vivo* w poszczególnych stadiach cyklu nabłonka plemnikotwórczego i *in vitro* po dodaniu hormonów [24].

W badaniach na szczurach stwierdzono, że w fazie I i XIII oraz XIV cyklu komórek nabłonka plemnikotwórczego produkcja mRNA FSHR jest najwyższa, a między tymi fazami ekspresja ulega obniżeniu. Z ekspresją genu FSHR skorelowane są produkcja cAMP oraz wiązanie FSH do receptora. Stwierdzono też, że FSH działa synergistycznie z androgenami na przebieg spermatogenezy [77].

Badania transkryptów genu receptora FSH wykazały ich dużą różnorodność. Stwierdzono siedem cząsteczek mRNA ludzkiego FSHR o długości: 6,5, 4,2, 2,5, 2,2, 2,0, 1,6, 1,3 kz. Uzyskiwane wyniki są zależne od rodzaju badanej tkanki, i tak mRNA z ludzkich jajników mają długość 2,5, 4,2 i 7,0 kz [26] lub 2,4 i 4,1 kz [63]. Podobne cząsteczki uzyskano z jąder szczura (2,6 i 7,2 kz) i jąder makaka (2,6 kz) [26]. Sądzi się, że różne długości mRNA wynikają z wykorzystania różnych miejsc poliadenylacji [24] oraz różnej długości regionów niekodujących 5' i 3' [63], a także z alternatywnego składania pierwotnych transkryptów, które są gatunkowo i płciowo specyficzne [26]. Stwierdzono bowiem obecność izoform funkcjonalnych oraz niefunkcjonalnych receptora, które są wynikiem przedwczesnego odczytania kodonu terminacyjnego [26, 98].

W jądrach barana wykryto również alternatywne składanie, w wyniku którego powstaje wiele transkryptów genu FSHR. Prowadzi ono do tworzenia różnych typów receptorów, które mogą brać udział w regulacji działania hormonu [85].

WIĄZANIE HORMONU I TRANSDUKCJA SYGNAŁU

Charakterystyczna budowa receptorów hormonów glikoproteinowych umożliwia wiązanie liganda i przekazanie sygnału do wnętrza komórki (rys. 1). Zainteresowanie badaczy skupia się wokół zagadnień lokalizacji miejsca wiązania hormonu przez receptor oraz sposobu transdukcji sygnału. Ludzki receptor FSH nie wiąże ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej i reaguje tylko na duże stężenia hormonu bydlęcego [63]. Świadczy to o specyficzności wiązania hormonu przez receptor. Rolę domeny zewnątrzkomórkowej w tym procesie wykazały wyniki badań chimer receptorów. Receptor złożony z ED FSHR i TM LHR przekazuje sygnał folitropiny, a chimera skonstruowana odwrotnie – sygnał lutropiny [78]. W przypadku badania formy receptora FSH skróconej w części cytoplazmatycznej, która zawierała 635 reszt aminokwasowych, wykazano, że taki receptor wiązał ludzki FSH z powinowactwem podobnym do wiązania całego receptora. Ponadto następował wzrost stężenia cAMP i gromadzenie fosforanu inozytolu w komórce [32].

Nawet wolna domena zewnątrzkomórkowa FSHR wiąże hormon podobnie jak cały receptor. Sugeruje to, że N-końcowa ED tego receptora, tak samo jak ED TSHR i LH/CGR, bierze udział w rozpoznawaniu i wiązaniu hormonu [12]. Hipotezę tę potwierdzają badania pozostałych receptorów hormonów glikoproteinowych, w

których wykazano wiązanie hormonu z wolną formą ED [87, 95]. Jednak stwierdzono, że hormon może się też łączyć z końcem karboksylowym (TM II) receptora LH/CG [74]. Uważa się, że ED LH/CG jest odpowiedzialna za wiązanie hormonu z dużym powinowactwem, a TD za transdukcję sygnału przez wiązanie białka G [78, 80]. Substytucja Asp₃₉₇ w pierwszej pętli zewnątrzkomórkowej receptora LH/CG powoduje zmniejszenie produkcji cAMP po związaniu hormonu, dlatego przypuszcza się, że ta pętla może brać udział w wiązaniu hormonu. Odpowiednikiem tej reszty w FSHR jest Asp₄₂₂ (rys. 2). Badania potwierdziły, że zastąpienie tego aminokwasu przez Glu, Ala lub Lys uniemożliwia wiązanie FSH. Takie substytucje powodują niekompletne fałdowanie białka receptora i zatrzymywanie go w siateczce śródplazmatycznej. Podobne zjawisko zaobserwowano syntetyzując niepełną formę receptora pozbawioną domeny wewnątrzkomórkowej (ID) [83].

Wyniki badań sugerują, że reszty węglowodanowe FSHR są konieczne do wiązania hormonu. Usunięcie miejsc potencjalnej glikozylacji przez ukierunkowaną mutagenezę powoduje, że hormon nie wiąże się z receptorem. Podobnie dzieje się, gdy zapobiega się N-glikozylacji przez dodanie tunikamycyny. Jednak gdy usuwa się węglowodany z receptora metodami enzymatycznymi, uzyskuje się wysokie powinowactwo FSH do receptora. Świadczy to, że reszty glikozytowe związane z FSHR nie są bezpośrednio wymagane przy wiązaniu hormonu, lecz oligosacharydy (szczególnie związane z Asn₁₉₁ i Asn₂₉₃) są konieczne do prawidłowego fałdowania syntetyzowanego białka receptora [12]. Znaczenie N-glikozylacji w ustaleniu prawidłowej konformacji innych białek zostało udokumentowane, choć węglowodany mogą też wpływać na wiązanie liganda w innych receptorach (np. w receptorze urokinazy) [12].

Wiązanie folitropiny do jej receptora nie zostało dokładnie zbadane, lecz ze względu na podobieństwo budowy hormonów glikoproteinowych, jak i ich receptorów można przypuszczać, że przebiega podobnie jak wiązanie LH/CG [89]. Podjednostki α i β hormonu przypuszczalnie tworzą bruzdę, która bierze udział w kontakcie z receptorem [10]. Domena zewnątrzkomórkowa LH/CG, zawierająca helikalnie zwinięte odcinki odpowiadające motywom bogatym w Leu, ułożona jest w kształcie litery U lub J (rys. 1). Wiązanie hormonu z dużym powinowactwem wynika z oddziaływania reszt aminokwasowych w zgiętej części receptora i rowku utworzonym przez pierwszą pętlę α -podjednostki oraz pierwszą i trzecią pętlę β -podjednostki hormonu. Po przyłączeniu do receptora hormon znajduje się w przestrzeni pomiędzy ramionami wygiętej ED receptora. Przypuszczalnie istnieje też kilka miejsc kontaktu ED z domeną przezbłonową. Transdukcja sygnału wywołana jest wpływem hormonu na odległość pomiędzy ramionami ED i modulowana jest przez oligosacharydy związane z podjednostkami hormonu [65]. Prawidłowa glikozylacja cząsteczki hormonu wydaje się ważniejsza niż obecność reszt węglowodanowych w receptorze [54]. Oligosacharydy związane z Asn₅₆ α -podjednostki

FSH, w zależności od ich wielkości, mają wpływ hamujący na reasocjację podjednostek i wiązanie hormonu z receptorem [8].

W porównaniu do LH/CGR i TSHR sekwencję aminokwasów od 282 do 334 należy uznać za unikalną w FSHR. Odcinek ten, zawierający 53 reszty aminokwasowe, może warunkować specyficzne wiązanie hormonu [26].

Związanie agonisty do receptora indukuje zmiany konformacyjne, które ułatwiają jego oddziaływanie z białkiem G [21]. Syntetyczne peptydy, odpowiadające sekwencjom aminokwasów regionu il3 (533 do 555) i końca karboksylowego (645 do 653) jądrowego receptora szczura, stymulowały bowiem wymianę nukleotydów guanylowych w błonach i modulowały odpowiedź komórek Sertoliego na stymulację przez FSH [22, 23]. Usunięcie z receptora FSH fragmentu sekwencji aminokwasów od 645 do 653 powodowało, że nie oddziaływał on z białkiem G. Przypuszcza się, że w tym miejscu następuje przyłączenie białka G do receptora [21, 31]. W niektórych receptorach wiążących białko G występuje sekwencja aminokwasów tworząca motywy B-B-X-X-B lub B-B-X-B (B – reszty aminokwasów zasadowych). Motywowym tym odpowiadają sekwencje KIAKR (aminokwasy 551 do 555) i RKSH (650 do 653) szczurzego receptora FSH. Stanowią one minimalny motyw strukturalny odpowiedzialny za wiązanie białka G [21]. Z białkiem G może oddziaływać fragment C-końcowy trzeciej pętli wewnątrzkomórkowej, który tworzy amfifilową strukturę α -heliksu. Inne badania dowodzą, że C-końcowa reszta aminokwasu zasadowego w wyżej wymienionych motywach w il3 α_2 -receptora adrenergicznego może być zastąpiona przez resztę aminokwasu aromatycznego (Phe) bez zakłócenia oddziaływania z białkiem G [21]. Zauważono, że usunięcie aminokwasów 645–653 hamuje biosyntezę estradiolu stymulowaną przez FSH w hodowli komórek Sertoliego, przypuszcza się więc, że reszty N-końcowe (przypuszczalnie His₆₄₅ i His₆₄₈) tego regionu FSHR mogą brać udział w aktywacji białka G [21]. Przypuszczenie to potwierdza fakt, że reszty te są konserwatywne u wielu gatunków ssaków [26].

REGULACJA DZIAŁANIA RECEPTORA

Na transdukcję sygnału za pośrednictwem receptora FSH można wpływać na etapie ekspresji genu receptora, a także przez modyfikację struktury utworzonego białka.

Na początkowych etapach ontogenezy ekspresja genu FSHR jest zahamowana i rozpoczyna się w okresie przechodzenia do stadium pęcherzyka pierwotnego [68]. Podobnie, w nabłonku plemnikotwórczym ekspresja genu FSHR zależy od stadium cyklu i może być regulowana parakrynowo przez związki syntetyzowane w spermatogoniach i spermatocytach [77]. Badania *in vitro* i *in vivo* na szczurach wykazały, że w obecności FSH zmniejsza się zawartość mRNA FSHR w komórkach

Sertoliego [59]. Podobne zjawisko zaobserwowano w komórkach ziarnistych jajnika krowy, hodowanych *in vitro* [33].

Transdukcja sygnału za pośrednictwem receptora FSH może być regulowana przez produkty białkowe genu FSHR powstałe w wyniku alternatywnego składania (*splicing*) pierwotnego transkryptu. W gonadzie męskiej stwierdzono alternatywne składanie pierwotnego transkryptu genu FSHR prowadzące do delecji 186 pz z eksonu IX i w konsekwencji do skrócenia produktu białkowego o 62 reszty aminokwasów (rys. 2). Ta izoforma receptora, zwana FSHR/E [25], jest białkiem o określonej funkcji, pomimo że nie zawiera konserwatywnych Cys₂₇₅ i Cys₂₇₆ wpływających na strukturę przestrzenną receptora i wiązanie liganda. Może ona brać udział w modulacji odpowiedzi komórkowej na gonadotropiny [25].

W badaniach szczurów pomiędzy 12,5 a 14,5 dniem życia płodowego wykazano, że w jądrach i jajnikach najwcześniej pojawia się mRNA kodujący domenę zewnątrzkomórkową, a dwa dni później całkowity mRNA FSHR [76]. Z kolei w dojrzałych jajnikach myszy, poza mRNA kodującym kompletny receptor FSH, stwierdzono trzy rodzaje cząsteczek będących wynikiem delecji eksonu 2 oraz 2, 5 i/lub 6. Ekspresja wszystkich cząsteczek wynikających z alternatywnego składania jest gonadotropino-niezależna, a krótsze formy pojawiają się wcześniej podczas rozwoju jajników [69].

Krótkie fragmenty receptora FSH stwierdzono również u innych zwierząt m.in. u bydła i królika. Alternatywne składanie pierwotnego transkryptu genu receptora FSH u owcy doprowadza do produkcji formy mRNA receptora, zawierającej eksony od pierwszego do ósmego, lub rozpuszczalnego białka, które jest wynikiem translacji mRNA zawierającego eksony od pierwszego do czwartego. W komórkach HEK 293 ekspresji ulega owczy gen receptora FSH, który różni się w regionie 3' od zwykle występującego genu. Jego produkt białkowy wiąże specyficznie FSH, lecz nie indukuje syntezy cAMP, działa więc jako receptor negatywny [103].

Izoformy pozbawione funkcji, będące wynikiem alternatywnego składania receptorów LH/CG i TSH, mogą także odgrywać rolę jako białka wiążące hormon lub autoantygeny [72].

Prowadzone badania są również ukierunkowane na poznanie mechanizmu regulacji receptora na etapie potranslacyjnym, gdyż stwierdzono, że fosforylacja FSHR uniemożliwia aktywację cyklazy adenylanowej przez receptor [32]. Gdy komórki docelowe są poddawane działaniu hormonu, ich odpowiedź zmniejsza się przy stałej obecności hormonu. To zjawisko zwane odczuleniem (*desensitization*) opiera się na dwóch mechanizmach regulacyjnych. Pierwszy z nich, krótkotrwały, polega na zmianie właściwości receptorów bez zmiany ich liczby i prowadzi do zmniejszenia zdolności receptorów do aktywacji ich systemu efektorowego. Drugi mechanizm, o dłuższym czasie działania, zwany *down-regulation* polega na zredukowaniu liczby receptorów na powierzchni komórki.

Zmiana właściwości receptorów przebiega w drodze modyfikacji potranslacyjnych, a *down-regulation* przez zahamowanie syntezy lub dojrzewania, internalizację lub degradację i/lub przez zmniejszenie wydzielania na zewnątrz komórki [32].

W przypadku receptora β_2 -adrenergicznego wiązaniu agonisty towarzyszy fosforylacja, która doprowadza do zablokowania jego ponownego wiązania [35]. Mutacje w miejscach fosforylacji w innych receptorach wiążących białko G prowadzą do zmniejszenia fosforylacji indukowanej przez agonistę [3, 32, 36, 49, 73, 91]. Zaobserwowano również zjawisko odczulenia ludzkiego FSHR po działaniu FSH, choć jego mechanizm nie został ostatecznie wyjaśniony [63, 64]. Związaniu hormonu towarzyszy internalizacja i po 4 godz. inkubacji z hormonem obserwowano utratę 50% receptorów z powierzchni komórki [64].

Gdy stwierdzono, że FSH indukuje fosforylację receptora, przyjęto założenie, że fosforylacja FSHR przez kinazę białkową C może wpływać na jego działanie. Skonstruowano receptor skrócony w swej części cytoplazmatycznej, w której zlokalizowano miejsca potencjalnej fosforylacji. Takie białko, które nie miało dwunastu miejsc fosforylacji, reagowało na ludzki FSH trzy razy silniej i ulegało fosforylacji. Wnioskuje się z tego, że postulowane miejsca nie podlegają fosforylacji, a tak skonstruowane białko ma wyeksponowane inne miejsca fosforylacji lub reakcja ta przebiega w miejscach zlokalizowanych na pętlach wewnątrzkomórkowych i Ser₆₂₄ [32]. Wyniki przeprowadzonych badań wykazują, że kinaza białkowa C jest tylko częściowo odpowiedzialna za fosforylację receptora indukowaną przez hormon [75]. Dalsze badania miejsc fosforylacji szczurzego receptora FSH, w których użyto mutantów receptora pozbawionych reszt Ser i Thr w pętlach cytoplazmatycznych, doprowadziły do wniosków, że fosforylacja indukowana hormonem jest czynnikiem powodującym zarówno brak wiązania agonisty, jak i internalizację receptora. Ustalono ponadto, że fosforylacja w trzeciej pętli wewnątrzkomórkowej przyczynia się do braku wiązania agonisty, lecz nie jest konieczna do internalizacji receptora. Nie wyjaśniono do tej pory, czy do internalizacji jest konieczna fosforylacja w pierwszej, trzeciej, czy w obu pętlach wewnątrzkomórkowych [66].

Wpływ na działanie receptorów FSH wykazuje też białko FSH-BI (*follicle stimulating hormone receptor-binding inhibitor*) wydzielane przez ludzkie komórki ziarniste i hamujące wiązanie FSH z receptorem. Ponieważ białko to stymuluje syntezę estradiolu z androstendionu w hodowlach komórek Sertoliego, jego rola może polegać na miejscowej regulacji działania FSH w jajnikach [4].

WPLYW NIEPRAWIDŁOWEJ BUDOWY RECEPTORA NA JEGO DZIAŁANIE

Zmiany w sekwencji aminokwasowej receptorów mogą powodować przekazywanie sygnału do komórki bez udziału liganda. W receptorach o nieskomplikowanej

TABELA 1. Skutki mutacji w receptorach gonadotropin

Receptor	Zamiana aminokwasu	Lokalizacja*	Efekt	Piśmiennictwo
FSHR	Asp 567 → Gly	il 3	Aktywacja konstytutywna u mężczyzn po usunięciu przysadki mózgowej	[30]
FSHR	Ser 164 → Phe	ED	Nieprawidłowe fałdowanie receptora powodujące różny stopień zaburzeń spermatogenezy u mężczyzn i dysgenезję jajników (ODG) u kobiet	[2]
	Ala 189 → Val	ED		[1]
LH/CGR	Met 398 → Thr	TM II	Aktywacja konstytutywna receptora powodująca sporadyczne i rodzinne przedwczesne dojrzewanie męskie (FMPP)	[15], [43], [50], [102]
	Ile 542 → Leu	TM V		[50]
	Asp 564 → Gly	il 3		[50]
	Ala 568 → Val	il 3		[47]
	Met 571 → Ile	TM VI		[43], [44]
	Ala 572 → Val	TM VI		[100], [101]
	Ile 575 → Leu	TM VI		[51]
	Thr 577 → Ile	TM VI		[41]
	Asp 578 → Gly	TM VI		[44], [88]
	Asp 578 → Tyr	TM VI		[50]
	Cys 581 → Arg	TM VI		[50]
LH/CGR	Asn 291 → Ser	ED	Inaktywacja receptora powodująca hypoplazję komórek Leydiga (LCH) i męski pseudohermafrodytyzm	[52]
	Ala 593 → Pro	TM VI		[45], [97]
	Ser 616 → Tyr	TM VII		[48]

*il – pętla wewnątrzkomórkowa, TM – segment przez błonowy, ED – domena zewnątrzkomórkowa.

budowie, np. receptorze bakteryjnym Trg, zamiana jednej reszty aminokwasowej wywołana mutacją genu powoduje uaktywnienie przekazywania sygnału bez związania liganda (*mimicked-occupancy*). W tym przypadku miejsce wiązania znajduje się w domenie przez błonowej, a substytucja aminokwasu dotyczy miejsca rozpoznawania liganda i uniemożliwia jego wiązanie z receptorem [99].

Podobny efekt, choć jego mechanizm jest odmienny, daje aktywacja konstytutywna, polegająca na stałym uaktywnieniu receptora i ciągłym przekazywaniu sygnału bez udziału liganda. W sekwencjach aminokwasowych receptorów wiążących białko G, np. α_{1B} -, α_2 - i β_2 -adrenergicznych, stwierdzono wiele mutacji konstytutywnych [81, 86, 90] zlokalizowanych głównie w il3, która przypuszczalnie bierze udział w wiązaniu białka G [31]. Mutacje konstytutywne występują też w receptorach hormonów glikoproteinowych [15, 30, 41, 45, 47, 53, 100] (tab. 1). Większość mutacji wpływających na transdukcję sygnału w receptorach TSH i LH/CG znajduje się w domenie przez błonowej. Tam też zlokalizowane są mutacje aktywujące receptory LH/CG i FSH. Z kolei mutacje inaktywujące receptory są

rozproszone w całej sekwencji kodującej. Mutacje aktywujące są z reguły dziedziczone w sposób dominujący, a inaktywujące w sposób recesywny [9].

Stwierdzono, że u mężczyzny, którym usunięto przysadkę mózgową, wytwarzanie nasienia nie było zaburzone. Próba wyjaśnienia tej anomalii doprowadziła do wykrycia tranzycji w trzeciej pętli wewnątrzkomórkowej, powodującej zamianę Asp 567 Gly w produkcie białkowym genu FSHR. Wykazano, że ta heterozygotyczna mutacja wywołała konstytutywną aktywację receptora i zwiększenie produkcji cAMP [30].

W receptorze folitropiny stwierdzono również mutacje w domenie zewnątrzkomórkowej. Choć nie powodują one aktywacji konstytutywnej, wpływają na funkcję biologiczną receptora. Mutacja w eksonie siódmym, kodującym ED (Ala 189 Val), powoduje nieprawidłowe fałdowanie białka i utratę jego aktywności [93]. Mutacja ta wyjaśnia około 50% dziedzicznych form dysgenезji jajników (*hypergonadotropic ovarian dysgenesis*) w populacji fińskiej [1, 34]. Schorzenie to jest dziedziczone recesywnie i chociaż nie znosi wiązania FSH, doprowadza do zahamowania produkcji cAMP [34].

W eksonie szóstym, kodującym domenę zewnątrzkomórkową FSHR stwierdzono tranzycję (C566T) powodującą zamianę Ser w pozycji 164 na Phe. U pacjentek powoduje ona oporność jajników na FSH i objawy dysgenезji jajników [2].

Mutacje genu receptora FSH mogą także wiązać się z nowotworami gonad. W przypadku 69% badanych guzów jajnika (*sex cord tumor*) stwierdzono heterozygotyczną mutację (T1777C) powodującą zamianę Phe 591 Ser w szóstym segmencie przezbłonowym. Powodowała ona zahamowanie produkcji cAMP po stymulacji folitropiną w komórkach hodowanych *in vitro* [42].

Mężczyźni homozygotyczni z mutacjami w obrębie FSHR mają w różnym stopniu zaburzoną spermatogenezę, lecz nie wykazują azoospermii. Potwierdza to przypuszczenia, że FSH jest bardziej istotny w płodności kobiet niż mężczyzn [93].

Podczas badań niepłodnych mężczyzn z objawami zespołu komórek Sertoliego (*Sertoli-cell-only syndrome*) nie potwierdzono mutacji w receptorze FSH, natomiast u pacjentów tych wykazano wysoką aktywność immunologiczną przeciw FSH [54].

UWAGI KOŃCOWE

Komórki docelowe FSH (komórki ziarniste względnie komórki Sertoliego) są niezbędne w procesie gametogenezy. Komórki Sertoliego stanowią fizyczną podporę dla rozwoju plemników, a komórki ziarniste jajnika stanowią osłonę komórki jajowej i rozwijającego się pęcherzyka. Komórki te syntetyzują również czynniki wzrostu niezbędne do rozwoju komórek rozrodczych [24].

Obecność receptorów FSH w pęcherzykach jajnikowych wskazuje, że FSH może odgrywać rolę w ich rozwoju i różnicowaniu we wcześniejszych stadiach niż dotychczas przypuszczano. Możliwe jest też, że efekty stymulacyjne czynników in-

dujących jajczkowanie nie są ograniczone do pęcherzyków przedstonkowych (*antral follicles*). Wiele dowodów na heterogeniczność FSHR oraz jego odpowiedzi na hormony we wczesnych stadiach rozwoju pęcherzyków budzi szczególne zainteresowanie, gdyż, jak się sądzi, zjawiska te mogą powodować różnicowy wzrost pęcherzyków i ustalenie pęcherzyka dominującego [68].

Cykliczność ekspresji receptora FSH stwierdzona w komórkach Sertoliego przybliża poznanie funkcji tego hormonu podczas spermato- i spermiogenezy [24]. Rola FSH w procesie spermatogenezy podkreślają wyniki badań na szczurach, u których indukowano reakcję immunologiczną przeciw receptorom FSH. U zwierząt tych zaobserwowano redukcję liczby plemników wynikającą z supresji wiązania hormonu z receptorem [20].

Zwraca się też uwagę na rolę gonadotropin i ich receptorów w powstawaniu guzów narządów rodnych u kobiet [17, 42, 106]. Ostatnio np. stwierdzono obecność FSHR w komórkach raka endometrium macicy [67].

Poznanie budowy i funkcji receptora FSH stanowi podłoże do dalszych badań zaburzeń rozrodczości człowieka, w których lokalizacja mutacji powodujących jego nieprawidłowe działanie odgrywa szczególną rolę.

LITERATURA

- [1] AITTO MAKI K, LUCENA JL, PAKARINEN P, SISTONEN P, TAPANAINEN J, GROMOLL J, KASKIKARI R, SANKILA EM, LEHVASLAIHO H, ENGEL AR, NIESCHLAG E, HUHTANIEMI I, DE LA CHAPELLE A. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell* 1995; **82**: 959–968.
- [2] AITTO MAKI K, HERVA R, STENMAN UH, JUNTUNEN K, YLOSTALO P, HOVATTA O, DE LA CHAPELLE A. Clinical features of primary ovarian failure caused by a point mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; **81**: 3722–3726.
- [3] ALBLAS J, VAN ETTEN I, KHANUM A, MOOLENAAR WH. C-terminal truncation of the neurokinin-2 receptor causes enhanced and sustained agonist-induced signaling. Role of receptor phosphorylation in signal attenuation. *J Biol Chem* 1995; **270**: 8944–8951.
- [4] ALOUF CA, REICHERT LE, KELLOM TA, LEE DW. Cultured human granulosa cells secrete a follicle stimulating hormone receptor-binding inhibitor. *Hum Reprod* 1997; **12**: 2735–2740.
- [5] ATGER M, MISRAHI M, SAR S, LE FLEM L, DESSEN P, MILGROM E. Structure of the human luteinizing hormone-choriogonadotropin receptor gene: unusual promoter and 5' non-coding regions. *Mol Cell Endocrinol* 1995; **111**: 113–123.
- [6] BAO B, GARVERICK A, SMITH GW, SMITH MF, SALFEN BE, YOUNGQUIST RS. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biol Reprod* 1997; **56**: 1158–1168.
- [7] BEAU I, GROUYER-PICARD MT, LE BIVIC A, VANNIER B, LOOSFELT H, MILGROM E, MISRAHI M. The basolateral localization signal of the follicle-stimulating hormone receptor. *J Biol Chem* 1998; **273**: 18610–18616.
- [8] BUTNEY VY, GOTSCHALL RR, BUTNEV VY, BAKER VL, MOORE WT, BOUSFIELD GR. Hormone-specific inhibitory influence of alpha-subunit Asn 56 oligosaccharide on *in vitro*

- subunit association and follicle-stimulating hormone receptor binding of equine gonadotropins. *Biol Reprod* 1998; **58**: 458–469.
- [9] CHAN WY. Molecular genetic, biochemical, and clinical implications of gonadotropin receptor mutations. *Mol Genet Metab* 1998; **63**: 75–84.
- [10] COSOWSKY L, VENKATESWARA RAO SN, MACDONALD GJ, PAPPKOFF H, CAMPBELL RK, MOYLE WR. The groove between the α - and β -subunits of hormones with lutropin (LH) activity appears to contact the LH receptor, and its conformation is changed during hormone binding. *J Biol Chem* 1995; **270**: 20011–20019.
- [11] DANKBAR B, BRINKWORTH MH, SCHLATT S, WEINBAUER GF, NIESCHLAG E, GROMOLL J. Ubiquitous expression of the androgen receptor and testis-specific expression of the FSH receptor in the Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) revealed by a ribonuclease protection assay. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1995; **55**: 35–41.
- [12] DAVIS D, LIU X, SEGALOFF DL. Identification of the sites of N-linked glycosylation on the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor and assessment of their role in FSH receptor function. *Mol Endocrinol* 1995; **9**: 159–170.
- [13] DAVIS DP, ROZELL TG, LIU X, SEGALOFF DL. The six N-linked carbohydrates of the lutropin/choriogonadotropin receptor are not absolutely required for correct folding, cell surface expression, hormone binding, or signal transduction. *Mol Endocrinol* 1997; **11**: 550–562.
- [14] ELLIS R J. Chaperoning nascent proteins. *Nature* 1994; **370**: 96–117.
- [15] EVANS BA, BOWENDJ, SMITH PJ, CLAYTON PE, GREGORY JW. A new point mutation in the luteinising hormone receptor gene in familial and sporadic male limited precocious puberty: genotype does not always correlate with phenotype. *J Med Genet* 1996; **33**: 143–147.
- [16] FRAZIER AL, ROBBINS LS, STORK PJ, SPRENGEL R, SEGALOFF DL, CONE RD. Isolation of TSH and LH/CG receptor cDNA from human thyroid: Regulation by tissue specific splicing. *Mol Endocrinol* 1990; **4**: 1264–1276.
- [17] FULLER PJ, VERITY K, SHEN Y, MAMERS P, JOBLING T, BURGER HG. No evidence of a role for mutations or polymorphisms of the follicle-stimulating hormone receptor in ovarian granulosa cell tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; **83**: 274–279.
- [18] GOETZ TL, LLOYD TL, GRISWOLD MD. Role of E Box and Initiator Region in the expression of the rat follicle-stimulating hormone receptor. *J Biol Chem* 1996; **271**: 33317–33324.
- [19] GORCZYNSKA E, SPALIVIERO J, HANDELSMANN DJ. The relationship between 3',5'-cyclic adenosine monophosphate and calcium in mediating follicle-stimulating hormone signal transduction in Sertoli cells. *Endocrinology* 1994; **134**: 293–300.
- [20] GRAF KM, DIAS JA, GRISWOLD MD. Decreased spermatogenesis as the result of an induced autoimmune reaction directed against the gonadotropin receptors in male rats. *J Androl* 1997; **18**: 174–185.
- [21] GRASSO P, DEZIEL MR, REICHERT jr. LE. Synthetic peptides corresponding to residues 551 to 555 and 650 to 653 of the rat testicular follicle-stimulating hormone (FSH) receptor are sufficient for post-receptor modulation of Sertoli cell responsiveness to FSH stimulation. *Regul Pept* 1995; **60**: 177–183.
- [22] GRASSO P, LENG N, REICHERT jr. LE. A synthetic peptide corresponding to residues 546 to 653 in the carboxyl terminal cytoplasmic domain of the rat testicular follicle-stimulating hormone receptor modulates G protein coupled-receptor signaling in rat testis membranes and in intact cultured rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol* 1995; **108**: 43–50.
- [23] GRASSO P, LENG N, REICHERT jr. LE. A synthetic peptide corresponding to the third cytoplasmic loop (residues 533 to 555) of the testicular follicle-stimulating hormone receptor affects signal transduction in rat testis membranes and in intact rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol* 1995; **110**: 35–41.
- [24] GRISWOLD MD, HECKERT L, LINDER C. The molecular biology of the FSH receptor. *J Steroid Molec Biol* 1995; **53**: 215–218.

- [25] GROMOLL J, GUDERMANN T, NIESCHLAG E. Molecular cloning of a truncated isoform of the human follicle stimulating hormone receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **188**: 1077–1083.
- [26] GROMOLL J, DANKBAR B, SHARMA RS, NIESCHLAG E. Molecular cloning of the testicular follicle stimulating hormone receptor of the non human primate *Macaca fascicularis* and identification of multiple transcripts in the testis. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **196**: 1066–1072.
- [27] GROMOLL J, DANKBAR B, GUDERMANN T. Characterization of the 5' flanking region of the human follicle-stimulating hormone receptor gene. *Mol Cell Endocrinol* 1994; **102**: 93–102.
- [28] GROMOLL J, RIED T, HOLTGREVE-GREZ H, NIESCHLAG E, GUDERMANN T. Localization of the human FSH receptor to chromosome 2p21 using a genomic probe comprising exon 10. *J Mol Endocrinol* 1994; **102**: 265–271.
- [29] GROMOLL J, PEKEL E, NIESCHLAG E. The structure and organization of the human follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) gene. *Genomics* 1996; **35**: 308–311.
- [30] GROMOLL J, SIMONI M, NORDHOFF V, BEHRE HM, DE GEYTER C, NIESCHLAG E. Functional and clinical consequences of mutations in the FSH receptor. *Mol Cell Endocrinol* 1996; **125**: 177–182.
- [31] HAWES BE, LUTTRELL LM, EXUM ST, LEFKOWITZ RJ. Inhibition of G protein-coupled receptor signaling by expression of cytoplasmic domains of the receptor. *J Biol Chem* 1994; **269**: 15776–15785.
- [32] HIPKIN RW, LIU X, ASCOLI M. Truncation of the C-terminal tail of the follitropin receptor does not impair the agonist- or phorbol ester-induced receptor phosphorylation and uncoupling. *J Biol Chem* 1995; **270**: 26683–26689.
- [33] HOUDE A, LAMBERT A, SAUMANDE J, SILVERSIDES DN, LUSSIER JG. Structure of the bovine follicle-stimulating hormone receptor complementary DNA and expression in bovine tissues. *Mol Reprod Dev* 1994; **39**: 127–135.
- [34] HUHTANIEMI I T. Polymorphism of gonadotropin action; molecular mechanisms and clinical implications. *Acta Neurobiol Exp* 1996; **56**: 743–751.
- [35] INGLESE J, FREEDMAN NJ, KOCH WJ, LEFKOWITZ RJ. Structure and mechanism of the G protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem* 1993; **268**: 23735–23738.
- [36] ISHII K, CHEN J, ISHII M, KOCH WJ, FREEDMAN NJ, LEFKOWITZ RJ, COUGHLIN SR. Inhibition of thrombin receptor signaling by a G-protein coupled receptor kinase. Functional specificity among G-protein coupled receptor kinases. *J Biol Chem* 1994; **269**: 1125–1130.
- [37] KAWATE N, MENON KM. Palmitoylation of luteinizing hormone/human choriogonadotropin receptors in transfected cells. Abolition of palmitoylation by mutation of Cys-621 and Cys-622 residues in the cytoplasmic tail increases ligand-induced internalization of the receptor. *J Biol Chem* 1994; **269**: 30651–30658.
- [38] KELTON CA, CHENG SVY, NUGENT NP, SCHWEICKHARDT RL, ROSENTHAL JL, OVERTON SA, WANDS GD, KUZEJA JB, LUCHETTE CA, CHAPPEL SC. The cloning of the human follicle stimulating hormone receptor and its expression in COS-7, CHO and Y-1 cells. *Mol Cell Endocrinol* 1992; **89**: 141–151.
- [39] KOLLER KJ, WHITEHORN EA, TATE E, RIES T, AGUILAR B, CHERNOV-ROGAN T, DAVIS AM, DOBBS A, YEN M, BARRETT RW. A generic method for the production of cell lines expressing high levels of 7-transmembrane receptors. *Anal Biochem* 1997; **250**: 51–60.
- [40] KONARSKA L. [red.] Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1995.
- [41] KOSUGI S, VAN DOP C, GEFFNER ME, RABL W, CAREL JC, CHAUSSAIN JL, MORI T, MERENDINO JJ jr., SHENKER A. Characterization of heterogeneous mutations causing constitutive activation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. *Hum Mol Genet* 1995; **4**: 183–188.

- [42] KOTLAR TJ, YOUNG RH, ALBANESE C, CROWLEY WF jr, SCULLY RE, JAMESON JL. A mutation in the follicle-stimulating hormone receptor occurs frequently in human ovarian sex cord tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 1020–1026.
- [43] KRAAIJ R, POST M, KREMER H, MILGROM E, EPPING W, BRUNNER HG, GROOTE-GOED JA, THEMME APN. A missense mutation in the second transmembrane domain of the luteinizing hormone receptor causes familial male-limited precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; **80**: 3168–3172.
- [44] KREMER H, MARIMAN E, OTTEN BJ, MOLL G jr, STOELINGA GB, WIT JM, JANSEN M, DROP SL, FAAS B, ROPERS HH, BRUNNER HG. Cosegregation of missense mutations of the luteinizing hormone receptor gene with familial male-limited precocious puberty. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 1779–1783.
- [45] KREMER H, KRAAIJ R, TOLEDO SPA, POST M, FRIEDMAN JB, HAYASHIDA CY, VAN REEN M, MILGROM E, ROPERS H, MARIMAN E, THEMME APN, BRUNNER H G. Male pseudohermaphroditism due to a homozygous missense mutation of the luteinizing hormone receptor gene. *Nature Gen* 1995; **9**: 160–164.
- [46] LATRONICO AC, ANASTI J, MENDONCA BB, ARNHOLD I, DOMENICE S, ALBANO MC, WAJCHENBERG B L, ZACHMAN K, TSIGOS C. A novel mutation of the luteinizing hormone receptor gene causing male gonadotropin-independent precocious puberty. *Annual Meeting of the Endocrine Society*, Washington DC 1995; P3–P35.
- [47] LATRONICO AC, ANASTI J, ARNHOLD IJ, MENDONCA BB, DOMENICE S, ALBANO MC, ZACHMAN K, WAJCHENBERG BL, TSIGOS C. A novel mutation of the luteinizing hormone receptor gene causing male gonadotropin-independent precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; **80**: 2490–2494.
- [48] LATRONICO AC, ANASTI J, ARNHOLD IJ, RAPAPORT R, MENDONCA BB, BLOISE W, CASTRO M, TSIGOS C, CHROUSOS GP. Brief report: testicular and ovarian resistance to luteinizing hormone caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone-receptor gene. *New Engl J Med* 1996; **334**: 507–512.
- [49] LATTION A L, DIVIANI D, COTECCHIA S. Truncation of the receptor carboxyl terminus impairs agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the alpha 1B-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1994; **269**: 22887–22893.
- [50] LAUE LL, CHAN WY, HSUEH AJW, KUDO M, HSU SY WU SM, BLOMBERG L, CUTLER GB jr. Genetic heterogeneity of constitutively activating mutations of the human luteinizing hormone receptor in familial male-limited precocious puberty. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 ; **92**: 1906–1910.
- [51] LAUE LL, WU SM, JELLY DH, CUTLER GB jr, CHAN WY. A novel constitutively activating mutation of the human luteinizing hormone receptor (hLHR) gene in an african American patient with sporadic male-limited precocious puberty. *Annual Meeting of the Endocrine Society* Washington DC 1995 ; P3–P36.
- [52] LAUE LL, WU SM, KUDO M, HSUEH AJW, CUTLER GB jr, CHAN W Y. Missense mutations in exons 10 to 11 of the human luteinizing hormone receptor gene are associated with Leydig cell hypoplasia. *Ann J Hum Gene Suppl* 1995; **57**: 1252.
- [53] LAUE LL, WU SM, KUDO M, BOURDONY CJ, CUTLER GB jr., HSUEH AJ, CHAN WY. Compound heterozygous mutations of the luteinizing hormone receptor gene in Leydig cell hypoplasia. *Mol Endocrinol* 1996; **10**: 987–997.
- [54] LEIFKE E, SIMONI M, KAMISCHKE A, GROMOLL J, BERGMANN M, NIESCHLAG E. Does the gonadotrophic axis play a role in the pathogenesis of Sertoli-cell-only syndrome? *Int J Androl* 1997; **20**: 29–36.
- [55] LIM K, HWANG B. Follicle-stimulating hormone transiently induces expression of protooncogene c-myc in primary Sertoli cell cultures of early pubertal and prepubertal rat. *Mol Cell Endocrinol* 1995; **111**: 51–56.

- [56] LINDER CC, HECKERT LL, GOETZ TL, GRISWOLD MD. Follicle stimulating hormone receptor gene promoter activity. *Endocrine* 1994; **2**: 957–966.
- [57] LITTLEWOOD TD, EVAN GI. Transcription factors 2: helix-loop-helix. *Protein Profile* 1994; **1**: 635–709.
- [58] LIU J, ARONOW BJ, WITTE DP, POPE WF, LA BARBERA AR. Cyclic and maturation-dependent regulation of follicle-stimulating hormone receptor and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in the porcine ovary. *Biol Reprod* 1998; **58**: 648–658.
- [59] MAGUIRE SM, TRIBLEY WA, GRISWOLD MD. Follicle-stimulating hormone (FSH) regulates the expression of FHS receptor messenger ribonucleic acid in cultured Sertoli cells and in hypophysectomized rat testis. *Biol Reprod* 1997; **56**: 1106–1111.
- [60] MAYERHOFER A, DISSEN GA, COSTA ME, OJEDA SR. A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology* 1997; **138**: 3320–3329.
- [61] Mc LACHLAN RI, WREFORD NG, de KRETZER DM, ROBERTSON DM. The effects of recombinant follicle-stimulating hormone on the restoration of spermatogenesis in the gonadotropin-releasing hormone-immunized adult rat. *Endocrinology* 1995; **136**: 4035–4043.
- [62] MEACHEM SJ, Mc LACHLAN RI, de KRETZER DM, ROBERTSON DM, WREFORD NG. Neonatal exposure of rats to recombinant follicle stimulating hormone increases adult Sertoli and spermatogenic cell numbers. *Biol Reprod* 1996; **54**: 36–44.
- [63] MINEGISHI T, IGARASHI S, NAKAMURA K, NAKAMURA M, TANO M, SHINOZAKI H, MYIAMOTO K, IBUKI Y. Functional expression of the recombinant human FSH receptor. *J Endocrinol* 1994; **141**: 369–375.
- [64] MINEGISHI T, TANO M, SHINOZAKI H, NAKAMURA K, ABE Y, IBUKI Y, MIYAMOTO K. Dual coupling and down regulation of human FSH receptor in CHO cells. *Life Sciences* 1997; **60**: 2043–2050.
- [65] MOYLE WR, CAMPBELL RK, VENKATESWARA RAO SN, AYAD NG, BERNARD M P, HAN Y, WANG Y. Model of human chorionic gonadotropin and lutropin receptor interaction that explains signal transduction of the glycoprotein hormones. *J Biol Chem* 1995; **270**: 20020–20031.
- [66] NAKAMURA K, HIPKIN RW, ASCOLI M. The agonist-induced phosphorylation of the rat follitropin receptor maps to the first and third intracellular loops. *Mol Endocrinol* 1998; **12**: 580–591.
- [67] NOCI I, BORRI P, TADDEI GL, MONCINI D, BARNI T, VANNELLI GB. Human endometrial cancers contain follicle-stimulating hormone receptors: a preliminary study. *Gynecol Endocrinol* 1997; **11**: 297–300.
- [68] OKTAY K, BRIGGS D, GOSDEN RG. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 3748–3751.
- [69] OSHAUGHNESSY PJ, MARSH P, DUDLEY K. Follicle-stimulating hormone receptor mRNA in the mouse ovary during post-natal development in the normal mouse and in the adult hypogonadal (hpg) mouse: structure of alternate transcripts. *Mol Cell Endocrinol* 1994; **101**: 197–201.
- [70] OU W-J, CAMERON PH, THOMAS DY, BERGERON JM. Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation. *Nature* 1994; **364**: 771–776.
- [71] PARMA J, DUPREZ L, VAN SANDE J, PASCHKE R, TONACCHERA M, DUMONT J, VASSART G. Constitutively active receptors as disease-causing mechanism. *Mol Cell Endocrinol* 1994; **100**: 159–162.
- [72] PASCHKE R, METCALFE A, ALCADE L, VASSART G, WEETMAN A, LUDGATE M. Presence of non-functional thyrotropin receptor variant transcripts in retroocular and other tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; **79**: 1234–1238.

- [73] PROSSNITZ ER, KIM CM, BENOVIC JL, YE RD. Phosphorylation of the N-formyl peptide receptor carboxyl terminus by the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *J Biol Chem* 1995; **270**: 1130–1137.
- [74] QUINTANA J, WANG H, ASCOLI M. The regulation of the binding affinity of the lutropin/choriogonadotropin receptor by sodium ions is mediated by a highly conserved aspartate located in the second transmembrane domain of G protein-coupled receptors. *Mol Endocrinol* 1993; **7**: 767–775.
- [75] QUINTANA J, HIPKIN RW, SANCHEZ-YAGUE J, ASCOLI M. Follitropin (FSH) and a phorbol ester stimulate the phosphorylation of the FSH receptor in intact cells. *J Biol Chem* 1994; **269**: 8772–8779.
- [76] RANNIKKI AS, ZHANG FP, HUHTANIEMI IT. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in the rat testis and ovary. *Mol Cell Endocrinol* 1995; **107**: 199–208.
- [77] RANNIKKO A, PENTTILA T-L, ZHANG F-P, TOPPARIJ, PARVINEN M, HUHTANIEMI I. Stage-specific expression of the FSH receptor gene in the prepubertal and adult rat seminiferous epithelium. *J Endocrinol* 1996; **151**: 29–35.
- [78] REMY JJ, BOZON V, COUTURE L, GOXE B, SALESSE R, GARNIER J. Reconstitution of a high-affinity functional lutropin receptor by coexpression of its extracellular and membrane domains. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **193**: 1023–1030.
- [79] REMY JJ, LAHBIB-MANSAIS Y, YERLE M, BOZON V, COUTURE L, PAJOT E, GREBER D, SALESSE R. The porcine follitropin receptor: cDNA cloning, functional expression and chromosomal localization of the gene. *Gene* 1995; **163**: 257–261.
- [80] REMY JJ, COUTURE L, RABESONA H, HAERTLE T, SALESSE R. Immunization against exon 1 decapeptides from the lutropin/choriogonadotropin receptor or the follitropin receptor as potential male contraceptive. *J Reprod Immunol* 1996; **32**: 37–54.
- [81] REN Q, KUROSE H, LEFKOWITZ RJ, COTECCHIA S. Constitutively active mutants of the α_2 -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1993; **268**: 16483–16487.
- [82] ROY AL, ROEDER RG. Initiator element binding protein TF II-I: a tale of two sites. *Indian J Biochem Biophys* 1994; **31**: 14–19.
- [83] ROZELL TG, WANG H, LIU X, SEGALOFF DL. Intracellular retention of mutant gonadotropin receptors results in loss of hormone binding activity of the follitropin receptor but not the lutropin/choriogonadotropin receptor. *Mol Endocrinol* 1995; **9**: 1727–1736.
- [84] ROZELL TG, DAVIS DP, CHAI Y, SEGALOFF DL. Association of gonadotropin receptor precursors with the protein folding chaperone calnexin. *Endocrinology* 1998; **139**: 1588–1593.
- [85] SAIRAM M R, JIANG L G, YARNEY T A, KHAN H. Alternative splicing converts the G-protein coupled follitropin receptor gene into a growth factor type I receptor: implications for pleiotropic actions of the hormone. *Mol Reprod Dev* 1997; **48**: 471–479.
- [86] SAMAMA P, COTECCHIA S, COSTA T, LEFKOWITZ RJ. A mutation-induced activated state of the β_2 -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1993; **268**: 4625–4636.
- [87] SEETHARAMAIAH G S, KUROSKY A, DESAI RK, DALLAS JS, PRABHAKER BS. A recombinant extracellular domain of the thyrotropin (TSH) receptor binds TSH in the absence of membranes. *Endocrinology* 1994; **134**: 549–554.
- [88] SHENKER A, LAUE L, KOSUGI S, MERENDINO J jr, MINEGISHI T, CUTLER GB jr. A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. *Nature* 1993; **365**: 652–654.
- [89] SOBKOWIAK A, WIERZBICKI A, TRZECIAK WH. Budowa i funkcja receptora lutropiny (LH/hCG). *Post Biol Kom* 1997; **24**: 67–82.
- [90] STRADER CD, FONG TM, TOTA MR, UNDERWOOD D. Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem* 1994; **63**: 101–132.
- [91] TAKANO T, HONDA Z, SAKANAKA C, IZUMI T, KAMEYAMA K, HAGA K, HAGA T, KUOKAWA K, SHIMIZU T. Role of cytoplasmic tail phosphorylation sites of platelet-ac-

- tivating factor receptor in agonist-induced desensitization. *J Biol Chem* 1994; **269**: 22453–22458.
- [92] TAPANAINEN JS, AITTOMAKI K, HUHTANIEMI IT. New insights into the role of follicle-stimulating hormone in reproduction. *Ann Med* 1997; **29**: 265–266.
- [93] TAPANAINEN JS, AITTOMAKI K, MIN J, VASKIVUO T, HUHTANIEMI IT. Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. *Nat Genet* 1997; **15**: 205–206.
- [94] THEM MEN A PN, KRAAIJ R, GROOTEGOED JA. Regulation of gonadotropin receptor gene expression. *Mol Cell Endocrinol* 1994; **100**: 15–19.
- [95] THOMAS DM, SEGALOFF DL. Hormone binding properties and glycosylation pattern of a recombinant from of the extracellular domain of the LH/CG receptor expressed in mammalian cells. *Endocrinology* 1994; **135**: 1902–1912.
- [96] TIAN XC, BERNDTSON AK, FORTUNE JE. Differentiation of bovine preovulatory follicles during the follicular phase is associated with increases in messenger ribonucleic acid for cytochrome P450 side-chain cleavage, 3-hydroxysteroid dehydrogenase, and P450 17 α -hydroxylase, but not P450 aromatase. *Endocrinology* 1995; **136**: 5102–5110.
- [97] TOLEDO SPA, BRUNNER HG, KRAAIJ R, POST M, DAHIA PLM, HAYASHIDA CY, KREMER H, THEM MEN APN. An inactivating mutation of the LH receptor causes amenorrhea in a 46,XX female. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; **81**: 3850–3854.
- [98] VANNIER B, LOOSFELT H, MEDURI G, PICHON C, MILGROM E. Anti-human FSH receptor monoclonal antibodies: immunochemical and immunocytochemical characterization of the receptor. *Biochemistry* 1996; **35**: 1358–1366.
- [99] YAGHMAI R, HAZELBAUER GL. Ligand occupancy mimicked by single residue substitutions in a receptor: Transmembrane signaling induced by mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 7890–7894.
- [100] YANO K, HIDAKA A, SAJI M, POLYMEROPOULOS MH, OKUNO A, KOHN LD, CUTLER GB jr. A sporadic case of male-limited precocious puberty has the same constitutively activating point mutation in the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene as familial cases. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; **79**: 1818–1823.
- [101] YANO K, SAJI M, HIDAKA A, MORIYA N, OKUNO A, KOHN LD, CUTLER GB jr. A new constitutively activating point mutation in the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene in cases of male-limited precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; **80**: 1162–1168.
- [102] YANO K, KOHN LD, SAJI M, KATAOKA N, OKUNO A, CUTLER GB jr. A case of male-limited precocious puberty caused by a point mutation in the second transmembrane domain of the luteinizing hormone choriogonadotropin receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **220**: 1036–1042.
- [103] YARNEY T A, JIANG L, KHAN H, MacDONALD EA, LAIRD DW, SAIRAM MR. Molecular cloning, structure, and expression of a testicular follitropin receptor with selective alteration in the carboxy terminus that affects signaling function. *Mol Reprod Dev* 1997; **48**: 458–470.
- [104] ZELEZINK AJ, BENYO DF. Control of follicular development, corpus luteum function, and the recognition of pregnancy in higher primates. [w] Knobil E, Neill J [red.] *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press Ltd 1994: 751–781.
- [105] ZHANG C, SHIMADA K, SAITO N, KANSAKU N. Expression of messenger ribonucleic acids of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptors in granulosa and theca layers of chicken preovulatory follicles. *Gen Comp Endocrinol* 1997; **105**: 402–409.
- [106] ZHENG W, MAGID MS, KRAMER EE, CHEN YT. Follicle-stimulating hormone receptor is expressed in human ovarian surface epithelium and fallopian tube. *Am J Pathol* 1996; **148**: 47–53.

- [107] ZHOU J, KUMAR TR, MATZUK MM, BONDY C. Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary. *Mol Endocrinol* 1997; **11**: 1924–1933.
- [108] ZHU H, WANG H, ASCOLI M. The lutropin/choriogonadotropin receptor is palmitoylated at intracellular cysteine residues. *Mol Endocrinol* 1995; **9**: 141–150.
- [109] ZIRKIN BR, AWONIYI C, GRISWOLD MD, SHARPE RM. Is FSH required for adult spermatogenesis? *Androl* 1994; **15**: 273–276.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 18.11.1998 r.

Przyjęto: 08.01. 1999 r.

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

ROLA KOMÓRKI TUCZNEJ W ORGANIZMIE CZŁOWIEKA

THE ROLE OF THE MAST CELL IN HUMAN BODY

Grażyna SZPUNAR*, Marlena WAWROCKA-PAWLAK,
Ryszard DĄBROWSKI

Katedra i Zakład Patofizjologii Akademii Medycznej w Łodzi

Streszczenie: Komórki tuczne (mastocyty) znajdują się niemal we wszystkich głównych narządach i tkankach naszego organizmu. Choć dziś dużo już o nich wiadomo, wiele jeszcze pozostało do odkrycia. Mastocyty zawierają liczne ziarnistości wydzielnicze. Ziarnistości produkują wiele związków biologicznie czynnych, takich jak: aminy biogenne, proteazy, metabolity kwasu arachidonowego, cytokiny. Komórki tuczne człowieka możemy podzielić w zależności od zawartości ziarnistości na trzy podtypy: 1) MC_{CT} – zawierające chymazę i tryptazę, 2) MC_T – zawierające tryptazę, 3) MC_C – zawierające chymazę. Obecnie wiadomo, że komórki tuczne poza różnorodnością pod względem histochemicznym i biochemicznym wykazują także zróżnicowanie funkcjonalne. Komórki tuczne pełnią kluczową rolę w reakcjach nadwrażliwości i w tzw. niealergicznym reakcjach immunologicznych. Udowodniony jest również udział komórek tucznych w procesie zapalnym, w regulacji napięcia ścian dróg oddechowych, procesie wykrzepiania wewnątrznaczyniowego, regulacji ciśnienia tętniczego krwi, mogą one wpływać na procesy angiogenezy oraz przebudowy tkankowej. Szczegółowe poznanie fizjologii tych komórek może pozwolić na zrozumienie wielu dotychczas nie wyjaśnionych procesów.

Słowa kluczowe: komórka tuczna, tryptaza, chymaza

Summary: Mast cells are found in almost every main organs and tissues of our body. Although we know a lot about them, they still arouse much controversy. They produce or store many substances, among them: biogenic amins, proteases, mediators synthesized from arachidonic acid and cytokines. Mast cells in human represent a heterogeneous cell population. According to the content of the specific proteases we can distinguish: 1) MC_{CT} – mast cells containing chymase and tryptase, 2) MC_T – mast cells containing tryptase, 3) MC_C – mast cells containing chymase. Now it is clear that mast cells in addition to their histochemical and biochemical heterogeneity can also be distinguished by their functional activity. Mast cells play a great role in hypersensitivity reactions, inflammatory reactions, airway and vascular tone regulation, intravascular coagulation, vascularisation and tissue remodeling. Better know-

*Stud. Wydziału Lekarskiego V roku, Indywidualny Tok Studiów.

ledge of mast cell physiology can help to understand many reactions which have not been acknowledged yet.

Key words: mast cell, tryptase, chymase.

Komórki tuczne (mastocyty, ang.: *mast cells*, niem.: *Mastzellen*) znajdują się niemal we wszystkich głównych narządach i tkankach naszego organizmu i biorą udział w wielu procesach, zarówno fizjologicznych jak i patologicznych. Choć dziś dużo już o nich wiadomo, nadal wzbudzają wiele kontrowersji.

Po raz pierwszy zaobserwował je von Recklinghausen w 1863 roku, jednakże odkrycie ich przypisuje się Pawłowi Ehrlichowi. Ten niemiecki uczony, jeszcze jako student w 1877 roku badał zdolności barwienia barwników anilinowych i stwierdził, że pewne komórki zawierają ziarnistości barwiące się pod wpływem niebieskich barwników na kolor fioletowy. Ponieważ podejrzewał, że tak duże komórki magazynują substancje odżywcze dla tkanki łącznej, więc nazwał je komórkami tuczными. I choć późniejsze badania innych uczonych nie potwierdziły tej hipotezy, nazwa przetrwała do dziś [32].

Komórki tuczne mają kształt okrągły lub lekko wydłużony. Jądro jest na ogół niesegmentowane, heterochromatyna rozproszona. Wyposażone są w typowe organelle komórkowe: mitochondria, retikulum endoplazmatyczne, aparat Golgiego, rybosomy i polisomy. W cytoplazmie stwierdza się ponadto ziarna lipidowe nie otoczone błoną, mikrotubule, mikrofilamenty oraz bardzo liczne ziarnistości wydzielnicze.

Pochodzenie komórek tucznych długo pozostawało niejasne. Sugerowano, że różnicują się one z limfocytów T, makrofagów lub fibroblastów. Obecnie wiadomo, że rozwijają się z wielopotencjalnych komórek krwiotwórczych w szpiku kostnym [13, 20]. Komórki te są mniej zróżnicowane niż komórki prekursorowe linii erytrocytarnej czy granulocytarnej. Podczas gdy komórki krwi (erytrocyty, granulocyty) nie opuszczają tkanki krwiotwórczej przed ukończeniem dojrzewania, komórki tuczne docierają do tkanki łącznej jako niezróżnicowane komórki progenitorowe i dopiero tam nabierają swoistych cech.

Dojrzewanie komórek tucznych zachodzi pod wpływem specyficznych czynników wzrostu, którymi są: IL-3, IL-4, SCF (*stem cell factor*, czynnik wzrostu komórek pnia), IL-9, IL-10 [18]. W odróżnieniu od pozostałych dojrzałych komórek krwi, mastocyty zachowują zdolność do proliferacji (choćby podziały tych komórek nie były dotąd obserwowane w tkankach) [31].

Liczba komórek tucznych w organizmie jest znaczna. Dowiedziono, że gdyby komórki te tworzyły jeden narząd, jego masa byłaby porównywalna z masą śledziony [31]. Rozmieszczone są jednak nieregularnie. Zagęszczenie tych komórek występuje w skórze, błonie śluzowej dróg oddechowych i przewodu pokarmowego – czyli wszędzie tam, gdzie organizm narażony jest na kontakt z obcymi antygenami. Sugeruje to, że pełnią one kluczową rolę w procesach obronnych organizmu.

Aktywność immunologiczną mastocytów można, w pewnym uproszczeniu, sprowadzić do zdolności uwalniania przez nie mediatorów.

Mediatory zawarte w ziarnistościach komórek tucznych można podzielić na trzy grupy:

- 1) mediatory preformowane,
- 2) mediatory syntetyzowane *de novo* z fosfolipidów błon komórkowych pod wpływem aktywacji komórek tucznych,
- 3) cytokiny [31].

Do **mediatorów preformowanych** zaliczamy:

- *aminybiogenne*: histaminę i serotoninę; zawartość histaminy jest różna w różnych komórkach tucznych – najwięcej 5,6 pg/kom. znajduje się w mastocytach migdałków, mniej – 4,6 pg/kom. – w mastocytach skóry, 1,0–5,5 – w mastocytach płuc, 3,7 – w mastocytach krezki, 2,8 – w mastocytach jelita grubego; serotonina nie występuje w mastocytach człowieka (występuje tylko w komórkach tucznych gryzoni) [27];
- *proteoglikany*: proteoglikan heparyny i niektóre siarczany chondroityn;
- *obojętne proteazy*: tryptazę, chymazę, karboksypeptydazę B, katepsynę G [21];
- *kwaśne hydrolazy*: arylosulfatazę- β , β -heksozaminidazę, β -galaktozydazę;
- *enzymy utleniające*: peroksydazę, dysmutazę ponadtlenkową, kininogenazę;
- *czynniki chemotaktyczne*: ECF-A (*eosinophil chemotactic factor*, czynnik chemotaktyczny dla eozynofilów), NCF-A (*neutrophil chemotactic factor*, czynnik chemotaktyczny dla neutrofilów) [32].

Do **mediatorów syntetyzowanych z kwasu arachidonowego** błon komórkowych pod wpływem aktywacji komórek tucznych należą: PGD₂, LTC₄, PAF (*platelet-activating factor*, czynnik aktywujący płytki) i występujący w mniejszej ilości LTB₄ [12, 20].

Mechanizm syntezy i magazynowania **cytokin** nie jest dokładnie wyjaśniony, ale udowodniono, że profil wydzielania komórek tucznych jest zbliżony do profilu limfocytów Th typu 2. Stwierdzono, że komórki tuczne gryzoni produkują: IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IFN- γ (interferon- γ), TGF- β (*transforming growth factor*- β , transformujący czynnik wzrostu), TNF- α (*tumor necrosis factor*- α , czynnik nekrotyczny nowotworów), MIP-1 (*macrophage inflammatory protein-1*), GM-CSF (*granulocyte – macrophage colony-stimulating factor*). Natomiast komórki tuczne człowieka produkują: TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6 (TNF- α i IL-4 mogą być natychmiastowo uwalniane z ziarnistości w procesie degranulacji) [1, 5, 16].

Zdolność komórek tucznych do uwalniania cytokin, które mają szeroki i bardzo różnorodny wpływ na wiele procesów zachodzących w organizmie, świadczy o różnej roli tych komórek. Biorą one m.in. udział w takich procesach, jak: gojenie się ran, przebudowa tkanek, patologiczne włóknienie, angiogeneza, tworzenie skrzepów, odpowiedź swoista na infekcje bakteryjne, rozrost niektórych nowotworów, hematopoeza i produkcja przeciwciał [31].

Odpowiedź komórek tucznych na bodziec może przebiegać w dwojaki sposób: 1) jako degranulacja komórek lub 2) jako wzrost liczby mastocytów.

Pierwszy typ odpowiedzi (tj. degranulacja) jest charakterystyczny dla reakcji nadwrażliwości typu wczesnego. Degranulacja może być zależna od IgE, a niezależna od dopełniacza (jak w reakcji anafilaksji) lub zależna od dopełniacza (jak w reakcji anafilaksji wywołanej przez kompleksy immunologiczne).

Rozrost komórek tucznych jest z kolei charakterystyczny dla reakcji nadwrażliwości typu późnego. Akumulacja mastocytów w tym procesie jest poprzedzona agregacją limfocytów T. IL-1 i TNF- α uwolnione z komórek tucznych mogą wtórnie przyczyniać się do gromadzenia się limfocytów.

Degranulacja komórek tucznych następuje pod wpływem ich aktywacji. Głównym czynnikiem aktywującym mastocyty jest reakcja swoistego antygeny z cząsteczkami odpowiednich IgE związanych z komórkowymi receptorami Fc ϵ RI (reakcja anafilaktyczna). Wiadomo, że reaktywność komórek tucznych pochodzących z różnych narządów nie jest taka sama. Związane jest to przede wszystkim z różną gęstością receptorów Fc ϵ RI na powierzchni tych komórek.

Do aktywacji mastocytów może dojść także w drodze tzw. mechanizmów anafilaktoidalnych, bez udziału IgE. Ta aktywacja komórek może być wywołana przez czynniki endogenne lub egzogenne [32].

Czynnikami endogennymi wywołującymi aktywację komórek tucznych są: anafilatoksyny C_{3a}, C_{4a}, C_{5a}, czynniki uwalniające histaminę (HRFs), enzymy (fosfolipaza A₂, fosfolipaza C, chymotrypsyna), neuropeptydy (somatostatyna, neurotensyna, angiotensyna, substancja P, endorfina, gastryna), interleukiny (IL-1, IL-3), białka pochodzące z eozynofili (główne białko zasadowe: MBP – *major basic protein*, kationowe białko eozynofilowe: ECP – *eosinophil cationic protein*) i inne.

Niektóre z tych czynników, np. anafilatoksyny łączą się ze swoistymi receptorami na powierzchni komórek tucznych i w ten sposób aktywują je; mechanizm działania pozostałych nie został poznany. Reaktywność mastocytów różnych gatunków zwierząt i człowieka na wyżej wymienione czynniki jest bardzo zróżnicowana [13, 15].

Wśród **czynników egzogennych** aktywujących mastocyty należy wymienić: niektóre leki, środki cieniujące, jonofory wapnia, polimery węglowodanów, bakterie i ich produkty [4, 28].

Komórki tuczne nie stanowią jednolitej populacji komórek. Pierwsze doniesienia o ich zróżnicowaniu pochodzą z 1906 roku, kiedy to Maksimow zaobserwował, że mastocyty przewodu pokarmowego różnych gatunków zwierząt są mniejsze i zawierają mniej ziarnistości niż wyizolowane z innych narządów; obserwacje te potwierdziły także późniejsze badania innych uczonych [3, 10, 23]. Obecnie wiadomo, że komórki tuczne, poza różnorodnością pod względem histochemicznym i biochemicznym, wykazują także zróżnicowanie funkcjonalne [10, 29].

Komórki tuczne gryzoni można podzielić na dwie subpopulacje. Są to: 1) komórki tuczne związane z błoną śluzową: MMC – *mucosal mast cells* i 2) komórki tuczne związane z tkanką łączną: CTMC – *connective tissue mast cells*.

Ludzkich komórek tucznych nie można podzielić na mastocyty związane z błoną śluzową i związane z tkanką łączną. Również klasyfikacja histochemiczna, oparta na obecności lub braku heparyny, dobra do różnicowania mastocytów u gryzoni, nie jest przydatna w analizowaniu tych komórek, gdyż wszystkie komórki tuczne człowieka zawierają heparynę.

Podobnie jak u gryzoni, dominującym składnikiem ziarnistości ludzkich komórek tucznych są obojętne proteazy: chymaza i tryptaza [2, 11, 12, 17, 19, 22, 30, 31].

W zależności od zawartości proteaz komórki tuczne człowieka możemy podzielić na trzy podtypy: 1) MC_T – zawierające tryptazę, 2) MC_{CT} – zawierające chymazę i tryptazę, 3) MC_C – zawierające chymazę.

Trzecia subpopulacja komórek tucznych, tzn. zawierająca tylko chymazę (a nie zawierająca tryptazy) została odkryta dopiero niedawno w 1993 roku przez Weidnera i Austena [30]. Komórki te występują w błonie podśluzowej przewodu pokarmowego i w węzłach chłonnych. Ponieważ jednak żadnemu innemu badaczowi nie udało się uwidocznić tych komórek, ich występowanie czeka na potwierdzenie.

Subpopulacje MC_T i MC_{CT} różnią się pod względem budowy ultrastrukturalnej. Ziarnistości MC_{CT} zawierają struktury parakrystaliczne w kształcie siatki lub kryształów, podczas gdy ziarnistości MC_T zawierają struktury ułożone w rulony, skupione na obrzeżach ziarnistości [12]. Ponadto subpopulacje te różnią się zawartością cytokin, a mianowicie: IL-4 występuje w 85% MC_{CT} i tylko w 15% MC_T , a IL-5 i IL-6 znajdują się prawie wyłącznie w MC_T [6].

Aldenberg i Enerbäck [2] wykazali wiele różnic w lokalizacji między komórkami MC_{CT} i MC_T . Stwierdzili oni, że MC_{CT} są dominującymi komórkami zarówno w błonie podśluzowej, jak i śluzowej przewodu pokarmowego, natomiast MC_T są zlokalizowane w błonie śluzowej (tylko błona śluzowa kątnicy wykazuje duże różnicowanie w zakresie zawartości komórek MC_T). Natomiast wg Matina i wsp. MC_C występują z tą samą częstością we wszystkich narządach [22].

Różnorodność komórek tucznych dyskutowano od dawna, podobnie jak pochodzenie poszczególnych subpopulacji mastocytów. Kitamura i wsp. [15, 17] na podstawie badań *in vitro* i *in vivo* stwierdzili, że różnicowanie w kierunku poszczególnych podtypów mastocytów zależy od mikrośrodowiska, w którym zachodzi ostateczne dojrzewanie tych komórek. Komórki MMC (komórki tuczne związane z błoną śluzową) mogą przekształcać się w CTMC (komórki tuczne związane z tkanką łączną) i odwrotnie. Różnicowanie związane jest z wpływem pewnych czynników obecnych w mikrośrodowisku. Wykazano, że mysie komórki tuczne w obecności IL-3 różnicują się w kierunku MMC, podczas gdy hodowane w obecności SCF (*stem cell factor*, czynnik wzrostu komórek pnia) lub fibroblastów lub po prostu bez dostępu egzogennej IL-3, różnicują się w CTMC. U człowieka róż-

nicowanie komórek tucznych przebiega inaczej. Dowiedziono, że IL-3 nie wpływa znacząco na proliferację mastocytów, lecz jest czynnikiem wzrostu granulocytów obojętnochłonnych [25]. Związane jest to z brakiem receptorów dla IL-3 na powierzchni ludzkich mastocytów. Udowodniono także, że IL-4, pobudzająca proliferację komórek tucznych gryzoni, nie odgrywa żadnej roli jako czynnik wzrostu dla mastocytów człowieka [25]. Natomiast SCF indukuje różnicowanie komórek tucznych w kierunku MC_T [24, 33]. Podczas badania nad wpływem SCF na komórki tuczne człowieka stwierdzono interesującą zależność: po inkubacji przez 8 tygodni mysich fibroblastów $3T_3$ (głównego źródła SCF) i linii jednojądrzastych komórek krwi okazało się, że ponad 90% komórek przekształciło się w dojrzałe komórki tuczne zawierające chymazę i tryptazę. To doświadczenie sugeruje, że fibroblasty produkują inne niż SCF czynniki odpowiedzialne za różnicowanie się komórek tucznych w kierunku MC_{CT} [14].

Ostatnie doniesienia mówią, że histochemiczne zróżnicowanie komórek tucznych można odnieść także do ich różnorodności funkcjonalnej [7]. Wykazano, że 90% mastocytów zlokalizowanych w sercu to MC_{CT} [26]. Komórki te wykazują wiele podobieństw funkcjonalnych do subpopulacji komórek tucznych pochodzących z płuc lub z macicy. Wykazano ponadto, że zawartość tryptazy w sercowych komórkach tucznych (HHMC – *human heart mast cell*) jest wyższa niż w komórkach pochodzących z płuc, a niższa niż w skórnych komórkach tucznych. Stymulowanie HHMC przeciwciałami anti-IgE powoduje uwalnianie LTC_4 i PGD_2 . Komórki tuczne skóry natomiast uwalniają więcej PGD_2 , ale znacznie mniej LTC_4 . Anafilatoksyna C_{5a} i protamina indukują uwalnianie histaminy z HHMC i mastocytów skórnych, ale nie wpływają na komórki tuczne płuc.

Z kolei morfina, substancja P i związek 48/80 selektywnie uwalniają histaminę ze skórnych mastocytów, a nie wpływają na reaktywność komórek tucznych serca i płuc [26, 28].

Tryptaza jest obok chymazy główną proteiną produkowaną i magazynowaną przez komórki tuczne; występuje ona jako w pełni aktywny tetramer. Istnieją dwa rodzaje tryptazy: α -tryptaza i β -tryptaza [27]. Nie wiadomo, czy są one produktami dwóch różnych genów (α i β), czy też występowanie dwóch izoform jest wynikiem modyfikacji potranslacyjnej [19]. Alfa-tryptaza nie jest przechowywana w ziarnistościach wydzielniczych, lecz jest ciągle uwalniana przez komórki tuczne i jest dominującą formą tego enzymu występującą we krwi. Beta-tryptaza występuje jako nieaktywny monomer. Konwersja tej nieaktywnej formy do aktywnego homotetrameru wymaga kwaśnego pH i heparyny, dlatego proces ten może zachodzić jedynie w komórkach tucznych. Tryptaza jest magazynowana w ziarnistościach wydzielniczych razem z chymazą, karboksypeptydazą i proteazą podobną do katepsyny G. Tryptaza występuje w połączeniach z proteoglikanami. Kompleksy te są mniejsze niż kompleksy wiążące chymazę i karboksypeptydazę. Tryptaza znajduje się w elektronowo rzadkich obszarach ziarnistości, podczas gdy chymaza i proteaza

podobna do katepsyny G zajmują elektronowo gęste fragmenty ziarnistości. U ludzi tryptaza wydaje się być stabilizowana przez histaminę. Biologiczne znaczenie tryptazy polega na hydrolizie białek. Jest to enzym wysoce specyficzny, hamowany jedynie przez inhibitory proteaz serynowych.

Tryptaza ma wielokierunkowe działanie:

1) rozszczepia takie związki, jak: VIP (*vasoactive intestinal peptide*, wazoaktywny peptyd jelitowy), HMMK (*high-molecular-mass kininogen*, kininogen o wysokiej masie cząsteczkowej), PHM (*peptide histidine-methionine*, peptyd histydynowo-metioninowy), CGRP (*calcitonin gene related peptide*, peptyd pochodny genu kalcytoninowego) – neuropeptydy te działają rozluźniająco na mięśnie gładkie oskrzeli, a zatem ich rozpad może być przyczyną skurczu tych mięśni po stymulacji trypsyną;

2) stymuluje syntezę DNA w komórkach nabłonka oskrzeli, a zatem może być traktowana jako potencjalny mitogen;

3) zwiększa ekspresję ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule*, cząsteczka adhezji międzykomórkowej) na komórkach nabłonka, przez co może przyczyniać się do regeneracji nabłonka i mobilizacji granulocytów;

4) w naskórku rozszczepia fibronektynę i kolagenazę typu IV, przez co bierze aktywny udział w przebudowie tkankowej; ponadto w doświadczeniach *in vivo* wykazano, że aktywuje ona MMP III (metaloproteiny, które degradują tkankę łączną i są wydzielane przez komórki w formie nieaktywnej);

5) odgrywa rolę w rozszczepianiu i inaktywacji fibrynogenu, przez co działa jak miejscowy antykoagulant;

6) hamuje mitogenne działanie trombiny na mięśnie gładkie naczyń, przez co zwiększa przepuszczalność naczyń;

7) jest czynnikiem wzrostu dla fibroblastów, więc wpływa na włóknienie tkanek i gojenie się ran [11].

Drugą proteazą serynową produkowaną i magazynowaną przez komórki tuczne jest **chymaza**. Istnieje bardzo wiele izoform tego enzymu u różnych gatunków zwierząt.

U człowieka odkryto dotychczas jedną formę chymazy. Zdolność syntezy tego enzymu mają komórki tuczne i niektóre komórki śródbłonka naczyń. Interesujący jest fakt, że najbardziej zbliżona do ludzkiej chymazy pod względem strukturalnym jest chymaza psia i mysia (zupełnie inną sekwencję ma natomiast chymaza produkowana przez szczury, co zmusza do ostrożnej interpretacji wyników doświadczeń prowadzonych na tych zwierzętach). Podobnie jak tryptaza, chymaza ludzka także wykazuje wiele działań:

1) ma zdolność konwersji angiotensyny I do angiotensyny II (niezależną od konwertazy), przez co może regulować ciśnienie krwi;

2) wywiera dwukierunkowe działanie na mięśnie gładkie oskrzeli:

- zwiększa ich napięcie przez rozszczepianie VIP (który rozluźnia mięśnie gładkie oskrzeli),

- zmniejsza ich napięcie przez hamowanie wazokonstryktorów: bradykininy, kalidyny;
- 3) stymuluje wydzielanie gruczołów warstwy podśluzowej oskrzeli;
- 4) poprzez IL-1 i TGF- β 1 moduluje zapalenie w skórze;
- 5) aktywuje MMP III, rozszczepia fibronektynę i kolagen typu IV, przez co wpływa na degradację substancji międzykomórkowej i przebudowę tkanek.

Komórki tuczne występują we wszystkich niemal tkankach i narządach. Mają zdolność uwalniania wielu biologicznie czynnych substancji. Pełnią kluczową rolę w reakcji nadwrażliwości typu anafilaktycznego w fazie natychmiastowej (EPR – *early phase reaction*) i w fazie późnej (LPR – *late phase reaction*) [9]. Biorą także udział w tzw. „niealergicznym reakcjach immunologicznych”. Udowodniony jest również udział komórek tucznych w procesie zapalnym [8]. Przez uwalnianie mediatorów zwiększają przepuszczalność naczyń krwionośnych. Mastocyty wpływają także na napięcie ścian dróg oddechowych (przez rozkład związków rozluźniających mięśnie gładkie, powodują skurcz oskrzeli), procesy wykrzepiania wewnątrznaczyniowego i ciśnienie tętnicze krwi. Histamina i heparyna, uwalniane w procesie aktywacji komórek tucznych, wpływają na angiogenezę (zwiększają proliferację komórek śródbłonna naczyń krwionośnych). Mastocyty biorą także udział w procesie przebudowy tkankowej i włóknienia: tryptaza jest bowiem czynnikiem wzrostu dla fibroblastów, a jednocześnie razem z chymazą rozszczepia kolagenazę IV i fibrynogen. Ponadto sugeruje się, że komórki tuczne mogą wpływać na regulację skórno przepływu krwi (dzięki komunikacji między tymi komórkami i nerwami czuciowymi) oraz na procesy regeneracji włókien nerwowych.

Wiele pytań związanych z komórką tuczną wciąż czeka na odpowiedź. Szczegółowe poznanie fizjologii tej komórki może pozwolić na zrozumienie wielu dotychczas nie wyjaśnionych procesów i rzucić nowe światło na mechanizmy już poznane.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ABRAHAM SN, MALAVIYA R.: Mast Cells in Infection and Immunity. *Infect Immun* 1997; **65**: 3501–3508.
- [2] ALDENBORG F, ENERBACK L. The immunohistochemical demonstration of chymase and tryptase in human intestinal mast cells. *Histochem J* 1994; **26**: 587–596.
- [3] AYDIN T, TUNCEL N, GURER F, TUNCEL M, KOSAR M, OFLAZ G. Ovarian, uterine and brain mast cells in female rats: cyclic changes and contribution to tissue histamine. *Comp Biochem Physiol* 1998; **120**: 255–262.
- [4] BERGEAT A, RUETSCH YA. Anesthesia in a patient with malignant systemic mastocytosis using a total intravenous anesthetic technique. *Anesth Analg* 1998; **86**: 442–444.
- [5] BRADDING P. Human mast cell cytokines. *Clin Exp Allergy* 1996; **26**: 13–19.
- [6] BRADDING P, OKAYAMA Y, HOWARTH PH, CHURCH K, HOLGATE ST. Heterogeneity of Human Mast Cells Based on Cytokine Content. *J Immunol* 1995; **155**: 297–307.

- [7] BUCKLEY MG, GALLAGHER PJ, WALLS AF. Mast cell subpopulations in the synovial tissue of patients with osteoarthritis: selective increase in numbers of tryptase-positive, chymase-negative mast cells. *J Pathol* 1998; **186**: 67–74.
- [8] CHURCH MK, LEVI-SCHAFFER F. The human mast cell. *J Allergy Clin Immunol* 1997; **99**: 155–160.
- [9] DE PATER-HUIJSEN FL, POMPEN M, JANSEN HM, OUT TA. Products from mast cells influence T lymphocyte proliferation and cytokine production – relevant to allergic asthma? *Immunol Lett* 1997; **57**: 47–51.
- [10] DVORAK AM. New aspects of mast cell biology. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; **114**: 1–9.
- [11] GRUBER BL, KEW RR, JELASKA A, MARCHESE MJ, GARLICK J, REN S, SCHWARTZ LB, KORN JH. Human mast cells activate fibroblasts: tryptase is a fibrogenic factor stimulating collagen messenger ribonucleic acid synthesis and fibroblast chemotaxis. *J Immunol* 1997; **158**: 2310–2317.
- [12] HARVIMA IT, HORSMANHEIMO L, NAUKKARINEN A, HORSMANHEIMO M. Mast cell proteinases and cytokines in skin inflammation. *Arch Dermatol Res* 1994; **287**: 61–67.
- [13] IRANI AM, SCHWARTZ LB. Human mast cell heterogeneity. *Allergy Proc* 1994; **15**: 303–308.
- [14] ISHIZAKA T, MITSUI H, YANAGIDA M, MIURA T, DVORAK AM. Development of human mast cells from their progenitors. *Curr Opin Immunol* 1993; **5**: 937–943.
- [15] KITAMURA Y. Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Ann Rev Immunol* 1989; **7**: 59–76.
- [16] KRUGER-KRASAGAKES S, MOLLER A, KOLDE G, LIPPERT U, WEBER M, HENZ BM. Production of interleukin-6 by human mast cells and basophilic cells. *J Invest Dermatol* 1996; **106**: 75–79.
- [17] LEE YM, JIPPO T, KIM DK, KATSU Y, TSUJINO K, MORII E, KIM HM, ADACHI S, NAWA Y, KITAMURA Y. Alteration of protease expression phenotype of mouse peritoneal mast cells by changing the microenvironment as demonstrated by *in situ* hybridization histochemistry. *Am J Pathol* 1998; **153**: 931–936.
- [18] LIN TJ, BEFUS AD. Differential regulation of mast cell function by Il-10 and stem cell factor. *J Immunol* 1997; **159**: 4015–4023.
- [19] LITTLE SS, JOHNSON DA. Human mast cell tryptase isoforms: separation and examination of substrate-specificity differences. *Biochem J* 1995; **307**: 341–346.
- [20] LONGLEY J, DUFFY TP, KOHN S. The mast cell and mast cell disease. *Am Acad Dermatol* 1995; **32**: 545–561.
- [21] MARONE G, CASOLARO V, PATELLA, FLORIO G, TRIGGIANI M. Molecular and cellular biology of mast cells and basophils. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; **114**: 207–217.
- [22] MATIN R, TAMEK, NADEL JA, CAUGHEY GH. Distribution of chymase containing mast cells in human bronchi. *J Histochem Cytochem* 1992; **40**: 781–786.
- [23] MAXIMOV A. Ueber die Zellformen des lockeren Bindegewebes. *Arch Mikroskop Anat Entw Gesch* 1905; **67**: 680–757.
- [24] NILSSON G, BUTTERFIELD JH, NILSSON K, SIEGBAHN A. Stem cell factor is a chemotactic factor for human mast cells. *J Immunol* 1994; **153**: 3717–3723.
- [25] NILSSON G, METCALFE DD. Contemporary Issues In Mast Cell Biology. *Allergy Asthma Proc* 1996; **17**: 59–63.
- [26] PATELLA V, DE CRESCENZO G, CICCARELLI A, MARINO I, ADT M, MARONE G. Human heart mast cells: a definitive case of mast cell heterogeneity. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; **106**: 386–393.
- [27] SCHWARTZ LB. Mast cells: function and contents. *Curr Opin Immunol* 1994; **6**: 91–97.
- [28] STELLATO C, CIRILLO R, DE-PAULIS A, CASOLARO V, PATELLA V, MASTRONARDI P, MAZZARELLA B, MARONE G. Human basophil/mast cell releasability. IX. Heterogeneity of the effects of opioids on mediator release. *Anesthesiology* 1992; **77**: 932–940.

- [29] SUGIMOTO Y, OHISHI H, TOYOTA T, KAMEI C. Strain differences in histamine release from peritoneal mast cells in rats. *Gen Pharmac* 1998; **31**: 613–616.
- [30] WEIDNER N, AUSTEN KF. Heterogeneity of mast cells at multiple body sites. Fluorescent determination of avidin binding and immunofluorescent determination of chymase, tryptase and carboxypeptidase content. *Pathol Res Pract* 1993; **189**: 156–162.
- [31] WELLE M. Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *J Leukoc Biol* 1997; **61**: 233–245.
- [32] YONG LCJ. The mast cell: origin, morphology, distribution and function. *Exp Toxicol Path* 1997; **49**: 409–424.
- [33] ZHANG S, ANDERSON DF, BRADDING P, COWARD WR, BADDELEY SM, MACLEOD JDA, MCGILL JI, CHURCH MK, HOLGATE ST, ROCHE WR. Human mast cells express stem cell factor. *J Pathol* 1998; **186**: 59–66.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 10.10.1998 r.

Przyjęto: 16.12.1998 r.

Adres autora: ul. Narutowicza 60, 90-136 Łódź

RECENZJA

Ultrastruktura i funkcja komórki. Tom 7: Mechanizmy regulujące spermatogenezę. A. Łukaszyk, B. Bilińska, J. Kawiak, Z. Bielańska-Osuchowska (red.). PWN Warszawa, 1998.

Kiedy inicjowano serię wydawniczą "*Ultrastruktura i funkcja komórki*", tytuł odzwierciedlał rozłożenie akcentów w badaniach nad komórką: ultrastruktura ukazywana przez coraz doskonalsze mikroskopy elektronowe i nowe techniki przygotowania materiału stanowiła przedmiot większości liczących się publikacji. Po latach, wraz z postępem wiedzy o komórce i rozwojem metod biochemii komórkowej, cytochemii, a przede wszystkim biologii molekularnej, badania ultrastrukturalne przesunęły się na nieco dalszy plan.

Sytuację tę można dostrzec wyraźnie w wydanym niedawno VII tomie serii, noszącym tytuł "*Mechanizmy regulujące spermatogenezę*": zaledwie 3 z 13 rozdziałów poświęcone są problemom ultrastruktury, pozostałe natomiast dotyczą – ogólnie rzecz ujmując – cytofizjologicznych aspektów procesu spermatogenezy. Autorzy poszczególnych rozdziałów są specjalistami w tej dziedzinie i w większości uwzględniają w omawianej przez siebie problematyce również wyniki własnych badań.

Tom ma trochę niejednorodny charakter: dwa pierwsze rozdziały (Godula i Witaliński) dotyczą niewątpliwie ciekawej, choć raczej egzotycznej spermatogenezy u bezkręgowców, prezentując zdumiewające zróżnicowanie strukturalne męskich komórek rozrodczych w tej grupie, które można powiązać z adaptacjami funkcjonalnymi, a nawet z filogenezą poszczególnych gatunków. Rozdziały pozostałe omawiają najlepiej poznany męski układ rozrodczy u ssaków.

Część tę otwiera prezentacja ultrastruktury plemników ssaków (Bielańska-Osuchowska i Sysa), po czym omawiane są aspekty biochemiczne (Strzeżek), immunologiczne (Kurpisz) i genetyczne (Krzanowska) procesu spermatogenezy. Zgodnie z tytułem tomu, wiele miejsca poświęcono mechanizmom regulacyjnym kontrolującym przebieg spermatogenezy: czynnikom wzrostu (Bartmańska) i regulacji hormonalnej. Czytelnik znajdzie zatem omówienie lokalnej regulacji spermatogenezy, w której kluczową rolę odgrywają komórki Leydiga (Bilińska), charakterystykę receptorów LH/CG w komórkach Leydiga (Niedziela i Łukaszyk) i FSH w komórkach Sertoliego (Łukaszyk i wsp.), a także rozważania na temat specyficznej, zależnej od długości fotoperiodu regulacji mechanizmów reprodukcyjnych u samców gryzoni rozmnażających się sezonowo (Bartke i wsp.).

Tom zamykają rozdziały poświęcone roli mózgu w regulacji procesów reprodukcyjnych, co znajduje odbicie w jego "zróżnicowaniu płciowym" na poziomie zarówno morfologicznym, jak i molekularnym (Jarzab) oraz funkcjom regulacyjnym najądrza w procesie dojrzewania plemników (Wenda-Różewicka).

Jest to niewątpliwie bardzo wartościowa pozycja, wszechstronnie przedstawiająca obecny stan wiedzy na temat spermatogenezy i regulacji męskich funkcji reprodukcyjnych. Czytelny tekst uzupełniają dobrze dobrane schematy, rysunki, a w niektórych rozdziałach również mikrofotografie. Każdy rozdział został opatrzony wyczerpującą bibliografią doprowadzoną do 1996 roku.

Redaktorom i autorom można wytknąć tylko drobne niedociągnięcia: zawartość treściowa rozdziałów 3 i 4 częściowo pokrywają się ze sobą, opis rysunku 5.1 nie daje żadnych szans na jego zrozumienie (jedynie specjalista domyśli się, że przedstawiono rysunkową wersję obrazów połączeń międzykomórkowych uwidocznionych metodą mrożenia i łamania), a na rysunku 4.5 struktura wskazana jako "mikrotubula centralna" jest w istocie tzw. powłóczką środkową otaczającą centralną parę mikrotubul.

Monografię tę można polecić zarówno studentom, jak i biologom i lekarzom zainteresowanym komórkowymi i fizjologicznymi aspektami procesów związanych z reprodukcją.

Jan A. Litwin

SPRAWOZDANIE

z działalności

Zarządu Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej za okres od stycznia do grudnia 1998 roku

W obecnym okresie sprawozdawczym Zarząd działał w niezmienionym składzie: Jerzy KAWIAK – prezes, Maciej NAŁĘCZ – wiceprezes, Maciej ZABEL – sekretarz, dr Joanna LIWSKA – skarbnik. Skład Rady Fundacji również się nie zmienił: Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, członkowie: Tadeusz CICHOCKI, Antoni HORST, Józef KAŁUŻA, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA, Andrzej ŁUKASZYK, Andrzej MYŚLIWSKI, Maria OLSZEWSKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA, Jan STEFFEN. Zarząd pracował społecznie. Kadencja Zarządu upływa w roku 1999.

W pracy Zarządu uczestniczyły panie: Ewa Próchniewicz – księgowa oraz Barbara Miks i Danuta Wasilewska w rozprawianiu zeszytów „Postępów Biologii Komórki”. Zarząd składa tym osobom serdeczne podziękowania.

1. Działalność wydawnicza

Jest to główny zakres działania Zarządu Fundacji. Fundacja wspiera wydawanie czasopism: „Folia Histochemica et Cytobiologica” oraz „Postępy Biologii Komórki”.

A. *Folia Histochemica et Cytobiologica*

Czasopismo ukazywało się regularnie w dotychczasowej formie odpowiadającej standardom międzynarodowym. Rada Redakcyjna i Zarząd PTHiC zdecydowały o wprowadzeniu od stycznia 1999 grona współredaktorów celem pozyskania większej liczby artykułów z zagranicy oraz lepszej oceny poziomu czasopisma. Wprowadzono zwyczaj częstego publikowania artykułów przeglądowych pisanych przez wybitnych specjalistów. Skład i druk czasopisma odbywa się w Krakowie. Merytoryczną pieczę i decyzje o składzie redaktorów „Folia” ma Polskie Towarzystwo Histochemików i Cytochemików. Również Towarzystwo od 1995 r. jest formalnym właścicielem czasopisma. Współpraca Fundacji z Redakcją „Folii” układa się bardzo dobrze. Wydawanie czasopisma odbywa się z pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych oraz z funduszy zebranych ze sprzedaży czasopisma. Otwarto subkonto Fundacji w PKO SA w Krakowie dla ułatwienia redaktorom prowadzenia czasopisma. Artykuły z „Folia” są indeksowane w: Medline, Biological Abstracts, Excerpta Medica, Index Medicus, SciSearch, Research Alert.

B. *Postępy Biologii Komórki*

Czasopismo ukazywało się regularnie w dotychczasowej formie. w dalszym ciągu wydawano suplementy:

suplement nr 10 pt. „*Postępy Biologii Molekularnej*” pod redakcją prof. R. Słomskiego, zawierający materiały z 10 Szkoły Biologii Molekularnej organizowanej w Poznaniu;

suplement 11 pt. „*Neurodegeneracja*” pod redakcją prof. L. Kaczmarka; są to wykłady wygłoszone podczas 28 Konferencji Biologii Komórki 1998, tradycyjnie zoorganizowanej wspólnie przez zarządy: Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików, Fundację Biologii Komórki i Biologii Molekularnej oraz redakcję „*Postępów Biologii Komórki*” pod koniec roku.

Skład czasopisma odbywa się w dalszym ciągu w Wydawnictwie Fundacji •Rozwój SGGW• w Warszawie, a f-ma „Script” pomaga w przygotowaniu rysunków czasopisma i wspomaga współpracę z drukarniami.

Merytoryczną pieczę nad „*Postępami*” ma od 26 lat Polskie Towarzystwo Anatomiczne oraz od 5 lat Polskie Towarzystwo Biologii Komórki. Tytuł własności czasopisma „*Postępy Biologii Komórki*” ma Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej. Wydawanie czasopisma odbywa się z pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych oraz z funduszy zebranych przez Fundację ze sprzedaży czasopisma.

Będą czynione starania o włączenie „*Postępów*” do Medline. W związku z tym od stycznia 1999 r. czasopismo będzie miało okładkę z napisami w j. polskim i j. angielskim.

2. Wyróżnienia

W dalszym ciągu działa stała Komisja Nagród Fundacji pod przewodnictwem prof. Zofii Osuchowskiej. Członkami Komisji są: prof. dr Barbara Sztabert-Grzelakowska, dr hab. Agnieszka Mostowska, prof. dr Hieronim Bartel, prof. dr Stanisław Moskalewski, prof. dr Jerzy Kawiak. Komisja opracowała regulamin dorocznej nagrody Fundacji. Konkurs nagród w 1994 r. został ogłoszony w „*Postęпах Biologii Komórki*” , w „*Postęпах*” podano też regulamin nagrody Fundacji.

W 1998 roku nadeszły 4 prace zgłoszone do nagrody. W roku 1998 Komisja przyznała nagrodę dr Zbigniewowi Polańskiemu z Zakładu Genetyki i Ewolucjonizmu UJ w Krakowie za prace:

a) *Genetic background of differences in timing of meiotic maturation in mouse oocytes: a study using recombinant inbred strains*. J Reprod Fertil 1997, 109, 109–114.

b) *Strain difference in timing of meiosis resumption in mouse oocytes: involvement of a cytoplasmic factor(s) acting presumably upstream of the dephosphorylation of p^{34cdc2} kinase.* *Zygote* 1997, 5, 105–109.

3. Finanse

Zarząd Fundacji wystąpił do Komitetu Badań Naukowych o dotację na dalsze wydawanie obu czasopism w roku 1999. Zarząd musi zlikwidować kserokopiarkę, która jest własnością Fundacji, ale ciągle się psuje. Zarząd przeznaczą część funduszy na opłaty pocztowe oraz zakup materiałów biurowych koniecznych do prowadzenia działalności bieżącej, opłaca pracę księgowej i pań rozprowadzających „Postępy”. Sprawozdanie finansowe w załączeniu.

Prezes Fundacji
Jerzy Kawiak

Wiceprezes
Maciej Natęcz

Sekretarz
Maciej Zabel

Warszawa grudzień 1998 r.

KOMUNIKATY

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

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

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

INTERNATIONAL SYMPOSIUM on Molecular and Clinical Aspects of Regulation of Ovarian Function: Impact on the Reproductive Health of Women

October 6–10 1999, New Delhi, India

(includes a Workshop on Ovulation: Lessons from in vitro Approaches)

Topics to be discussed include:

Hypothalamo-pituitary-ovarian axis, molecular biology of steroid hormone synthesis and action, interovarian regulators of follicular maturation, ovulation and atresia, regulation of luteal function, hormone replacement therapy, ovarian carcinoma

Organizers:

Dr A. K. Mukhopadhyay, IHF, Grandweg 64, D-22529 Hamburg

email: mukhopadhyay@ihf.de **Tel.:** (+49 40) 561908-20/23, **Fax:** (+49 40) 561908-64

Dr Anand Kumar, Dept. of Reproductive Physiology, AIIMS, New Delhi 110029, India

email: anand@medinst.ernet.in **Fax:** (+9111) 6862663



W. Mejbaum-Katzenellenbogen's Molecular Biology Seminars

6. LIPOSOMES AND RELATED STRUCTURES

June 10–12, 1999, Wrocław/Szklarska Poręba, Poland

General Objective of the Seminar: To discuss recent advances in construction and application of liposomes and related vesicular structures in biomembrane modeling and delivery of therapeutic agents.

The scientific programme will include plenary lectures by invited speakers (30+10 min) and oral and poster presentation. Oral communications (15+5 min) will be chosen from the abstracts send by participants.

The main topics of the seminar are:

- Monolayers, Bilayers and Liposomes – Laboratory practice
- Proteoliposomes and Biomembrane Reconstitution
- Cationic Lipids and Nucleic Acids
- Liposomes as Carriers in Drug Delivery
- Non-liposomal Vesicular and Submicron Delivery Systems
- Other Applications of Liposomes

Poster presentations may relate to the Seminar themes or to other areas of lipids, amphiphiles and membrane structure.

The Seminar will be held in a resort of Szklarska Poręba near Jelenia Góra. Szklarska Poręba is situated in the south-west Poland in the scenic Sudety Mountains. Participants will be offered accommodations which will be placed in the easy walking distance of the lecture auditorium and restaurants.

Preliminary list of invited speakers: T. M. Allen (CA), D. Arndt (DE), G. Betageri (USA), J. R. Chantres (ES), A. Fahr (DE), D. Hoekstra (NL), P. Kinnunen (FI), B. Kloesgen (DE), J.-Y. Legrende (FR), L. Leserman (FR), J. Monkkonen (FI), N. Oku (JP), G. Rapp (DE), G. Scherphof (NL), R. Schwendener (CH), M. Sentjurs (SL), E. Touitou (IL), R. Zeisig (DE).

The second announcement containing further details of the scientific and social programme of Seminar will be send in March 1999. Please register using an appropriate form of the first announcement or on-line registration form to ensure receipt of the second and final announcement.

Please send all requests related to the Seminar to:

Organising Committee of Mejbaum-Katzenellenbogen's Seminar
 6. LIPOSOMES IN BIOLOGY AND MEDICINE
 Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Wrocław University
 Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław, Poland
 tel/fax +48 (71) 3252930

E-mail: mejsem@angband.microb.uni.wroc.pl
 or visit Seminar www Page at: <http://angband.mirob.uni.wroc.pl/biochem/sem-99.htm>

Early application is advised as the Liposome Seminar is limited to 150 persons.

Wskazówki przygotowania rysunków i streszczeń do publikacji w PBK

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

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.

Wprowadzamy nowy standard **streszczeń** w „Postępach”. Streszczenie po polsku będzie jak dotychczas pierwsze przed streszczeniem w języku angielskim. Streszczenie ma mieć następującą strukturę:

j. polski		j. angielski
Podstawy zagadnienia:	jedno zdanie	Background:
Podtytuły:	do każdego podtytułu 3–5 zdań	Subtitles:
Wnioski:	2 zdania	Conclusions:
Słowa kluczowe:	do 8 słów	Key words:

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

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

Warunki prenumeraty kwartalnika POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI *Prenumerata na rok 1999*

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1999 pod adresem:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99,
01-813 Warszawa; tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl

na konto: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,
ul. Marymoncka 99, 01-813 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,
tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl:

On account: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa;

Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa, No 12401053-40006576-2700-401112-001.

Price per year 20 dollars USA.

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 przysłać 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 s. 444) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona dla redakcji winna zawierać: imiona, nazwiska, tytuły naukowe autorów, i adresy: w pracy, domowy wraz z telefonem i e-mail, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i 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 korespondencje, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następną stroną powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 1 str.) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rysunków, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. I, 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 polycycephalum. Exptl Cell Res 1980; 2: 41–48.

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

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu doby. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą oraz mogą zamówić odbitki odpłatnie odsyłając korektę, cennik w PBK. Redakcja prosi o propozycję do 5 osób (nazwisko, imię, adres, fax), które byłyby odpowiednimi recenzentami maszynopisu, nie powinny jednak być pracownikami instytucji, w której pracuje autor, ani jego współpracownikami. Poprawioną po recenzji wersję pracy należy zwrócić do redakcji koniecznie w ciągu 30 dni. Redakcja zrzeczuje z publikacji maszynopisu, którego autorzy do 30 dni nie odpowiedzą na list redaktora.

Redakcja prosi także głównego Autora o dołączenie do maszynopisu podpisanej odpowiedzi na następujące pytania:

Dołączono 2 kopie maszynopisu,
tabel i rycin.

Treść pracy nie była uprzednio publikowana i nie została wysłana do innej redakcji.

Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę. **tak nie**
Jest zgoda osób, których informacje niepubli- **tak nie**
kowane są zamieszczone w tekście artykułu **tak nie**
Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w "Postępkach Biologii Komórki" przechodzi na własność redakcji i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji. **tak nie**
Dołączono kopię pracy na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM **tak nie**
Odpowiadam za całość pracy opisaną w zał. maszyn. **tak nie**
podpis

TREŚĆ – CONTENTS

W tym Zeszycie Postępów Biologii Komórki	217
WÓJCIK C., GOŁĄB J.: Od dynamitu do Viagry, czyli rzecz o Nagrodzie Nobla z medycyny i fizjologii w 1998 roku	
From dynamite to Viagra – 1998 Nobel Prize in medicine and physiology	219
TRETYN A., KOPCEWICZ J.: Mechanizmy kwitnienia roślin. I. Uwarunkowania fizjologiczno-środowiskowe	
Regulation of flowering in plants. I. Physiological and environmental implications	231
TRETYN A., KOPCEWICZ J.: Mechanizmy kwitnienia roślin. II. Genetyczna i molekularna kontrola indukcji kwitnienia	
Regulation of flowering in plants. II. Genetic and molecular control of flower induction	249
JAKUBOWICZ-GIL J., GAWRON A.: Rozmieszczenie i rola białek szoku termicznego w komórce zwierzęcej	
Localization and function of heat shock proteins in the animal cell	267
JANIAK M. K., WREMBEL-WARGOCKA J., CHEDA A.: Apoptoza popromienna – Mechanizmy, rola biologiczna i możliwości wykorzystania w terapii nowotworów	
Radiation-induced apoptosis: Mechanisms biological relevance and potential application to radiotherapy of cancer	285
ZIMOWSKI J. G.: Rdzeniowy zanik mięśni – Podłoże molekularne choroby	
Spinal muscular atrophy – Molecular background of the disease	311
SAMARDAKIEWICZ S., WOŹNY A.: Metody wykrywania ołowiu w komórkach roślinnych	
The methods of the lead detection in the plant cells	325
TRETYN A., WIŚNIEWSKA J.: Budowa, właściwości i mechanizm działania kryptochromów – eukariotycznych fotoreceptorów światła niebieskiego	
Structure, properties and mechanism of action of the cryptochromes – The blue-light photoreceptors of <i>Eukaryota</i>	343
LACHOWICZ L., PODKUL T., ŻYLIŃSKA L.: Struktura i funkcje receptora GABA _A	
Structure and functions of GABA _A -receptor	359
SZABLEWSKI L.: Leptyna i jej rola w regulacji masy ciała	
Leptin and its role in the regulation of body weight	375
SZABLEWSKI L.: Rola białek Glut w dyfuzji glukozy do komórek ssaczych. II. Wpływ insuliny na aktywność Glut 1 i Glut 4	
Role of Glut proteins in glucose transport into mammalian cells. II. The effect of insulin on activity of Glut 1 and Glut 4	387
SOBKOWIAK A., TRZECIAK W. H.: Budowa i funkcja receptora folitropiny	
Structure and function of follitropin receptor	401
SZPUNAR G., WAWROCKA-PAWLAK M., DĄBROWSKI R.: Rola komórki tucznej w organizmie człowieka	
The role of the mast cell in human body	427
Recenzja	437
Sprawozdanie	439
Komunikaty	442
Wskazówki przygotowania rysunków i streszczeń do publikacji w PBK oraz warunki prenumeraty	444

Indeks 369705