

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

VOL. 29, ISSUE 2/2002
(179–362)

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, cytoszkielet, połączenia międzykomórkowe – developmental biology, embryology, cytoskeleton, cell junctions – *Inst. Zoologii UJ, 30-060 Kraków, Ingardena 6*

Lilla HRYNIEWIECKA – energetyka komórki, mitochondria – cell energetics, mitochondria – *Zakład Bioenergetyki, Uniwersytetu im. A. Mickiewicza, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*

Bożena KAMIŃSKA – neurobiologia, biologia molekularna – neurobiology, molecular biology – *Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego 02-097 Warszawa, ul. Pasteura 3*

Jerzy KAWIAK – immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów – immunology, cytometry, hematology, cancer biology – *Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*

Wincenty KILARSKI – mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek – muscles, muscle contraction, cell movements – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*

Maria OLSZEWSKA – komórki roślinne, informacja genetyczna w komórkach roślinnych i zwierzęcych – plant cells, genetic information in plant and animal cells – *Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin Instytutu Fizjologii i Cytologii UŁ, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*

Barbara PŁYTYCZ – immunologia – immunology – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*

Maciej ZABEL – histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek – histology, endocrinology, histochemistry (immunocytochemistry, hybridocytochemistry), cell ultrastructure – *Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chalubińskiego 6a*

Jan ŻEROMSKI – patologia, immunologia, cytometria – pathology, immunology, cytometry – *Katedra i Zakład Immunologii AM 60-355 Poznań, ul. Przybyszewskiego 49*

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, e-mail: 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.

W TYM ZESZYCIE PBK

- Kanał jonowy stanowi podstawowe rozwiązanie w wymianie cząsteczek przez zewnętrzną błonę mitochondrialną. Pełni on również rolę w transporcie metabolitów, jak i imporcie białek. Bliżej o tym na stronie 203.
- Komórki macierzyste są przedmiotem ogromnego zainteresowania. Pluripotencjalne komórki macierzyste wyselekcjonowane z organizmu dorosłego różnicują się we wszystkie typy tkanek. Komórki macierzyste już wkrótce mogą znaleźć zastosowania terapeutyczne – patrz artykuł na stronie 257.
- Kontrolowana degradacja białek zachodzi w wielu procesach komórkowych, w tym cyklu komórkowym, różnicowaniu, kierowaniu i dystrybucji białek oraz apoptozie. Degradacja swoistych białek jest również ważnym elementem mechanizmów biogenezy chloroplastów. Artykuł, gdzie można na ten temat znaleźć więcej informacji, jest na stronie 283.
- W oocytach i komórkach jajowych wielu zwierząt, w sąsiedztwie bieguna tylnego, występuje swoista, morfologicznie odmienna cytoplazma, tzw. plazma płciowa. W czasie rozwoju zarodkowego plazma ta ulega segregacji do blastomerów linii płciowej, a następnie do komórek prapłciowych. Artykuł na ten temat jest na stronie 301.

WYKAZ RECENZENTÓW Z TOMU 28 Z ROKU 2001 REFEREES OF THE VOLUME 28, 2001

prof. dr hab. S. Biliński
doc. dr hab. Barbara Czartoryska
prof. dr hab. Maria Jerka-Dziadosz
prof. dr hab. B. Grzelakowska-Sztabert
doc. dr hab. Amalia Guzdek
doc. dr hab. B. Kamińska
prof. dr hab. Jerzy Kawiak
prof. dr hab. W. Kilarski
prof. dr hab. Liliana Konarska
prof. dr hab. A. K. Kononowicz
prof. dr hab. Halina Krzanowska

dr Katarzyna Kwiatkowska
prof. dr hab. Piotr Leider
prof. dr hab. M. J. Olszewska
prof. dr hab. Zofia Osuchowska
prof. dr hab. B. Płytycz
prof. dr hab. S. Rogalska
prof. dr hab. med. D. Rożynkowa
prof. dr hab. Lidia Różewicka
prof. dr hab. K. Staroń
prof. dr hab. K. Szyfter

ROŚLINNE PEPTYDY SYGNAŁOWE*

PLANT SIGNALING PEPTIDES

Stanisław KOWALCZYK¹, Beata MACIEJEWSKA²

¹Zakład Biochemii, ²Zakład Fizjologii i Morfogenezy Roślin,
Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet M. Kopernika, Toruń

Streszczenie: Poznane dotychczas roślinne peptydy sygnałowe (SCR, CLAVATA3, fitosulfokina- α , systemina, ENOD40) uczestniczą w przekazywaniu informacji między komórkami lub organami. Polipeptyd SCR jest pyłkowym ligandem rozpoznawanym przez kompleks receptorowy komórek wyrostkowych epidermy znamienia. Efektem reakcji rozpoznania pyłku jest aktywacja szlaku sygnałowego regulującego mechanizm efektorowy odpowiedzialny za hydratację ziarna pyłku. CLAVATA3 jest małym polipeptydem sekrecyjnym uczestniczącym w przekazywaniu informacji między oddzielnymi kompartmentami komórkowymi merystemu wierzchołkowego pędu. Fitosulfokina- α jest pentapeptydem stymulującym proliferację kultur komórkowych. Systemina jest oligopeptydem uwalnianym w miejscu zranienia rośliny aktywującym ponad 20 genów, których produkty funkcjonują w reakcjach obronnych. Produkty genu *ENOD40* uczestniczą w regulacji podziałów komórkowych towarzyszących nodulacji oraz w różnicowaniu wiązek naczyniowych.

Słowa kluczowe: roślinne peptydy sygnałowe, SCR, CLAVATA3, fitosulfokina- α , systemina, ENOD40.

Summary: Signaling peptides identified in plants are involved in communication between cells or organs. Until now, the five signaling peptides (SCR, CLAVATA3, phytosulfokine- α , systemin, ENOD40) have been found in plants. The SCR polypeptides are pollen ligands involved in activation of stigmatic receptors and initiation of a signal transduction cascade that leads to regulation of pollen hydration. The CLAVATA3 is a small secreted polypeptide that plays a role in cell-cell communication in the shoot apical meristem. Phytosulfokine- α , a sulfated pentapeptide, promotes proliferation of plant cells in culture. Systemin, an oligopeptide released from wound site, systemically regulates the activation of over 20 defensive genes. The products of gene *ENOD40* facilitate cell divisions in nodulation and differentiation of vascular bundles.

Key words: plant signaling peptides, SCR, CLAVATA3, phytosulfokine- α , systemin, ENOD40.

WSTĘP

Do początku lat dziewięćdziesiątych nie były znane roślinne peptydy, które pod względem funkcji nawiązywałyby do zwierzęcych hormonów peptydowych czy drożdżowych feromonów. Dzisiaj już wiemy, że rośliny podobnie jak inne organizmy syntetyzują zarówno proste peptydy, jak też oligo- i polipeptydy funkcjonujące jako cząstki sygnałowe bądź substancje hormonalne. Pięć poznanych dotychczas roślinnych peptydów sygnałowych, zróżnicowanych pod względem budowy, pełni w roślinach różnorodne funkcje [3,66]. Wiedza o tej rodzinie substancji sygnałowych będzie się zapewne powiększać w miarę poznawania molekularnych mechanizmów międzykomórkowych oddziaływań w organizmach roślinnych.

PEPTYDY SCR – PYŁKOWE LIGANDY FUNKCJONUJĄCE W REAKCJI SAMONIEZGODNOŚCI SPOROFITOWEJ

Samoniezgodność (niezgodność wewnątrzgatunkowa) definiowana jest jako niezdolność do wytworzenia zygoty w wyniku samozapylenia. Samoniezgodność homomorficzna jest mechanizmem kontrolowanym genetycznie umożliwiającym selekcję pyłków padających na znamię słupka, której celem jest niedopuszczenie do zapłodnienia przez pyłek o niewłaściwym haplocyocie. Mechanizm samoniezgodności obejmuje reakcję rozpoznania oraz reakcję odpowiedzi, których ostatecznym efektem jest akceptacja bądź odrzucenie pyłku.

W drugiej połowie lat dziewięćdziesiątych zaznaczył się wyraźny postęp w poznawaniu molekularnych mechanizmów samoniezgodności. W pracy przeglądowej opublikowanej przed trzema laty w *Postęпах Biologii Komórki* prezentowane były ogólne założenia tych mechanizmów dotyczących obu rodzajów samoniezgodności – gametofitowej i sporofitowej [42]. W propozycjach dotyczących wyjaśnienia mechanizmu samoniezgodności sporofitowej brakowało wówczas istotnego elementu reakcji rozpoznania pyłek-słupek, jakim powinien być produkt locusa *S* niesiony na powierzchni pyłku. Wątpliwości wynikające z tego faktu zostały w ostatnim czasie ostatecznie rozwiązane po tym, jak zidentyfikowano i sklonowano geny kodujące poszukiwane pyłkowe ligandy samoniezgodności. O wadze tego odkrycia może świadczyć liczba prac przeglądowych opublikowanych w literaturze światowej omawiających wyniki najnowszych badań [6,17,26,56,62,73,95,97].

Zgodnie z ogólnymi założeniami mechanizmu samoniezgodności sporofitowej w reakcji rozpoznania pyłek-słupek powinny uczestniczyć produkty locusa *S* zlokalizowane na powierzchni znamienia oraz w warstwie powierzchniowej pyłku (*pollen coat*). W licznych badaniach eksperymentalnych dowiedziono, że ściany komórek wyrostkowych epidermy znamienia zawierają sekrecyjną glikoproteinę SLG (*S-locus glycoprotein*),

natomiast w plazmolemie komórek wyrostkowych jest zlokalizowana receptorowa serynowo/treoninowa kinaza białkowa SRK (*S-locus receptor kinase*) (ryc. 1B) [42]. Miejsce i czas ekspresji genów *SLG/SRK* są skorelowane z występowaniem reakcji samoniezgodności. Również wyniki badań prowadzonych na mutantach wykazywały, iż produkty obu genów są niezbędne do wystąpienia samoniezgodności [42]. Niektóre najnowsze doniesienia potwierdzają te sugestie [15,27,44,76,78], inne ponadto wskazują, że w reakcji rozpoznania uczestniczy homodimer SRK/SRK. Zdaniem niektórych autorów, rola SLG miałaby zatem polegać na ochranianiu bądź stabilizowaniu SRK oraz na współuczestniczeniu w powstawaniu aktywnego kompleksu receptorowego [18,86].

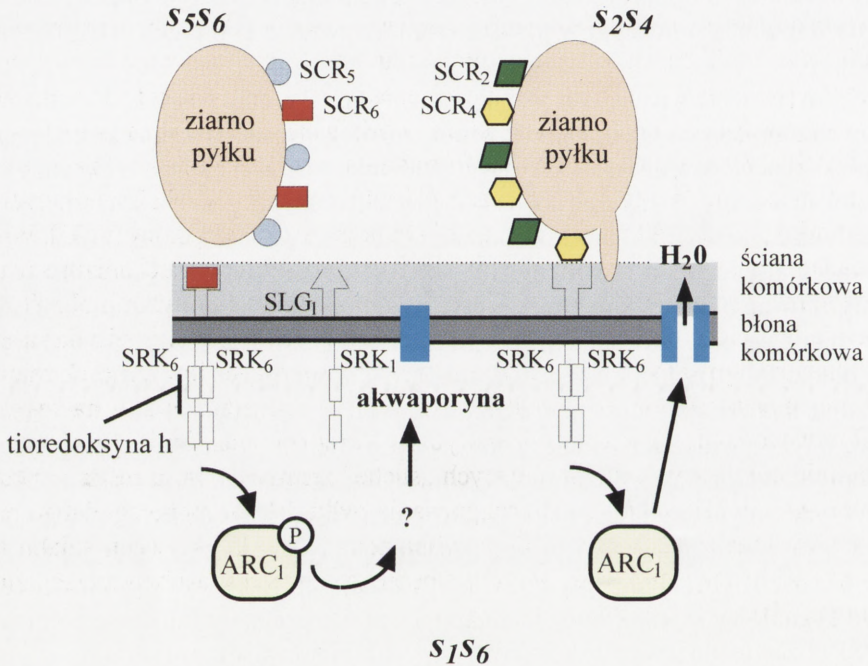
Drugim elementem reakcji rozpoznania powinien być produkt locusa *S* zlokalizowany na powierzchni ziaren pyłku, pełniący rolę swoistego ligandu rozpoznawanego przez kompleks receptorowy SRK. Pyłkowy ligand kinazy SRK musi być kodowany przez gen zlokalizowany w obrębie locusa *S*. Produkt takiego genu powinien fizycznie oddziaływać z zewnątrzkomórkową domeną SRK, a swoistość takiej interakcji musi wynikać z allelicznego zróżnicowania locusa *S*. Przez wiele lat nie udawało się zidentyfikować białka, które mogłoby spełniać funkcję pyłkowego elementu reakcji rozpoznania. W poszukiwaniach właściwego ligandu zwracano szczególną uwagę na małe białka PCP (*pollen coat protein*) [95]. W ostatnim czasie Suzuki i wsp. [84] analizując sekwencję locusa *S Brassica campestris* zidentyfikowali szereg nowych genów, w tym również gen kodujący mały polipeptyd SP11 bogaty w cysteinę. Dojrzały polipeptyd zbudowany z 59 aminokwasów (6,7 kDa) zawiera 8 reszt cysteiny (ryc. 1A). W tym samym czasie zespół kierowany przez Nasrallaha zidentyfikował w obrębie locusa *S B. oleracea* sekwencję kodującą polipeptyd bogaty w cysteinę SCR (*S-locus Cys-rich*) [74]. Polipeptydy SCR/SP11 mają na N-końcu 19-aminokwasowy peptyd sygnałowy skierowujący je do apoplastu. Dojrzałe, hydrofilowe polipeptydy SCR/SP11 zawierają 9 w pełni konserwowanych aminokwasów, w tym 8 reszt cysteiny i jedną resztę glicyny (ryc. 1A). Fragmenty położone między tymi aminokwasami charakteryzują się wyjątkowo wysokim polimorfizmem stanowiącym podstawę swoistych oddziaływań SCR z domeną zewnątrzkomórkową SRK [74,77,88,96]. O swoistości reakcji rozpoznania świadczą wyniki badań, w których udało się wprowadzić gen *SCR₆* do homozygotycznej rośliny o genotypie *S₂S₂*. Okazało się, że pyłek pochodzący z takiej rośliny transgenicznej jest odrzucany przez znamię rośliny o genotypie *S₆S₆* [74]. Analogiczne doświadczenia przeprowadzone w innych pracowniach również potwierdzają swoistość oddziaływań SCR/SRK [77]. Polipeptydy SCR/SP11 są syntetyzowane w komórkach tapetum pylnika i zostają wbudowane do egzyny ziaren pyłku [77,87]. Tak więc polipeptydy SCR/SP11 okazały się poszukiwanymi męskimi elementami reakcji rozpoznania pyłek-słupek, których poznanie potwierdza ostatecznie główne założenia mechanizmu samoniezgodności sporofitowej.

Mimo że podstawowy mechanizm reakcji rozpoznania pyłku przez komórki wyrostkowe znamienia został już stosunkowo dobrze poznany, to wiedza na temat szlaku sygnalizacyjnego przekazującego informację z układu receptorowego na układ

A,

SP11-9 MKSAIYALLCFIFI VSSHVQ-EV-EANLRKT- C VHLRNLSSGS C GKSGQHD C EAFYTNKTNQKAFY C N C TS - PFRT RY C D C AI-K-C KVR
 SCR6 MKSAIYALLCFIFLVSSHGQ-EV-EANLKKN- C VGKTRLPGP C GDSGASS C RDLYNQTEKT MPVS C R C - - - - VPTGR C F C SL- C K
 SCR13 MKSAVYALLCFIFIVSGHIQ-EV-EANLMMP- C - - GSFMPGN C RNIGARE C EKLNSPGKRRK - PSH C K C TDTQMGTYSC D C KL- C

B,



RYCINA 1. Struktura pierwszorzędowa i funkcja polipeptydów SCR w mechanizmie samoniezgodności sporofitowej. A – sekwencja aminokwasowa trzech polipeptydów z rodziny SCR z zaznaczonymi konserwowanymi resztami cysteiny (trójkąt pokazuje miejsce odcinania sekwencji sygnałowej) B – model ilustrujący reakcję rozpoznania pyłkowego polipeptydu SCR przez kompleks receptorowy SRK/SRK lub SLG/SRK komórek wyrostkowych epidermy znamienia rośliny o genotypie S_5S_6 . Reakcja samoniezgodności wystąpi wówczas, gdy na powierzchni pyłku padającego na znamię będzie się znajdował polipeptyd SCR allelu S_6 lub S_5 ; wiązanie SCR_6 z kompleksem receptorowym SRK_6/SRK_6 lub SLG_6/SRK_6 prowadzi do zamknięcia kanałów wodnych zapobiegając w ten sposób hydratacji i kiełkowaniu ziarna pyłku; ziarno pyłku niosące polipeptydy SCR będące produktami innych alleli np. S_2 i S_4 będzie rozpoznane jako samozgodne. Na schemacie zaznaczono tioredoksynę h hamującą aktywność SRK oraz białko ARC fosforylowane przez serynowo/treoninową kinazę białkową SRK (na podstawie danych [74,84,88,96])

efektorowy odpowiedzialny za odrzucenie pyłku o „nieodpowiednim” haplotypie jest ciągle jeszcze bardzo fragmentaryczna. Dotychczas udało się zidentyfikować jedynie białko ARC1 (*arm repeat containing*), które regionem C-końcowym oddziałuje z domeną wewnątrzkomórkową SRK, ulegając przy tym fosforylacji (ryc. 1B) [28]. Technikami antysensu udało się w komórkach wyrostkowych znacząco obniżyć poziom mRNA kodującego ARC. Zahamowaniu syntezy białka ARC towarzyszy zdecydowane osłabienie lub całkowity zanik reakcji samoniezgodności, co może sugerować, że białko ARC pełni w szlaku sygnalizacyjnym funkcję pozytywnego regulatora odpowiedzi [80]. Szereg obserwacji wskazuje, że aktywność enzymatyczna SRK *in vivo* podlega swoistemu hamowaniu, które jest znoszone w momencie związania pyłkowego ligandu. Wyniki prezentowane w ostatnich doniesieniach skierowują uwagę na tioredoksynę h, która swoiście hamuje reakcję autofosforylacji SRK [7,55]. W badaniach recesywnego mutantu *mod B. oleracea* z zaburzonym mechanizmem samoniezgodności wykazano, iż obserwowany defekt jest następstwem braku transkryptu mRNA kodującego białko homologiczne z akwaporynami [33]. Wyniki tych badań zachęcają do spekulacji na temat molekularnego mechanizmu reakcji „odpowiedzi” przejawiającej się w akceptacji bądź odrzuceniu pyłku o określonym haplocyocie. Mechanizm taki mógłby polegać na regulacji otwierania i zamykania kanałów wodnych zlokalizowanych w błonach komórek wyrostkowych lub komórek warstwy położonej pod komórkami wyrostkowymi [46]. Mechanizm oparty na regulacji przepływu wody przez błonę plazmatyczną komórek znamienia powinien być szczególnie efektywny u roślin mających „suche” znamię, m.in. u roślin z rodziny *Brassicaceae*. W takim przypadku rozpoznanie pyłku jako samoniezgodnego przez receptorową kinazę białkową SRK powinno prowadzić do aktywacji szlaku sygnałowego zamykającego kanały wodne, zapobiegając w ten sposób hydratacji ziarna pyłku (ryc. 1B).

CLAVATA3 – POLIPEPTYD SEKRECYJNY FUNKCJONUJĄCY W REGULACJI PROLIFERACJI I RÓŻNICOWANIA KOMÓREK MERYSTEMU WIERZCHOŁKOWEGO

Merystem wierzchołkowy pędu powstający w embriogenezie i utrzymujący się przez cały okres życia rośliny umożliwia wzrost nadziemnej części rośliny. Podstawą funkcjonowania merystemu wierzchołkowego jest zdolność utrzymywania pewnego zestawu komórek pluripotencyjnych w regionie centralnym (RC) (*central zone*) oraz inicjowanie zawiązków organów dzięki możliwości różnicowania się komórek w regionie peryferycznym (RP) (*peripheral zone*) (ryc. 2A). Region centralny tworzą komórki niezróżnicowane, rzadko dzielące się, z małymi jądrami i dużymi wakuolami. Obszar peryferyczny zawiera populację komórek z gęstą cytoplazmą i małymi wakuolami,

podlegających szybkim podziałom i różnicowaniu. W merystemie wierzchołkowym roślin okrytonasiennych wyróżnia się trzy odmiennie zorganizowane warstwy. U *Arabidopsis* dwie warstwy komórek dzielących się antyklinalnie, tworzących tunikę określa się mianem warstwy L1 i L2 (ryc. 2A) [43,93]. Pierwsza zewnętrzna warstwa komórek L1 daje początek epidermie, natomiast z warstwy L2 leżącej pod nią powstaje tkanka subepidermalna. Tkanka przewodząca oraz rdzeń wykształcają się z trzeciej warstwy L3 komórek dzielących się w różnych kierunkach.

Merystem wierzchołkowy jest strukturą dynamiczną, w której muszą być skoordynowane dwa przeciwstawne procesy, proces inicjacji organów oraz proces samoodnawiania się populacji komórek rdzenia w regionie centralnym [4,19,25]. Aktywność merystemu jest regulowana przez produkty wielu genów, których transkrypty mRNA pojawiają się w embriogenezie w różnym czasie, a ich ekspresja jest ograniczona do niewielkich regionów merystemu tworzących oddzielne kompartmenty komórkowe [43,93]. Pełne rozumienie funkcji poszczególnych genów będzie wymagać jeszcze wielu badań, tym nie mniej poznanie roli produktów niektórych z nich sprzyja właściwemu ukierunkowaniu dalszych poszukiwań. W pierwszym rzędzie należy tu wymienić geny *CLAVATA1 (CLV1)*, *CLAVATA2 (CLV2)* i *CLAVATA3 (CLV3)*, których produkty funkcjonują w szlaku sygnalizacyjnym regulującym proliferację i różnicowanie komórek regionu centralnego [19].

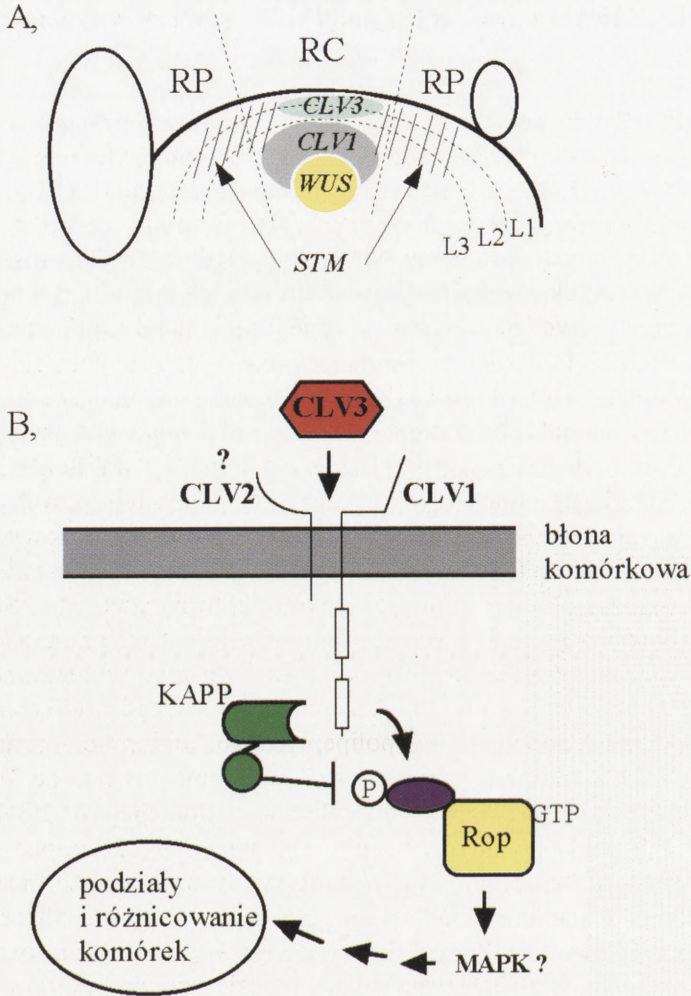
Gen *CLV1* koduje transbłonową serynowo/treoninową kinazę białkową mającą w części zewnątrzkomórkowej 21 powtórzeń fragmentu bogatego w leucynę LRR (*leucine rich repeat*) [12,79,98]. Ekspresja genu *CLV1* zachodzi wyłącznie w merystemie wierzchołkowym i w zasadzie ogranicza się tylko do warstwy L3 regionu centralnego (ryc. 2A) [12]. Gen *CLV2* koduje białko typu RLP (*receptor-like protein*) z zewnątrzkomórkową domeną LRR, krótką sekwencją hydrofobową tworzącą fragment transbłonowy i bardzo krótkim, bo tylko 27-aminokwasowym fragmentem cytoplazmatycznym [37]. *CLV2* różni się od *CLV1* głównie tym, że w wewnątrzkomórkowej części C-końcowej nie ma motywów charakterystycznych dla kinaz białkowych. Występowanie domeny LRR w *CLV2* sugeruje, że białko to może tworzyć heterodimery z *CLV1*. U mutantu *clv2* gen *CLV1* ulega transkrypcji na normalnym poziomie, ale poziom białka *CLV1* jest niższy o ponad 90% [37]. Na tej podstawie sugeruje się, że możliwość tworzenia heterodimeru *CLV2/CLV1* warunkuje efektywną ochronę lub stabilizację receptorowej kinazy *CLV1*.

Gen *CLV3* koduje 96-aminokwasowy polipeptyd mający na N-końcu sekwencję sygnałową [24]. Obecność tego 18-aminokwasowego fragmentu świadczy o tym, że *CLV3* jest polipeptydem sekrecyjnym. Transkrypty mRNA *CLV3* pojawiają się jedynie w apikalnych komórkach warstw L1 i L2 regionu centralnego, a więc komórkach, w których nie zachodzi ekspresja genu *CLV1* (ryc. 2A). Wielkość polipeptydu kodowanego przez *CLV3* oraz obecność sekwencji sygnałowej pozwalały przypuszczać, że *CLV3* lub proteolitycznie „wycięty” z niego peptyd jest ligandem dla receptorowej kinazy białkowej *CLV1* bądź kompleksu receptorowego *CLV1/CLV2* [24]. Proponowaną funkcję polipeptydu *CLV3* potwierdzają szczegółowe obserwacje zmian

fenotypowych, jakie towarzyszą mutacjom w obu genach. Ogólnie mutanty *clv1* i *clv3* charakteryzują się silnym rozbudowaniem regionu centralnego świadczącym o intensywnej proliferacji komórek w tym regionie lub o zahamowaniu przekształcania się w komórki regionu peryferycznego [4,19,43]. Również budowa merystemu wierzchołkowego mutantu *clv2* wykazuje szereg odchyień, nawiązując fenotypowo do mutantów *clv1/clv3* [93]. Stosując techniki immunochemiczne wykazano, że kinaza CLV1 występuje w merystemie pędu rzodkiewnika i kalafiora w formie kompleksów białkowych o masie cząsteczkowej 180 i 450 kDa [89]. W skład większego kompleksu oprócz CLV1 wchodzi jeszcze fosfataza białkowa towarzysząca kinazie KAPP (*kinase-associated protein phosphatase*) [79,98] oraz białko Rop podobne do Rho-GTPazy (ryc. 2B). Rho-GTPaza pełni przypuszczalnie funkcję podobną do zwierzęcych białek Ras aktywujących kaskadę kinaz MAP. Autorzy sugerują, że oddziaływanie CLV3 z CLV1 warunkuje bądź co najmniej promuje tworzenie wieloenzymatycznego kompleksu receptorowego o masie cząsteczkowej 450 kDa [89]. Wiązanie CLV3 do kompleksu receptorowego potwierdzono technikami immunostrącania [90]. Wykazano, że CLV3 koprecypituje z kompleksem receptorowym o masie 450 kDa zawierającym CLV1. Wiązania CLV3 do CLV1 nie obserwuje się w sytuacji, gdy białko CLV1 ma zmienioną w wyniku mutacji domenę kinazy białkowej. Zależność ta jest nieco zaskakująca, bowiem zgodnie z powszechnie przyjętym poglądem ligand CLV3 powinien być wiązany przez zewnątrzkomórkową domenę CLV1 zawierającą motywy LRR.

Najnowsze doniesienia sugerują, że informacja przekazywana za pośrednictwem polipeptydu CLV3 z komórek szczytowych regionu centralnego do komórek zawierających kompleksy receptorowe CLV1 prowadzi do represji genu *WUS* [72]. Produkt genu *WUS* pełni przypuszczalnie rolę regulatora transkrypcji, bowiem zawiera nietypową sekwencję homeodomeny [54]. Mutant *wus A. thaliana* nie ma merystemu wierzchołkowego w stadium zarodkowym, chociaż w trakcie kiełkowania nasion wytwarza nieprawidłowo rozwinięty pęd. Na podstawie najnowszych doniesień zaczyna się ugruntowywać pogląd, że produkt genu *WUS* uczestniczy w procesie samoodnawiania się regionu centralnego funkcjonując jako pozytywny regulator podziałów komórkowych [54,94]. Silne powiększenie regionu centralnego obserwowane u mutantów *clv*, może więc być efektem nadekspresji genu *WUS*. Białko *WUS* jest również pozytywnym regulatorem ekspresji genu *CLV3*. Zatem wydaje się, że geny *CLV/WUS* tworzą pętlę regulacyjną, która funkcjonuje między dwoma kompartmentami komórkowymi regionu centralnego [5,72]. Regulacja ekspresji genów w tej pętli powinna wpływać na równowagę między proliferacją a różnicowaniem komórek merystemu wierzchołkowego [94].

Pozytywnym regulatorem ekspresji genu *WUS* jest przypuszczalnie produkt genu *STM* (*shoot meristemless*). *STM* koduje białko zawierające homeodomenę klasy KNOTTED pełniące funkcję czynnika transkrypcyjnego [45]. Transkrypty mRNA genu *STM* pojawiają się w globularnym stadium rozwoju zarodka w pojedynczej komórce, a w późniejszym okresie rozwoju embrionalnego we wszystkich komórkach

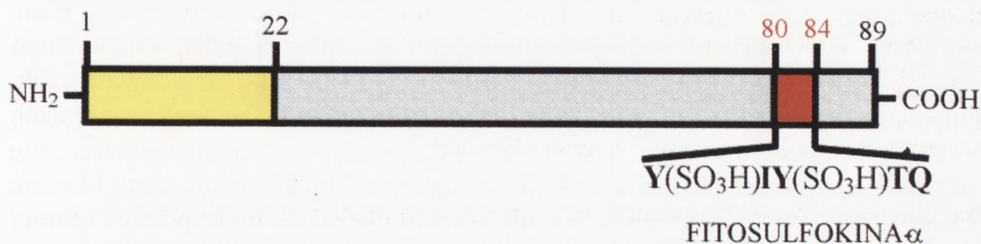


RYCINA 2. Geny *CLV*, *WUS* i *STM* funkcjonujące w merystemie wierzchołkowym pędu. A – schemat ilustruje miejsce ekspresji genów *CLV*, *WUS* i *STM* w merystemie wierzchołkowym; B – schemat przedstawia proponowaną rolę polipeptydu *CLV3* w aktywacji szlaku transdukcji sygnału rozpoczynającego się od kompleksu receptorowego *CLV1/CLV2*; składnikiem kompleksu receptorowego jest też fosfataza towarzysząca kinazie białkowej (*KAPP*) oraz białko *Rop* aktywujące kaskadę kinaz *MAPK*; informacja przekazywana przez *CLV3* gra istotną rolę w regulacji podziałów i różnicowania komórek regionu centralnego (wg [4, 94] zmodyfikowane)

regionu centralnego i merystemu peryferycznego (ryc. 2A). Homozygotyczny mutant *stm* charakteryzuje się całkowitym brakiem merystemu wierzchołkowego, dlatego przypuszcza się, że białko *STM* gra istotną rolę w mechanizmie pozwalającym utrzymywać komórki regionu centralnego w stanie niezróżnicowanym [22]. Można zatem sądzić, że rola białka *STM* jest przeciwstawna w stosunku do *CLV3/CLV1* [11].

FITOSULFOKINA- α – ROŚLINNY CZYNNIK WZROSTOWY

W doświadczeniach prowadzonych w kulturach komórkowych roślin zwracano wielokrotnie uwagę na stosunkowo niską aktywność mitotyczną w warunkach, gdy gęstość kultury komórkowej jest niska [99]. Częstotliwości podziałów nie zmieniają hormony roślinne ani związki pokarmowe, natomiast rośnie ona zdecydowanie wówczas, gdy do środowiska dodaje się płynu pobranego z kultury szybko rosnącej. Próby zidentyfikowania czynnika mitogennego zawartego w takim płynie kończyły się zwykle niepowodzeniami z powodu braku dostatecznie czulej metody analitycznej. Dopiero zastosowanie testu biologicznego, w którym wykorzystuje się komórki mezożyłowe szparaga w kulturze *in vitro*, umożliwiło znalezienie szukanego związku [51]. Zidentyfikowanym czynnikiem, który już w stężeniu 1 nM wyraźnie aktywuje proliferację komórek mezofilowych, jest pentapeptyd o sekwencji Y(SO₃H)IY(SO₃H)TQ nazwany fitosulfokina- α (PSK- α). Grupy hydroksylowe w łańcuchach bocznych obu tyrozyn są zestryfikowane resztami siarczanowymi. Usunięcie reszt siarczanowych prowadzi do niemal całkowitej utraty aktywności biologicznej peptydu [47]. Równie drastyczną utratę aktywności, sięgającą 80–90%, obserwuje się w sytuacji, gdy PSK- α zostaje skrócona na C-końcu o jeden lub dwa aminokwasy [47]. Wkrótce po odkryciu PSK- α , pentapeptyd o identycznej sekwencji aminokwasowej znaleziono w płynie pobieranym z kultury komórkowej ryżu i marchwi [29,53]. Zidentyfikowano też gen *PSK* ryżu kodujący prekursorowy polipeptyd fitosulfokiny- α – preprosulfokinę [100]. Zbudowana z 89 aminokwasów preprosulfokina zawiera na N-końcu 22-aminokwasową sekwencję sygnałową. Aktywny pentapeptyd PSK- α zostaje proteolitycznie „wycięty” z części C-końcowej prekursorowego polipeptydu (ryc. 3). W ostatnim czasie znaleziono specyficzną sulfotransferazę zlokalizowaną w aparacie Golgiego, która przenosi resztę siarczanową z 3'-fosfoadenozyno-5'-fosfosiarczanu na syntetyzowaną preprosulfokinę [30]. Metodą hybrydyzacji *in situ* stwierdzono, że ekspresja genu *PSK* w kielkach ryżu jest w zasadzie ograniczona do merystemów



RYCINA 3. Schemat budowy preprosulfokiny – białka prekursorowego fitosulfokiny- α ; na schemacie zaznaczono 22-aminokwasowy peptyd sygnałowy oraz mieszczącą się w części C-końcowej prosulfokiny (aminokwasy 80 – 84) fitosulfokinę- α (na podstawie danych [100]).

wierzchołkowych [100]. W komórkach szparaga PSK- α jest syntetyzowana tylko w obecności auksyny (1-NAA) i cytokininy (N^6 -benzyladenina) [48]. Fitosulfokina- α jest wiązana na powierzchni protoplastów ryżu przez dwa rodzaje „miejsz wiązających” – miejsca o wysokim i niskim powinowactwie względem peptydu [50]. Za pośrednictwem zmodyfikowanej fitosulfokiny zawierającej na C-końcu lizynę z dołączoną grupą azydosalicylową udało się wyznaczyć dwa polipeptydy o masie 120 i 160 kDa, które przypuszczalnie pełnią funkcję receptorową [49].

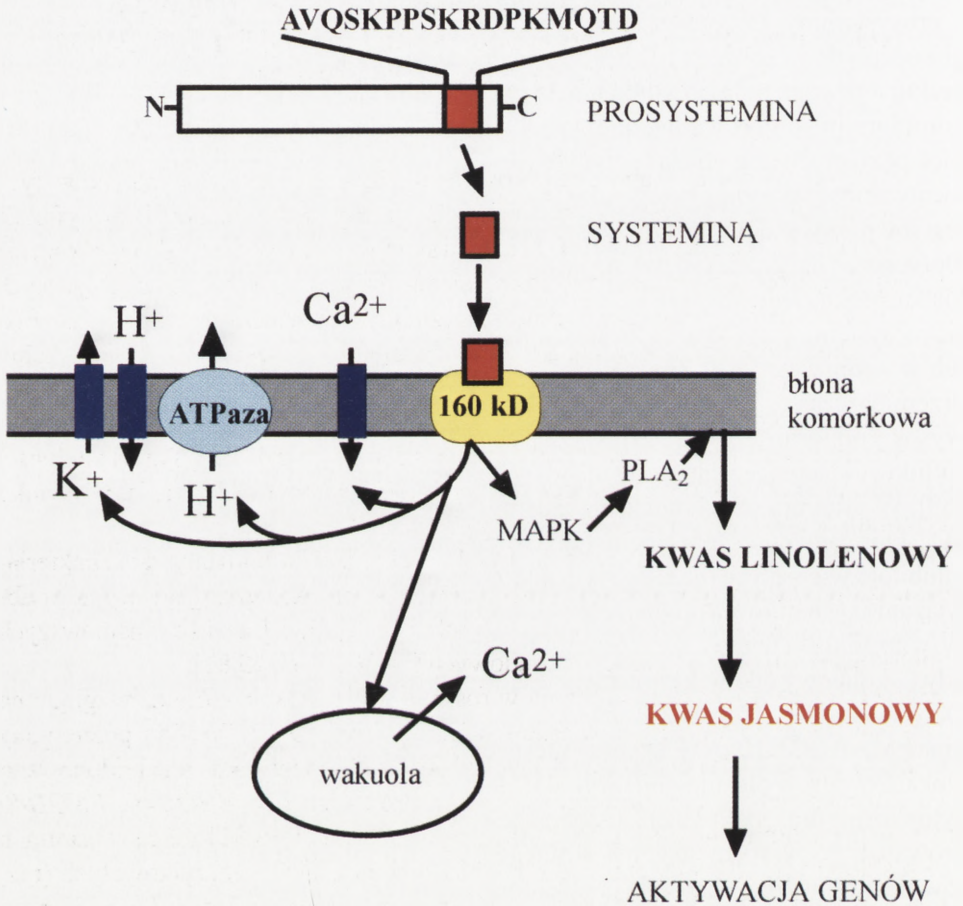
Opublikowane ostatnio pojedyncze doniesienia sugerują, że PSK- α stymuluje embriogenezę somatyczną marchwi [29,39] i różnicowanie naczyń z izolowanych komórek mezofilu cynii [52], a także pobudza kiełkowanie ziaren pyłku tytoniu [10].

SYSTEMINA – PEPTYD SYGNAŁOWY W REAKCJACH OBRONNYCH PRZECIW ZRANIENIOM

Ostatnie dziesięciolecie przyniosło wyraźny postęp w poznawaniu biochemicznych i molekularnych mechanizmów obronnych będących odpowiedzią rośliny na działanie czynników zewnętrznych, takich jak: zranienie, atak owadów, infekcje bakteryjne i wirusowe. Zainteresowanie badaczy ogniskuje się nie tylko na samych reakcjach obronnych, ale również na mechanizmach przekazywania informacji o ataku. Poszukiwane są substancje sygnałowe informujące o zagrożeniu oraz uruchamiające lokalne reakcje obronne bądź indukujące reakcje odpornościowe w częściach rośliny, które nie zostały zranione lub zainfekowane (reakcje systemiczne). Jedną z takich substancji sygnałowych jest systemina – 18-aminokwasowy oligopeptyd zidentyfikowany po raz pierwszy na początku lat dziewięćdziesiątych. Badaniom związanym z systeminą poświęcono dwa artykuły przeglądowe opublikowane przed pięcioma laty na łamach *Postępów Biologii Komórki* [36,85]. Postęp badań w tej dziedzinie podsumowują również nowsze opracowania opublikowane w literaturze angielskojęzycznej [67,68].

Systemina, znaleziona po raz pierwszy w ekstrakcie z liści pomidora, pełni funkcję czynnika przemieszczającego się z miejsca zranienia do odległych części rośliny, gdzie indukuje reakcje obronne m.in. syntezę inhibitorów proteaz [36,68]. Prekursorem systeminy jest prosystemina, polipeptyd zbudowany z 200 reszt aminokwasowych. Prosystemina jest białkiem konstytutywnym występującym w śladowych stężeniach w cytoplazmie, szczególnie w wiązках przewodzących, chociaż jej synteza drastycznie rośnie w sytuacji zranienia tkanki [34]. Przed trzema laty udało się zidentyfikować cDNA kodujący prosysteminę w ziemniaku (*Solanum tuberosum*), psiance czarnej (*Solanum nigrum*) i pieprzu (*Capsicum annuum*) [13]. Sekwencja aminokwasowa prosysteminy pochodzącej z tych trzech roślin jest identyczna w 73 do 88%. Zwraca uwagę obecność kilku konserwowanych fragmentów, spośród których C-końcowy odcinek zawierający systeminę charakteryzuje się niemal 100% identycznością

sekwencji. Znacząca homologia sekwencji aminokwasowej kilku innych fragmentów [13] może sugerować, że systemina nie jest jedynym aktywnym peptydem „wycinanym” z prosysteminy. Przypuszczenie to może potwierdzać obecność w tytoniu dwóch glikopeptydów (Tob SysI i Tob SysII), pochodzących z jednego 165-aminokwasowego prekursorowego polipeptydu, które w tytoniu pełnią podobną funkcję jak systemina u pomidora [65]. Porównując pierwszorzędową strukturę systeminy kodowaną przez pięć poznanych dotychczas genów można stwierdzić, iż wykazuje ona prawie 100% identyczność sekwencji w regionie C-końcowym. Podobieństwo regionu N-końcowego jest również wysokie, aczkolwiek stopień identyczności tej części jest nieco mniejszy. Dotychczas nie zidentyfikowano proteazy „wycinającej” systeminę z prekursorowego białka. Można jedynie zakładać, że dzieje się to w miejscu zranienia w wyniku zetknięcia się prosysteminy z proteazą zlokalizowaną w oddzielnym kompartmentie komórkowym lub w apoplacie [20]. Znakowana izotopowo systemina nałożona na zraniony liść przemieszcza się floemem na stosunkowo znaczne odległości wykazując przy tym wysoką odporność na proteolityczną degradację. Związki blokujące grupy hydro-sulfidowe i hamujące transport sacharozy do floemu hamują również transport systeminy [68]. W ostatnim czasie udało się zidentyfikować białko o masie cząsteczkowej 160 kDa, które przypuszczalnie pełni funkcję receptora systeminy [57,70]. Suramina, znany inhibitor zwierzęcych receptorów cytokin i czynników wzrostowych, wyraźnie hamuje wiązanie systeminy na powierzchni komórek w kulturze zawiesinowej pomidora [82]. W wiązaniu systeminy do receptora uczestniczy jej N-końcowy fragment, podczas gdy C-końcowy odcinek konieczny jest do aktywacji szlaku transdukcji sygnału [57]. Dotychczasowe wyniki badań sugerują, że istotnymi elementami tego szlaku są: kaskada kinaz MAP [83], H⁺-ATPaza oraz niespecyficzne kanały wapniowe i kanały jonowe zlokalizowane w plazmolemie (ryc. 4) [59,60,68,69]. Wzrost stężenia jonów wapnia w cytoplazmie oraz fosforylacja fosfolipazy A₂ w następstwie aktywacji kinaz białkowych prowadzą do wzrostu stężenia wolnego kwasu linolenowego [61]. Obserwuje się również wzmożoną ekspresję genu chloroplastowej lipoksygenazy funkcjonującej w szlaku biosyntezy kwasu jasmonowego [31]. Aktywacja szlaku biosyntezy jasmonianu prowadzi ostatecznie do uaktywnienia około dwudziestu genów, których produkty są w różny sposób włączone w mechanizmy obronne [68]. Można więc przypuszczać, że wpływ systeminy na syntezę nadtlenu wodoru [64], ekspresję genów oksydazy polifenolowej [68] i kalmoduliny [2] odbywa się poprzez aktywację metabolizmu kwasu linolenowego. Ponadto systemina działa aktywnie na ekspresję genu poli-galakturonazy – enzymu produkującego fragmenty kwasu oligogalakturonowego z materiału ścian komórkowych [1].



RYCINA 4. Schemat szlaku transdukcji sygnału aktywowanego przez systeminę w wyniku zranienia rośliny. W miejscu zranienia z prekursorowego białka prosysteminy „wycinany” jest 18-aminokwasowy peptyd (systemina), który oddziałując z błonowym białkiem receptorowym aktywuje szlak transdukcji sygnału prowadzący do aktywacji fosfolipazy A₂ (PLA₂), wzmożonej syntezy kwasu jasmonowego oraz ekspresji genów obronnych (wg [68], zmodyfikowane)

PRODUKTY GENU *ENOD40* – CZYNNIKAMI REGULUJĄCYMI MORFOGENEZĘ BRODAWEK KORZENIOWYCH ORAZ RÓŻNICOWANIE I ROZWÓJ WIĄZEK PRZEWODZĄCYCH

Symbiotyczne oddziaływania między rizobiami a roślinami z rodziny motylkowatych polegają na wzajemnej wymianie sygnałów chemicznych aktywujących specyficzne geny bakteryjne i roślinne. Wymiana substancji sygnałowych prowadzi do wytworzenia funkcjonalnej brodawki korzeniowej oraz różnicowania bakterii do form symbiotycznych mających zdolność wiązania azotu atmosferycznego. Cząsteczki sygnałowe (czynniki Nod), produkowane przez rizobia, a rozpoznawane przez receptory na powierzchni korzeni, aktywują odpowiedni szlak transdukcji sygnału. W komórkach kompetentnych zostaje uruchomiona informacja genetyczna, w której jest zapisany program wytworzenia brodawki. Realizacja tego programu rozpoczyna się od odzyskania zdolności podziałów przez komórki perycyklu, kory pierwotnej i endodermy korzenia. W wyniku tych zmian dochodzi do utworzenia zawiązka brodawki.

Więcej informacji na temat molekularnych mechanizmów oddziaływania bakteria-roślina zainteresowany Czytelnik może znaleźć w pracach przeglądowych opublikowanych w polskich czasopismach monograficznych [35,40], a także w najnowszych angielskojęzycznych artykułach przeglądowych [14,16,21,63,75,81].

Bakteryjne czynniki Nod aktywują w roślinie wiele genów, które ze względu na czas pojawiania się transkryptów dzieli się na tzw. wczesne (*ENOD*) i późne geny nodulinowe (*NOD*). Na początku lat dziewięćdziesiątych zidentyfikowano i sklonowano szereg wczesnych genów nodulinowych, a wśród nich gen *ENOD40*. *ENOD40* poznany pierwotnie u soi, lucerny, grochu, wyki i fasoli [21,35,81] został w ostatnich latach sklonowany również u roślin nienależących do rodziny motylkowatych (ryż, tytoń, kukurydza) [41,91]. Na podstawie analizy porównawczej sekwencji nukleotydowej zwrócono uwagę, że geny *ENOD40* zawierają w regionie kodującym dwa zachowane fragmenty (ryc. 5) [41]. Przypuszcza się, że region I koduje krótki peptyd utworzony z 10 (tytoń), 12 (soja, ryż, kukurydza) lub 13 (groch, lucerna, wyka) reszt aminokwasowych. Trzy C-końcowe aminokwasy (His-Gly-Ser) oraz tryptofan położony w regionie środkowym kodowanych peptydów są zachowywane w 100%. Ponadto region I genu *ENOD40* roślin motylkowatych koduje jeszcze dwa w pełni zachowane aminokwasy (Cys i Ile). Ekspresja genu *ENOD40* była wielokrotnie badana, ale obecność peptydu *ENOD40* potwierdzono immunochemicznie jedynie w ekstrakcie z brodawek i w niższym stężeniu również w ekstrakcie z korzeni soi, używając przeciwciał skierowanych przeciw chemicznie zsyntetyzowanemu peptydowi [91].

Wysoce konserwatywny region II *ENOD40* nie zawiera typowej ramki odczytu, chociaż w kilku przypadkach występuje typowy kodon startowy (ryc. 5). Niektórzy autorzy sugerują, że sekwencja tego regionu może uczestniczyć w regulacji translacji [8,91] lub że RNA jest aktywnym produktem pełniącym funkcję regulatorową [14].

	Region I		Region II	
A,	<i>Glycine max</i>	a	ME LCWQTSIHGS* LANRQVT KRQW – TPLGSL	
		b	ME – LCWLTTIHGS* WQTGKSQKRQW – TPLGSL	
	<i>Sesbania rostrata</i>		MK – LCWQKSIHGS* LANRQV TKRQW – TPLGLV	
	<i>Lotus japonicus</i>		MR – FCWQKSIHGS* LANRQV T ERQW – TPLGVI	
	<i>Phaseolus vulgaris</i>		MK – FCWQASIHGS* QANRQV T KRQW – TPSGSL	
B,	<i>Pisum sativum</i>		MKFLCWQKSIHGS* MANRQVTKRQW – I PFWSL	
	<i>Trifolium repens</i>		MKLLCWQKSIHGS* MPNRQVTKKA M – DSFI.GA	
	<i>Medicago sativa</i>		MKLI.CWQKSIHGS* MANRQVTKRQW – I PFWSL	
	<i>Medicago truncatula</i>		MKLLCWLEKSIHGS* MANRQVTKRQW – I PFWSL	
	<i>Vicia sativa</i>		MKLLCWQKSIHGS* MANRQVTKRQW – I PFWSL	
	C,	<i>Oryza brachyantha</i>		ME – DEWLEHAHGS* CTNRQVT KRHW*
		<i>Oryza sativa</i>		ME – DEWLEHAHGS* APNRQVT KRQW*
<i>Nicotiana tabacum</i>			MQ WDEA I HGS* MANRQVTKRQW – TPFWSL	
	<i>Zea mays</i>		ME – DAWLEHILHGS* R T NRQ VT I RQW R TPLGVV	

RYCINA 5. Porównanie sekwencji aminokwasowej peptydów kodowanych przez dwa konserwowane regiony (Region I i Region II) genu *ENOD40* z roślin motylkowatych (A i B) i roślin z innych grup systematycznych (C): A – rośliny motylkowate tworzące brodawki zdeterminowane; B – rośliny motylkowate wytwarzające brodawki niezdeteminowane; C – rośliny z innych grup systematycznych (na podstawie danych [41])

Z drugiej jednak strony, chemicznie zsyntetyzowany, 19-aminokwasowy oligopeptyd o sekwencji odpowiadającej peptydowi kodowanemu przez region II *ENOD40* tytoniu wykazuje właściwości czynnika aktywującego podziały mitotyczne komórek [38]. Przeciwciała skierowane przeciw syntetycznemu peptydowi reagują z peptydem zsyntetyzowanym przez protoplasty tytoniu traktowane czynnikiem Nod [38].

Funkcję produktu(ów) *ENOD40* wiązano początkowo wyłącznie z powstawaniem zawiązka brodawki korzeniowej, bowiem transkrypty mRNA pojawiają się w perycyklu już w pierwszych godzinach po zainfekowaniu korzeni bakteriami lub po podaniu czynnika Nod [8,9,58]. Jednak już w pierwszych doniesieniach zwracano uwagę na obecność transkryptów mRNA w komórkach pędu soi, zawiązkach korzeni bocznych lucerny i fasoli, a także zawiązkach liści lucerny [14]. Transkrypty *ENOD40* pojawiają się w korzeniu lucerny w odpowiedzi na traktowanie rośliny cytokininą [23,32]. Ekspresję genu *ENOD40* obserwuje się również u mutantu lucerny, który nie tworzy brodawek [32], a także w korzeniu zainfekowanym grzybami mikoryzowymi [92]. W ryżu ekspresja *ENOD40* zachodzi jedynie w komórkach parenchymatycznych pędu otaczających protoksylem [41]. Wyniki opublikowane w ostatnim czasie [71] nie potwierdziły wcześniejszych doniesień, które wiązały funkcję peptydu ENOD40 ze zmianą wrażliwości protoplastów tytoniu na działanie auksyny [91].

Podsumowując dotychczasowe wyniki badań należy sądzić, iż produkty genu *ENOD40* są zaangażowane nie tylko w procesie nodulacji, ale uczestniczą również w procesach różnicowania wiązek naczyniowych w brodawce korzeniowej oraz innych organach i to niezależnie od tego, czy roślina wchodzi w symbiozę z rizobiami czy też nie.

PODSUMOWANIE

Peptydy tworzą najliczniejszą grupę substancji sygnałowych funkcjonujących w organizmach zwierzęcych. Rodzina tych związków jest syntetyzowana przez układ biosyntezy białek. Wspólna z białkami jest również enzymatyczna obróbka i transport drogą pęcherzykowego układu sekrecyjnego, a także możliwość różnorodnych modyfikacji potranslacyjnych mogących zmieniać aktywność biologiczną syntetyzowanych peptydów. Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że również w organizmach roślinnych peptydy pełnią funkcję substancji sygnałowych pośredniczących w przekazywaniu informacji między komórkami lub organami. Niektóre z tych związków są krótkimi peptydami lub oligopeptydami, inne zaś polipeptydami o nieco bardziej skomplikowanej budowie. Mimo że wiedza na temat ich struktury pierwszorzędowej, miejsca syntezy, a w niektórych przypadkach również wywoływanych efektów biochemicznych i fizjologicznych jest już dość bogata, to nadal sporo wątpliwości rodzą pytania o ich rolę oraz szczegółowy mechanizm działania.

Funkcja polipeptydów SCR w reakcji rozpoznania pyłek-słupek wydaje się być bezsporna, mimo że szlak transdukcji sygnału aktywowany w komórkach wyrostkowych przez receptorową kinazę białkową SRK oraz mechanizm efektorowy odpowiedzialny za akceptację lub odrzucenie pyłku o określonym haplocyfie są jeszcze słabo poznane. Bez odpowiedzi pozostają również szczegółowe pytania dotyczące roli polipeptydu CLV3 oraz pytania o funkcjonowanie szlaku sygnałowego aktywowanego przez kompleks receptorowy CLV1/CLV2. Niewątpliwie polipeptyd CLV3 jest ligandem przenoszącym informację między dwoma różnymi kompartmentami komórkowymi regionu centralnego, ale pytanie o to, jak przekazywana w ten sposób informacja wpływa na właściwe funkcjonowanie merystemu wierzchołkowego pędu, pozostaje nadal bez odpowiedzi. Badania związane z funkcjonowaniem merystemów wierzchołkowych pędu i korzenia znalazły się ostatnio w centrum uwagi kilku zespołów zajmujących się genetyką molekularną roślin. Stwarza to nadzieję, że w niedługim czasie również rola polipeptydu CLV3 zostanie ostatecznie wyjaśniona. Prosystemina i proteolitycznie „wycięta” z niej systemina funkcjonują w reakcjach obronnych przeciw zranieniom. Badania trwające już dziesięć lat umożliwiły zebranie wielu informacji na temat wywoływanych przez systeminę efektów biochemicznych oraz zmian w ekspresji wielu genów. Zakres obserwowanych zmian jest stosunkowo szeroki i ma ścisły związek z reakcjami obronnymi indukowanymi przez czynniki stresowe. Dlatego dalsze postępy

w poznawaniu szczegółowego mechanizmu działania systeminy będą zależę od osiągnięć w badaniach mechanizmów funkcjonowania kwasu jasmonowego, etylenu i kwasu absycynowego, a także od poznania roli oligosacharydów i nadtlenku wodoru jako wtórnych przekaźników informacji zaangażowanych w funkcjonowanie systeminy. Rola pozostałych dwóch peptydów jest jeszcze słabo poznana. Tylko przez analogię z organizmami zwierzęcymi możemy dzisiaj przypuszczać, że fitosulfokina- α i ENOD40 pełnią funkcję roślinnych czynników wzrostowych lub cytokin. Mimo że niemal wszystkie publikacje na temat fitosulfokiny- α pochodzą tylko z jednej japońskiej pracowni, postępy w badaniach tego peptydu mogą budzić uznanie. Inaczej jest w przypadku produktów genu *ENOD40*. Dotychczasowe wyniki nie dają pewności, czy region I tego genu rzeczywiście ulega translacji, dostarczając aktywnych oligopeptydów. Nie wiadomo również, czy wysoce konserwowany region II funkcjonuje jako sekwencja regulująca transkrypcję, czy może koduje aktywny oligopeptyd bądź regulatorowy RNA. W konkluzji można zatem stwierdzić, że z genem *ENOD40*, kodowanymi przezeń produktami i ich funkcją wiąże się nadal wiele wątpliwości i pytań, na które muszą odpowiedzieć przyszłe badania.

LITERATURA

- [1] BERGEY DR, OROZCO-CARDENAS M, DE MOURA DS, RYAN CA. A wound- and systemin-inducible polygalacturonase in tomato leaves. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 1756–1760.
- [2] BERGEY DR, RYAN CA. Wound- and systemin-inducible calmodulin gene expression in tomato leaves. *Plant Mol Biol* 1999; **40**: 815–823.
- [3] BISSELING T. The role of plant peptides in intercellular signalling. *Curr Opin Plant Biol* 1999; **2**: 365–368.
- [4] BOWMAN J, ESHED Y. Formation and maintenance of the shoot apical meristem. *Trends Plant Sci* 2000; **5**: 110–115
- [5] BRAND U, FLETCHER JC, HOBE M, MEYEROWITZ EM, SIMON R. Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by *CLV3* activity. *Science* 2000; **289**: 617–619.
- [6] BRUGIĆRE N, CUI Y, ROTHSTEIN SJ. Molecular mechanisms of self-recognition in *Brassica* self-incompatibility. *Trends Plant Sci* 2000; **5**: 432–438.
- [7] CABRILLAC D, COCK JM, DUMAS C, GAUDE T. The *S*-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature* 2001; **410**: 220–223.
- [8] CHARON C, JOHANSSON C, KONDOROSI E, KONDOROSI A, CRESPI M. *enod40* induces dedifferentiation and division of root cortical cells in legumes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 8901–8906.
- [9] CHARON C, SOUSA C, CRESPI M., KONDOROSI A. Alteration of *enod40* expression modifies *Medicago truncatula* root nodule development induces by *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell* 1999; **11**: 1953–1965.
- [10] CHEN Y-F, MATSUBAYASHI Y, SAKAGAMI Y. Peptide growth factor phytosulfokine- α contributes to the pollen population effect. *Planta* 2000; **211**: 752–755.
- [11] CLARK SE, JACOBSEN SE, LEVIN JZ, MEYEROWITZ EM. The *CLAVATA* and *SHOOT MERISTEMLESS* loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* 1996; **122**: 1567–1575.

- [12] CLARK SE, WILLIAMS RW. The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* 1997; **89**: 575–585.
- [13] CONSTABEL CP, YIP L, RYAN CA. Prosystemin from potato, black nightshade, and bell pepper: primary structure and biological activity of predicted systemin polypeptides. *Plant Mol Biol* 1998; **36**: 55–62
- [14] CRESPI M, GALVEZ S. Molecular mechanisms in root nodule development. *J Plant Growth Regul* 2000; **19**: 155–166.
- [15] CUI Y, BI Y-M, BRUGIÈRE N, ARNOLDO M, ROTHSTEIN SJ. The *S* locus glycoprotein and the *S* receptor kinase are sufficient for self-pollen rejection in *Brassica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 3713–3717.
- [16] CULLIMORE JV, RANJEVA R, BONO J-J. Perception of lipo-chitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends Plant Sci* 2001; **6**: 24–30.
- [17] DIXIT R, NASRALLAH JB. Recognizing self in the self-incompatibility response. *Plant Physiol* 2001; **125**: 105–108.
- [18] DIXIT R, NASRALLAH ME, NASRALLAH JB. Post-transcriptional maturation of the *S* receptor kinase of *Brassica* correlates with co-expression of the *S*-locus glycoprotein in the stigmas of two *Brassica* strains and in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol* 2000; **124**: 297–311.
- [19] DOERNER P. Shoot meristems: Intercellular signals keep the balance. *Curr Biol* 1999; **9**: R377–R380.
- [20] DOMBROWSKI JE, PEARCE G, RYAN CA. Proteinase inhibitor-inducing activity of the prohormone prosystemin resides exclusively in the C-terminal systemin domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 12947–12952.
- [21] DOWNIE JA, WALKER SA. Plant responses to nodulation factors. *Curr Opin Plant Biol* 1999; **2**: 483–489.
- [22] ENDRIZZI K, MOUSSIAN B, HAECKER A, LEVIN JZ, LAUX T. The *SHOOT MERISTEM-LESS* gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE*. *Plant J* 1996; **10**: 967–979.
- [23] FANG Y, HIRSCH AM. Studying early nodulin gene *ENOD40* expression and induction by nodulation factor and cytokinin in transgenic alfalfa. *Plant Physiol* 1998; **116**: 53–68.
- [24] FLETCHER JC, BRAND U, RUNNING MP, SIMON R, MEYEROWITZ EM. Signaling of cell fate decisions by *CLAVATA3* in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* 1999; **283**: 1911–1914.
- [25] FLETCHER JC, MEYEROWITZ EM. Cell signaling within the shoot meristem. *Curr Opin Plant Biol* 2000; **3**: 23–30.
- [26] FRANKLIN-TONG VE, FRANKLIN FCH. Self-incompatibility in *Brassica*: The elusive pollen *S* gene is identified! *Plant Cell* 2000; **12**: 305–308.
- [27] GIRANTON J-L, DUMAS C, COCK JM, GAUDE T. The integral membrane *S*-locus receptor kinase of *Brassica* has serine/threonine kinase activity in a membranous environment and spontaneously forms oligomers *in planta*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 3759–3764.
- [28] GU T, MAZZURCO M, SULAMAN W, MATIAS DD, GORING DR. Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the *S*-locus receptor kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 382–387.
- [29] HANAI H, MATSUNO T, YAMAMOTO M, MATSUBAYASHI Y, KABAYASHI T, KAMADA H, SAKAGAMI Y. A secreted peptide growth factor, phyto-sulfokine, acting as a stimulatory factor of carrot somatic embryo formation. *Plant Cell Physiol* 2000; **41**: 27–32.
- [30] HANAI H, NAKAYAMA D, YANG H, MATSUBAYASHI Y, HIROTA Y, SAKAGAMI Y. Existence of a plant tyrosylprotein sulfotransferase: novel plant enzyme catalyzing tyrosine *O*-sulfation of preprophyto-sulfokine variants *in vitro*. *FEBS Lett* 2000; **470**: 97–101.

- [31] HEITZ T, BERGEY DR, RYAN CA. A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiol* 1997; **114**: 1085–1093.
- [32] HIRSCH AM, FANG Y, ASAD S, KAPULNIK Y. The role of phytohormones in plant-microbe symbioses. *Plant Soil* 1997; **194**: 171–184.
- [33] IKEDA S, NASRALLAH JB, DIXIT R, PREISS S, NASRALLAH ME. An aquaporin-like gene required for the *Brassica* self-incompatibility response. *Science* 1997; **276**: 1564–1566.
- [34] JACINTO T, MCGURL B, FRANCESCHI V, DELANO-FREIER J, RYAN CA. Tomato pro-systemin promoter confers wound-inducible, vascular bundle-specific expression of the β -glucuronidase gene in transgenic tomato plants. *Planta* 1997; **203**: 406–412.
- [35] JAKUBOWSKA A, KOWALCZYK S. Biochemiczne i molekularne podstawy symbiotycznych oddziaływań bakterii i roślin. *Post Biochem* 1998; **44**: 72–82.
- [36] JAKUBOWSKA A, MURACH AP, KOWALCZYK S. Nowe cząsteczki sygnałowe i związki regulujące wzrost i rozwój roślin. *Post Biol Kom* 1996; **23**: 657–682.
- [37] JEONG S, TROTOCHAUD AE, CLARK SE. The *Arabidopsis* *CLAVATA 2* gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the *CLAVATA 1* receptor-like kinase. *Plant Cell* 1999; **11**: 1925–1933.
- [38] JOHN M, SCHMIDT J, WALDEN R, CZAJA I, DÜLZ M, SCHELL J, RÖHRIG H. Lipochitoooligosaccharide-induced tobacco cells release a peptide as mediator of the glycolipid signal. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 10178–10182.
- [39] KOBAYASHI T, EUN C-H, HANAI H, MATSUBAYASHI Y, SAKAGAMI Y, KAMADA H. Phytosulphokine- α , a peptidyl plant growth factor, stimulates somatic embryogenesis in carrot. *J Exp Bot* 1999; **50**: 1123–1128.
- [40] KOPCIŃSKA J, GOLINOWSKI W. Czynniki Nod – cząsteczka sygnałowa w interakcji rośliny motylkowate-*Rhizobium*. *Kosmos* 1995; **44**: 579–587.
- [41] KOUCHI H, TAKANE K-I, SO RB, LADHA JK, REDDY PM. Rice *ENOD40*: isolation and expression analysis in rice and transgenic soybean root nodules. *Plant J* 1999; **18**: 121–129.
- [42] KRZYWNICKA E, KOWALCZYK S. Molekularne mechanizmy samoniezgodności homomorficznej zapobiegające samozapłodnieniu roślin okrytonasiennych. *Post Biol Kom* 1998; **25**: 75–98.
- [43] LENHARD M, LAUX T. Shoot meristem formation and maintenance. *Curr Opin Plant Biol* 1999; **2**: 44–50.
- [44] LETHAM DLD, BLISSARD GW, NASRALLAH JB. Production and characterization of the *Brassica oleracea* self-incompatibility locus glycoprotein and receptor kinase in a baculovirus infected insect cell culture system. *Sex Plant Reprod* 1999; **12**: 179–187.
- [45] LONG JA, MOAN EI, MEDFORD JI, BARTON MK. A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* 1996; **379**: 66–69.
- [46] MARIN-OLIVIER M, CHEVALIER T, FOBIS-LOISY I, DUMAS C, GAUDE T. Aquaporin *PIP* genes are not expressed in the stigma papillae in *Brassica oleracea*. *Plant J* 2000; **24**: 231–240.
- [47] MATSUBAYASHI Y, HANAI H, HARA O, SAKAGAMI Y. Active fragments and analogs of the plant growth factor, phytosulfokine: structure-activity relationships. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **225**: 209–214.
- [48] MATSUBAYASHI Y, MORITA A, MATSUNAGA E, FURUYA A, HANAI N, SAKAGAMI Y. Physiological relationships between auxin, cytokinin, and a peptide growth factor, phytosulfokine- α , in stimulation of asparagus cell proliferation. *Planta* 1999; **207**: 559–565.
- [49] MATSUBAYASHI Y, SAKAGAMI Y. 120- and 160-kDa receptors for endogenous mitogenic peptide, phytosulfokine- α , in rice plasma membranes. *J Biol Chem* 2000; **275**: 15520–15525.

- [50] MATSUBAYASHI Y, SAKAGAMI Y. Characterization of specific binding sites for a mitogenic sulfated peptide, phytosulfokine- α , in the plasma-membrane fraction derived from *Oryza sativa* L. *Eur J Biochem* 1999; **262**: 666–671.
- [51] MATSUBAYASHI Y, SAKAGAMI Y. Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 7623–7627.
- [52] MATSUBAYASHI Y, TAKAGI L, OMURA N, MORITA A, SAKAGAMI Y. The endogenous sulfated pentapeptide phytosulfokine- α stimulates tracheary element differentiation of isolated mesophyll cells of zinnia. *Plant Physiol* 1999; **120**: 1043–1048.
- [53] MATSUBAYASHI Y, TAKAGI L, SAKAGAMI Y. Phytosulfokine- α , a sulfated pentapeptide, stimulates the proliferation of rice cells by means of specific high- and low-affinity binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 13357–13362.
- [54] MAYER KFX, SCHOOF H, HAECKER A, LENHARD M, JÜRGENS G, LAUX T. Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* 1998; **95**: 805–815.
- [55] MAZZURCO M, SULAMAN W, ELINA H, COCK JM, GORING DR. Further analysis of the interactions between the *Brassica S* receptor kinase and three interacting proteins (ARC1, THL1 and THL2) in the yeast two-hybrid system. *Plant Mol Biol* 2001; **45**: 365–376.
- [56] MCCUBBIN A, KAO T-h. Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; **16**: 333–364.
- [57] MEINDL T, BOLLER T, FELIX G. The plant wound hormone systemin binds with the N-terminal part to its receptor but needs the C-terminal part to activate it. *Plant Cell* 1998; **10**: 1561–1570.
- [58] MINAMI E, KOUCHI H, COHN JR, OGAWA T, STACEY G. Expression of the early nodulin, ENOD40, in soybean roots in response to various lipo-chitin signal molecules. *Plant J* 1996; **10**: 23–32.
- [59] MOYEN C, HAMMOND-KOSACK KE, JONES J, KNIGHT MR, JOHANNES E. Systemin triggers an increase of cytoplasmic calcium in tomato mesophyll cells: Ca^{2+} mobilization from intra- and extracellular compartments. *Plant Cell Environm* 1998; **21**: 1101–1111.
- [60] MOYEN C, JOHANNES E. Systemin transiently depolarizes the tomato mesophyll cell membrane and antagonizes fusicoccin-induced extracellular acidification of mesophyll tissue. *Plant Cell Environm* 1996; **19**: 464–470.
- [61] NÁRVAEZ-VÁSQUEZ J, FLORIN-CHRISTENSEN J, RYAN CA. Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharide elicitors in tomato leaves. *Plant Cell* 1999; **11**: 2249–2260.
- [62] NASRALLAH JB. Cell-cell signaling in the self-incompatibility response. *Curr Opin Plant Biol* 2000; **3**: 368–373.
- [63] NIEBEL A, GRESSENT F, BONO J-J, RANJEVA R, CULLIMORE J. Recent advances in the study of Nod factor perception and signal transduction. *Biochimie* 1999; **81**: 669–674.
- [64] OROZCO-CARDENAS M, RYAN CA. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 6553–6557.
- [65] PEARCE G, MOURA DS, STRATMANN J, RYAN CA. Production of multiple plant hormones from a single polyprotein precursor. *Nature* 2001; **411**: 817–820.
- [66] RYAN CA, PEARCE G. Polypeptide hormones. *Plant Physiol* 2001; **125**: 65–68.
- [67] RYAN CA, PEARCE G. Systemin: A polypeptide signal for plant defensive genes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998; **14**: 1–17.
- [68] RYAN CA. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1477**: 112–121.
- [69] SCHALLER A, OECKING C. Modulation of plasma membrane H^+ – ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. *Plant Cell* 1999; **11**: 263–272.

- [70] SCHEER JM, RYAN CA. A 160-kD systemin receptor on the surface of *Lycopersicon peruvianum* suspension-cultured cells. *Plant Cell* 1999; **11**: 1525–1535.
- [71] SCHELL J, BISSELING T, DÜLZ M, FRANSSSEN H, FRITZE K, JOHN M, KLEINOW T, LEBNICK A, MIKLASHEVICH S, PAWLOWSKI K, RÖHRIG H, VAN DE SANDE K, SCHMIDT J, STEINBIß H-H, STOLL M. Re-evaluation of phytohormone-independent division of tobacco protoplast-derived cells. *Plant J* 1999; **17**: 461–466.
- [72] SCHOOF H, LENHARD M., HAECKER A, MAYER KFX, JÜRGENS G, LAUX T. The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell* 2000; **100**: 635–644.
- [73] SCHOPFER CR, NASRALLAH JB. Self-incompatibility. Prospects for a novel putative peptide-signaling molecule. *Plant Physiol* 2000; **124**: 935–939.
- [74] SCHOPFER CR, NASRALLAH ME, NASRALLAH JB. The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science* 1999; **286**: 1697–1700.
- [75] SCHULTZE M, KONDOROSI A. Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu Rev Genet* 1998; **32**: 33–57.
- [76] SHIBA H, KIMURA N, TAKAYAMA S, HINATA K, SUZUKI A, ISOGAI A. Alteration of the self-incompatibility phenotype in *Brassica* by transformation of the antisense *SLG* gene. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000; **64**: 1016–1024.
- [77] SHIBA H, TAKAYAMA S, IWANO M, SHIMOSATO H, FUNATO M, NAKAGAWA T, CHE F-S, SUZUKI G, WATANABE M, HINATA K, ISOGAI A. A pollen coat protein, SP11/SCR, determines the pollen S-specificity in the self-incompatibility of *Brassica* species. *Plant Physiol* 2001; **125**: 2095–2103.
- [78] STAHL RJ, ARNOLDO M, GLAVIN TL, GORING DR, ROTHSTEIN SJ. The self-incompatibility phenotype in *Brassica* is altered by the transformation of a mutant *S* locus receptor kinase. *Plant Cell* 1998; **10**: 209–218.
- [79] STONE JM, TROTOCHAUD AE, WALKER JC, CLARK SE. Control of meristem development by *CLAVATA1* receptor kinase and kinase-associated protein phosphatase interactions. *Plant Physiol* 1998; **117**: 1217–1225.
- [80] STONE SL, ARNOLDO M, GORING DR. A breakdown of *Brassica* self-incompatibility in *ARC1* antisense transgenic plants. *Science* 1999; **286**: 1729–1731.
- [81] STOUGAARD J. Regulators and regulation of legume root nodule development. *Plant Physiol* 2000; **124**: 531–540.
- [82] STRATMANN J, SCHEER J, RYAN CA. Suramin inhibits initiation of defense signaling by systemin, chitosan, and a β -glucan elicitor in suspension-cultured *Lycopersicon peruvianum* cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 8862–8867.
- [83] STRATMANN JW, RYAN CA. Myelin basic protein kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharide elicitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 11085–11089.
- [84] SUZUKI G, KAI N, HIROSE T, FUKUI K, NISHIO T, TAKAYAMA S, ISOGAI A, WATANABE M, HINATA K. Genomic organization of the *S* locus: identification and characterization of genes in *SLG/SRK* region of *S*⁹ haplotype of *Brassica campestris* (syn. *rapa*). *Genetics* 1999; **153**: 391–400.
- [85] ŚLÓSAREK G, BARCISZEWSKI J. Struktura i funkcja systeminy – peptydu o właściwościach hormonu roślinnego. *Post Biol Kom* 1996; **23**: 477–489.
- [86] TAKASAKI T, HATAKEYAMA K, SUZUKI G, WATANABE M, ISOGAI A, HINATA K. The *S* receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica* stigma. *Nature* 2000; **403**: 913–916.
- [87] TAKAYAMA S, SHIBA H, IWANO M, ASANO K, HARA M, CHE F-S, WATANABE M, HINATA K, ISOGAI A. Isolation and characterization of pollen coat proteins of *Brassica campestris* that interact with *S* locus-related glycoprotein 1 involved in pollen-stigma adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 3765–3770.

- [88] TAKAYAMA S, SHIBA H, IWANO M, SHIMOSATO H, CHE F-S, KAI N, WATANABE M, SUZUKI G, HINATA K, ISOGAI A. The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 1920–1925.
- [89] TROTOCHAUD AE, HAO T, WU G, YANG Z, CLARK SE. The CLAVATA1 receptor-like kinase requires CLAVATA3 for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and a Rho-related protein. *Plant Cell* 1999; **11**: 393–405.
- [90] TROTOCHAUD AE, JEONG S, CLARK SE. CLAVATA 3, a multimeric ligand for the CLAVATA 1 receptor-kinase. *Science* 2000; **289**: 613–616.
- [91] VAN DE SANDE K, PAWLOWSKI K, CZAJA I, WIENEKE U, SCHELL J, SCHMIDT J, WALDEN R, MATVIENKO M, WELLINK J, VAN KAMMEN A, FRANSSEN H, BISSE-LING T. Modification of phytohormone response by a peptide encoded by *ENOD40* of legumes and a nonlegume. *Science* 1996; **273**: 370–373.
- [92] VAN RHIJN P, FANG Y, GALILI S, SHAUL O, ATZMON N, WININGER S, ESHED Y, LUM M, LI Y, TO V, FUJISHIGE N, KAPULNIK Y, HIRSCH AM. Expression of early nodulin genes in alfalfa mycorrhizae indicates that signal transduction pathways used in forming arbuscular mycorrhizae and *Rhizobium*-induced nodules may be conserved. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 5467–5472.
- [93] VERNOUX T, AUTRAN D, TRAAS J. Developmental control of cell division patterns in the shoot apex. *Plant Mol Biol* 2000; **43**: 569–581.
- [94] WAITES R, SIMON R. Signaling cell fate in plant meristems: three clubs on one toulse. *Cell* 2000; **103**: 835–838.
- [95] WATANABE M, HATAKEYAMA K, TAKADA Y, HINATA K. Molecular aspects of self-incompatibility in *Brassica* species. *Plant Cell Physiol* 2001; **42**: 560–565.
- [96] WATANABE M, ITO A, TAKADA Y, NINOMIYA C, KAKIZAKI T, TAKAHATA Y, HATAKEYAMA K, HINATA K, SUZUKI G, TAKASAKI T, SATTA Y, SHIBA H, TAKAYAMA S, ISOGAI A. Highly divergent sequences of the pollen self-incompatibility (*S*) gene in class-I *S* haplotypes of *Brassica campestris* (syn. *rapa*) L. *FEBS Lett* 2000; **473**: 139–144.
- [97] WATANABE M, SUZUKI G, TAKAYAMA S, ISOGAI A, HINATA K. Genomic organization of the *SLG/SRK* region of the *S* locus in *Brassica* species. *Annal Bot* (Suppl. A) 2000; **85**: 155–160.
- [98] WILLIAMS RW, WILSON JM, MEYEROWITZ EM. A possible role for kinase-associated protein phosphatase in the *Arabidopsis* CLAVATA1 signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 10467–10472.
- [99] YANG H, MATSUBAYASHI Y, HANAI H, SAKAGAMI Y. Phytosulfokine- α , a peptide growth factor found in higher plants: Its structure, functions, precursor and receptors. *Plant Cell Physiol* 2000; **41**: 825–830.
- [100] YANG H, MATSUBAYASHI Y, NAKAMURA K, SAKAGAMI Y. *Oryza sativa* *PSK* gene encodes a precursor of phytosulfokine- α , a sulfated peptide growth factor found in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 13560–13565.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 24.09.2001 r.

Przyjęto: 20.11.2001 r.

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

UDZIAŁ KANAŁÓW BŁONY ZEWNĘTRZNEJ W FIZJOLOGII MITOCHONDRIOW

THE OUTER MEMBRANE CHANNELS IN MITOCHONDRIA PHYSIOLOGY

Hanna KMITA, Nina ANTOS

Zakład Bioenergetyki, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii,
Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Poznań

Streszczenie: Kanał jonowy stanowi podstawowe rozwiązanie w wymianie cząsteczek przez zewnętrzną błonę mitochondrialną. Pełni on zasadniczą rolę w transporcie metabolitów, jak i imporcie białek. W artykule omówiono podstawowe właściwości kanałów błony zewnętrznej oraz ich udział w fizjologii mitochondriów. Istnienie szeregu czynników regulujących stan funkcjonalny kanałów błony zewnętrznej wskazuje, iż masa cząsteczkowa jest tylko jednym z czynników warunkującym przejście cząsteczki przez tę błonę. Co więcej, dzięki obecności kanałów o skomplikowanej modulacji, błona zewnętrzna odgrywa istotną rolę nie tylko w regulacji metabolicznych i energetycznych funkcji mitochondriów, ale także w ich biogenezie oraz w funkcjonowaniu całej komórki.

Słowa kluczowe: kanał VDAC, kanał kompleksu TOM, transport białek i metabolitów.

Summary: Pathways for molecule transport across the outer mitochondrial membrane are formed by ion channels. The transported molecules are not only metabolites exchanged between mitochondria and cytosol but also proteins imported into mitochondria. This review presents basic properties of the outer membrane channels and their role in mitochondria physiology. The existence of many factors influencing functional state of the outer membrane channels indicates that transport of a molecule across the outer membrane depends not only on its mass. Moreover, the functional complexity of the outer membrane channels suggests a significant role of the membrane not only in metabolic and energetic functions of mitochondria but also in their biogenesis as well as in cell physiology.

Key words: VDAC channel, the TOM complex channel, protein and metabolite transport.

WSTĘP

Import białek i transport metabolitów do mitochondriów to procesy kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania tych organelli. Import białek wymaga transportu metabolitów zapewniającego odpowiednie zasilanie energetyczne, z kolei większość białek uczestniczących w przekształceniach energetycznych kodowana jest przez genom jądrowy, dlatego muszą być one importowane do odpowiednich przedziałów mitochondriów. Proces importu nie byłby możliwy bez istnienia wyspecjalizowanych kompleksów białkowych, umożliwiających wbudowanie prekursorów białek w błony mitochondriów lub ich skierowanie do przestrzeni międzybłonowej i matriks. Kompleksy te to translokaza błony zewnętrznej, czyli kompleks TOM (*translocase of the outer membrane*) oraz translokazy błony wewnętrznej, czyli kompleksy TIM (*translocase of the inner membrane*) [5, 35, 41, 43, 53, 57, 58, 75]. W przypadku obu typów kompleksów podstawową rolę odgrywa kanał umożliwiający translokację białka przez błonę. Kanał stanowi także podstawowy mechanizm transportu metabolitów przez zewnętrzną błonę mitochondrialną. Jest on tworzony przez porynę mitochondrialną nazywaną również kanałem VDAC (*voltage-dependent anion-selective channel*) [6, 10, 32, 45]. Natomiast transport metabolitów przez wewnętrzną błonę mitochondrialną prowadzony jest przez specyficzne nośniki. Nie oznacza to jednak, iż w błonie wewnętrznej nie występują białka o aktywności kanałowej. Chociaż według założeń teorii chemiosmotycznej Mitchella wewnętrzna błona mitochondrialna powinna być szczelna dla jonów, w błonie tej stwierdzono obecność różnorodnych kanałów o określonej selektywności jonowej, przewodności i wrażliwości na czynniki modulujące [7, 54]. Ponieważ kanały te umożliwiają przemieszczanie się anionów (np. Cl^-) lub kationów (np. K^+ lub Ca^{2+}) w poprzek błony wewnętrznej, kontrola ich aktywności ma kluczowe znaczenie dla metabolizmu mitochondriów i stanu funkcjonalnego całej komórki. Dlatego kanałom błony wewnętrznej przypisuje się obecnie podstawową rolę w mechanizmie molekularnym wielu schorzeń, co sprawia, że poszukiwania skutecznych środków terapeutycznych koncentrują się w dużym stopniu na czynnikach modulujących aktywność tych kanałów. Na przykład kanał potasowy regulowany przez ATP uznaje się za podstawowe narzędzie obrony kardiomiocytów i neuronów przed uszkodzeniami wynikającymi z niedotlenienia, co czyni go celem działania terapeutycznego w kardiologii i neurologii. Równocześnie nie wyklucza się możliwości wykorzystania czynników modulujących aktywność tego kanału w leczeniu całej gamy schorzeń, od otyłości do przedwczesnego starzenia się [14, 31, 54, 74].

KANAŁ VDAC

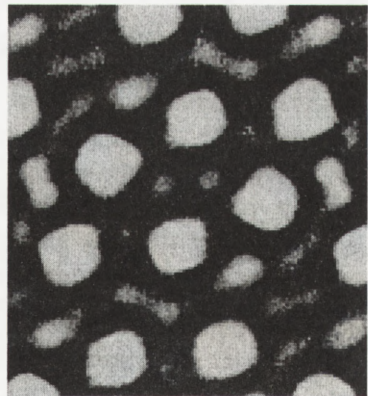
1. Biogeneza

Kanał VDAC jest dominującym ilościowo białkiem zewnętrznej błony mitochondrialnej [6, 10, 36]. Białko to kodowane jest przez genom jądrowy i kierowane do

mitochondriów bez typowej odszczepialnej sekwencji sygnałowej na N-końcu. We wbudowaniu białka VDAC w błonę zewnętrzną uczestniczy kompleks TOM (zostanie on omówiony w kolejnym rozdziale artykułu), przy czym nadal trwa dyskusja dotycząca udziału jego poszczególnych podjednostek. Istnieje zgodność, iż import białka VDAC wymaga obecności receptora Tom20, jednak proponuje się różne wyjaśnienia pełnionej przez niego roli; Tom20 samodzielnie zapewnia skuteczne wprowadzenie białka VDAC w błonę zewnętrzną [69] bądź stanowi tylko miejsce wiązania, a pojawienie się funkcjonalnego kanału VDAC w błonie wymaga udziału innych podjednostek kompleksu TOM, kluczowych dla aktywności kanałowej tego kompleksu [36, 78].

2. Organizacja molekularna kanału

Białko VDAC izolowane z mitochondriów różnych organizmów wykazuje niewielkie podobieństwo sekwencji aminokwasowej. Jednakże podobieństwo cech struktury pierwszorzędowej, czyli analogiczny układ aminokwasów o zbliżonych właściwościach, wskazuje na wspólny model struktury przestrzennej [6, 10, 32, 45, 46, 48, 72]. W poznanych dotąd sekwencjach białka VDAC wyróżnić można zlokalizowany na N-końcu odcinek tworzący strukturę amfipatycznej α helisy i następujące po nim 12 (lub więcej) odcinków zdolnych do przyjęcia struktury β . Odcinki o strukturze β tworzą łącznie strukturę beczułki β , której wewnątrz jest hydrofilne, a powierzchnia zewnętrzna hydrofobowa. Analiza dwuwymiarowych kryształów kanału VDAC, jak i niemożność utworzenia kanału zbudowanego z dwóch cząsteczek białka VDAC wskazują, iż w funkcjonalnym kanale białko VDAC występuje w postaci monomeru. Ściany tego kanału powstają przy udziale odcinków o strukturze β , natomiast odcinek o strukturze α -helisy zmienia swoje położenie w zależności od stanu funkcjonalnego kanału warunkowanego istniejącym potencjałem. Na podstawie komputerowej analizy mikroskopowych obrazów kanału VDAC stwierdzono, że ma on postać pustego cylindra o średnicy wewnętrznej 2,4–3 nm (ryc. 1), co pozostaje w zgodzie z wynikami badań opartych na pomiarach jego przepuszczalności dla cząsteczek o różnej masie [10]. Kanał VDAC reprezentuje więc ciekawy przypadek tworzenia szerokiej drogi poprzez błonę przez pojedynczy polipeptyd o stosunkowo niewielkiej masie cząsteczkowej (od 28 do 37 kD) [10, 32].



RYCINA 1. Obraz kryształów kanału VDAC uzyskany za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Kryształy takie powstają w wyniku trawienia zewnętrznej błony mitochondrialnej fosfolipazą A_2 (wg [47] zmodyfikowany).

3. Podstawowe cechy kanału

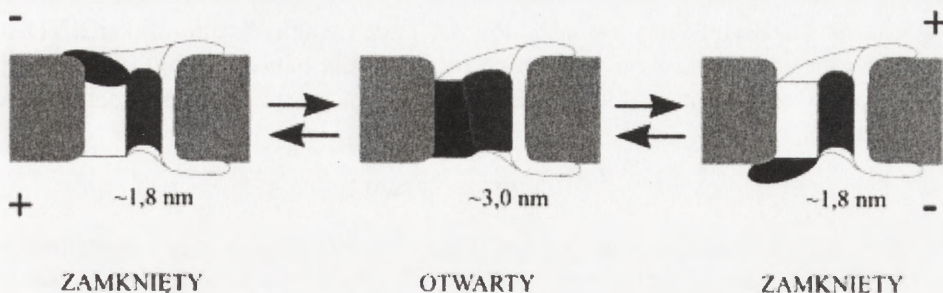
Po rekonstytucji w sztuczne błony lipidowe białko VDAC izolowane z mitochondriów różnych organizmów wykazuje niezwykłą konserwa-

tywność podstawowych parametrów elektrofizjologicznych, tj. wartości przewodnictwa, selektywności i zależności od potencjału [6, 10, 32]. Wartość przewodnictwa pojedynczego kanału w stanie otwartym wyznaczana w tych samych warunkach pomiarowych (po wbudowaniu w sztuczną błonę lipidową rozdzielającą dwa przedziały wypełnione roztworem 1M KCl) wynosi około 4 nS. Trwanie kanału w stanie otwartym wymaga niskiego bądź zerowego potencjału. Zwiększenie przyłożonego potencjału powoduje zamykanie kanałów, co prowadzi do jednoczesnego zmniejszenia przewodnictwa i zmiany selektywności z anionowej na kationową. Kanały jednak nigdy nie zamykają się całkowicie, natomiast istnieją różne stany ich zamknięcia nazywane podstanami zamkniętymi. W podstanie zamkniętym średnica kanału ulega zmniejszeniu o 30–40%, co pociąga za sobą zmniejszenie przewodnictwa.

Zmiana stanu otwarcia kanału pod wpływem czynnika bramkującego wynika z indukowanej tym czynnikiem zmiany konformacyjnej. Cechą charakterystyczną kanałów bramkowanych potencjałem jest obecność czujnika, czyli rejonu przemieszczającego się w polu elektrycznym generowanym przyłożonym potencjałem, co prowadzi do zmiany konformacyjnej. Badania polegające na modyfikacji chemicznej aminokwasów, jak i ukierunkowanej mutagenezie doprowadziły do identyfikacji takiego czujnika w kanale VDAC [10, 72]. W tworzenie czujnika zaangażowany jest stosunkowo duży obszar białka VDAC obejmujący odcinek o strukturze α -helisy na N-końcu i kilka (3–5) odcinków o strukturze β , przy czym większość aminokwasów, których modyfikacja zmienia zależność od potencjału, zlokalizowana jest w obrębie 84 pozycji na N-końcu [72]. Aktualny model działania czujnika w kanale VDAC zakłada, iż w stanie otwartym czujnik wyściela wnętrze kanału, przy czym jego wypadkowy ładunek dodatni zapewnia selektywność anionową. W obecności potencjału czujnik ulega przemieszczeniu na zewnątrz kanału w kierunku ujemnego potencjału, co prowadzi do przejścia kanału w jeden z podstanów zamkniętych charakteryzujących się zredukowaną średnicą kanału i odwróconą selektywnością jonową [45, 72]. Przejście kanału VDAC w podstany zamknięte następuje niezależnie od znaku przyłożonego potencjału, jest więc procesem symetrycznym, co wskazuje na istnienie dwóch niezależnych mechanizmów zamykania kanału VDAC. Co więcej, trwanie kanału w stanie zamkniętym przy zmianie znaku potencjału wymaga jego krótkotrwałego przejścia w stan otwarty [72]. Oznacza to, iż czujnik zmierzając w kierunku ujemnego potencjału może przemieszczać się w obu kierunkach (ryc. 2). Działanie czujnika wydaje się być cechą specyficzną gatunkowo lub tkankowo, jako że dla kanałów VDAC izolowanych z różnych źródeł uzyskuje się różną wartość potencjału, przy której 50% kanałów przechodzi w podstany zamknięte (tzw. V_0) [13]. Różnice w wartości V_0 obserwuje się także w przypadku izoform kanału VDAC [17, 79].

4. Znaczenie fizjologiczne

Istnienie w obrębie danego organizmu izoform kanału VDAC o różnej charakterystyce działania wskazuje na możliwość zróżnicowanej regulacji, jak i funkcji tego kanału. Izoformy kanału VDAC zidentyfikowano w mitochondriach ssaków [8, 67, 71, 79], roślin [17] i drożdży *S. cerevisiae* [9]. Jednakże w przypadku drożdży tylko



RYCINA 2. Model działania czujnika potencjału w kanale VDAC. Czujnik, przedstawiony na rycinie w postaci obszaru koloru czarnego, przemieszcza się z wnętrza kanału (stan otwarty) na zewnątrz w kierunku ujemnego potencjału (podstany zamknięte) (wg [72] zmodyfikowany).

jedna z dwu izoform wykazuje zdolność tworzenia kanału [40] i do tej pory nie udało się wyjaśnić, jaką rolę pełni w mitochondriach drożdży izoforma niezdolna do tworzenia kanału.

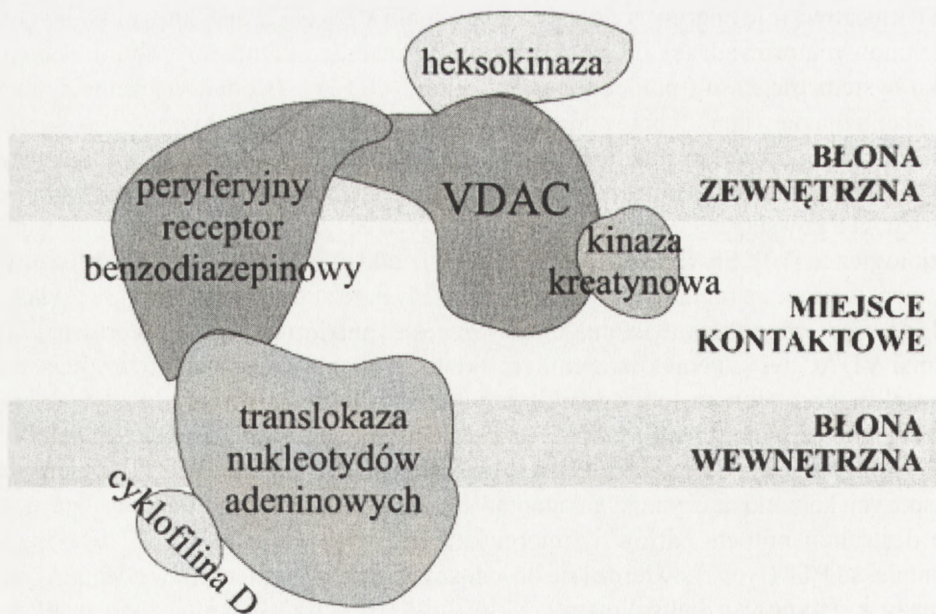
Podstawową funkcją kanału VDAC jest transport metabolitów poprzez zewnętrzną błonę mitochondrialną, przy czym szczególną rolę odgrywa tu jego stan funkcjonalny. Stwierdzono, na przykład, że skuteczny transport ATP, podobnie jak innych metabolitów obdarzonych ładunkiem ujemnym (np. cytrynianu, bursztynianu, fosforanu, glutaminianu), jest możliwy tylko wtedy, gdy kanał VDAC znajduje się w stanie otwartym, charakteryzującym się selektywnością anionową [20, 26, 61, 65]. Ponadto w transporcie ATP kluczową rolę odgrywa oddziaływanie kanału VDAC z translokazą nukleotydów adeninowych prowadzące do powstania funkcjonalnego kompleksu definiowanego jako system transportu nukleotydów adeninowych [21]. Istotne znaczenie w jego działaniu ma prawdopodobnie oddziaływanie kanału VDAC z kinazami: heksokinazą, kinazą kreatynową i kinazą glicerolową [10]. Z drugiej strony oddziaływanie kanału VDAC z kinazami odgrywa znaczną rolę w ich działaniu, ułatwiając między innymi dostęp ATP powstającego w mitochondriach do tych enzymów, co ma ważne implikacje fizjologiczne [10]. Stwierdzono, na przykład, iż oddziaływanie to stanowi kluczowy element w procesie regulacji wydzielania insuliny przez komórki trzustki [32], a także odgrywa prawdopodobnie istotną rolę w procesie transformacji nowotworowej [71]. Kanał VDAC jest również integralnym składnikiem zlokalizowanego w miejscach kontaktu obu błon mitochondrialnych megakanalu, czyli kanału o wysokiej przewodności, nazywanego także kompleksem PTP (*permeability transition pore*) [7, 11, 21, 22, 23, 49, 54, 81]. Otwarcie tego kanału, uruchamiane w warunkach ekspozycji komórki na czynniki proapoptotyczne lub pronekrotyczne, doprowadzić może do destrukcji mitochondriów i śmierci komórki. Obok kanału VDAC w obrębie kompleksu PTP (ryc. 3) stwierdza się obecność translokazy nukleotydów adeninowych, kinazy kreatynowej, heksokinazy, cyklofiliny D oraz zlokalizowanego w błonie zewnętrznej białka określanego mianem peryferyjnego receptora dla benzodiazepin. Ponieważ peryferyjny receptor dla benzodiazepin definiowany jest również jako

kompleks białek, w którym podstawowe znaczenie ma oddziaływanie między kanałem VDAC i translokazą nukleotydów adeninowych, przez niektórych autorów kanał VDAC jest uznawany za składnik peryferyjnego receptora dla benzodiazepin [32]. Istnieją także dane wskazujące na to, iż kanał VDAC stanowi miejsce połączenia mitochondriów z cytoszkieletem [42].

5. Regulacja działania

Modulacja działania kanału VDAC sprowadza się do zmiany jego wrażliwości na potencjał. Na podstawie efektu działania w układach rekonstruowanych oraz w przypadku całych mitochondriów lub błon zewnętrznych, czynniki uczestniczące w regulacji kanału VDAC podzielić można na zmniejszające i zwiększające tę podstawową dla funkcjonowania kanału VDAC zależność [32]. Ze względu na uzyskiwane niekiedy różnice w wynikach dotyczących wpływu badanych czynników w sztucznych błonach lipidowych i w nienaruszonych mitochondriach lub błonach zewnętrznych sugeruje się, że ich działanie może zależeć od środowiska białkowego i lipidowego. Badania dotyczące regulacji działania kanału VDAC są dodatkowo utrudnione przez występowanie jego izoform.

Do czynników zmniejszających wrażliwość na potencjał, tj. zwiększających szansę otwarcia kanału VDAC zalicza się wysokie pH, bezwodnik bursztynianu i wodorotlenki metali trójwartościowych [10, 32] oraz syntetyczne poliaminy (np. spermina i spermidyna) [28]. Zwiększenie zależności od potencjału, tj. zwiększenie szansy zamknięcia kanału VDAC przy niższych jego wartościach wydaje się być zjawiskiem



RYCINA 3. Hipotetyczna struktura kompleksu PTP (megakanalu mitochondrialnego). Przedstawiony model zakłada, iż peryferyjny receptor dla benzodiazepin (PBR) jest pojedynczym białkiem

bardziej istotnym dla regulacji przepuszczalności zewnętrznej błony mitochondrialnej w warunkach *in vivo* [79]. W regulacji tej uczestniczyć może potencjał Donnana powstający w poprzek błony zewnętrznej lub potencjał błony wewnętrznej oddziałujący na kanał VDAC zlokalizowany w obrębie lub poza miejscami kontaktowymi obu błon mitochondrialnych [6]. Zwiększenie zależności od potencjału obserwuje się w obecności niskiej siły jonowej [6], zwiększonego ciśnienia osmotycznego [10], syntetycznych polianionów [10, 32], glutaminianu [20] i makrocząsteczek. Przykładem tych ostatnich mogą być dekstrany o różnej masie cząsteczkowej [10, 32], kwas poliasparginianowy i RNA [10] oraz białka. Czynnikiem zwiększającym wrażliwość kanału VDAC na potencjał jest także NADH w mikromolowym zakresie stężeń [10].

Wśród białek regulujących działanie kanału VDAC najbardziej znany jest tzw. białkowy modulator VDAC, po raz pierwszy wyizolowany z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów *N. crassa* [10]. Białka tego nie udało się dotąd wyizolować w czystej postaci, jednakże częściowo oczyszczone frakcje przestrzeni międzybłonowej mitochondriów różnych organizmów (grzyby, rośliny, ssaki) są zdolne do modulacji działania kanału VDAC w układach rekonstruowanych lub w całych mitochondriach [10, 17, 32]. Nie jest więc wykluczone, że białkowy modulator VDAC stanowić może mieszaninę białek zlokalizowanych w przestrzeni międzybłonowej [17, 44]. Działanie białkowego modulatora VDAC polega na stabilizacji podstanów zamkniętych. Do czynników regulujących to działanie zalicza się fosforylację, wiązanie i uwalnianie metabolitów lub jonów, a także zmiany pH środowiska [32]. Białkowy modulator VDAC może więc stanowić w warunkach *in vivo* istotny regulator kontrolujący przepływ metabolitów przez zewnętrzną błonę mitochondrialną. Ponieważ w układach rekonstruowanych modulator VDAC działa bo obu stronach kanału VDAC, proponuje się także, że modulator ten lub białka o podobnym działaniu zlokalizowane są również w cytoplazmie [10, 44].

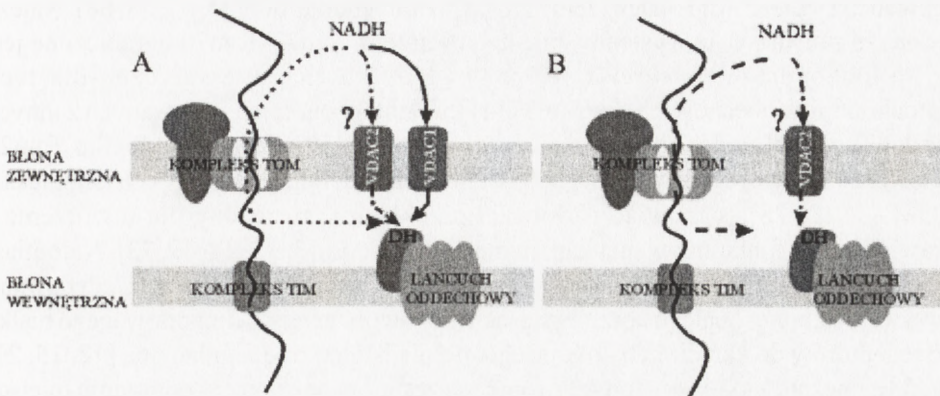
Do białek regulujących działanie kanału VDAC zalicza się także białka należące do rodziny BCL-2, które wykazują działanie pro- lub antyapoptotyczne. Jednakże dostępne dane nie pozwalają na razie na jednoznaczne wyjaśnienie roli tych białek w regulacji kanału VDAC. Obecnie funkcjonują dwa modele poświęcone temu zagadnieniu. Pierwszy z nich zakłada, że białko proapoptotyczne (np. Bax) tworzy z kanałem VDAC kanał oligomeryczny o wysokiej przewodności, natomiast białko antyapoptotyczne (np. Bcl-2) zapobiega jego powstaniu poprzez wiązanie z białkiem Bax [70]. Drugi model uznaje natomiast białko antyapoptotyczne za inhibitor kanału VDAC, a białko proapoptotyczne za czynnik odpowiedzialny za utrzymanie kanału VDAC w stanie otwartym [76, 77]. Ostatnio stwierdzono, że w regulacji kanału VDAC istotną rolę odgrywa także aktyna [80] oraz żelzolina, uznawana za ważny inhibitor apoptozy [37]. Zatem, funkcjonowanie kanału VDAC zależy nie tylko od czynników zewnętrznych, ale także od jego oddziaływań z licznymi białkami mitochondrialnymi i cytoplazmatycznymi, które tym sposobem zyskują istotną rolę w procesie regulacji metabolizmu energetycznego komórki.

Zdolność kanału VDAC do zmiany stanu przewodnictwa jest niezwykle istotna dla fizjologii mitochondriów, a więc także funkcjonowania całej komórki. Jednym z

podstawowych czynników warunkujących przeżycie komórki jest bowiem odpowiednia przepuszczalność zewnętrznej błony mitochondrialnej warunkująca wymianę metabolitów między mitochondriami i cytoplazmą. Ograniczenie przepuszczalności zewnętrznej błony mitochondrialnej wynikające z przejścia kanału VDAC w jeden z podstanów zamkniętych może okazać się więc decydujące dla uruchomienia procesu apoptozy [77]. Na istotną rolę kanału VDAC w indukcji procesu apoptozy wskazuje również zdolność białek rodziny BCL-2 do regulacji stanu otwartego i integralności tego kanału, z czym wiąże się ich działanie pro- lub antyapoptotyczne [21, 23, 77]. Zdolność kanału VDAC do przejścia między stanem otwartym a jednym ze stanów zamkniętych uznaje się także obecnie za istotny mechanizm umożliwiający przetrwanie komórki w warunkach stresu fizjologicznego. Na przykład w warunkach niedoboru tlenu w komórkach obserwuje się zahamowanie wymiany metabolitów między mitochondriami i cytoplazmą [77]. W komórkach drożdży *S. cerevisiae* ograniczenie przepuszczalności kanału VDAC stanowi jedno z kluczowych wydarzeń w procesie adaptacji do zwiększonego stężenia glukozy, polegającej na zasadniczym ograniczeniu szybkości oddychania mitochondrialnego [1]. Podstawową rolę w ograniczeniu przepuszczalności kanału VDAC w tych warunkach odgrywa prawdopodobnie NADH, powstający w wyniku glikolizy.

6. Konsekwencje genetycznego lub fizjologicznego wyłączenia funkcji kanału VDAC

Mimo tak kluczowej roli kanału VDAC w przepuszczalności błony zewnętrznej, udało się skonstruować trzy różne mutanty drożdży *S. cerevisiae* pozbawione tego kanału i mimo to zdolne do wzrostu przy wykorzystaniu jako źródła węgla związku nieutleniającego w procesie glikolizy, co wymaga w pełni funkcjonalnych mitochondriów [9, 16, 51]. W związku z tym pojawiło się oczywiście pytanie, jakie białko lub białka błony zewnętrznej zdolne są do zastąpienia kanału VDAC w mitochondriach mutantów? Odkryty niedawno w mitochondriach drożdży izomer kanału VDAC, nazywany VDAC2, nie może uczestniczyć w transporcie metabolitów przez błonę zewnętrzną, ponieważ pozbawiony jest aktywności kanałowej. Białko to jednakże stanowi skuteczny supresor mutacji kanału VDAC (obecnie VDAC1), kiedy poddane zostanie nadekspresji, co wskazuje na częściowe przejęcie funkcji białka VDAC1 przez białko VDAC2 w natywnych mitochondriach [9, 40]. Ponieważ w błonie zewnętrznej mitochondriów drożdży zidentyfikowano do tej pory tylko jeszcze jeden kanał, stanowiący integralny składnik kompleksu TOM (zostanie on przedstawiony w kolejnym rozdziale artykułu), zaproponowano, iż kanał ten mógłby działać jako zastępcza droga transportu metabolitów przez błonę zewnętrzną przy braku VDAC1 [34, 40, 46]. Ostatnio udało się wykazać, że istotnie w mitochondriach drożdży pozbawionych białka VDAC1 transport NADH przez błonę zewnętrzną prowadzony jest przez kompleks TOM, co jest prawdopodobnie ułatwione przez nadekspresję składników tego kompleksu [33] (ryc. 4). Co więcej, istnieją dane wskazujące na to, że kompleks TOM uczestniczyć może w transporcie metabolitów przez błonę zewnętrzną także w obecności kanału VDAC, w warunkach jego ograniczonej przepuszczalności [4].



RYCINA 4. Schemat udziału kanału kompleksu TOM w transporcie metabolitów przez błonę zewnętrzną mitochondriów *S. cerevisiae* przy braku kanału VDAC lub w warunkach jego ograniczonej przepuszczalności. A – W mitochondriach szczepu dzikiego transport zewnętrznego NADH może zostać częściowo przejęty przez kanał kompleksu TOM, gdy przepuszczalność kanału VDAC (VDAC1) ulegnie ograniczeniu. B – Przy braku kanału VDAC (VDAC1) transport zewnętrznego NADH przez błonę zewnętrzną prowadzony jest głównie przez kanał kompleksu TOM. Funkcja izoformy kanału VDAC (VDAC2) w transporcie metabolitów nie została do tej pory wyjaśniona. DH – dehydrogenaza zewnętrznego NADH

KANAŁ KOMPLEKSU TOM

1. Budowa kompleksu TOM

W sensie strukturalnym kompleks TOM stanowi połączenie podjednostek, których nazwy tworzy się poprzez połączenie skrótu Tom i cyfry stanowiącej przybliżenie masy cząsteczkowej [56], przy czym liczba typów podjednostek w opisanych dotąd kompleksach izolowanych z różnych źródeł jest zmienna. Do najlepiej poznanych należy kompleks TOM wyizolowany z mitochondriów *Neurospora crassa* (6 podjednostek) [3, 38, 41], drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (9 podjednostek) [12, 41] i ziemniaka (7 podjednostek) [29]. Dużo mniej wiadomo na temat budowy kompleksu TOM w mitochondriach ssaków, chociaż udało się zidentyfikować białka stanowiące jego podjednostki [52, 66, 73].

Przy identyfikacji składników kompleksu TOM w nowym materiale stosuje się zawsze porównanie ze wzorcem, za jaki uznano podjednostki tego kompleksu w mitochondriach grzybów (tj. *N. crassa* i *S. cerevisiae*). Na rycinie 5 przedstawiono więc schemat organizacji kompleksu TOM w mitochondriach *S. cerevisiae*. Biorąc pod uwagę funkcje poszczególnych białek tworzących łącznie kompleks TOM wyróżnia się w nim podjednostki, które działają jako receptory dla białek mających ulec importowi oraz podjednostki tworzące kanał translokujący i uczestniczące w jego regulacji. Kanał translokujący kompleksu TOM umożliwia transport importowanych białek przez błonę zewnętrzną lub ich wbudowanie w tę błonę. Białka pełniące funkcje receptorów działają w postaci heterodimerów Tom20-Tom22 i Tom37-Tom70, rozpoznających różne typy

sekwencji sygnałowych białek kierowanych do mitochondriów [35, 57, 58, 68]. Należy jednakże zauważyć, iż występowanie heterodimeru Tom37-Tom70 ograniczone jest do mitochondriów *S. cerevisiae*, ze względu na charakterystyczną dla tych mitochondriów obecność białka Tom37 [41]. W mitochondriach izolowanych z innych źródeł Tom70 prawdopodobnie działa samodzielnie [59]. Co więcej, białko Tom22 pełni także funkcje regulacyjne [50, 78]. Białko Tom40 dominuje ilościowo w kompleksie TOM [3, 12, 38], stanowiąc równocześnie składnik niezbędny dla utworzenia i prawidłowego funkcjonowania kanału translokującego [2, 25, 38, 39, 73]. Natomiast podjednostki o małej masie cząsteczkowej (Tom5, Tom6 i Tom7), mając zdecydowany wpływ na stabilność całego kompleksu, jak i możliwość przejścia importowanego białka od receptorów do kanału translokującego, pełnią istotną rolę regulacyjną [12, 15, 27, 57, 58]. Łącznie z białkiem Tom40 i Tom22 uczestniczą one także w powstaniu miejsca rozpoznającego sekwencje sygnałowe od strony przestrzeni międzybłonowej (tzw. miejsca *trans*), co ma podstawowe znaczenie dla translokacji importowanego białka do wewnątrznych przedziałów mitochondriów [60, 62, 78].

2. Biogeneza białka Tom40, podstawowego składnika kanału

Podobnie jak inne podjednostki kompleksu TOM, białko Tom40 kodowane jest przez genom jądrowy i importowane do mitochondriów. Dostępne dane dowodzą jednak unikatowego mechanizmu kierowania tego białka do mitochondriów, wbudowania w błonę zewnętrzną i włączenia w funkcjonalny kompleks TOM [61]. Białko Tom40 nie zawiera sekwencji sygnałowej na N-końcu i pod tym względem przypomina inne białka błony zewnętrznej. Jednakże wbudowanie Tom40 w błonę zewnętrzną wymaga jego częściowego pofałdowania, co sugeruje, iż informacja umożliwiająca skierowanie Tom40 do błony zewnętrznej powstaje po przyjęciu przez to białko określonej struktury przestrzennej. Wymóg przynajmniej częściowego pofałdowania w procesie wbudowywania białka w błonę stwierdzono także w przypadku poryn bakteryjnych [19]. Taki mechanizm wbudowania w błonę umożliwił prawdopodobnie powstanie struktury β -beczułki, charakterystycznej dla poryn, jak i białka Tom40, chociaż wystąpić może także w przypadku białek o innej strukturze przestrzennej, np. w przypadku translokazy nukleotydów adeninowych [18]. Zawartość struktury β w białku Tom40 jest jednakże niższa niż w białku VDAC [2]. Białko Tom40 importowane jest w postaci monomeru, przy czym istotną rolę w zapoczątkowaniu jego oddziaływań z kompleksem TOM odgrywa receptor Tom20, uczestniczący także w imporcie innych białek błony zewnętrznej, jak i tych, które zawierają sekwencję sygnałową na N-końcu [61, 63]. Po wbudowaniu w błonę białko Tom40 oddziałuje ze składnikami kompleksu TOM, co z kolei zapewnia jego skuteczne włączenie w istniejący kompleks. Istotną rolę w tym procesie odgrywa 20 aminokwasów zajmujących pozycje 41–60 (licząc od N-końca). Aminokwasy te są niezbędne dla włączenia białka Tom40 w kompleks TOM, ale równocześnie nie można ich wykorzystać jako sygnału umożliwiającego włączenie

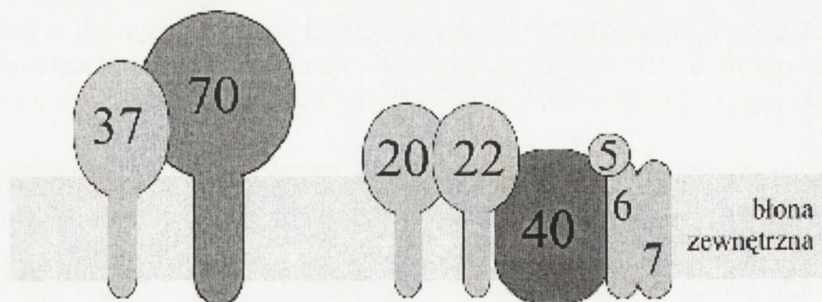
innych białek w ten kompleks. Oznacza to, iż aminokwasy te działają skutecznie tylko w natywnym środowisku białka Tom40. Obecnie funkcjonują dwa modele dotyczące włączania importowanego białka Tom40 w kompleks TOM:

- (i) kompleks TOM uwalnia nowoprowadzane białko Tom40 bezpośrednio do błony, gdzie łączy się ono z innymi cząsteczkami białka Tom40 w niepełnych kompleksach TOM;
- (ii) nowoprowadzane białko Tom40 jest od razu włączane w kompleks TOM.

Istniejące dane wskazują, iż białko Tom40 osiąga końcową strukturę przestrzenną na wczesnych etapach importu, a więc włączenie tego białka w kompleks TOM nie wywołuje poważniejszych zmian jego konformacji.

3. Organizacja molekularna kanału

Masa cząsteczkowa białka Tom40 izolowanego z mitochondriów różnych organizmów wynosi od 36 do 42 kD. Mimo różnic w sekwencji aminokwasowej, widocznych szczególnie przy porównaniu białka Tom40 z *S. cerevisiae* i *N. crassa* z ich odpowiednikiem w mitochondriach roślinnych [29], wszystkie poznane dotąd białka Tom40 wykazują wspólne cechy struktury pierwszorzędowej, co sugeruje podobieństwo struktury przestrzennej. Obowiązujący obecnie model struktury przestrzennej tego białka zakłada istnienie czternastu [48, 58] lub tylko ośmiu do dziesięciu [2] transbłonowych odcinków o strukturze β tworzących łącznie beczułkę β . Jest to więc struktura niezwykle podobna do występującej w przypadku kanału VDAC [55]. W związku z tym pojawia się pytanie, czy kanał translokujący kompleksu TOM może zostać utworzony przez pojedyncze białko Tom40? Dostępne dane wskazują, iż w obrębie kompleksu TOM, białko Tom40 tworzy homooligomer oparty na strukturze dimeru, który jako całość uczestniczy w translokacji importowanego białka. Przyjmuje się więc, że kanał kompleksu TOM tworzony jest przez taki homooligomer [2, 12, 38, 59]. Ponieważ Tom40 jest zdolny do samodzielnego tworzenia kanału [2, 25], inne podjednostki kompleksu TOM pełnią zapewne istotną rolę w jego modulacji, tym bardziej iż aktywność kanałowa kompleksu TOM nie jest identyczna z charakterystyką kanału utworzonego samodzielnie przez białko Tom40 [2, 25, 38, 39]. Zatem, jakie podjednostki kompleksu TOM są niezbędne dla powstania kanału o natywnych właściwościach?



Na podstawie analizy kompleksów TOM izolowanych z mitochondriów *S. cerevisiae* i *N. crassa*, przyjmuje się, iż są to: białko Tom40, transbłonowe odcinki białka Tom22 i podjednostki o małej masie cząsteczkowej [3, 12, 50, 78]. Podjednostki te tworzą łącznie tzw. rdzeń kompleksu TOM [3]. Analiza trójwymiarowych map uzyskanych za pomocą tomografii elektronowej pozwoliła stwierdzić, że ma on postać struktury dwupierścieniowej, co odpowiada obecności dwóch kanałów o średnicy ok. 2 nm (ryc. 6). Pozostaje to w zgodzie z charakterystyką elektrofizjologiczną wskazującą na istnienie w obrębie rdzenia kompleksu TOM dwóch kanałów o sprzężonej aktywności [50]. Podstawową rolę w ich powstaniu odgrywa białko Tom40, które w układach rekonstruowanych tworzy kanały o tej samej średnicy [2, 25], chociaż nie wyklucza się istotnej roli strukturalnej białka Tom22 [3, 12, 38, 50]. Struktura dwupierścieniowa jest charakterystyczna dla rdzenia kompleksu TOM nieuczestniczącego w translokacji białka. Zachodzące podczas translokacji importowanego białka zmiany w oddziaływaniu podjednostek, jak i pojawienie się oddziaływań między rdzeniem kompleksu TOM i importowanym białkiem wymuszają specyficzne zmiany strukturalne. Na przykład translokacja białka w formie częściowo pofałdowanej, obserwowana w przypadku Tom40 [61] lub translokazy nukleotydów adeninowych [18], prowadzi prawdopodobnie do powstania struktury jednopierścieniowej [3]. W przypadku całego kompleksu TOM uzyskano struktury dwu- i trójpierścieniowe, przy czym do tej pory nie jest jasne, czy trzeci pierścień odpowiada trzeciemu kanałowi. Natomiast średnica pierścieni, jak i zawartość białka Tom40 są identyczne z wyznaczonymi dla rdzenia kompleksu TOM [3, 38].

4. Natywne aktywność kanałowa kompleksu TOM

Ponieważ elektrofizjologiczna charakterystyka całego kompleksu TOM jest identyczna z wyznaczoną dla rdzenia kompleksu TOM i nieco odmienna od obserwowanej w przypadku kanału tworzonego wyłącznie przez białko Tom40, przyjmuje się, iż to właśnie rdzeń kompleksu TOM reprezentuje natywną aktywność kanałową [2, 3, 25, 38, 39, 50]. Podstawowe parametry elektrofizjologicznej charakterystyki kanału to wartość przewodnictwa, selektywność jonowa i wrażliwość na potencjał lub inne czynniki modulujące. Rdzeń kompleksu TOM wykazuje wartość przewodnictwa ok. 2,3 nS (w obecności 1 M KCl) i selektywność kationową. W obecności potencjału kanał translokujący przechodzi w podstany zamknięte, przy czym podobnie jak kanał VDAC nigdy nie ulega całkowitemu zamknięciu. Dodatkowo kanał translokujący jest modulowany przez peptydy odpowiadające mitochondrialnym



RYCINA 6. Obraz rdzenia kompleksu TOM uzyskany za pomocą tomografii komputerowej (wg [3] zmodyfikowany)

sekwencjom sygnałowym [39], co pozostaje w zgodzie z udziałem tych sekwencji w zmianach konformacyjnych oligomeru Tom40 [59]. Mitochondrialne sekwencje sygnałowe zmniejszają przepływ jonów przez kanał translokujący w sposób zależny od potencjału, który może działać jako czynnik ułatwiający lub utrudniający ich oddziaływanie z kompleksem TOM. Aktywność kanałowa rdzenia kompleksu TOM zaliczona więc być może do kanałów bramkowanych sekwencją sygnałową [39]. Powyższa charakterystyka jest identyczna z opisaną wcześniej dla kanału PSC (*peptide sensitive channel*) [24, 30], co pozwala wnioskować, iż ta niezidentyfikowana dotąd pod względem białkowym aktywność kanałowa związana jest z kompleksem TOM [39]. Równocześnie nie jest ona identyczna z charakterystyką kanału utworzonego wyłącznie przez białko Tom40 [2, 25], co wskazuje na istotną rolę innych podjednostek kompleksu TOM w działaniu kanału translokującego białka.

5. Znaczenie fizjologiczne

Podstawową funkcją kanału kompleksu TOM jest umożliwienie translokacji importowanego białka przez zewnętrzną błonę mitochondrialną lub jego wbudowanie w tę błonę. Oddziaływania, jakie zachodzą między importowanym białkiem i kanałem translokującym, mają podstawowe znaczenie dla utrzymania tego białka w stanie umożliwiającej translokację [60, 62] i zapobiegają jego agregacji [59]. Równocześnie asymetryczne powinowactwo głównego składnika kanału translokującego, tj. białka Tom40 względem sekwencji sygnałowych prawdopodobnie zabezpiecza odpowiedni kierunek przebiegu procesu importu [25]. Kanał kompleksu TOM może także uczestniczyć w imporcie metabolitów w warunkach ograniczonej przepuszczalności kanału VDAC lub jego braku w mitochondriach [4, 33]. Nie istnieją jednak białka zdolne do przejścia funkcji podjednostek kluczowych dla powstania kanału kompleksu TOM, jako że usunięcie białek Tom40 lub Tom22 uniemożliwia powstanie funkcjonalnych mitochondriów [58] lub, jak to stwierdzono w przypadku białka Tom22, prowadzi do silnego upośledzenia ich funkcji [78].

6. Regulacja aktywności kanałowej kompleksu TOM

Podstawową rolę w regulacji działania kanału kompleksu TOM odgrywają podjednostki wchodzące w skład rdzenia kompleksu (Tom22 i podjednostki o małej masie cząsteczkowej) oraz translokowane białko. Pomimo stwierdzonej w układach rekonstruowanych zależności od potencjału, nie istnieją żadne dane potwierdzające jego istotne znaczenie w warunkach *in vivo* [39].

Oddziaływanie białek Tom40 i Tom22 jest niezwykle stabilne, podczas gdy białka Tom o małej masie cząsteczkowej łączą się z rdzeniem kompleksu TOM nieco słabiej [50]. Obecność białka Tom22, a dokładniej jego domeny transbłonowej zabezpiecza więc integralność rdzenia kompleksu TOM [50, 78]. Przy braku tego białka rdzeń kompleksu TOM rozpada się na mniejsze subkompleksy zawierające dimer białka Tom40 i białka Tom o niskiej masie cząsteczkowej. Subkompleksy te nadal wykazują aktywność kanałową, przy czym prawdopodobieństwo otwarcia kanału w sub-

kompleksie jest dużo wyższe niż w rdzeniu kompleksu TOM. Stąd wniosek, iż Tom22 pełni istotną rolę w mechanizmie bramkowania kanału kompleksu TOM [78]. Domena błonowa białka Tom22 oddziałując z białkiem Tom40 zapewnia prawdopodobnie odpowiednią strukturę przestrzenną oligomerów tworzonych przez Tom40 [59]. Z kolei oddziaływanie Tom40 - odcinki transbłonowe Tom22 wymaga obecności białka Tom6, pełniącego rolę czynnika stabilizującego [12]. Białko Tom6 ułatwia także oddziaływania Tom40 z heterodimerami receptorowymi Tom20-Tom22 i Tom37-Tom70. Natomiast białko Tom7 destabilizuje oddziaływania między Tom40 a heterodimerami receptorowymi i dodatkowo osłabia oddziaływania między białkami Tom20 i Tom22 [57, 58]. Brak białka Tom7 zwiększa więc oddziaływania Tom20-Tom22-Tom40, co ma niewielki wpływ na translokację importowanych białek przez błonę zewnętrzną, utrudnia jednak ich uwalnianie do błony w trakcie translokacji [27]. Białko Tom5, którego obecność stwierdzono na razie tylko w mitochondriach *S. cerevisiae*, nie wpływa na stabilność kompleksu TOM, ale oddziałuje bezpośrednio z importowanymi białkami umożliwiając ich przeniesienie z miejsca wiązania przez receptory do kanału translokującego. Zablockowanie Tom5 przy pomocy specyficznego przeciwciała nie zapobiega więc wiązaniu importowanego białka przez kompleks TOM, ale poważnie utrudnia jego translokację przez błonę zewnętrzną [15]. Białka Tom20 i Tom70, luźno związane z rdzeniem kompleksu TOM i w związku z tym łatwo z niego uwalniane [3, 12, 50, 59], oddziałują z nim przejściowo, co ma kluczowe znaczenie dla przeniesienia importowanego białka z receptorów do kanału translokującego [12, 59]. Jednakże po usunięciu Tom20 i Tom70 rdzeń kompleksu TOM jest nadal zdolny do związania i translokacji importowanego białka, chociaż procesy te zachodzą z niższą wydajnością [12, 60]. Rdzeń kompleksu TOM zawiera bowiem białko Tom22 pełniące funkcję receptora, natomiast Tom20 i Tom70, oddziałując z rdzeniem kompleksu TOM dzięki białku Tom22 [78], zwiększają poziom i specyficzną wiązania importowanych białek, co w konsekwencji prowadzi do zwiększenia szybkości importu około pięciu razy [3, 12].

Jak wspomniano wcześniej, kanał kompleksu TOM zaliczany jest do kanałów bramkowanych sekwencją sygnałową. Dostępne dane sugerują bowiem, iż sekwencja sygnałowa białka kierowanego do mitochondriów jest czynnikiem otwierającym kanał [39, 59]. Z drugiej strony translokacji białka prowadzonej przez kompleks TOM towarzyszy szereg zmian strukturalnych w jego obrębie. Chociaż precyzyjne wyjaśnienie molekularnego mechanizmu bramkowania i translokacji białka nie jest jeszcze możliwe, zaproponowano model wyjaśniający rolę homoooligomeru Tom40 w tych procesach. W modelu tym można wyróżnić trzy podstawowe zmiany konformacyjne:

- (i) przy braku importowanego białka, Tom40 łączy się z innymi cząsteczkami Tom40 i białkiem Tom6 oraz pozostaje w kontakcie z receptorami; szczególnie z Tom22, który może wpływać na strukturę całego oligomeru;
- (ii) związanie importowanego białka z receptorami wywołuje osłabienie oddziaływania Tom40-Tom40 i wzmocnienie oddziaływania Tom40-Tom6, co prawdopodobnie umożliwia rozpoczęcie translokacji importowanego białka dzięki otwarciu kanału;

(iii) związanie importowanego białka z miejscem *trans* nie zmienia oddziaływań Tom40-Tom6, ale prowadzi do dalszego osłabienia oddziaływań Tom40-Tom40 i umożliwia powstanie oddziaływań Tom40-importowane białko, co pozwala na jego dalszą translokację [59].

Powyższy model wskazując na wiązanie importowanych białek z receptorami jako czynnik, wyzwalający zmiany konformacyjne prowadzące do otwarcia kanału, wyjaśnia jednocześnie dlaczego w obecności Tom20 i Tom70 import białka zachodzi z większą szybkością.

PODSUMOWANIE

Kanały błony zewnętrznej nie tylko zapewniają wymianę metabolitów między mitochondriami a resztą komórki i wprowadzenie nowych białek do mitochondriów, ale także zapobiegają niespecyficznemu „przeciekowi” tych cząsteczek. Warunkowana ich obecnością przepuszczalność błony zewnętrznej odgrywa więc istotną rolę w regulacji stanu funkcjonalnego mitochondriów, który z kolei ma podstawowe znaczenie dla możliwości przeżycia komórki. Można więc założyć, iż kanały błony zewnętrznej łącznie z kanałami błony wewnętrznej decydują w znacznym stopniu o „być albo nie być” komórki. Poznanie regulacji aktywności kanałów błony zewnętrznej oraz ich współdziałania w mitochondriach różnych tkanek ssaków może przyczynić się do opisanego molekularnego mechanizmu wielu schorzeń, jak i uzyskania skutecznych środków terapeutycznych.

LITERATURA

- [1] AHMADZADEH M, HORNG A, COLOMBINI M. The control of mitochondrial respiration in yeast: a possible role of the outer mitochondrial membrane. *Cell Biochem Funct* 1996; **14**: 201–208.
- [2] AHTING U, THIEFFRY M, ENGELHARDT H, HEGERL R, NEUPERT W, NUSSBERGER S. Tom40, the pore-forming component of the protein-conducting TOM channel in the outer membrane of mitochondria. *J Cell Biol* 2001; **153**: 1151–1160.
- [3] AHTING U, THUN C, HEGERL R, TYPKE D, NARGANG FE, NEUPERT W, NUSSBERGER S. The TOM core complex: the general import pore of the outer membrane of mitochondria. *J Cell Biol* 1997; **147**: 959–968.
- [4] ANTOS N, STOBIEŃSKA O, BUDZIŃSKA M, KMITA H. Under conditions of insufficient permeability of VDAC1 external NADH may use the TOM complex channel to cross the outer membrane of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *J Bioenerg Biomemb* 2001; **33**: 119–126.
- [5] BAUER MF, HOFMANN S, NEUPERT W, BRUNNER M. Protein translocation into mitochondria: the role of the TIM complexes. *Trends Cell Biol* 2000; **10**: 25–31.
- [6] BENZ R. Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1197**: 167–196.
- [7] BERNARDI P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers and permeability transition. *Physiol Rev* 1999; **79**: 1127–1155.
- [8] BLACHLY-DYSON E, ZAMBROWICZ EB, YU WH, ADAMS V, McCABE ERB, ADELMAN J, COLOMBINI M. Cloning and functional expression in yeast of two human isoforms of the outer mitochondrial membrane channel, the voltage-dependent anion channel. *J Biol Chem* 1993; **268**: 1835–1841.
- [9] BLACHLY-DYSON E, SOND J, WOLFGANAG WJ, FORTE M. Multicopy suppressors of phenotypes resulting from the absence of yeast VDAC-like protein. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 5727–5738.

- [10] COLOMBINI M, BLACHLY-DYSON E, FORTE M, VDAC, a channel in the outer mitochondrial membrane. [w] Narahashi T [red] *Ion Channels* vol 4. New York Plenum Press 1996: 169–202.
- [11] CROMPTON M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999; **341**: 233–249.
- [12] DEKKER PJT, RYAN MT, BRIX J, MÜLLER H, HÖNLINGER A, PFANNER N. Preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: molecular dissection and assembly of the general import pore complex. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 6515–6524.
- [13] DE PINTO V, LUDWIG O, KRAUSE J, BENZ R, PALMIERI F. Porin pores of mitochondrial outer membranes from high and low eukaryotic cells: biochemical and biophysical characterization. *Biochim Biophys Acta* 1987; **894**: 109–119.
- [14] DĘBSKA G, KICIŃSKA A, SKALSKA J, SZEWCZYK A. Intracellular potassium and chloride channels: An update. *Acta Biochim Pol* 2001; **48**: 137–144.
- [15] DIETMEIER K, HÖNLINGER A, BOMER U, DEKKER PJ, ECKERSORN C, LOTTSPEICH F, KUBRICH M, PFANNER N. Tom 5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore. *Nature* 1997; **388**: 121–122.
- [16] DIHANICH M, SUDA K, SCHATZ G. A yeast lacking mitochondrial porin is respiratory deficient, but can recover respiration with simultaneous accumulation of an 86-kDa extramitochondrial protein. *EMBO J* 1987; **6**: 723–728.
- [17] ELKELES A, BREIMAN A, ZIZI M. Functional differences among wheat voltage-dependent anion channel (VDAC) isoforms expressed in yeast. *J Biol Chem*. 1997; **272**: 6252–6260.
- [18] ENDRES M, NEUPERT W, BRUNNER M. Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the Tim 22-54 complex. *EMBO J* 1999; **18**: 3214–3221.
- [19] EPPENS EF, NOUWEN N, TOMMASSEN J. Folding of a bacterial outer membrane protein during passage through the periplasm. *EMBO J*. 1997; **16**: 4295–4301.
- [20] GINCEL D, SILBERBERG SD, SHOSHAN-BARMATZ V. Modulation of the voltage-dependent anion channel (VDAC) by glutamate. *J Bioenerg Biomembr* 2000; **32**: 571–583.
- [21] GOTTLIEB RA. Mitochondria: execution central. *FEBS Lett* 2000; **482**: 6–12.
- [22] GRĄDZKA A. Apoptoza: decyzja należy do mitochondrium. *Post Biochemii* 2000; **46**: 2–16.
- [23] GROSS A, McDONNELL JM, KORSMEYER SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999; **13**: 1899–1911.
- [24] HENRY JP, JUIN P, VALLETTE F, THIEFFRY M. Characterization and function of the mitochondrial outer membrane peptide-sensitive channel. *J Bioenerg Biomembr* 1996; **28**: 101–108.
- [25] HILL K, MODEL K, RYAN MT, DIETMEIER K, MARTIN F, WAGNER R, PFANNER N. Tom 40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins. *Nature* 1998; **395**: 516–521.
- [26] HODGE T, COLOMBINI M. Regulation of metabolite flux through voltage-gating of VDAC channels. *J Membr Biol* 1997; **157**: 271–279.
- [27] HÖNLINGER A, BÖMER U, ALCONADA A, ECKERSKORN C, LOTTSPEICH F, DIETMEIER K, PFANNER N. Tom 7 modulates the dynamics of the mitochondrial outer membrane translocase and plays a pathway-related role in protein import. *EMBO J* 1996; **15**: 2125–2137.
- [28] HORN A, REYMANN S, THINNES FP. Studies on human porin. XVI: Polyamines reduce the voltage dependence of human VDAC in planar lipid bilayers – spermine and spermidine inducing asymmetric voltage gating on the VDAC channel. *Mol Genet Metab* 1998; **63**: 239–242.
- [29] JÄNSCH J, KRUFFT V, SCHMITZ UK, BRAUN HP. Unique composition of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane from plants. *J Biol Chem* 1998; **273**: 17251–17257.
- [30] JUIN P, THIEFFRY M, HENRY JP, VALLETTE FM. Relationship between the peptide-sensitive channel and mitochondrial outer membrane protein translocation machinery. *J Biol Chem* 1997; **272**: 6044–6050.
- [31] KICIŃSKA A, DĘBSKA G, KUNZ W, SZEWCZYK A. Mitochondrial potassium and chloride channels. *Acta Biochim Pol* 2000; **47**: 541–551.
- [32] KMITA H, MICHEJDA J. Poryna mitochondrialna – kanał VDAC. *Post Biol Kom* 1994; **21**, 431–459.
- [33] KMITA H, BUDZIŃSKA M. Involvement of the TOM complex in external NADH transport into yeast mitochondria depleted of mitochondrial porin1. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1509**: 86–94.
- [34] KMITA H, STOBIENIA O, MICHEJDA J. The access of metabolites into yeast mitochondria in the presence and absence of the voltage dependent anion selective channel (YVDAC1). *Acta Biochim Pol* 1999; **46**: 991–1000.
- [35] KOEHLER CM. Protein translocation pathways of the mitochondrion. *FEBS Lett* 2000; **476**: 27–31.
- [36] KRIMMER T, RAPAPORT D, RYAN MT, MEISINGER C, KASSENBRÖCK CK, BLACHLY-DYSON E, FORTE M, DOUGLAS MG, NEUPERT W, NARGANG FE, PFANNER N. Biogenesis of porin of the outer mitochondrial membrane involves an import pathway via receptors and the General Import Pore of the TOM complex. *J Cell Biol* 2001; **152**: 289–300.

- [37] KUSANO H, SHIMIZU S, KOYA RC, FUJITA H, KAMADA S, KUZUMAKI N, TSUJIMOTO Y. Human gelsolin prevents apoptosis by inhibiting apoptotic mitochondrial changes via closing VDAC. *Oncogene* 2000; **19**: 4807–4814.
- [38] KÜNKELE KP, HEINS S, DEMBOWSKI M, NARGANG FE, BENZ R, THIEFFRY M, WALZ J, LILL R., NUSSBERGER S, NEUPERT W. The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell* 1998; **93**: 1009–1019.
- [39] KÜNKELE KP, JUIN P, POMPA C, NARGANG FE, HENRY JP, NEUPERT W, LILL R, THIEFFRY M. The isolated complex of the translocase of the outer membrane of mitochondria. *J Biol Chem* 1998; **273**: 31032–31039.
- [40] LEE AC, XU X, BLACHLY-DYSON E, FOTE M, COLOMBINI M. The role of yeast VDAC genes on the permeability of the mitochondrial outer membrane. *J Membr Biol* 1998; **161**: 173–181.
- [41] LILL R, NEUPERT W. Mechanisms of protein import across the mitochondrial outer membrane. *Trends Cell Biol* 1996; **6**: 56–61.
- [42] LINDEN M, KARLSSON G. Identification of porin as a binding site for MAP2. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **218**: 833–836.
- [43] LITHGOW T. Targeting of proteins to mitochondria. *FEBS Lett* 2000; **476**: 22–26.
- [44] LIU MY, TORGRIMSON A, COLOMBINI M. Characterization and partial purification of the VDAC-channel-modulating protein from calf liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1185**: 203–112.
- [45] MANNELLA CA. Minireview: On the structure and gating mechanism of the mitochondrial channel, VDAC. *J Bioenerg Biomembr* 1997; **49**: 525–531.
- [46] MANNELLA CA. Conformational changes in the mitochondrial channel protein, VDAC, and their functional applications. *J Struct Biol* 1998; **121**: 207–218.
- [47] MANNELLA CA, GUO XW. Interaction between the VDAC channel and a polyanionic effector. *Biophys J* 1990; **57**: 23–31.
- [48] MANNELLA CA, NEUWALD AF, LAWRENCE CE. Detection of likely transmembrane β -strand regions in sequences of mitochondrial pore proteins using the Gibbs sampler. *J Bioenerg Biomembr* 1996; **28**: 163–169.
- [49] MARZO I, BRENNER C, ZAMZAMI N, SUSIN SA., BEUTNER G, BRDICZKA D, REMY R, XIE ZH, REED JC, KROEMER G. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2 related proteins. *J Exp Med* 1998; **187**: 1261–1271.
- [50] MEISINGER C, RYAN MT, HILL K, MODEL K, LIM JH, SICKMANN A, MÜLLER H, MEYER HE, WAGNER R, PFANNER N. Protein import channel of the outer mitochondrial membrane: a highly stable Tom40-Tom22 core structure differentially interacts with preproteins, small Tom proteins and import receptors. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 2337–2348.
- [51] MICHEJDA J, GUO XJ, LAUQUIN GJM. The respiration of cells and mitochondria of porin-deficient yeast mutants is coupled. *Biochim Biophys Res Commun* 1990; **171**: 354–361.
- [52] MORI M, TERADA K. Mitochondrial protein import in animals. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1403**: 12–27.
- [53] NEUPERT W. Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 1997; **66**: 863–917.
- [54] O'ROURKE B. Pathophysiological and protective roles of mitochondrial ion channels. *J Physiol* 2000; **529**: 23–36.
- [55] PAULSEN IT, SLIWINSKI MK, NELISSEN B, GOFFEAU A, SAIER Jr MH. Unified inventory of established and putative transporters encoded within the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 1998; **430**: 116–125.
- [56] PFANNER N, DOUGLAS MG, ENDO T, HOOGENRAAD NJ, JENSEN RE, MEIJER M, NEUPERT W, SCHATZ G, SCHMITZ UK, SHORE GC. Uniform nomenclature for the protein transport machinery of the mitochondrial membranes. *Trends Biochem Sci* 1996; **21**: 51–52.
- [57] PFANNER N, MEIJER M. Mitochondrial biogenesis: The Tom and Tim machine. *Curr Biol* 1997; **7**: R100–R103.
- [58] PFANNER N, CRAIG EA, HÖNLINGER A. Mitochondrial preprotein translocase. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997; **13**: 25–51.
- [59] RAPAPORT D, KÜNKELE KP, DEMBOWSKI M, AHTING U, NARGANG FE, NEUPERT W, LILL R. Dynamics of the Tom complex of mitochondria during binding and translocation of preproteins. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 5256–5262.
- [60] RAPAPORT D, MAYER A, NEUPERT W, LILL R. *Cis* and *trans* sites of the TOM complex of mitochondria in unfolding and initial translocation of preproteins. *J Biol Chem* 1998, **273**: 8806–8813.
- [61] RAPAPORT D, NEUPERT W. Biogenesis of Tom 40, core component of the TOM complex of mitochondria. *J Cell Biol* 1999; **146**: 321–331.

- [62] RAPAPORT D, NEUPERT W, LILL R. Mitochondrial protein import. Tom40 plays a major role in targeting and translocation of preproteins by forming a specific binding site for presequence. *J Biol Chem* 1997; **272**: 18725–18731.
- [63] RAPAPORT D, TAYLOR RD, KÄSER M, LANGER T, NEUPERT W, NARGANG FE. Structural requirements of Tom40 for assembly into preexisting TOM complex of mitochondria. *Mol Biol Cell* 2001; **12**: 1189–1198.
- [64] ROSTOVSTSEVA T, COLOMBINI M. ATP flux is controlled by a voltage-gated channel from the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 1996; **271**: 28006–28008.
- [65] ROSTOVSTSEVA T, COLOMBINI M. VDAC channels mediate and gate the flow of ATP: implications for regulation of mitochondrial function. *Biophys J* 1997; **72**: 1954–1962.
- [66] SAEKI K, SUZUKI H, TSUNEOKA M, MAEDA M, IWAMOTO R, HASUWA H, SHIDA S, TAKAHASHI T, SAKAGUCHI M, ENDO T, MIURA Y, MEKADA E, MIHARA K. Identification of mammalian Tom 22 as a subunit of the preprotein translocase of the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 2000; **275**: 31996–32002.
- [67] SAMPSON MJ, LOVELL RS, CRAIGEN WJ. The mouse VDAC gene family: Conserved structure and function. *J Biol Chem* 1997; **272**: 18966–18973.
- [68] SCHATZ G. The protein import system of mitochondria. *J Biol Chem* 1996; **271**: 31763–31766.
- [69] SCHLEIFF E, SILVIUS JR, SHORE GC. Direct membrane insertion of voltage-dependent anion-selective channel protein catalyzed by mitochondrial Tom 20. *J Cell Biol* 1999; **145**: 973–978.
- [70] SHIMIZU S, IDE T, YANAGIDA T, TSUJIMOTO Y. Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. *J Biol Chem* 2000; **275**: 12321–12325.
- [71] SHINOHARA Y, ISHIDA T, HINO M, YAMAZAKI N, BABA Y, TERADA H. Characterization of porin isoforms expressed in tumor cells. *Eur J Biochem* 2000; **267**: 6067–6073.
- [72] SONG J, MIDSON C, BLACHLY-DYSON E, FORTE M, COLOMBINI M. The sensor regions of VDAC are translocated from within the membrane to the surface during the gating processes. *Biophys J* 1998; **74**: 2926–2944.
- [73] SUZUKI H, OKAZAWA Y, KOMIYA T, SAEKI K, MEKADA E, KITADA S, ITO A, MIHARA K. Characterization of rat Tom 40, a central component of the preprotein translocase of the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 2000; **275**: 37930–37936.
- [74] SZEWCZYK A, MARBAN E. Mitochondria: a new target for K⁺ channel openers? *Trends Pharmacol Sci* 1999; **20**: 157–161.
- [75] TOKATLIDIS K, SCHATZ G. Biogenesis of mitochondrial inner membrane proteins. *J Biol Chem* 1999; **274**: 35285–35288.
- [76] VANDER HEIDEN MG, CHANDEL NS, SCHUMACKER PT, THOMPSON OB. Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol Cell* 1999; **3**: 159–167.
- [77] VANDER HEIDEN MG, CHANDEL NS, LI XX, SCHUMACKER PT, COLOMBINI M. Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 4666–4671.
- [78] Van WILPE S, RYAN MT, HILL K, MAARSE AC, MEISINGER C, BRIX J, DEKKER PJ, MOCZKO M, WAGNER R, MEIJER M, GUIARD B, HÖNLINGER A, PFANNER N. Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase. *Nature* 1999; **401**: 485–489.
- [79] XU X, DECKER W, SAMPSON MJ, CRAIGEN WJ, COLOMBINI M. Mouse VDAC isoforms expressed in yeast: channel properties and their roles in mitochondrial outer membrane permeability. *J Membr Biol* 1999; **170**: 89–102.
- [80] XU X, FORBES JG, COLOMBINI M. Actin modulates the gating of *Neurospora crassa* VDAC. *J Membr Biol* 2001; **180**: 73–81.
- [81] ZAMZAMI N, BRENNER C, MARZO I, SUSIN SA, KROEMER G. Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl2-like oncoproteins. *Oncogene* 1998; **16**: 2265–2282.

Redaktor prowadzący – Lilla Hryniewiecka

Otrzymano: 05.09. 2001 r.

Przyjęto: 06.11.2001 r.

60-701 Poznań, ul. Fredry 10.

e-mail: kmita@main.amu.edu.pl

GENETYCZNA REGULACJA TRANSPORTU I METABOLIZMU MIEDZI*

GENETIC REGULATION OF COPPER TRANSPORT AND METABOLISM

Małgorzata LENARTOWICZ

Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński,
Kraków

Streszczenie: Wyniki wieloletnich badań potwierdziły niezbędność obecności miedzi dla prawidłowego wzrostu i metabolizmu komórek wszystkich żywych organizmów. Zarówno niedobór, jak i nadmiar tego pierwiastka jest szkodliwy dla roślin i zwierząt. Z tego powodu organizmy wykształciły precyzyjny i podlegający kontroli genetycznej mechanizm regulujący stężenie miedzi wewnątrz komórki. Obserwacje organizmów modelowych, takich jak: bakterie, drożdże czy mutantów zwierząt wyższych oraz ludzi z genetycznym defektem w metabolizmie miedzi, doprowadziły do odkrycia dwóch grup białek biorących udział w transporcie tego pierwiastka. Jedną stanowią ATPazy niezbędne do utrzymania stałego stężenia kationów miedziowych w komórkach organizmów pro- i eukariotycznych. Drugą, nowo odkrytą grupą białek biorących udział w transporcie miedzi w obrębie komórki są tak zwane metalochaperony. Wiążą one kationy miedziowe pobrane przez komórkę i dostarczają do odpowiednich organelli.

Słowa kluczowe: metabolizm miedzi, ATPazy typu P, transport kationów miedziowych.

Summary: The results obtained for many decades indicate that copper is an essential element for normal growth and metabolism of all living organisms. Both deficiency and excess of this element are harmful for plants and animals. That is why living organisms have developed a precise and genetically-controlled mechanism which regulates the concentration of this element in the cells. When the model organisms (bacteria, yeast) and mutants of higher animals, as well as human patients with

*Obecna praca jest finansowana z DS Zakładu Genetyki i Ewolucjonizmu (DS/IZ/ Genetyka/2000)

genetic defect in copper metabolism were analysed, two groups of protein involved in copper transport and metabolism were found. Those proteins are: 1) two types of P-type ATPases necessary for maintaining cellular copper homeostasis in pro- and eucariotes. 2) metallochaperones, which bound the metal molecules and deliver to cellular organelles when the copper is incorporated into structure of the copper-dependent enzymes or nonenzymatic proteins.

Key words: copper metabolism, P-type ATPases, copper cations transport.

WSTĘP

Wiadomo, że jony metali są niezbędne dla prawidłowego metabolizmu i wzrostu każdej komórki, przykładem takiego metalu jest miedź. Już 2000 lat temu ludzie znali jej wpływ na żywe organizmy, a szczególnie jej toksyczne działanie i wykorzystywali związki miedzi jako składniki leków lub trucizn [46]. Dopiero jednak prace prowadzone na zwierzętach laboratoryjnych w pełni udokumentowały niezbędność tego pierwiastka dla prawidłowego przebiegu procesów metabolicznych.

Miedź jest metalem należącym do grupy pierwszej pobocznej układu okresowego i dzięki swoim zdolnościom oksydo-redukcyjnym pełni rolę kofaktora w wielu reakcjach enzymatycznych zachodzących w komórkach żywych organizmów. Obecnie znanych jest około 30 różnych białek enzymatycznych i nieenzymatycznych zawierających w swoim składzie atomy miedzi [8, 45]. Do najważniejszych enzymów zawierających w swoim składzie atomy miedzi należą oksydaza cytochromowa i dysmutaza ponadtlenkowa, hydroksylaza β -dopaminy, tyrozynaza czy oksydaza lizylowa. Nie tylko całkowity brak, ale także obniżenie aktywności wymienionych wyżej enzymów, na skutek niedoboru miedzi prowadzi do znacznych zmian patologicznych (co zostało uprzednio omówione w artykule przeglądowym [29]). Metabolizm, a szczególnie transport miedzi pozostawał problemem niewyjaśnionym aż do ostatnich lat naszej dekady. W 1993 roku trzy niezależne laboratoria na świecie odkryły u człowieka gen *ATP7A* kodujący białko biorące udział w aktywnym transporcie miedzi przez błony komórkowe [6, 36, 55], zaś pod koniec lat dziewięćdziesiątych odkryto białka związane z transportem tego pierwiastka [41].

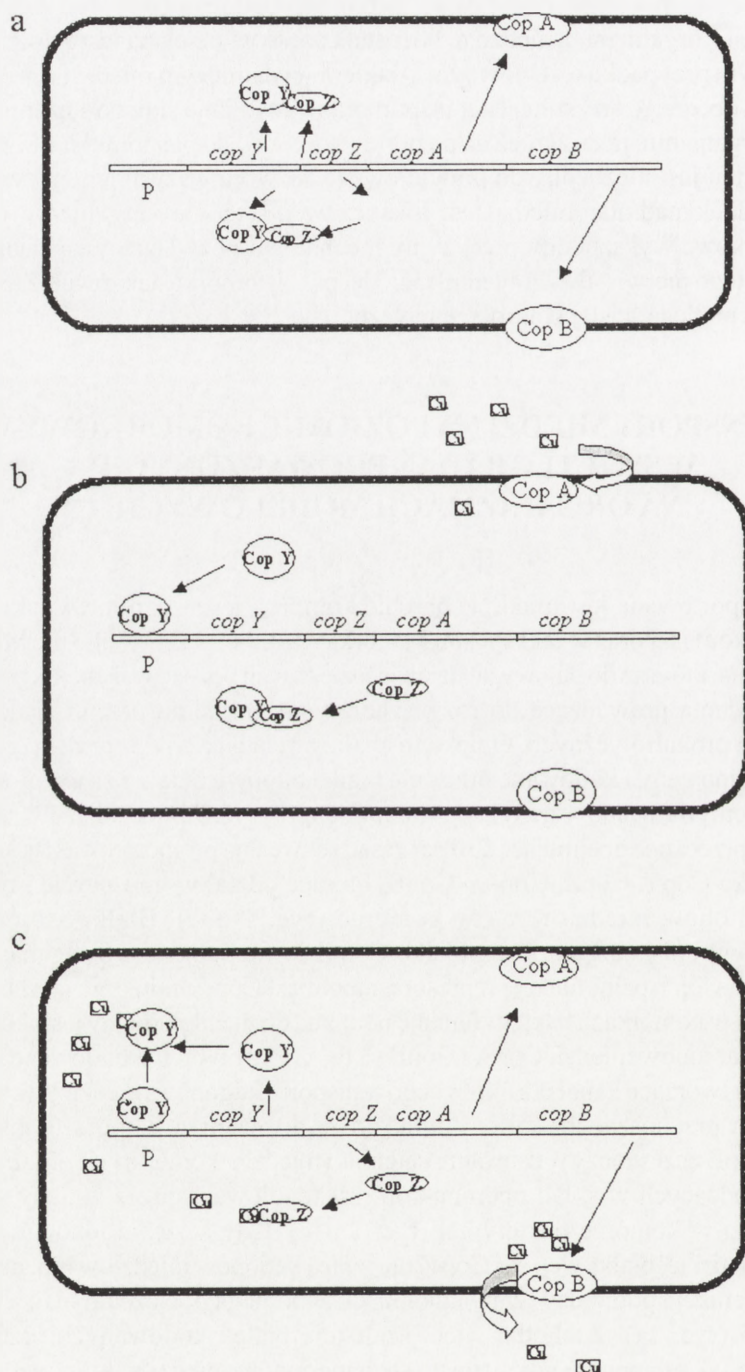
U ssaków kationy miedziowe pochodzące z pokarmu transportowane są aktywnie poprzez ścianę jelita cienkiego do krwioobiegu. Kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy tego pierwiastka w organizmie odgrywa wątroba. Do niej wraz z krwią miedź jest transportowana w pierwszej kolejności w połączeniu z albuminami, a następnie przyłączana do syntetyzowanych tam białek, np. ceruloplazminy czy metalotioneiny [1, 11]. W osoczu miedź związana jest głównie z ceruloplazminą – glikoproteina, w której na każdą cząsteczkę białka przypada 6 atomów miedzi [18]. Pozostała część miedzi w osoczu krwi związana jest z albuminami oraz występuje w kompleksie miedź-histydyna [8, 10, 37]. W takiej postaci miedź transportowana jest przez krew do innych tkanek. Miedź usuwana jest z organizmu poprzez nerki oraz

poprzez przewód pokarmowy z żółcią. Tylko niewielki procent tego pierwiastka wydalany jest z organizmu z moczem, pozostała część wydzielana jest z żółcią, która to droga w tym przypadku jest głównym szlakiem wydalniczym miedzi [7, 11].

Tematem obecnego artykułu jest transport oraz utrzymanie stałego stężenia miedzi w obrębie organizmu, jak również na poziomie komórki. Jak wspomniano wcześniej, pierwiastek ten jest niezbędny do prawidłowego rozwoju wszystkich żywych organizmów, jednak nadmiar miedzi jest toksyczny, dlatego też organizmy jedno- i wielokomórkowe wykształciły precyzyjny mechanizm pozwalający na zachowanie homeostazy tego pierwiastka. Pobieranie miedzi przez komórkę, jak również usuwanie jej nadmiaru podlega ścisłej kontroli genetycznej.

TRANSPORT MIEDZI NA POZIOMIE KOMÓRKOWYM W ŚWIELE BADAŃ PROWADZONYCH NA ORGANIZMACH MODELOWYCH

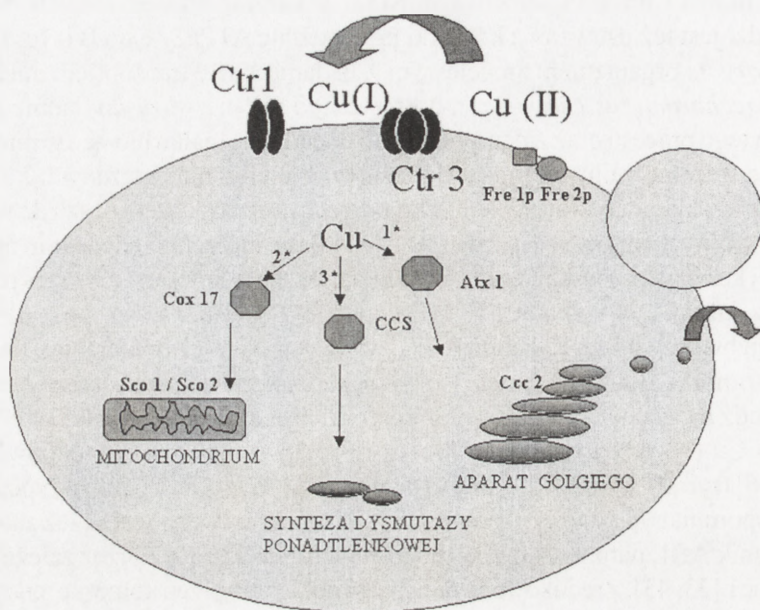
Jak transportowana jest miedź w obrębie komórki, a szczególnie w jaki sposób wchodzi do komórki oraz w jaki sposób komórka reguluje stężenie tego pierwiastka – były to pytania, które aż do połowy lat dziewięćdziesiątych pozostawały bez odpowiedzi. Pierwsze badania prowadzące do rozwiązania tego problemu przeprowadzono na organizmach prokariotycznych. Obiektem analizy była bakteria *Enterococcus hirae*, u której opisano geny i kodowane przez nie białka odpowiedzialne za ten proces [40, 43, 49]. Zidentyfikowano 4 geny: *copY*, *copZ*, *copA* i *copB* pozostające w układzie operonu i poprzedzone obejmującą 530 par zasad sekwencją promotorową (P), kodujące kolejno białka CopY, CopZ, CopA i CopB, biorące udział w transporcie i regulacji stężenia kationów miedziowych w komórce (ryc. 1 a–c). Białko Cop Y (145 aminokwasów) i niskocząteczkowe białko Cop Z (69 aminokwasów) pełnią funkcje regulatorowe. CopY pełni funkcję represora, natomiast Cop Z induktora i jest białkiem spełniającym w komórkach bakterii funkcję podobną do metalotioneiny u ssaków, czyli wiąże nadmiar jonów miedzi. CopA i CopB są to ATPazy typu P wbudowane w błonę komórkową i tworzące kanał dla aktywnego transportu kationów miedziowych. CopA jest białkiem przenoszącym kationy miedziowe do wnętrza komórki bakteryjnej, natomiast CopB uczestniczy w usuwaniu nadmiaru miedzi z komórki [12, 43]. Ekspresja genów wchodzących w skład operonu-cop jest regulowana przez zmiany stężenia jonów miedzi w komórce bakteryjnej (ryc. 1 a–c). Gdy stężenie jonów miedzi w komórce jest niskie, białka Cop Y i Cop Z nie wiążą kationów miedziowych, natomiast zachodzi interakcja pomiędzy tymi białkami, co zapobiega połączeniu białka CopY z promotorem (ryc. 1a). Zachodzi więc produkcja białek kodowanych przez geny operonu-cop. W momencie gdy wzrasta stężenie jonów miedzi w komórce i osiąga ono poziom fizjologiczny, białko CopY łączy się z promotorem hamując syntezę wymienionych białek (ryc. 1b). Gdy stężenie miedzi w komórce osiąga poziom



RYCINA 1. Regulacja transportu miedzi w komórkach prokariotycznych: a – niskie stężenie jonów miedzi w komórce bakteryjnej, b – stężenie jonów miedzi w komórce osiąga stan fizjologiczny, c – wysokie stężenie jonów Cu w komórce

toksyczny, białka Cop Y i Cop Z wiążą nadmiar kationów miedziowych. Nadmiar jonów miedzi jest też usuwany z komórki przy udziale ATPazy Cop B (ryc. 1c) [12].

Dla *Eucaryota* organizmem modelowym w badaniach nad transportem miedzi były drożdże (*Saccharomyces cerevisiae*), u których po raz pierwszy dokładnie opisano mechanizm tego procesu oraz zidentyfikowano dodatkowe białka biorące w nim udział. Porównując stężenie wolnych jonów miedzi (czyli jonów niezwiązanych z żadnymi ligandami) z ich całkowitym stężeniem w komórkach drożdży, uczeni doszli do wniosku, że stężenie wolnych jonów wynoszące 10^{-18} M lokuje mniej niż jeden atom miedzi w pojedynczej komórce, co wskazywało, że pierwiastek ten w komórce cały czas pozostaje związany z jakimiś związkami [41]. Fakt ten był podstawą do poszukiwania i identyfikacji białek wiążących kationy miedziowe w trakcie ich pobierania i transportu w obrębie komórki. Białka takie odkryto tylko u organizmów eukariotycznych (ryc. 2, 3). Aby miedź mogła być pobrana przez komórki drożdży, musi zostać zredukowana (Cu (II) do Cu (I)) przez reduktazy Fre 1p i Fre 2p zlokalizowane na powierzchni komórki [16] (ryc. 2), które kodowane są przez geny *FRE1-FRE7*. Transkrypcja pięciu spośród wspomnianych wyżej genów *FRE2-FRE6* regulowana jest przez zależny od żelaza czynnik Aft1, natomiast dwóch pozostałych *FRE1* i *FRE7* przez zależny od Cu czynnik Mac1 [33, 43]. Zredukowana miedź jest pobierana przez komórkę, co zachodzi przy udziale białek Ctr1 i Ctr3 kodowanych odpowiednio przez geny *CTR1* i *CTR3* [24, 42, 43]. Obydwa z omawianych białek wykazują wysokie powinowactwo do jonów miedzi. Białko Ctr1 składa się z 401 aminokwasów i tworzy oligomer wbudowany w błonę komórkową. W budowie tego białka można wyróżnić trzy domeny transbłonowe z powtarzającym się motywem sekwencji aminokwasów Met – X – Met (X – dowolny aminokwas) charakterystycznym dla sekwencji wiążących jony metali. Białko to bierze udział nie tylko w procesie pobierania kationów miedziowych, lecz również chroni komórkę przed toksycznym działaniem nadmiaru jonów miedzi. W momencie, gdy stężenie jonów miedzi osiąga poziom toksyczny, następuje rozpad białka Ctr1 w błonie komórkowej, co zapobiega dalszemu wzrostowi stężenia kationów miedziowych wewnątrz komórki. Białko Ctr3 składa się z 241 aminokwasów i w swojej budowie ma przypuszczalnie trzy transbłonowe domeny bogate w cysteinę i odpowiadające za przyłączanie kationów miedziowych. U drożdży białka Ctr1 i Ctr3 uczestniczą w pobieraniu kationów miedziowych przez komórkę jako dwa niezależne układy transportujące, co ułatwia wzrost tych komórek nawet na podłożach ubogich w zawartość miedzi [43, 44]. Po wejściu do komórki kationy miedziowe zostają przyłączone do następnej kategorii białek określanych jako białka opiekuńcze – metalochaperony (Atx1, Cox17, CCS), w połączeniu z którymi są transportowane do miejsc syntezy enzymów bądź włączane do szlaku metabolicznego innych białek (ryc. 2). Termin metalochaperony jest stosunkowo nowym określeniem przyjętym dla tej grupy białek, bowiem aż do 1997 roku nie była znana budowa cząsteczek pełniących taką funkcję w komórce. Dotychczas w komórkach organizmów eukariotycznych białka określane tym terminem zostały opisane tylko dla miedzi, trwają jednak prace nad ustaleniem podobnej grupy związków biorących udział w komórkowym transporcie



RYCINA 2. Schemat transportu jonów miedzi w komórce drożdży

innych metali, np. żelaza czy niklu [41]. Przedstawione na rycinie 2 trzy różne szlaki wewnątrzkomórkowego transportu jonów Cu u drożdży obrazują kolejno:

1. W połączeniu z białkiem Atx1 kationy miedziowe transportowane są do cystern aparatu Golgiego, skąd poprzez białko Ccc2, które jest ATPazą typu P [32, 43], mogą być włączane do szlaku metabolicznego innych białek, np. takich, które uczestniczą w transporcie żelaza [9, 43]. W cząsteczce białka Atx1 stwierdzono sekwencję Met-X-Cys-X-X-Cys. Dzięki obecności tej sekwencji możliwy jest transport kationów metalu. Cząsteczka białka Atx1 przyłącza jeden kation miedzi (Cu I) poprzez wiązanie koordynacyjne do dwóch reszt cysteinowych. Struktura czwartorzędowa tego białka umożliwia ochronę atomu metalu przed utleniaczami lub związaniem przez „konkurencyjne” związki, takie jak glutation. Na skutek oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy dodatnio naładowanymi resztami białka Atx1 a ujemnie naładowanymi aminokwasami docelowego białka Ccc2 następuje „przekazanie” kationów miedziowych przez rozpad wiązań koordynacyjnych wiążących miedź z białkiem Atx1 i utworzenie takich wiązań pomiędzy kationami metalu a grupami tiolowymi pochodzącymi z reszt cysteinowych białka Ccc2. W procesie tym białko Atx1 pełni funkcje enzymu obniżającego energię aktywacji

dla jonów miedziowych w trakcie wiązania metalu przez białko Ccc2 [17, 41].

2. Z białkiem Cox17 jony Cu wędrują do mitochondriów, gdzie wbudowywane są w cząsteczki oksydazy cytochromowej [16, 41, 43]. W komórkach drożdży białko Cox17 zlokalizowano w cytoplazmie oraz w przestrzeni międzybłonowej w mitochondriach [23, 42]. Cząsteczka tego białka, zbudowana z 69 aminokwasów, zawiera 6 reszt cysteinowych, zgrupowanych w motywach Cys-Cys-X-Cys [16], do których przyłączane są kationy miedziowe. Jedna cząsteczka białka Cox17 transportuje dwa jony metalu [43]. Dla wbudowania w cząsteczkę oksydazy cytochromowej kationów miedziowych, dostarczonych przez białko Cox17, konieczna jest obecność dwóch innych białek: Sco1 i Sco2. Białka te tkwią w wewnętrznej błonie mitochondrialnej i prawdopodobnie pośredniczą w przekazaniu jonów metalu do cząsteczki enzymu [41].
3. Gdy jony Cu połączą się z białkiem CCS, dostarczane są do cytoplazmy w miejsce, gdzie zachodzi synteza enzymu dysmutazy ponadtlenkowej. Białko CCS ma największą (249 aminokwasów) i najbardziej złożoną cząsteczkę spośród poznanych dotychczas metalochaperonów, składa się bowiem ona z trzech domen [41, 43, 48]. Domena N-końcowa wykazuje wysoką homologię do białka Atx1 i podobnie jak wspomniane białko zawiera sekwencję aminokwasów Met-X-Cys-X-X-Cys wiążącą kationy miedziowe. Jednak okazało się, że obecność tej domeny nie jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania białka CCS, gdyż cząsteczki pozbawione jej zachowywały zdolność do transportu kationów miedziowych [41]. Przypuszcza się, że główną rolą tej domeny jest zwiększenie zdolności do transportu jonów miedzi przez białko CCS w sytuacji niedoboru tego pierwiastka w środowisku. Centralna domena białka CCS ma wysoki stopień podobieństwa do białka docelowego, czyli dysmutazy ponadtlenkowej. W czasie „przekazywania” jonów miedzi do cząsteczki apoenzymu w momencie, gdy dochodzi do formowania heterodimeru pomiędzy białkami CCS a dysmutazą ponadtlenkową, ta właśnie domena wchodzi w interakcję z cząsteczką enzymu. Najmniejsza C-końcowa domena, dzięki sekwencji aminokwasów Cys-X-Cys, przyłącza kationy miedziowe i wspólnie z domeną N-końcową uczestniczy we włączaniu jonów miedziowych do miejsca aktywnego dysmutazy ponadtlenkowej.

Wymienione wyżej białka biorące udział w transporcie Cu są dobrze scharakteryzowane i odgrywają ważną rolę w metabolizmie miedzi u drożdży [43].

Podobne mechanizmy transportu miedzi znaleziono również u ssaków (ryc. 3). U człowieka zidentyfikowano leżące w 9 autosomie geny *hCTR1* i *hCTR2* będące odpowiednikami genów *CTR1* i *CTR3* opisanych wcześniej u drożdży [43, 59]. Ekspresję genu *hCTR1* wykryto we wszystkich tkankach u człowieka, ze szczególnym nasileniem w wątrobie, trzustce, sercu i nerkach [28]. Koduje on białko hCtr1 biorące udział w pobieraniu przez komórki kationów miedziowych. Okazało się, że białko to pełni szczególnie istotną funkcję w pierwszym etapie wchłaniania miedzi w przewodzie pokarmowym, który stanowi przejście Cu z pokarmu do komórek nabłonkowych jelita (ang. *mucosal cells*). Obecnie u myszy odkryto i opisano gen *mCtr1* zlokalizowany w

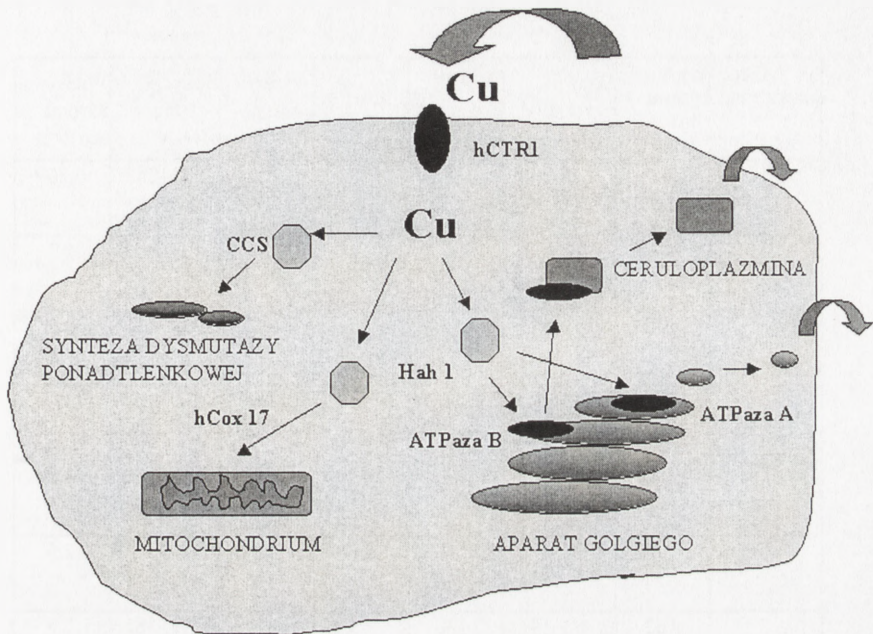
4. autosomie pełniący taką samą funkcję w transporcie miedzi jak ludzki gen *hCTR1* [25]. Ekspresję genu *mCtr1* wykryto już u 7-dniowych zarodków mysich ze szczególnym natężeniem ekspresji tego genu w wątrobie i nerce tych zwierząt [28]. Gen *hCTR2* najwyższą ekspresję przejawiał w komórkach łożyska. Prawdopodobnie bierze on udział w transporcie kationów miedziowych pomiędzy organizmem matki a płodem [43]. Podobnie jak u drożdży, u człowieka, opisano również białka chaperonowe biorące udział w transporcie miedzi w obrębie komórki (ryc. 3). Po wejściu do komórki w zależności od miejsca docelowego transportu kationy miedziowe łączą się ze specyficznymi białkami.

Do miejsca syntezy dysmutazy ponadtlenkowej w komórkach ludzkich miedź transportowana jest w połączeniu z białkiem hCCS [3, 43], do mitochondriów w połączeniu z białkiem hCox17, zaś do aparatu Golgiego przez białko Hah1 [18, 21, 25, 42].

W strukturach Golgiego u ssaków miedź dostarczona przez białko Hah1 przyłączana jest do następnego białka Cu-zależnej ATPazy. W ten sposób może być wprowadzona do szlaku metabolicznego innych białek bądź przy nadmiarze tego pierwiastka usunięta z komórki. Przy wysokim stężeniu jonów miedzi w komórce ATPaza wiążąca kationy miedziowe z aparatu Golgiego, transportowana w formie pęcherzyków włączana jest w błonę komórkową, co umożliwia kationom Cu opuszczenie komórki w drodze transportu aktywnego [19, 20, 43]. W przypadku gdy następuje zaburzenie aktywności tego enzymu w komórce, dochodzi do gromadzenia jonów miedzi aż do osiągnięcia stężenia toksycznego. Takie zaburzenie homeostazy prowadzi do stanów chorobowych organizmu (choroba Menkesa u człowieka, mutacje *mottled* u myszy). Defekt w wymienionych schorzeniach polega na akumulacji miedzi w komórkach nabłonkowych jelita.

GEN *ATP7A* ORAZ JEGO PRODUKT BIAŁKOWY ATPaza TRANSPORTUJĄCA KATIONY MIEDZIOWE

Jedną z przyczyn niedoboru miedzi w organizmie człowieka i zwierząt jest upośledzenie transportu tego pierwiastka spowodowane defektem genetycznym w budowie białka ATPazy typu P. Białko to będące produktem genu *Atp7a*, zlokalizowanego w chromosomie X, bierze udział w aktywnym transporcie kationów miedziowych przez błony komórkowe [14]. U człowieka gen ten zlokalizowany jest w chromosomie X w pozycji Xq13. [55]. Odpowiednikiem genu *ATP7A* u ludzi jest opisany w 1994 roku u myszy gen oznaczony jako *Atp7a* zlokalizowany również w chromosomie X w locus *mottled* [2, 31]. Okazało się, że między mysim genem *Atp7a* a ludzkim genem *ATP7A* istnieje 87% zgodności na poziomie sekwencji kodujących oraz na poziomie sekwencji aminokwasów w białkowym produkcie tych genów [4]. Obecnie znana jest już sekwencja genu kodującego ATPazę przenoszącą kationy miedziowe u



RYCINA 3. Schemat transportu jonów miedzi w komórkach ssaków na przykładzie komórki ludzkiej

człowieka i trzech gatunków ssaków laboratoryjnych: myszy, chomika i szczura [47], a także u *Caenorhabditis elegans* (*CUA-1*), drożdży (oznaczony jako *CCC2*) i niektórych bakterii np. *Enterococcus hirae* (*copA*, *copB*) [12, 58], *Listeria monocytogenes* (*ctpA*) [13].

U myszy wielkość genu *Atp7a* wynosi 120 kbp, składa się on z 23 egzonów, których wielkość waha się od 64 bp (egzon 1) do 726 bp (egzon 4). Sekwencje kodujące tego genu poprzedzielane są 22 intronami o zróżnicowanej wielkości od 209 bp (intron 13) do 40 kbp (intron pierwszy) [4]. W tabeli 1 zilustrowano budowę genu *Atp7a* u myszy.

Bardzo podobną budowę ma występujący u ludzi gen *ATP7A*, w którym poszczególnym egzonom zostały już przypisane podjednostki funkcjonalne kodowanego białka [53, 54]. Stwierdzono tutaj również 23 egzony, których wielkość waha się od 77 do 4120 par zasad, kodon startowy ATG znajduje się w drugim egzonie. Kodon stop TAA znajduje się w egzonie 23. W egzonie tym transkrypcji ulegają tylko 274 zasady, natomiast odcinek około 3800 par zasad nie ulega transkrypcji [15].

Ekspresja genu *Atp7a* zachodzi już u 7-dniowych zarodków mysich w komórkach pnia (*stem cells*) [5]. W późniejszym okresie, u badanych zwierząt, transkrypt genu *Atp7a*, o rozmiarach 8,5 kbp, wykryto we wszystkich organach, z wyjątkiem wątroby

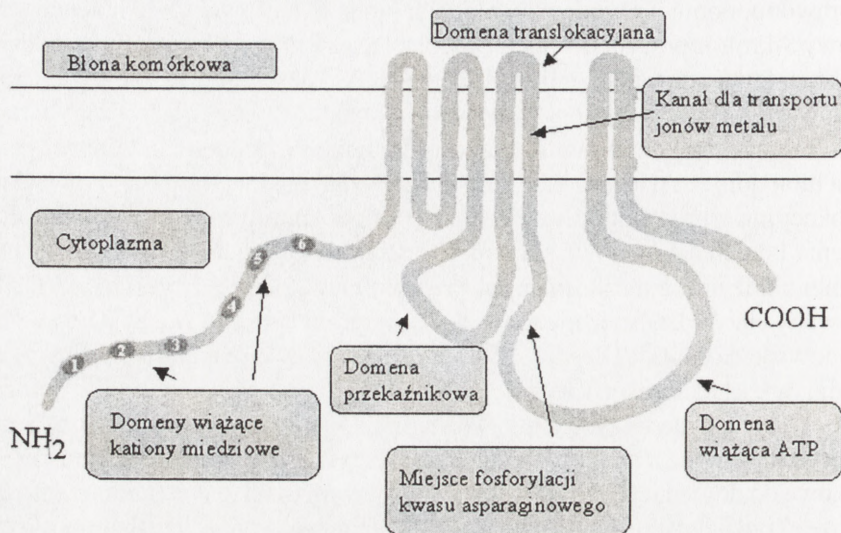
TABELA 1. Wielkość egzonów i intronów w genie *Atp7a*. (wg [4], zmodyfikowane).

Nr egzonu lub intronu	Wielkość egzonu (bp)	Pozycja egzonu w cDNA	Wielkość intronu (kb)	Nr egzonu lub intronu	Wielkość egzonu (bp)	Pozycja egzonu w cDNA	Wielkość intronu (kb)
1	64	64	>40	13	155	2682–2836	0,209
2	138	65–202	20	14	135	2837–2971	>5
3	490	203–692	0,5	15	195	2971–3166	1,6
4	726	693–1418	>5	16	183	3167–3349	3,0
5	180	1419–1598	3,8	17	217	3150–3566	4,0
6	164	1599–1762	2,7	18	147	3567–3713	2,9
7	162	1763–1924	1,4	19	143	3714–3856	1,8
8	77	1925–2001	0,5	20	204	3857–4060	1,0
9	226	2002–2227	1,0	21	118	4061–4178	1,6
10	234	2228–2461	1,3	22	103	4179–4281	0,9
11	92	2462–2553	1,3	23	267+3' UTR	ok. 3,5 kpb	
12	128	2554–2681	0,348				

[35, 38]. Produktem tego genu u myszy jest transbłonowe białko, będące pojedynczym polipeptydem składającym się z 1491 aminokwasów (1500 aminokwasów u człowieka) [53], należące do rodziny ATPaz typu P (ryc. 4) podobnie jak ATPaza wapniowa czy ATPaza sodowo-potasowa. Fizjologiczna rola ATPaz tej klasy polega na utrzymaniu równowagi jonowej w cytoplazmie komórki. W czasie przeprowadzanej reakcji, enzymy te wykorzystują energię powstającą w wyniku hydrolizy ATP. Różne ATPazy typu P pochodzące z różnych organizmów i transportujące różne kationy zbudowane są według tej samej zasady strukturalnej. Są to białka transbłonowe występujące w

błonach plazmatycznych, endoplazmatycznym retikulum, błonach aparatu Golgiego oraz prawdopodobnie również w błonach otoczki jądrowej. Ich łańcuch aminokwasowy 8-krotnie przechodzi przez błonę tworząc 4-hydrofilowe domeny oddzielone od siebie odcinkami transbłonowymi (ryc. 4). ATPazy typu P w budowie łańcucha peptydowego mają wysoce konserwatywne i charakterystyczne dla tej grupy związków odcinki biorące prawdopodobnie bezpośredni udział w procesie katalitycznym [30]. Należą tutaj domena wiążąca ATP, domena zawierająca kwas asparaginowy, domena translokacyjna i przekaźnikowa. W trakcie cyklu katalitycznego dochodzi do wytworzenia kowalencyjnego wiązania między resztą kwasu asparaginowego centrum aktywnego enzymu a resztą fosforanową uwolnioną podczas hydrolizy ATP. Ufosforylowany enzym transportuje jony, po czym reszta fosforanowa zostaje uwolniona do środowiska komórki. Ulegający fosforylacji w trakcie reakcji kwas asparaginowy wchodzi w skład konserwatywnej sekwencji Asp-Lys-Tyr-Gly-Tyr, która jest charakterystyczna dla wszystkich ATPaz typu P [50]. Podniesienie na wyższy poziom energetyczny białka enzymatycznego przekazywane jest poprzez domeny przekaźnikowe do domen wiążących kationy Cu. W wyniku tej reakcji kationy miedziowe w drodze aktywnego transportu poprzez domenę translokacyjną wydalane są z komórki. ATPaza transportująca kationy miedziowe zaliczana jest do wydzielonej z klasy ATPaz typu P, podklasy ATPaz transportujących metale ciężkie typu Cys-Pro-X, gdzie w domenie translokacyjnej konserwatywne reszty proliny otoczone są przez cysteinę. Ten charakterystyczny element budowy odgrywa ważną rolę w transporcie jonów tworząc prawdopodobnie kanał dla przechodzących jonów metalu (patrz ryc. 4, domena translokacyjna, zaznaczono kanał dla transportu jonów z charakterystyczną sekwencją aminokwasów Cys-Pro-Cys) [12]. Innym elementem budowy charakterystycznym dla tej grupy białek jest występowanie w hydrofilowej części N-końcowej jednej lub kilku domen wiążących jony metalu z motywem Gly-Met-Tre-Cys-X-X-Cys. W przypadku mysiego i ludzkiego białka ATPazy, transportującego kationy miedziowe, stwierdzono sześć takich domen (ryc. 4) [14, 52]. U organizmów niższych liczba tych domen jest mniejsza, u bakterii *Enterococcus hirae* znaleziono tylko jedną taką domenę, u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* dwie, a u nicienia *Caenorhabditis elegans* trzy takie domeny. Jest to dowód na to, że ewolucja tego białka szła w kierunku zwiększenia liczby domen wiążących kationy metalu [19]. Domeny wiążące kationy metalu połączone są z domeną przekaźnikową poprzez region łącznikowy oraz dwie domeny transbłonowe. Koniec C omawianego białka zawiera tylko dwie transbłonowe helisy nie zaś cztery jak w innych opisanych ATPazach typu P [12]. W komórce białko to zlokalizowano w aparacie Golgiego [51]. Jednak pod wpływem zwiększającego się stężenia jonów miedziowych, kiedy konieczne staje się usunięcie części z nich z komórki, ATPaza ta transportowana jest z aparatu Golgiego w postaci pęcherzyków i wbudowywana w błonę komórkową. Umożliwia to nadmiarowi jonów miedziowych opuszczenie komórki w wyniku transportu aktywnego.

Innym genem biorącym udział w metabolizmie miedzi jest opisany u człowieka gen *ATP7B* zlokalizowany w 13. parze autosomów w pozycji 13q12-22 [7]. Produktem



RYCINA 4. Schemat budowy białka kodowanego przez gen *Atp7a*, ATPazy typu P, niezbędnej dla utrzymania stałego stężenia kationów miedziowych w komórce (wg [14], zmodyfikowane)

tego genu jest zbudowana z 1411 aminokwasów ATPaza biorąca udział w przyłączeniu kationów miedziowych do ceruloplazminy w czasie syntezy tego białka w wątrobie [39, 51]. Szczególnie silną ekspresję genu *ATP7B* stwierdzono u człowieka w wątrobie i nerkach. Istnieje 60% zgodności w budowie genów oraz białek kodowanych przez gen *ATP7A* i *ATP7B* [56]. Odpowiednikiem ludzkiego genu *ATP7B* u myszy jest gen *Atp7b* zlokalizowany w 8 autosomie.

U ludzi opisano mutacje w wymienionych już genach *ATP7A* (choroba Menkesa) i *ATP7B* (choroba Wilsona) prowadzące do poważnych schorzeń metabolicznych [10, 22]. Modelem zwierzęcym choroby Menkesa u ludzi są myszy z mutacją w genie *Atp7a* w locus *mottled* [34, 57].

PODSUMOWANIE

Miedź jest pierwiastkiem niezbędnym dla prawidłowego wzrostu i rozwoju organizmów zarówno prokariotycznych, jak i eukariotycznych. Dzięki swoim właściwościom oksydo-redukcyjnym pierwiastek ten pełni rolę kofaktora w kluczowych dla organizmu reakcjach enzymatycznych (np. oddychanie, detoksykacja wolnych rodników).

Organizmy żywe wykształciły precyzyjny i podlegający kontroli genetycznej mechanizm regulacji stężenia kationów miedziowych w swoich komórkach. Mechanizm ten obejmuje pobieranie, wewnątrzkomórkowy transport oraz wydalanie nadmiaru tego pierwiastka z komórki. Obecnie znane są trzy klasy białek zaangażowane we wspomniane procesy. Są to błonowe białka uczestniczące w aktywnym pobieraniu kationów miedziowych przez komórki, białka wiążące i transportujące docelowo kationy miedziowe w obrębie komórki (metalochaperony) oraz białka o budowie ATPaz uczestniczące w aktywnym usuwaniu nadmiaru jonów tego pierwiastka. Metalochaperony wykryte tylko u organizmów eukariotycznych stanowią obiekt intensywnych badań prowadzonych w ostatnich latach, a dotyczących głównie oddziaływań między białkami chaperonowymi i białkami transportującymi a białkami docelowymi, do których przyłączane są kationy miedziowe. Poszukiwane są również mutacje w obrębie genów kodujących metalochaperony, gdyż ciekawe będzie opisanie skutków takich mutacji dla organizmu. Dotychczas nie są znane u ludzi jednostki chorobowe wynikające z wspomnianych mutacji.

LITERATURA

- [1] BINGHAM MJ, ONG TJ, INGLEDEW WJ, MCARDLE HJ. ATP-dependent copper transporter in the Golgi apparatus of rat hepatocytes, transports Cu(II) not Cu (I). *Am J Physiol* 1996; G741–G746.
- [2] BROWN SDM, AVNER P, BOYD Y, CHAPMAN V, RASTAN S, SEFTON L, THOMAS JD HERMAN GE. Mouse X chromosome. *Mam Gen* 1993; **4**: S269–281.
- [3] CASARENO RL, WAGGONER D, GITTLIN JD. The copper chaperone CCS directly interacts with copper/zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1998; **273**: 23625–23628.
- [4] CECCHI C, AVNER P. Genomic organization of the mottled gene, the mouse homologue of the human Menkes disease gene. *Genomics* 1996; **37**: 96–104.
- [5] CECCHI C, BISSOTTO M., TOSI M, AVNER P. The mottled mouse as a model for human Menkes disease: identification of mutations in the *Atp7a* gene. *Hum Molec Genet* 1997; **6**: 425–433.
- [6] CHELLY J, TUMER Z, TONNESEN T, PETTERSON A, ISHIKAWA-BRUSH Y, TOMMERUP N, HORN N, MONACO AP. Isolation of the candidate gene for Menkes disease that encodes a potential heavy metal binding protein. *Nature Genet* 1993; **3**: 14–19.
- [7] COX DW. The copper-transporting ATPases defective in Menkes disease and Wilson disease. *Therapeutic uses of trace element ed. Nave et. al. Plenum Press, New York.* 1996; 411–419.
- [8] DANKS DM. Copper deficiency in humans. *Ann Rev Nutr* 1988; **8**: 235–257.
- [9] DE SILVA DM, ASKWITH CC, KAPLAN J. Molecular mechanism of iron uptake in Eucaryotes. *Phys Rev* 1996; **76**: 31–47.
- [10] DIDONATO M, SARKAR B. Copper transport and its alterations in Menkes and Wilson diseases. *Biochim Biophys Acta* 1997; **1360**: 3–16.
- [11] DIJKSTRA M, VONK RJ, KUIPERS F. How does copper get into bile? New insights into the mechanism(s) of hepatobiliary copper transport. *J Hepat* 1996; **24**: 109–120.
- [12] DUDA P, STRAUSAK D, SOLIOZ M. The *Enterococcus hirae* copper ATPases, structure, function and regulation. *Therapeutic uses of trace elements ed. Nave et. al. Plenum Press, New York* 1996; 421–428.

- [13] FRANCIS MS, THOMAS CJ. The *Listeria monocytogenes* gene *ctpA* encodes a putative P-type ATPase involed in copper transport. *Mol Gen Genet* 1997; **253**: 484–491.
- [14] GITSCHIER J, MOFFAT B, REILLY D, WOOD WI, FAIRBROTHER WJ. Solution structure of the fourth metal-binding domain from the Menkes copper-transporting ATPase. *Natur Struct Biol* 1998; **5**: 47–54.
- [15] HARRIS ED. Cellular copper transport and metabolism. *Annu Rev* 2000; **20**: 291–310.
- [16] HORN N, TUMER Z. Molecular genetics of intracellular copper transport. *J Trace Elem Exp Med* 1999; **12**: 297–313.
- [17] HUFFMAN DL, O'HALLOORAN TV. Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. *Annu Rev Biochem* 2001; **70**: 677–701.
- [18] HUNG IH, CASARENO RLB, LABESSE G, MATHWES FS, GITLIN JD. HAH1 is a copper-binding protein with distinct amino acid residues mediating copper homeostasis and antioxidant defense. *J Biol Chem* 1998; **16**: 1749–1754.
- [19] JENSEN PY, BONADER N, HORN N, TUMER Z, FARVER O. Expression, purification and copper-binding studies of the first metal-binding domain of Menkes protein. *Eur J Biochem* 1999; **264**: 890–896.
- [20] JENSEN PY, BONADER N, MOLLER LB, FARVER O. Cooperative binding of copper(I) to the metal binding domains in Menkes disease protein. *Biochem Biophys Acta* 1999; **1434**: 103–113.
- [21] KAKO K, TSUMORI K, OHMASA Y, TAKAHASHI Y, MUNEKATA E. Expression of Cox17p. in rodent tissue and cells. *Eur J Biochem* 2000; **267**: 6699–6707.
- [22] KELLY EJ, PALMITER RD. A murine model of Menkes disease reveals a physiological function of metallothionein. *Nature Genet* 1996; **13**: 219–222.
- [23] KLOMP WL, LIN SJ, YUAN SD, KLAUSNER RD, CULOTTA VC, GITLIN JD. Identification and functional expression of HAH1: a novel human gene involved in copper homeostasis. *J Biol Chem* 1997; **272**: 9221–9226.
- [24] KNIGHT SA, LABBE S, KWON LF, KOSMAN DJ, THIELE DJ. A widespread transposable element masks expression of a yeast copper transport gene. *Genes Dev* 1996; **10**: 1917–1929.
- [25] KUO YM, ZHOU B, COSCO D, GITSCHIER J. The copper transporter CTR1 provides an essential function in mammalian embryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 6836–6841.
- [26] LAU SJ, KRUCK TPA, SARKAR B. A peptide molecule mimicking the copper (II) transport site of human serum albumin. *J Biol Chem* 1974; **249**: 5878–5884.
- [27] LEE HH, HILL GM, SIKHA VKNM, BREWER GJ, PRASAD AS, OWYANG C Pancreatino-biliary secretion of zinc and copper in normal persons and with patients with Wilson's disease. *J Lab Clin Med* 1990; **116**: 283–288.
- [28] LEE J, PROHASKA JR, DAGENAIS SL, GLOVER TW, THIELE DJ. Isolation of a murine copper transporter gene, tissue specific expression and functional complementation of a yeast copper transport mutant. *Gene* 2000; **254**: 87–96.
- [29] LENARTOWICZ M. Myszy z mutacją mottled – model zaburzeń metabolizmu miedzi u ludzi. *Post Hig Med Dośw* 1998; **52**: 527–541.
- [30] LEŚNIAK W, POREMBSKA Z. ATPazy budowa i funkcje. *Polskie Towarzystwo Biochemiczne Warszawa* 1992; 8–33.
- [31] LEVINSON B, VULPE C, ELDER B, MARTIN C, VERLEY F, PACKMAN S, GITSCHIER J. The mottled gene is the mouse homologue of the Menkes disease gene. *Nature Genet* 1994; **6**: 369–373.
- [32] MALMSTROM B, LECKNER J. The chemical biology of copper. *Current Opinion Chem Biol* 1998; **2**: 286–292.
- [33] MARTINAS LJ, JENSEN L, SIMONS JR, KELLER GL, WINGE DR. Metalloregulation of FRE1 and FRE2 homologs in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1998; **273**: 23716–23721.
- [34] MERCER JFB. The molecular basis of copper-transport disease. *Trends Mol Med* 2001; **7**: 64–69.

- [35] MERCER JFB, GRIMES A, AMBROSINI L, LOCKHART P, PAYNTER JA, DIERICK H, GLOVER TW. Mutations in the murine homologue of the Menkes disease gene in dappled and blotchy mice. *Nature Genet* 1994; **6**: 374–378.
- [36] MERCER JFB, LIVINGSTON J, HALL B, PAYNTER JA, BEGY C, CHANDRASEKHARAPPA S, LOCKHART P, GRIMES A, BHAVE M, SIEMIENIAK D, GLOVER TW. Isolation of a partial candidate gene for Menkes disease by positional cloning. *Nature Genet* 1993; **3**: 20–25.
- [37] MILNE D. Assessment of copper nutritional status. *Clin Chem* 1994; **40**: 1479–1484.
- [38] MURATA Y, KODAMA H, ABE T, ISHIDA N, NISHIMURA M, LEWINSON B, GITSHIER J, PACKMAN S. Mutation analysis and expression of the mottled gene in the macular mouse model of Menkes disease. *Pediatric Res* 1997; **42**: 436–442.
- [39] NAGANO K, NAKAMURA K, URAKAMI KI, UEYAMA K, UCHIAMA H, KOIWA K, HATTORI S, YAMAMOTO T, MATSUDA I, ENDO F. Intracellular distribution of the Wilson's disease gene product (ATPase7B) after *in vitro* and *in vivo* exogenous expression in hepatocytes from the LEC rat, an animal model of Wilson's disease. *Hepatology* 1998; **27**: 799–807.
- [40] ODERMATT A, KRAPF R, SALIOZ M. Induction of the putative copper ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *J Biol Chem* 1994; **268**: 12775–12779.
- [41] O'HALLORAN TV, CIZEWSKI CULOTTA V. Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J Biol Chem* 2000; **275**: 25057–25060.
- [42] PENA MMO, KOCH KA, THIELE DJ. Dynamic regulation of copper uptake and detoxification genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 2514–2523.
- [43] PENA MMO, LEE J, THIELE DJ. A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J Nutr* 1999; **129**: 1251–1260.
- [44] PENA MMO, PUIG S, THIELE DJ. Characterization of the *Sacharomyces cervisiae* high affinity copper transporter Ctr3. *J Biol Chem* 2000; **275**: 33244–33251.
- [45] PROHASKA J. Biochemical changes in copper deficiency. *J Nutr Biochem* 1990; **1**: 452–461.
- [46] PROHASKA JR. Neurological roles of copper as antioxidant or prooxidant. In: Metals and oxidative damage in neurological disorders. Ed. Connor Plenum Press, New York; 1997; 57–74.
- [47] QIAN Y, TIFFANY-CASTIGLIONI E, HARRIS ED. Sequence of a Menkes-type Cu-transporting ATPase from rat C6 glioma cells: comparison of the rat protein with other mammalian Cu-transporting ATPases. *Molec Cell Biochem* 1998; **181**: 49–61.
- [48] RINALDI AC. Meeting report – Copper research at the top. *Biomaterials* 2000; **13**: 9–13.
- [49] SALIOZ M, ODERMATT A. Copper and silver transport by CopB-ATPase in membrane vesicles of *Enterococcus hirae*. *J Biol Chem* 1995; **270**: 9217–9221.
- [50] SOLIOZ M, CAMAKARIS J. Acylphosphate formation by the Menkes copper ATPase. *FEBS Lett* 1997; **412**: 165–168.
- [51] SUZUKI M, GITLIN JD. Intracellular localization of Menkes and Wilson disease proteins and their intracellular copper transport. *Pediatr Int* 1999; **41**: 430–435.
- [52] TRENOR III C, LIN W, ANDREWS NC. Novel bacterial P-type ATPases with histidine-rich heavy-metal-associated sequences. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **205**: 1644–1650.
- [53] TUMER Z. Genetics of Menkes disease. *J Trace Elem Exp Med* 1998; **11**: 147–161.
- [54] TUMER Z, VURAL B, TONNESSEN T, CHELLY J, MONACO AP, HORN N. Characterization of the exon structure of the Menkes disease gene using vectorate PCR. *Genomics* 1995; **26**: 437–442.
- [55] VUPLE CH, LEVINSON B, WHITNEY S, PACKMAN S, GITSCHIER J. Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nature Genet* 1993; **3**: 7–13.

- [56] WU J, FORBES JR, CHEN HS, COX DW. The LEC rat has a deletion in the copper transporting Atpase gene homologous to the Wilson disease gene. *Nature Genet* 1994; **7**: 541–545.
- [57] YAMAGUCHI Y, HEINY ME, SUZUKI M, GITLIN JD. Biochemical characterization and intracellular localization of the Menkes disease protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 14030–14035.
- [58] YOSHIMIZU T, OMOTE H, WAKABAYASHI T, SAMBONGI Y, FUTAI M. Essential Cys-Pro-Cys motif of *Caenorhabditis elegans* copper transport ATPase. *Biosci Biotechnol Biochem* 1998; **62**: 1258–1260.
- [59] ZHOU B, GITSCHIER J. *hCTR1*: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 7481–7486.

Redaktor prowadzący – Lilla Hryniewiecka

Otrzymano: 30.07.2001 r.

Przyjęto: 22.11.2001 r.

Adres: ul. R. Ingardena 6, 30-060 Kraków

MECHANIZM DZIAŁANIA I FUNKCJE OKSYTOCYN W CYKLU PŁCIOWYM*

THE MECHANISM OF ACTION AND THE ROLE OF OXYTOCIN IN THE OESTROUS CYCLE

Anita FRAN CZAK, Genowefa KOTWICA

Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Biologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
w Olsztynie

Streszczenie: Oksytocyna uczestniczy w regulacji cyklu płciowego. W pracy przedstawiono syntezę hormonu w różnych narządach organizmu samicy oraz opisano budowę receptora oksytocyny. Scharakteryzowano czynniki wpływające na biosyntezę oraz zmiany gęstości receptorów oksytocyny w tkankach układu rodneg o podczas cyklu płciowego. Szczegółowo opisano udział oksytocyny w regulacji procesu luteolizy z uwzględnieniem różnic gatunkowych u owiec, krów i świń. Przedstawiono wpływ oksytocyny na steroidogenezę w jajniku oraz na kurczliwość macicy i jajowodów.

Słowa kluczowe: oksytocyna, receptory oksytocyny, luteoliza.

Summary: Oxytocin participates in the regulation of the oestrous cycle. The biosynthesis of hormone by different organs in females and structure of oxytocin receptor were described. The factors which regulate the biosynthesis and concentrations of oxytocin receptors in the tissues in the oestrous cycle were presented. It was shown the role of oxytocin during luteolysis in sheep, cows and sows. The influence of oxytocin on ovarian steroidogenesis and motility of uterus and oviduct was also presented.

Key words: oxytocin, oxytocin receptors, luteolysis.

Objaśnienia skrótów: AA – kwas arachidonowy, COX₂ – cyklooksygenaza 2, CRAC (ang. calcium release-activated calcium channel) – kanały wapniowe aktywowane wapniem, DAG – 1,2 diacyloglicerol, E₂ – estradiol-17β, GnRH – gonadoliberyna, IP₂ – inozytolo(1,4)bisfosforan, IP₃ – inozytolo(1,4,5) trisfosforan, OT – oksytocyna, P₄ – progesteron, PGA – monooksygenaza peptydylo-glicyno-α-amidowa, PGE₂ – prostaglandyna E₂, PGF₂α – prostaglandyna F₂α, PGH₂ – endoperoksyd H₂, PIP₂ – fosfatydyloinozytolo(4,5)bisfosforan, PKC – kinaza białkowa C, PLA₂ – fosfolipaza A₂, rOT – receptor

*Praca finansowana w ramach Promotorskiego Projektu Badawczego KBN Nr 5 PO6D 022 18

oksytocyny, **TD** – domena transbłonowa, **VON** (ang. *vasopressin and oxytocin containing nucleus*) – jądro zawierające wazopresynę i oksytocynę.

Oksytocyna (OT) jest hormonem peptydowym, który u samic ssaków powstaje w różnych narządach [24, 82]. Najbogatsze źródło OT stanowią neurony jądra nadwzrokowego i przykomorowego podwzgórza [24]. U świń wykryto w podwzgórzu dodatkowe skupisko neuronów OT-ergiczných – jądro VON (ang. *vasopressin and oxytocin containing nucleus*), położone bocznie od III komory i dogrzbietowo od jądra skrzyżowania [79]. Hormon powstaje w perikarionach neuronów drobno- i wielkokomórkowych wymienionych jąder, a ich aksony, docierające do części nerwowej przysadki, transportują i magazynują peptyd. Pod wpływem potencjału czynnościowego neuronów, OT jest wydzielana z ich zakończeń do krwi i drogą endokrynową działa na obwodowe narządy docelowe. Część aksonów oksytocyno-ergiczných dociera też do pozapodwzgórzowych struktur mózgowia oraz do wyniosłości pośrodkowej i przedniej części przysadki. Pozwala to OT modulować wydzielanie klasycznych neuro-trans-miterów i regulować w ten sposób wiele reakcji behawioralnych [26, 60]. Peptyd wpływa też na sekrecję hormonów z przysadki – hormonu luteinizującego, adrenokortykotropowego i β -endorfiny.

Synteza OT występuje również w jajnikach naczelných, owiec, krów, kóz, świń, jeleni, bawołów i szczurów [24, 25, 53, 67, 82], w macicy świń [7], grasicy człowieka, nadnerczach krów, szczurów, królików i świnek morskich oraz w łożysku i owodni szczurów [24]. Hormon produkowany w tych narządach działa głównie parakrynowo, a z komórek wydzielany jest pod wpływem różnych czynników, w tym – prostaglandyny $F_2\alpha$ ($PGF_2\alpha$), estrogenów i cytokin. U owiec OT, syntetyzowana w dużych stężeniach przez komórki lutealne jajnika i wydzielana do krwi żyły jajnikowej, dociera do pozostałych narządów układu rodnegó, działając na nie w sposób endokrynný [11, 67].

Komórki wymienionych narządów syntetyzują OT w podobny sposób. Gen OT, złożony z 3 eksonów i 2 intronów, znajduje się na 13 chromosomie – pozycja między DIK54 i ETH7 [44]. Produktem ekspresji tego genu jest prohormon, czyli pre-pro-oksytocyno-neurofizyna I (NP I) [23, 24]. W skład tej cząsteczki wchodzi peptyd sygnałowy, oksytocyna, łącznik – Gly-Lys-Arg, białkowy nośnik NP I. Prohormon podlega potranslacyjnym modyfikacjom [23]. W pierwszym etapie, zachodzącym w szorstkim retikulum endoplazmatycznym komórek syntetyzujących OT, odłączany jest peptyd sygnałowy. Powstały produkt gromadzi się w ziarnistościach aparatu Golgiego. W drugim etapie cząsteczka OT oddzielana jest od neurofizyny I. Działa tutaj endopeptydaza i karboksypeptydaza – enzymy rozszczepiające wiązania peptydowe łącznika. Trzeci etap obejmuje oksydacyjną amidację reszty glicyny będącej w 9. pozycji cząsteczki OT. Uczestniczy w tym procesie monoooksygenaza peptydylo-glicyno- α -amidowa (PGA). Aktywność PGA jest zmienna i dlatego potranslacyjne przemiany pro-oksytocyny należą do ważnych czynników regulujących produkcję i sekrecję OT. Końcowym efektem opisanych reakcji jest powstanie biologicznie czynnej OT i NP I.

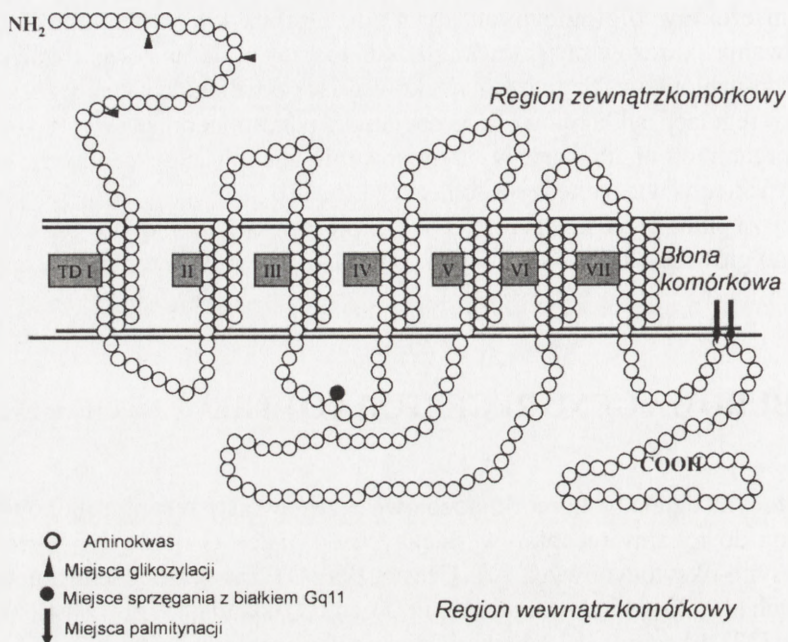
Różnorodność organów, w których zachodzi biosynteza OT, wskazuje na szerokie spektrum efektów biologicznych hormonu. Oprócz klasycznej funkcji OT, tj. powodowania skurczów mięśniówki gładkiej macicy podczas porodu oraz komórek mięśniowo-nabłonkowych gruczołu mlekowego w czasie laktacji, znany jest też udział peptydu w regulacji cyklu rujowego, gospodarki wodno-mineralnej i węglowodanowej, reakcji organizmu na stresory, w warunkowaniu zachowań seksualnych, instynktu macierzyńskiego i więzi międzyosobniczych [26, 60].

Niniejsza praca przedstawia rolę OT i receptorów tego hormonu w regulacji cyklu płciowego głównie na podstawie wyników badań przeprowadzonych u krów, owiec i świń.

BUDOWA GENU RECEPTORA OT I RECEPTORA OT

Oksytocyna działa na komórki docelowe przez swoisty receptor błonowy (rOT). Należy on do rodziny receptorów zależnych od białek G, podrodziny receptorów wazopresyno-oksytocynowych [4]. Cząsteczka rOT zawiera siedem domen transbłonowych [10, 29]. Kodowana jest przez gen rOT składający się z 4 eksonów i 3 intronów [22]. Eksony 1. i 2. obejmują niekodujący region 5'. Ekson 3. koduje część rOT od pierwszej do szóstej domeny transbłonowej. Ekson ten rozpoczyna się 142. parą zasad w kierunku przeciwnym do kodonu inicjującego ATG i składa się z 922 par zasad. Ekson 4. koduje siódmą domenę transbłonową, region C-końcowy oraz cały niekodujący region 3' [19, 28]. Komplementarne DNA (cDNA) rOT sklonowano u ludzi [29], świń [19], owiec [75], bydła [23] i gryzoni [2]. U wymienionych gatunków zwierząt budowa cDNA rOT jest w 90% homologiczna do cDNA rOT człowieka.

Białko receptorowe dla OT zbudowane jest u bydła, owiec i świń, odpowiednio z: 391, 341 i 386 aminokwasów [10]. Cząsteczkę rOT stanowi pojedynczy łańcuch polipeptydowy, uformowany w siedem transbłonowych hydrofobowych domen (TD I – TD VII), które są przedzielone pętlami hydrofilowymi zewnątrz- i wewnątrzkomórkowymi (ryc. 1). Domeny transbłonowe mają postać α -helis. Na zewnątrz błony komórkowej znajduje się N-koniec łańcucha białkowego, natomiast fragment C-końcowy skierowany jest do cytoplazmy. W N-końcowym fragmencie łańcucha występują 3 miejsca glikozylacji przy 8., 15. i 26. aminokwasie. Rola procesu glikozylacji rOT nie jest wyjaśniona. Zniszczenie tych miejsc lub zmiana ich liczby nie wpływa na powinowactwo receptora ani na poziom akumulacji wtórnego przekaźnika. W przypadku receptorów innych hormonów, np. GnRH i wazopresyny, glikozylacja potrzebna jest do ich stabilizacji i internalizacji [83]. W C-końcowym fragmencie receptora znajduje się 7 miejsc fosforylacji, a do dwóch reszt cysteiny w tej części dołączone są reszty kwasu palmitynowego. Proces palmitynacji cząsteczki receptora uczestniczy w utworzeniu jego trzeciorzędowej struktury [19]. Miejsce sprzęgania rOT z białkiem G znajduje się w drugiej pętli wewnątrzkomórkowej. Tworzy je



RYCINA 1. Budowa receptora oksytocyny: TD I–TD VII – domeny transmembranowe (wg [4,10,19], zmodyfikowany)

triplet Asp-Arg-Cys. Wewnątrzcytoplazmatyczna pętla I, między transbłonową domeną TD I i TD II, jest odpowiedzialna za uruchomienie metabolizmu fosfoinozytoli po przyłączeniu OT do receptora [62]. Ligand łączy się z receptorem w miejscu wąskiej bruzdy utworzonej przez transbłonowe domeny od TD II do TD VI. Powstają tutaj wiązania wodorowe między OT i resztami aminokwasów: kwasu glutaminowego w domenie II, IV i VI, lizyny w domenie III oraz fenyloalaniny w I pętli zewnątrzkomórkowej [4].

Podrodzina rOT i receptora wazopresyny typ V_2 ma kilka cech wspólnych. Występuje w tych receptorach unikalny ciąg siedmiu aminokwasów (Phe-Gln-Val-Leu-Pro-Gln-Leu) w końcu II domeny transbłonowej, jedna sekwencja w obrębie I pętli zewnątrzkomórkowej (Gly-Pro-Asp) i dwie sekwencje w obrębie II pętli zewnątrzkomórkowej (Asp-Cys-Trp-Ala i Pro-Trp-Gly). Sekwencje te są powtarzalne, zachowane wyłącznie w obrębie tej podrodziny receptorów i pełnią ważną rolę w rozpoznaniu ligand-receptor [61, 62].

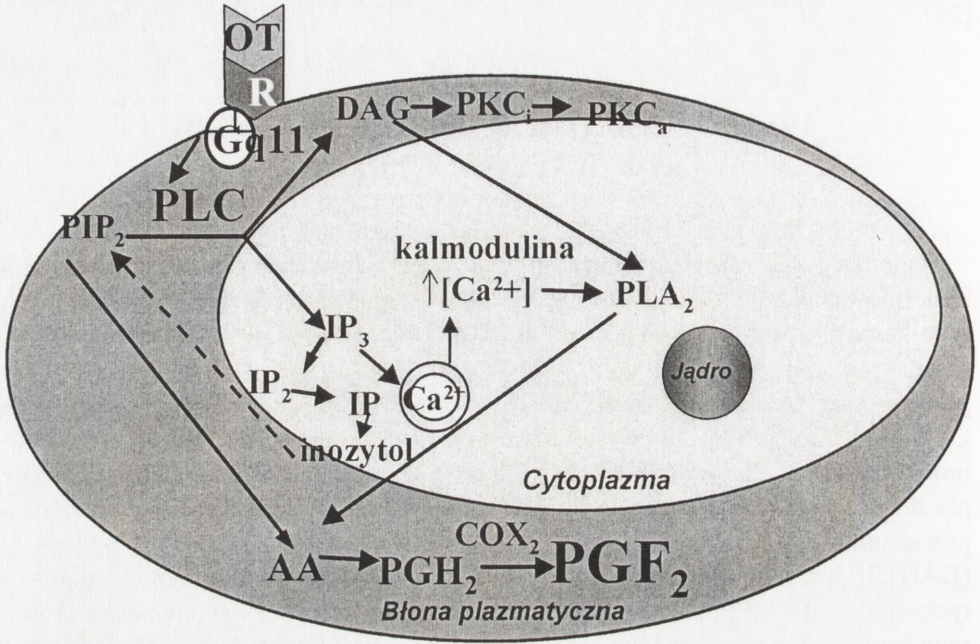
W porównaniu do wazopresyny, której działanie biologiczne warunkowane jest przez receptory: $V_{1\alpha}$, $V_{1\beta}$ i V_2 , rOT nie wykazuje takiego zróżnicowania. W toku ewolucji gen kodujący receptor wazopresyny uległ duplikacji, a następnie mutacji, dlatego występują dwa podtypy tego receptora (V_1 i V_2) wykorzystujące odmienne systemy wtórnych przekaźników [4, 10]. Pomimo stosowania licznych agonistów i antagonistów dla rOT stwierdza się istnienie jednego typu rOT niezależnie od badanej tkanki. Również

wyniki analizy rOT na poziomie molekularnym nie wskazują na istnienie jego podtypów [28].

WEWNĄTRZKOMÓRKOWE PRZEKAŹNIKI WYKORZYSTYWANE PRZEZ ROT

Podczas cyklu rujowego samic główne tkanki docelowe dla OT to śluzówka i mięśniówka układu rodnego. Receptory OT, występujące w błonach plazmatycznych tych komórek, sprzężone są z białkiem G – podtyp G_{q11} [37]. Podczas aktywacji receptora dochodzi do dysocjacji podjednostki G_{α} związanej z GTP od pozostałych podjednostek, tzn. kompleksu $\beta\gamma$ białka G_{q11} . Podjednostka α oddziałuje z fosfolipazą C, jednym z enzymów błony komórkowej. Enzym ten hydrolizuje fosfatydyloinozytolo(4,5)bisfosforan – PIP_2 , znajdujący się w wewnętrznej warstwie błony plazmatycznej, doprowadzając do powstania dwóch odrębnych wewnątrzkomórkowych przekazników informacji: inozytolo(1,4,5)trisfosforanu (IP_3) i 1,2 diacyloglicerolu (DAG). IP_3 przechodzi do cytoplazmy komórki, a DAG pozostaje w błonie plazmatycznej. Powstały IP_3 inaczej działa w komórkach wydzielniczych (śluzówka układu rodnego) w porównaniu do komórek kurczliwych (mięśniówka), natomiast DAG daje podobne efekty biologiczne w obu typach tkanek. W cytoplazmie komórek śluzówki macicy IP_3 powoduje wzrost stężenia jonów Ca^{2+} , wyzwala je z magazynów siateczki sarkoplazmatycznej (ryc. 2). Jony Ca^{2+} łączą się ze swoim wewnątrzkomórkowym receptorem – białkiem kalmoduliną. Kompleks Ca^{2+} -kalmodulina aktywuje fosfolipazę A_2 (PLA_2), enzym, który uwalnia z fosfolipidów kwas arachidonowy (AA), będący substratem dla $PGF_2\alpha$. Z kolei DAG aktywuje kinazę białkową C (PKC), co w rezultacie, przez mechanizm włączający fosfolipazę A_2 , powoduje również uwalnianie $PGF_2\alpha$ [68]. Zatem, fizjologiczną odpowiedzią komórek śluzówki, np. macicy, na działającą na nie OT jest większa synteza i wydzielanie $PGF_2\alpha$ [69, 76]. Potwierdzenie tego mechanizmu użykano w badaniach *in vitro*, przeprowadzonych na skrawkach śluzówki macicy krów, świń i owiec, wykazując wysoce istotną korelację między stężeniem rOT, hydrolizą PIP_2 i sekrecją $PGF_2\alpha$ z tej tkanki [39, 40, 84]. W śluzówce innych narządów np. szyjki macicy, OT może stymulować wydzielanie PGE_2 [17].

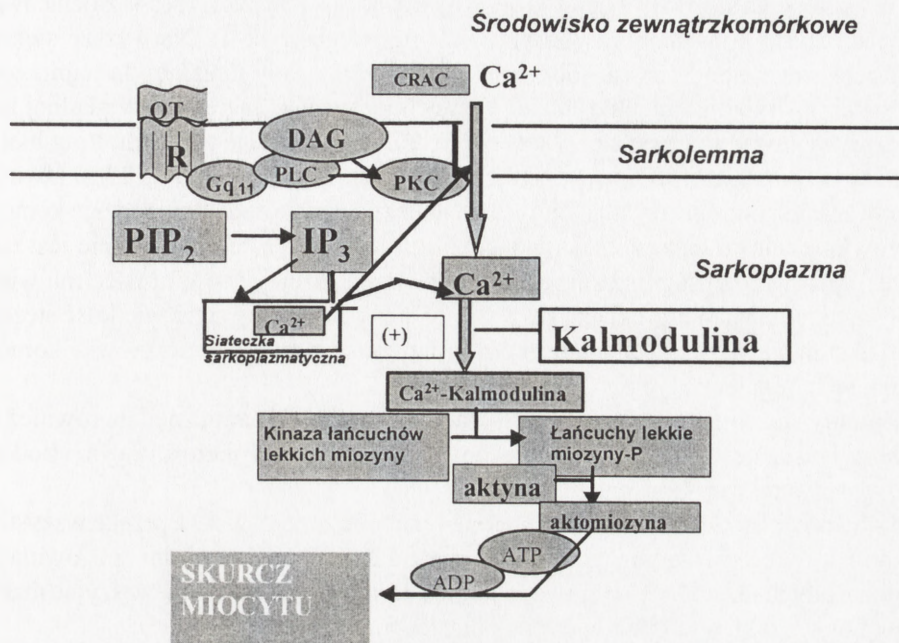
W cytoplazmie komórek kurczliwych (miocyty macicy i jajowodów) powstały IP_3 łączy się ze swoimi receptorami w siateczce sarkoplazmatycznej i powoduje uwalnianie zmagazynowanych tam jonów Ca^{2+} (ryc. 3). Jony te wpływają na otwieranie, zależnych od Ca^{2+} , kanałów wapniowych, będących w błonie plazmatycznej (kanały CRAC – ang. *calcium release-activated calcium channel*) [63]. Kanały te transportują dodatkowe ilości Ca^{2+} z płynu zewnątrzkomórkowego. Jony Ca^{2+} , występujące w sarkoplazmie w wysokim stężeniu, łączą się z kalmoduliną. Aktywna kalmodulina pobudza kinazę łańcuchów lekkich miozyny, gdyż powoduje fosforylację grupy



RYCINA 2. Działanie receptora oksytocyny w komórkach błony śluzowej układu rodnego samic (wg [11, 50, 68], zmodyfikowany)

hydroksylowej jednej z reszt seryny i treoniny w każdym z dwóch łańcuchów lekkich miozyny [71]. Fosforylacja miozyny decyduje o jej interakcji z aktyną. Powstaje kompleks aktomiozyna i w konsekwencji następuje skurcz miocytów [63, 64]. Ponieważ w miocytach macicy drugi przekaznik – DAG – działa podobnie, jak w komórkach śluzówki macicy, sugerowana jest możliwość powstawania i sekrecji prostaglandyn przez miocyty macicy. W warunkach *in vitro* mięśniówka macicy kobiet [52] i szczurzyk [9] wydziela pod wpływem OT prostaglandyny – E₁, E₂ i F₂α.

Oprócz IP₃ i DAG receptor OT wykorzystuje też inne wtórne przekazniki. Peptyd ten podwyższa wytwarzanie cAMP przez komórki ziarniste pęcherzyka jajnikowego [70] oraz przez komórki przysadki świni [5]. W tych ostatnich komórkach wykazano także powstawanie cGMP pod wpływem OT. Fizjologicznym efektem takiego działania OT i rOT była modulacja steroidogenezy w komórkach ściany pęcherzyka jajnikowego oraz pobudzanie sekrecji β-endorfiny przez komórki przysadki [5, 70].



RYCINA 3. Działanie receptora oksytocyny w komórkach błony mięśniowej układu rodnych samic (wg [48, 63, 64], zmodyfikowany)

ONTOGENEZA, LOKALIZACJA I STĘŻENIE ROT W UKŁADZIE ROZRODCZYM SAMIC

Receptory OT pojawiają się w tkankach macicy płodów krów w trzecim trymestrze ciąży, a ich stężenie wzrasta stopniowo od urodzenia do 6. miesiąca życia [17]. Ściana macicy niedojrzałych płciowo krów, owiec i świń zaopatrzona jest w rOT, ale nie wykazują one jeszcze kompetencji biologicznych [15, 17, 66]. W pełni funkcjonalne rOT pojawiają się w układzie rodnych samic równocześnie z pierwszym cyklem płciowym [16, 54, 80].

Białko rOT zlokalizowano w komórkach różnych narządów: śluzówce i mięśniówce macicy [15, 16, 80], jajowodach [1, 13, 14], szyjce macicy [80], jajnikach [55, 57] i gruczołach mlekowych [72]. Zatem, niemal wszystkie narządy układu rodnych samic są docelowymi dla OT. Gęstość rOT w komórkach tych narządów zmienia się w przebiegu cyklu rujowego, ciąży, porodu i laktacji. Dane o stężeniu rOT podczas zaawansowanej ciąży, porodu i laktacji zawarte są we wcześniejszych pracach przeglądowych, dlatego poniżej omówione będą wyniki dotyczące cyklu rujowego.

W komórkach śluzówki macicy krów [16], owiec [74, 80] świń [15, 54] zróżnicowana koncentracja rOT występuje w toku cyklu rujowego (ryc. 4). Najwyższe stężenie rOT rejestrowane podczas rui obniża się na początku fazy lutealnej do najniższych wartości w środkowolutealnej fazie. Niewielki wzrost w fazie późnolutealnej kontynuowany jest w fazie pęcherzykowej. Średnie koncentracje rOT (fmol/mg białka) wahają się od 30 do 1800 (krowy); od 40 do 1000 (owce) i od 90 do 1350 (świnie), odpowiednio podczas fazy lutealnej cyklu płciowego i rui. Wszystkie rodzaje komórek śluzówki macicy zaopatrzone są w rOT, ale stężenie tych receptorów nie jest takie same. Śluzówka występująca między brodawkami macicy krów i owiec ma więcej rOT niż tkanka nad brodawek [16, 81]. W śluzówce macicy świń wielkość stężenia rOT układa się według schematu: komórki zrębu > komórki gruczołów > komórki nabłonka luminalnego [78].

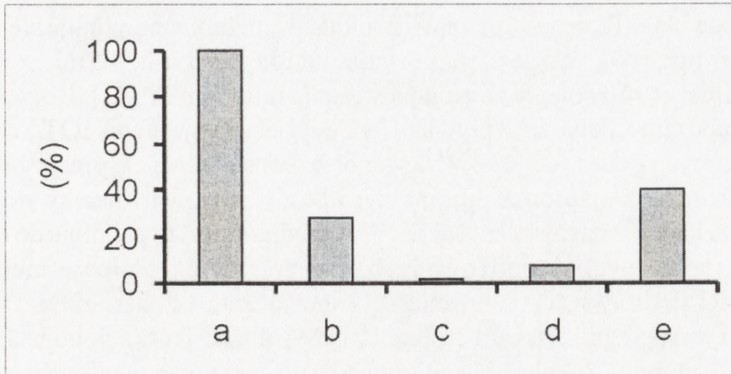
Zmiany stężenia rOT w miocytach macicy są mniej dynamiczne, ale również ich wysoką i niską gęstość rejestruje się odpowiednio w okresie okołorujowym i podczas zaawansowanej fazy lutealnej [15, 16, 81].

Jajowody krów [13], owiec [1] i świń [14] zaopatrzone są w rOT przede wszystkim w okresie okołooowulacyjnym (przeciętnie od 2 dni przed do 2 dni po owulacji). W pozostałych fazach cyklu rujowego jest ich bardzo mało. Podobnie w szyjce macicy krów i owiec rOT występuje głównie podczas rui [17, 80].

W jajnikach rOT są obecne w komórkach ziarnistych pęcherzyka jajnikowego i lutealnych ciała żółtego, a także w tkance śródmiąższowej [55, 57]. Podobnie jak w macicy ich stężenie zmienia się zależnie od fazy cyklu i stopnia rozwoju pęcherzyka jajnikowego i ciała żółtego. Przykładowo, w dużych i małych komórkach lutealnych świni więcej rOT występuje we wczesnej i środkowej, a dwukrotnie mniej w późnolutealnej fazie cyklu rujowego [57].

REGULACJA BIOSYNTETY I FUNKCJONOWANIA ROT

Nieznane są czynniki wpływające na biosyntezę rOT w życiu płodowym i przed osiągnięciem dojrzałości płciowej samic. Jak wspomniano, receptory te w macicy nie są w tym okresie funkcjonalne, a ich stężenie i poziom mRNA rOT są niskie [17]. Z chwilą osiągnięcia dojrzałości płciowej, decydujący wpływ na biosyntezę funkcjonalnych rOT oraz na zmiany ich stężenia w cyklu płciowym mają żeńskie hormony płciowe – estradiol 17β (E_2) i progesteron (P_4) oraz lokalne czynniki o parakrynnym działaniu [3, 15, 39, 40, 49, 66, 73, 81]. Usunięcie jajników, źródła E_2 i P_4 , powoduje stopniowe obniżanie stężenia rOT w tkankach macicy w miarę upływu czasu od zabiegu [12, 17, 66]. Jednakże niski, podstawowy ich poziom utrzymuje się stale, nie jest więc zależny od steroidów jajnikowych. Rolę E_2 i P_4 wyjaśniano na modelu doświadczalnym, w którym pozbawione jajników krowy [39], owce [40] i świni



RYCINA 4. Zmiany stężenia rOT w śluzówce macicy owiec, krów i świń w cyklu rujowym (% w stosunku do maksymalnych wartości występujących podczas rui) (wg [16,54,80]: a – ruja, b – faza wczesnolutealna, c – faza środkowolutealna, d – faza późnolutealna, e – faza pęcherzykowa)

[13] otrzymywały egzogenne steroidy w różnych kombinacjach. Stężenie funkcjonalnych rOT zmieniało się zależnie od:

- (1) koncentracji we krwi owariotomizowanych samic E_2 i P_4 oraz czasu oddziaływania steroidów,
- (2) obecności w macicy własnych receptorów dla E_2 i P_4 ,
- (3) kolejności działania tych hormonów,
- (4) rodzaju komórek i ich położenia w ścianie macicy.

Stwierdzono różnice we wpływie E_2 i P_4 na rOT między samicami przeżuwaczy i świń. W macicy owiec i krów same estrogeny, ale w niskim stężeniu pobudzały syntezę białka receptorowego dla OT oraz stymulowały mechanizmy od receptora w dół; wysokie stężenia estrogenów hamowały te wpływy. Z kolei P_4 , działający na tkanki macicy w ciągu 10 dni u owiec [40] i 12 dni u krów [39], wyraźnie obniżał koncentrację i aktywność rOT, ale między 12. a 16. dniem u owiec i 16. a 20. dniem jego działania u krów, rosło stężenie rOT, niezależnie od poziomu P_4 . W dniach tych rOT w śluzówce macicy owiec i krów stawały się funkcjonalne. W tkankach macicy świń oba steroidy pobudzały powstawanie rOT [15]. Estrogeny zwiększały ich stężenie siedmiokrotnie ponad poziom podstawowy, a P_4 – trzykrotnie. Inaczej niż u przeżuwaczy swoje funkcje w macicy świń rOT ujawniały dopiero po luteolizie, tj. po obniżeniu stężenia P_4 . U wszystkich samic kilkunastodniowa, ale nie krótsza ekspozycja komórek macicy na steroidy wpływała na biosyntezę rOT. Generalnie występował duży stopień korelacji między stężeniem rOT i rE_2 w różnych typach komórek macicy owiec [80]. Aktywne rOT można uzyskać w śluzówce macicy krów, podając najpierw egzogenne estrogeny, a potem progesteron. Kolejność odwrotna nie jest efektywna. U krów, owiec i świń łączne podawanie E_2 i P_4 nie dawało synergistycznego efektu na wielkość stężenia rOT [15, 39, 66].

Mechanizmy, dzięki którym steroidy jajnikowe wpływają na biosyntezę białka receptorowego dla OT, nie są w pełni wyjaśnione. Generalnie przyjmuje się, że E_2 i P_4 , regulując biosyntezę rOT, oddziałują na poziomie transkrypcji i że liczba miejsc wiążących dla OT zmienia się równoległe ze zmianą stężenia mRNA rOT [42]. Dotychczasowe dane doświadczalne dotyczą wpływu E_2 i P_4 na ekspresję genu rOT w śluzówce macicy ciężarnych owiec [42, 43]. Wykazano, że podstawowa ekspresja genu rOT w hodowanym *in vitro* nabłonku luminalnym błony śluzowej macicy pojawia się spontanicznie i nie wymaga obecności E_2 i P_4 w medium. Jest to podobne do opisanego powyżej u samic owariektomizowanych i niedojrzałych płciowo mechanizmu utrzymywania podstawowego stężenia rOT niezależnie od steroidów. Dodany E_2 przyspieszał wystąpienie wzrostu stężenia mRNA dla rOT oraz pobudzał wiązanie ligandu z receptorem. Z kolei P_4 stale obecny w medium powodował opóźnienie zwiększania się poziomu tego mRNA, ale nie zmieniał aktywności wiązania rOT. Autorzy sądzą, że transkrypcja genu rOT jest stale włączona, a obecność E_2 i P_4 odpowiednio wzmacnia ją albo tłumia. Sugerują także bezpośredni wpływ E_2 oraz pośredni wpływ P_4 na ekspresję genu rOT. W części promotorowej genu rOT wykazano obecność trzech elementów (tzw. *half palindromic*), odpowiadających na E_2 [2, 22]. Hormon ten powoduje również wydłużenie odcinka poly(A)-mRNA rOT i stabilizację transkryptu [8]. P_4 wydaje się tłumić działanie czynników bezpośrednio stymulujących ekspresję genu rOT.

Oprócz steroidów jajnikowych, na powstawanie funkcjonalnych rOT w różnych tkankach układu rodnych samic mogą mieć wpływ lokalne czynniki o parakrynnym działaniu [42, 49, 81]. U owiec i krów jednym z nich jest wydzielany przez zarodek interferon tau. Hamuje on powstawanie rOT w śluzówce macicy podczas wczesnej ciąży, gdyż blokuje ekspresję genu dla rOT [49, 73]. U świń natomiast interferony zarodków nie mają wpływu na rOT [41]. Spośród innych czynników w warunkach *in vitro* wykazano powstawanie rOT w macicy i w dużych komórkach lutealnych świni odpowiednio pod wpływem cAMP [77] i hCG [57].

Funkcjonowanie rOT zależy od różnych czynników. Bezpośrednio są to cechy budowy i organizacji cząsteczki rOT, co wiąże się z jego powinowactwem i pojemnością wiązania. Pośredni wpływ wywiera stosunek cholesterolu do innych frakcji lipidowych zawartych w błonie komórkowej, w której zakotwiczona jest cząsteczka rOT [30]. Zmiany poziomu cholesterolu pociągają za sobą zmiany płynności błony komórkowej, co wpływa na konformację białka receptorowego i jego interakcję z białkiem Gq_{11} . Obniżenie zawartości cholesterolu zmniejsza powinowactwo OT do receptora, a zwiększa pojemność wiązania. Przywrócenie normalnego poziomu cholesterolu warunkuje wysokie powinowactwo i małą pojemność wiązania rOT. Zatem, obserwowana w tkankach zmienność powinowactwa rOT może być spowodowana różną zawartością cholesterolu w błonach plazmatycznych komórek docelowych dla OT [28].

UDZIAŁ OT I ROT W REGULACJI CYKLU PŁCIOWEGO

Podczas cyklu płciowego OT uczestniczy w regulacji luteolizy, steroidogenezy i aktywności skurczowej macicy i jajowodów.

Luteoliza

U krów, owiec i świń zakończenie trwającej kilkanaście dni fazy lutealnej – luteoliza (regresja lutealna) przebiega szybko, w ciągu 24–48 h. Proces ten objawia się gwałtownym obniżeniem sekrecji P_4 , ponieważ komórki lutealne w ciałku żółtym przestają syntetyzować ten hormon. Bezpośrednim czynnikiem, który powoduje regresję lutealną, jest $PGF_2\alpha$ – hormon wytwarzany w błonie śluzowej macicy, przenikający w obszarze więzadła szerokiego macicy do krwi tętnicy jajnikowej i tą drogą docierający do jajnika, a w nim do komórek lutealnych [36, 47]. Hormon wykazuje szerokie spektrum działania, wprowadzając zarówno morfologiczne, jak i funkcjonalne zmiany w ciałku żółtym, które w krótkim czasie doprowadzają do degradacji komórek lutealnych. Podczas luteolizy $PGF_2\alpha$ wydzielana jest w pulsach o charakterystycznej dla samic różnych gatunków amplitudzie i częstotliwości [47]. Związek między OT a $PGF_2\alpha$ stwierdzono po raz pierwszy na początku lat osiemdziesiątych u owiec [47, 53, 67]. Wykazano, że brak biologicznego działania OT, spowodowany związaniem i wytrąceniem cząsteczek peptydu przez przeciwciała anty-oksytocynowe, prowadzi do wydłużenia cyklu rujowego, gdyż nie dochodzi do sekrecji $PGF_2\alpha$. Stwierdzono też wysoką syntezę OT przez komórki lutealne, co było inspiracją do prowadzenia licznych doświadczeń nad rolą jajnikowej OT w procesie regresji lutealnej [11, 67]. Na podstawie wyników tych badań opisano model regulacji tego procesu u owiec [47]. Obejmuje on interakcje między podwzgórzem – jajnikami – śluzówką macicy. Włączone są tutaj wzajemne oddziaływania między podwzgórzową i lutealną OT, steroidami jajnikowymi a $PGF_2\alpha$. Inicjowanie i przebieg luteolizy u owiec są następujące. Pod koniec fazy lutealnej, dzięki „regulacji w dół” receptorów P_4 przez P_4 , następuje znacznie obniżone oddziaływanie P_4 na neurony OT-ergiczne w podwzgórzu i na komórki śluzówki macicy. Ujawniają się wtedy wpływy estrogenów, które decydują o powstaniu rOT w błonie śluzowej macicy. Steroidy te wywołują też wydzielanie OT z podwzgórza w postaci pulsów o dużej częstotliwości i niskiej amplitudzie. Ten sposób sekrecji określono jako generator pulsów OT [46]. Generator pulsów OT i rOT powodują uwalnianie z komórek śluzówki macicy $PGF_2\alpha$ w postaci subluteolitycznych pulsów. Prostaglandyna ta działa na duże komórki lutealne przez swoje receptory o wysokim powinowactwie i powoduje sekrecję OT, zawartej w tych komórkach. OT jajnikowa, wydzielana w formie pulsów o wysokiej amplitudzie, jest głównym czynnikiem, który pobudza sekrecję luteolitycznych pulsów $PGF_2\alpha$. Stężenie $PGF_2\alpha$ jest w tym momencie na tyle wysokie, aby oddziaływać na komórki lutealne również przez receptory o niskim powinowactwie. Powoduje to hamowanie sekrecji P_4 oraz uwalnianie dodatkowych ilości lutealnej OT. Pętla dodatniego sprzężenia zwrotnego: lutealna OT

– $\text{PGF}_2\alpha$ ze śluzówki macicy, funkcjonuje do momentu odczucia obu typów receptorów $\text{PGF}_2\alpha$. Pojedyncze luteolityczne pulsje $\text{PGF}_2\alpha$ u owiec trwają 1h i występują w odstępach 6–9h [47]. Wykazano, że u owiec rozwój wrażliwości śluzówki macicy na OT wyprzedza rozpoczęcie luteolizy i jest jej bezpośrednią przyczyną [11, 68, 69].

Zależności OT- $\text{PGF}_2\alpha$, podobnych do tych, jakie występują podczas luteolizy u owiec, poszukiwano także u krów i świń [12, 33, 39, 53]. W przypadku krów podważana jest rola OT pochodzenia jajnikowego w rozpoczęciu i przebiegu luteolizy. Usunięcie OT z ciała żółtego nie hamuje tego procesu [35]. Podobnie, infuzje antagonisty rOT w dawkach, które skutecznie blokują rOT w okresie przed i podczas luteolizy, nie zakłócają przebiegu regresji lutealnej. Pomimo zablokowania rOT występują pulsje $\text{PGF}_2\alpha$ charakterystyczne dla luteolizy, a długość cyklu rujowego u badanych jałówek była taka jak u zwierząt kontrolnych [33]. Stymulację sekrecji $\text{PGF}_2\alpha$ przez OT uzyskano w okresie okołoluteolitycznym u krów dopiero po zastosowaniu farmakologicznych dawek peptydu [34]. Sugerowana jest więc modulująca proces lutealnej regresji rola OT u krów [56].

Bezpośrednie czynniki inicjujące oraz podtrzymujące luteolityczne pulsje $\text{PGF}_2\alpha$ u świń nie są w pełni poznane. Są dane, które wskazują, że OT stymuluje sekrecję $\text{PGF}_2\alpha$ u świń w warunkach *in vivo* [27] i *in vitro* [45, 76, 84]. W okresie luteolizy wydzielanie OT jest podwyższone i występuje istotna korelacja między pulsami OT i $\text{PGF}_2\alpha$ [31]. Wyniki doświadczeń, prowadzonych w warunkach *in vitro*, wskazują, że OT pobudza sekrecję $\text{PGF}_2\alpha$ ze skrawków śluzówki macicy pobranych od świń będących w 15. i 16. dniu cyklu rujowego [50]. Z drugiej strony dożylne infuzje antagonisty OT, wykonywane od 12. do 20. dnia cyklu rujowego nie hamują luteolizy ani nie wpływają na długość cyklu rujowego u badanych świń [32]. Obserwowano jedynie niższą amplitudę i częstotliwość pulsów $\text{PGF}_2\alpha$, co nie zmieniło istotnie sekrecji P_4 . Wydaje się więc, że OT jest u świń jednym z wielu/kilku regulatorów, ale nie sprawcą luteolizy.

U świń dominacja progesteronu ujemnie wpływa na pobudzenie przez OT sekrecji $\text{PGF}_2\alpha$. Wyjaśnieniu tego zjawiska może służyć odkryty, interesujący związek między rOT a P_4 [20]. W miocytach macicy ciężarnych szczurzy i w transfekowanych komórkach nabłonkowych linii CHO, zawierających ludzki i szczurzy rOT stwierdzono, że P_4 wykazuje bezpośrednie powinowactwo do rOT, konkurując skutecznie z OT do jej miejsc wiążących. Progesteron zachowywał się jak typowy antagonistą rOT. Silnie hamował, stymulowaną przez OT, hydrolizę PIP_2 oraz mobilizację jonów wapnia. Wykazano również, iż progesteron zakłóca działanie rOT w błonie śluzowej macicy krów, gdyż upośledza łączenie się OT z własnym receptorem [6].

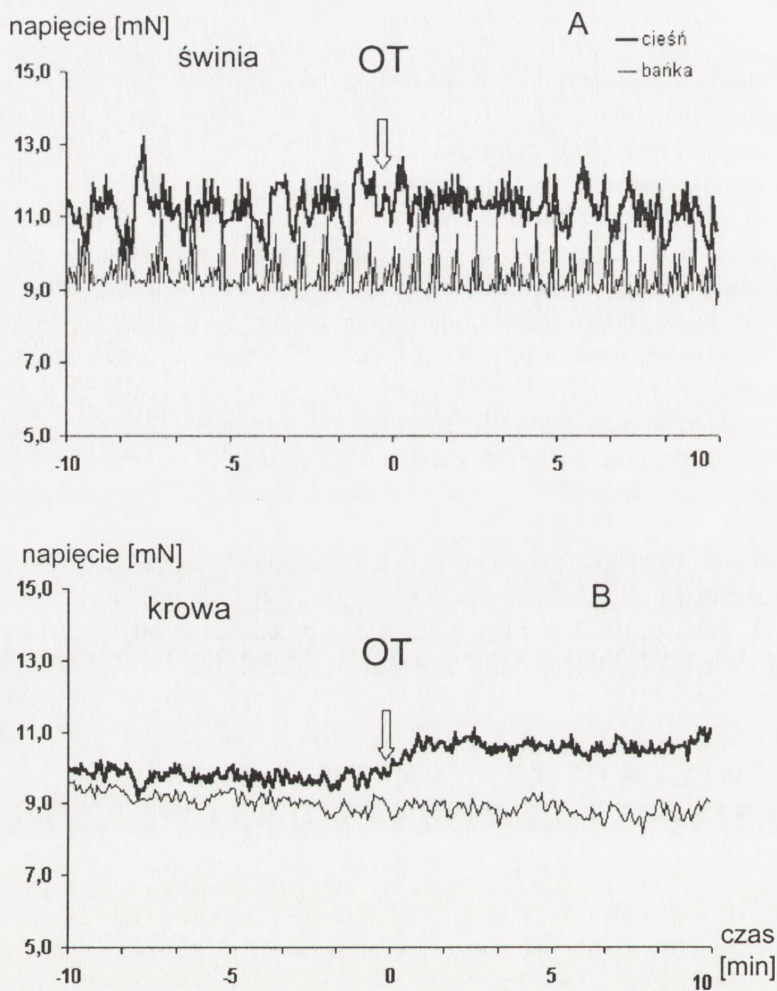
ROLA OT W STEREOIDOGENEZIE JAJNIKOWEJ

Jednym z mechanizmów, dzięki któremu OT reguluje cykl rujowy, jest wpływ peptydu na steroidogenezę w jajniku. Hormon działa tutaj w sposób auto-i parakryny. Receptory OT wykazano w komórkach lutealnych CL świń [57], krów [55] i owiec [53] oraz w komórkach ziarnistych pęcherzyka jajnikowego świń [70]. Wpływ OT na syntezę P_4 i E_2 stwierdzono w komórkach lutealnych i w komórkach ziarnistych [21, 25, 58, 59, 70]. Oksytocyna w warunkach *in vitro* hamowała produkcję P_4 przez rozproszone komórki lutealne świń, krów i owiec, jeżeli stosowano wysokie stężenie OT dodawanej do medium. Mniejsza dawka hormonu nie zmieniała albo pobudzała wydzielanie P_4 [53, 57, 59]. Przy użyciu systemu mikrodializy ciałek żółtych świń i krów udowodniono, że spontaniczna wewnątrzlutealna sekrecja P_4 i OT pojawia się w sposób pulsacyjny i występuje wysoki stopień zgodności sekrecji obu hormonów [25, 51]. OT podana w fizjologicznym stężeniu bezpośrednio do ciała żółtego przez system sztucznych naczyń pobudza wydzielanie P_4 i E_2 . Taki efekt działania OT jest najsilniejszy we wczesnym ciałku żółtym [25, 51].

Efekt działania OT na komórki ziarniste pęcherzyka jajnikowego świń i krów również zależy od stężenia peptydu dodanego do medium [21, 70]. Wysokie dawki OT hamują sekrecję P_4 i E_2 przez te komórki. Stwierdzono, że w przedowulacyjnych pęcherzykach jajnikowych świń OT hamuje nadmierne uwalnianie E_2 [21].

WPLYW OT/ROT NA MACICĘ, JAJOWODY ORAZ SZYJKĘ MACICY PODCZAS CYKLU PŁCIOWEGO

Obecność rOT w mięśniówce macicy i jajowodów oraz w szyjce macicy krów, owiec i świń czyni te narządy podatnymi na działanie OT [1, 13, 14, 17]. Największa wrażliwość tych narządów na OT występuje u samic będących w rui. Jest to zgodne z występowaniem w tym okresie maksymalnego stężenia rOT [1, 13, 14]. Ponadto, OT produkowana w jajniku dzięki mechanizmowi przeciwpądowego przenikania w splocie podjajnikowym może w wysokim stężeniu docierać do rogów macicy i jajowodów, co potęguje działanie hormonu [36]. Spontaniczna fala perystaltyczna rogów macicy jest w tym czasie modyfikowana przez OT: częstotliwość skurczów podwaja się, wzrasta ich siła i szybkość przesuwania się fali skurczowej [18]. W przypadku jajowodów u świń i owiec silniej na OT reaguje bańka – wzrost liczby skurczów, a u krów cieśń – długotrwały wzrost napięcia (ryc. 5) [18, 38]. Oksytocyna może również hamować skurcze jajowodów. Taka sytuacja ma miejsce na początku fazy lutealnej u krów, gdy OT, pochodząca z nowopowstałego ciała żółtego, blokuje wydzielanie lokalnych czynników kurczących – endoteliny 1 i prostaglandyny $F_{2\alpha}$ [85]. Szyjka



RYCINA 5. Wpływ OT (10^{-7} M) na kurczliwość cieśni i bańki jajowodów świni (A) i krowy (B). Odcinki jajowodu pobierano od samic będących w rui. Zmiany napięcia (mN) rejestrowano przy użyciu aparatu Schuler Organbath, transducer izometryczny typ 372, napięcie wyjściowe wynosiło 10 mV (badania własne [38])

macicy ulega rozluźnieniu pod wpływem OT, dlatego u owiec peptyd podawany podczas sztucznej inseminacji może zwiększać wydajność tego zabiegu [65].

PIŚMIENNICTWO

- [1] AYAD VJ, GULDENAAR SEF, WATHES DC. Characterization and localization of oxytocin receptors in the uterus and oviduct of the non-pregnant ewe using an iodinated receptor antagonist. *J Endocrinol* 1991; **128**: 187–195.
- [2] BALE TL, DORSA DM. Cloning, novel promoter sequence, and estrogen regulation of a rat oxytocin receptor gene. *Endocrinology* 1997; **138**: 1151–1158.
- [3] BALE TL, PEDERSEN CA, DORSA DM. CNS oxytocin receptor mRNA expression and regulation by gonadal steroids. *Adv Exp Med Biol* 1995; **395**: 269–280.
- [4] BARBERIS C, MOUILLAC B, DURROUX T. Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. *J Endocrinol* 1998; **156**: 223–229.
- [5] BOGACKA I, SIAWRYS G, OKRASA S, KAMIŃSKI T, PRZAŁA J. The influence of GnRH, oxytocin and vasoactive intestinal peptide on secretion of β -endorphin-like and production of cAMP and cGMP by pig pituitary cells. *Anim Reprod Sci* 2001; (przyjęta do druku)
- [6] BOGACKI M, SILVIA WJ, REKAWIECKI R, MŁYNARCZUK J, KOTWICA J. Inhibition of oxytocin binding and oxytocin stimulated prostaglandin $F_{2\alpha}$ secretion by progesterone in bovine endometrium. International Conference on the Female Reproduction Tract, Frauenthemsee, Germany, May 26–29, 2000; abstr.
- [7] BOULTON MI, MCGRATH TJ, GOODE JA, BROAD KD, GILBERT CL. Changes in content of mRNA encoding oxytocin in the pig uterus during the oestrous cycle, pregnancy, at parturition and in lactational anoestrus. *J Reprod Fert* 1996; **108**: 219–227.
- [8] BRENTON C, NECULCEA J, ZINGG HH. Renal oxytocin receptor messenger ribonucleic acid: characterization and regulation during pregnancy and in response to ovarian steroid treatment. *Endocrinology* 1996; **147**: 2711–2717.
- [9] CAMPOS GA, LIGGINS GC, SEAMARK RF. Differential production of PGF and 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ by the rat endometrium and myometrium in response to oxytocin, catecholamines and calcium inophore. *Prostaglandins* 1980; **20**: 297–310.
- [10] FAHRENHOLZ F, AKHUNDOVA A, BÜCHNER H, GORBULEV V. V_2 lysine vasopressin receptor and oxytocin receptor from pig LLC-PK1 cells: two members of the vasopressin-oxytocin receptor family. [w] P. Gross, D. Richter, G.L. Robertson [red.]. *Vasopressin*. 1993: 45–57.
- [11] FLINT APF, LEAT EL, SHELDRIK EL, STEWART HJ. Stimulation of phosphoinositide hydrolysis by oxytocin and the mechanism by which oxytocin controls prostaglandin synthesis in the ovine endometrium. *Biochem J* 1986; **247**: 798–805.
- [12] FRAN CZAK A, KOTWICA G. Effect of exogenous oxytocin and ovarian steroids on secretion of PGF $_{2\alpha}$ in ovariectomized gilts. 7th International Symposium: „Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism”, Kraków. 9–10 czerwiec, 1998: 92–93, abstr.
- [13] FRAN CZAK A, KUROWICKA B, ZARĘBA D, KOTWICA G. Oxytocin receptors in the bovine oviduct. 10th International Symposium: „Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism”, Kraków. 5–6 czerwca, 2001: 94–95, abstr.
- [14] FRAN CZAK A, PISALSKA A, KOTWICA G. Oxytocin receptors in the porcine oviduct during the oestrous cycle. 9th International Symposium: „Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism”. Kraków. 6–7 czerwca, 2000: 111–112, abstr.
- [15] FRAN CZAK A, KOTWICA G. Wpływ hormonów steroidowych na koncentrację receptorów oksytocyny w słuźowce i mięśniówce macicy loszek. I Zjazd Towarzystwa Biologii Rozrodu, Mierki k. Olsztyna, 1999: 63, abstr.
- [16] FUCHS AR, BEHRENS O, HELMER H, LUI CH, BARROS CM, FIELDS MJ. Oxytocin and vasopressin receptors in bovine endometrium and myometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Endocrinology* 1990; **127**: 629–636.

- [17] FUCHS AR, DROLET P, FORTIER A, BALVERS M, FIELDS MJ. Ontogeny of oxytocin receptors and oxytocin-induced stimulation of prostaglandin synthesis in prepubertal heifers. *Endocrinology* 1998; **139**: 2755–2764.
- [18] GILBERT CL, CRIPPS PJ, WATHES DC. Effect of oxytocin on the pattern of electromyographic activity in the oviduct and uterus of the ewe around oestrous. *Reprod Fertil Dev* 1992; **4**: 193–203.
- [19] GORBULEV V, BUCHNER H, AKHUNDOVA A, FAHRENHOLZ F. Molecular cloning and functional characterization of V₁ [8-lysine]vasopressin and oxytocin receptors from a pig kidney cell line. *Eur J Biochem* 1993; **215**: 1–7.
- [20] GRAZZINI E, GUILLON G, MOUILAC B, ZINGG HH. Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. *Nature* 1998; **2**: 509–512.
- [21] GREGORASZCZUK E, STOKŁOSOWA S, TARNAWSKA M, RZAŚA J. The effect of oxytocin on steroid hormone secretion by isolated porcine follicular cells in tissue culture. *Anim Reprod Sci* 1988; **17**: 141–154.
- [22] INOUE T, KIMURA T, AZUMA C, INAZAWA J, TAKEMURA M, KIKUCHI T, KUBOTA Y, OGITA K, SAJI F. Structural organization of the human oxytocin receptor gene. *J Biol Chem* 1994; **269**: 32451–32456.
- [23] IVELL R, RUST W, EINSPANIER A, HARTUNG S, FIELDS M, FUCHS AR. Oxytocin and oxytocin receptor gene expression in the reproductive tract of the pregnant cow: rescue of luteal oxytocin production at term. *Biol Reprod* 1995; **53**: 553–560.
- [24] IVELL R. Biosynthesis of oxytocin in the brain and peripheral organs. *Curr Topics Neuroendocrinol* 1986; **6**: 118–123.
- [25] JARRY H, EINSPANIER A, KANNGIESSER L, DIETRICH M, PITZEL J, HOLTZ W, WUTKE W. Release and effects of oxytocin on estradiol and progesterone secretion in porcine corpora lutea as measured by an *in vivo* microdialysis system. *Endocrinology* 1990; **126**: 2350–2358.
- [26] KENDRICK KM. Oxytocin, motherhood and bonding. *Exp Physiol* 2000; **85**: 111–124.
- [27] KIEBORZ KR, SILVIA WJ, EDGERTON LA. Changes in uterine secretion of prostaglandin F_{2α} and luteal secretion of progesterone in response to oxytocin during the porcine estrous cycle. *Biol Reprod* 1991; **45**: 950–954.
- [28] KIMURA T, SAJI F. Molecular endocrinology of the oxytocin receptor. *Endocrine J* 1995; **42**: 607–615.
- [29] KIMURA T, TANIZAWA O, MORI K, BROWNSTEIN MJ, OKAYAMA H. Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature* 1992; **356**: 526–529.
- [30] KLEIN U, GIMPL G, FAHRENHOLZ F. Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with β-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry* 1995; **34**: 13784–13793.
- [31] KOTWICA G, DUSZA L, CIERESZKO R, OKRASA S, SCHAMS D. Oxytocin plasma levels during spontaneous and cloprostenol-induced luteolysis in sows. *Anim Reprod Sci* 1990; **22**: 109–119.
- [32] KOTWICA G, FRAN CZAK A, OKRASA S, KOTWICA J. Effect of an oxytocin antagonist on prostaglandin F_{2α} secretion and the course of luteolysis in sows. *Acta Vet Hung* 1999; **47**: 249–262.
- [33] KOTWICA J, SKARŻYŃSKI D, BOGACKI M, MELIN P, STAROSTKA B. The use of an oxytocin antagonist to study the function of ovarian oxytocin during luteolysis in cattle. *Theriogenology* 1997; **48**: 1287–1299.
- [34] KOTWICA J, SKARŻYŃSKI D, JAROSZEWSKI J, WILLIAMS GL, BOGACKI M. Uterine secretion of prostaglandin F_{2α} stimulated by different doses of oxytocin and released spontaneously during luteolysis in cattle. *Reprod Nutr Develop* 1998; **38**: 319–328.
- [35] KOTWICA J, SKARŻYŃSKI D. Influence of oxytocin removal from corpus luteum on secretory function and duration of the oestrous cycle in cattle. *J Reprod Fert* 1993; **97**: 411–417.

- [36] KRZYMOWSKI T, KOTWICA J, STEFAŃCZYK-KRZYMOWSKA S. Uterine and ovarian countercurrent pathways in the control of ovarian function in the pig. *J. Reprod Fert* 1990; Suppl. **40**: 179–191.
- [37] KU CHJ, QIAN A, WEN J, ANSWER K, SANBORN BM. Oxytocin stimulates myometrial guanosine triphosphatase and phospholipase-C activities via coupling to $G_{\alpha 11}$. *Endocrinology* 1995; **136**: 1509–1515.
- [38] KUROWICKA B, GRZEGORZEWSKI W, FRANCAK A, WRÓBEL M, KOTWICA G. Effect of oxytocin, noradrenaline and acetylcholine on the contraction's activity of the bovine oviduct. 10th International Symposium: „Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism”, Kraków. 5–6 czerwca, 2001: 194–195, abstr.
- [39] LAMMING GE, MANN GE. Control of endometrial oxytocin receptors and prostaglandin $F_{2\alpha}$ production in cows by progesterone and oestradiol. *J Reprod Fert* 1995; **103**: 69–73.
- [40] LÄU TM, KERTON DJ, GOW CB, FAIRCLOUGH RJ. Role of progesterone in the control of endometrial oxytocin receptors at luteolysis in sheep. *J Reprod Fert* 1993; **98**: 229–233.
- [41] LEFEVRE F, MARTINAT-BOTTÉ F, LOCATELLI A, DE NIU P, TERQUI M, LA BONNARDIÈRE C. Intrauterine infusion of high doses of pig trophoblast interferons has no antiluteolytic effect in cyclic gilts. *Biol Reprod* 1998; **58**: 1026–1031.
- [42] LEUNG ST, WATHES DC. Regulatory effect of steroid hormones and fetal tissues on expression of oxytocin receptor in the endometrium of late pregnant ewes. *J Reprod Fert* 1999; **115**: 243–250.
- [43] LEUNG ST, WATHES DC, YOUNG IR, JENKIN G. Effect of labor induction in the expression of oxytocin receptor, cytochrome P450 aromatase, and estradiol receptor in the reproductive tract of the late-pregnant ewe. *Biol Reprod* 1999; **60**: 814–820.
- [44] LEYHE-HORN B, ZIRON C, PRINZENBERG E, BARENDSE W, HIENDLEDER S, ERHARDT G. Mapping of oxytocin (OXT) to the central region of bovine chromosome 13 by linkage analysis using SSCP. *J Anim Sci* 2001; **79**: 777–778.
- [45] LUDWIG TE, SUN BC, CARNAHAN KG, UZUMCU M, YELICH JV, GEISERT RD, MIRANDO MA. Endometrial responsiveness to oxytocin during diestrus and early pregnancy in pigs is not controlled solely by changes in oxytocin receptor population density. *Biol Reprod* 1998; **58**: 769–777.
- [46] McCracken JA, CUSTER EE, ELDERING JA, ROBINSON AG. The central oxytocin pulse generator: a pacemaker for luteolysis. *Adv Exp Med Biol* 1995; **395**: 133–154.
- [47] McCracken JA, CUSTER EE, LAMSA JC. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev* 1999; **79**: 263–323.
- [48] MESONERO JE, TANFIN Z, HILLY M, COLOSETTI P, MAUGER JP, HARBON S. Differential expression of 1,4,5-trisphosphate receptors types 1, 2 and 3 in rat myometrium and endometrium during gestation. *Biol Reprod* 2000; **63**: 532–537.
- [49] MIRANDO MA, OTT TL, VALLET JL, DAVIS M, BAZER F. Oxytocin – stimulated inositol phosphate turnover in endometrium of ewes is influenced by stage of the estrous cycle, pregnancy, and intrauterine infusion of ovine conceptus secretory proteins. *Biol Reprod* 1990; **42**: 98–105.
- [50] MIRANDO MA, PRINCE BC, TYSSSELING KA, CARNAHAN KG, LUDWIG TE, HOGGLAND TE, CRAIN RC. A proposed role for oxytocin in regulation of endometrial prostaglandin $F_{2\alpha}$ secretion during luteolysis in swine. [w] Ivell R and Russell J [red.] Oxytocin. Plenum Press, New York, 1995: 421–443.
- [51] MIYAMOTO A, SCHAMS D. Oxytocin stimulates progesterone release from microdialyzed bovine *corpus luteum in vitro*. *Endocrinology* 1991; **44**: 1163–1170.
- [52] MOLNÁR M, RIGÓ J, ROMERO R, HERTELENDY F. Oxytocin activates mitogen-activated protein kinase and up-regulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin production in human myometrial cells. *Am J Obstet Gynecol* 1999; **181**: 42–49.
- [53] NISWENDER GD, JUENGEL JL, SILVIA PJ, ROLLYSON MK, MCINTOSH W. Mechanism controlling the function and life span of the *corpus luteum*. *Physiol Rev* 2000; **80**: 1–29.

- [54] OKANO A, OKUDA K, TAKAHASHI M, SCHAMS D. Oxytocin receptors in the porcine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Anim Reprod Sci* 1996; **41**: 61–70.
- [55] OKUDA K, MIYAMOTO A, SAUERWEIN H, SCHWEIGERT FJ, SCHAMS D. Evidence for oxytocin receptors in cultured bovine luteal cells. *Biol Reprod* 1992; **49**: 1001–1006.
- [56] OKUDA K, SKARŻYŃSKI D. Luteal prostaglandin $F_{2\alpha}$: new concepts of protdaglandin $F_{2\alpha}$ secretion and its actions within the bovine *corpus luteum* – review. *Asian-Aus J Anim Sci* 2000; **13**: 390–400.
- [57] PITZEL L, JARRY H, WUTTKE W. Demonstration of oxytocin receptors on porcine *corpora lutea*: effects of the cycle stage and the distribution on small and large luteal cells. *Biol Reprod* 1993; **48**: 640–646.
- [58] PITZEL L, JARRY H, WUTTKE W. Effects and interactions of prostaglandin $F_{2\alpha}$, oxytocin, and cytokines on steroidogenesis of porcine luteal cells. *Endocrinology* 1993; **132**: 751–756.
- [59] PITZEL L, JARRY H, WUTTKE W. Effects of oxytocin on *in vitro* steroid release of midstage small and large luteal cells. *Endocrinology* 1990; **126**: 2343–2349.
- [60] RICHARD P, MOOS F, FREUND-MERCIER MJ. Central effect of oxytocin. *Physiol Rev* 1991; **71**: 331–369.
- [61] RILEY PR, ABAYASEKARA DRE, STEWART HJ, FLINT APF. Functional characterisation of an ovine endometrial oxytocin receptor cDNA transiently expressed in Cos-7 cells. *J Endocrinol* 1996; **149**: 389–396.
- [62] RILEY PR, FLINT APF, ABAYASEKARA DRE, STEWART HJ. Structure and expression of an ovine endometrial oxytocin receptor cDNA. *J Molec Endocrinol* 1995; **15**: 195–202.
- [63] SANBORN BM, QAIN A, KU CY, WEN Y, ANWER K, MONGA M, SINN SP. Mechanism regulating oxytocin receptor coupling to phospholipase C in rat and human myometrium. *Adv Exp Med Biol* 1995; **395**: 469–479.
- [64] SANBORN BM, YUE C, WANG W, DODGE KL. G protein signalling pathways in myometrium: affecting the balance between contraction and relaxation. *Rev Reprod* 1998; **3**: 196–205.
- [65] SAYRE BL, LEWIS GS. Cervical dilation with exogenous oxytocin does not affect sperm movement into oviducts in ewe. *Theriogenology* 1996; **45**: 1523–1533.
- [66] SHELDRIK EL, FLICK-SMITH HC. Effect of ovarian hormones on oxytocin receptor concentrations in explants of uterus from ovariectomized ewes. *J Reprod Fertil* 1993; **97**: 241–245.
- [67] SHELDRIK EL, FLINT APF. Secretion of oxytocin by the *corpus luteum* and its role in luteolysis in the sheep. [w]: *Endocrinology and Physiology of Reproduction*. Plenum Press, New York, London, 1987: 211–219.
- [68] SILVIA WJ, LEE JS, TRAMMELL DS, HAYNES SH, LOWBERGER LL, BROCKMAN JA. Cellular mechanisms mediating the stimulation of ovine endometrial secretion of prostaglandin $F_{2\alpha}$ in response to oxytocin: role of phospholipase C and diacylglycerol. *J Endocrinol* 1994; **141**: 481–490.
- [69] SILVIA WJ, RAW RE, ALDRICH SL, HAYES SH. Uterine secretion of prostaglandin $F_{2\alpha}$ in response to oxytocin in ewes: changes during the estrous cycle and early pregnancy. *Biol Reprod* 1992; **46**: 107–115.
- [70] SIROTKIN AV, BULLA J, KUCEK A. Oxytocin and vasopressin, like LH, stimulate cyclic AMP production by porcine ovarian granulosa cells. *Acta Zoot* 1995; **51**: 121–126.
- [71] SMITH GD, XIAO-TIE L, PHILIPPE M. Divergence in murine myometrium spontaneous and oxytocin-stimulated contractile response to serine/threonine protein phosphatase-1 inhibition. *Biol Reprod* 2000; **63**: 781–788.
- [72] SOLOFF MS, JENG YJ, COPLAND JA, STRAKOVA Z, HOARE S. Signal pathways mediating oxytocin synthesis in select target cells. *Exp Physiol* 2000; **85**: 51–58.

- [73] SPENCER TE, MIRANDO MA, MAYES JS, WATSON GH, OTT TL, BAZER FW. Effects of interferon γ and progesterone on oestrogen - stimulated expression of receptors for oestrogen, progesterone and oxytocin in the endometrium of ovariectomized ewes. *Reprod Fertil Dev* 1996; **8**: 843–853.
- [74] STEVENSON KR, RILEY PR, STEWART HJ, FLINT APF. Localization of oxytocin receptor mRNA in the ovine uterus during the oestrous cycle and early pregnancy. *J Mol Endocrinol* 1994; **12**: 93–105.
- [75] STEWART HJ, STEVENSON KR, FLINT APF. Isolation and structure of a partial sheep oxytocin receptor cDNA and its use as a probe for Northern analysis of endometrial RNA. *J Mol Endocrinol* 1993; **10**: 359–361.
- [76] TYSSSELING KA, UZUMCU M, HOAGLAND TA, CRAIN RC, MIRANDO M. The role of phosphoinositide-derived second-messengers in oxytocin-stimulated prostaglandin $F_{2\alpha}$ release from endometrium of pigs. *Domest Anim Endocrinol* 1996; **13**: 411–420.
- [77] UENOYAMA Y, HATTORI SI, MIYAKE M, OKUDA K. Up-regulation of oxytocin receptors in porcine endometrium by adenosine 3', 5-monophosphate. *Biol Reprod* 1997; **57**: 723–728.
- [78] UZUMCU M, BRAILEANU GT, CARNAHAN KG, LUDWIG TE, MIRANDO MA. Oxytocin-stimulated phosphoinositide hydrolysis and prostaglandin F secretion by luminal epithelial, glandular epithelial, and stromal cells from pig endometrium. I. Response of cyclic pigs on day 16 postestrus. *Biol Reprod* 1998; **59**: 1259–1265.
- [79] VAN EERDENBURG FJCM, POOT P, MDENAAR GJ, VAN LEENWEN FW, SWAAB DF. A vasopressin and oxytocin containing nucleus in the pig hypothalamus that shows neuronal changes during puberty. *J Comp Neurol* 1990; **310**: 138–146.
- [80] WATHES DC, HAMON M. Localization of oestradiol, progesterone and oxytocin receptors in the uterus during the oestrous cycle and early pregnancy of the ewe. *J Endocrinol* 1993; **138**: 479–491.
- [81] WATHES DC, MANN GE, PAYNE JH, RILEY PR, STEVENSON KR, LAMMING GE. Regulation of oxytocin, oestradiol and progesterone receptor concentrations in different uterine regions by oestradiol, progesterone and oxytocin in ovariectomized ewes. *J Endocrinol* 1996; **151**: 375–393.
- [82] WATHES DC. Oxytocin and vasopressin in the gonads. [w] S.R. Milligan [red.], *Oxford Rev Reprod Biol*, Oxford Univ Press 1989; **11**: 225–283.
- [83] WHEATLEY M, HAWTIN SR. Glycosylation of G-protein-coupled receptors for hormones central to normal reproductive functioning: its occurrence and role. *Hum Reprod Up* 1999; **4**: 356–364.
- [84] WHITEAKER SS, MIRANDO MA, BECKER WC, HOSTETLER CE. Detection of functional oxytocin receptors on endometrium of pigs. *Biol Reprod* 1994; **51**: 92–98.
- [85] WIJAYAGUNAWARDANE MPB, MIYAMOTO A, TAQUAHASHI Y, GABLER C, COSTA TJ, NISHIMURA M, KILLAN G, SATO K. *In vitro* regulation of local secretion and contraction of the bovine oviduct: stimulation by luteinizing hormone, endothelin-1 and prostaglandins, and inhibition by oxytocin. *J Endocrinol* 2001; **168**: 117–130.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 25.09.2001 r.

Przyjęto: 07.01. 2002 r.

Adres autora: ul. Oczapowskiego 5, 10-718 Olsztyn

POSTĘP W METODACH HODOWLI KOMÓREK DLA TRANSPLANTOLOGII – KOMÓRKI MACIERZYSTE

ADVANCE IN METHODS OF CULTURING CELLS FOR TRANSPLANTOLOGY – STEM CELLS

Magdalena KUCIA, Justyna DRUKAŁA

Zakład Biologii Komórki Instytutu Biologii Molekularnej im. Jana Zurzyckiego
Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Streszczenie: Ze względu na swoje biologiczne właściwości i potencjalną możliwość zastosowania klinicznego, komórki macierzyste są obecnie przedmiotem ogromnego zainteresowania. Totipotencjalne komórki macierzyste wyizolowane z wczesnych embrionów mogą rozwinąć się w zarodek. Pluripotencjalne komórki macierzyste wyselekcjonowane z organizmu dojrzałego różnicują we wszystkie typy tkanek, które już wkrótce mogą znaleźć zastosowanie terapeutyczne. Wydaje się, że rozwój metod inżynierii komórkowej umożliwi prowadzenie hodowli tkanek *in vitro* i późniejsze ich zastosowanie w transplantologii. W artykule omówiono niektóre z ostatnich osiągnięć dotyczących izolacji i hodowli komórek macierzystych; ze szczególnym uwzględnieniem komórek macierzystych obecnych w hodowlach keratynocytów skóry ludzkiej.

Słowa kluczowe: ludzkie komórki macierzyste, hodowla *in vitro*, transplantologia.

Summary: Stem cells raise an increasing interest for the sake of their potential significance in clinical medicine. Totipotent individual stem cells derived from early embryos are able to develop into a foetus. Pluripotent stem cells selected from adult organisms can differentiate into various tissue cell types and soon might be used in therapy. The development of methods of cell engineering can be expected to permit growth of tissues and organs *in vitro* and their later usage in transplantology. The article considers some latest achievements in the field of stem cells isolation and culture; the special attention is paid to stem cells present in cultures of human skin keratinocytes.

Key words: human stem cells, *in vitro* culture, transplantology.

WSTĘP

Istotny postęp w dziedzinie hodowli embrionalnych komórek macierzystych oraz odkrycie, że komórki macierzyste izolowane z dorosłego organizmu mogą różnicować w rozmaite typy komórek, doprowadziły do wzrostu zainteresowania zagadnieniem plastyczności tych komórek i ich potencjalnym wykorzystaniem w transplantologii. Możliwość hodowli *in vitro* pluripotencjalnych komórek macierzystych izolowanych z zarodka ludzkiego spotkała się zarówno z dużym entuzjazmem, jak i krytyką. Bardzo ekscytująca wydaje się szansa praktycznego wykorzystania komórek macierzystych w klinice do zastępowania tkanek w organizmie ludzkim; zrozumiałe są jednak wątpliwości natury etycznej [5, 8]. Mniej kontrowersji wzbudzają komórki macierzyste pochodzące z tkanek dojrzałych organizmów. Istnieje nadzieja, że dotychczas słabo poznana plastyczność tego typu komórek umożliwi ich hodowlę oraz namnażanie w celu autologicznego przeszczepienia [36].

Obecnie wykorzystywane są trzy źródła pozyskiwania komórek macierzystych. Pierwszym z nich są ludzkie embriony. Komórki te izoluje się bezpośrednio z wewnętrznej masy blastocysty ludzkiej, tzw. węzła zarodkowego, z embrionów nie wykorzystanych w leczeniu bezpłodności, po uzyskaniu zgody rodziców [11, 40]. W przypadku sztucznych poronień komórki te można izolować z tkanek płodu, najczęściej z zawiązków jąder lub jajników [32]. Drugim źródłem komórek macierzystych są: szpik kostny, skóra, mięśnie, nabłonki, mózg oraz krew dojrzałego organizmu [2, 20]. W porównaniu z embrionalnymi pluripotencjalnymi komórkami macierzystymi, komórki te cechuje dużo mniejszy potencjał proliferacyjny. Kolejną przeszkodą jest ograniczenie ich występowania do kilku miejsc w dojrzałym organizmie. Dodatkowo komórki pozyskiwane z tego źródła nie są zdolne do różnicowania w rozmaite typy tkanek, a ich niewielka liczba, malejąca wraz z wiekiem, jest przyczyną trudności w ich izolacji. Przykładowo u noworodków jedna komórka macierzysta szpiku kostnego, określana również mezenchymalną komórką macierzystą (MSCs), przypada na 10 000 komórek szpiku, liczba ta spada do 1 na 100 000 u nastolatków i do 1 na 400 000 u 50-latków. U 80-latków można znaleźć tylko jedną komórkę macierzystą na 1 do 2 milionów komórek szpiku. Ponadto w miarę starzenia komórki te wykazują większą ilość uszkodzeń DNA, co znacznie obniża ich żywotność.

Trzecim źródłem komórek macierzystych jest krew pępowinowa [15]. Pierwsza wzmianka o tym, że krew pępowinowa płodu może mieć zastosowanie kliniczne pochodzi z roku 1972, kiedy to bracia Norman i Milton Edge donieśli o skutku podania krwi pępowinowej choremu na białaczkę – po kilku tygodniach we krwi pacjenta pojawiły się erytrocyty wywodzące się z komórek macierzystych dawcy. Przeszczep krwi pępowinowej wiąże się jednakże z pewnym ryzykiem, nie można bowiem wykluczyć prawdopodobieństwa, że zawarte w krwi komórki macierzyste mają wady genetyczne, mogące spowodować chorobę biorcy.

Dodatkowym ograniczeniem w stosowaniu klinicznym krwi pępowinowej jest stosunkowo mała liczba komórek macierzystych w jednej próbce. Obecnie pracuje się nad zwiększaniem liczby komórek w pobranej próbce wykorzystując czynniki

wzrostu i odpowiednie pożywki. Podejmowane są również próby naprawy uszkodzonego materiału genetycznego. Nadzieja na szersze zastosowanie krwi pępowinowej w transplantologii i inżynierii tkankowej wydaje się zatem uzasadniona [16].

HISTORIA BADAŃ

Badania dotyczące komórek macierzystych sięgają początków lat osiemdziesiątych, kiedy to w 1981 roku, w dwóch niezależnych ośrodkach – w Kalifornii i Anglii, wyizolowano nietypowy rodzaj komórek z wnętrza 100-komórkowej blastocysty mysiej. Komórki te były identyczne i każda z nich mogła dać początek wszystkim typom komórek. Warunkiem praktycznego wykorzystania potencjału komórek macierzystych jest ich utrzymanie w hodowli w stanie niezróżnicowanym: stąd cały szereg badań nad przeróżnymi kombinacjami czynników wzrostu i białek osocza, utrzymujących fenotyp komórek niezróżnicowanych.

Pierwszą hodowlę ludzkich embrionalnych komórek macierzystych przeprowadził w 1998 roku James A. Thomson po wcześniejszych udanych próbach izolacji komórek macierzystych z embrionów rhesusa [40]. Z kolei John D. Gearhart wyizolował embrionalne komórki macierzyste z fragmentów płodowych zawiązków jajników i jąder [33].

Inspiracją do badań ludzkich komórek macierzystych były wcześniejsze odkrycia istnienia komórek macierzystych zwierząt [28]. Gerard Bain i Dawid Gottlieb z *Washington School of Medicine* wykazali, że mysie embrionalne komórki macierzyste potraktowane witaminą A różnicują w neurony. Z kolei Meri Firpo [28] z *National Jewish Medical and Research Center* w Denver oraz Gordon Keller donieśli, że hodowla embrionalnych komórek macierzystych w obecności specyficznych czynników wzrostu stymuluje różnicowanie we wszystkie typy komórek krwi.

Loren J. Field z *Indiana University School of Medicine* opracował metodę różnicowania kardiomiocytów pozwalającą uzyskiwać populację komórek z 99% czystością [28]. Do mysich embrionalnych komórek macierzystych wprowadził gen oporności na określony antybiotyk, ulegający ekspresji jedynie w kardiomiocytach. Po okresie pozwalającym na zróżnicowanie komórek poddawał je działaniu określonej dawki antybiotyku, eliminując w ten sposób komórki niemające genu oporności. Po przeszczepieniu otrzymanych kardiomiocytów do mięśnia sercowego myszy stwierdził, że komórki te podjęły funkcje.

Po tym, jak Terrence Deacon z *Harvard Medical School* przeszczepił embrionalne komórki macierzyste do mózgu dorosłych myszy i zauważył, że wiele z tych komórek przyjęło kształt typowy dla neuronów, a co więcej, niektóre z nich produkowały enzymy szlaku syntezy neurotransmitera – dopaminy, rozpoczęto intensywne badania nad ludzkimi embrionalnymi komórkami macierzystymi, mając nadzieję poznania sposobów regulacji ekspresji genów kierujących różnicowaniem komórek macierzystych.

CECHY KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Jak dotąd sformułowano wiele definicji komórek macierzystych. Po 30 latach badań pytanie: „czym jest komórka macierzysta” nadal wywołuje liczne kontrowersje. Wspólnym mianownikiem tych koncepcji jest podkreślenie dwóch właściwości komórek macierzystych: są one zdolne do nieograniczonych podziałów przez całą ontogenezę oraz mogą dawać początek co najmniej jednemu typowi wysoce zróżnicowanych komórek, czyli są zdolne do różnicowania [1, 23].

Zazwyczaj pomiędzy komórką macierzystą a jej ostatecznie zróżnicowanym potomstwem istnieje przejściowa populacja komórek zdeterminowanych, charakteryzująca się ograniczoną aktywnością proliferacyjną i określoną możliwością różnicowania. Komórki tej populacji często są określane komórkami przejściowo namnażającymi się. W sytuacji kiedy komórki macierzyste różnicują w jeden określony typ komórek, główną funkcją komórek populacji przejściowej jest zwiększanie liczby komórek zróżnicowanych. Oznacza to, że mimo zdolności komórek macierzystych do samoodnawiania się, komórki te stosunkowo rzadko ulegają podziałom [24].

Istnieją dwie strategie wyprowadzania z komórek macierzystych zróżnicowanego potomstwa: 1) komórka macierzysta dzieli się asymetrycznie, dając jedną komórkę potomną i jedną komórkę przeznaczoną do różnicowania; 2) komórka macierzysta dzieląc się daje początek komórkom macierzystym lub komórkom przeznaczonym do różnicowania. Zależy to od potrzeb organizmu i podlega ścisłej regulacji. Większość odnawiających się tkanek ssaków podlega tej drugiej strategii. Asymetria populacji ułatwia odpowiedź na rozmaite potrzeby fizjologiczne, np. po zranieniu konieczne jest zwiększenie liczby komórek krwi i keratynocytów [6, 42].

Utrzymanie puli komórek macierzystych podlega kontroli autonomicznych regulatorów komórkowych, które z kolei odpowiadają na sygnały płynące z zewnątrz [4]. Przykładem wewnątrzkomórkowych czynników regulatorowych są białka kontrolujące asymetryczne podziały, czynniki transkrypcyjne wpływające na ekspresję określonych genów, względnie tzw. zegary biologiczne odmierzające liczbę podziałów w przejściowo dzielącej się populacji. Dużą rolę odgrywa również adhezja komórek do macierzy zewnątrzkomórkowej odbywająca się za pośrednictwem wielu klas receptorów, spośród których najlepiej scharakteryzowane są integryny. Stwierdzono, że wysoka ekspresja β -integryn konieczna jest dla utrzymania puli macierzystych komórek naskórka. Białka te m.in. biorą udział w regulacji procesu różnicowania keratynocytów poprzez kinazy MAP [35].

TYPY KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Kilka godzin po zapłodnieniu komórka jajowa dzieli się na identyczne totipotencjalne komórki, co oznacza, że każda z nich umieszczona ponownie w macicy może rozwinąć się w zarodek. Maksymalnie cztery dni po zapłodnieniu i kilku cyklach podziałowych totipotencjalne komórki zaczynają procesy specjalizacji prowadzące do utworzenia kulistej blastocysty, w której można wyróżnić zewnętrzną warstwę komórek tworzących blastodermę i grupę komórek nazywaną węzłem zarodkowym lub wewnętrzną masą komórkową (ICM – ang. *inner cell mass*). Komórki węzła zarodkowego biorą udział w tworzeniu łożyska oraz tkanek wspomagających rozwój zarodka. Komórki wewnętrznej masy stanowią populację komórek pluripotencjalnych, które, w przeciwieństwie do komórek totipotencjalnych, po przeniesieniu do macicy nie mogą rozwinąć się w zarodek, ale mają zdolność do różnicowania w komórki macierzyste zdeterminowane do spełniania określonych funkcji. Przykładem są komórki macierzyste krwi dające początek erytrocytom, trombocytom lub leukocytom czy komórki macierzyste skóry, z których powstają keratynocyty czy fibroblasty [22]. Komórki macierzyste o zdeterminowanym potencjale określane są mianem komórek multipotencjalnych. Wyzwaniem dla inżynierii tkankowej jest stworzenie typu komórek macierzystych o ściśle określonym przeznaczeniu, co pozwoliłoby na kliniczne ich zastosowanie.

Krokiem w tym kierunku były prace przeprowadzone przez zespół prof. Pery, który z ludzkiej blastocysty wyizolował komórki pluripotencjalne, spośród których wyróżnił neuronalne komórki progenitorowe [41]. Doświadczenia przeprowadzono na trzech typach komórek: embrionalnych komórkach macierzystych (ES – izolowanych z węzła zarodkowego blastocysty ludzkiej), embrionalnych komórkach germinalnych (EG – z pierwotnych komórek germinalnych gonad) oraz zarodkowych komórkach rakowych izolowanych z potworniaków, różniących się pod względem morfologii, ekspresji markerów powierzchniowych i wymagań hodowlanych, które mogą odzwierciedlać podstawowy stan biologiczny lub być następstwem hodowli w warunkach *in vitro*. Podstawowa różnica między w/w liniami polega na tym, że ES i EG są komórkami diploidalnymi, natomiast komórki rakowe są aneuploidalne, co czyni je niewłaściwym modelem dla badań prawidłowego rozwoju. Pera i współl. [41] z czterech blastocyst ludzkich wyizolowali węzły zarodkowe; w dwóch przypadkach hodowla komórek macierzystych zakończyła się sukcesem. Komórki hodowano na warstwie odżywczej, którą stanowiły mysie embrionalne fibroblasty, co zapewniało dostarczenie do hodowli niezbędnych czynników wzrostowych. Stworzone warunki pozwoliły na utrzymanie fenotypu komórek macierzystych w dzielącej się populacji, czego dowodem było wykazanie pluripotencjalności komórek o stabilnym kariotypie po więcej niż 40 pasażach. Komórki były zdolne do różnicowania w kierunku wszystkich trzech warstw germinalnych (ekto-, endo- i mezodermalnej).

W hodowli *in vitro* obserwuje się różnicowanie komórek w przypadku braku w środowisku hodowlanym czynników stymulujących samoodnawianie się komórek macierzystych. Jak dotąd natura tych sygnałów nie została zdefiniowana, można jednak przypuszczać, że są wydzielane przez fibroblasty warstwy odżywczej na poziomie pozwalającym na utrzymanie fenotypu komórek pluripotencjalnych. Hodowla komórek w dużych gęstościach przez okres 4–7 tygodni przeciwdziałała spontanicznemu różnicowaniu komórek podczas pasażowania. W hodowli zidentyfikowano komórki barwiące się pozytywnie na obecność neurofilamentów i NCAM, co wskazywało na ich różnicowanie w kierunku ektodermy, a także barwiące się na desminę – manifestujące mezodermalne pochodzenie. Komórki pluripotencjalne charakteryzuje aktywność alkalicznej fosfatazy oraz ekspresja licznych markerów powierzchniowych, do których należą SSEA-3 (ang. *stage specific embryonic antigen-3*), TRA-1-60, TRA-1-81 i GCTM-2. Komórki macierzyste wyróżnia ekspresja i aktywność telomerazy.

PRÓBY KLINICZNE

Inżynieria tkankowa rozwinęła się w odpowiedzi na wzrastające zapotrzebowanie na tkanki i organy dla transplantacji. Mimo tego, że wciąż na wiele pytań poszukuje się odpowiedzi, dziedzina ta nie ogranicza się już tylko do laboratorium [3, 18, 21, 43]. Skóra wyhodowana *in vitro* jest już dostępna komercyjnie, tkanka chrzęstna poddawana jest pierwszym próbom klinicznym, w fazie badań klinicznych są również komórki kości i wątroby [12, 29, 31, 37]. Kliniczne zastosowanie hodowanych komórek macierzystych niesie możliwość wydajnej poprawy procesów regeneracji tkanek, integracji przeszczepianych komórek dawcy z komórkami biorcy, co w przyszłości mogłoby całkowicie wyeliminować konieczność stosowania terapii immunosupresyjnych po przeprowadzonym przeszczepie [14].

Ostatnio lista tkanek, które można wyprowadzić z komórek macierzystych, została wzbogacona o tkanki centralnego i obwodowego układu nerwowego [10]. Próby kliniczne przeprowadzono na grupie pacjentów z chorobą Parkinsona. Do mózgu przeszczepiono neurony dopaminergiczne wyprowadzone z płodowych tkanek ludzkich. Wykazały one niezwykle wysoką przeżywalność w obrębie przeszczepu, co dowiodło, że komórki te są zdolne do przeżycia i dojrzwania w ludzkim mózgu. Próby terapii komórkowej prowadzi się również na grupie chorych z zespołem Huntingtona, a planuje podjąć w przypadku schorzeń związanych z uszkodzeniami osłonki mielinowej (np. w stwardnieniu rozsianym) [39].

SKÓRA

Naskórek jest wielowarstwowym epitelium, przeżywającym dzięki procesom samoodnawiania się. Keratynocyty warstwy bazalnej są obdarzone aktywnością proliferacyjną, regularnie przechodzą podziały mitotyczne, różnicują i migrują w kierunku zewnętrznych warstw skóry, zastępując terminalnie zróżnicowane, zrogowaciałe i złuszczone komórki. Naskórek ludzki jest całkowicie odnawiany co 4 tygodnie, a więc muszą być w nim obecne komórki macierzyste, które podczas podziałów zachowują stałą liczbę i dają początek populacji przejściowo namnażających się komórek, charakteryzującej się wysokim potencjałem proliferacyjnym tylko przez ograniczony okres, której komórki ostatecznie różnicują [34, 35]. Obie populacje zlokalizowane są w warstwie bazalnej i w mieszkach włosowych. Populacja przejściowo namnażających się komórek ma decydujące znaczenie w procesie gojenia się ran, jest zatem oczywiste, że aby móc wykorzystywać keratynocyty hodowane *in vitro* należy w pierwszym rzędzie stworzyć środowisko hodowlane pozwalające utrzymać w hodowli komórki macierzyste.

Pojedyncze keratynocyty warstwy bazalnej dają początek klonom, co umożliwia zbadanie ich potencjału proliferacyjnego. Dzięki zastosowaniu analizy klonalnej wyizolowano z naskórka ludzkiego trzy typy keratynocytów, charakteryzujące się różnym potencjałem proliferacyjnym: holoklony, meroklony i paraklony [27].

Holoklony są dużymi klonami (po 14 dniach hodowli w kolonii znajduje się 200 000 komórek) o bardzo gładkiej i wyrównanej powierzchni, uformowanym przez migrujące komórki, nie wykazujące ekspresji inwolukryny (markera różnicowania keratynocytów). Po pasażu komórki wyizolowane z holoklonów dają początek takim samym, dużym siostrzanym klonom z wydajnością 100%. Komórki tworzące holoklony mogą przechodzić ponad 140 podziałów (10^{40} komórek), co wystarcza do utworzenia epitelium pokrywającego kilkakrotnie powierzchnię ciała dorosłego człowieka, którego naskórek zawiera około 8×10^{10} keratynocytów. Uważa się więc, że keratynocyty warstwy bazalnej, z których pochodzą holoklony są właściwymi komórkami macierzystymi, charakteryzującymi się bardzo dużym potencjałem proliferacyjnym.

Paraklony są tworzone przez komórki przejściowo dzielące się, w porównaniu z bazalnymi keratynocytami mają bardzo ograniczony potencjał proliferacyjny, maksymalnie mogą przechodzić 15 podziałów. Są tworzone przez duże, keratynizujące, terminalnie zróżnicowane komórki, wykazujące ekspresję inwolukryny.

Meroklony są tworzone przez pośredni typ komórek i z tego powodu są rezerwuarem populacji przejściowo namnażających się komórek.

Uważa się, że przejście z holoklonu do meroklonu, a następnie paraklonu jest jednokierunkowym, nieodwracalnym procesem, który zarówno podczas naturalnego starzenia się organizmu, jak i podczas pasażowania komórek w hodowli przebiega powoli. Niestety, przy niezachowaniu właściwych warunków hodowlanych proces ten przebiega znacznie szybciej. Zatem w przypadku hodowli keratynocytów do autologicznego przeszczepiania w celu zamknięcia rany niezmiernie ważne jest stałe

monitorowanie jakości hodowli ze szczególnym zwróceniem uwagi na parametry świadczące o obecności holoklonów w hodowli, okresowa analiza klonalna pod kątem potencjału klonogennego i proliferacyjnego oraz określenie procentu nierozwiniętych kolonii w czasie hodowli.

Ponieważ hodowla i przeszczepianie autologicznych komórek naskórka stały się niezwykle skuteczną metodą stosowaną w gojeniu ran, pojawiły się spekulacje na temat możliwości wprowadzenia terapii genowej naskórka. Obecnie wiadomo, że macierzyste komórki epidermalne mogą być trwale transfekowane retrowiralnymi konstrukcjami, wykazującymi ekspresję cDNA ludzkiej Il-6 [27]. Metodą analizy klonalnej dowiedziono, że:

- 1) ekspresja wprowadzonych genów trwa przez cały czas życia populacji (ponad 150 podwojeń),
- 2) komórki macierzyste keratynocytów włączają do swego genomu co najmniej jedną kopię konstruktów genowych,
- 3) synteza egzogennych białek jest proporcjonalna do ilości zintegrowanych kopii genów,
- 4) transfekowane komórki epidermalne wprowadzone do organizmu myszy podejmują syntezę i wydzielają do krwi białko egzogenne.

KOMÓRKI MACIERZYZYSTE SZPIKU A SERCE

Idea naprawy uszkodzonego mięśnia serca komórkami donorowymi jest dosyć stara, ale próby znalezienia komórek spełniających określone wymagania jak dotąd kończyły się niepowodzeniem. Rozwiązanie przyniosło odkrycie grupy komórek wywodzących się ze szpiku kostnego [38].

Następstwem zawału serca jest zjawisko nekrozy kardiomiocytów, prowadzące do powstania blizny na uszkodzonym obszarze mięśnia serca, która znacznie utrudnia jego pracę. Idea wykorzystania komórek szpiku kostnego w likwidacji blizn pozawałowych ma swoje uzasadnienie. Po pierwsze, spośród komórek szpiku kostnego można wyróżnić komórki multipotencjalne, a więc takie, które mogą różnicować w określone typy komórek. W przypadku mięśnia sercowego multipotencjalne komórki szpiku mogą formować zarówno komórki mięśnia, jak i komórki naczyń krwionośnych, które wydatnie wspomagają zasiedlanie blizny pozawałowej. Po drugie, komórki szpiku pobierane są od osobników dorosłych, tym samym wyeliminowany zostaje problem etyczny, który istnieje w przypadku, gdy komórki pochodzą z embrionów. Po trzecie, leczenie pacjenta autologicznymi komórkami wyklucza problem odrzucania przeszczepu. Przeszczep do blizny pozawałowej komórek szpiku, w których zaindukowano ekspresję białek mięśni, przyniósł poprawę funkcjonowania serca. Wymienione cechy czynią komórki szpiku idealnymi kandydatami do odtwarzania struktury serca i poprawy jego funkcji po zawale [17]. Ograniczeniem jest fakt, iż główną funkcją komórek macierzystych szpiku kostnego jest tworzenie komórek krwi. Dodatkowo, multipotencjalne komórki u osobników dorosłych stanowią jedynie

niewielką frakcję puli komórek szpiku, ponadto większość z nich znajduje się na różnych etapach różnicowania w kierunku komórek układu krwionośnego. Należy pamiętać, że komórki macierzyste już zdeterminowane nie będą brały udziału w procesach odtwarzania ściany myocardium. Wydaje się, że ominięciem wspomnianych przeszkód byłoby bezpośrednie wyizolowanie multipotencjalnych komórek i przeszczepienie ich do mięśnia serca. Zadania tego podjęła się grupa prof. Anwersy z *New York Medical College*, której udało się zidentyfikować multipotencjalne komórki szpiku na podstawie ekspresji białka c-Kit i braku ekspresji białka Lin, kombinacji definiującej macierzyste komórki szpiku [25]. Badania przeprowadzono na modelu zwierzęcym ze sztucznie wywołanym zawałem mięśnia sercowego. Z organizmu myszy wyizolowano komórki donorowe, które następnie transfekowano białkiem GFP (ang. *green fluorescent protein*). Po kilku godzinach od wywołania zawału do zdrowej tkanki otaczającej bliznę pozawałową wprowadzono multipotencjalne komórki szpiku. Po 9 dniach wykazano adaptację komórek donorowych do nowego środowiska. Ponad połowa uszkodzonej tkanki mięśniowej została zasiedlona przez komórki wykazujące charakterystyczne cechy kardiomiocytów, komórek mięśni gładkich i endotelialnych. Zatem komórki wprowadzone w obszar okołobliznowy różnicowały się w trzy główne typy komórek, niezbędne w procesach naprawy serca. Sukcesem zakończyły się również próby identyfikacji białek związanych z aktywacją ekspresji genów specyficznych dla komórek mięśniowych. Nowo powstałe komórki w uszkodzonym obszarze kontynuowały proliferację, poprawiając funkcjonowanie mięśnia sercowego.

PODSUMOWANIE

Istnieją rozmaite źródła komórek dla inżynierii tkankowej [13]. Każde z nich ma swoje wady i zalety. Jedną z najlepszych obecnie metod jest pobieranie komórek autologicznych i namnażanie w hodowlach *in vitro*. W tym przypadku wyklucza się problem odpowiedzi immunologicznej po przeprowadzonej transplantacji, prowadzącej do odrzucenia przeszczepu, ponieważ komórki są pobierane bezpośrednio od pacjenta. Niestety, metoda ta ma liczne ograniczenia. W wielu przypadkach związanych z martwicą tkanek brakuje komórek nadających się do pobrania. W stanach chorobowych lub u starszych pacjentów komórki nie kwalifikują się do autoprzeszczepu. Alternatywą jest przeprowadzenie allo- lub ksenoprzeszczepów, co jednak wiąże się z ryzykiem transmisji patogenów. Obiecujące zatem wydaje się wprowadzenie do inżynierii tkankowej komórek macierzystych [26]. Wyzwaniem dla biologów jest zbadanie obecności komórek macierzystych lub progenitorowych we wszystkich typach tkanek; konieczny jest rozwój metod izolacji, oczyszczania i zbadania proliferacji komórek macierzystych, określenie natury dróg sygnałowych determinujących bezpośrednie różnicowanie komórek w określonym kierunku, zwłaszcza przed planowaną implantacją,

co prawdopodobnie wydajnie przyspieszy proces naprawczy [7, 19]. Ponadto, by móc wykonać przeszczep allogenicznych komórek macierzystych należało by poddać je modyfikacjom w celu uniknięcia odpowiedzi immunologicznej. Idealnym rozwiązaniem wydaje się stworzenie uniwersalnej linii komórek macierzystych ze zmodyfikowanymi genami układu HLA lub uzyskanie komórek identycznych pod względem antygenów zgodności tkankowej z komórkami biorcy poprzez transfer jąder komórkowych [9, 30, 44].

LITERATURA

- [1] BACH SP, RENEHAN AG, POTTEN CS. Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm. *Carcinogenesis* 2000; **21**(3): 469–476.
- [2] BIANCO P, GEHRON ROBEY P. Marrow stromal stem cells. *The Journal of Clinical Investigation* 2000; **105**: 1663–1668.
- [3] BREITBART AS, GRANDE DA, KESSLER R, RYABY JT, FITZSIMMONS RJ, GRANT RT. Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured periosteal cells. *Plast Reconstr Surg* 1998; **101**(3): 567–574.
- [4] BURDON T, CHAMBERS I, STRACEY C, NIWA H, SMITH A. Signaling mechanisms regulating self-renewal and differentiation of pluripotent embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs* 1999; **165**: 131–143.
- [5] CAHILL LS. Social ethics of embryo and stem cell research. *Womens Health Issues* 2000; **10**(3): 131–135.
- [6] CHEAH PY, CHIA W, YANG X. Jumeaux, a novel *Drosophila* winged – helix family protein, is required for generating asymmetric sibling neuronal cell fates. *Development* 2000; **127**: 3325–3335.
- [7] D'AMOUR K, GAGE FH. New tools for human developmental biology. *Nature Biotechnology* 2000; **18**: 381–382.
- [8] DENKER HW. Embryonic stem cells: an exciting field for basic research and tissue engineering, but also an ethical dilemma? *Cells Tissues Organs* 1999; **165**: 246–249.
- [9] DOMINKO T, MITALIPOVA M, HALEY B, BEYHAN Z, MEMILIE, McKUSICK B, FIRST NL. Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biology of Reproduction* 1999; **60**: 1496–1502.
- [10] FRISÉN J, JOHANSSON CB, LOTHIAN C, LENDAHL U. Central nervous system stem cells in the embryo and adult. *CMLS Cell Mol Life Sci* 1998; **54**: 935–945.
- [11] GEARHART J. New potential for human embryonic stem cells. *Science* 1998; **282** (5391): 1061–1062.
- [12] GRANDE DA, BREITBART AS, MASON J, PAULINO C, LASER J, SCHWARTZ RE. Cartilage tissue engineering: current limitations and solutions. *Clin Orthop* 1999; **367**: S176–185.
- [13] HEATH CA. Cells for tissue engineering. *Tibtech January* 2000; **18**: 17–19.
- [14] JOHNSTONE B, YOO JU. Autologous mesenchymal progenitor cells in articular cartilage repair. *Clin Orthopaedics and Related Research* 1999; **367S**: S156–S162.
- [15] KLINE RM. Krew pępowinowa – cudowny lek? *Świat Nauki* 2001; **6**(118): 20–28.
- [16] KLINE RM, BERTOLONE SJ. Umbilical cord blood transplantation: providing a donor for everyone needing a bone marrow transplant? *Southern Medical Journal* 1998; **9**(91): 821–828.

- [17] KLUG MG, SOONPAA MH, KOH GY, FIELD LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 1996; **98**: 216–224.
- [18] KOLLER MR, MANCHEL I, PALSSON B. Importance of parenchymal: stromal cell ratio for the *ex vivo* reconstitution of human hematopoiesis. *Stem Cells* 1997; **15**: 305–313.
- [19] LANZA RP, CIBELLI JB, WEST MD. Human therapeutic cloning. *Nature Medicine* 1999; **5**: 975–977.
- [20] LORD BI. The architecture of bone marrow cell populations. *Internat J Cell Cloning* 1990; **8**: 317–331.
- [21] MARTIN I, PADERA RF, VUNJAK-NOVAKOVIC G, FREED LE. *In vitro* differentiation of chick embryo bone marrow stromal cells into cartilaginous bone-like tissues. *J Orthop Res* 1998; **16**: 181–198.
- [22] McNIECE I, BRIDDELL R. *Ex vivo* expansion of hematopoietic progenitor cells and mature cells. *Exp Hematology* 2001; **29**: 3–11.
- [23] MOMMA S, JOHANSSON CB, FRISEN J. Get to know your stem cells. *Curr Opin Neurobiol* 2000; **10**(1): 45–49.
- [24] MORRISON SJ, SHAH NM, ANDERSON DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 1997; **88**: 287–298.
- [25] ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, JAKONIUK I, ANDERSON SM, LI B, PICKEL J, MCKAY R, NADAL-GINARD B, BODINE DM, LERI A, ANVERSA P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; **410**: 701–705.
- [26] PEDERSEN RA. Embryonic stem cells for medicine. *Scientific American* 1999; Nov: 18–23.
- [27] PELLEGRINI G, BONDANZA S, GUERRA L, DE LUCA M. Cultivation of human keratinocyte stem cells: current and future clinical applications. *Med Biol Eng Comput* 1998; **36**: 778–790.
- [28] REGALADO A. The troubled hunt for the ultimate cell. *Technology Review* 1998; **4**(101): 34–41.
- [29] RIORDAN SM, WILLIAMS R. Acute liver failure: targeted artificial and hepatocyte – based support of liver regeneration and reversal of multiorgan failure. *J Hepatol* 2000; **32**(1 Suppl): 63–76.
- [30] ROMANO G, MICHELI P, PACILIO C, GIORDANO A. Latest developments in gene transfer technology: achievements, perspectives, and controversies over therapeutic applications. *Stem Cells* 2000; **18**: 19–39.
- [31] SERVICE RF. Tissues engineers build new bone. *Science* 2000; **289** (5484): 1498–1500.
- [32] SHAMBLOTT MJ, AXELMAN J, LITTLEFIELD JW, BLUMENTHAL PD, HUGGINS GR, CUI Y, CHENG L, GEARHART JD. Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively *in vitro*. *Pnas* 2001; **98**: 113–118.
- [33] SHAMBLOTT MJ, AXELMAN J, WANG S, BUGG EM, LITTLEFIELD JW, DONOVAN PJ, BLUMENTHAL PD, HUGGINS GR, GEARHART JD. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 13726–13731.
- [34] SLACK JMW. Stem cells in epithelial tissues. *Science* 2000; **287** (5457): 1431–1433.
- [35] SMITH GH, CHEPKO G. Mammary epithelial stem cells. *Microsc Res Tech* 2001; **52**: 190–203.
- [36] SOLTER D, GEARHART J. Enhanced: putting stem cells to work. *Science* 1999; **283** (5407): 1468–1470.
- [37] STRAIN AJ, CROSBY HA. Hepatic stem cells. *Gut* 2000; **46**: 743–745.
- [38] SUSSMAN M. Hearts and bones. *Nature* 2001; **410**: 640–641.
- [39] SVENDSEN CN, SMITH AG. New prospects for human stem-cell therapy in the nervous system. *Tins* 1999; **22**: 357–364.

- [40] THOMSON JA, ITSKOVITZ-ELDOR J, WAKNITZ MA, SWIERGIEL JJ, MARSHALL VS, JONES JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; **282** (5391): 1145–1147.
- [41] TROUNSON A, PERA M. Potential benefits of cell cloning for human medicine. *Reprod Fertil Dev* 1998; **10**: 121–125.
- [42] WATT FM, HOGAN BLM. Out of eden: stem cells and their niches. *Science* 2000; **287** (5457): 1427–1430.
- [43] WEISSMAN IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 2000; **287** (5457): 1442–1446.
- [44] YEAGER TR, REDDEL RR. Constructing immortalized human cell lines. *Curr Opin Biotechnol* 1999; **10**(5): 465–469.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 29.06. 2001 r.

Przyjęto: 30.01. 2002 r.

Adres autora: 30-387 Kraków, ul. Gronostajowa 7

e-mail: Justyna@mol.uj.edu.pl

REGULACYJNA ROLA CUKRÓW. PERCEPCJA CUKRÓW I PRZEKAZYWANIE SYGNAŁU W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH*

SUGAR REGULATION AND SIGNALING IN THE PLANT CELLS

Iwona CIERESZKO

Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku

Streszczenie: Cukry są nie tylko głównymi, końcowymi produktami fotosyntezy, transportowanymi i magazynowanymi w różnych organach roślin, ale pełnią również funkcje regulacyjne. Zmiany stężenia cukrów w tkankach oddziałują na przebieg wielu procesów metabolicznych: fotosyntezę, oddychanie, biosyntezę białek, gospodarkę azotową, hamując lub wzmagając ich intensywność. Zmiany w zawartości cukrów wpływają także na ekspresję szeregu genów. Akumulacja cukrów w tkance powoduje z reguły represję genów kodujących białka strukturalne i enzymatyczne niezbędne w procesie fotosyntezy, niedobór cukrów natomiast wzmagają ich ekspresję. Geny kodujące białka enzymatyczne związane z metabolizmem sacharozy (syntaza sacharozy, inwertazy) oraz enzymy uczestniczące w syntezie skrobi (pirofosforylaza ADP-glukozy) są indukowane przez sacharozę i glukozę. W pracy dyskutowana jest rola heksokinazy oraz transporterów glukozy i sacharozy w percepcji cukrów i transdukcji sygnału w komórkach roślin wyższych.

Słowa kluczowe: ekspresja genów, glukoza, heksokinaza, regulacja metabolizmu, sacharoza, transdukcja

Summary: Sugars are not only the end products of photosynthesis, transporting forms and storage materials in some tissues, sugars also play regulatory function. Changes of sugar concentration in the tissue affect metabolic processes: photosynthesis, respiration, protein synthesis and nitrate assimilation. Changes in sugar content influence the expression of numerous genes. Sugars accumulated in the tissues often cause repression of photosynthetic genes while sugar starvation induce the same genes. Genes encoding enzymes involved in sucrose metabolism, eg. sucrose synthase, invertases and enzymes involved in starch synthesis, like ADP-glucose pyrophosphorylase, are induced by glucose and sucrose. The role of hexokinase, sugar transporters and other components in sugar signaling in plant cell is discussed in this review.

Key words: gene expression, glucose, hexokinase, metabolism regulation, sugar signaling, sucrose.

*Praca powstała w trakcie realizacji grantu KBN nr 6 P04C 019 20.

WSTĘP

Około 80% węgla wiązanego przez liście podczas fotosyntezy jest zużywane do syntezy węglowodanów, przede wszystkim skrobi i sacharozy, z pozostałej części są syntetyzowane aminokwasy i kwasy organiczne [19]. Skrobia i sacharoza są głównymi końcowymi produktami fotosyntezy i związkami magazynowanymi w różnych organach roślin. Sacharoza jest najczęściej transportowanym cukrem u roślin wyższych, choć obok sacharozy mogą być przemieszczane floemem także rafinoza, stachioza, werbaskoza, mannitol i sorbitol. Sacharoza może też pełnić rolę regulatora wzrostu i niektórych procesów metabolicznych poprzez zmiany w ekspresji genów decydujących o syntezie odpowiednich enzymów [4, 25, 44, 47, 50].

Synteza skrobi i sacharozy są procesami przebiegającymi w różnych przedziałach komórki; pierwszy zachodzi w chloroplastach, drugi w cytoplazmie; obydwa sacharydy powstają z tworzących się w cyklu Calvina triozofosforanów, pierwotnych produktów fotosyntezy [1]. Wyprodukowana w liściach sacharoza jest w większości transportowana floemem do miejsc zużycia, np. korzeni, pędów kwiatowych. Na niewielkie odległości, np. z komórki do komórki, sacharoza może być transportowana drogą apoplastyczną lub symplastyczną, przez plazmodesmy, a także w drodze dyfuzji prostej lub ułatwionej [13, 50]. Transport sacharozy drogą apoplastyczną, jak również przemieszczanie glukozy i fruktozy w obrębie komórki wymaga pokonania bariery błon plazmatycznych i zachodzi dzięki istnieniu szeregu sprawnych przenośników cukrów zlokalizowanych zarówno w plazmolemie, jak i tonoplaście [2, 34, 41]. Najczęściej spotykanym rodzajem transportu aktywnego jest ko-transport (symport) protonu i heksozy lub sacharozy [2, 3, 34].

W cytoplazmie komórek tkanek нефotosyntetyzujących sacharoza jest wykorzystywana w procesach oddychania, syntezy polisacharydów strukturalnych i materiałów zapasowych. W reakcjach rozkładu sacharozy uczestniczą enzymy z grupy inwertaz (β -fruktofuranozydaz, EC 3.2.1.26): inwertaza kwaśna (zlokalizowana w ścianie komórkowej lub w wakuoli) oraz cytozolowa inwertaza obojętna (zasadowa) i syntaza sacharozy (UDP-glukoza:D-fruktozo-2-glukozylo-transferaza, EC 2.4.1.13) [1, 11]. Produktem rozkładu sacharozy przez inwertazy są glukoza i fruktoza, które muszą ulec fosforylacji, aby uczestniczyć w dalszych przemianach metabolicznych.

Glukoza jest fosforylowana w reakcji katalizowanej przez niespecyficzną heksokinazę (EC 2.7.1.1) lub glukokinazę (EC 2.7.1.2); fosforylacja fruktozy wymaga specyficznej fruktokinazy (EC 2.7.1.4) [1]. W wyniku hydrolizy sacharozy katalizowanej przez syntazę sacharozy powstaje fruktoza oraz UDP-glukoza, która może być kierowana bezpośrednio do syntezy polisacharydów strukturalnych lub polisacharydów zapasowych [1, 11].

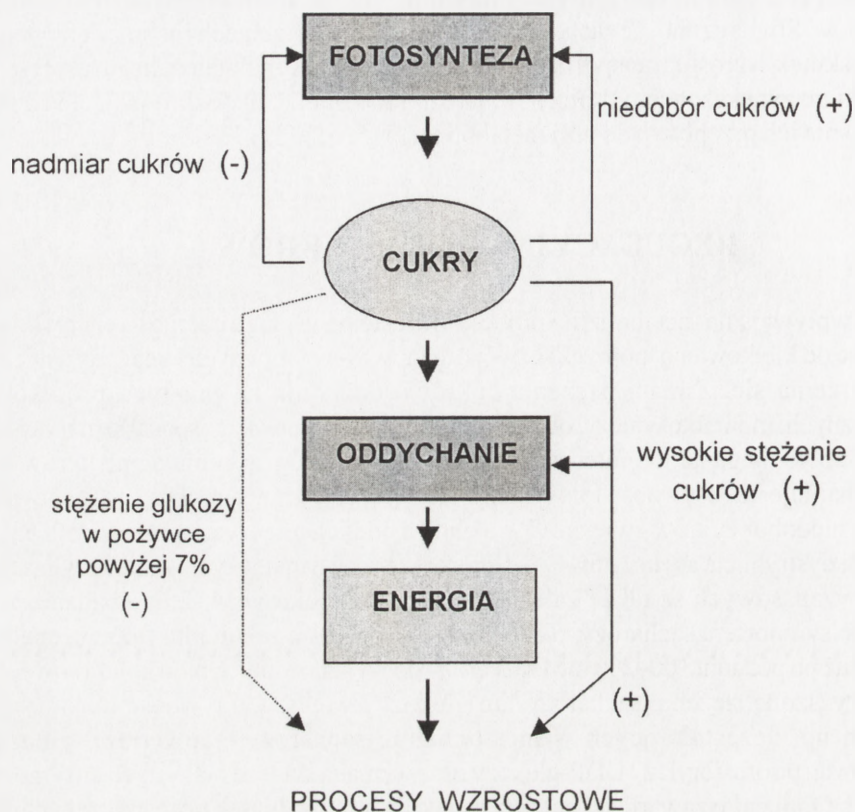
Sacharoza oraz produkty jej rozkładu są często kumulowane w tkankach pod wpływem niekorzystnych warunków środowiskowych: w stresie wodnym [10], wywołanym niską temperaturą [10, 16, 26] czy przy niedoborze składników mineralnych [5, 6, 31]. Pod wpływem chłodu zawartość cukrów w liściach może wzrastać nawet

10-krotnie [16]. Pełnią one prawdopodobnie funkcje osmoregulatorów i krioprotektantów. Stwierdzono, że sacharoza gromadzi się w korzeniach roślin z deficytem fosforu wskutek wzrostu transportu z liści; jednoczesna kumulacja cukrów prostych jest wynikiem zwiększonej hydrolizy sacharozy lub/i obniżenia fosforylacji cukrów i zahamowania ich przepływu do puli metabolicznej [5, 6, 14, 31, 39].

REGULACYJNA ROLA CUKRÓW

Cukry wpływają na metabolizm i procesy wzrostowe w ciągu całego życia rośliny, poczynając od kiełkowania, poprzez rozwój organów wegetatywnych i generatywnych, aż do starzenia się. Zmiany stężenia cukrów oddziałują na przebieg procesów metabolicznych, m.in. fotosyntezy, oddychania, biosyntezy białek, gospodarki azotowej, hamując lub wzmagając ich intensywność (ryc. 1) [25, 53]. Akumulacja cukrów w tkankach hamuje intensywność fotosyntezy netto (P_N), a wzmagają procesy oddechowe, natomiast niedobór cukrów zwiększa P_N a obniża oddychanie (ryc. 1) [32, 47, 50, 53]. Transport i dystrybucja asymilatów w roślinie oraz procesy magazynowania i utylizacji związków zapasowych są także zależne od poziomu cukrów [4, 25]. Zbadano, że aktywność symportera sacharozy, niezbędnego w procesie załadunku floemu, spada znacząco już po podaniu 100–200 mM sacharozy do wyizolowanych błon komórkowych [4]. Podwyższone stężenie sacharozy lub glukozy zwiększa aktywność niektórych enzymów, np. uczestniczących w metabolizmie sacharozy – inwertazy, syntazy sacharozowej, pirofosforylasy UDP-glukozy oraz wzmagają syntezę białek tych enzymów [7, 10, 37]. Obniżenie zawartości cukrów redukuje poziom białek uczestniczących w syntezie skrobi, biosyntezie białek, redukcji azotu, rozkładzie sacharozy i procesie glikolizy [53]. Stwierdzono, że stężenie glukozy w podłożu wyższe niż 7% drastycznie obniża kiełkowanie i rozwój siewek *Arabidopsis thaliana*, natomiast podobne stężenia sacharozy mają znacznie mniejszy wpływ (ryc. 1) [20, 21, 25]. Zmiany zawartości sacharozy mogą wpływać na wzrost roślin, decydując zwłaszcza o stosunku pęd/korzeń i pośrednicząc w regulacji wielu procesów metabolicznych [13, 14, 25, 47, 50]. Sugerowano, że sacharoza może być cząsteczką sygnałową wywołującą zmiany w intensywności fotosyntezy [13, 32, 47], rozkładu asymilatów [4], oddychania i procesów z nim związanych, zwłaszcza w warunkach stresowych [14, 50].

Regulacja procesów metabolicznych przy udziale sacharozy (oraz innych cukrów) następuje poprzez zmiany w ekspresji genów decydujących o syntezie odpowiednich enzymów [24, 32, 43, 44, 47, 53]. Regulacja ekspresji genów przez cukry została dokładnie opisana u bakterii i drożdży, u których w obecności glukozy była hamowana synteza enzymów rozkładających inne substraty (represja kataboliczna) [27, 35]. Podobny wpływ cukrów na ekspresję genów w komórkach roślinnych poznano znacznie później. Zmiany stężenia cukrów w tkankach roślinnych wpływają na ekspresję genów zarówno jądrowych, jak i plastydowych, choć te ostatnie z reguły reagują na cukry znacznie wolniej [25]. Podwyższenie stężenia cukrów z reguły powoduje represję genów kodujących białka uczestniczące w procesie fotosyntezy (w tym szybsza represja



RYCINA 1. Schemat przedstawiający regulację procesów metabolicznych i wzrostowych przez zmiany w stężeniu cukrów: (+) indukcja procesu, (-) represja procesu

następuje zwykle pod wpływem heksoz niż sacharozę), niedobór glukozy czy sacharozę natomiast wzmaga ekspresję tychże genów (ryc.1) [25, 32, 43, 53]. Geny kodujące enzymy uczestniczące w metabolizmie fotosyntetycznym, np. małą i dużą podjednostkę karboksylazy/oksygenazy RuBP (*rbcS*, *rbcL*), czy też białka antenowe fotosystemów (*cab*, *Lhcb*), ATPazy tylakoidowe, karboksylazę fosfoenolopirogronianową (*Pepc1*) i translokator triozyfosforanowy ulegają represji pod wpływem glukozy, sacharozę i czasami octanu [20, 21, 22, 25, 26, 44]. Geny kodujące enzymy metabolizmu sacharozę, takie jak: syntaza sacharozę (*Sus1*), inwertaza (*Ivr2*), pirofosforylaza UDP-glukozy (*Ugp*) oraz enzymy uczestniczące w syntezie skrobi, takie jak: pirofosforylaza ADP-glukozy (*ApL*, *ApS*), syntaza skrobi, są indukowane przez sacharozę i glukozę o stężeniach 100 mM i wyższych [8, 10, 24, 25, 46]. Jednakże maksymalna aktywacja innego genu kodującego syntazę sacharozę, *Sh1* oraz *Ivr1* kodującego inwertazę zachodzi, gdy dostęp cukrów rozpuszczalnych jest ograniczony (np. 10 mM glukozy)

[24, 25]. Remobilizacja skrobi i geny α -amylazy, fosfoglukomutazy czy plastydowej fosforylasy skrobiowej są indukowane przy niedoborze cukrów, podczas gdy ekspresja genu β -amylazy wzrasta przy nadmiarze sacharozy i heksoz [25, 28, 29]. Geny odpowiedzialne za syntezę elementów łańcucha oddechowego, takich jak: ubichinon, oksydaza cytochromowa, dehydrogenazy oraz niektórych enzymów glikolizy (dehydrogenaza aldehydu fosfoglicerynowego, PPI-fosfofruktokinaza) są indukowane przez egzogennie wprowadzane do tkanek roślinnych cukry [25]. Jednak u drożdży, w przeciwieństwie do roślin, wiele genów związanych z procesem glikolizy nie reaguje na zmiany stężenia węglowodanów [25]. Wykazano, że sacharoza dodana do pożywki hamuje syntezę enzymów proteolitycznych na zasadzie represji katabolicznej i może zaburzać proces dojrzewania białek zapasowych oraz powstawanie ciał białkowych podczas rozwoju zarodków somatycznych roślin motylkowatych [35]. Ponadto, cukry mogą regulować cykle podziałów komórkowych wpływając między innymi na ekspresję genów kodujących cykliny oraz syntezę cyklin [25].

Geny odpowiedzialne za syntezę enzymów związanych z reakcją roślin na atak patogenów (oraz inne stresy), inhibitora II proteinaz u ziemniaka i syntazy chalconowej, ulegają wzbudzeniu pod wpływem podwyższonego stężenia cukru [25, 49]. Sacharoza, przy udziale światła i cytokinin, wpływa na ekspresję genów kodujących enzymy uczestniczące w metabolizmie azotowym, np. reduktazę azotanową [36]. Wykazano, że ekspresja wielu innych genów regulowanych przez cukry może być również zmieniana przez takie czynniki, jak: natężenie światła [32, 36, 46], hormony [28, 45, 54], stężenie fosforanu [7, 8, 40] czy też zranienie lub warunki beztlenowe [10, 12].

PERCEPCJA CUKRÓW W KOMÓRCIE

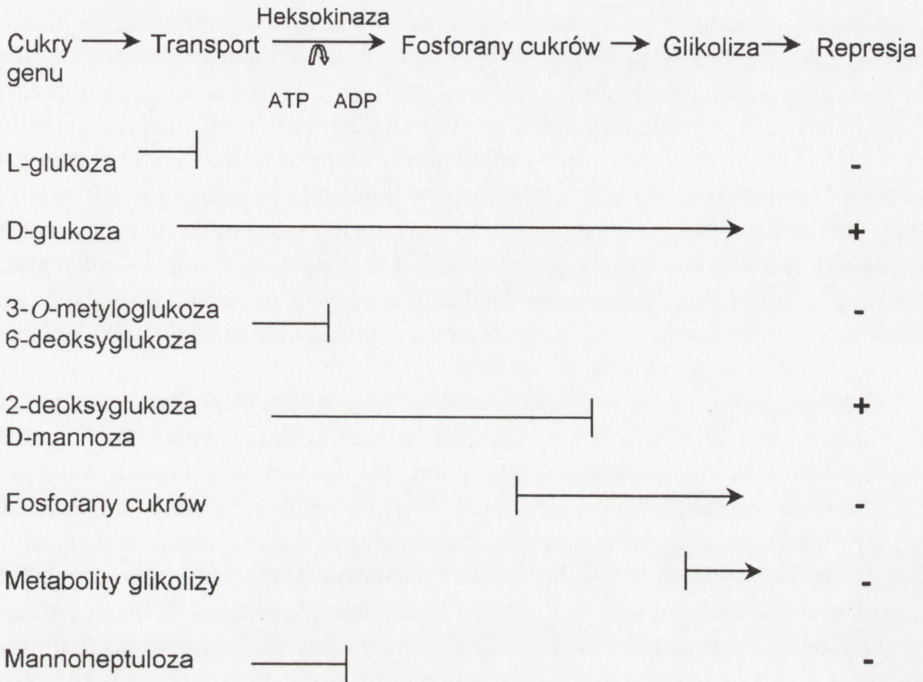
Percepcja cukrów przez komórkę roślinną może zachodzić w kilku etapach; zmiany w zawartości cukrów mogą być prawdopodobnie odczuwane już w apoplasmie, następnie podczas transportu przez błony, wewnątrz komórki (np. w cytozolu) i w trakcie przemian metabolicznych dostarczonych komórce cukrów [28]. Uważa się, że w odbiorze i przekazywaniu sygnału wywołanego przez cukry w tkankach roślinnych uczestniczą białka transportujące glukozę i sacharozę zlokalizowane w błonach komórkowych, a przede wszystkim heksokinaza, cytozolowy enzym katalizujący reakcję fosforylacji heksoz (ryc. 2, 3) [21, 43, 45, 51].

Rola heksokinazy, jako sensora cukrowego została po raz pierwszy poznana u drożdży, toteż w późniejszych badaniach z udziałem komórek roślinnych w dużym stopniu uwzględniano proponowane uprzednio mechanizmy [20, 38, 42]. Szereg dowodów na udział heksokinazy w percepcji cukru i przekazywaniu sygnału u roślin dostarczyły doświadczenia Jen Sheen i jej współpracowników [20, 21, 22, 42]. Wykazano, że D-glukoza, podawana wraz z prądem transpiracyjnym do liści lub dodawana do pożywki kultur tkankowych/protoplastów, powodowała represję wielu genów kodujących białka uczestniczące w procesie fotosyntezy, m.in. *cab* (*chlorophyll a/b-binding protein*),

rbcS, *rbcL* (geny kodujące małą i dużą podjednostkę karboksylazy/oksygenazy RuBP) [25, 26, 42, 44]. Glukoza jest substratem glikolizy i ulega fosforylacji, reakcji katalizowanej przez heksokinazę (ryc. 2). Analogi glukozy, takie jak: 3-*O*-metyloglukoza i 6-deoksyglukoza nie są fosforylowane przez heksokinazę, toteż po ich podaniu do tkanek nie obserwowano obniżenia poziomu wyżej opisanych transkryptów (ryc. 2). Sygnał represyjny podobny do D-glukozy wywołują natomiast 2-deoksyglukoza i D-mannoza; mogą być one fosforylowane z udziałem heksokinazy, lecz nie są metabolizowane (lub ulegają w minimalnym stopniu dalszym przemianom) i najczęściej gromadzą się w postaci fosforanów w cytozolu [20, 22, 23, 43, 45]. Potwierdzeniem roli heksokinazy w percepcji i przekazywaniu sygnału cukrowego były wyniki doświadczeń z zastosowaniem inhibitora tego enzymu, mannoheptulozy. Wykazano, że zablokowanie procesu fosforylacji znosiło represyjny sygnał powodowany przez D-glukozę (ryc. 2) [20, 43, 45]. Represja genów nie następowała, gdy podawano do tkanek roślinnych (i zawieszin protoplastów) fosforany cukrów i inne związki pośrednie lub produkty procesu glikolizy oraz L-glukozę, która nie była transportowana do komórek (ryc. 2) [22, 25, 26, 42, 45].

Następne dowody potwierdzające udział heksokinazy w percepcji cukrów i przekazywaniu sygnału uzyskano z zastosowaniem roślin transgenicznych rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*), a mianowicie roślin, do których wprowadzono gen heksokinazy (*AtHXK1*) w orientacji antysensownej (*antisense*) lub wielokrotnie zwiększano poziom jego transkryptu (nadekspresja, *overexpressed*) [21]. Transgeniczne siewki rzodkiewnika z podwyższoną ekspresją *AtHXK1* wykazywały wyższą wrażliwość na egzogennie podawaną glukozę (2–6%) niż rośliny kontrolne, wolniej kiełkowały i rosły, koleoptyle nie były zielone, miały obniżoną ekspresję genów fotosyntezy (*rbcS*, *cab*) [21]. Siewki *Arabidopsis* z obniżoną ekspresją *AtHXK1* (*antisense*) odznaczały się zmniejszoną wrażliwością na podwyższone stężenie glukozy, miały wówczas wydłużone hypokotyle, a ekspresja genów *rbcS* i *cab* była indukowana. Wyniki tych doświadczeń potwierdziły poprzednie sugestie o roli heksokinazy w odbiorze i transdukcji sygnału wysłanego przez cukry [20, 21, 22]. Ponadto nadekspresja *AtHXK1* (*overexpressed*) u transgenicznego pomidora hamowała wzrost roślin, obniżała fotosyntezę i przyspieszała starzenie się roślin [9]. Autorzy tej pracy sugerowali, że heksokinaza uczestniczy w percepcji endogennej poziomu cukrów w tkankach fotosyntetyzujących i tym samym pośredniczy w regulacji procesów metabolicznych wzrostu i rozwoju, zarówno u siewek jak i dojrzałych roślin [9].

Wielu innych badaczy również uznało i potwierdziło kluczową rolę heksokinazy w percepcji/przekazywaniu sygnału cukrowego [15, 28, 33, 43, 44, 45, 49]. Geny, kodujące syntezę enzymów cyklu glioksalanowego, liazy izocytrynianowej (*ICL*) i syntazy jabłczanowej (*MS*), ulegały represji pod wpływem cukrów, represja następowała po podaniu mannozy i 2-deoksyglukozy, podczas gdy 3-*O*-metyloglukoza nie miała wpływu na ekspresję tych genów [15]. Proces fosforylacji cukrów z udziałem heksokinazy jest prawdopodobnie włączony w transdukcję sygnału prowadzącego do akumulacji antocyjanów (jako reakcji na zwiększone stężenie sacharozy) w komórkach



RYCINA 2. Schemat przedstawiający rolę heksokinazy w percepcji i przekazywaniu sygnału cukrowego; (+) stymulacja procesu, (-) hamowanie procesu (zmodyfikowane wg [22])

winogron. Stwierdzono bowiem, że podanie mannozy i mannoheptulozy, inhibitora heksokinazy, zmniejszyło gromadzenie antocyjanów w tych komórkach [49]. W innych badaniach zaobserwowano, że kiełkowanie nasion *Arabidopsis thaliana* na pożywce zawierającej mannozę lub 2-deoksyglukozę było zahamowane, a dodanie mannoheptulozy odwracało ten efekt, natomiast podanie 3-O-metyloglukozę i 6-deoksyglukozę nie hamowało kiełkowania [33]. Ostatnie doniesienia wskazują, że cząsteczką sygnałową w tkankach roślinnych może być także trehaloza (do niedawna uważano, że cukier ten występuje jedynie u bakterii, drożdży, owadów [52]). Enzymy syntetyzujące i rozkładające trehalozę mogą ponadto pośredniczyć w transdukcji typowego sygnału cukrowego odbieranego przez heksokinazę (ryc. 3) [32, 38]. Okazuje się, że wprowadzając do roślin bakteryjne geny kodujące syntazę trehalozofosforanową można zwiększyć szybkość i wydajność fotosyntezy [32], a także poprawić tolerancję roślin na suszę i zasolenie [52].

Hipoteza udziału heksokinazy w percepcji cukrów i transdukcji sygnału wzbudziła również wiele kontrowersji i dyskusji na łamach czasopism naukowych. Dostarczone dowody uważane są przez niektórych autorów za niewystarczające [17]. Heksokinaza, jako enzym fosforylujący cukry proste, ma nieco inne znaczenie w tkankach roślinnych

(zwłaszcza w liściach) niż u heterotrofów, ponieważ roślina może czerpać fosforany heksoz bezpośrednio z przemian fotosyntetycznych (triozofosforany), bez udziału heksokinazy [38]. Stosowanie analogów cukrowych (np. mannozy) obniża pulę cytozolowego Pi, a wiadomo, że deficyt fosforu może regulować ekspresję niektórych genów [5, 7, 23, 40]. Po podaniu 2-deoksyglukozy, jak i mannozy zmniejszona zostaje zawartość metabolitów ufosforylowanych w tkankach, obniżona jest nie tylko pula ATP, ale i drastycznie spada poziom UDP-glukozy, co może mieć znaczący wpływ na regulację metabolizmu i ekspresję genów [23, 47]. Ponadto zarówno 2-deoksyglukoza, jak i mannoza są metabolizowane w tkankach (choć znacznie wolniej), stąd też związki te nie powinny być stosowane bądź stosowane z dużą ostrożnością w badaniach nad rolą heksokinazy w percepcji cukrów [23, 17].

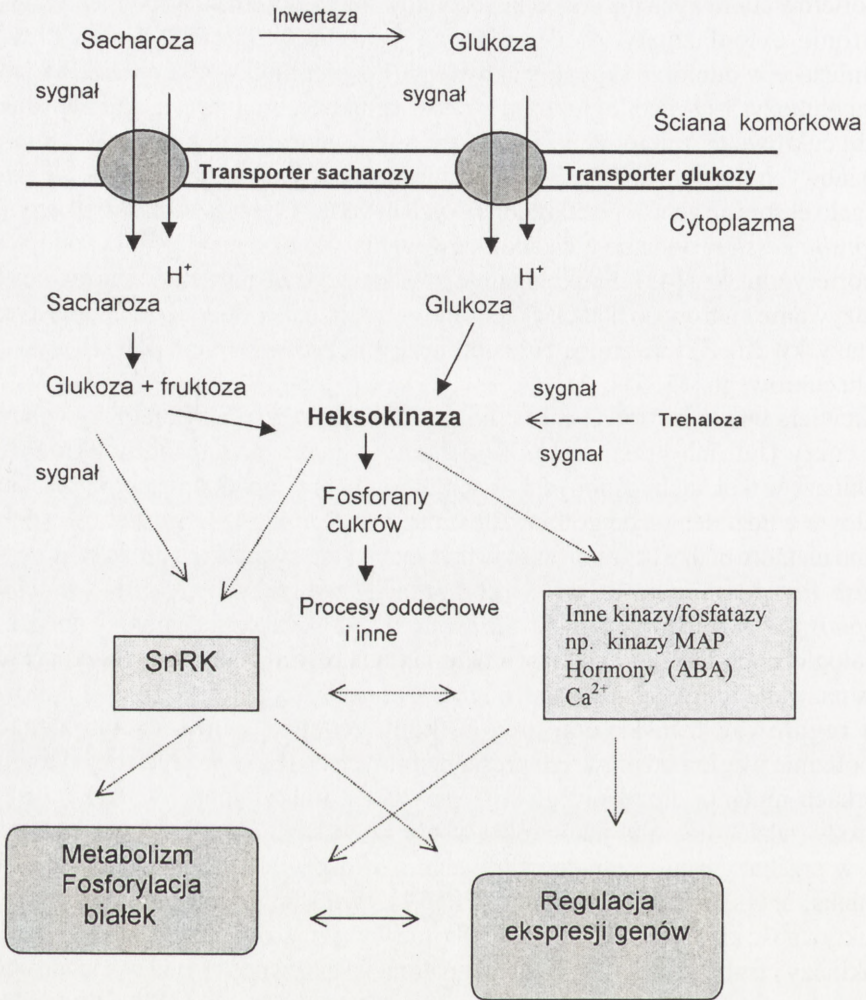
Większość przedstawionych wyników doświadczeń uzyskano podając cukry egzogenne do liści (kultur tkankowych), zaś naturalnie zwiększone wewnątrzkomórkowe (lub tylko w obrębie poszczególnych organelli) stężenie cukrów nie zawsze wywoływało podobne zmiany w regulacji ekspresji genów (czy metabolizmu). Należy jednak pamiętać, że omawiane w pracy zagadnienia są stosunkowo nowe, intensywnie badane u roślin dopiero od kilku lat. Wykorzystanie mutantów różnorodnie reagujących na cukry na pewno pomoże w dalszych badaniach określających drogi percepcji i przekazywania sygnału cukrowego. Przykładowo, wyselekcjonowano rośliny *Arabidopsis thaliana* ze zmniejszoną wrażliwością lub nie reagujące na podwyższenie poziomu cukrów w podłożu, są to mutanty: *cai* (*carbohydrate insensitive*), *sun* (*sucrose-uncoupled*), *sis* (*sucrose insensitive*), *gin* (*glucose insensitive*), *rsr* (*reduced sugar response*), jak również mutanty o wzmożonej wrażliwości na cukier, m.in. *gss* (*glucose super sensitive*) i *sss* (*sucrose super sensitive*) [45]. Interesującym mutantem jest *mig* (*mannose insensitive germination*), mutant *Arabidopsis*, którego nasiona kiełkują w obecności D-mannozy, odmiennie niż u typu dzikiego [33]. Mutant *mig* powinien wykazywać defekty w aktywności/syntezie heksokinazy, a jednak koduje fruktokinazę², potwierdzając tym samym udział fosforylacji heksoz w procesie transdukcji sygnału cukrowego [38, 45].

W percepcji cukrów i przekazywaniu sygnału w tkankach roślinnych mogą uczestniczyć również białka-transportery cukrów (głównie glukozy i sacharozy), zlokalizowane w błonach komórkowych (ryc. 3) [2, 3, 4, 27, 28, 41]. U drożdży funkcję sensorów glukozy pełnią m.in. membranowe białka ScSNF3 i ScRGT2, które reagują odpowiednio na niski i wysoki poziom tego cukru i wykazują szereg podobieństw do przenośników glukozy u drożdży i roślin [45, 51]. Obszerniejsze części C-końców łańcucha polipeptydowego tych białek po stronie cytoplazmatycznej (SNF3 – 303 aminokwasy) są prawdopodobnie niezbędne w transmisji sygnału glukozowego [27, 51]. Genom *Arabidopsis thaliana* zawiera 14 genów kodujących transportery monosacharydów i przynajmniej 7 genów kodujących przenośniki disacharydów, część z nich może pełnić podwójną rolę, uczestniczyć nie tylko w transporcie, ale i odbiorze sygnału cukrowego [51]. Nie dostarczono dotychczas bezpośrednich dowodów na udział przenośników w percepcji cukrów, choć stwierdzono, że wiele roślinnych

transporterów cukrowych ma podobnie rozbudowane części łańcucha polipeptydowego (po stronie cytoplazmatycznej), m.in. jak ScSNF3 i ScRGT2, białka drożdży uczestniczące w odbiorze sygnału cukrowego. Pośrednim dowodem może być to, iż analogi glukozy, 3-*O*-metyloglukoza i 6-deoksyglukoza, inicjują czasami transdukcję sygnału cukrowego, mimo iż nie są fosforylowane przez heksokinazę. W kulturach zawiesinowych *Chenopodium rubrum* dodanie zarówno glukozy, jak i 6-deoksyglukozy wzmagало ekspresję genów pozakomórkowych inwertaz i syntazy sacharozy, natomiast u *Chlorella kessleri* dodanie tych analogów wzmagало ekspresję genów kodujących transportery glukozy [45]. Funkcjonalnie związane z transporterami cukrowców (w przekazywaniu cukrów do tkanek akceptorów – rozładunek floemu) są apoplastyczne inwertazy kwaśne, które mogą również uczestniczyć w percepcji/przekazywaniu sygnału cukrowego [37, 51].

Niewiele wiadomo dotychczas o dalszym przekazywaniu sygnału wywołanego przez cukry (lub ich przemiany), a odebranego przez przENOŚniki cukrów lub/i heksokinazę w tkankach roślinnych. Następuje ono prawdopodobnie poprzez kaskady sygnałowe z udziałem szeregu kinaz/fosfatyz [12, 25, 45, 48]. Stosunkowo dobrze poznano niektóre białka uczestniczące w przekazywaniu sygnałów u drożdży, np. SNF1 (*sucrose non-fermenting-1*) czy w komórkach zwierzęcych, AMPK (*adenosine monophosphate-activated protein kinase*) [18, 45]. Znacznie później doszukano się analogicznych białek w niektórych komórkach roślinnych i grupę kodujących je genów nazwano SnRK (*SNF1-related protein kinases*) (ryc. 3) [18]. SNF-1 u drożdży mogą regulować transkrypcję genów kodujących enzymy uczestniczące w metabolizmie węglowodanów. Ekspresja roślinnych SnRK (np. z ryżu czy tytoniu) w komórkach mutanta drożdżowego *snf1* przywraca mu zdolność do wykorzystania sacharozy (także glicerolu) jako źródła węgla, co wskazuje, że SnRK może zastąpić SNF1 w przekazywaniu sygnału cukrowego u drożdży [18]. Transgeniczne rośliny ziemniaka, antysensowne do SnRK1 (PKIN1), tym samym mające obniżoną o ok. 80% aktywność kinazy białkowej (SAMS), nie wykazują zmian aktywności inwertaz, glukokinazy i fruktokinazy. Spada u nich natomiast aktywność syntazy sacharozowej i silnie zahamowana jest ekspresja genu kodującego ten enzym [18]. Ekspresja tego genu jest indukowana po podaniu do tkanek sacharozy, podczas gdy u roślin dzikiego typu *Sus4* jest silnie indukowana przez egzogenny cukier. Doświadczenia te wskazują na niezbędność SnRK1 w percepcji/transdukcji sygnału sacharozowego kontrolującego ekspresję genów syntazy sacharozy i prawdopodobnie innych genów (ryc.3) [17, 18]. Glukoza-6-fosforan, produkt reakcji katalizowanej przez heksokinazę, wpływa na aktywność kinazy SnRK1 u roślin, jak również białka SNF1 w komórkach drożdży [32].

Droga przekazywania sygnału cukrowego w tkankach roślinnych nie funkcjonuje w izolacji od szlaków transdukcji innych sygnałów, lecz stanowi integralną część rozprzestrzenionej sieci połączeń poza- i wewnątrzkomórkowych. Pewne etapy przekazywania sygnałów mogą być nawet wspólne, z wykorzystaniem tych samych przekaźników informacji lub/i katalizowanych przez podobne typy kinaz białkowych (ryc. 3) [12, 45, 48, 54]. Przykładowo, stwierdzono ścisłą zależność między drogami



RYCINA 3. W percepcji cukrów i przekazywaniu sygnału w tkankach roślinnych uczestniczą heksokinaza (enzym cytozolowy) lub/i przenośniki sacharozы i glukozy, zlokalizowane w błonach komórkowych. W transdukcji sygnału pośredniczą prawdopodobnie kinazy białkowe kodowane przez grupę genów SnRK (SNF1-related protein kinases) [18] lub inne kinazy białkowe, np. kinazy MAP (*mitogen-activated protein*); w przekazywaniu sygnału mogą brać udział fitohormony, np. kwas absycynowy (ABA) oraz jony wapnia. Odebrany sygnał o zmianach zawartości cukrów wpływa na ekspresję genów oraz przebieg procesów metabolicznych

transdukcji sygnału glukozy i etylenu badając mutanty etylenowe, *eto* (*ethylene-overproducing*) i *etr* (*ethylene-resistant*) oraz mutantą glukozowego, *gin* [54]. Reakcja roślin na podwyższenie lub obniżenie poziomu cukru zależy może również od innych hormonów, takich jak: kwas abscysynowy, gibereliny czy cytokiny [28, 36, 45], a także od warunków świetlnych i wielu czynników stresowych [12, 36, 45, 46]. Postulowany przez niektórych badaczy udział jonów wapniowych w transdukcji sygnału sacharozowego stwierdzono np. w komórkach batatów, podczas indukcji przez cukry genów kodujących sporaminę i β -amylazę [30]. W komórkach *Vitis vinifera* w procesie indukcji przez cukier biosyntezy antocyjanów uczestniczą zarówno Ca^{2+} , kalmodulina, jak i białka kinaz i fosfataz [49]. Dokładniejsze poznanie sugerowanych współzależności wymaga jednak wielu dalszych, intensywnych badań. Zastosowanie w badaniach wielu roślin transgenicznych i ostatnio wyselekcjonowanych mutantów na pewno pomoże uzupełnić naszą wiedzę o molekularnych mechanizmach odpowiedzi roślin na zmianę poziomu cukrów, zjawiska powszechnego w zmiennych warunkach środowiskowych.

LITERATURA

- [1] ap REES T. Hexose phosphate metabolism by nonphotosynthetic tissues of higher plants. [w:] Preiss J [red.] Carbohydrates. The Biochemistry of Plants. Academic Press, San Diego 1988; **14**: 1–33.
- [2] BUSH DR. The proton-sucrose symport. *Photosynth Res* 1992; **32**: 155–165.
- [3] BUSH DR. Sugar transporters in plant biology. *Curr Opin Plant Biol* 1999; **2**: 187–191.
- [4] CHIOU T-J, BUSH DR. Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 4784–4788.
- [5] CIERESZKO I. Wzrost i metabolizm roślin w warunkach deficytu fosforu. *Kosmos* 2000; **49**: 179–189.
- [6] CIERESZKO I, BARBACHOWSKA A. Sucrose metabolism in leaves and roots of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during phosphate deficiency. *J Plant Physiol* 2000; **156**: 640–644.
- [7] CIERESZKO I, JOHANSSON H, HURRY V, KLECZKOWSKI LA. Phosphate status affects the gene expression, protein content and enzymatic activity of UDP-glucose pyrophosphorylase in wild-type and *pho* mutants of *Arabidopsis*. *Planta* 2001; **212**: 598–605.
- [8] CIERESZKO I, JOHANSSON H, KLECZKOWSKI LA. Sucrose and light activation of a cold-inducible UDP-glucose pyrophosphorylase gene via a hexokinase-independent, ABA-unresponsive and okadaic acid-sensitive pathway in *Arabidopsis*. *Biochem J* 2001; **354**: 67–72.
- [9] DAI N, SCHAFFER A, PETREIKOV M, SHAHAK Y, GILLER Y, RATNER K, LEVINE A, GRANOT D. Overexpression of *Arabidopsis* hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *Plant Cell* 1999; **11**: 1253–1266.
- [10] DÉJARDIN A, SOKOLOV LN, KLECZKOWSKI LA. Sugar/osmoticum levels modulate differential ABA-independent expression of two stress-responsive sucrose synthase genes in *Arabidopsis*. *Biochem J* 1999; **344**: 503–509.
- [11] DOEHLERT DC, CHOUREY PS. Possible roles of sucrose synthase in sink function. [w:] Bonnemain JL, Delrot S, Lucas WJ, Dainty J [red.] Recent Advances in Phloem Transport and Assimilate Compartmentation. Nantes-Paris: Quest Editions, Press Academ 1991: 185–195.

- [12] EHNESS R, ECKER M, GODT DE, ROITSCH T. Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. *Plant Cell* 1997; **9**: 1825–1841.
- [13] FARRAR JF. The whole plant: carbon partitioning during development. [w] Farrar JF, Gordon AJ, Pollock PJ [red.] Carbon Partitioning Within and Between Organisms. Oxford: Bios Scientific Publishers, Environmental Plant Biology Series 1992: 163–179.
- [14] FARRAR JF, WILLIAMS JHH. Control of the rate of respiration in roots: compartmentation, demand and the supply of substrate. [w] Emes MJ [red.] Compartmentation of Plant Metabolism in Non-Photosynthetic Tissues. Soc Exp Biol Sem Ser, Cambridge University Press, Cambridge 1990; **42**: 167–188.
- [15] GRAHAM IA, DENBY KJ, LEAVER CJ. Carbon catabolite repression regulates glyoxylate cycle gene-expression in cucumber. *Plant Cell* 1994; **6**: 761–772.
- [16] GUY CL. Cold acclimation and freezing stress tolerance: Role of protein metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1990; **41**: 187–223.
- [17] HALFORD NG, PURCELL PC, HARDIE G. Is hexokinase really a sugar sensor in plants? *Trends Plant Sci* 1999; **4**: 117–120.
- [18] HALFORD NG, BOULY J-P, THOMAS M. SNF1-related protein kinases (SnRKs) - regulators at the heart of the control of carbon metabolism and partitioning. *Adv Bot Res* 2000; **32**: 405–434.
- [19] HUBER SC, HUBER JLA, McMICHAEL Jr RW. The regulation of sucrose synthesis in leaves. [w] Farrar JF, Gordon AJ, Pollock PJ [red.] Carbon Partitioning Within and Between Organisms. Oxford: Bios Scientific Publisher, Environmental Plant Biology Series 1992: 1–25.
- [20] JANG J-C, SHEEN J. Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell* 1994; **6**: 1665–1679.
- [21] JANG J-C, LEÓN P, SHEEN J. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell* 1997; **9**: 5–19.
- [22] JANG J-C, SHEEN J. Sugar sensing in higher plants. *Trends Plant Sci* 1997; **2**: 208–214.
- [23] KLEIN D, STITT M. Effects of 2-deoxyglucose on the expression of *rbcS* and the metabolism of *Chenopodium rubrum* cell-suspension cultures. *Planta* 1998; **205**: 223–234.
- [24] KOCH KE, NOLTE KD, DUKE ED, McCARTY DR, AVIGNE WT. Sugar levels modulate differential expression of maize sucrose synthase genes. *Plant Cell* 1992; **4**: 59–69.
- [25] KOCH KE. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1996; **47**: 509–540.
- [26] KRAPP A, HOFMANN B, SCHÄFER CH, STITT M. Regulation of the expression of *rbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for the 'sink regulation' of photosynthesis? *Plant J* 1993; **3**: 817–828.
- [27] LALONDE S, BOLES E, HELLMANN H, BARKER L, PATRICK JW, FROMMER WB, WARD JM. The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. *Plant Cell* 1999; **11**: 707–726.
- [28] LORETI E, DE BELLIS L, ALPI A, PERATA P. Why and how do plant cells sense sugars? *Ann Bot* 2001; **88**: 803–812.
- [29] MITA S, MURANO N, AKAIKE M, NAKAMURA K. Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for beta-amylase and on the accumulation of anthocyanin that are inducible by sugars. *Plant J* 1997; **11**: 841–851.
- [30] OHTO M, HAYASHI K, ISOBE M, NAKAMURA K. Involvement of Ca²⁺ signalling in the sugar-inducible expression of genes coding for sporamin and α -amylase of sweet potato. *Plant J* 1995; **7**: 297–307.
- [31] PAUL MJ, STITT M. Effects of nitrogen and phosphorus deficiencies on levels of carbohydrates, respiratory enzymes and metabolites in seedlings of tobacco and their response to exogenous sucrose. *Plant Cell Environ* 1993; **16**: 1047–1057.
- [32] PAUL M, PELLNY T, GODDIJN O. Enhancing photosynthesis with sugar signals. *Trends Plant Sci* 2001; **6**: 197–200.

- [33] PEGO JV, WEISBEEK PJ, SMEEKENS CCM. Mannose inhibits *Arabidopsis* germination via a hexokinase-mediated step. *Plant Physiol* 1999; **119**: 1017-1023.
- [34] RAUSCH T. The hexose transporters at the plasma membrane and the tonoplast of higher plants. *Physiol Plant* 1991; **82**: 134-142.
- [35] RATAJCZAK W. Badanie represji katabolicznej powodowanej przez cukier w tkankach roślinnych hodowanych *in vitro*. [w] Dubert F, Skoczowski A [red.] Zastosowanie Kultur *in vitro* w Fizjologii Roślin. Zakład Fizjologii Roślin PAN, Kraków 1995: 113-120.
- [36] REDA M, KŁOBUS G, BUCZEK J. Budowa i sposoby regulacji reduktazy azotanowej. *Postępy Biochemii* 2000; **46**: 99-106.
- [37] ROITSCH T, BITTNER M, GODT DE. Induction of apoplasmic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation. *Plant Physiol* 1995; **108**: 285-294.
- [38] ROLLAND F, WINDERICKX J, THEVELEIN JM. Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends Biochem Sci* 2001; **26**: 310-317.
- [39] RYCHTER AM, RANDALL DD. The effect of phosphate deficiency on carbohydrate metabolism in bean roots. *Physiol Plant* 1994; **91**: 383-388.
- [40] SADKA A, DEWALD DB, MAY GD, PARK WD, MULLETT JE. Phosphate modulates transcription of soybean *VspB* and other sugar-inducible genes. *Plant Cell* 1994; **6**: 737-749.
- [41] SAUER N, TANNER W. Molecular biology of sugar transporters in plants. *Bot Acta* 1993; **106**: 277-286.
- [42] SHEEN J. Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell* 1990; **2**: 1027-1038.
- [43] SMEEKENS S, ROOK F. Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plants. *Plant Physiol* 1997; **115**: 7-13.
- [44] SMEEKENS S. Sugar regulation of gene expression in plants. *Curr Opin Plant Biol* 1998; **1**: 230-234.
- [45] SMEEKENS S. Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 2000; **51**: 49-81.
- [46] SOKOLOV LN, DÉJARDIN A, KLECZKOWSKI LA. Sugars and light/dark exposure trigger differential regulation of ADP-glucose pyrophosphorylase genes in *Arabidopsis thaliana* (thale cress). *Biochem J* 1998; **336**: 681-687.
- [47] STITT M, KRAPP A, KLEIN D, RÖPER-SCHWARZ U, PAUL M. Do carbohydrates regulate photosynthesis and allocation by altering gene expression? [w] Madore MA, Lucas WL (red.) Carbon Partitioning and Source-Sink Interaction in Plants. Rockville, MD; *Am Soc Plant Physiol* 1995: 68-77.
- [48] TAKEDA S, MANO S, OHTO M, NAKAMURA K. Inhibitors of protein phosphatase-1 and phosphatase-2A block the sugar-inducible expression in plants. *Plant Physiol* 1994; **106**: 567-574.
- [49] VITRAC X, LARRONDE F, KRISA S, DECENIA A, DEFFIEUX G, MÉRILLON J-M. Sugar sensing and Ca^{2+} -calmodulin requirement in *Vitis vinifera* cells producing anthocyanins. *Phytochemistry* 2000; **53**: 659-665.
- [50] WILLIAMS JHH, WINTERS AL, FARRAR JF. Sucrose: a novel plant growth regulator. [w] Lambers H, van der Pias LHW [red.] The Molecular, Biochemical and Physiological Aspects of Plant Respiration. SPB Academic Publ, The Hague, The Netherlands 1992: 463-469.

- [51] WILLIAMS LE, LEMOINE R, SAUER N. Sugar transporters in higher plants – a diversity of roles and complex regulation. *Trends Plant Sci* 2000; **5**: 283–290.
- [52] WOLSKA-MITASZKO B. Trehaloza – substancja przedziwna. Właściwości, występowanie, zastosowania. *Biotechnologia* 2001; **2** (53): 36–53.
- [53] YU S-M. Cellular and genetic responses of plants to sugar starvation. *Plant Physiol* 1999; **121**: 687–693.
- [54] ZHOU L, JANG JC, JONES TL, SHEEN J. Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an *Arabidopsis* glucose-insensitive mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 10294–10299.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 10.12.2001 r.

Przyjęto: 10.01.2002r.

Adres autora: Świerkowa 20b, 15-950 Białystok

E-mail: icier@uwb.edu.pl

PROTEAZY CHLOROPLASTOWE

CHLOROPLAST PROTEASES

Agnieszka ŻELISKO i Grzegorz JACKOWSKI

Zakład Fizjologii Roślin, Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu

Streszczenie: Kontrolowana degradacja białek jest procesem zaangażowanym w regulację wielu ważnych procesów komórkowych, w tym cyklu komórkowego, różnicowania, kierowania i dystrybucji białek oraz programowanej śmierci komórki. Od kilkunastu lat wiadomo, że degradacja specyficznych białek jest również bardzo istotnym elementem mechanizmów decydujących o biogenezie chloroplastów i ich adaptacjach do zmieniających się warunków środowiskowych oraz że proteazy odpowiedzialne za trawienie białek chloroplastowych są zlokalizowane w samych chloroplastach. Ustalono, że część spośród proteaz chloroplastowych jest odpowiedzialna za proteolityczną obróbkę form prekursorowych białek chloroplastowych, część katalizuje procesy degradacyjne towarzyszące adaptacji aparatu fotosyntetycznego do zmian natężenia światła i temperatury, a jeszcze jedna grupa proteaz chloroplastowych atakuje białka uszkodzone, skierowane do niewłaściwego kompartmentu wewnątrz chloroplastu lub syntetyzowane w niestechiometrycznych ilościach względem zasocjowanych z nimi *in vivo* innych białek bądź kofaktorów. W niniejszym opracowaniu podsumowano aktualny stan wiedzy na temat wewnątrzchloroplastowej kompartmentacji poszczególnych proteaz, ich struktury (w tym homologii strukturalnej wobec proteaz bakteryjnych) i właściwości funkcjonalnych oraz zmienności ekspresji w odpowiedzi na zmieniający się kontekst ontogenetyczny i środowiskowy.

Słowa kluczowe: proteaza, centrum katalityczne, Clp, FtsH, DegP, chloroplast, stroma, błona tylakoidowa, światło tylakoidu, otoczka chloroplastowa, peptyd tranzytowy.

Summary: A controlled degradation of proteins is intimately involved in regulatory mechanisms of many different cell functions, including cell cycle, differentiation, protein targeting and sorting and a programmed cell death. It is about fifteen years that the role of the degradation of specific proteins in mechanisms behind chloroplast biogenesis and adaptation to everchanging environmental stimuli was recognized as well. It also became evident that the proteases responsible for the degradation of chloroplast proteins are located inside the chloroplast themselves. As a result at the moment most investigated chloroplast proteases can be operationally divided into three categories: 1) the ones responsible for a proteolytic processing of precursor forms of chloroplast proteins; 2) the ones catalysing degradative processing put into motion in response to changing incident photon flux density and temperature; 3) the ones degrading the proteins that are damaged or otherwise abnormal, the unassembled subunits of protein complexes and

mistargeted proteins. The data regarding current awareness in relation to intrachloroplast compartmentation of defined proteases, their structure (including structural homology to bacterial enzymes), functional properties and expression pattern as determined by changing ontogenetical and environmental context is summarised below.

Keywords: protease, catalytic domain, Clp, FtsH, DegP, chloroplast, stroma, thylakoid membrane, thylakoid lumen, chloroplast envelope, transit peptide.

WSTĘP

W 1984 roku dowiedziono, że w izolowanych i inkubowanych *in vitro* chloroplastach może następować szybka, ATP-zależna i stymulowana przez światło degradacja białek katalizowana przez autonomiczne proteazy chloroplastowe [37]. W kilka lat potem ujawniono obecność w chloroplastach także proteaz działających w sposób niezależny od ATP [10]. Odkrycia te pozwoliły na przełamanie utrzymującego się przez długie lata poglądu, że degradację białek chloroplastowych katalizują proteazy wodniczkowe lub/i cytoplazmatyczne, przedostające się do wnętrza chloroplastu w określonych sytuacjach lub też że degradacja białek chloroplastowych następuje w wodniczkach bądź cytoplazmie, dokąd przeznaczone do hydrolizy białka miałyby być eksportowane [51]. Dziś wiadomo, że w chloroplastach działa wiele proteaz; część z nich udało się oczyścić [5, 10, 66], inne zidentyfikowano dzięki znacznej homologii wobec proteaz bakteryjnych, najlepiej scharakteryzowanych w przypadku *Escherichia coli* [3]. W zależności od okoliczności sprzyjających ujawnianiu aktywności enzymatycznej wszystkie poznane do tej pory proteazy chloroplastowe można podzielić na dwie kategorie: konstytutywne i indukowalne. Pierwsza kategoria obejmuje endoproteazy zaangażowane w wewnątrzchloroplastową obróbkę prekursorów białek chloroplastowych [11, 59] oraz liczną grupę enzymów uczestniczących w usuwaniu białek uszkodzonych [22, 27], syntetyzowanych z różnych powodów w ilościach niestechiometrycznych względem skompleksowanych z nimi *in vivo* białek lub niebiałkowych kofaktorów [30, 63] oraz białek omyłkowo skierowanych do niewłaściwego przedziału chloroplastu [20, 21]. Wydaje się pewne, że poza konstytutywnymi endoproteazami dokonującymi pierwotnego cięcia wymienionych typów substratów chloroplasty zawierają także – wciąż niezidentyfikowane – peptydazy trawiące produkty pierwotnego cięcia na drobne fragmenty, prawdopodobnie aż do poziomu wolnych aminokwasów. Na istnienie peptydaz spełniających funkcje „sprzątające” wskazuje fakt, że produkty pierwotnego nacięcia substratów konstytutywnych proteaz nie gromadzą się *in vivo* [2]. Druga kategoria proteaz chloroplastowych – to enzymy regulacyjne produkowane lub aktywowane w odpowiedzi na zmiany natężenia światła [5, 65] oraz temperatury [27]. Funkcje tych proteaz można zatem sprowadzić do współuczestnictwa – obok innych mechanizmów – w procesie optymalizacji składu biochemicznego aparatury fotosyntetycznej w zmieniających się warunkach środowiskowych.

Choć ilość zidentyfikowanych i scharakteryzowanych proteaz chloroplastowych wzrasta w tempie niemal lawinowym, jest rzeczą pewną, że jesteśmy wciąż dalecy od znajomości ich pełnej listy, nie tylko w związku z istnieniem *in vivo* wciąż niezidentyfikowanych peptydaz „sprzątających”, ale także w związku z tym, że niedawno ujawniono, iż jądrowy genom *Arabidopsis thaliana* zawiera po kilka (2–6) nieidentycznych genów homologicznych kodujących znane wcześniej enzymy homologiczne do proteaz bakteryjnych (Clp, FtsH, DegP) [4]. Oznacza to, że Clp, FtsH i DegP są w rzeczywistości rodzinami enzymów obejmującymi po kilka indywidualnych proteaz. Podobną sytuację stwierdzono w odniesieniu do genomu *Synechocystis*, w którym zidentyfikowano około czterdziestu różnych sekwencji kodujących proteazy [31].

Celem niniejszego opracowania jest przegląd stanu wiedzy na temat struktury i właściwości funkcjonalnych chloroplastowych proteaz zidentyfikowanych i scharakteryzowanych do września 2001 roku, ich wewnątrzchloroplastowej kompartmentacji oraz zmienności ekspresji w odpowiedzi na zmieniający się kontekst ontogenetyczny i środowiskowy. Literatura polskojęzyczna była dotąd całkowicie pozbawiona opracowań przeglądowych na ten temat.

Na rycinie 1 zilustrowano rozmieszczenie wewnątrz chloroplastu opisanych w niniejszej pracy proteaz. Nie uwzględniliśmy jednak enzymów, których lokalizacja nie została jeszcze wyjaśniona.

I. PROTEAZY STROMY CHLOROPLASTOWEJ

CPE – chloroplastowa peptydaza przetwarzająca

Większą część białek wchodzących w skład chloroplastu stanowią białka kodowane przez genom jądrowy, pozostałe są kodowane przez genom chloroplastowy. Polipeptydy zakodowane w genomie jądrowym, których miejscem przeznaczenia jest stroma chloroplastowa, są syntetyzowane w cytoplazmie w postaci prekursorów dłuższych od dojrzałej formy o tak zwane peptydy tranzytowe, N-terminalne odcinki o długości od 28 do 139 aminokwasów [56]. Sekwencja aminokwasowa peptydu tranzytowego zawiera w sobie całość informacji niezbędnej do rozpoznania – przez aparat importowy otoczki chloroplastowej – prekursorowego białka i jego translokacji do wnętrza chloroplastu. C-koniec peptydu tranzytowego zawiera dość konserwatywną czteroaminokwasową sekwencję (Ile/Val-X-Ala/Cys-Ala), która wyznacza miejsce odcięcia peptydu (samo odcięcie zachodzi w stromie). Prekursory innych białek chloroplastowych, których miejscem przeznaczenia jest błona tylakoidowa bądź też światło tylakoidu, wyposażone są w podwójne peptydy tranzytowe, tzn. peptyd importowy i eksportowy. Peptyd importowy odpowiada temu, co w przypadku białek kierowanych do stromy chloroplastowej nazywamy po prostu peptydem tranzytowym. Po odcięciu peptydu importowego białko jest nadal dłuższe od formy dojrzałej o jeszcze jeden N-końcowy peptyd – peptyd eksportowy [13, 46, 56]. Odcięcie peptydu

tranzytowego oraz peptydu importowego jest katalizowane przez specyficzną endopeptydazę zwaną chloroplastowym enzymem przetwarzającym – CPE (ang. *chloroplast processing enzyme*). CPE jest białkiem kodowanym przez genom jądrowy i syntetyzowanym na terenie cytoplazmy w formie prekursorowej, a proces odcięcia peptydu tranzytowego CPE katalizuje sama CPE (123 kDa), wykazująca aktywność autoproteolityczną [45]. CPE jest białkiem zasadowym wiążącym Zn^{2+} [45] o niezbyt dobrze rozpoznanej strukturze drugorzędowej [15].

Zespołowi Vandervere'a [59] udało się wyizolować i zsekwencjonować cDNA CPE grochu; ekspresja tego genu w liściach jest niezależna od światła [59]. CPE uważana jest za peptydazę odpowiedzialną za usuwanie peptydów importowych prekursorów wielu bardzo ważnych białek importowanych do chloroplastów [45], ponieważ zablokowanie ekspresji CPE za pomocą antysensownego konstruktów prowadzi do całkowitego rozprzęgnięcia biogenezy chloroplastu [60]. Eksperymentalnie potwierdzono zdolność CPE do odcinania peptydu tranzytowego od form prekursorowych, m.in. LHCP II, ferredoksyny, małej podjednostki karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-bisfosforanu [2], aktywazy karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-bisfosforanu, podjednostki CF1 syntazy ATP, plastocyaniny oraz psbO [45].

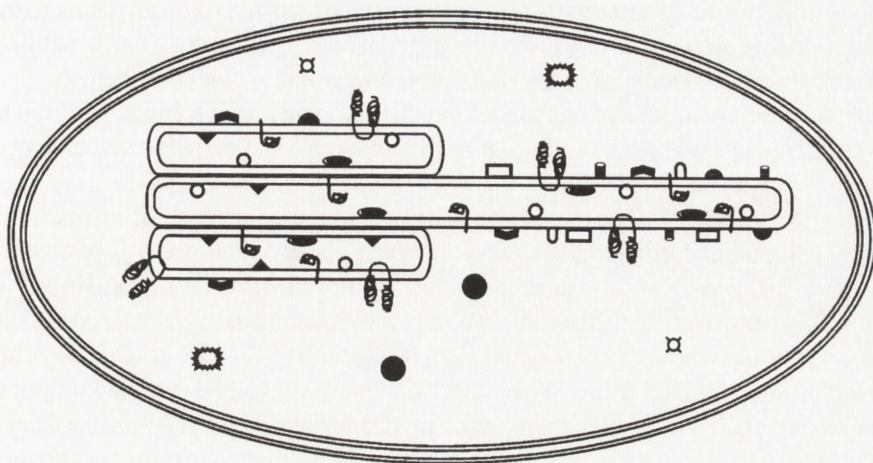
Ostatnio oczyszczono stromowy enzym przetwarzający, który wprowadzie odcina peptyd tranzytowy różnych białek prekursorowych (najefektywniej prekursora oksydazy polifenolowej), ale nie wykazuje takiej aktywności względem prekursora LHCP II [29]. Enzym ten (metaloproteaza) zapewne nie jest tożsamy z CPE, na co wskazuje nie tylko fakt braku aktywności wobec prekursora LHCP II, ale także brak reakcji krzyżowej z przeciwciałami anti-CPE. Wydaje się zatem zupełnie prawdopodobne, że peptydy tranzytowe i peptydy importowe prekursorów białek chloroplastowych mogą być na terenie stromy odtrawiane przez więcej niż jeden enzym przetwarzający albo przynajmniej przez nieidentyczne pod względem aktywności enzymatycznej i charakterystyki immunologicznej holoenzymatyczne permutacje dużej populacji podjednostek [29].

Proteaza EP1

Innym enzymem stromy chloroplastowej jest endoproteaza określona jako EP1, wyizolowana i oczyszczona po raz pierwszy z liści grochu (*Pisum sativum* L.) [10, 38]. Jest to enzym wiążący Zn^{2+} , który do pełnej aktywności katalitycznej wymaga ponadto obecności jonów Mg^{2+} lub Ca^{2+} [38].

W testach *in vitro* stwierdzono, że EP1 wykazuje najwyższą aktywność enzymatyczną wobec wiązania Ala-Ala i Gly-Gly, o ile reszty Ala lub Gly wchodzi w skład oligopeptydów zawierających w swojej strukturze także inne aminokwasy [38]. Wydaje się jednak, że *in vivo* specyficzność proteolitycznego cięcia zależy nie tylko od rozpoznawania par aminokwasów, ale także od obecności określonych motywów konformacyjnych [38].

Nie uzyskano jeszcze pewności co do masy cząsteczkowej holoenzymu, gdyż w zależności od zastosowanej metody uzyskano różne oznaczenia – używając sączenia



- | | | |
|-----|-------|---------------------------------------|
| Clp | FtsH | SppA |
| CPE | TPP | Proteaza związana z cząsteczkami PSII |
| EP1 | DegP1 | Proteaza degradująca ELIP |
| Tsp | DegP2 | Proteaza aklimacyjna |
| | | Proteaza degradująca LHCP II |

RYCINA 1. Rozmieszczenie proteaz wewnątrz chloroplastu (na podstawie [7], zmodyfikowane i uzupełnione)

molekularnego i elektroforezy w warunkach niedenaturujących wyznaczono masę cząsteczkową EP1 na 93 kDa [38], a przy zastosowaniu techniki HPLC (warunki denaturujące) jako 40 kDa lub nawet 20 kDa. Może to oznaczać, że EP1 przyjmuje różną strukturę czwartorzędową, w zależności od środowiska izolacyjnego oraz od sposobu traktowania białka podczas izolacji, weryfikacja tej hipotezy wymaga jednak dalszych badań [10].

Spośród naturalnych białek jedynym znanym substratem EP1 *in vitro* jest duża podjednostka karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-bisfosforanu. EP1 wytrawia z niej fragment o masie cząsteczkowej 36 kDa, który ulega dalszej szybkiej degradacji – z udziałem zapewne innych peptydaz stromy chloroplastowej – aż do wolnych aminokwasów [1]. Karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu stanowi około 50% białek w liściach, stąd też jest głównym źródłem azotu liściowego. Podczas starzenia liści białka chloroplastowe, a więc także karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu, ulegają proteolitycznemu rozkładowi. Uzyskany tą drogą azot jest transportowany do młodszych części rośliny, gdzie jest wykorzystywany m.in. do budowy nowych struktur komórkowych. Sugeruje się, że EP1 może być proteazą odpowiedzialną za rozpoczęcie procesu degradacji karboksylazy/oksygenazy rybulozo-

1,5-bisfosforanu podczas starzenia [10]. W chloroplastach wyizolowanych na różnych etapach rozwoju siewek grochu poziom aktywności EP1 jest jednak bardzo zbliżony, co może oznaczać, że enzym odgrywa istotną rolę podczas całej ontogenezy.

Z badań przeprowadzonych na modelowych oligopeptydach wynika, że aktywność EP1 jest niższa na świetle niż w ciemności [38]. Na razie trudno jednoznacznie ocenić sens fizjologiczny tej obserwacji.

Inkubując *in vitro* zawiesinę chloroplastów grochu można obserwować szybką degradację dużej podjednostki karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-bisfosforanu (substratu EP1), ale także szeregu innych białek stromy chloroplastowej (np. fosforybulokinazy, syntetazy glutaminowej, syntazy glutaminianowej, małej podjednostki karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-bisfosforanu) [47]. Degradacja zachodzi zarówno na świetle, jak i w ciemności, przy czym niezależna od światła komponenta procesów degradacyjnych jest katalizowana przez metaloproteazę, co może wskazywać na udział EP1 [47]. Niezależna od światła degradacja białek stromy zachodząca w toku inkubacji chloroplastów *in vitro* prawdopodobnie jest ciągiem wydarzeń zbliżonym do degradacji towarzyszącej starzeniu liści [47]. W obydwu procesy może być zaangażowana EP1 [10]. Degradacja na świetle innych niż duża podjednostka karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-bisfosforanu białek stromy chloroplastów grochu wydaje się być jednak zależna od innego enzymu (-ów), dodatkowo rozszerzającego listę proteaz rezydujących w stromie chloroplastu.

Proteaza Clp

Proteaza Clp po raz pierwszy została zidentyfikowana u *Escherichia coli* jako enzym katalizujący *in vitro* degradację kazeiny i stąd pochodzi jej nazwa: *Caseinolytic protease* (Clp). Funkcjonuje ona jako ATP-zależna serynowa proteaza wymagająca do swego działania jonów Mg^{2+} [12].

Bakteryjna proteaza Clp zbudowana jest z dwóch podjednostek: proteolitycznej podjednostki typu serynowego o masie 21 kDa określanej jako ClpP oraz jednej z dwóch podjednostek regulatorowych o charakterze ATPazy określanej jako ClpA (83 kDa) [1] i ClpX (46 kDa) [12, 19]. Podjednostka ClpA ma dwie odrębne domeny wiążące ATP [17]. Hydroliza jednej cząsteczki ATP jest wymagana dla oligomeryzacji ClpA (umożliwia asocjacje z ClpP), natomiast uwolnienie energii drugiej cząsteczki ATP umożliwia proteolizę [23, 43]. Z kolei podjednostka ClpX ma tylko jedną domenę wiążącą ATP [17].

Podjednostki regulatorowe ClpA oraz ClpX należą do rodziny molekularnych chaperonów Clp/Hsp100 [12, 48]. Mogą one działać niezależnie od ClpP pełniąc wyłącznie funkcję białek chaperonowych [18, 23, 43]. Sama podjednostka proteolityczna ClpP nie jest zdolna do degradacji oligopeptydów dłuższych niż 6 aminokwasów. Rozkład dłuższych peptydów jest możliwy przez utworzenie kompleksu ClpP z ClpA lub ClpX.

Zdolny do proteolizy kompleks składa się z dwóch centralnych heptamerycznych podjednostek ClpP [61] otoczonych przez jeden lub dwa heksameryczne pierścienie ClpA lub ClpX [23, 43]. Pierścienie heptameryczne ClpP tworzą stos w formie cylindra

[50], w którego wnętrzu znajdują się centra katalityczne typu serynowego [61]. Wnętrze cylindra jest zatem komorą katalityczną (o średnicy 50Å); dostęp do niej jest możliwy tylko przez dwa szczytowe otwory. Szerokość tych otworów wynosi zaledwie 11Å, co utrudnia lub nawet uniemożliwia dostanie się do wnętrza większości natywnych polipeptydów. Dlatego też dla skutecznej translokacji substratów białkowych do centrów katalitycznych ClpP niezbędna jest obecność podjednostek ClpA [9, 24]. Podjednostki te, przeprowadzając hydrolizę ATP dostarczają energii potrzebnej do rozfałdowania substratu, niezbędnego dla jego translokacji do wnętrza komory katalitycznej ClpP [12].

Stwierdzono, że homologi bakteryjnych proteaz ClpP i jednostek regulatorowych występują także w stromie chloroplastowej roślin [4] i są określone jako, odpowiednio, ClpP i ClpC/D. ClpC/D i ClpP mogą asocjować w ATP-zależny sposób zarówno *in vitro* [49], jak i *in vivo* [14] tworząc funkcjonalny chaperonowo-proteazowy kompleks, analogiczny do bakteryjnego ClpA(X)/P. Wydaje się, że – inaczej niż w przypadku bakteryjnej proteazy – asocjacja podjednostki chaperonowej i proteazowej jest zależna od wiązania ATP, a nie jego hydrolizy [21].

Opierając się na wynikach analizy klonów EST cDNA ustalono, że u roślin wyższych (*Arabidopsis thaliana*) funkcjonuje pięć genów kodujących różne formy molekularne ClpP [4]. Cztery spośród nich (*ClpP3–P6*) to geny jądrowe, piąty (*ClpP1*) jest genem chloroplastowym – kodowana przez ten gen forma molekularna ClpP1 jest jedyną znaną proteazą kodowaną przez genom plastydowy. Formy ClpP1 oraz ClpP3–6 zawierają charakterystyczną dla proteaz serynowych katalityczną triadę His-Asp-Ser [54]. Analiza klonów EST cDNA *Arabidopsis thaliana* pozwoliła na stwierdzenie heterogeniczności także na poziomie sekwencji kodujących roślinne homologi bakteryjnych jednostek regulacyjnych ClpA(X) – heterogeniczność polega na istnieniu trzech homologicznych genów, nazwanych *ClpC1*, *ClpC2* i *ClpD*. *ClpD*, choć bardzo podobny do *ClpC1/C2*, różni się od nich określonymi motywami sekwencyjnymi [48] i inną charakterystyką ekspresji *in vivo* [40].

Funkcje, jakie pełni Clp w chloroplastach, nie są dokładnie poznane. Eksperymentalnie udowodniono tylko udział Clp w trawieniu psbO mylnie skierowanego do stromy [20, 21] oraz w trawieniu białek kompleksu cytochromowego b6/f w warunkach głodu azotowego i u mutantów charakteryzujących się obniżonym poziomem białka Rieskego [39]. Clp prawdopodobnie degradowuje także powstałe w wyniku błędów biosyntezy białka anormalne, niewłaściwie pofałdowane i uszkodzone [3, 12, 49]. Niewielka część populacji ClpC występuje w chloroplastach w postaci związanej z maszyną importową wewnętrznej błony otoczki chloroplastowej [41], prawdopodobnie pełniąc funkcję chaperonową, a mianowicie biorąc udział w utrzymaniu rozfałdowanej struktury prekursorów białek importowanych do stromy.

Aktywność proteazy Clp ulega zmianom w trakcie rozwoju ontogenetycznego rośliny, np. w trakcie konwersji dojrzałych chloroplastów w gerontoplasty; poziom transkrypcji genów *clpP* kodujących białko ClpP jest bardzo wysoki w dojrzałych, fotosyntetycznie aktywnych liściach jęczmienia, lecz drastycznie spada podczas starzenia [25]. Z kolei

ekspresja *ClpD* ulega intensyfikacji zarówno w ciemności, jak i podczas naturalnego starzenia liści *Arabidopsis thaliana* [40], przy czym ilość białka ClpD – w przeciwieństwie do mRNA – silnie spada wraz z postępowaniem starzenia, stając się niewykrywalna w liściach w zaawansowanej fazie starzenia [62], dlatego – zdaniem autorów – ClpP i ClpD nie odgrywają istotnej roli podczas starzenia. Wydaje się jednak, że Clp może pełnić ważne funkcje podczas innych faz rozwoju rośliny. Humbeck i Krupińska [25] wykazali, że pod wpływem opadów następujących po długim okresie suszy procesy starzeniowe zostają zatrzymane i na krótki czas wzrasta aktywność fotosyntetyczna. Następuje wówczas również wzrost poziomu transkrypcji *clpP*. Znaczny wzrost poziomu transkrypcji *clpP* ma miejsce także podczas odwrócenia indukowanego ciemnością starzenia przez ponowne przeniesienie roślin do światła. Powyższe wyniki sugerują, że Clp odgrywa ważną rolę w degradacji białek w dojrzałych chloroplastach, charakteryzujących się wysoką aktywnością fotosyntetyczną, a także w chloroplastach, w których następuje synteza i montaż nowych składników aparatu fotosyntetycznego [25].

Powszechnie uważa się, że miejscem występowania oraz działania proteazy Clp jest stroma chloroplastu. Jednakże niedawno opublikowano doniesienie dowodzące możliwości izolacji z błon tylakoidowych *Arabidopsis thaliana* wieloskładnikowego kompleksu zawierającego różne formy molekularne ClpP, a także ClpR i ClpS – białek spokrewnionych z ClpP, lecz nie zawierających katalitycznej triady His-Asp-Ser [44]. W skład tego kompleksu (350 kDa) wchodzi aż 9 różnych podjednostek o masach cząsteczkowych mieszczących się w przedziale 20–30 kDa, a mianowicie ClpP1, P3, P4, P6, P7, ClpR1, R2, R3 oraz ClpS1. Wydaje się, że istnieje przynajmniej jedna dodatkowa przesłanka, aby sądzić, że Clp może istotnie mieć jakiś związek z błonami tylakoidowymi – zdolność Clp do trawienia składników kompleksu cytochromowego b6/f, integralnych białek błony tylakoidowej [39].

Potrzebne są dalsze badania, aby ostatecznie wyjaśnić wewnątrzchloroplastową lokalizację proteazy Clp.

Proteazy niewrażliwe na SDS

W pracy Sokolenko i współpracowników [53] doniesiono o odkryciu trzech niewrażliwych na SDS proteaz stromy chloroplastowej szpinaku. Tożsamość tych enzymów w odniesieniu do Clp, CPE i EPI pozostaje nieznana, ponieważ, o ile wiadomo autorom niniejszego opracowania, aktywność CPE, Clp i EPI nigdy nie była badana w obecności SDS. Jediną podstawą do snucia rozważań o relacjach pomiędzy tymi proteazami a enzymami niewrażliwymi na SDS jest porównanie mas cząsteczkowych. Opierając się na takim porównaniu trudno uznać którykolwiek z trzech enzymów niewrażliwych na SDS za tożsamy z którąś ze znanych wcześniej proteaz stromy chloroplastowej [53].

II. PROTEAZY BŁONY TYLAKOIDOWEJ

1. Enzymy związane integralnie z błoną tylakoidową

TPP – Tylakoidowa peptydaza przetwarzająca

Jak wspomniano już wcześniej, białka światła tylakoidu oraz niektóre białka błony tylakoidowej są syntetyzowane w cytoplazmie w formie prekursorowej wyposażonej w podwójny peptyd tranzytowy. Po translokacji białka prekursorowego przez otoczkę chloroplastową do stromy następuje katalizowane przez CPE odcięcie peptydu importowego. Peptyd eksportowy zostaje odtrawiony przez tylakoidową peptydazę przetwarzającą – TPP (ang. *Thylakoid Processing Peptidase*) podczas przemieszczania się prekursora białka przez błonę tylakoidową [3, 7]. Gen TPP został kilka lat temu sklonowany i scharakteryzowany [11]. Koduje on integralne białko błony tylakoidowej o masie cząsteczkowej 30 kDa, przenikające błonę jednym transmembranowym odcinkiem. Centrum katalityczne TPP w postaci diady Ser-Lys znajduje się w hydrofilnym C-terminalnym odcinku cząsteczki zlokalizowanym na powierzchni błony tylakoidowej od strony światła tylakoidu. TPP uczestniczy w obróbce form prekursorowych plastocyaniny oraz psbO, P i Q do form dojrzałych.

Proteaza FtsH

Proteaza FtsH, po raz pierwszy odkryta i opisana u *Escherichia coli* [4] jest związaną z błoną, ATP-zależną metaloproteazą o masie cząsteczkowej 74 kDa [35]. FtsH należy do rodziny AAA ATP-az (*ATPases associated with diverse cellular activities*). U *Escherichia coli* jest ona zaangażowana w degradację czynnika transkrypcyjnego δ^{32} i nieskompleksowanej formy białka błonowego SecY [1], a także w odpowiedź na szok termiczny [35].

Homolog bakteryjnej proteazy FtsH odkryto także w chloroplastach roślin wyższych [35, 42]. Roślinna wersja FtsH – integralne białko błony tylakoidowej – jest ATP-zależną cynkową metaloproteazą o masie cząsteczkowej 78 kDa. FtsH przenika błonę tylakoidową dwoma transmembranowymi α -helisami, natomiast rejony hydrofilne cząsteczki są zanurzone w stromie i świetle tylakoidu. Region eksponowany do stromy zawiera funkcjonalne domeny enzymu, a mianowicie domenę wiążącą ATP oraz centrum katalityczne wiążące jony Zn^{2+} . Dzięki takiej topografii FtsH jest w bezpośrednim kontakcie i może degradować zarówno białka zawieszane w stromie, jak i białka wbudowane w błony tylakoidowe [3, 58]. Stwierdzono, że FtsH nie jest związana z żadnym kompleksem fotosyntetycznym [1]. Proteaza FtsH występuje w obrębie błon niezespólonych stromy, natomiast nie zlokalizowano jej w błonach zespolonych tylakoidów gran. FtsH jest syntetyzowana w formie prekursorowej w cytoplazmie, a ekspresję genów kodujących ten enzym indukuje światło [1].

Wyniki badań nad klonami EST cDNA *Arabidopsis thaliana* dowodzą obecności w genomie tego gatunku czterech nieidentycznych, lecz homologicznych genów

kodujących FtsH – FtsH1 do FtsH4, co oznacza, że *de facto* FtsH *in vivo* jest populacją czterech podobnych do siebie białek.

Funkcje, jakie pełni proteaza FtsH, są wciąż znane dosyć pobieżnie – na razie eksperymentalnie potwierdzono zdolność FtsH do trawienia *in vivo* dwóch substratów. Jednym z nich jest białko Rieskego, degradowane przez FtsH wówczas, gdy wskutek zaburzeń mechanizmów regulujących stosunki stechiometryczne pomiędzy podjednostkami kompleksu cytochromowego b6/f białko Rieskego akumuluje się w nadmiarowych ilościach, tzn. część puli cząsteczek białka pozostaje niezasocjowana z innymi składnikami kompleksu. FtsH degradowuje zarówno te z „nadprogramowych” cząsteczek białka Rieskego, które pozostają związane z błoną tylakoidową, jak i te, które znajdują się w stromie chloroplastowej [42]. Innym substratem FtsH *in vivo* jest białko psbA, składnik centrum reakcji PSII. psbA ulega nieodwracalnemu uszkodzeniu w warunkach kontaktu rośliny ze światłem, nawet o umiarkowanym naświetleniu. Uszkodzone białko jest degradowane i zastąpione przez nową kopię. Tożsamość enzymów degradujących białko psbA długo pozostawała zagadką i dopiero ostatnio dowiedziono, że degradacja zachodzi w dwóch etapach katalizowanych przez dwa różne enzymy. W pierwszym etapie proteaza DegP2 rozcina białko psbA na dwa fragmenty o masach cząsteczkowych 23 i 10 kDa w procesie wymagającym hydrolizy GTP [55]. Drugi indukowany przez światło etap polega na całkowitej degradacji fragmentu 23 kDa w procesie zależnym od ATP oraz jonów Zn^{2+} – właśnie ten etap przeprowadza FtsH [34, 55]. Tak więc FtsH jest składnikiem systemu naprawiającego uszkodzone cząstki PSII. Ostateczny etap degradacji ma miejsce w regionie niezespolonych tylakoidów stromy, gdzie zlokalizowana jest FtsH.

Proteaza degradująca Lhcb3

Proteaza degradująca Lhcb3 jest integralnym enzymem błony tylakoidowej o jeszcze nierozpoznanych właściwościach biochemicznych (Jackowski i Żelisko, dane niepublikowane). Jego aktywność ujawnia się podczas starzenia się liści, choć enzym jest obecny już w liściach świeżych. Degradacja Lhcb3 nie następuje w liściach świeżych dlatego, że substrat (Lhcb3) jest niedostępny dla omawianej proteazy na skutek osłaniania go przez białka peryferyczne błony tylakoidowej. Dopiero strawienie tych białek następujące w toku starzenia umożliwia rozpoczęcie trawienia Lhcb3 (Jackowski i Żelisko, dane niepublikowane).

2. Enzymy związane peryferycznie z błoną tylakoidową

Proteaza aklimacyjna

Proteaza aklimacyjna jest związanym peryferycznie z błoną tylakoidową, ATP-zależnym enzymem, co do którego nie ustalono jednoznacznie, czy reprezentuje typ serynowy czy cysteinowy [36]. Przypuszcza się, że jedyny znany do tej pory substrat tej proteazy – monomeryczna forma LHCI – jest specyficznie rozpoznawany i degradowany przez proteazę aklimacyjną dzięki dostępności dla tego enzymu N-końcowej sekwencji 25 kDa LHCP, niedostępnej w przypadku trimerycznej formy

LHCII [64]. Po trwającej co najmniej 48 godzin ekspozycji rośliny na wysokie natężenie światła omawiana proteaza ujawnia swoją aktywność (nie dającą się stwierdzić przy niskich natężeniach światła) polegającą na degradacji 25 kDa LHCP II [36, 65]. 25 kDa LHCP II jest składnikiem głównie peryferycznej subpopulacji LHCII, zatem jego degradacja prowadzi do zniknięcia prawie połowy tej subpopulacji i redukcji o 20–30% przekroju optycznego PSII [36]. Cząstki PSII o zmniejszonym przekroju optycznym przekazują mniej wydajnie energię wzbudzenia elektronowego w kierunku centrów reakcji, co prowadzi do zmniejszenia prawdopodobieństwa fotouszkodzenia PSII i stanowi sens fizjologiczny regulacyjnej proteolizy 25 kDa LHCP II. Aktywność proteazy aklimacyjnej jest regulowana zarówno na poziomie samego enzymu, jak i substratu. Regulacja na poziomie substratu wyraża się tym, że holokompleks LHCII staje się podatny na atak proteazy dopiero po monomeryzacji i bocznym przemieszczeniu w kierunku tylakoidów stromy, a LHCP II przed degradacją musi ulec defosforylacji [64, 65]. Mechanizmy regulacji proteazy aklimacyjnej na poziomie enzymu pozostają niewyjaśnione. W wyniku degradacji zachodzącej podczas aklimacji do wysokich natężeń światła dochodzi do nagromadzenia się olbrzymiej puli wolnych aminokwasów. Mogą być one wykorzystane do syntezy przenośników elektronów oraz karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-bisfosforanu, których poziom zwiększa się wraz ze wzrostem natężenia światła [7]. Aklimacyjna degradacja LHCP II prowadzi także do pojawienia się dużych ilości wolnego chlorofilu, sprowadzającego na chloroplast niebezpieczeństwo stresu oksydacyjnego [8]. Ochroną przed taką sytuacją jest natychmiastowe związanie wolnego chlorofilu przez indukowane wysokim natężeniem światła białka ELIP [33].

Proteaza degradująca LHCP II

Kilka lat temu opisano enzym degradujący LHCP II o właściwościach podobnych do proteazy aklimacyjnej [6]. Proteaza degradująca LHCP II jest enzymem serynowego typu, prawdopodobnie związanym peryferycznie (od strony stromy) z błonami tylakoidowymi stromy oraz błonami brzegowymi tylakoidów gran [6, 57]. Aktywność degradującą LHCP II stwierdza się tylko w błonach tylakoidowych upłynnionych z użyciem Tritonu X-100, a degradacja dotyczy zarówno egzogenego, jak i endogenego LHCP II jako substratu [6, 57]. Aktywność jest regulowana przez jony Mg^{2+} , fitochrom oraz poziom chlorofilu zgromadzonego w tylakoidach. Sądzi się, że proteaza degradująca LHCP II jest zaangażowana w regulację stabilności LHCII w rozwijających się tylakoidach oraz w regulację ilości LHCP II w warunkach ograniczonej akumulacji chlorofilu [57]. Wydaje się zupełnie możliwe, że omawiana proteaza degraduje LHCP II także w toku aklimacji rośliny do wysokiego natężenia światła, a to oznaczałoby, że jest to enzym tożsamy z proteazą aklimacyjną.

Proteaza SppA

Serynowa proteaza SppA jest nowo odkrytym składnikiem maszynery proteolitycznej chloroplastów *Arabidopsis thaliana*, stanowiącym część wysokocząsteczkowego (270 kDa) kompleksu funkcjonalnego [31].

SppA jest proteazą związaną peryferycznie z błonami tylakoidów stromy oraz błonami brzegowymi tylakoidów gran. Proteaza ma silnie pofałdowaną domenę eksponowaną na stromowej powierzchni błony tylakoidowej [31].

Sekwencja dojrzałego białka, wydedukowana na podstawie znajomości sekwencji cDNA *Arabidopsis thaliana*, wykazuje 22% podobieństwa do sekwencji serynowej proteazy IV (SppA) z *Escherichia coli* oraz 27% do sekwencji SppA1 z *Synechocystis*. Najwyższy stopień podobieństwa do prokariotycznych homologów (ponad 50%) znaleziono w centralnej domenie białka (reszty 418–485 w sekwencji *Arabidopsis thaliana*) w postaci dwóch słabo hydrofobowych odcinków. Wcześniej sugerowano, że te odcinki – łącznie z N-terminalnym hydrofobowym segmentem – odpowiadają za zakotwiczenie białka w plazmalemmie u *Escherichia coli*. Jednak N-terminalna sekwencja zapewne reprezentująca transmembranową α -helisę bakteryjnej proteazy nie występuje w SppA *Arabidopsis thaliana*, dlatego też sądzi się, że u *Arabidopsis thaliana* SppA oddziałuje z podwójną warstwą błony tylakoidowej za pośrednictwem jednego lub dwu wspomnianych, słabo hydrofobowych odcinków, zlokalizowanych w centralnej domenie SppA. W obrębie tej domeny znajdują się cztery reszty serynowe, spośród których dwie (Ser⁴²⁶ i Ser⁴⁵³) uważa się za centrum katalityczne SppA. Centrum katalityczne jest umiejscowione blisko powierzchni błony tylakoidowej, w odległości umożliwiającej kontakt z domnianymi substratami w postaci białek błonowych. Rzeczywiste substraty SppA *in vivo* pozostają nieznanne, jednak uwzględniając fakt, że wysokie natężenie światła powoduje indukcję mRNA SppA i kilkukrotny wzrost mierzonego immunologicznie poziomu enzymu, wydaje się prawdopodobne, że SppA bierze udział w zależnej od wysokich natężeń światła proteolizie integralnych białek błony tylakoidowej (np. LHCP II) lub peptydów uwalnianych z tych białek [31]. Dodatkowym poparciem eksperymentalnym dla takiej sugestii jest obserwacja, że mRNA SppA osiąga najwyższy poziom po 26–52 h od zainicjowania kontaktu rośliny ze światłem o wysokim natężeniu, wiadomo bowiem, że zależna od wysokiego natężenia światła degradacja LHCP II wymaga trwającego około 48 h okresu zwłoki [65]. Jeśli udałoby się eksperymentalnie potwierdzić udział SppA w degradacji LHCP II, to mogłoby to oznaczać identyczność tego enzymu z proteazą aklimacyjną lub/i proteazą degradującą LHCP II. Wszystkie trzy enzymy są białkami peryferycznie związanymi z niespolonymi błonami tylakoidowymi, a niezależnie od tego SppA wykazuje indywidualne podobieństwo do proteazy degradującej LHCP II; obydwie enzymy reprezentują typ serynowy [31].

Proteaza degradująca białka ELIP

Proteza degradująca białka ELIP jest niezależnym od ATP metaloenzymem, wymagającym dla swojej aktywności jonów Mg^{2+} , związanym peryferycznie z niespolonymi błonami tylakoidowymi stromy [5]. Sugeruje się, że natywna forma proteazy jest złożona z więcej niż jednej podjednostki oraz że niektóre z tych podjednostek mogą pełnić funkcje regulatorowe. Białka ELIP są jedynym znanym substratem omawianej proteazy. Do degradacji ELIP dochodzi w sytuacji, gdy stresująco wysokie

natężenie światła zostaje zastąpione niskim natężeniem i odgrywając rolę fotoprotekcyjną białka ELIP przestają być dalej potrzebne [5]. Co ciekawe, proteaza degradująca białka ELIP jest obecna w chloroplastach niezależnie od zewnętrznych warunków świetlnych, jednak zdolność do katalizowania trawienia białek ELIP ujawnia tylko w toku adaptacji roślin do niskiego natężenia światła. Nie wiadomo, co stanowi sygnał do rozpoczęcia degradacji białek ELIP. Być może spadek natężenia światła indukuje jakieś zmiany w molekularnym otoczeniu ELIP lub w nich samych, co czyni je podatnymi na stale aktywną proteazę. Te zmiany mogą polegać na utracie stabilizujących kofaktorów (np. barwników), co byłoby zgodne z przypisywaną białkom ELIP funkcją czasowego wiązania barwników. Alternatywnym wytłumaczeniem inicjacji degradacji ELIP może być teza, że proteaza degradująca białka ELIP pozostaje nieaktywna w warunkach stresu świetlnego, a staje się aktywna w momencie obniżenia natężenia światła do poziomu nie wywołującego stresu [5].

Proteaza związana z PSII

Wśród białek wyflukanych z cząstek PSII za pomocą 1 M NaCl Zhang i jego koledzy [66] znaleźli metaloproteazę (43 kDa) zdolną do degradacji białka psbP, nawet w obecności 0,2 M NaCl. Wyższe stężenie NaCl hamowało aktywność proteazy. Enzym ten nie wydaje się tożsamy z żadną inną spośród scharakteryzowanych wcześniej proteaz związanych peryferycznie z błoną tylakoidową, gdyż wszystkie one – z wyjątkiem proteazy degradującej białka ELIP – są enzymami typu serynowego lub cysteinowego. Z kolei jedyna metaloproteaza w tej grupie, enzym degradujący białka ELIP ma zupełnie niepodobną do proteazy związanej z PSII masę cząsteczkową (odpowiednio 65 i 43 kDa). Niejasna pozostaje także relacja omawianej proteazy do enzymu znalezionej wśród białek wyflukanych za pomocą 1 M NaCl z cząstek PSII, lecz niewykazującego cech metaloproteazy [7].

Proteaza DegP1

DegP1 jest, podobnie jak w przypadku Clp, FtsH i SppA, proteazą znaną i scharakteryzowaną u *Escherichia coli*. Jest to enzym typu serynowego, peryferycznie związany z błoną plazmatyczną od strony periplazmy [28, 52]. Sądzi się, że w komórce bakteryjnej DegP1 bierze udział w odpowiedzi na wysoką temperaturę, degraduje niewłaściwie pofałdowane lub innego rodzaju nienormalne białka periplazmatyczne i błonowe [2].

Kilka lat temu sklonowano i scharakteryzowano gen kodujący chloroplastowy homolog tej proteazy [27]. Chloroplastowa wersja DegP1 jest ATP-zależną, serynową proteazą o masie cząsteczkowej 40 kDa, zawierającą charakterystyczną triadę katalityczną His-Asp-Ser. C-koniec DegP1 zawiera sekwencję określaną jako PDZ, która prawdopodobnie pośredniczy w międzycząsteczkowych oddziaływaniach białko-białko i wpływa na aktywności katalityczne enzymu [4]. Poziom ekspresji genu DegP1 wyraźnie wzrasta w warunkach ekspozycji roślin na podwyższoną temperaturę [3], co pozwala przypuszczać, że DegP1 może być zaangażowana w degradację białek

uszkodzonych i zagregowanych w tych warunkach. Lokalizacja DegP1 na powierzchni błony tylakoidowej umożliwia trawienie zarówno białek zawieszonych w świetle tylakoidu, jak i eksponowanych do światła tylakoidu pętli integralnych białek błony tylakoidowej [2].

Proteaza DegP2

DegP2, kolejny homolog enzymu wcześniej opisanego u *Escherichia coli*, jest peryferycznie związaną (od strony stromy) z niezspolonymi błonami tylakoidowymi proteazą serynowego typu, funkcjonującą w sposób niezależny od ATP [34, 55]. Podobnie jak DegP1 również DegP2 ma sekwencję PDZ. Poziom ekspresji genu DegP2 wzrasta w warunkach ekspozycji rośliny na wysokie stężenie NaCl, suszę oraz na światło o wysokim natężeniu. Udowodniono, że DegP2 przeprowadza pierwszy etap degradacji uszkodzonego pod wpływem światła białka psbA, a mianowicie wykonuje GTP-zależne endoproteolityczne cięcie na eksponowanej do stromy pętli łączącej transmembranowe α -helisy D i E psbA. W wyniku cięcia powstają dwa fragmenty: 23 kDa – zawierający N-koniec pierwotnego białka oraz 10 kDa – stanowiący C-terminalny fragment. Nieuszkodzone psbA jest zlokalizowane w zespolonych błonach tylakoidowych gran, podczas gdy DegP2 znajduje się w rejonie niezspolonych błon tylakoidowych. Do kontaktu pomiędzy uszkodzonym psbA a trawiącym go enzymem dochodzi dzięki bocznej migracji uszkodzonego psbA w kierunku niezspolonych błon tylakoidowych.

Proteazy niewrażliwe na SDS

W błonach tylakoidowych znaleziono pięć proteaz niewrażliwych na SDS [53]. Cztery spośród nich to enzymy typu serynowego, a jedna jest metaloproteazą. Ta ostatnia reaguje krzyżowo z przeciwciałami skierowanymi przeciwko mitochondrialnej FtsH z drożdży [32], co może sugerować, że jest ona odpowiednikiem mitochondrialnej FtsH w chloroplastach. Nie poznano jeszcze naturalnych substratów błonowych proteaz niewrażliwych na SDS, wiadomo natomiast, że doskonałym sztucznym substratem jest Azocoll [53].

III. PROTEAZY ŚWIATŁA TYLAKOIDU

Proteaza Tsp

Bakteryjna Tsp jest periplazmatyczną proteazą zdolną do przetwarzania pewnych substratów przez pojedyncze proteolityczne cięcie lub do całkowitej degradacji innych substratów [4]. Kilka lat temu oczyszczono z preparatów światła tylakoidu szpinaku enzym, którego 27-aminokwasowy N-końcowy odcinek wykazuje 37% podobieństwo do bakteryjnej Tsp [16]. Wyizolowano i sklonowano jądrowy gen kodujący omawianą proteazę [26]. Produkt tego genu, będący monomerycznym białkiem o masie

cząsteczkowej 45 kDa, katalizuje postranslacyjną obróbkę C-końca prekursora białka psbA, tzn. odcięcie od formy prekursorowej 8–16-aminokwasowego peptydu. Nie wiadomo, dlaczego pre-psbA jest syntetyzowany w formie prekursora dłuższego od dojrzałego białka o taki nietypowy peptyd, jednak jest rzeczą pewną, że proteolityczne usunięcie tego odcinka jest niezbędne, aby psbA mógł zostać wykorzystany do montażu funkcjonalnych cząstek PSII. Enzym oczyszczony przez Fujitę i współpracowników [26] jest jedyną proteazą zaangażowaną w obróbkę C-końca pre-psbA, nie wiadomo natomiast, czy jest to jedyna funkcja tego enzymu [3].

Proteaza niewrażliwa na SDS

W świetle tylakoidu zlokalizowano jedną cysteinowego typu proteazę niewrażliwą na SDS, wykazującą aktywność enzymatyczną w szerokim zakresie pH (5,5–9,0) [53]. Stanowi ona być może element lumenalnego systemu „sprzątającego”.

LITERATURA

- [1] ADAM Z. Protein stability and degradation in chloroplasts. *Plant Mol Biol* 1996; **32**: 773–783.
- [2] ADAM Z. Chloroplast proteases: Possible regulators of gene expression? *Biochimie* 2000; **82**: 647–654.
- [3] ADAM Z. Chloroplast proteases and their role in photosynthesis regulation. [w] Aro EM, Andersson B [red.] Regulation of photosynthesis. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers 2001: 265–276.
- [4] ADAM Z, ADAMSKA I, NAKABAYASHI K, OSTERSETZER O, HAUSSUHL K, MANUELL A, ZHENG B, VALLON O, RODERMEL SR, SHINOZAKI K, CLARKE AK. Chloroplast and mitochondrial proteases in *Arabidopsis*: A proposed nomenclature. *Plant Physiol* 2001; **125**: 1912–1918.
- [5] ADAMSKA I, LINDAHL M, ROOBOL-BOZA M, ANDERSSON B. Degradation of the light-stress protein is mediated by an ATP-independent, serine-type protease under low-light conditions. *Eur J Biochem* 1996; **236**: 591–599.
- [6] ANASTASSIOU R, ARGYROUDI-AKOYUNOGLU JH. Thylakoid-bound proteolytic activity against LHCII apoprotein in bean. *Photosynth Res* 1995; **43**: 241–250.
- [7] ANDERSSON B, ARO EM. Proteolytic activities and proteases of plant chloroplasts. *Physiol Plant* 1997; **100**: 780–793.
- [8] ASADA K. Radical production and scavenging in the chloroplasts. [w] Baker NR [red.] Advances in Photosynthesis. Photosynthesis and the Environment. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers 1996; **5**: 123–150.
- [9] BEURON F, MAURIZI MR, BELNAP DM, KOCSIS E, BOOY FP, KESSEL M, STEVEN AC. At sixes and sevens: characterization of the symmetry mismatch of the ClpAP chaperone-assisted protease. *J Struct Biol* 1998; **123**: 248–259.
- [10] BUSHNELL TP, BUSHNELL D, JAGENDORF AT. A purified zinc protease of pea chloroplasts, EP1, degrades the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Physiol* 1993; **103**: 585–591.
- [11] CHAAL BK, MOULD RM, BARBROOK AC, GRAY JC, HOWE CJ. Characterization of a cDNA encoding the thylakoidal processing peptidase from *Arabidopsis thaliana*. Implications for the origin and catalytic mechanism of the enzyme. *J Biol Chem* 1998; **273**: 689–692.

- [12] CLARKE AK. ATP-dependent Clp proteases in photosynthetic organisms – A cut above the rest! *Ann Bot* 1999; **83**: 593–599.
- [13] CLINE K, HENRY R. Import and routing of nucleus-encoded chloroplast proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996; **12**: 1–26.
- [14] DESIMONE M, WEISS-WICHERT W, WAGNER E, ALTENFELD U, JOHANNING MEIER U. Immunochemical studies on the Clp-protease in chloroplasts: evidence for the formation of a ClpC/P complex. *Bot Acta* 1997; **110**: 234–239.
- [15] FRISHMAN D, ARGOS P. 75% accuracy in protein secondary structure prediction. *Proteins* 1997; **27**: 329–335.
- [16] FUJITA S, INAGAKI N, YAMAMOTO Y, TAGUCHI F, MATSUMOTO A, SATOH K. Identification of the carboxyl-terminal processing protease for the D1 precursor protein of the photosystem II reaction center of spinach. *Plant Cell Physiol* 1995; **36**: 1169–1177.
- [17] GOTTESMAN S. Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* 1996; **30**: 465–506.
- [18] GOTTESMAN S, WICKNER S, MAURIZI MR. Protein quality control: Triage by chaperones and proteases. *Genes Dev* 1997; **11**: 815–823.
- [19] GRIMAUD R, KESSEL M, BEURON F, STEVEN AC, MAURIZI MR. Enzymatic and structural similarities between the *Escherichia coli* ATP-dependent proteases, ClpXP and ClpAP. *J Biol Chem* 1998; **273**: 12476–12481.
- [20] HALPERIN T, ADAM Z. Degradation of mistargeted OEE33 in the chloroplast stroma. *Plant Mol Biol* 1996; **30**: 925–933.
- [21] HALPERIN T, OSTERSETZER O, ADAM Z. ATP-dependent association between subunits of Clp protease in pea chloroplasts. *Planta* 2001; **213**: 614–619.
- [22] HAUSSUHL K, ANDERSSON B, ADAMSKA I. A chloroplast DegP2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1 protein in plant photosystem II. *EMBO J* 2001; **20**: 713–722.
- [23] HORWICH AL, WEBER-BAN EU. Chaperone rings in protein folding and degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 11033–11040.
- [24] HOSKINS JR, PAK M, MAURIZI MR, WICKNER S. The role of the ClpA chaperone in proteolysis ClpAP. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 12135–12140.
- [25] HUMBECK K, KRUPINSKA K. Does the Clp protease play a role during senescence-associated protein degradation in barley leaves? *J Photochem Photobiol B: Biol* 1996; **36**: 321–326.
- [26] INAGAKI N, YAMAMOTO Y, MORI H, SATOH K. Carboxyl-terminal processing protease for the D1 precursor protein: cloning and sequencing of the spinach cDNA. *Plant Mol Biol* 1996; **30**: 39–50.
- [27] ITZHAKI H, NAVEH L, LINDAHL M, COOK M, ADAM Z. Identification and characterization of DegP, a serine protease associated with the luminal side of the thylakoid membrane. *J Biol Chem* 1998; **273**: 7094–7098.
- [28] KOLMAR H, WALLER PRH, SAUER RT. The DegP and DegQ periplasmic endoproteases of *Escherichia coli*: Specificity for cleavage sites and substrate conformation. *J Bacteriol* 1996; **178**: 5925–5929.
- [29] KOUSSEVITZKY S, NE'EMAN E, SOMMER A, STEFFENS JC, HAREL E. Purification and properties of a novel chloroplast stromal peptidase. Processing of polyphenol oxidase and other imported precursors. *J Biol Chem* 1998; **273**: 27064–27069.
- [30] KURAS R, DE VITRY C, CHOQUET Y, GIRARDBASCOU J, CULLER D, BUSCHLEN S, MERCHANT S, WOLLMAN FA. Molecular genetic identification of a pathway for heme binding to cytochrome b6. *J Biol Chem* 1997; **272**: 32427–32435.
- [31] LENSCH M, HERRMANN RG, SOKOLENKO A. Identification and characterization of SppA, a novel light-inducible chloroplast protease complex associated with thylakoid membranes. *J Biol Chem* 2001; **276**: 33645–33651.

- [32] LEONHARD K, HERRMANN JM, STUART RA, MANNHAUPT G, NEUPERT W, LANGER T. AAA proteases with catalytic sites on opposite membrane surfaces a proteolytic system for the ATP-dependent degradation of the inner membrane proteins in mitochondria. *EMBO J* 1996; **15**: 4218–4229.
- [33] LINDAHL M. Regulatory proteolysis of higher plant thylakoid membranes. The significance of protein degradation in light acclimation of the photosynthetic apparatus. Praca doktorska, Stockholm Universitet 1997.
- [34] LINDAHL M, SPETEA C, HUNDAL T, OPPENHEIM AB, ADAM Z, ANDERSSON B. The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. *Plant Cell* 2000; **12**: 419–431.
- [35] LINDAHL M, TABAK S, CSEKE L, PICHERSKY E, ANDERSSON B, ADAM Z. Identification, characterization, and molecular cloning of a homologue of the bacterial FtsH protease in chloroplasts of higher plants. *J Biol Chem* 1996; **271**: 29329–29334.
- [36] LINDAHL M, YANG DH, ANDERSSON B. Regulatory proteolysis of the major light-harvesting chlorophyll *a/b* protein of photosystem II by a light-induced membrane-associated enzymic system. *Eur J Biochem* 1995; **231**: 503–509.
- [37] LIU XQ, JAGENDORF AT. ATP-dependent proteolysis in pea chloroplasts. *FEBS Lett* 1984; **166**: 248–252.
- [38] LIU XQ, JAGENDORF AT. Neutral peptidases in the stroma of pea chloroplasts. *Plant Physiol* 1986; **81**: 603–608.
- [39] MAJERAN W, WOLLMAN FA, VALLON O. Evidence for a role of ClpP in the degradation of the chloroplast cytochrome *b6/f* complex. *Plant Cell* 2000; **12**: 137–149.
- [40] NAKABAYASHI K, ITO M, KIOSUE T, SHINOZAKI K, WATANABE A. Identification of *clp* genes expressed in senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell Physiol* 1999; **40**: 504–514.
- [41] NIELSEN E, AKITA M, DAVILAAPONTE J, KEEGSTRA K. Stable association of chloroplastic precursors with protein translocation complexes that contain proteins from both envelope membranes and a stromal Hsp 100 molecular chaperone. *EMBO J* 1997; **16**: 935–946.
- [42] OSTERSETZER O, ADAM Z. Light-stimulated degradation of an unassembled Rieske FeS protein by a thylakoid-bound protease: the possible role of the FtsH protease. *Plant Cell* 1997; **9**: 957–965.
- [43] PAK M, WICKNER S. Mechanism of protein remodeling by ClpA chaperone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 4901–4906.
- [44] PELTIER JB, YTTERBERG J, LIBERLES DA, ROEPSTORFF P, VAN WIJK KJ. Identification of a 350-kDa ClpP protease complex with 10 different Clp isoforms in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 2001; **176**: 16318–16327.
- [45] RICHTER S, LAMPPA GK. A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 7463–7468.
- [46] ROBINSON C, MANT A. Targeting of proteins into and across the thylakoid membrane. *Trends in Plant Sci* 1997; **11**: 431–437.
- [47] ROULIN S, FELLER U. Light-independent degradation of stromal proteins in intact chloroplasts isolated from *Pisum sativum* L. leaves: requirement for divalent cations. *Planta* 1998; **205**: 297–304.
- [48] SCHRIMMER EC, GLOVER JR, SINGER MA, LINDQUIST S. HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends in Biochem Sci* 1996; **21**: 289–295.
- [49] SHANKLIN J, DEWITT ND, FLANAGAN JM. The stroma of higher plant plastids contain ClpP and ClpC, functional homologs of *Escherichia coli* ClpP and ClpA: an archetypal two-component ATP-dependent protease. *Plant Cell* 1995; **7**: 1713–1722.
- [50] SHIN DH, LEE CS, CHUNG CH, SUH SW. Molecular symmetry of the ClpP component of the ATP-dependent Clp protease, an *Escherichia coli* homolog of 20 S proteasome. *J Mol Biol* 1996; **262**: 71–76.
- [51] SHURTZ-SWIRSKI R, GEPSTEIN S. Proteolysis of endogenous substrates in senescing oat leaves. I. Specific degradation of ribulose biphosphate carboxylase. *Plant Physiol* 1985; **78**: 121–125.

- [52] SKORKO-GLONEK J, LIPIŃSKA B, KRZEWSKI K, ZOLESE G, BERTOLI E, TANFANI F. HtrA heat shock protease interacts with phospholipid membranes and undergoes conformational changes. *J Biol Chem* 1997; **272**: 8974–8982.
- [53] SOKOLENKO A, ALTSCHMIED L, HERRMANN RG. Sodium dodecyl sulfate-stable proteases in chloroplasts. *Plant Physiol* 1997; **115**: 827–832.
- [54] SOKOLENKO A, LERBS-MACHE S, ALTSCHMIED L, HERRMANN RG. Clp protease complexes and their diversity in chloroplasts. *Planta* 1998; **207**: 286–295.
- [55] SPETEA C, HUNDAL T, LOHMANN F, ANDERSSON B. GTP bound to the chloroplast thylakoid membranes is required for light-induced multi-enzyme degradation of photosystem II D1 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 6547–6552.
- [56] SZCZEPANIAK A, GUBERNATOR B, KRÓLICZEWSKI J, ŁACZMAŃSKI Ł. Targeting of proteins into and within the chloroplast. *Acta Physiol Plant* 1998; **20**: 437–451.
- [57] TZIVELEKA LA, ARGYROUDI-AKOYUNOGLU JH. Implications of a developmental-stage-dependent thylakoid-bound protease in the stabilization of the light-harvesting pigment-protein complex serving photosystem II during thylakoid biogenesis in red kidney bean. *Plant Physiol* 1998; **117**: 961–970.
- [58] VAN WIJK KJ, ANDERSSON B, ARO EM. Kinetic resolution of the incorporation of the D1 protein into PSII and localisation of assembly intermediates in thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *J Biol Chem* 1996; **271**: 9627–9636.
- [59] VANDERVERE PS, BENNETT TM, OBLONG JE, LAMPPA GK. A chloroplast processing enzyme involved in precursor maturation shares a zinc-binding motif with a recently recognized family of metalloendopeptidases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 7177–7181.
- [60] WAN J, BRINGLOE D, LAMPPA GK. Disruption of chloroplast biogenesis and plant development upon down-regulation of a chloroplast processing enzyme involved in the import pathway. *Plant J* 1998; **15**: 459–468.
- [61] WANG J, HARTLING JA, FLANAGAN JM. The structure of ClpP at 2 x 3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis. *Cell* 1997; **91**: 447–456.
- [62] WEAVER LM, FROEHLICH JE, AMASINO RM. Chloroplast-targeted ERD1 protein declines but its mRNA increases during senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 1999; **119**: 1209–1216.
- [63] WOLLMAN FA, MINAI L, NECHUSHTAI R. The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1411**: 21–85.
- [64] YANG DH, PAULSEN H, ANDERSSON B. The N-terminal domain of the light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein complex (LHCII) is essential for its acclimative proteolysis. *FEBS Lett* 2000; **466**: 385–388.
- [65] YANG DH, WEBSTER J, ADAM Z, LINDAHL M, ANDERSSON B. Induction of acclimative proteolysis of the light-harvesting chlorophyll a/b protein of photosystem II in response to elevated light intensities. *Plant Physiol* 1998; **118**: 827–834.
- [66] ZHANG LX, WANG J, WEN JQ, LIANG HG, DU LF. Purification and partial characterization of a protease associated with photosystem II particles. *Physiol Plant* 1995; **95**: 591–595.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano 10.12. 2001 r.

Przyjęto 20.01. 2002 r. :

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

e-mail: grzesiek@main.amu.edu.pl

ROLA PLAZMY PŁCIOWEJ W SPECYFIKACJI KOMÓREK LINII PŁCIOWEJ U BEZKRĘGOWCÓW I KRĘGOWCÓW

SPECIFICATION OF THE GERM-LINE CELLS IN INVERTEBRATES
AND VERTEBRATES. THE FUNCTION OF THE GERM PLASM

¹Małgorzata KLOC, ²Szczepan BILIŃSKI

¹Department of Molecular Genetics, MD Anderson Cancer Center, University of Texas, Houston, Texas. ²Zakład Zoologii Systematycznej, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie. W oocytach i komórkach jajowych wielu zwierząt, w sąsiedztwie bieguna tylnego (lub wegetatywnego) występuje specyficzna, morfologicznie odmienna cytoplazma, tzw. plazma płciowa. W czasie rozwoju zarodkowego plazma ta ulega segregacji do blastomerów linii płciowej, a następnie do komórek prapłciowych. Plazma płciowa zawiera liczne mitochondria, cysterny szorstkiej siateczki śródplazmatycznej, kompleksy Golgiego oraz charakterystyczne nieobłonione struktury, tzw. ziarna płciowe. W plazmie płciowej, a także w ziarnach płciowych gromadzone są rozmaite klasy RNA (m.in. zlokalizowane mRNA) oraz białka. W pracy przedyskutowano rolę składników plazmy płciowej w specyfikacji (determinacji) linii płciowej; przedstawiono też nowoczesne metody używane w badaniach funkcji plazmy płciowej.

Słowa kluczowe: komórki prapłciowe, oocyty, lokalizacja mRNA, rozwój zarodkowy.

Summary: In many invertebrates and vertebrates the specification of germ cells depends on the germ cell fate determinant which is called the germ plasm. During development the germ plasm segregates to the prospective germ line blastomeres and eventually to the primordial germ cells. At the ultrastructural level, the germ plasm contains a number of constant components: mitochondria, elements of rough endoplasmic reticulum, Golgi complexes and characteristic structures termed germinal granules. Various RNAs and proteins are localized either in the germ plasm matrix or on the germinal granules. We discuss the role of the germ plasm components and the methods of interference with its function.

Key words: Primordial germ cells, oocytes, RNA localization, embryogenesis.

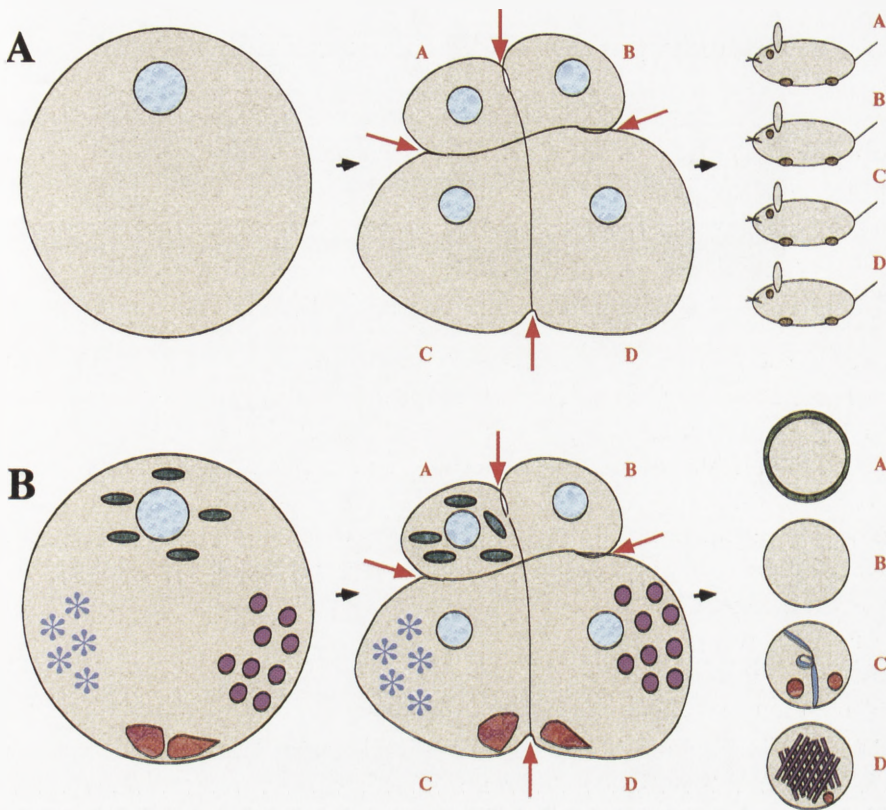
ROZWÓJ MOZAIKOWY I REGULACYJNY

Już ponad 100 lat temu opisano dwa podstawowe typy rozwoju zarodkowego: regulacyjny i mozaikowy. U zwierząt, których zarodki rozwijają się „regulacyjnie”, komórki jajowe są niespolaryzowane i nie zawierają żadnych asymetrycznie zlokalizowanych determinantów cytoplazmatycznych. W związku z tym, w początkowej fazie bruzdkowania wszystkie blastomery mają pełny i jednakowy potencjał rozwojowy. Po eksperymentalnym rozdzieleniu zarodka na indywidualne blastomery, każdy z nich może rozwinąć się w mniejszy, ale kompletny organizm (ryc. 1A) [30,48]. Specyfikacja losów komórek (w tym również komórek linii płciowej) i tkanek zachodzi w późniejszych etapach rozwoju zarodkowego i jest efektem indukcji oraz interakcji pomiędzy poszczególnymi blastomerami. Komórki jajowe zwierząt charakteryzujących się rozwojem mozaikowym są wyraźnie spolaryzowane; ich cytoplazma zawiera różnorodnie zlokalizowane determinanty, które podczas bruzdkowania rozdzielane są „asymetrycznie” – do ściśle określonych blastomerów. W rezultacie, każdy z blastomerów ma inne determinanty i inny potencjał rozwojowy. Po eksperymentalnym rozdzieleniu zarodka, blastomery rozwijają się zazwyczaj w niekompletne „organizmy” (części organizmów) (ryc. 1B) [11, 18, 33, 39].

W rozwoju zarodkowym większości zwierząt współdziałają procesy charakterystyczne dla rozwoju regulacyjnego (np. indukcja) i mozaikowego (lokalizacja determinantów) [20, 30]. Jednym z najlepiej poznanych i najbardziej fascynujących przykładów funkcjonowania determinantów cytoplazmatycznych w początkowej fazie embriogenezy jest proces specyfikacji komórek linii płciowej. Obecnie wiadomo, że determinanty komórek linii płciowej zawarte są w tzw. plazmie płciowej [8, 36, 45].

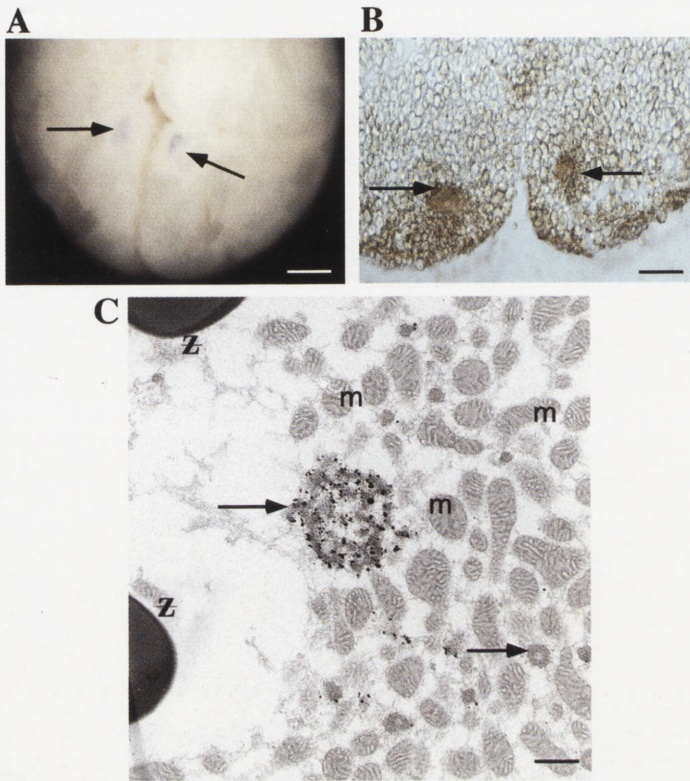
ULTRASTRUKTURA PLAZMY PŁCIOWEJ

Plazma płciowa (ang. *germinal/germ plasm*) to specyficzny, morfologicznie odmienny rejon cytoplazmy komórek linii płciowej, komórek prapłciowych, oocytów, dojrzałych komórek jajowych, blastomerów linii płciowej. Konsekwencją eksperymentalnego usunięcia tej plazmy z komórki jajowej lub młodego zarodka jest powstanie organizmu sterylnego, tj. pozbawionego funkcjonalnych komórek płciowych [8, 45]. Przeszczepienie plazmy płciowej z jej naturalnego położenia w inny rejon zarodka indukuje rozwój komórek płciowych w nietypowym miejscu [8, 9]. Plazmie płciowej w oocytach i zarodkach różnych gatunków zwierząt nadawano rozmaite nazwy. Np. u owadów określana była ona jako plazma polarna (ang. *polar plasm*), plazma biegunowa (ang. *pole plasm*) lub oosom. Obecnie wszystkie te terminy używane są wymiennie i traktowane jako synonimy.



RYCINA 1. Rozwój regulacyjny i mozaikowy: A – Rozwój regulacyjny – komórka jajowa nie zawiera determinantów cytoplazmatycznych. Po rozdzieleniu blastomerów, każdy z nich rozwija się w mniejszy, lecz kompletny organizm. B – Rozwój mozaikowy – komórka jajowa zawiera rozmaicie zlokalizowane determinanty, które w czasie rozwoju trafiają do określonych blastomerów. Po eksperymentalnym rozdzieleniu zarodka, blastomery rozwijają się w niekompletne „części organizmów”

U większości gatunków zwierząt, plazma płciowa ma postać mniejszych lub większych, optycznie „gęstych” wysepek (ryc. 2B). Badania w mikroskopie elektronowym pozwoliły stwierdzić, że plazma płciowa pozbawiona jest materiałów zapasowych (kul żółtka i kropeł lipidów) i zawiera zawsze te same organelle komórkowe: mitochondria, cysterny siateczki śródplazmatycznej, kompleksy Golgiego (diktiosomy) oraz charakterystyczne, elektronowogęste, nieobłonione struktury, tzw. ziarna płciowe (ang. *germinal granules*) (ryc. 2C) [13, 16, 25, 29]. Te ostatnie znane są również jako ziarna biegunowe (ang. *polar granules*) lub ziarna P (ang. *P granules*). Bardzo często, mitochondria występujące na terenie plazmy płciowej pozostają w ścisłym kontakcie z ziarnami płciowymi [15, 29], co sugeruje wymianę makrocząsteczek pomiędzy tymi organellami. Analiza rozmieszczenia mitochondrialnego rRNA w plazmie płciowej *Drosophila* sugeruje, że z mitochondriów do ziaren płciowych przekazywane są rybosomy mitochondrialne [15]. Według Kobayashi’ego i współpracowników, rybosomy te biorą udział w syntezie białek specyficznych dla plazmy płciowej [15].

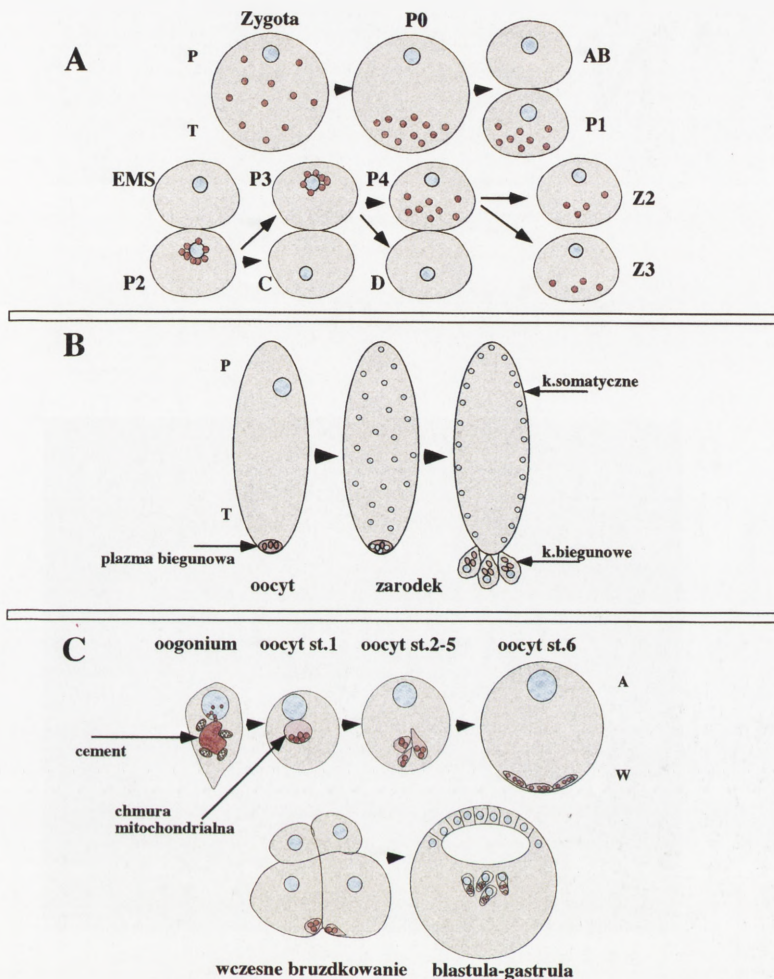


RYCINA. 2. Plazma płciowa w zarodku *Xenopus laevis*: A – Zarodek 8-komórkowy; wysepki plazmy płciowej (strzałki) w makromerach, w rejonie bieguna wegetatywnego. Hybrydyzacja z antysensownym *Xcat2*. B – Zarodek 8-komórkowy; wysepki plazmy płciowej (strzałki) w cytoplazmie makromerów. C – Zarodek 8-komórkowy; fragment wysepki plazmy płciowej. Widoczne liczne mitochondria (m), płytki żółtka (Z) i ziarna płciowe (strzałki). Mikroskop elektronowy, hybrydyzacja z antysensownym *Xcat2*; mRNA *Xcat2* zlokalizowany jest w ziarnach płciowych. Skala: A = 200 μm .; B = 100 μm .; C = 500 nm

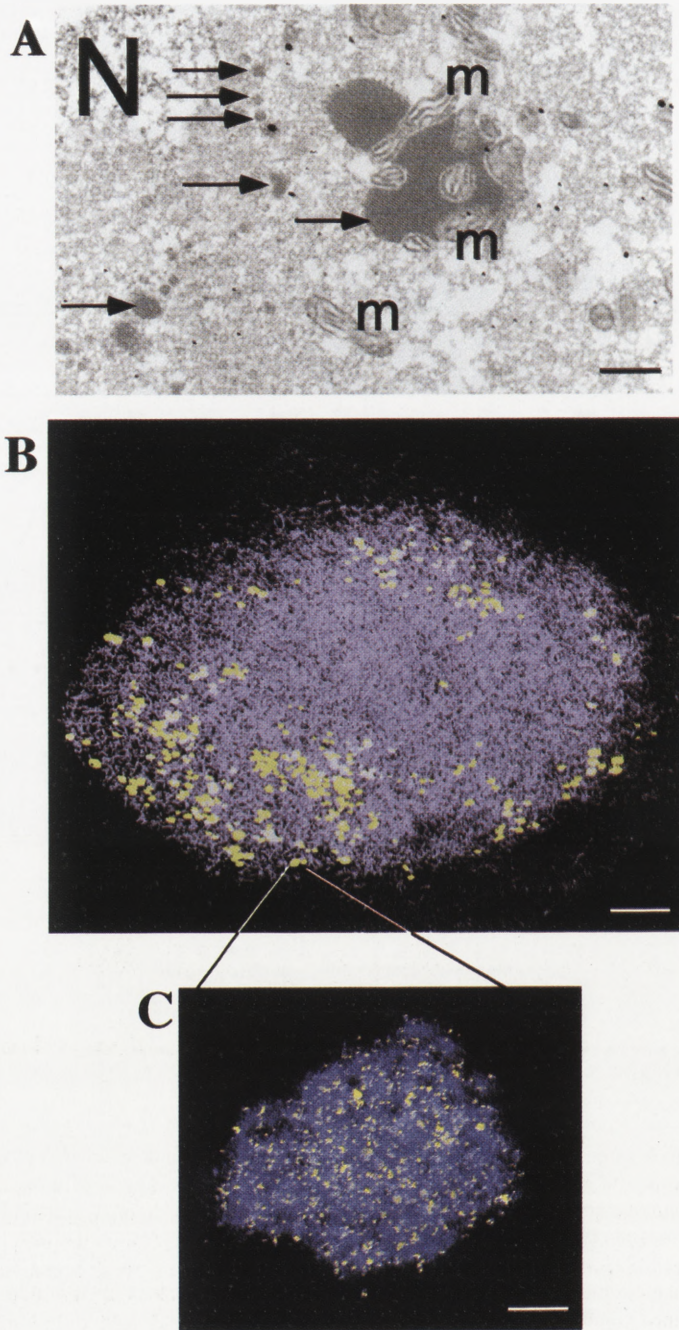
PLAZMA PŁCIOWA W CZASIE OOGENEZY I ROZWOJU ZARODKOWEGO

Analiza stopniowej akumulacji plazmy płciowej w rozwijających się oocytach rozmaitych gatunków zwierząt wskazuje, że jej składniki powstają (lub są odnawiane) w czasie oogenezy [8, 25, 29, 36]. Strukturalne i molekularne przemiany, jakim podlega plazma płciowa w czasie rozwoju zarodkowego, najlepiej poznano u 3 gatunków: nicienia, *Caenorhabditis elegans*, muszki owocowej, *Drosophila melanogaster* i żaby szponiastej, *Xenopus laevis*.

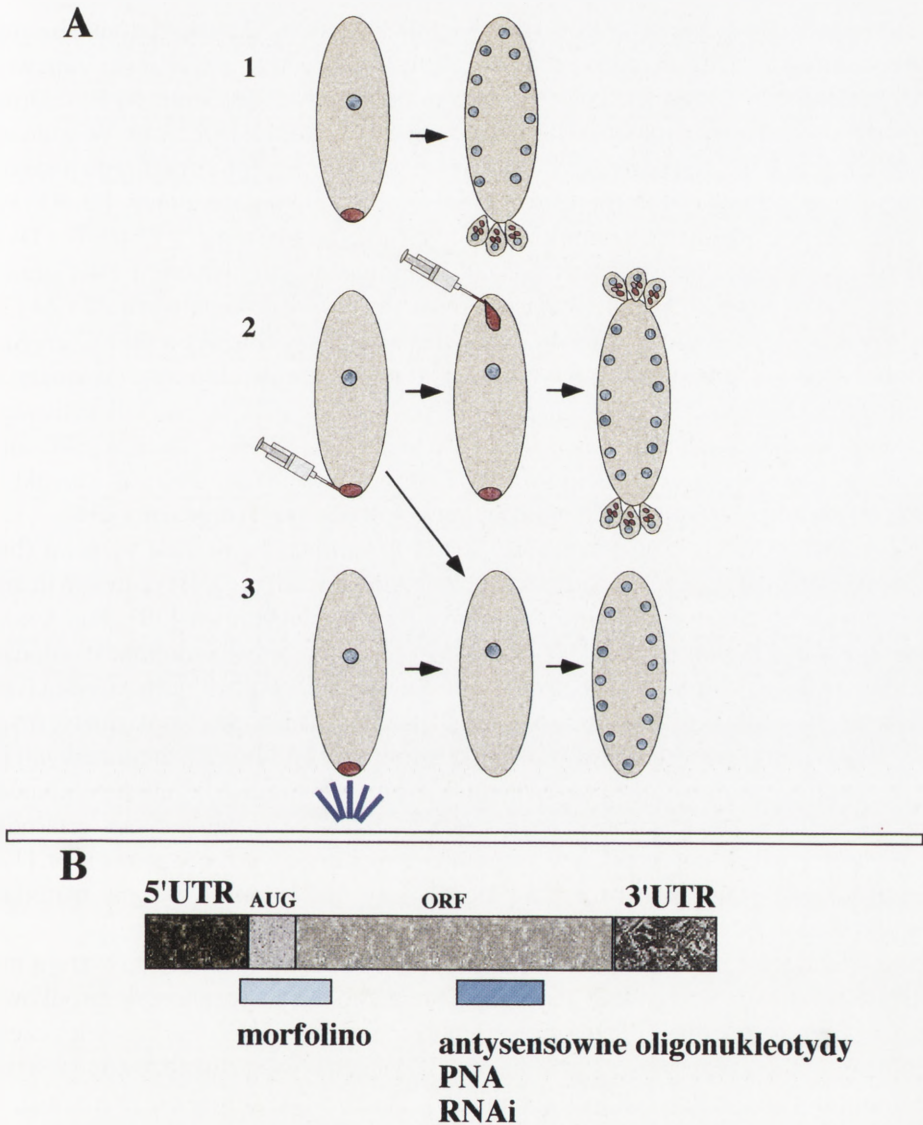
W oocytach i zygotach *C. elegans* nie stwierdzono typowej, wyodrębnionej w postaci wysepki plazmy płciowej. Cytoplazma tych komórek zawiera natomiast równomiernie rozmieszczone ziarna P (ziarna płciowe) [38]. W okresie poprzedzającym



RYCINA 3. Segregacja plazmy płciowej w czasie rozwoju zarodkowego: A – *C. elegans*. Po zapłodnieniu ziarna P (czerwone) rozmieszczone są w cytoplazmie zarodka równomiernie. Podczas kolejnych podziałów segregują one do blastomerów linii płciowej (kolejno P1, P2, P3 i P4), a w końcu do komórek prapłciowych Z2 i Z3. Komórki AB, EMS, C i D to blastomery linii somatycznej. W czasie podziału zygoty (P0) i blastomeru P1 ziarna P wędrują w kierunku bieguna tylnego (T) zarodka; w czasie podziału blastomeru P2 i P3 ziarna P gromadzą się wokół jądra. Biegun przedni zarodka – P. B. – *Drosophila melanogaster*. W oocycie i komórce jajowej plazma płciowa (czerwona) zlokalizowana jest w sąsiedztwie bieguna tylnego (T). W czasie formowania blastodermi syncytialnej kilka jąder zarodka wchodzi na teren plazmy płciowej. W ten sposób powstają komórki biegunowe. C – *Xenopus laevis*. Część apikalna oogonium zawiera tzw. chmurę pierwotną, zbudowaną z mitochondriów i cementu. W młodych oocytach chmura pierwotna przekształca się w ciało Balbianiego (chmurę mitochondrialną). Wegetatywna strefa ciała Balbianiego (METRO) zawiera ziarna płciowe (czerwone). Podczas wzrostu oocytu, ciało Balbianiego rozpadła się na kilka fragmentów, które wędrują w kierunku bieguna wegetatywnego (W). W dojrzałym oocycie pęcherzyk zarodkowy (jądro oocytu) leży w półkuli animalnej (A), wysepki plazmy płciowej pozostają w kontakcie z warstwą korową bieguna wegetatywnego. Podczas rozwoju zarodkowego, plazma płciowa segreguje do blastomerów wegetatywnych i w końcu do komórek prapłciowych



RYCINA 4. A – Fragment oogonium *X. laevis*; wydostający się z jądra cement (strzałki) wnika pomiędzy mitochondria (m). B – Rekonstrukcja ciała Balbianiego (na podstawie 21 seryjnych skrawków ultracienkich); widoczne mitochondria (fioletowe) i ziarna płciowe (jasnożółte). C – Rekonstrukcja ziarna płciowego (na podstawie 4 seryjnych skrawków ultracienkich), widoczne rozmieszczenie mRNA Xcat2 (jasnożółte punkty). Skala: A = 500 nm, B = 5 μ m, C = 400 nm



RYCINA 5. Metody badania funkcji plazmy płciowej. A – Mikrochirurgiczne przenoszenie i niszczenie plazmy płciowej w zarodkach *Drosophila melanogaster*. W zarodku kontrolnym komórki prapłciowe powstają w rejonie bieguna tylnego (1). Mechaniczne usunięcie plazmy płciowej (2) lub jej zniszczenie światłem ultrafioletowym (3) powoduje sterylizację zarodka (= brak komórek biegunowych). Przeniesienie plazmy płciowej do cytoplazmy bieguna przedniego (2) indukuje rozwój dodatkowych komórek biegunowych w przedniej części zarodka (= ektopowo). B – Metody blokowania funkcji mRNA. Nukleotydy antysensowne, zmodyfikowane (PNA) oraz dwuniciowe RNA (metoda RNAi) wiążą się z komplementarnymi sekwencjami odcinka kodującego (ORF) mRNA. Częsteczki hybrydowe degradowane są przez rybonukleazę H. Morfolino wiążą się z tym rejonem cząsteczki mRNA, w którym zlokalizowany jest sygnał inicjacji translacji (kodon startowy, AUG). Prowadzi to do zablokowania translacji docelowego mRNA, nie powodując jego degradacji (dalsze objaśnienia w tekście). 5'UTR i 3'UTR – nieulegające translacji fragmenty końca 5' i 3' cząsteczki mRNA

pierwszy podział mitotyczny zygoty (ryc. 3A, P0), ziarna P wędrują w kierunku bieguna tylnego zarodka. Odpowiedni przebieg pierwszej bruzdy podziałowej zapewnia segregację ziaren do jednej z dwóch komórek potomnych (blastomeru P1). Druga komórka potomna (blastomer AB) nie „dziedziczy” ziaren P (ryc. 3A). W podobny sposób, ziarna P ulegają segregacji w czasie drugiego, trzeciego i czwartego podziału mitotycznego zarodka. Komórki zawierające ziarna (kolejno blastomery P2, P3 i P4) to komórki linii płciowej. Komórki pozostałe (kolejno blastomery EMS, C i D) to blastomery somatyczne. Podczas podziału mitotycznego blastomeru P4 ziarna P rozdzielane są do obu blastomerów potomnych – komórek prapłciowych Z2 i Z3 [38, 40]. Przebieg segregacji ziaren P w czasie pierwszej fazy bruzdkowania *C. elegans* przedstawiono schematycznie na rycinie 3A. Badania ultrastrukturalne dowiodły, że w młodych komórkach płciowych ziarna P powstają w pobliżu osłonki jądrowej i zawierają specyficzne białka oraz zlokalizowane mRNA [38] (por. rozdział „Składniki plazmy płciowej i ziaren płciowych”). Uformowane ziarna P tracą kontakt z osłonką i przemieszczają się do bardziej obwodowych części ooplazmy [34].

W rozwijających się oocytach *Drosophila melanogaster* plazma płciowa (biegunowa) zlokalizowana jest w sąsiedztwie bieguna tylnego (ryc. 3B) i zawiera liczne, izolowane, elektronowogęste ziarna płciowe (ziarna biegunowe) [29]. Pod koniec oogenezy ziarna te tworzą kompleksy i uzyskują kontakt z mitochondriami. W młodym zarodku, w czasie formowania blastodermy syncytialnej, 3 lub 4 jądra zarodka (tzw. blastomery) wwędrowują do plazmy płciowej i otaczane są błonami cytoplazmatycznymi (ryc. 3B). Powstające w ten sposób komórki nazywamy komórkami biegunowymi [7, 29]. Po kilku podziałach mitotycznych komórki biegunowe przekształcają się w komórki prapłciowe. Te ostatnie stanowią jedyne źródło gamet w rozwijającym się zarodku (osobniku). Podczas migracji komórek prapłciowych do zawiązków gonad (por. [17]) ziarna płciowe stopniowo rozpadają się. Są one odtwarzane – z tzw. materiału chmurkowego (ang. *nuage material*) – w czasie witellogenezy [29].

Prewitellogeniczne oocyty żaby szponiastej, *Xenopus laevis* nie zawierają materiałów zapasowych i są całkowicie przejrzyste. Jądro oocytu (pęcherzyk zarodkowy) jest proporcjonalnie duże i leży w centrum komórki. W pobliżu jądra, w tej części ooplazmy, która w przyszłości stanie się półkulą wegetatywną, zlokalizowana jest tzw. chmura mitochondrialna (ciało Balbianiego). Warto w tym miejscu zaznaczyć, że podobne struktury opisano w oocytach wielu gatunków kregowców i bezkręgowców [2, 12]. Ciało Balbianiego *X. laevis*, poza mitochondriami, zawiera również cysterny szorstkiej siateczki śródplazmatycznej, diktiosomy i ziarna płciowe [13, 25]. Te ostatnie występują głównie w „wegetatywnym” (skierowanym ku przyszłemu biegunowi wegetatywnemu) rejonie chmury mitochondrialnej (ryc. 4B) [26]. Podczas witellogenezy, ciało Balbianiego dzieli się na kilka mniejszych fragmentów. Fragmenty te migrują ku powierzchni oocytu i docierają do bieguna wegetatywnego (ryc. 3C). W dojrzałych oocytach fragmenty ciała Balbianiego (nazywane w tym stadium wysepkami plazmy płciowej), z zawartymi w nich ziarnami płciowymi, zostają zakotwiczone do warstwy korowej bieguna wegetatywnego. W świetle powyższych obserwacji wydaje

się, że ciało Balbianiego *Xenopus* odpowiada za transport składników plazmy płciowej do cytoplazmy korowej bieguna wegetatywnego [22, 23]. Po zapłodnieniu, wysepki plazmy płciowej zlewają się w większe agregaty. Podczas bruzdkowania agregaty te ulegają segregacji i dostają się wyłącznie do blastomerów wegetatywnych (makromerów) (ryc. 2A, B, C), a następnie do komórek prapłciowych (ryc. 3C) [5, 26]. Ostatnio wykazano, że w czasie rozwoju zarodkowego (pomiędzy zapłodnieniem a pojawieniem się komórek prapłciowych) ziarna płciowe cyklicznie łączą się tworząc większe struktury i rozpadają na mniejsze ziarna [26].

Pochodzenie ciała Balbianiego *Xenopus laevis* wyjaśniono analizując ultrastrukturę jajników larwalnych. W tej fazie rozwoju, jajniki zawierają liczne, 16-komórkowe grona (zespoły) oogoniów. Oogonia *X. laevis* mają kształt gruszkowaty i są wyraźnie spolaryzowane. Zaostrzone, skierowane do centrum grona części tych komórek zawierają mitochondria, podczas gdy jądra leżą w rozszerzonych częściach apikalnych (ryc. 3C). Wydstający się z jąder oogoniów elektronowogęsty materiał (tzw. cement lub *nuage*) wypełnia przestrzeń pomiędzy mitochondriami (ryc. 4A), łącząc je w tzw. chmurę pierwotną (ryc. 4A). W młodych oocytach liczba mitochondriów wyraźnie rośnie, a chmura pierwotna staje się dojrzłym ciałem Balbianiego. Równocześnie cement traci kontakt z mitochondriami i przekształca się w tzw. materiał ziarnisto-włóknisty, GFM (ang. *Granulo-Fibrillar Material*). Badania ultrastrukturalne i hybrydocytochemiczne (z zastosowaniem molekularnych markerów ziaren płciowych) wskazują, że ziarna płciowe formowane są z GFM [24–26]. Materiał podobny do cementu stwierdzono również w spermatogoniach i spermatocytach *X. laevis*. Rola tego materiału w męskich komórkach płciowych pozostaje niejasna [8].

WSPÓŁCZESNE METODY BADANIA FUNKCJI SKŁADNIKÓW PLAZMY PŁCIOWEJ

Tradycyjną i najczęściej stosowaną metodą badania funkcji plazmy płciowej jest jej mikrochirurgiczne usuwanie lub niszczenie przy pomocy wiązki laserowej albo światła ultrafioletowego (ryc. 5A). Analiza skutków takich eksperymentów pozwoliła na określenie roli całej plazmy płciowej w specyfikacji komórek płciowych, nie wyjaśniła natomiast funkcji poszczególnych jej składników, np. białek, mRNA.

Dynamiczny postęp biologii molekularnej doprowadził do zaproponowania nowych metod pozwalających na zablokowanie („usunięcie”) funkcji wybranych elementów plazmy płciowej. Jedną z takich metod polega na wprowadzaniu (za pomocą mikropipety) do oocytów lub komórek jajowych, przeciwciał rozpoznających białka występujące w plazmie płciowej. Niestety, ze względu na właściwości toksyczne, nawet oczyszczonych przeciwciał, stosowanie tej metody jest utrudnione, a interpretacja uzyskanych wyników obciążona dużym błędem. Znacznie lepsze wyniki osiągnięto wprowadzając do komórek jajowych lub zarodków tzw. antysensowne oligonukleotydy

(ang. *antisense oligonucleotides*) [44]. Antysensowne oligonukleotydy to krótkie (od 15 do 21 zasad) odcinki DNA, komplementarne („antysensowne”) w stosunku do dowolnie wybranych sekwencji w kodującym odcinku mRNA (ryc. 5B). Po wprowadzeniu do komórki, antysensowny DNA wiąże się trwale z komplementarną sekwencją docelowej (analizowanej) cząsteczki mRNA. Takie hybrydowe cząsteczki są degradowane przez rybonukleazę H, enzym odpowiedzialny za rozpoznawanie i niszczenie hybryd DNA/RNA w komórkach zwierzęcych. W ten sposób, z cytoplazmy (plazmy płciowej) usuwane są produkty (mRNA, a w konsekwencji białka) ściśle określonego genu. Wadą omawianej metody jest niestabilność antysensownych oligonukleotydów, które bardzo szybko (w ciągu kilku minut) rozkładane są przez endonukleazy. Znacznie większą stabilność wykazują tzw. oligonukleotydy zmodyfikowane. W chwili obecnej najczęściej stosowane są oligonukleotydy siarkowe, peptydowe kwasy nukleinowe (PNA, ang. *Peptide Nucleic Acids*) oraz tzw. morfolino (ang. *morpholino*) [32, 42]. Są to analogi DNA, w których:

1. Jeden z atomów tlenu w wiązaniu fosfodiesterowym cząsteczki DNA zastąpiony jest przez siarkę (oligonukleotydy siarkowe);
2. Dezoksyryboza zastąpiona jest cząsteczką pseudopeptydu (oligonukleotydy peptydowe);
3. Dezoksyryboza zastąpiona jest sześciowęglowym pierścieniem morfolinowym (morfolino).

Oligonukleotydy zmodyfikowane nie występują w naturze i jako takie nie są rozpoznawane przez endonukleazy. W rezultacie, są one stabilne i nie ulegają rozkładowi przez wiele dni, a nawet tygodni, po wprowadzeniu do komórki. Zastąpienie dezoksyrybozy pseudopeptydem lub pierścieniem morfolinowym zapewnia dodatkowo silniejsze i bardziej specyficzne wiązanie z docelową cząsteczką mRNA. Warto w tym miejscu dodać, że hybrydy morfolino/mRNA (w przeciwieństwie do innych cząsteczek hybrydowych) nie są degradowane przez rybonukleazę H. W związku z tym, cząsteczki morfolino muszą zawierać sekwencje komplementarne do tego rejonu cząsteczki mRNA, w którym zlokalizowany jest sygnał inicjacji translacji (kodon startowy, AUG). Związanie cząsteczki morfolino z początkowym fragmentem odcinka kodującego mRNA blokuje translację, nie powodując degradacji cząsteczki mRNA (ryc. 5B).

Ostatnio, do badań nad funkcją plazmy płciowej zastosowano tzw. technikę RNAi (ang. *RNA interference*) [31, 46]. Technika ta jest stosunkowo prosta i polega na podawaniu (w pokarmie lub pożywce) dwuniciowych cząsteczek RNA (dsRNA, ang. *double-stranded RNA*) homologicznych do fragmentów analizowanego mRNA. Po wnikięciu do komórek, cząsteczki dsRNA uczestniczą (wraz z endonukleazami) w degradacji (rozcinaniu) docelowych cząsteczek mRNA (ryc. 5B) [27]. W ubiegłym roku wykazano, że krótkie cząsteczki dsRNA są naturalnym składnikiem komórek zwierzęcych. Wydaje się, że biorą one udział w regulacji ekspresji genów i degradacji RNA wirusów [46].

Jeszcze inną metodą stosowaną w badaniach funkcji plazmy płciowej jest wprowadzanie jej składników (białek, mRNA) do nietypowych („ektopowych”) rejonów komórki jajowej i/lub zarodka [9]. Analiza wyników takich eksperymentów pozwala określić rolę poszczególnych składników plazmy płciowej w specyfikacji komórek płciowych. Metoda ta umożliwia również śledzenie przebiegu transportu tzw. zlokalizowanych RNA (ang. *localized RNA*) do ściśle określonych rejonów ooplazmy [23–25], np. do plazmy płciowej (biegunowej) lub ciała Balbianiego (por. rozdział następnny).

SKŁADNIKI (mRNA, BIAŁKA) PLAZMY PŁCIOWEJ I ZIAREN PŁCIOWYCH

Caenorhabditis elegans

W ostatnich latach zidentyfikowano szereg białek, które występują stale (konstytutywnie) lub okresowo (w określonej fazie rozwoju) w ziarnach P [38]. Stałymi komponentami ziaren P są:

białka z rodziny PGL (ang. **P Granule**; PGL-1, PGL-2 i PGL-3) zawierające motyw RGG (ang. *RGG box*), charakterystyczny dla białek łączących się z RNA (ang. *RNA binding proteins*), w tym dla występującego w ziarnach płciowych *Drosophila*, białka vasa. Mutacje genu kodującego białko PGL-1 prowadzą do zablokowania rozwoju gonad i sterility osobników dorosłych [3, 35, 38];

białka (helikazy RNA) z rodziny GLH (ang. **Germ Line Helicase**; GLH-1, GLH-2, GLH-3 i GLH-4), wykazujące homologię z białkiem vasa *Drosophila*. Eksperymentalne usunięcie wszystkich 4 białek GLH (przy użyciu metody RNAi), z komórek osobnika rodzicielskiego, powoduje zahamowanie różnicowania oocytów w pokoleniu F1, nie ma natomiast wpływu na powstawanie plemników [38].

W czasie rozwoju zarodkowego w ziarnach P występują:

białka z rodziny KH (MEX-3 i GLD-1) zawierające domenę KH (ang. **K-Homology**) powszechnie występującą w białkach łączących się z jednoniciowym RNA. Białka MEX-3 i GLD-1 są represorami translacji, co sugeruje, że ziarna P odgrywają istotną rolę w regulacji ekspresji mRNA [38];

białka z rodziny CCCH (MEX-1, POS-1 i PIE-1) mające zdolność do łączenia się z RNA, zawierające palce cynkowe (ang. *zinc fingers*) typu CCCH. Najprawdopodobniej, biorą udział w kontroli stabilności cząsteczek mRNA zlokalizowanych w ziarnach P [38].

Jedynym, dotychczas zidentyfikowanym na terenie ziaren P, mRNA jest produkt genu *nos-2*. mRNA *nos-2* jest homologiem mRNA *nanos* *Drosophila* i mRNA

Xcat2 Xenopus laevis [41]. Białko nos-2 syntetyzowane jest wyłącznie w blastomerze P4 i komórkach prapłciowych (Z2 i Z3) i odpowiada za prawidłową rekrutację komórek prapłciowych do somatycznej części gonady [41].

Drosophila melanogaster

Geny, których produkty (mRNA lub białka) są niezbędne w czasie tworzenia, a potem funkcjonowania plazmy płciowej *Drosophila*, dzielone są obecnie na 2 grupy:

- 1) geny odpowiadające za powstanie plazmy płciowej;
- 2) geny odpowiadające za powstanie komórek biegunowych.

Do pierwszej grupy należą: *orb*, *staufen*, *gurken*, *spire*, *oskar*, *cappucino*; do drugiej: *tudor*, *oskar*, *vasa* i *valois*. Charakterystykę białek kodowanych przez wymienione geny podano w tabeli I.

Trzy najważniejsze składniki plazmy płciowej *Drosophila* to produkty genów *oskar*, *tudor* i *vasa* [3, 29].

mRNA *oskar* występuje wyłącznie na terenie plazmy płciowej. Eksperymentalne zaburzenie lokalizacji mRNA *oskar* lub wprowadzenie białka *oskar* do cytoplazmy bieguna przedniego oocytu prowadzi do powstania komórek biegunowych w przedniej części zarodka. Zahamowanie ekspresji genu *oskar* powoduje zmniejszenie liczby lub całkowity brak komórek biegunowych [9, 29].

Zarówno mRNA, jak i białko *tudor* zlokalizowane są w ziarnach płciowych (biegunowych). Białko *tudor* występuje również w mitochondriach plazmy płciowej. Ostatnio zaproponowano, że białko to bierze udział w sugerowanej przez Kobayashi'ego i współpracowników [15] „kooperacji” ziaren płciowych i mitochondriów [29].

Białko kodowane przez gen *vasa* jest stałym (konstytutywnym) składnikiem plazmy płciowej *Drosophila*. Białko to ma zdolność do wiązania się z RNA; na terenie plazmy płciowej łączy się z mRNA *oskar*. Rola tej interakcji nie została ostatecznie wyjaśniona [29].

Bardziej szczegółową i wyczerpującą dyskusję molekularnych aspektów różnicowania linii płciowej *Drosophila melanogaster* przedstawiono w jednym z poprzednich numerów Postępów Biologii Komórki [17].

Xenopus laevis

Dotychczas zidentyfikowano 9 genów (*Xcat2*, *Xwnt11*, *Xpat*, *Xdazl*, *Xlsirts*, *fatVg*, *DEAD South*, *XFACS*, *Fingers*), których produkty (cząsteczki mRNA) zlokalizowane są na terenie plazmy płciowej *Xenopus* [4, 22, 23, 26, 47]. Charakterystykę białek kodowanych przez te geny przedstawiono w tabeli I.

W czasie prewitellogenezy, wszystkie wymienione mRNA występują w wegetatywnej strefie chmury mitochondrialnej (ciała Balbianiego). Jak już wcześniej wspomniano, strefa ta zawiera prawie wszystkie ziarna płciowe (ryc. 4B); uważana jest ona obecnie za właściwą plazmę płciową i określana terminem METRO (ang.

Message Transport Organizer) [22, 23, 25]. Analiza ultrastrukturalna i hybrydocytochemiczna wykazała, że w czasie kolejnych faz oogenezy i rozwoju zarodkowego „wzór” rozmieszczenia zlokalizowanych mRNA w plazmie płciowej jest stosunkowo często modyfikowany [26]. I tak:

Cement nie zawiera żadnego z dotychczas zidentyfikowanych rodzajów mRNA.

W GFM stwierdzono mRNA *Xcat2*, *Xpat*, *Xdazl*, i *DEAD South*.

W pełni uformowanych ziarnach płciowych (w oocytach) występuje mRNA *Xcat2* (ryc. 4C), na ich powierzchni stwierdzono natomiast mRNA *Xpat* i *DEAD South*;

W ziarnach płciowych młodych zarodków występuje jedynie mRNA *Xcat2* (ryc. 2C) i śladowe ilości *Xpat*.

Pozostałe, z 9 wymienionych zlokalizowanych mRNA występują w cytoplazmie ciała Balbianiego, tj. pomiędzy ziarnami płciowymi [26]. Funkcja zlokalizowanych mRNA w zarodkach *Xenopus laevis* pozostaje niestety nieznana. Dotychczasowe badania eksperymentalne pozwoliły jedynie na ustalenie że:

Usunięcie mRNA *Xdazl* z zarodka prowadzi do nienormalnej migracji komórek prapłciowych [14].

RNA *Xlsirts* niezbędny jest do zaczepienia mRNA *Vg1* w warstwie korowej wegetatywnej półkuli oocytu [21].

mRNA *Xcat2* podlega translacji dopiero po uwolnieniu z ziaren płciowych [25, 26, 28].

Ostatnio zaproponowano, że ziarna płciowe *Xenopus*, podobnie jak ziarna *P. C. elegans*, odgrywają rolę w kontroli translacji zlokalizowanych mRNA.

PLAZMA PŁCIOWA W ROZWOJU REGULACYJNYM

Do niedawna sądzono, że oocyty i komórki jajowe ssaków są całkowicie symetryczne i nie zawierają żadnych nierównomiernie rozmieszczonych determinantów cytoplazmatycznych. Analiza literatury dotyczącej oogenezy tej grupy zwierząt wskazuje jednak, że u wielu gatunków torbaczy [37, 43] i ssaków łożyskowych (m.in. u szczura, chomika, świnki morskiej, królika, kozy, bizona oraz niektórych naczelnych, w tym człowieka) [6, 12] żeńskie komórki płciowe są wyraźnie spolaryzowane i zawierają ciało Balbianiego (chmurę mitochondrialną). Podobnie jak u *Xenopus laevis*, w młodych oocytach ciało to zlokalizowane jest w pobliżu pęcherzyka zarodkowego, później przemieszcza się do warstwy korowej jednego z biegunów. Badania w mikroskopie elektronowym wykazały, że ciało Balbianiego ssaków zawiera organelle charakterystyczne dla plazmy płciowej innych zwierząt, tj. mitochondria, cysterny siateczki śródplazmatycznej, diktiosomy oraz podobne do ziaren płciowych skupienia

TABELA 1. Geny zaangażowane w specyfikacji linii płciowej *Drosophila melanogaster* i *Xenopus laevis*

Gen/RNA	Charakterystyka białka	Gen/RNA	Charakterystyka białka
<i>Drosophila melanogaster</i>		<i>Xenopus laevis</i>	
<i>oskar</i>	funkcja nieznana	<i>Xcat2</i>	homolog nanos
<i>tudor</i>	funkcja nieznana	<i>Xwnt</i>	cząsteczka sygnałowa
<i>vasa</i>	helikaza RNA	<i>Xpat</i>	funkcja nieznana
<i>orb</i>	białko wiążące się z RNA	<i>Xdazl</i>	białko wiążące się z RNA
<i>staufen</i>	białko wiążące się z dwuniciowym RNA	<i>Xlsirts</i>	repetytywny, niekodujący RNA
<i>gurken</i>	ligand z rodziny TGF α	<i>fatVg</i>	homolog białka odpowiedzialnego za różnicowanie adipocytów ssaków
<i>spire</i>	funkcja nieznana	<i>DEAD South</i>	helikaza RNA
<i>cappucino</i>	homolog forminy	<i>XFACS</i>	syntaza acylowa CoA
<i>valois</i>	sekwencja nieznana	<i>Fingers</i>	białko zawierające palce cynkowe (21 motywów), homolog Krüppel
<i>nanos</i>	białko zawierające palce cynkowe		

elektronowogestego materiału [6]. Do chwili obecnej funkcja ciała Balbianiego ssaków pozostaje niejasna i nie wiadomo, czy struktura ta odgrywa jakąkolwiek rolę w determinacji komórek linii płciowej.

Odmienne zbudowane są oocyty myszy; nie zawierają one ani ciała Balbianiego, ani żadnych innych determinantów cytoplazmatycznych. Ostatnio wykazano natomiast, że w cytolazmie półkuli animalnej komórki jajowej tego gatunku zlokalizowana jest leptyna oraz białko STAT-3 [1, 10].

U płazów ogoniastych (*Urodela*) komórki linii płciowej powstają stosunkowo późno i jak się wydaje bez udziału determinantów cytoplazmatycznych. Plazma płciowa (*nuage*) pojawia się dopiero w komórkach prapłciowych [8, 45]. Ostatnio wykazano,

że oocyty i młode zarodki aksolotla zawierają mRNA *Axdazl* – homolog mRNA *Xdazl* *Xenopus* [19]. W czasie oogenezy, cząsteczki mRNA *Axdazl* rozmieszczone są w ooplazmie równomiernie, natomiast w komórkach prąpciwych występują wyłącznie na terenie plazmy płciowej. Funkcja *Axdazl* w specyfikacji linii płciowej nie została poznana.

LITERATURA

- [1] ANTCZAK M, VAN BLERKOM J. Oocyte influences on early development: the regulatory proteins leptin and STAT3 are polarized in mouse and human oocytes and differentially distributed within the cells of the preimplantation stage embryo. *Mol Hum Reprod* 1997; **3**: 1067–1086.
- [2] BALBIANI EG. Sur la constitution du germe dans l'oeuf animal avant la fecondation. *CR Hebd Seances Acad Sci* 1864; **58**: 584.
- [3] BASHIRULLAH A, COOPERSTOCK RL, LIPSHITZ HD. RNA localization in development. *Annu Rev Biochem* 1998; **67**: 335–394.
- [4] CHAN AP, KLOC M, BILIŃSKI S, ETKIN LD. The vegetally localized mRNA *fatvg* is associated with the germ plasm in early embryo and is later expressed in the fat body. *Mech Dev* 2001; **100**: 137–140.
- [5] CZOŁOWSKA R. Observations on the origin of 'germinal cytoplasm' in *Xenopus leavis*. *J Embryol Exp Morphol* 1969; **22**: 229–235.
- [6] DE SMEDT V, SZOLLOSI D, KLOC M. The Balbiani body: asymmetry in the mammalian oocyte. *Genesis* 2000; **26**: 208–212.
- [7] DENG W, LIN H. Asymmetric germ cell division and oocyte determination during *Drosophila* oogenesis. *Int Rev Cytol* 2001; **203**: 93–138.
- [8] EDDY EM. Germ plasm and differentiation of the germ cell line. *Int Rev Cytol* 1975; **43**: 229–280.
- [9] EPHRUSSI A, LEHMANN R. Induction of germ cell formation by oskar. *Nature* 1992; **358**: 387–389.
- [10] GARDNER RL. The early blastocyst is bilaterally symmetrical and its axis of symmetry is aligned with the animal-vegetal axis of the zygote in the mouse. *Development* 1997; **124**: 289–301.
- [11] GARDNER RL. Scrambled or bisected mouse eggs and the basis of patterning in mammals. *BioEssays* 1999; **21**: 271–274.
- [12] GURAYA SS. Recent advances in the morphology, cytochemistry and function of Balbiani's vitelline body in animal oocytes. *Int Rev Cytol* 1979; **59**: 249–321.
- [13] HEASMAN J, QUARMBY J, WYLIE CC. The mitochondrial cloud of *Xenopus* oocytes: the source of germinal granule material. *Dev Biol* 1984; **105**: 458–469.
- [14] HOUSTON DW, KING ML. A critical role for *Xdazl*, a germ plasm-localized RNA, in the differentiation of primordial germ cells in *Xenopus*. *Development* 2000; **127**: 447–456.
- [15] IIDA T, KOBAYASHI S. Essential role of mitochondrially encoded large rRNA for germ-line formation in *Drosophila* embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 11274–11278.
- [16] ILLMENSEE K, MAHOWALD AP, LOOMIS MR. The ontogeny of germ plasm during oogenesis in *Drosophila*. *Dev Biol* 1976; **49**: 40–65.
- [17] JAGLARZ MK. Molekularne podłoże różnicowania linii płciowej i formowanie gonady zarodkowej *Drosophila melanogaster*. *Post Biol Kom* 1998; **25**: 263–282.

- [18] JEFFERY WR. Ultraviolet irradiation during ooplasmic segregation prevents gastrulation, sensory cell induction, and axis formation in the ascidian embryo. *Dev Biol* 1990; **140**: 388–400.
- [19] JOHNSON AD, BACHVAROVA RF, DRUM M, MASI T. Expression of axolotl DAZL RNA, a marker of germ plasm: widespread maternal RNA and onset of expression in germ cells approaching the gonad. *Dev Biol* 2001; **234**: 402–415.
- [20] KACZANOWSKI A, KACZANOWSKA J. Mechanizmy przestrzennego różnicowania zarodka. *Post Biol Kom*, 2001; **28**: 69–98.
- [21] KLOC M, ETKIN LD. Delocalization of Vgl mRNA from the vegetal corex in *Xenopus* oocytes after destruction of Xlirt RNA. *Science* 1994; **265**: 1101–1103.
- [22] KLOC M, ETKIN LD. Two distinct pathways for the localization of RNAs at the vegetal cortex in *Xenopus* oocytes. *Development* 1995; **121**: 287–297.
- [23] KLOC M, LARABELL C, ETKIN LD. Elaboration of the messenger transport organizer pathway for localization of RNA to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes. *Dev Biol* 1996; **180**: 119–130.
- [24] KLOC M, BILIŃSKI S, CHAN AP, ETKIN LD. The targeting of Xcat2 mRNA to the germinal granules depends on a cis-acting germinal granule localization element within the 3'UTR. *Dev Biol* 2000; **217**: 221–229.
- [25] KLOC M, BILIŃSKI S, CHAN AP, ALLEN LH, ZEARFOSS NR, ETKIN LD. RNA localization and germ cell determination in *Xenopus*. *Int Rev Cytol* 2001; **203**: 63–91.
- [26] KLOC M, DOUGHERTY MT, BILIŃSKI S, CHAN AP, BREY E, KING ML, PATRICK CW, ETKIN LD. Three dimensional ultrastructural analysis of RNA distribution within germinal granules of *Xenopus*. *Dev Biol* 2002; **241**: 79–93.
- [27] MAINE EM. RNAi is a tool for understanding germline development in *Caenorhabditis elegans*: uses and cautions. *Dev Biol* 2001; **239**: 177–189.
- [28] MAC ARTHUR H, BUBUNENKO M, HOUSTON DW, KING ML. Xcat2 RNA is a translationally sequestered germ plasm component in *Xenopus*. *Mech Dev* 1999; **84**: 75–88.
- [29] MAHOWALD AP. Assembly of the *Drosophila* germ plasm. *Int Rev Cytol* 2001; **203**: 187–221.
- [30] MELTON DA. Pattern formation during animal development. *Science* 1991; **252**: 234–241.
- [31] MONTGOMERY MK, XU S, FIRE A. RNA as target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 15502–15507.
- [32] NILSEN PE, EGHOLM M. An introduction to peptide nucleic acid. *Curr Issues Mol Biol* 1999; **1**: 89–104.
- [33] NISHIDA H, SAWADA K. Macho-1 encodes a localized mRNA in ascidian eggs that specifies muscle fate during embryogenesis. *Nature* 2001; **409**: 724–729.
- [34] PITT JN, SCHISA JA, PRIESS JR. P granules in the germ cell of *Caenorhabditis elegans* adults are associated with clusters of nuclear pores and contain RNA. *Dev Biol* 2000; **219**: 315–333.
- [35] SCHISA JA, PITT JN, PRIESS JR. Analysis of RNA associated with P granules in germ cells of *C. elegans* adults. *Development* 2001; **128**: 1287–1298.
- [36] SAFFMAN EE, LASKO P. Germline development in vertebrates and invertebrates. *Cell Mol Life Sc* 1999; **55**: 1141–1163.
- [37] SELWOOD L. Mechanism underlying the development of pattern in marsupial embryos. *Curr Topics Dev Biol* 1992; **27**: 175–233.
- [38] SEYDOUX G, SCHEDL T. The germline in *C. elegans*: origins, proliferation, and silencing. *Int Rev Cytol* 2001; **203**: 139–185.
- [39] ST JOHNSTON D, NUSSLEIN-VOLHARD C. The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* 1992; **68**: 201–219.
- [40] STROME S, WOOD WB. Generation of asymmetry and segregation of germ line granules in early *C. elegans* embryos. *Cell* 1983; **35**: 15–25.

- [41] SUBRAMANIAM K, SEYDOUX G. Nos-1 and nos-2, two genes related to *Drosophila* nanos, regulate primordial germ cell development and survival in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 1999; **126**: 4861–4871.
- [42] SUMMERTON J. Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1489**: 141–158.
- [43] ULLMANN SL, BUTCHER L. Mammalian oocyte organelles with special reference to pleomorphic mitochondria and vacuole formation in marsupials. *Rep Fertil Dev* 1996; **8**: 491–508.
- [44] WAGNER RW, MATTEUCCI MD, GRANT D, HUANG T, FROEHLER BC. Potent and selective inhibition of gene expression by an antisense heptanucleotide. *Nat Biotechnol* 1996; **14**: 840–844.
- [45] WYLIE C. Germ cells. *Curr Opin Genet Dev* 2000; **10**: 410–413.
- [46] ZAMORE PD. RNA interference: listening to the sound of silence. *Nat Struct Biol* 2001; **8**: 746–750.
- [47] ZHANG J, KING ML. PCR-based cloning of cortically localized RNA from *Xenopus* oocytes. *Methods Mol Biol* 2000; **136**: 309–314.
- [48] ŻERNICKA-GOETZ M. Fertile offspring derived from mammalian eggs lacking either animal or vegetal poles. *Development* 1998; **125**: 4803–4808.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 05.02.2002 r.

Przyjęto: 05.02.2002 r.

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

PERYFERYCZNY RECEPTOR BENZODIAZEPIN

THE PERIPHERAL BENZODIAZEPINE RECEPTOR

Małgorzata SŁOCIŃSKA

Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii,
Zakład Bioenergetyki, Poznań

Streszczenie: Benzodiazepiny są klasą leków działających uspokajająco, nasennie i przeciwdrgawkowo. W ich terapeutycznym działaniu pośredniczy receptor GABA_A znajdujący się w centralnym układzie nerwowym. Miejsca wiążące benzodiazepiny, nazwane peryferycznym receptorem benzodiazepin (PRB), zidentyfikowano również poza obrębem centralnego układu nerwowego, w nadnerczach, sercu, nerkach, jajnikach lub jądrach, ale także w komórkach glejowych mózgu. W skład receptora PRB wchodzi białko p18 znajdujące się w błonie zewnętrznej mitochondriów oraz prawdopodobnie kanał VDAC (z ang. *voltage dependent anion channel*) oraz translokaza nukleotydów adeninowych. Receptorowi PRB przypisuje się udział w transporcie cholesterolu do wewnętrznej błony mitochondrialnej, proliferacji komórek, przepływie jonów wapnia przez błony komórkowe, oddychaniu komórkowym, odpowiadzi immunologicznej, transformacji nowotworowej oraz apoptozie. Ekspresja PRB jest gatunkowo i tkankowo specyficzna, zależna od poziomu hormonów w organizmie oraz ekspozycji na stres.

Słowa kluczowe: peryferyczny receptor benzodiazepin, benzodiazepiny.

Summary: Benzodiazepines are the most widely used therapeutic drugs because of their sedative and anxiolytic effects mediated through GABA_A receptors located in the central nervous system. Another recognition site for these drugs termed the peripheral-type benzodiazepine receptor (PRB) has been found in peripheral tissues (outside the nervous system) and glial cells in the brain. PRB is comprised in part by a 18 kDa protein. This protein is present in the outer mitochondrial membrane and is likely to associate with the VDAC channel and adenine nucleotide carrier. A definitive role of PRB has not been elucidated but strong evidence indicates that this receptor plays an important role in steroid biosynthesis, mechanism affecting mitochondrial respiration, proliferation, calcium flow, cellular immunity, malignancy and apoptosis. The tissue distribution of PRB shows a distinct cell-specific pattern

of expression. The receptor levels are regulated in a tissue dependent manner by hormonal regulation and stress.

Key words: peripheral benzodiazepine receptor, benzodiazepine

WSTĘP

Receptory benzodiazepin, leków działających przeciwdrgawkowo, przeciwłękowo, uspokajająco i nasennie zidentyfikowano w 1977 roku w błonach komórek nerwowych mózgu szczura. Ścisła zależność pomiędzy klinicznym działaniem benzodiazepin, takich jak: diazepam (popularne valium), a ich powinowactwem do miejsc wiążących wskazywała, że receptory te pośredniczą w terapeutycznym efekcie leków [18]. W tym samym czasie zidentyfikowano miejsca wiążące benzodiazepiny poza centralnym układem nerwowym, w nerkach i sercu [4]. Na tej podstawie podzielono receptory benzodiazepin na dwa typy:

- 1) centralny (CRB), identyczny z receptorem $GABA_A$, znajdujący się w presynaptycznych i postsynaptycznych błonach neuronów w obrębie centralnego układu nerwowego, aktywowany przez neurotransmitter kwas γ -aminomasłowy (GABA) oraz
- 2) peryferyczny (PRB), zlokalizowany w błonie komórkowej [58] i błonach organelli komórkowych, zidentyfikowany w centralnym układzie nerwowym [7], później także poza jego obrębem [5].

Peryferyczny receptor benzodiazepin występuje w komórkach glejowych, w tylnym płacie przysadki, korze nadnerczy [4], jądrach, jajnikach oraz sercu, płucach i nerkach [4,5,9]. Szczególnie wysokie zagęszczenie receptora PRB zaobserwowano w tkankach steroidogenicznych, głównie w nadnerczach, gdzie jego ilość jest pięciokrotnie wyższa niż w nerkach lub sercu. Niewielkie ilości PRB znajdują się w mięśniach szkieletowych i gładkich, wątrobie oraz mózgu [4]. Przy zastosowaniu technik histochemicznych wykazano, że peryferyczny receptor benzodiazepin występuje przede wszystkim w mitochondriach [32], ale jego obecność stwierdzono również w aparacie Golgiego, lizosomach, peroksosomach [57], jądrze komórkowym [37,57] oraz błonach komórkowych dojrzałych erytrocytów [59] i komórek glejowych [7,77]. Dotychczas najlepiej poznano peryferyczny receptor benzodiazepin występujący w mitochondriach.

Fizjologiczne funkcje receptora PRB nie są dobrze poznane, choć budowa i lokalizacja sugerują, że receptor ten może być zaangażowany w regulację podstawowych procesów metabolicznych komórki. Receptorowi temu przypisuje się udział w procesach, takich jak: steroidogeneza [41,64], transport cholesterolu do wewnętrznej błony mitochondrialnej [45,61], proliferacja komórek [23,79], przepływ jonów wapnia przez błonę komórkową [22,67], oddychanie komórkowe [38], transport porfirynewych intermediatów niezbędnych w syntezie hemu [85], odpowiedź immunologiczna (odporność komórkowa) [48], transformacja nowotworowa [1,2,37] oraz apoptoza [36,39,43,75].

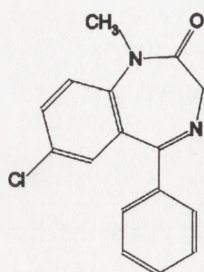
W niniejszej pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy dotyczący lokalizacji, molekularnej charakterystyki i klinicznych implikacji obecności receptora PRB.

LIGANDY RECEPTORA PRB – BENZODIAZEPINY KONTRA KARBOKSYMIDY IZOCHINOLINOWE

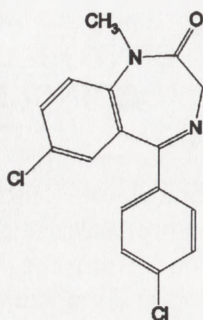
Najczęściej stosowanymi w badaniach ligandami receptora PRB są benzodiazepiny działające jako agoniści i karboksymidy izochinolinowe działające jako antagoniści (patrz ryc. 1). Benzodiazepiny są klasą leków szeroko opisaną ze względu na ich farmakologiczne znaczenie (patrz Wstęp). Należące do tej klasy leków diazepam i flunitrazepam wiążą się z równym powinowactwem do obu typów receptorów, podczas gdy pozostałe benzodiazepiny wykazują zróżnicowaną specyficzność wiązania [10]. Największe znaczenie dla badań receptora PRB ma Ro5-4864 (4-chlorodiazepam), będący pochodną diazepamu. Ligand ten wykazuje mikromolowe powinowactwo względem receptora GABA_A [10], natomiast jego wiązanie z receptorem PRB jest gatunkowo specyficzne [34]. Dla gryzoni (szczur, mysz) wykazano nanomolowe powinowactwo tego liganda do receptora PRB, tymczasem w tkankach ludzkich jest ono dwa rzędy wielkości niższe, a w tkankach wołu – trzy rzędy wielkości niższe [35]. Karboksymidy izochinolinowe charakteryzuje także wysoka specyficzność wiązania do receptora PRB. Najczęściej stosowanym związkiem z tej grupy jest PK-11195, dla którego stwierdzono nanomolowe powinowactwo w przypadku wszystkich badanych gatunków ssaków, m.in. szczura, królika, psa oraz człowieka. Ligand ten konkuruje z Ro5-4864 o miejsce wiązania na receptorze PRB, co oznacza, że oba związki wzajemnie znoszą możliwość swego wiązania z receptorem PRB [7,65].

Wiązanie się benzodiazepin do receptora PRB jest hamowane przez nienasycone kwasy tłuszczowe, detergenty i cyklosporynę A [38]. Czynniki te nie wpływają jednak na wiązanie się karboksymidów izochinolinowych. Początkowo sądzono, że obserwowane różnice w wiązaniu się benzodiazepin i karboksymidów izochinolinowych z receptorem PRB wynikają ze zmieniających się stanów konformacyjnych receptora lub że miejsca wiążące benzodiazepiny częściowo nachodzą i/lub są allosterycznie sprzężone z domenami wiążącymi karboksymidy izochinolinowe [10]. Istnieją jednak dane wskazujące na funkcjonowanie w obrębie receptora PRB dwóch odrębnych domen wiążących, jednej dla benzodiazepin i drugiej dla karboksymidów izochinolinowych [33]. Prawdopodobnie więc tylko ligandy wykazujące wysokie powinowactwo względem receptora PRB, takie jak Ro5-4864 oraz PK11195, wiążą się z jednym wspólnym dla obu klas ligandów miejscem, co tłumaczy obserwowaną w ich przypadku konkurencję o wiązanie z receptorem.

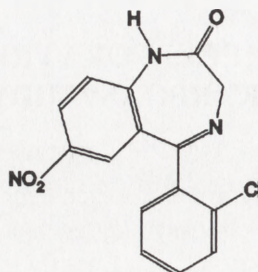
BENZODIAZEPINY



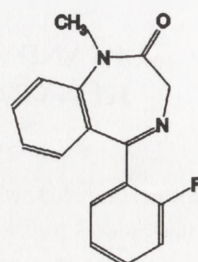
Diazepam



Ro-54864

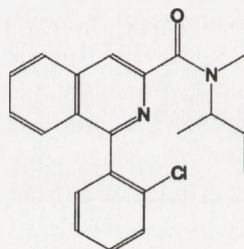


Klonazepam

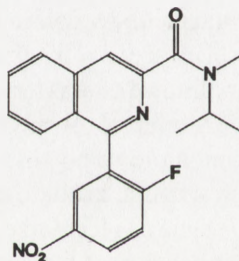


Flunitrazepam

KARBOKSYAMIDY IZOCHINOLINOWE



PK11195



PK14105

RYCINA 1. Chemiczna struktura wybranych ligandów receptora PRB: Ro5-4864 oraz karboksymidy izochinolinowe są specyficznymi ligandami PRB, diazepam i flunitrazepam wiążą się z równym powinowactwem do PRB i GABA_A, a klonazepam jest specyficznym ligandem GABA_A.

LIGANDY ENDOGENNE

Endogennymi ligandami receptora PRB są porfiryny [78] oraz białko DBI (z ang. *diazepam binding inhibitor*) [25,31]. Substancje te skutecznie konkurują z ligandami egzogennymi o miejsce wiązania na receptorze. Protoporfiryna IX, podawana w nanomolowych stężeniach, jest najbardziej skutecznym inhibitorem wiązania się ligandów egzogennych z receptorem PRB. Efektywnymi inhibitorami są także inne porfiryny, takie jak mezoporfiryna IX lub deuteroporfiryna IX. Zamiana jonu żelaza na jon cynku w grupie hemowej skutkuje 10-krotnym obniżeniem powinowactwa do tego

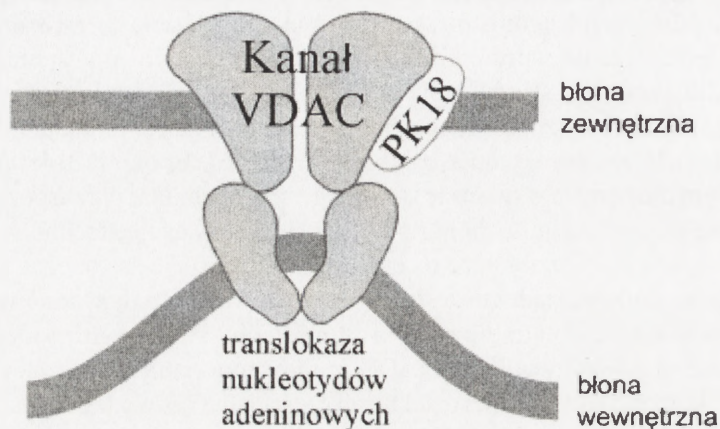
receptora [32]. Natomiast białko DBI współzawodniczy z diazepamem o miejsce wiązania na receptorze PRB i GABA_A. Białko to o masie 10 kD zlokalizowano w ludzkim mózgu i płynie mózgowo-rdzeniowym [30]. Działanie DBI w mózgu przypomina działanie odwrotnych agonistów, ponieważ białko to hamując działanie diazepamu, hamuje jednocześnie wpływ GABA_A na przewodnictwo jonów chlorkowych, co prowadzi do powstania stanów prołękowych u szczurów i ludzi. Wzrost ekspresji białka DBI jest skorelowany z rakowaceniem komórek mózgu i występuje w nowotworach mózgu, takich jak: astrocycytoma, glioblastoma [2,53]. Białko DBI jest równocześnie kluczowym elementem w procesie steroidogenezy i stymulacji transportu cholesterolu do wewnętrznej błony mitochondrialnej [16,31,32]. Stosując techniki hybrydyzacji i autoradiografii dowiedziono, że receptor PRB i białko DBI są obecne we wszystkich komórkach jajników i jąder uczestniczących w uwalnianiu hormonów, w nabłonku i gruczołach macicy, nadnerczach oraz nerkach. Sieciowanie oczyszczonego i znakowanego radioaktywnie białka DBI z mitochondriami pochodzącymi z komórek Leydiga (komórki wewnątrzwydzielniczej części jąder) dowodzi, że białko to łączy się specyficznie z białkiem pk18 [31] (patrz niżej).

POJEDYNCZE BIAŁKO CZY KOMPLEKS BIAŁEK

Istnieją dwie koncepcje dotyczące budowy receptora PRB. Pierwsza z nich zakłada, że receptor PRB to istniejący w miejscach kontaktu błon mitochondrialnych kompleks trzech białek: kanału VDAC (z ang. *voltage dependent anion selective channel*), translokazy nukleotydów adeninowych (TNA) oraz białka o masie 18 kDa nazywanego pk18 [33,50]. Druga koncepcja zakłada, że receptor PRB jest pojedynczym białkiem, identycznym z pk18, zlokalizowanym w błonie zewnętrznej mitochondriów i wchodzącym w skład PTP (z ang. *permeability transition pore*), definiowanego jako kanał o wysokiej przewodności i niskiej selektywności, biorący udział w regulacji procesów prowadzących do apoptozy [33,36,39,43,75,90] (patrz ryc. 2).

Zastosowanie znakowanych radioaktywnie ligandów receptora PRB umożliwiło wyizolowanie i oczyszczenie białka pk18 [5], co z kolei pozwoliło na poznanie sekwencji kodującego go genu u wielu gatunków ssaków, w tym człowieka [69], szczura [72], myszy [33] i krowy [65]. Białko pk18 wykazuje bardzo wysoką konserwatywność sekwencji aminokwasowej. Zidentyfikowano je również u bakterii *Escherichia coli* [47] i *Archeoglobus fulgidus* [34], a kodujący go gen jest wysoce homologiczny w stosunku do genu ssaków, w tym człowieka (patrz tab. 1). Fakt zachowania tak dużego podobieństwa w toku ewolucji świadczyć może o fundamentalnym znaczeniu tego białka dla komórki. Obecność białka pk18 wydaje się być również kluczowa dla działania samego receptora PRB. Ekspresja białka pk18 w liniach komórkowych ssaków powoduje wzrost liczby miejsc wiążących karboksymidy izochinolinowe i benzodiazepiny, co dowodzi, że białko to ma domeny wiążące dla obu klas ligandów,

Peryferyczny Receptor Benzodiazepin



Pojedyncze białko czy
kompleks białek?

RYCINA 2. Schemat budowy peryferycznego receptora benzodiazepin

a więc może pełnić funkcję receptora. Wychodząc z tego założenia należałoby się spodziewać braku aktywności (czyli specyficznego wiązania się liganda) receptora PRB u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, które nie mają genu kodującego białko pk18 [69,70]. Organizm ten jednak wykazuje aktywność receptora PRB (Słocińska, wyniki niepublikowane), co wskazuje na to, że receptor PRB może być kompleksem białek powstającym również przy braku białka pk18. Jest to jednak aktywność odmienna od obserwowanej w komórkach ludzkich [69]. Można stąd wnioskować, że białko pk18 nie jest jedynym miejscem wiązania się ligandów receptora PRB. Choć nie można tego stwierdzić definitywnie, białko pk18 może być odpowiedzialne za indukowanie zmian konformacyjnych innych białek, takich jak: kanał VDAC lub TNA, uczestniczących w wiązaniu ligandów receptora PRB. Istnieje również inne wytłumaczenie: to białka związane z pk18 mogą określać strukturalne i funkcjonalne środowisko receptora PRB, wpływając na charakterystykę wiązania się ligandów [33].

Choć obecność białka pk18 nie jest konieczna dla ekspresji aktywności receptora PRB, jest niezbędna dla prawidłowego rozwoju wyższych organizmów eukariotycznych. Wszelkie próby wyhodowania myszy pozbawionej genu kodującego białko pk18 kończyły się niepowodzeniem, bowiem zwierzęta umierały we wczesnym stadium rozwoju embrionalnego [62]. Zaobserwowano jednak, że brak białka pk18 powoduje

TABELA 1. Homologia genu kodującego białko pk 18

	% homologii z PRB czł owieka	Referencje
Nerki		
człowieka	100	[64]
bydłęce	85	[60]
myszy	82	[30]
szczura	77	[66]
<i>Escherichia coli</i>	55	[43]
<i>Archeoglobus ulgidus</i>	53	[31]

tylko w 50% redukcję wiązania się ligandów do receptora PRB [41]. W innego typu eksperymentach, izolowano białko pk18 z mysich komórek Leydiga poddanych transformacji nowotworowej i wbudowywano je w liposomy. Białko to wiązało karboksymidy izochinolinowe, ale nie wiązało benzodiazepin. Dodanie mitochondriów do płynu inkubacyjnego, w którym znajdowały się liposomy, przywracało zdolność wiązania się benzodiazepin [33]. Białko odpowiedzialne za ten efekt zostało oczyszczone i zidentyfikowane jako kanał VDAC. Powyższe dane stanowią silny dowód na to, że receptor PRB nie jest pojedynczym białkiem, ale kompleksem przynajmniej dwóch białek, w którym miejsce wiązania karboksymidów izochinolinowych znajduje się na białku pk18, a wiązanie benzodiazepin wymaga obecności zarówno białka pk18, jak i kanału VDAC. Wpływ benzodiazepin na przewodnictwo kanału VDAC obserwowano także u niższych *Eucaryota*, takich jak: ameba *Acanthamoeba castellanii* i drożdże *Saccharomyces cerevisiae*. Zaobserwowano również, że w mitochondriach drożdży Ro5-4864 osłabia działanie CATR, który jest niekompetycyjnym inhibitorem translokazy nukleotydów adeninowych (Słocińska, dane niepublikowane). Kolejnym dowodem na to, że receptor PRB jest kompleksem kilku białek było wyizolowanie w natywnej formie kompleksu trzech białek, w którego skład oprócz białka pk18 i kanału VDAC wchodzi TNA [46]. Liczne próby rozdzielania kanału VDAC od TNA lub białka pk18 powodowały utratę możliwości wiązania ligandów receptora PRB. Stechiometria wyznaczona dla kompleksu tych białek w oczyszczonej frakcji mitochondriów pokazuje, że VDAC i TNA występują w dużo większych ilościach niż białko pk18. Obecność pk18 jest przy tym tkankowo i gatunkowo specyficzna [44].

FUNKCJE PERYFERYCZNEGO RECEPTORA BENZODIAZEPIN – FAKTY I HIPOTEZY

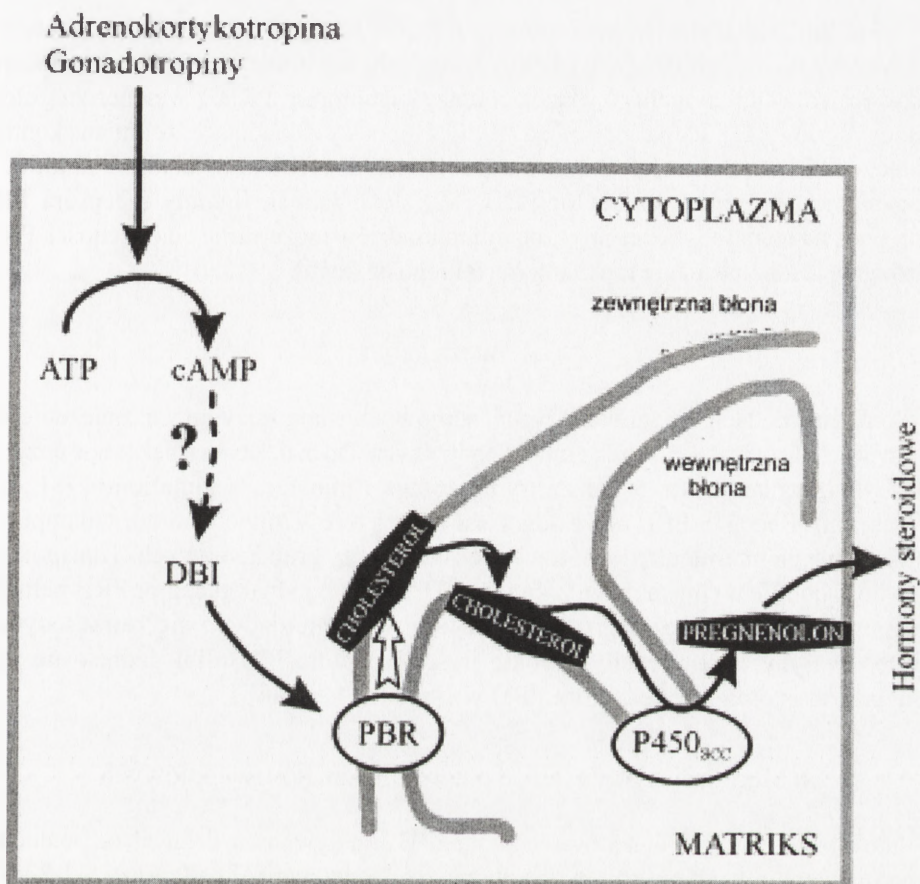
1. Biosynteza steroidów

Najlepiej scharakteryzowaną funkcją receptora PRB jest jego udział w syntezie steroidów [74,82]. Stwierdzenie to oparte jest na dwóch ważnych przesłankach. Po pierwsze: komórki steroidogeniczne mają największą liczbę miejsc wiążących ligandy receptora PRB [10,28]. Po drugie: białko pk18, które prawdopodobnie umożliwia transport cholesterolu do wewnętrznej błony mitochondrialnej, znajduje się w zewnętrznej błonie mitochondrialnej [57].

Pierwszym krokiem w biosyntezie steroidów jest przemiana cholesterolu w pregnenolon. Reakcja ta katalizowana jest przez enzym P-450_{sc} zlokalizowany po matriksowej stronie wewnętrznej błony mitochondrialnej. Czynnikiem limitującym wydajność działania tego enzymu jest ilość cholesterolu, transportowanego do wewnętrznej błony mitochondrialnej [45,61]. Zatem, translokacja cholesterolu z cytoplazmy do wewnętrznej błony mitochondrialnej jest krytycznym momentem regulującym syntezę steroidów i hormonów, takich jak: adrenokortykotropina i gonadotropiny, które uruchamiają mechanizmy komórkowe prowadzące do steroidogenezy. Egzogenne ligandy receptora PRB modulują translokację cholesterolu z błony zewnętrznej do wewnętrznej. Ligandy specyficzne wobec receptora PRB, takie jak: Ro5-4864 (agonista) i karbosymidy izochinolinowe (antagoniści), stymulują syntezę steroidów w nadnerczach, jądrach, jajnikach, łożysku i komórkach glejowych [34]. Z kolei flunitrazepam, częściowy agonista receptora PRB w wyniku wiązania się z receptorem, hamuje stymulowaną przez hormony tropowe biosyntezę steroidów w korze nadnerczy i komórkach Leydiga [45]. Sugeruje to, że receptor PRB może odgrywać istotną rolę w transporcie cholesterolu i regulacji syntezy steroidów. Proces ten zachodziłby w miejscach kontaktu zewnętrznej i wewnętrznej błony mitochondrialnej, przy współpracy z białkiem DBI [64]. Ten endogenny ligand receptora PRB, stymuluje steroidogenezę poprzez wiązanie się do receptora, wpływając w ten sposób na mitochondrialny transport cholesterolu (patrz ryc. 3).

2. Wydajność energetyczna mitochondriów

Główną funkcją mitochondriów jest przekształcanie energii prowadzące do syntezy ATP. W związku z tym pojawiło się pytanie, czy ligandy receptora PRB mogą wpływać na wydajność energetyczną tych organelli. Okazało się, że Ro5-4864 i PK11195 podawane w nanomolarnych stężeniach obniżają kontrolę oddechową oraz indeks ADP/O wyznaczane dla mitochondriów pochodzących z nerek i serca ssaków [38]. Efektem działania tych ligandów jest obniżenie zużycia tlenu w stanie fosforylacyjnym i wzrost zużycia tlenu w stanie spoczynkowym. Obserwowana zmiana kontroli oddechowej i indeksu ADO/O może być więc spowodowana osłabieniem sprzężenia



RYCINA 3. Schemat przedstawiający udział PRB w syntezie steroidów: Kortykotropina i gonadotropiny oddziałując na receptory powierzchniowe komórki, stymulują syntezę cyklicznego AMP. cAMP jest odpowiedzialny za pobudzenie cytozolowego czynnika niezbędnego do aktywacji transportu cholesterolu do wewnętrznej błony mitochondrialnej. Tym czynnikiem jest prawdopodobnie DBI, które łączy się z PRB pośredniczy w 1. etapie steroidogenezy, jakim jest transport cholesterolu do wewnętrznej błony mitochondrialnej, gdzie ulega przemianie w pregnenolon

między łańcuchem oddechowym i syntazą ATP. Wpływ różnych ligandów receptora PRB na wydajność energetyczną mitochondriów jest skorelowany z ich powinowactwem do receptora. Im wyższe powinowactwo, tym skutek obecności liganda jest silniejszy. Zmiana kontroli oddechowej i indeksu ADP/O w mitochondriach izolowanych z różnych tkanek jest ponad to zależna od ilości receptora PRB w badanych mitochondriach [44].

W mitoplastach ssaków nanomolowe stężenia PK-11195 i Ro5-4864 skuteczniej niż w mitochondriach zmieniają kontrolę oddechową i indeks ADP/O, co zapewne odzwierciedla funkcjonalny związek między receptorem PRB a wewnętrzną błoną mitochondriów [42]. Jednakże istnieją również hipotezy zakładające, że zmiana kontroli oddechowej i indeksu ADP/O jest niespecyficznym efektem działania ligandów, w którym nie pośredniczy receptor PRB [89]. Jeśli jednak ligandy receptora PRB wpływają na wydajność energetyczną mitochondriów niezależnie od obecności PRB, niezbędne jest wyjaśnienie mechanizmu takiego działania.

3. Synteza hemu

Porfiryny będące składnikami grup hemowych mają decydujące znaczenie dla aktywności wielu białek, nie tylko mitochondrialnych. Do białek tych należą takie enzymy, jak: cyklaza guanylowa, pyrolaza tryptofanowa i transferaza glutationu [78], oraz cytochromy. Receptor PRB może odgrywać istotną rolę w mitochondrialnym imporcie porfiryńowych intermediatów potrzebnych do syntezy grup hemowych. Transport ten prawdopodobnie wymaga udziału kanału VDAC. Jeśli jednak receptor PRB pełniłby kluczową rolę w syntezie grup hemowych, w różnicujących się retikulocytach występowałyby odpowiednio wysokie ilości receptora PRB. Tak jednak nie jest. Podważa to istotną rolę receptora PRB w tym procesie [44].

4. Modulacja zależnych od potencjału kanałów wapniowych

Modulacyjny wpływ ligandów receptora PRB na aktywność zależnych od potencjału kanałów wapniowych obserwowano dla mózgu, serca, nerek i nadnerczy [11,22,67]. Powinowactwo benzodiazepin selektywnych wobec receptora PRB koreluje z możliwością ich współzawodniczenia z nifedypiną (dihydropirydyna) o wiązanie z zależnym od potencjału kanałem wapniowym typu L [11]. Im wyższe powinowactwo względem receptora PRB, tym skuteczniejsza konkurencja z nifedypiną. Na przykład Ro5-4864 kompetytywnie hamuje wiązanie nifedypiny do kanałów wapniowych, ale jego stężenia niezbędne dla wywołania tego efektu są dwa rzędy wielkości wyższe niż jego powinowactwo do receptora PRB [22]. Co ciekawe, dihydropirydyny stosowane w mikromolowych stężeniach także kompetytywnie hamują wiązanie Ro5-4864 do receptora PRB. Zjawisko to można tłumaczyć w następujący sposób: benzodiazepiny i dihydropirydyny wiążą się z wysokim powinowactwem do odpowiadających im miejsc wiążących, natomiast z niskim powinowactwem do miejsca wiązania konkurującego liganda. Inne z kolei badania wykazały, że Ro5-4864 skraca czas trwania potencjału czynnościowego w mięśniu sercowym świnki morskiej i obniża siłę jego skurczu [44]. Jest to skutek hamowania przez ten ligand transportu jonów wapnia do wnętrza komórki, co sugeruje bezpośredni wpływ benzodiazepin na zależne od potencjału kanały wapniowe znajdujące się w sercu. Jednak obserwowany efekt wymaga mikromolowych stężeń Ro5-4864. Mikromolowe stężenia benzodiazepin hamują także działanie

zależnych od potencjału kanałów wapniowych w synaptosomach mózgu szczura [68]. Ponieważ hamujący wpływ diazepam i Ro5-4864 jest niemal równy, można założyć, iż kanały wapniowe regulowane potencjałem stanowią prawdopodobnie alternatywne miejsca wiązania ligandów receptorów GABA_A i PRB, charakteryzujące się niskim powinowactwem.

5. Proliferacja komórek

Możliwość oddziaływania ligandów receptora PRB na kanały wapniowe sugeruje udział tego receptora w proliferacji komórek [34], bowiem zwiększony poziom jonów wapnia w cytoplazmie jest warunkiem wstępnym dla mitozy komórek eukariotycznych. Zainteresowanie badaczy rolą receptora PRB w proliferacji komórek ma również inne przyczyny. Po pierwsze, stwierdzono podwyższone ilości receptora PBR w tkankach nowotworowych, po drugie, zaobserwowano silny wpływ ligandów receptora PRB na namnażanie się komórek hodowanych *in vitro*.

Zwiększona ekspresja receptora PRB jest często obserwowaną cechą komórek nowotworowych. Wzrastającą liczbę miejsc wiążących benzodiazepiny oraz podwyższony poziom mRNA białka pk18 w porównaniu z tkankami zdrowymi wykazano, na przykład, dla nowotworów mózgu [2,14,40]. W zmienionych nowotworowo astrocytach i komórkach glejowych ilość receptora PRB jest większa niż w komórkach kontrolnych [53,60]. Także w innych typach nowotworów (na przykład rak jajnika) częstość występowania receptora PRB wzrasta znacznie w stosunku do tkanek kontrolnych. Najnowsze badania wykazały także wysoki poziom ekspresji receptora PRB w próbkach pobranych ze złośliwego guza piersi [37]. Co więcej, zaobserwowano również, że w liniach komórkowych wyprowadzonych z bardziej zaawansowanego nowotworu piersi lokalizacja receptora PRB w komórce ulega zmianie. W przeciwieństwie do komórek kontrolnych lub mniej agresywnych linii guza, gdzie receptor PRB znajduje się w mitochondriach, stwierdzono jego obecność przede wszystkim w jądrze komórkowym [37]. Powyższe ustalenia nie pozwalają jednak jednoznacznie stwierdzić, że podwyższona ekspresja receptorów PRB jest ściśle skorelowana z występowaniem nowotworu.

Istnieje szereg danych wskazujących na udział ligandów receptora PBR w modulacji proliferacji komórek. Stwierdzono między innymi, że benzodiazepiny o wysokim powinowactwie do receptora PRB hamują proliferację komórek grasicy. Takiej korelacji nie stwierdzono dla ligandów GABA_A [79]. W limfocytach myszy pochodzących ze śledziony, zaobserwowano zależne od stężenia hamowanie proliferacji i syntezy DNA przez diazepam i Ro5-4864 [34]. Natomiast w liniach komórkowych glejaka [40] oraz transformowanych komórkach Leydiga [31] po podaniu nanomolowych stężeń PK-11195 i Ro5-4864, następuje stymulacja wzrostu komórki i syntezy DNA [35]. Jednakże, mikromolowe stężenia tych ligandów hamują wbudowywanie się tyminy do DNA, co jest interpretowane w kategoriach efektu niespecyficznego, wynikającego z oddziaływania tych ligandów z innymi białkami i lipidami błonowymi. W badaniach

nad komórkami melanomy B16/C3 u myszy dowiedziono, że benzodiazepiny o wysokim, nanomolarnym powinowactwie do receptora PRB, takie jak Ro5-4864 wykazują wysoką skuteczność w indukcji melanogenezy, podczas gdy benzodiazepiny o bardzo niskim powinowactwie, na przykład klonazepam, były dużo mniej skuteczne. Stwierdzono również, że markery różnicujących się komórek, takie jak: aktywność tyrozynazy i synteza melaniny, mogą ulegać indukcji przez diazepam [44].

6. Udział receptora PRB w odpowiedzi immunologicznej

Udział receptora PRB w regulacji proliferacji komórkowej sugeruje jego zaangażowanie w reakcję układu immunologicznego na nowotwór. Liczne obserwacje wskazują na to, że znaczącą rolę w tym procesie odgrywają makrofagi. Gromadzą się one wokół guza, a ich obecność zwykle skorelowana jest z regresją nowotworu. Benzodiazepiny wiążą się ze specyficznymi receptorami makrofagów i modulują ich właściwości oksydacyjne [48]. Badania *in vitro* dowodzą, że zdolność makrofagów do produkowania czynników TNF- α oraz IL-1, istotna w zwalczaniu nowotworu, jest hamowana przez specyficzne ligandy receptora PRB [87].

7. Udział w procesie apoptozy?

Punktem krytycznym procesu apoptozy jest otwarcie PTP (z ang. *permeability transition pore*) prowadzące do rozproszenia gradientu protonowego w wyniku zniszczenia integralności zewnętrznej i wewnętrznej błony mitochondrialnej [36,75,90]. Wychodząc z założenia, że receptor PRB jest ściśle związany z PTP podjęto próby określenia wpływu agonistów i antagonistów tego receptora na apoptozę ludzkich komórek. Istniejące fakty wskazują na ścisłą korelację między aktywnością anty-apoptyczną różnych agonistów i ich powinowactwem do receptora PRB oraz brak wpływu agonistów receptora GABA_A, takich jak klonazepam, na proces apoptozy. Na przykład Ro5-4864 silnie chroni limfoblastocyty przed apoptozą indukowaną przez czynnik TNF- α [13]. Natomiast PK-11195 wzmacnia indukcję apoptozy wywoływaną przez agonistów receptora glukokortykoidowego, chociaż sam nie wykazuje cytotoksycznego działania [15]

REGULACJA WYSTĘPOWANIA PERYFERYCZNEGO RECEPTORA BENZODIAZEPIN

1. Regulacja hormonalna

Kiedy odkryto, że receptor PRB odgrywa ważną rolę w tkankach wydzielających steroidy, spodziewano się, że regulacja poziomu ekspresji PRB w układzie dokrewnym

koreluje z aktywnością działania hormonów steroidowych, co znalazło potwierdzenie w faktach [50,67]. U dorosłych samic szczura ilość receptora PRB w jajnikach i ciałku żółtym związana jest z etapami przebiegającego cyklu miesięczkowego i osiąga maksimum w czasie owulacji. W macicy maksymalna liczba receptorów PRB przypada na fazę preowulacyjną, która poprzedza jajczkowanie i zbiega się z produkcją przez jajniki estrogenów powodujących proliferację komórek macicy [34]. W trakcie ciąży i laktacji ilość PRB znacznie spada. Z kolei podawanie przez 4 dni niedojrzałym płciowo samicom szczura testosteronu i progesteronu powodowało 1,5-krotny wzrost ilości PRB w jajnikach [6]. Jednakże aplikowanie tych hormonów zwierzętom przez 10 dni dawało wyniki całkowicie odmienne. Ilość receptorów PRB ulega obniżeniu o 14% w przypadku stosowania progesteronu i 40% w przypadku testosteronu [6]. W jądrach dojrzewających szczurów zaobserwowano trzykrotny wzrost ilości receptorów PRB. Powyższe rezultaty wskazują na udział PRB w różnicowaniu i rozwoju jąder i jajników [34].

Nadczynność tarczycy wywoływana u szczurów przez podawanie D-tyroksyny przez 10 dni powodowała wzrost ilości receptorów PRB w sercu, nerkach i jajnikach. Niedoczynność tarczycy przyczynia się natomiast do redukcji ilości receptora PRB w sercu i wątrobie [44]. Rezultaty te świadczą o tym, że ilość PRB może być regulowana przez podawanie steroidów. Stwierdzono również współdziałanie między receptorami PRB i hormonami tropowymi przysadki podczas rozwoju organizmu [6] oraz ich udział w syntezie hormonów steroidowych. Na przykład, receptor PRB występujący w jądrach jest prawdopodobnie zaangażowany w produkcję testosteronu [34].

2. Stres

Peryferyczny receptor benzodiazepin jest prawdopodobnie zaangażowany w regulację ważnych systemów związanych ze stresem, do których należą między innymi oś podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA) i sympatyczny układ nerwowy [34]. W ludzkich leukocytach i erytrocytach, receptor PRB został zidentyfikowany w błonie plazmatycznej [21,59], co umożliwia udział tego receptora w działaniu układu neuroendokrynoimmunologicznego [12] odgrywającego kluczową rolę w adaptacji organizmu w warunkach stresu.

Udział receptora PRB w reakcji na silny stres został eksperymentalnie wykazany w wielu badaniach na zwierzętach. Traktowanie myszy silnymi elektrowstrząsami indukuje szybki wzrost ilości receptora PRB w korze mózgowej i sercu w ciągu 30 minut po przeprowadzonym doświadczeniu [7]. Jednorazowy stres, np. wrzucanie szczurów do wody, powoduje także wzrost ilości receptora w korze mózgowej, płatach węchowych, nerkach i limfocytach [34]. Stwierdzono również, że silny stres wzmacnia działanie Ro5-4864 i karboksymidów izochinolinowych. Przypuszcza się, że wzrost ilości receptorów PRB w przodomózgowiu spowodowany silnym stresem może być

wywołany naborem peryferycznych receptorów benzodiazepinowych w drodze translokacji z innych przedziałów subkomórkowych, a nie syntezą białek receptorowych [49].

Poddanie szczurów działaniu hałasu powoduje wzrost o 80% częstości występowania receptora PRB w korze mózgowej przy jednoczesnym obniżeniu o 40% ilości receptora GABA_A w tej samej tkance. Wskazuje to, że indukowane stresem zmiany dotyczące receptora PRB nie idą w parze ze zmianami dotyczącymi receptora GABA_A [52]. Stres wywołany hałasem powodował także wzrost ilości receptora PRB i białka DBI w nadnerczach i hipokampie, co prawdopodobnie odgrywa istotną rolę w uwalnianiu steroidów i neurosteroidów wywołujących zwrótne zmiany w ilości receptorów benzodiazepinowych i białka DBI w mózgu. Substancje te mogą działać jako agoniści receptora GABA_A powodując ujemne sprzężenie zwrotne inaktywujące oś HPA [52].

Jak wspomniano uprzednio, poddanie szczurów jednorazowemu działaniu hałasu powodowało znaczący wzrost ilości receptora PRB. Odmiennych wyników dostarczają badania, w których szczury poddawano wielokrotnemu stresowi. 80-krotne poddawanie szczurów działaniu hałasu powodowało obniżenie ilości receptorów PRB w nerkach, sercu, gruczole przysadki i korze mózgowej [20]. Podobnie, głodzenie zwierząt przez 5 dni indukowało obniżenie ilości receptora PRB w nerkach o 33%, sercu o 34% i nadnerczach o 35%. Poddanie szczurów głodówce powodowało również redukcję ilości receptorów GABA_A w mózdzku o 35%, natomiast w korze mózgowej nie zaobserwowano żadnych zmian w ilości tego receptora. Wyniki te wskazują, iż chroniczny stres wywołuje spadek ilości receptora PRB [34]. Długotrwały stres może prowadzić do obniżenia ilości receptora PRB nie tylko u zwierząt, ale także u ludzi. Pomiar ilości receptora PRB przeprowadzony u żołnierzy po sześciu dniach ćwiczeń na poligonie wskazuje na redukcję ilości tego receptora w płytkach krwi o 26%, co potwierdza związek między długotrwałym stresem a redukcją ilości PRB [27].

Nie wiadomo, jakie mechanizmy odgrywają kluczową rolę w regulacji ekspresji receptora PRB w odpowiedzi na stres. Receptory PRB w dużych ilościach występują w tkankach szczególnie aktywnych podczas stresu, takich jak: serce, nerki, nadnercza i płuca. Sugeruje się więc, że receptory PRB są zaangażowane w fosforylację oksydacyjną i steroidogenezę [26,38]. Aktywacja receptora PRB podczas ekspozycji na silny stres może prowadzić do lepszej adaptacji w warunkach patologicznych. W niektórych sytuacjach zmiany w ilości PRB związane są z równoległym wzrostem aktywności receptora GABA_A [34].

2.1 PRB i nerwice

Obserwacja zachowania i encefalografia wykazały, że Ro5-4864 wywołuje konwulsje i niepokój u myszy, szczurów i świnek morskich w sposób podobny do odwrotnych agonistów receptora GABA_A i inhibitorów kanału chlorkowego sprzężonego z tym receptorem. Konwulsje i niepokój indukowane przez Ro5-4864 mogą być hamowane przez PK11195, który działa uspokajająco i przeciwdrgawkowo [10,56], ale nie przez

Ro15-1788, antagonistę GABA_A. Zatem, receptory PRB i GABA_A choć strukturalnie, farmakologicznie i fizjologicznie odmienne mogą posiadać pewne wspólne behawioralne funkcje, które są jednak dotąd nieznanne.

Wywołane przez czynniki zewnętrzne niepokój, lęk i złość występujące przez przynajmniej sześć miesięcy wpływają na stan fizjologiczny organizmu człowieka. Podawanie pacjentom diazepam, wywołującego stan uspokojenia, prowadziło do spadku ilości receptorów PRB w płytkach krwi o 16% w ciągu tygodnia i o 69% w ciągu 4 tygodni [83]. Podobne rezultaty zaobserwowano dla limfocytów, a efekt działania diazepam był widoczny jeszcze przez długi czas po zakończeniu kuracji. Badania przeprowadzone na zwierzętach pokazują, że długotrwałe aplikowanie diazepam skutkuje wzrostem ilości receptora PRB w sercu i korze mózgu. Jednakże po 5 dniach od zaprzestania podawania leku następuje ustabilizowanie się ilości receptorów PRB w tych tkankach do poziomu sprzed kuracji [80]. Obniżenie ilości receptora PRB w tych tkankach jest prawdopodobnie wywołane przez białko DBI, którego uwalnianie wzrasta podczas stanów niepokoju [34].

2.2. PRB i choroby neurodegeneracyjne

Zmiany poziomu receptora PRB występują w niektórych schorzeniach neurodegeneracyjnych. Obniżony poziom ilości receptora PRB stwierdzono, na przykład, u pacjentów cierpiących na chorobę Parkinsona [16]. Obniżenie ilości receptorów PRB w płytkach krwi u tych pacjentów nie było zależne od podawanych leków, chociaż doświadczenia na zwierzętach wykazują specyficzny tkankowo modulacyjny efekt dopaminy na ekspresję receptora PRB [3]. Zredukowaną ilość PBR w płytkach krwi stwierdzono również u pacjentów ze schizofrenią podczas kuracji dopaminowej [84]. Pośmiertne badania mózgu pacjentów z chorobą Alzheimera wykazały natomiast wzrost ilości receptora PRB w płacie skroniowym oraz w przedcentralnym i pozaśrodkowym zakręcie kory mózgowej [29]. Ponieważ PRB w mózgu zlokalizowany jest głównie w komórkach glejowych, możliwe jest, że wzrost ilości receptora PRB odzwierciedla uszkodzenie mózgu i glejozę. Choroba Alzheimera związana jest ze wzmożoną aktywnością osi HPA, skutkiem czego jest wzrost aktywności wydzielania steroidów i w konsekwencji wzrost ilości receptora PRB.

2.3. PBR i toksyczne uszkodzenie mózgu

Czynniki chemiczne, które powodują uszkodzenie neuronów, wywołują wzrost ilości receptora PRB w sercu i niektórych obszarach mózgu, takich jak: podwzgórze i hipokamp [8]. Receptor PRB może być więc stosowany jako marker uszkodzenia komórek nerwowych. Na przykład kwas metylofosforofluorowy, używany jako gaz bojowy, powoduje uszkodzenie neuronów z reakcjami zapalnymi i częściową proliferacją gleju [34]. Zmiany te są wyraźnie skorelowane ze zmianami w ilości miejsc wiążących ligandy receptora PRB. Dwa dni traktowania gazem bojowym zawierającym kwas metylofosforofluorowy powoduje wzrost ilości receptora PRB w hipokampie. Uszkodzenia hipokampu i wzrost ilości miejsc wiążących ligandy receptora PRB mogą być również wywołane kwasem kainowym [46,55].

PODSUMOWANIE

Niniejsza praca dowodzi, że wiedza o receptorze PRB jest wciąż cząstkowa. Podstawowym problemem jest nadal poznanie budowy molekularnej receptora PRB, jako iż na pytanie, czy receptor jest kompleksem białek, w którym białko pk18 pełni kluczową rolę, czy też funkcjonuje jako pojedyncze białko, nadal nie istnieje jednoznaczna odpowiedź. Fakt, że białko pk18 jest wysoce konserwatywne, sugeruje jego podstawowe znaczenie w funkcjonowaniu komórki. Białko to nie występuje jednak u niektórych niższych organizmów, takich jak: drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, choć obserwowana jest tu aktywność receptora PRB. Niezbędne jest też wyjaśnienie, dlaczego ewolucja tak starannie zadbała o zachowanie sekwencji tego niewielkiego białka tylko w wybranych organizmach. Wydaje się, że wnikliwe badania prowadzone na komórkach mikroorganizmów umożliwią uzyskanie odpowiedzi na to pytanie.

Receptor PRB bierze prawdopodobnie udział w wielu istotnych procesach zachodzących w komórce, takich jak: steroidogeneza, metabolizm energetyczny, proliferacja i różnicowanie komórek, transport wapnia przez błony plazmatyczne czy apoptoza. Dokładne zrozumienie jego funkcjonowania i regulacji występowania może okazać się kluczowe w terapii wielu chorób, między innymi nowotworów, chorób związanych z nieprawidłowym funkcjonowaniem układu immunologicznego i dokrewnego oraz chorób o podłożu neurologicznym.

Składam serdeczne podziękowania dr Hannie Kmicie za pomoc w napisaniu niniejszej pracy.

LITERATURA

- [1] ALENFALL J, BATRAS. Modulation of PBR density by testosterone in prostatic adenocarcinoma. *Life Sci* 1995; **56**: 1897–1902.
- [2] ALHO H, KOLMER M, HELEN P. Increased expression of diazepam binding inhibitor in human brain tumors. *Cell Growth Differ* 1995; **6**: 309–314 .
- [3] AMIRI Z, KATZ Y, WEIZMAN A, BIDDER M, SNYDER SH, GAVISH M. Adrenal mitochondrial benzodiazepine receptors are sensitive to agents active at the dopamine receptor. *Biochem Pharmacol* 1993; **45**: 999–1002.
- [4] ANHOLT RPH, DE SOUZA EB, OSTER-GRANITE ML, SNYDER SH. Peripheral type benzodiazepine receptors: Autoradiographic localization in whole body sections of neonatal rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1985; **233**: 517–528.
- [5] ANTKIEWICZ-MICHALUK L, GUIDOTTI A, KRUEGER KE. Molecular characterization and mitochondrial density of a recognition site for peripheral-type benzodiazepine ligands. *Mol Pharmacol* 1988; **272**–278.
- [6] BAR AMI S, AMIRI Z, FARES F, GAWISH M. Modulation of peripheral benzodiazepine receptors in female rat genital organs by various gonadal steroids. *Life Sci* 1992; **54**: 1965–1975.

- [7] BASILE AS, SKOLNICK P. Subcellular localization of peripheral-type binding sites for benzodiazepines in rat brain. *J Neurochem* 1986; **46**: 305–308.
- [8] BASILE AS, SKOLNICK P. Tissue specific regulation of peripheral type benzodiazepine receptor density after chemical sympathectomy. *Life Sci* 1988; **42**: 273–283.
- [9] BEAUMONT K, HEALY DP, FANESTIL D.D. Autoradiographic localization of benzodiazepine receptors in rat kidney. *Eur J Pharmacol* 1984; **110**: 149–150.
- [10] BENAVIDES J, GUILLOUX DE, ALLAN DE, UZAN A, MIZOULE J, RENAULT C, LE FUR G. Opposite effects of an agonists Ro5-4864 and an antagonist PK-11195 of the peripheral type benzodiazepine receptor binding sites on autogenic seizures in DBA/2J mice. *Life Sci* 1984; **34**: 2613–2620.
- [11] BENDER AS, HERTZ L. Pharmacological evidence that the non neuronal diazepam binding site in primary structures of glial cells is associated with a calcium channel. *Euro J Pharmacol* 1985; **110**: 287–288.
- [12] BERKOVICH A, FERRARESE C, CAVALETTI G, ALHO H, GUIDOTTI A, COSTA E. Topology of DBI receptors in human lymphocytes. *Life Sci* 1993; **52**: 1265–1277.
- [13] BEUTNER G, RUCK A, RIEDE B, WELTE W, BRDICZKA D. Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocase in rat brain resemble the permeability transition pore. *FEBS Lett* 1996; **396**: 189–195.
- [14] BLACK KL, SHIRAIISHI, IKEZAKI K, TABUCHI K, BECKER DP. Peripheral benzodiazepine stimulates secretion of growth hormone and mitochondrial proliferation in pituitary tumor GH cells. *Neurol Res* 1994; **16**: 74–84.
- [15] BONO F, LAMARCHE I, PRABONNAUD G, LE FUR, HERBERT JM. Peripheral benzodiazepine receptors agonists exhibit potent antiapoptotic activities. *Biochim Biophys Res Commun* 1999; **265**: 457–461.
- [16] BONUCCELI U, NUTI A, DEL DOTTO P, PICCINI P, MARTINI C. Platelet peripheral benzodiazepine receptors are decreased in Parkinsons disease. *Life Sci* 1991; **48**: 1185–1190.
- [17] BOUJRAD N, HUDSON JR Jr, PAPADOPOULOS U. Inhibition of hormone stimulated steroidogenesis in cultured Leydig tumor cells by a cholesterol-linked phosphorothiate oligodeoxynucleotide antisense to diazepam binding inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 5728–5735.
- [18] BRAESTRUP C, SQUIRES RF. Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high affinity [3H] diazepam binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; **74**: 3805–3809.
- [19] BRUSTOVETSKY N, KLINGENBERG U. Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca^{2+} . *Biochemistry* 1996; 8483–8488.
- [20] BURGIN R, WEIZMAN R, GAWISH M. Repeated swim stress and peripheral benzodiazepine receptor. *Neuropsychobiology* 1996; **33**: 28–31.
- [21] CAHARD D, CAVAL X, CARAYON P, ROGUE C, CASELLAS P, LE FUR P. Subcellular localization of PBR on human leukocytes. *Lab Invest* 1994; **70**: 23–28.
- [22] CANTOR EH, KENESSEY A, SEMENUK G, SPECTOR S. Interaction of channel blocker with non neuronal binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 1549–1552.
- [23] CARMEL J, FARES FA, LESCHIRER S, SCHERUBE H, WEISINGER G, GAVISH MC. Peripheral type benzodiazepine receptors in the regulation of proliferation of MCF-7 human breast carcinoma cell line. *Biochem Pharmacol* 1999; **59**: 831–842.
- [24] CASALOTTI SO, PELAIA G, YAKOWLEW AG, GRAYSON DR, KREGER KE. Structure of the rat gene encoding the mitochondrial benzodiazepine receptor. *Gene* 1992; **121**: 377–382.
- [25] CORDA MG, FERRARI M, GUIDOTTI A, COSTA E. Isolation, purification and partial sequence of a neuropeptide (diazepam binding inhibitor) precursor of an anxiogenic putative ligand for benzodiazepine recognition site. *Neurosc Lett* 1984; **47**: 310–324.
- [26] CULTY M, LI H, BOUJRAD, AMRI H, VIDIĆ B, PAPADOPOULOS K. *In vitro* studies on the role of the peripheral benzodiazepine receptors in steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999; **69**: 123–130.

- [27] DAR DE, WEIZMAN A, KARP L, GRINSHPOON A, BIDDER M, KOTLER M. Platelet peripheral benzodiazepine receptor in repeated stress. *Life Sci* 1991; **48**: 341–346.
- [28] DE SOUZA EB, ANHOLT RRH, MURPHY KMM, SNYDER SH, KUCHAR MJ. Peripheral type benzodiazepine receptors in endocrine organs: Autoradiographic localization in rat pituitary, adrenal and testis. *Endocrinology* 1985; **116**: 567–573.
- [29] DIORIO D, WELNER SA, BUTTERWORHL RF, MEANEY MJ. Peripheral benzodiazepine binding sites in Alzheimer disease frontal and temporal cortex. *Neurobiol Aging* 1991; **12**: 255–258.
- [30] FERRERO P, COSTA E, GUIDOTTI A. A diazepam binding inhibitor (DBI)-like neuropeptide is detected in human brain. *Brain Res* 1986; **399**: 136–142.
- [31] GARNIER M, BOUJARD N, OGWUEBU SO, HUDSON JR Jr, PAPADOPOULOS V. The polypeptide diazepam binding inhibitor and a higher affinity mitochondrial peripheral type benzodiazepine receptor sustain constitutive steroidogenesis in the RRC Leyding tumor cell line. *J Biol Chem* 1994; **269**: 22105–22112.
- [32] GARNIER M, BOUJARD N, OKE BO, BROWN AS, RIOND J, FERRARA P, SHOYAB M, SHAREZ-QUIAN CA, PAPADOPOULOS SV. Diazepam binding inhibitor is a paracrine/autocrine regulator of Leyding cell proliferation and steroidogenesis. Action via peripheral type benzodiazepine receptor and independent mechanisms. *Endocrinology* 1993; **132**: 444–458.
- [33] GARNIER M, DIMCHEV AB, BOUJARD N, PRICE JM, MUSTO NA, PAPADOPOULOS V. *In vitro* reconstitution of a functional peripheral type benzodiazepine receptor from mouse Leyding tumor cells. *Mol Pharmacol* 1994; **45**: 201–211.
- [34] GAVISH M, BACHMAN I, SHOUKRUN R, KATZ Y, VEENMAN L., WEISINGER G, WEIZMAN A. Enigma of the peripheral benzodiazepine receptor. *Pharmacological Rev* 1999; **51**: 629–650.
- [35] GAVISH M, KATZ K, BAR-AMI S, WEIZMAN R. Biochemical, physiological and pathological aspects of the peripheral benzodiazepine receptor. *J Neurochem* 1992; **58**: 1589–1601.
- [36] GRĄDZKA I. Apoptoza – decyzja należy do mitochondrium. *Post Biochem* 2000; **46** (1).
- [37] HARDWICK M, FERTICH D, CULTY M, PAPADOPOULOS V. Peripheral type benzodiazepine receptor (PBR) in human breast cancer. *Cancer Res* 1999; **59**: 837–842.
- [38] HIRSCH JD, BEYER CF, MALKOWITZ L, BEER B, BLUME AJ. Mitochondrial benzodiazepine receptor mediate inhibition of mitochondrial respiratory control. *Mol Pharmacol* 1989; **35**: 157–163.
- [39] HIRSCH T, DECAUDIN D, SUSU SA, MARCHETTI P, LAROCLETTE N, RIGON M, KROEMER G. PK 11195, a ligand of the mitochondrial benzodiazepine receptor facilitates the induction of apoptosis and reverses Bcl2 mediated cytoprotection. *Exp Cell Res* 1998; **241**: 426–434.
- [40] IKEZAKI K, BLACK KL. Stimulation of cell growth and DNA synthesis by peripheral benzodiazepine receptor. *Cancer Lett* 1990; **49**: 115–120.
- [41] KELLY-HERSKOWITZ E, WEIZMAN R, SPANIER J, LESCHINER S, LAHAR M, GAVISH M. Effects of PBR antisense knockout on MA-10 Leyding cell proliferation and steroidogenesis. *J Biol Chem* 1998; **273**: 5478–5483.
- [42] KINALLY KW, ZOROV D, ANTONENKO N, SNYDER SH, MC ENERY MW, TEDESCHI H. Mitochondrial benzodiazepine receptor linked to inner membrane ion channels by nanomolar actions of ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 1374–1378.
- [43] KROEMER G, ZAMZANI N, SUSIN S.A., Mitochondrial control of apoptosis. *Today* 1997; **18**: 44–57.
- [44] KRUEGER KE. Molecular and functional properties of mitochondrial benzodiazepine receptors. *Biochimica et Biophysica Acta* 1995; **1241**: 453–470.
- [45] KRUEGER KE, PAPADOPOULOS V. Peripheral type benzodiazepine receptors mediate translocation of cholesterol from outer to inner mitochondrial membranes in adrenocortical cells. *J Biol Chem* 1990; **265**: 15015–15022.

- [46] KUHLMAN AC, GUILARLE TR. The peripheral benzodiazepine receptor is a sensitive indicator of domoic and neurotoxicity. *Brain Res* 1997; **751**: 281–288
- [47] LUMMIS SCR, NICOLETTI G, JOHNSON GAR, HOLAN G. Gamma-aminobutyric acid-modulated benzodiazepine binding sites in bacteria. *Life Sci* 1991; **49**: 1079–1086.
- [48] LENFANT M, HAUMOU J ZAVALA F. *In vivo* immunomodulating activity of PK 11195, a structurally ligand for peripheral benzodiazepine binding site. *Int J Immunopharmacol* 1986; **8**: 825–829.
- [49] MARIN RH, ARCE A, MARTJENA ID. Recruitment of peripheral type benzodiazepine receptor after acute stress in chick forebrain membranes. *Neurochem Int* 1996; **28**: 425–429.
- [50] MC ENERY MW, SNOWMAN AM, TRIFILETTI RR, SNYDER SH. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor. Association with the voltage dependent anion channel and adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 3170–3174.
- [51] MENNINI T. Effect of changes in tissue concentrations of putative endogenous ligands on mitochondrial benzodiazepine receptors *ex vivo* in PBR. Academic Press. London. 1993: 171–186.
- [52] MENNINI T, GOBBI M. Noise induced opposite changes in central and peripheral benzodiazepine receptor in rat brain cortex. *Neurosci Res Commun* 1989; **5**: 27–34.
- [53] MIETTINEN H, KANONEN J, HELEN D, SALNEN D. Expression of peripheral type benzodiazepine receptor and diazepam binding inhibitor in human astrocytomas. *Cancer Res* 1995; **55**: 2691–2695.
- [54] MILLER WL. Mitochondrial specificity of the early steps in steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; **55**: 607–616.
- [55] MILLER WJ, MC GREGOR DG, STONE TW. Time course of purine protection against kainate-induced increase in hippocampal [3H] PK 11195 binding. *Brain Res Bull* 1994; **34**: 133–136.
- [56] MIZOULE J, GAUTHIER A, UZAN A, RENAULT C, GUEREMY C, LE FUR G. Opposite effects of two ligands for PBR binding site PK 11195 and Ro5-4864 in a conflict situation in the rat. *Life Sci* 1985; **36**: 1059–1068.
- [57] O'BEIRE GB, WOODS MJ, WILLIAMS DC. Two subcellular locations for peripheral-type benzodiazepine receptors in rat liver. *Eur J Biochem* 1990; **188**: 131–138.
- [58] OKE BO, SUAREZ-QUIAN CA, RIOND J, PAPADOPOULOS V. Cell surface localization of the peripheral-type benzodiazepine receptor in adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol* 1992; **87**: R1–R6.
- [59] OLSON JMM, CILIAUX BJ, MANCINI WR, YOUNG MB. Presence of peripheral binding sites on human erythrocyte membranes. *Eur J Pharmacol* 1988; **152**: 47–53.
- [60] OLSON JMM, JUNCK L, YOUNG AB, MANCINI WR. Isoquinoline and peripheral type benzodiazepine binding in gliomas: Implications for diagnostic imaging. *Cancer Res* 1988; **48**: 5837–5841.
- [61] PAPADOPOULOS V, AMRI H, BOUJARD N, CASAO C, CUIITY M, GARNIER, HARDWICK M, LI H. Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis. 1997; **62**: 21–28.
- [62] PAPADOPOULOS V, AMRI H, BOUJRAD N, VIDIC B, GARNIER M. Targeted disruption of the peripheral type benzodiazepine receptor gene inhibits steroidogenesis in the R2C Leydig tumor cell line. 1997; **272**: 32129–32135.
- [63] PAPADOPOULOS V, BOUJARD N, IKONOMOVIC MD, FERRARO P, VIDIC B. Topography of the Leydig cell mitochondria peripheral-type benzodiazepine receptor. *Mol Cell Endocrinol* 1994; **104**: R5–R9.
- [64] PAPADOPOULOS V, BROWN AS. Role of the peripheral type benzodiazepine receptor and the polypeptide diazepam binding inhibitor in steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; **53**: 103–110.
- [65] PAROLA AL, STUMP DG, PEPPER DJ, KRUEGER KE, REGAN JW, LAIROT HE. Cloning and expression of a pharmacological unique bovine peripheral-type benzodiazepine receptor isoquinoline binding protein. *J Biol Chem* 1991; **266**: 14082–14087.

- [66] PELAIA G, DI PAOLA ED, DE SARRO G, MARSICO S A. Is the mitochondrial benzodiazepine receptor involved in the control of airway smooth muscle tone? *Gen Pharmacol* 1997; **28**: 495–498.
- [67] PYTHON CP, ROSSIER MF, VALLOTTO MB, CAPPONI AM. Peripheral type benzodiazepines inhibit calcium channels and aldosterol production in adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 1993; **132**: 1489–1496.
- [68] RAMPE D, TRIGGLE DJ. Benzodiazepine interactions at neuronal and smooth muscle Ca^{2+} channels. *Trends Pharmacol Sci* 1986; **7**: 461–464.
- [69] RIOND J, LEPLATOI SP, LAURENT P, LE FUR G, CAPUT D, LOISON G, FERRARA P. Expression and pharmacological characterization of the human peripheral type benzodiazepine receptor in yeast. *Eur J Pharmacol* 1991; **208**: 307–312.
- [70] RIOND J, MATTEI MG, KAGHAD M, DUMONT X, GUILLEMAT JC, LE FUR G, CAPUT D, FERRERO P. Molecular cloning and chromosomal localization of a human peripheral type benzodiazepine receptor. *Eur J Biochem* 1991; **195**: 305–311.
- [71] SNYDER SH, VERMA A, TRIFILETTI RR. The peripheral type benzodiazepine receptor: A protein of mitochondrial outer membranes utilizing porphyrins as endogenous ligands. *FASEB J* 1987; **1**: 282–288.
- [72] SPRENGEL R, WERNER P, SEEBURG PH, MUKHIN AG, SANTI MR, GRAYSON DR, GUIDOTTI A, KRUEGER KE. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a peripheral type benzodiazepine receptor. *J Biol Chem* 1989; **264**: 20415–20421.
- [73] SRIDARAN R, PHILIP GH, CULTY M, STOCCO M, PAPADOPOULOS V. GnRH agonist treatment decreases progesterone synthesis, luteal peripheral benzodiazepine receptor mRNA, ligand binding and steroidogenic acute regulatory protein expression during pregnancy. *J Mol Endocrinol* 1999; **22**: 45–54.
- [74] STOCCO DM, CLARK BJ. Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis. *Biochem Pharmacol* 1996; **51**: 197–205.
- [75] TATTON WG, OLANOW CW. Apoptosis in neurodegenerative disease: the role of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1410**: 195–213.
- [76] VERMA A, FACCHINA SL, HIRSCH DJ, SONG SG, DILLAHEY LF, SNYDER SH. Photodynamic tumor therapy. Mitochondrial benzodiazepine receptors as a therapeutic target. *Mol Med* 1998; **4**: 40–45.
- [77] VERMA A, SNYDER SH. Peripheral type benzodiazepine receptors. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1989; **29**: 307–322.
- [78] VERMA A, SNYDER SH. Characterization of porphyrin interactions with peripheral type benzodiazepine receptors. *Mol Pharmacol* 1988; **34**: 800–805.
- [79] WANG A, MORGAN JI, SPECTOR S. Benzodiazepines that bind at peripheral sites inhibit cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 753–756.
- [80] WEIZMAN R, GAVISH M. Molecular cellular and behavioral aspects of peripheral benzodiazepine receptors. *Clin Neuropharmacol* 1993; **16**: 401–417.
- [81] WEIZMAN R, LAOR N, KARP L, DAGAN E, REISS A, DAR DE, WOLMER L, GAVISH M. Alteration of platelet benzodiazepine receptors by stress of war. *An J Psychiatry*. 1994; **151**: 766–767.
- [82] WEIZMAN R, LESCHINGER S, SCHLEGEL W, GAVISH M. PBR ligands and serum steroid hormones. *Brain Res* 1997; **772**: 203–208.
- [83] WEIZMAN R, TAME Z, GRANEK M, KARP L, GOLOMB M, TYANO S, GAVISH. Peripheral benzodiazepine binding sites on platelet membranes are increased during diazepam treatment of anxious patients. *Eur J Pharmacol* 1987; **138**: 289–292.
- [84] WODARZ N, RÖTHEHOFER C, FISCHER R, STÖBER G, KIEHL B, JUNGKUNZ G, RIEDERER P, KLEIN HE. Peripheral type benzodiazepine receptors in diagnostic subtypes of schizophrenic patients. *Psychiatry Res* 1998; **81**: 363–369.
- [85] WOODS, WILLIAMS. Multiple forms and localization for the peripheral type benzodiazepine receptor. *Biochem Pharmacol* 1996; **52**: 1805–1814.

- [86] ZAMZANI N, MARCHETTI, CASTEOLO M, ZANIN C, VAYSSIÈRE JL, PETIT PX, KROEMER G. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death *in vivo*. *J Exp Med* 1995; **181**: 1661–1672.
- [87] ZAVALA F, TAMPIN V, DESCAMPS-LATSCHÉ B. J. *In vivo* treatment with benzodiazepines inhibits murine phagocyte oxidative metabolism and production of interleukin 1, tumor necrosis factor and interleukin 6. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; **255**: 442–450.
- [88] ZILZ A, LI H, CASTELLO R, PAPADOPOULOS V, WIDMAIER EP. Developmental expression of the peripheral benzodiazepine receptor and the advent of steroidogenesis in rat adrenal glands. *Endocrinology* 1999; **140**: 859–864.
- [89] ZISTERER DM, GORMAN AM, WILLIAMS DC, MURPHY MP. The effects of the peripheral type benzodiazepine acceptor ligands Ro5-4864 and PK 11195 on mitochondrial respiration. *Methods Final Exp Clin Pharmacol* 1992; **14**: 85–90.
- [90] ZORATTI M, SZABO I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim et Biophys Acta* 1995; **1241**: 139–176.

Redaktor prowadzący – Lilla Hryniewiecka

Otrzymano: 10.01. 2002 r.

Przyjęto: 10.02. 2002 r.

Adres autora: 61-701 Poznań, ul. Fredry 10

NEURONALNE SENSORY WAPNIA

NEURONAL CALCIUM SENSORS

Agnieszka DEJDA¹, Izabela MATCZAK¹, Wojciech A. GORCZYCA^{1,2}

¹Zakład Amin Biogennych, Polska Akademia Nauk, Łódź,
²Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda,
Polska Akademia Nauk, Wrocław

Streszczenie: Jony wapniowe są jednym z podstawowych przekaźników sygnału w komórce. Ich działanie zachodzi między innymi za pośrednictwem białek wiążących wapń, wśród których coraz liczniejszą grupę stanowią odkrywane w ciągu ostatnich dziesięciu lat białka z motywem *EF-hand* tworzące rodzinę tzw. Neuronalnych Sensorów Wapnia (NCS, *Neuronal Calcium Sensors*). Zaliczają się do niej między innymi: rekoweryny, frekweniny, białka GCAP, białka VILIP. Ich wspólną cechą jest charakterystyczna budowa i występowanie w określonych komórkach nerwowych, co sugeruje, że pełnią tam ściśle określoną funkcję. Funkcja większości białek NCS nie została jednak wyjaśniona i stanowi przedmiot badań wielu zespołów na świecie. W niniejszej pracy dokonujemy przeglądu obecnego stanu wiedzy dotyczącego tej interesującej i ważnej grupy białek.

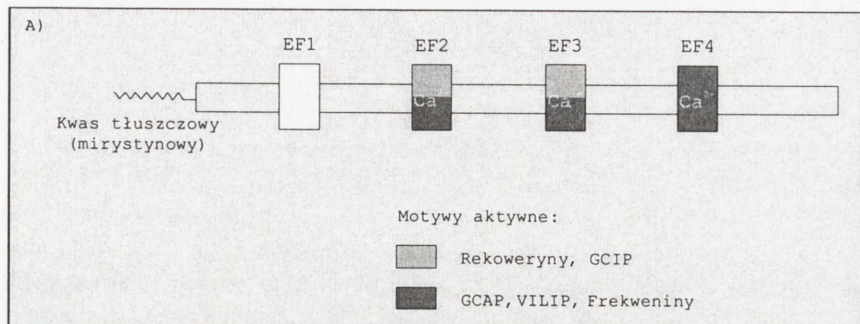
Słowa kluczowe: wapń, białka wiążące wapń, neuronalne sensory wapnia, przekazywanie sygnału.

Summary: Calcium ion is a key intracellular messenger molecule. Its action is mediated by the calcium-binding proteins. Among them, still growing group are homologous „EF-hand” proteins, discovered during last ten years and constituting a family called Neuronal Calcium Sensors. The family consists of recoverins, frequenins, GCAPs, and VILIPs. They all share such features as a specific structure and occurrence in certain neurons what suggests that they play a strictly determined role there. However, the function of most members of the NCS family has not been explained yet, and it still remains a matter of investigations. In this review we present the actual knowledge concerning this interesting and important group of proteins.

Key words: calcium, calcium-binding proteins, neuronal calcium sensors, signal transduction.

WSTĘP

Jony wapniowe należą do podstawowych przekaźników informacji w komórce. Zmiany ich stężenia w cytoplazmie mają wpływ na zmianę konformacji białek wiążących wapń [16, 40, 66] i w konsekwencji na modulację aktywności innych białek komórkowych. Wśród białek wiążących wapń najliczniejszą grupę stanowią te, które zawierają od 2 do 6 charakterystycznych motywów strukturalnych, nazwanych przez Kretsingera motywami *EF-hand*. Kolejne motywy numerowane są od N-końca (EF1, EF2, ...). Pojedyncza struktura *EF-hand* składa się z 29 aminokwasów, tworzących dwie α -helisy (oznaczane jako E i F), pomiędzy którymi znajduje się pętla o długości 12 aminokwasów, będąca miejscem wiązania jonu wapniowego. Struktury te są wysoce konserwatywne i w niektórych pozycjach niemal 100% znanych białek *EF-hand* ma identyczne reszty aminokwasowe (np. kwas asparaginowy w pozycji 1, glicynę w pozycji 6 czy kwas glutaminowy w pozycji 12 pętli wiążącej wapń) (ryc. 1B). Związanie Ca^{2+} prowadzi do zmian konformacyjnych białka warunkujących jego interakcje z cząsteczkami efektorowymi [40]. W ciągu ostatnich dziesięciu lat wykryto w różnych komórkach nerwowych szereg białek *EF-hand* wykazujących bardzo wysokie podobieństwa strukturalne sugerujące, że wywodzą się one ze wspólnego genu, który ewoluował w drodze kolejnych duplikacji. Pierwszym opisanym białkiem z tej grupy była wyizolowana z siatkówki kurczęcia wizynina (*visinin*) [101], ale dopiero odkrycie na początku ubiegłej dekady rekoweryny [26] dało początek identyfikacji całej serii homologicznych białek, które objęto wspólną nazwą neuronalnych białek wiążących wapń (NCBP, *Neuronal Calcium Binding Proteins*). W 1995 roku De Castro i współpracownicy [19] zaproponowali dla nich nazwę neuronalnych sensorów wapnia (NCS, *Neuronal Calcium Sensors*). Białka rodziny NCS mają zbliżone masy cząsteczkowe (22–24 kDa) oraz N-końcową glicynę stanowiącą miejsca potencjalnej mirystylacji i zawierają po 4 motywy *EF-hand*, z których jedynie 2–3 mogą wiązać Ca^{2+} (ryc. 1A). Na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasowych białka te można pogrupować w kilka podrodzin (rekoweryny, GCAP, VILIP, frekweniny) (ryc. 1B). Funkcja większości białek NCS nie jest znana. Przypuszcza się, że biorą one udział w regulacji kinaz fosforylujących receptory sprzężone z białkami G lub regulują aktywność cyklaz [9, 19, 74]. Bogatym źródłem białek NCS jest siatkówka oka kręgowców, gdzie niektóre z nich (GCAP, rekoweryna) biorą udział w regulowanej przez Ca^{2+} zamianie sygnału świetlnego na impuls nerwowy w procesie zwanym fototransdukcją (*phototransduction*) [21, 29]. Białka NCS wykrywane są również w szyszynce, ale funkcja, jaką tam pełnią, pozostaje niejasna. W prezentowanej pracy podsumowujemy aktualny stan wiedzy dotyczący białek NCS ze szczególnym uwzględnieniem ich znanej lub sugerowanej roli fizjologicznej.



B)

EF1

Rekoweryna	GNSKSGALSKEILEELQLNPKFSEELCSWYQSPFKKDCPTGRITQOQFQSIYAKFFPDTD	60
GCAP1	GN--V-----MEGKSVEELSTECHQWYKFKMTECPSSGQTLTYEFRQFFGLKNLSPS	50
GCAP2	GQEPS-----WEEAAAGEIDVAELQEWYKFKVMECPGSLTFMHFERKRFK--VTDDEE	52
GCAP3	GNGKS-----IAG-DQKAVPTQETHVWYRTFMMEYPSGLQTLHEFKTLLGLQGLNOK	51
VILIP1	GKQNS-KLAPEVMEDLVKSTEFNEHELKQWYKGFIKDCPSGRLNLEEFQOLYVKFFPYGD	59
VILIP2	GKTNS-KLAPEVLDELQNTSEFSEQLKQWYKGFIKDCPSGILNLEEFQOLYIKFFPYGD	59
VILIP3	GKQNS-KLRPEVLQDLREKTEFTDHELQEWYKGFIKDCPTGHLTVDFEKKIYANFFPYGD	59
Hipokalcyna	GKQNS-KLRPEMLQDLRENTSEFSELELQEWYKGFIKDCPTGILNVDFPKKIYANFFPYGD	59
NCS1	GKSNS-KLKPEVVEELTRKTYFTEKEVQQWYKGFIKDCPSGQLDAAGFQKIYKQFFPYGD	59

EF2 EF3

Rekoweryna	PKAYAQHVFVRSFDSNLDGTLDFKEYVIALHMTTAGKTNQKLEWAFSLYDVDNGNTISKNE	120
GCAP1	ASQYVEQMFETFDNKGDIYDFMEYVAGLSLVLKGKVEQKLRWYFKLYDVGNGCIDRDE	110
GCAP2	ASQYVEGMRADFKNQDNTIDFLYVAALNLVLRGTLEHKLKWTFFKLYDKDNGNGCIDRLE	112
GCAP3	ANKHIDQVYNTFTDNKDGVDLLEFIAAVNLIMQEKMEQKLNWYFKLYDADNGSIDKNE	111
VILIP1	ASKFAQHAFRTFDKNGDGTIDFREFICALSITSRGSPEQKLNWAFNMYDLDGDGKITRVE	119
VILIP2	ASKFAQHAFRTFDKNGDGTIDFREFICALSVTSRGSPEQKLNWAFEMYLDDGDGKITRLE	119
VILIP3	ASKFAEHVFRFTDNKNGDGTIDFREFIIGLSVTRGGKLEQKLNWAFSMYDLDNGYISRSE	119
Hipokalcyna	ASKFAEHVFRFTDNKNGDGTIDFREFIIALSVTSPGRLEQKLNWAFSMYDLDNGYISREE	119
NCS1	PTKFAFTVFNVFVDEKDKGRIEFSFIQALSVTSRGTLEKLRWAFKLYDLDNDGYITRNE	119

EF4

Rekoweryna	VLEIVMAIFKMITPEDVKLLE--DDENTPEKRAEKIKWYFGKNDDDKLKEKFEIEGTLAN	178
GCAP1	LTIITQAIRAINPC-----SDTTMTAEFTDTPVFSKIDVNGDGLSELEFIEGVQKD	162
GCAP2	LNIVVEGYQLKACRRELQTEQDQLLTPPEVVDRIPLLDVENDGQGLSLNFEVREGARD	172
GCAP3	LDDMFMAVQALN-----GQQLSPSEEFINLVPHKIDINDGELTLEEFINGMAKD	161
VILIP1	MLEIIEAAYKMGV--TVIMMKKNEGLTPEQRVDKIFSKDKKNDQDITLDEFKAAKSD	177
VILIP2	MLEIIEAAYKMGV--TVIMMRMQDGLTPEQRVDKIFKMDQDKDQDITLEEFKAAKSD	177
VILIP3	MLEIVQAIYKMVS--SVMKMP--EDESTPEKRTDKIFRQMDTNDGKLSLEFIRGAKSD	175
Hipokalcyna	MLEIVQAIYKMVS--SVMKMP--EDESTPEKRTDKIFRQMDTNDGKLSLEFIRGAKSD	175
NCS1	MLDIVDAIYQMGV--NTVELP--EEENTPEKRVDRIFAMDKNADSKLTLQEFQEGSKAD	175

Rekoweryna	KEILRLIQFEPQVKEKMKNA-----	199
GCAP1	QMLDLTLTRSLDLTRIVRRLQNGEQD--EEGAEAAEAAG-----	200
GCAP2	KWVMKMLQMDMNPSSWLAQRRKSAF-----	199
GCAP3	QDLLEIVYKSPDFSNLVRVICNGKQFDMETDSSKSPDKAGLGVKVMK	208
VILIP1	PSIVLRLQCDIQK-----	190
VILIP2	PSIVLRLQCDMQK-----	190
VILIP3	PSIVLRLQCDPSSASQF-----	192
Hipokalcyna	PSIVLRLQCDPSSRSQF-----	192
NCS1	PSIVQALSLYDGLV-----	189

RYCINA 1. Budowa białek NCS: A – schemat struktury, zaznaczono kolejne motywy *EF-hand* wskazujące te, które w poszczególnych białkach wiążą jony wapniowe; B – porównanie sekwencji ludzkich białek NCS: aminokwasy zajmujące identyczne położenie w różnych białkach zaznaczono szarym kolorem, gwiazdkami wyróżniono aminokwasy zajmujące identyczne położenie we wszystkich białkach; porównanie przeprowadzono korzystając z programu Clustal X

REKOWERYNY

Do podrodziny tej zalicza się rekowerynę, S-modulinę i p²⁶ oraz wizyninę i s²⁶.

Rekoweryna (*recoverin*) jest, pierwotnie wyizolowanym z siatkówek bydłęcych, cytozolowym białkiem o masie cząsteczkowej 23,3 kDa [26]. Z 4 motywów *EF-hand*, jedynie EF2 i EF3 zdolne są do wiązania jonów wapniowych [2, 27]. Obecność rekoweryny wykazano w komórkach fotoreceptorowych bydźlęcia [26], człowieka [100], myszy, szczura, królika, żaby, kameleona [64]. Stwierdzono ponadto ekspresję rekoweryny w niektórych subpopulacjach komórek dwubiegunowych siatkówki człowieka [100], myszy, szczura, królika [64]. U trzech ostatnich gatunków rekoweryna została zidentyfikowana też w pojedynczych komórkach zwojowych [64]. Poza siatkówką obecność rekoweryny stwierdzono również w szyszynkach kurczęcia [4], żaby, gołębia, szczura, królika, owcy i człowieka [53].

Homologami rekoweryny są **S-modulina** i p²⁶ oraz **wizynina** i s²⁶. S-modulina występuje w pręcikach siatkówki żaby [61, 94]. Sekwencje aminokwasowe S-moduliny i rekoweryny są identyczne w 80%. Innym odpowiednikiem rekoweryny, występującym w segmentach zewnętrznych pręcików gekona, jest białko p²⁶ [32]. Wizynina specyficznie występująca w czopkach siatkówki kurcząt jest białkiem o masie cząsteczkowej 22,5 kDa [101]. Wykazuje ona 60% identyczności z rekoweryną. W czopkach żaby zidentyfikowano z kolei odpowiednik S-moduliny nazwany białkiem s²⁶. Z analizy sekwencji aminokwasowych wynika, że s²⁶ wykazuje wysokie podobieństwo do wizyniny [37, 47].

Początkowo sądzono, że rekoweryna odgrywa kluczową rolę w powrotnej fazie, zachodzącego w komórkach fotoreceptorowych, procesu fototransdukcji i jest poszukiwanym aktywatorem siatkówkowej cyklazy guanylanowej [26]. Wyniki późniejszych badań nie potwierdziły jednak tych sugestii [32, 39]. Wykazano natomiast, że rekoweryna, podobnie jak S-modulina, p²⁶, wizynina i s²⁶ reguluje proces fosforylacji rodopsyny w sposób zależny od stężenia jonów wapniowych. Wpływa tym samym na przedłużenie aktywności fosfodiesterazy cGMP i w efekcie fazy aktywacji w procesie fototransdukcji [14, 19, 32, 37, 45–47, 61, 62, 83, 94]. Przy wysokim stężeniu jonów wapniowych (~2 μM) rekoweryna tworzy kompleks z kinazą rodopsynową, nie dopuszczając w ten sposób do fosforylacji rodopsyny [14, 48]. Rekoweryna jest heterogennie acylowana na N-końcowej glicynie przez 4 różne kwasy tłuszczowe. Najczęściej jest to kwas mirystynowy (C14:0), rzadziej kwas laurynowy (C12:0) lub dwa kwasy nienasycone (C14:1, C14:2) [23]. Kwas mirystynowy jest ukryty w głębokiej hydrofobowej kieszeni tworzącej się w cząsteczce rekoweryny, kiedy nie wiąże ona jonów wapniowych [95]. Przyłączenie Ca²⁺ wywołuje w jej strukturze zmiany konformacyjne prowadzące do wyeksponowania reszty kwasu mirystynowego i tym samym do wzrostu hydrofobowości białka. Efekt ten został nazwany „przełącznikiem wapniowo-mirystynowym” (*calcium-myristoyl switch*) [103]. Uważa się, że sprzyja on zakotwiczeniu białka w błonie komórkowej, a dodatkowym potwierdzeniem jest obserwacja, że niemirystylowana, rekombinowana rekoweryna nie wiąże się z błonami.

Dlatego sugeruje się, że acylacja obok Ca^{2+} jest odpowiedzialna za oddziaływanie rekoweryny z błonami segmentów zewnętrznych komórek fotoreceptorowych *in vivo* [103]. Rola modyfikacji przez kwas tłuszczowy nie jest jednak całkiem jasna. Niektóre wyniki wskazują bowiem, że N-końcowa acylacja ułatwia związanie rekoweryny z kinazą rodopsynową powodując zahamowanie aktywności enzymu [14, 89]. Skuteczność inhibitorowa zależy przy tym od stopnia hydrofobowości kwasu tłuszczowego modyfikującego rekowerynę [83]. Z innych doniesień wynika jednak, że acylacja białka nie jest bezwzględnie konieczna do zahamowania aktywności kinazy rodopsynowej. Stwierdzono np., że proces fosforylacji rodopsyny może być hamowany przez niemirystylowaną postać rekoweryny [45] oraz że mirystylacja ma niewielki wpływ na powinowactwo rekoweryny do kinazy rodopsynowej [84]. Nie ulega jednak wątpliwości, że warunkiem oddziaływania rekoweryny z kinazą rodopsynową jest obecność jonów wapniowych. Rzeczywista funkcja rekoweryny jest nadal sprawą dyskusyjną, gdyż wyniki innych badań sugerują, że fosforylacja rodopsyny nie jest procesem zależnym od stężenia Ca^{2+} [72].

Rekoweryna została zidentyfikowana jako autoantygen w schorzeniu degeneracyjnym siatkówki zwanym CAR (*Cancer Associated Retinopathy*). W chorobie tej rozwój nowotworu poza układem nerwowym wiąże się z degeneracją komórek fotoreceptorowych, co prowadzi w konsekwencji nawet do utraty wzroku. CAR towarzyszy najczęściej drobnokomórkowemu nowotworowi płuc. W surowicach pacjentów z CAR stwierdza się wysokie miana autoprzeciwciał skierowanych przeciwko rekowerynie [77-79, 98]. Wykazano, że u chorych z CAR dochodzi do ekspresji rekoweryny także w komórkach nowotworowych. Staje się ona wówczas autoantygenem wywołującym odpowiedź immunologiczną organizmu [60, 79]. Z badań dotyczących roli autoprzeciwciał obecnych w surowicach chorych na CAR wynika, że przeciwciała skierowane przeciwko rekowerynie wywołują *in vitro* apoptozę komórek fotoreceptorowych [15], a *in vivo* komórek fotoreceptorowych i dwubiegunowych siatkówki [1, 67].

BIAŁKA GCAP

Podrodzina GCAP (*Guanylyl Cyclase Activating Proteins*) reprezentowana jest przez: GCAP1, GCAP2, GCAP3 oraz GCIP (*Guanylyl Cyclase Inhibitory Protein*) [74]. Białko GCAP1 po raz pierwszy zostało wyizolowane z segmentów zewnętrznych pręcików bydłat [30]. Zbudowane jest ono z 205 aminokwasów, a jego masa cząsteczkowa wynosi 23,5 kDa [75]. Badania prowadzone na różnych gatunkach ssaków wykazywały obecność GCAP1 przede wszystkim w segmentach zewnętrznych i wewnętrznych czopków oraz w segmentach wewnętrznych pręcików. Jego ekspresja w segmentach zewnętrznych pręcików była natomiast niska [17, 42]. Obecność mRNA dla GCAP1 stwierdzono w szyszynkach kurcząt [88]. W szyszynce bydłacej wykazano

natomiast występowanie ostatecznego produktu ekspresji genu, tj. białka GCAP1 [99]. Określono sekwencje aminokwasowe GCAP1 u bydłęcia, człowieka, myszy, żaby i kurczęcia. Białko to składa się ze 199–205 aminokwasów. Z porównania sekwencji wynika, że u kręgowców jest ono identyczne w ponad 70%, a u ssaków w ponad 90% (ryc.2A) [75, 87].

GCAP2 zidentyfikowano pierwotnie w ekstraktach całych siatkówek bydłych [24]. Zbudowany jest z 204 aminokwasów, a jego masa cząsteczkowa wynosi 23,7 kDa. Sekwencja aminokwasowa GCAP2 jest w 42 % identyczna z GCAP1 [25, 31]. Badania immunocytochemiczne siatkówki naczelnych (małpa, człowiek) wykazały duże ilości GCAP2 w czopkach i segmentach wewnętrznych pręcików [17, 72]. U innych ssaków – bydło domowe [17, 42, 72], mysz, szczur, kot [17] – GCAP2 występuje przede wszystkim w pręcikach, a jedynie w niewielkich ilościach w czopkach. W przeciwieństwie do GCAP1 białko to wykrywane jest w siatkówce także, poza komórkami fotoreceptorowymi, w komórkach dwubiegunowych, amakrynowych i zwojowych [17, 72]. Wykryto też niewielkie ilości mRNA dla tego białka w szyszynce kurczęcia [88].

Ekspresję mRNA dla GCAP3 wykazano do tej pory w siatkówce człowieka [34] i danio pręgowanego [41]. Na podstawie cDNA określono, że GCAP3 zbudowany jest z 209 aminokwasów, a jego masa cząsteczkowa wynosi 23,8 kDa. Wykazuje on dużą homologię z białkami GCAP1 (57%) i GCAP2 (49%).

GCIP obecny jest w czopkach siatkówki żaby. Składa się z 206 aminokwasów, a jego masa wynosi 23,7 kDa. Porównując struktury pierwszorzędowe białek GCAP stwierdza się, że GCIP charakteryzuje się niższą homologią w stosunku do GCAP1, GCAP2 czy GCAP3 aniżeli te względem siebie nawzajem [58].

Białka GCAP w zależności od poziomu jonów wapniowych w komórce albo aktywują, albo hamują aktywność siatkówkowych cyklaz guanylanowych (RetGC1 i RetGC2). GCAP1, GCAP2, GCAP3 przy niskim stężeniu jonów wapniowych (50 nM) aktywują efektorowy enzym, a przy wysokim (>500 nM) – hamują [24, 25, 28, 30, 31, 34]. Należy zwrócić uwagę, że GCAP2 i GCAP3 regulują aktywność obydwu siatkówkowych cyklaz, podczas gdy GCAP1 – jedynie RetGC1 [34]. Znane są miejsca w sekwencjach aminokwasowych GCAP1 i GCAP2 biorące udział w regulacji cyklazy guanylanowej. W przypadku GCAP1 aktywacja enzymu odbywa się za pośrednictwem fragmentów Met157 - Arg182, Trp21 - Thr27, a także sekwencji między EF1 i EF3. W procesie hamowania RetGC istotny jest natomiast odcinek 9 N-końcowych aminokwasów w sekwencji GCAP1 [54]. W sekwencji aminokwasowej GCAP2 znaleziono 3 fragmenty uczestniczące w regulacji cyklazy guanylanowej. Odcinek między Phe78 a Asp113 decyduje o aktywacji enzymu przy niskim stężeniu jonów wapniowych. Aminokwasy leżące pomiędzy Lys29 a Phe48 biorą udział w aktywacji RetGC przy niskim stężeniu jonów wapniowych w komórce, a w hamowaniu, kiedy poziom Ca^{2+} jest wysoki. Trzeci z rozpoznanych fragmentów między Val171 a Asn189 przyczynia się do aktywacji cyklazy guanylanowej, ale nie ma wpływu na zahamowanie jej aktywności [69]. Białko GCIP przy niskim poziomie jonów wapniowych nie aktywuje

A)

		EF1	
człowiek	MGNVMEGKSVEELSSTECHQWYKKFMTECPGQLTLYEFRQFFGLKNLSPSASQYVEQMF		60
bydło domowe	MGNIMDGKSVEELSSTECHQWYKKFMTECPGQLTLYEFRQFFGLKNLSPWASQYVEQMF		60
mysz	MGNVMEGKSVEELSSTECHQWYKKFMTEVPDQGLTLYEFRQFFGLKNLSPSASQYVEQMF		60
kura domowa	MGN-MDGKAVEELSSATECHQWYKKFMTECPGQLTLYEFRQFFGLKNLSPSANKYVEQMF		59
żaba	MGN-MDGKTVBELSATEIHRWYKKFMTECPGQLTQHEFRQFFGLKNLSPASNOYIEQMF		59

	EF2	EF3	
człowiek	ETTFDNKDGIDFMETVAALSLVLKGVKVEQKLRWYFKLYDVDNGCIDRDELLTIIQAIR		120
bydło domowe	ETTFDNKDGIDFMETVAALSLVLKGVKVEQKLRWYFKLYDVDNGCIDRDELLTIIIRAIR		120
mysz	ETTFDNKDGIDFMETVAALSLVLKGVKVEQKLRWYFKLYDVDNGCIDRDELLTIIIRAIR		120
kura domowa	ETTFDNKDGIDFMETVAALSLVLKGVKVEQKLRWYFKLYDVDNGCIDRDELLTIIKPAIR		119
żaba	DTTFDNKDGIDFMETVAALSLVLKGVKVEQKLRWYFKLYDVDNGCIDRDELLTIIKPAIR		119

	EF4		
człowiek	AINPCSDTMTAAEFTDVFVKIDVNGDGELSLEEFIEGVQKQMLLDLTLTRSLDLTRIV		180
bydło domowe	AINPCSDTMTAAEFTDVFVKIDVNGDGELSLEEFIEGVQKQMLLDLTLTRSLDLTRIV		180
mysz	TINPWSDSMSAAEFTDVFVKIDVNGDGELSLEEFIEGVQKQMLLDLTLTRSLDLTGIV		180
kura domowa	AINRCNE-AMTAAEFTNMVFDKIDVNGDGELSLEEFIEGVQKQMLLDLTLTRSLDLTHIV		178
żaba	AINRCND-EMTAAEFTDMVFDKIDVNGDGELSLEEFIEGVQKQMLLDLTLTRSLDLKHIV		178
	**		
człowiek	RRLQNGEQDEEGAD---EAAEAAG--		201
bydło domowe	RRLQNGEQDEEGASGRETEAAEADG--		205
mysz	RRLQNGEHEEAAGTS---DLAAEAAG--		202
kura domowa	KLIQNDGKNPHAPEEAEAAQ-----		199
żaba	YMIQNDGKRMEISERPROEITTGNSLP		205
	**		

B)

		EF1	
człowiek	MGKQNSKLAPEVMEDLVKSTEFNEHELKQWYKGFLLKDCPSGRLNLEEFQQLYVKFFPYGD		60
bydło domowe	MGKQNSKLAPEVMEDLVKSTEFNEHELKQWYKGFLLKDCPSGRLNLEEFQQLYVKFFPYGD		60
szczur	MGKQNSKLAPEVMEDLVKSTEFNEHELKQWYKGFLLKDCPSGRLNLEEFQQLYVKFFPYGD		60
kura domowa	MGKQNSKLAPEVMEDLVKSTEFNEHELKQWYKGFLLKDCPSGRLNLEEFQQLYVKFFPYGD		60

	EF2	EF3	
człowiek	ASKFAQHAFRTFDKNGDGTIDFREFICALSITSRGSFEQKLNWAFNMYDLDDGDKITRVE		120
bydło domowe	ASKFAQHAFRTFDKNGDGTIDFREFICALSITSRGSFEQKLNWAFNMYDLDDGDKITRVE		120
szczur	ASKFAQHAFRTFDKNGDGTIDFREFICALSITSRGSFEQKLNWAFNMYDLDDGDKITRVE		120
kura domowa	ASKFAQHAFRTFDKNGDGTIDFREFICALSITSRGSFEQKLNWAFNMYDLDDGDKITRVE		120

	EF4		
człowiek	MLEIIEAIYKMGVGTIMMKMKNEDGLTPEQRVDKIFSKMKDNKDDQITLDEFKAAAKSDPS		180
bydło domowe	MLEIIEAIYKMGVGTIMMKMKNEDGLTPEQRVDKIFSKMKDNKDDQITLDEFKAAAKSDPS		180
szczur	MLEIIEAIYKMGVGTIMMKMKNEDGLTPEQRVDKIFSKMKDNKDDQITLDEFKAAAKSDPS		180
kura domowa	MLEIIEAIYKMGVGTIMMKMKNEDGLTPEQRVDKIFSKMKDNKDDQITLDEFKAAAKSDPS		180

człowiek	IVLLLCQDIQK		191
bydło domowe	IVLLLCQDIQK		191
szczur	IVLLLCQDIQK		191
kura domowa	IVLLLCQDIQK		191

RYCINA 2. Porównanie sekwencji GCAP1 (A) i VILIP1 (B) u różnych gatunków: aminokwasy zajmujące identyczne położenie w różnych białkach zaznaczono szarym kolorem, gwiazdkami wyróżniono aminokwasy zajmujące identyczne położenie we wszystkich białkach; porównanie przeprowadzono korzystając z programu Clustal X

cyklazy guanylanowej, ale przy wysokim, tak jak i inne białka GCAP, hamuje jej aktywność [58].

Z sekwencji aminokwasowych wynika, że białka GCAP mają 4 motywy *EF-hand* posiadające zdolność wiązania Ca^{2+} [31, 34]. Motyw EF1, a w białku GCIP prawdopodobnie również motyw EF4, są jednak nieaktywne i nie wiążą Ca^{2+} [74, 58]. Przyłączenie jonów wapniowych wiąże się ze zmianami konformacyjnymi białek GCAP [38, 90], wpływając na ich hydrofobowość i co za tym idzie sposób oddziaływania z błonami komórkowymi i efektorowym enzymem [71]. W przeciwieństwie do rekoweryny hydrofobowość GCAP po przyłączeniu jonów wapniowych maleje [Gorczyca i wsp., praca w przygotowaniu]. Efekt ten zaznacza się zdecydowanie wyraźniej w odniesieniu do GCAP2 niż GCAP1, które w niewielkim stopniu reaguje zmianami hydrofobowości na zmiany stężenia jonów wapniowych w otoczeniu. Sugeruje się, że GCAP2 w formie związanej z Ca^{2+} występuje w postaci monomeru, natomiast w formie wolnej od Ca^{2+} ulega dimeryzacji. Przypuszcza się, że zjawisko dimeryzacji GCAP2 przy niskim poziomie Ca^{2+} jest związane z jego zdolnością do regulowania cyklazy guanylanowej [70], która w swej formie aktywnej występuje również w postaci dimeru [102]. Podobnie do rekoweryny, GCAP1 jest heterogennie acylowane na N-końcu [75]. Acylowane przez kwas mirystynowy jest również białko GCAP2 [25]. Modyfikacja ta w przypadku GCAP1 wydaje się być istotnym czynnikiem w procesie regulacji aktywności cyklazy guanylanowej. Rekombinowane, nieacylowane białko jest znacznie słabszym aktywatorem RetGC, w porównaniu z białkiem acylowanym [28]. W przypadku GCAP2 nie wykazano istotnych różnic w zdolnościach do wiązania się z błoną komórkową i do regulacji aktywności cyklazy guanylanowej między formą acylowaną i nieacylowaną białka [71].

Białka GCAP regulując aktywność cyklazy guanylanowej odgrywają kluczową rolę w powrotnej fazie fototransdukcji, a tym samym w procesie prawidłowego widzenia. Zaobserwowano, że mutacje w regionach kodujących GCAP1 lub zmiany w poziomie ekspresji tego białka prowadzą do zaburzeń procesu widzenia i zmian degeneracyjnych komórek fotoreceptorowych siatkówki. U ludzi gen kodujący GCAP1 zlokalizowany jest na krótszym ramieniu 6 chromosomu [93]. Mutacja w jego obrębie, prowadząca do podstawienia cysteiny w miejsce tyrozyny w pozycji 99. sekwencji aminokwasowej, jest przyczyną autosomalnej dominującej dystrofii czopków (*autosomal dominant cone dystrophy*). Zmutowany GCAP1 (Y99C) aktywuje cyklazę guanylanową zarówno przy niskim, jak i przy wysokim stężeniu jonów wapniowych, co prowadzi do ciągłej syntezy cGMP i podwyższenia jego poziomu w komórce [22, 91]. W konsekwencji zwiększa się liczba otwartych kanałów jonowych aktywowanych cGMP i co za tym idzie napływ jonów Ca^{2+} do wnętrza komórek fotoreceptorowych. Przypuszcza się, że wzrost poziomu tych jonów zmienia w istotny sposób przebieg procesów metabolicznych stając się podstawową przyczyną degeneracji czopków. W rezultacie chorzy na autosomalną dominującą dystrofię czopków tracą ostrość wzroku i zdolność widzenia barw [22, 91]. Innym przykładem jest wrodzona choroba degeneracyjna siatkówki kurcząt (*retinal degeneration*, rd). W schorzeniu tym obserwuje się brak ekspresji cyklazy

guanylanowej, a także znaczne (nawet do 90%) obniżenie poziomu ekspresji GCAP1 w komórkach fotoreceptorowych. Powyższe defekty powodują obniżenie stężenia cGMP i zanik procesu fototransdukcji, co w konsekwencji prowadzi do degeneracji pręcików i czopków siatkówki [87].

BIAŁKA VILIP

Dotychczasowe nazewnictwo w obrębie tej podrodziny wprowadzało wiele zamętu i czytając prace często trudno się zorientować, o jakie w rzeczywistości białka chodzi. Powodem są różne nazwy stosowane w odniesieniu do tych samych białek identyfikowanych i klonowanych u różnych gatunków. Opierając się na stopniu podobieństwa ich sekwencji u człowieka przyjęto, że podrodzina VILIP składa się z czterech różnych białek: VILIP1, VILIP2, VILIP3 i hipokalcyny [12] (tab. 1). Pozwoliło to na uporządkowanie nazewnictwa i wzajemnych zależności między wszystkimi poznanymi dotychczas białkami tej podrodziny, takimi jak: VILIP (*Visinin Like Protein*), NVP (*Neuronal Visinin Like Protein*), HLP (*Hippocalcin Like Protein*), neurokalcyny i hipokalcyna [9, 12]. Białka VILIP (VILIP1, VILIP2, VILIP3) pierwotnie zidentyfikowano u kurczęcia [57], NVP (NVP1, NVP2, NVP3) u szczura [43, 56], HLP (HLP1, HLP2, HLP3, HLP4) u człowieka [49, 50, 96], neurokalcyny (izoforny α , β , γ_1 , γ_2 , δ) u bydła [36, 97], a hipokalcynę u szczura [51]. Ekspresja białek VILIP zachodzi w takich komórkach systemu nerwowego, jak: horyzontalne, dwubiegunowe, amakrynowe i zwojowe komórki siatkówki kurczęcia [9] oraz w szyszynce kurczęcia [Maczak I., Dejda A., Gorczyca W.A., dane niepublikowane]. NVP są białkami wyizolowanymi z mózgu szczura [43, 56]. Białka HLP występują w różnych częściach mózgu człowieka, m.in. korze mózgowej, mózdzku, hipokampie [49]. Neurokalcyny zostały pierwotnie wyizolowane z mózgu bydła [68, 97], ale zlokalizowano je również w komórkach amakrynowych i zwojowych siatkówki bydła [36]. Hipokalcynę pierwotnie wyizolowano z neuronów piramidalnych hipokampu szczura [51, 52]. Jej obecność stwierdzono również w komórkach amakrynowych i zwojowych siatkówki szczura [18], a także w różnych częściach mózgu człowieka [49].

Podobieństwo sekwencji aminokwasowych między poszczególnymi białkami omawianej podrodziny sięga 95%. Jest ono niższe w odniesieniu do pozostałych białek rodziny NCS, np. wizyniny czy rekoweryny (30–60%) (ryc. 1B) [10]. Ortologiem białka VILIP1 u szczura jest białko NVP1, a ich odpowiednikiem u bydła jest neurokalcyna α [9]. Sekwencje aminokwasowe tych trzech białek pokrywają się w 100% [10]. Ludzkim odpowiednikiem tych białek jest HLP3 (identyczne w 98%) [49] (ryc. 2B). Odpowiednikiem VILIP2 jest NVP2 u szczura (100% zgodności sekwencji aminokwasowych) [9], a HLP4 u człowieka (identyczne w 99%) [49]. Odpowiednikiem VILIP3 u szczura jest NVP3 (100% zgodności sekwencji aminokwasowych) [9]. Ich sekwencje aminokwasowe pokrywają się w 99% z sekwencją neurokalcyny δ i dlatego

TABELA 1. Terminologia białek NCS należących do podrodziny VILIP

NAZWA ZALECANA	NAZWA DOTYCHCZASOWA
VILIP1	VILIP1 (kura domowa) NVP1 (szczur) HLP3 (człowiek) Neurokalcyna α (bydło domowe)
VILIP2	VILIP2 (kura domowa) NVP2 (szczur) HLP4 (człowiek)
VILIP3	VILIP3 (kura domowa) NVP3 (szczur) HLP2 (człowiek) Neurokalcyna δ (bydło domowe)
Hipokalcyna	Hipokalcyna (szczur) HLP1 (człowiek)

przyjmuje się, że neurokalcyna δ jest odpowiednikiem NVP3 u bydła [43], a tym samym VILIP3 [12]. Ludzkim odpowiednikiem białka VILIP3 jest białko HLP2 [49]. Kolejne białko podrodziny VILIP to hipokalcyna, której sekwencja aminokwasowa jest w 91% identyczna z sekwencją VILIP3 (neurokalcyną δ) [12]. Odpowiednikiem hipokalcyny u człowieka jest HLP1, wykazujące 100% zgodności sekwencji aminokwasowych z hipokalcyną szczura [96].

Funkcja białek podrodziny VILIP nie została jeszcze dokładnie poznana. Przypuszcza się, że podobnie do rekoweryny i GCAP, mogą one pełnić rolę wapnioczułych aktywatorów kinaz białkowych i cyklaz [10]. Szereg ostatnio opublikowanych wyników wskazuje, że VILIP1 może regulować w sposób zależny od stężenia jonów wapniowych aktywność cyklaz adenylanowych i cyklaz guanylanowych. Stwierdzono, że komórki gładzaka C6, transfekowane genem kodującym VILIP1 wykazują podwyższoną zdolność do syntezy cAMP [11] oraz cGMP [8]. Sugeruje to, że białko odgrywa rolę zależnego od Ca^{2+} aktywatora, obecnej w tych komórkach, cyklazy adenylanowej typu 6 [9] oraz błonowych cyklaz guanylanowych typu A i B [8]. Niezdolny do wiązania z błonami mutant VILIP1, pozbawiony reszt kwasu mirystynowego, redukuje w komórkach C6 ilość syntetyzowanego cAMP [11] i aktywuje rozpuszczalne cyklazy guanylanowe wpływając na wzrost wewnątrzkomórkowej puli cGMP [8]. Białko VILIP1 (NVP1), którego poziom ekspresji jest wysoki w neuronach węchowych szczura, hamuje w

sposób zależny od stężenia jonów wapniowych aktywność obecnej w nich cyklazy adenylanowej typu 3 [7, 9]. Z innych obserwacji wynika, że VILIP1 może wiązać komórkowy mRNA w zależności od stężenia Ca^{2+} , wykazując ponadto zdolność oddziaływania z elementami cytoszkieletu. Doprowadziło to do sugestii, że być może VILIP1 odpowiada za zmianę lokalizacji mRNA wewnątrz komórki [59]. Stwierdzono, że VILIP1 (neurokalcyna α), podobnie jak rekoweryna, hamuje *in vitro* fosforylację rodopsyny w sposób zależny od stężenia jonów wapniowych. Uważa się więc, że białko może odgrywać ważną rolę w fosforylacji przez kinazy rodziny GRK (*G-protein-coupled receptor kinase*) receptorów sprzężonych z białkiem G, gdyż kinaza rodopsynowa (zwana też GRK1) należy do tej rodziny [9, 19]. Potwierdzeniem proponowanej funkcji może być obserwacja, że VILIP1 i VILIP3 (oraz ich odpowiedniki u bydła neurokalcyna α i neurokalcyna δ) hamują w około 30% fosforylację receptora muskarynowego (M2) przez GRK2 [12, 44]. Neurokalcyna δ (VILIP3) przy stężeniu jonów wapniowych przekraczającym 20 μ M aktywuje obecną w siatkówkach bydła cyklazę guanylanową ROS GC1 [55]. Chociaż fizjologiczna funkcja hipokalcyny nie została poznana, sugeruje się, że może regulować uwalnianie neurotransmitera z piramidalnych neuronów hipokampa [52]. Hipokalcyna może ponadto oddziaływać z białkowym inhibitorem apoptozy obecnym w komórkach nerwowych i w ten sposób brać udział w ochronie tych komórek przed apatozą [12].

Przypuszcza się, że zaburzenia w ekspresji białek podrodziny VILIP przyczyniają się do takich schorzeń centralnego układu nerwowego, jak: epilepsja, choroba Alzheimera, schizofrenia oraz endogenne depresje [6].

FREKWENINY

Na podstawie dostępnych wyników można przyjąć, że frekweniny stanowią najstarsze ewolucyjnie białka rodziny NCS. Obecność frekweniny stwierdzono już u drożdży (*S. cerevisiae*, *S. pombe*), u nicieni (*C. elegans*) i u ślimaka morskiego (*Aplysia*) [12]. Frekwenina została pierwotnie zidentyfikowana, jako 187-aminokwasowe białko o 4 motywach wiążących wapń, w systemie nerwowym *Drosophila melanogaster*, gdzie wpływa na uwalnianie neurotransmitera do szczeliny synaptycznej między komórką nerwową a komórką mięśniową [80], prawdopodobnie poprzez modulację aktywności wymiennika sodowo-wapniowego [82] oraz procesu przepływu jonów potasowych [81]. *In vitro*, frekwenina regulowała w sposób zależny od stężenia jonów wapniowych aktywność fotoreceptorowej cyklazy guanylanowej, a także, podobnie jak kalmodulina, przy podwyższonym stężeniu Ca^{2+} aktywowała zależne od kalmoduliny kinazy i fosfatazy białkowe [80].

U kręgowców odpowiednikiem frekweniny jest białko NCS-1 (*Neuronal Calcium Sensor-1*) [12, 63, 76]. Obecność NCS-1 wykazano m.in. w mózgu myszy, szczura, kurczęcia, w komórkach amakrynowych i dwubiegunowych siatkówki kurczęcia oraz

w komórkach zwojowych siatkówki kurczęcia, szczura i bydła [20]. Sekwencje aminokwasowe tego białka są w 100% identyczne u szczura, kurczęcia i człowieka [12]. NCS-1 kurczęcia wykazuje 72% aminokwasowej identyczności z frekwenią *Drosophila* [65]. Funkcja NCS-1 nie jest poznana. Postuluje się, że aktywuje ono enzymy zależne od wapnia i kalmoduliny: fosfodiesterazę cAMP (PDE1), kalcyneurynę oraz syntazę tlenu azotu [85].

INNE

Wszystkie omawiane dotychczas białka mają następujące cechy wspólne: zbliżoną masę cząsteczkową (22–24 kDa), N-końcową glicynę stanowiącą miejsce potencjalnej acylacji (mirystylacji), 4 motywy *EF-hand*, z których motyw EF1 jest nieaktywny, a z pozostałych dwa lub trzy mogą wiązać Ca^{2+} . Wszystkie te białka wywodzą się z prągu wspólnego również dla powszechnie występującej w komórkach organizmów zwierzęcych kalmoduliny [9, 74]. Oprócz tych „klasycznych” białek NCS, w ciągu ostatnich trzech lat w komórkach nerwowych wykryto szereg podobnych do nich i do kalmoduliny białek *EF-hand*, wykazujących jednak znaczne różnice w wielkości, budowie N-końca (brak konsensusu dla acylacji) oraz w domenach wiążących wapń. Niektórzy autorzy zaliczają te białka również do rodziny NCBP lub NCS i dlatego zostaną one niżej pokrótce omówione. Są to: kaldendryna, kalmodulino-podobne CaBP, białko DREAM oraz białka KChIP.

Kaldendryna i CaBPs (*Ca²⁺-binding proteins*) są białkami wiążącymi wapń, wywodzącymi się z tego samego prągu co rodzina białek NCS. Ewoluowały jednak w odmiennym od nich kierunku, przez co mają również nieco odrębne właściwości. W 1998 roku sklonowano u szczura cDNA kodujące nowe białko nazwane **kaldendryną**. Białko to wykazuje duże podobieństwo do kalmoduliny (70%), zawiera jednak tylko dwa aktywne motywy *EF-hand* (EF1 i EF3). Kaldendrynę zlokalizowano w takich częściach mózgu szczura, jak: kora mózgowa, hipokamp i mózdzek. Białko zbudowane jest z 298 aminokwasów, a jego masa cząsteczkowa wynosi 33,071 kDa. Modyfikacje potranslacyjne kaldendryny nie są do końca poznane, ale wiadomo, że wpływają na jej ruchliwość elektroforetyczną. Kaldendryna poddana elektroforezie w żelu poliakrylamidowym wędruje najczęściej jako białko o masie cząsteczkowej 36 kDa, a czasem pojawia się jako pasmo o masie 33 kDa [86].

Do CaBPs zalicza się pięć nowo odkrytych neuronalnych białek nazwanych: CaBP1, CaBP2, CaBP3, CaBP4 i CaBP5 [35]. Analizując ich sekwencje aminokwasowe zaobserwowano, że CaBP1 wykazuje szczególnie wysokie podobieństwo do kaldendryny. Ponadto stwierdzono, że wszystkie CaBP są identyczne w 46–58% z kalmoduliną. Podobnie jak ona mają cztery motywy *EF-hand*, z tym że motyw EF2 jest nieaktywny. Białka CaBP1 i CaBP2 mają ponadto miejsca dla N-końcowej mirystylacji. U człowieka CaBPs zbudowane są odpowiednio z: 277 (CaBP1), 220

(CaBP2), 192 (CaBP3), 211 (CaBP4) i 173 (CaBP5) aminokwasów. Poszczególne CaBP różnią się lokalizacją. Na przykład białko CaBP5 występuje w komórkach pręcikowych i dwubiegunowych siatkówki, zaś CaBP1 obecne jest w korze mózgowej i hipokampie oraz w komórkach zwojowych i amakrynowych siatkówki. Sugeruje się, że CaBP pośredniczą w zależnym od wapnia procesie transdukcji sygnału w komórkach centralnego systemu nerwowego, zastępując kalmodulinę lub wzmagając efekt jej działania [33, 35].

Białka KChIPs zidentyfikowano poszukując dodatkowych podjednostek zależnego od potencjału kanału potasowego typu A [3]. Wśród nich są KChIP1 i KChIP2 obecne u szczura oraz KChIP3 występujące u myszy i człowieka. Wykazano, iż wszystkie te białka podlegają ekspresji w mózgu, natomiast białko KChIP2 dodatkowo również w sercu i płucach. Zbudowane są odpowiednio z 216 (KChIP1), 252 (KChIP2) i 256 (KChIP3) aminokwasów. Ich sekwencje charakteryzują się około 40% podobieństwem do białka NCS-1. Porównując struktury pierwszorzędowe białek KChIP można zauważyć między nimi znaczne różnice w obrębie fragmentów N-końcowych, natomiast ich 185-aminokwasowe sekwencje C-końcowe, zawierające 4 motywy *EF-hand*, wykazują identyczność w blisko 70%. Białka KChIP modulują właściwości elektrofizjologiczne kanałów potasowych, łącząc się z cytoplazmatycznymi fragmentami ich podjednostek α i stając się ich integralną częścią [3, 5]. Wiązanie to nie jest zależne od jonów wapniowych, niemniej mutacje w białkach KChIP zachodzące w obrębie domen wiążących wapń znoszą ich modulatorowe właściwości. Przypuszcza się, że białka KChIP mogą zwiększać przepływ jonów potasowych w komórkach, przyczyniając się do wzrostu gęstości kanałów w błonie komórkowej oraz zmian kinetyki ich inaktywacji i powrotu do stanu aktywnego.

Białko DREAM (*DRE-antagonist modulator*) w nieobecności jonów wapniowych wiąże się specyficznie z sekwencją regulatorową DRE (*Downstream Regulatory Element*) genów prodynorfiny i *c-fos* hamując ich transkrypcję. W obecności Ca^{2+} , DREAM oddysocjowuje od DNA umożliwiając ekspresję tych genów. Białko zbudowane jest z 284 aminokwasów i ma masę cząsteczkową 31,8 kDa [13]. Wykazuje wysokie podobieństwo do VILIP1, hipokalcyny i rekoweryny, szczególnie w regionach obejmujących jego 4 motywy *EF-hand*. Najwyższą homologię wykazuje jednak z KChIP3, różniąc się od niego jedynie dwudziestoma N-końcowymi aminokwasami, co może sugerować, że DREAM i KChIP3 są wariantami powstałymi w wyniku alternatywnego składowania mRNA. Analiza *Northern blot*, wykazała obecność białka DREAM w takich narządach ludzkich, jak: mózg, tarczyca, grasica i jądra [13].

PODSUMOWANIE

Pierwsze białka z rodziny NCS pojawiły się w toku ewolucji już u drożdży (frekwenina), białka VILIP u nicieni, zaś rekoweryny i GCAP u płazów [12]. Ich

struktury pierwszorzędowe wykazują znaczny konserwatyzm międzygatunkowy. Na przykład, sekwencje frekweniny obecnej w drożdżach i frekweniny ludzkiej (NCS-1) są identyczne w 59%, zaś sekwencje VILIP1 człowieka i innych kręgowców różnią się jedynie dwoma aminokwasami (ryc. 2B). Pomimo znacznych podobieństw strukturalnych właściwości fizykochemiczne i funkcje białek NCS (o ile są znane) różnią się od siebie. Wydaje się, że część z nich, ulegająca ekspresji w wysoce wyspecjalizowanych komórkach nerwowych, odgrywa tam ściśle określoną rolę (np. białka GCAP w komórkach fotoreceptorowych siatkówki). Inne mogą pełnić różnorodne funkcje w zależności od typu komórek, w których zachodzi ich ekspresja (np. białka VILIP czy frekwenina). W dalszym ciągu toczy się dyskusja na temat funkcji rekoweryny, chociaż od odkrycia białka minęło już dziesięć lat. Nie ulega jednak wątpliwości, że białka NCS odgrywają istotną rolę w wewnątrzkomórkowej homeostazie wapnia oraz że regulując aktywności rozmaitych enzymów stanowią swoisty łącznik między różnymi szlakami przekazywania sygnału w komórce. Biorąc pod uwagę to, że w szeregu laboratoriów na świecie prowadzi się badania nad białkami NCS, najbliższe lata powinny przynieść odpowiedź na zasadnicze pytania związane z ich rolą w komórkach nerwowych. Szczególnie ważne będzie zidentyfikowanie białek efektorowych, z którymi białka NCS oddziałują i których aktywność może być regulowana poprzez białka NCS w sposób zależny od stężenia jonów wapniowych.

LITERATURA

- [1] ADAMUS G, MACHNICKI M, ELERDING H, SUGDEN B, BLOCKER YS, FOX DA. Antibodies to recoverin induce apoptosis of photoreceptor and bipolar cells *in vivo*. *J Autoimmun* 1998; **11**: 523–533.
- [2] AMES JB, PORUMB T, TANAKA T, IKURA M, STRYER L. Amino-terminal myristoylation induces cooperative calcium binding to recoverin. *J Biol Chem* 1995; **270**: 4526–4533.
- [3] AN WF, BOWLBY MR, BETTY M, CAO J, LING H-P, MENDOZA G, HINSON JW, MATSSON KI, STRASSLE BW, TRIMMER JS, RHODES KJ. Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* 2000; **403**: 553–556.
- [4] BASTIANELLI E, POCHE T. Calbindin-D28k, calretinin, and recoverin immunoreactivities in developing chick pineal gland. *J Pineal Res* 1994; **17**: 103–111.
- [5] BÄHRING R, DANNENBERG J, PETERS HCH, LEICHER T, PONGS O, ISBRANDT D. Conserved Kv4 N-terminal domain critical for effects of Kv channel-interacting protein 2.2 on channel expression and gating. *J Biol Chem* 2001; **276**: 23888–23894.
- [6] BERNSTEIN G-H, BAUMANN B, DANOS P, DIEKMANN S, BOGERTS B, GUNDELFINGER ED, BRAUNEWELL K-H. Regional and cellular distribution of neural visinin-like protein immunoreactivities (VILIP-1 and VILIP3) in human brain. *J Neurocytol* 1999; **28**: 655–662.
- [7] BOEKHOFF I, BRAUNEWELL K-H, ANDREINI I, BREER H, GUNDELFINGER E. The calcium-binding protein VILIP in olfactory neurons: regulation of second messenger signaling. *Eur J Cell Biol* 1997; **72**: 151–158.

- [8] BRAUNEWELL K-H, BRACKMANN M, SCHAUPP M, SPILKER CH, ANAND R, GUNDELFINGER ED. Intracellular neuronal calcium sensor (NCS) protein VILIP-1 modulates cGMP signalling pathways in transfected neural cells and cerebellar granule neurones. *J Neurochem* 2001; **78**: 1277–1286.
- [9] BRAUNEWELL K-H, GUNDELFINGER ED. Intracellular neuronal calcium sensor proteins: a family of EF-hand calcium-binding proteins in search of a function. *Cell Tissue Res* 1999; **295**: 1–12.
- [10] BRAUNEWELL K-H, REISSNER C, GUNDELFINGER ED. Visinin-like proteins (VILIPs)-Emerging role in cross-talk between cellular signaling pathways. [w] Roland Pochet [red.] Calcium the molecular basis of calcium action in biology and medicine. Kluwer Academic Publishers 2000.
- [11] BRAUNEWELL K-H, SPILKER CH, BEHNISCH T, GUNDELFINGER ED. The neuronal calcium-sensor protein VILIP1 modulates cyclic AMP accumulation in stably transfected C6 glioma cells: amino-terminal myristoylation determines functional activity. *J Neurochem* 1997; **68**: 2129–2139.
- [12] BURGOYNE RD, WEISS JL. The neuronal calcium sensor family of Ca^{2+} -binding proteins. *Biochem J* 2001; **353**: 1–12.
- [13] CARRIÓN AM, LINK WA, LEDO F, MELLSTRÖM B, NARANJO JR. DREAM is a Ca^{2+} -regulated transcriptional repressor. *Nature* 1999; **398**: 80–84.
- [14] CHEN CH-K, INGLESE J, LEFKOWITZ RJ, HURLEY JB. Ca^{2+} -dependent interaction of recoverin with rhodopsin kinase. *J Biol Chem* 1995; **270**: 18060–18066.
- [15] CHEN W, ELIAS RV, CAO W, LERIOUS V, MCGINNIS JF. Anti-recoverin antibodies cause the apoptotic death of mammalian photoreceptor cells *in vitro*. *J Neurosci Res* 1999; **57**: 706–718.
- [16] CHIN D, MEANS AR. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol* 2000; **10**: 322–328.
- [17] CUENCA N, LOPEZ S, HOWES K, KOLB H. The localization of guanylyl cyclase-activating proteins in the mammalian retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; **39**: 1243–1250.
- [18] DALIL-THINEY N, BASTIANELLI E, POCHE R, REPERANT J, VERSAUX-BOTTERI C. Recoverin and hippocampal distribution in the lamprey (*Lampræta fluviatilis*) retina. *Neurosci Lett* 1998; **247**: 163–166.
- [19] DeCASTRO E, NEF S, FIUMELLI H, LENZ SE, KAWAMURA S, Nef P. Regulation of rhodopsin phosphorylation by a family of neuronal calcium sensors. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **216**: 133–140.
- [20] De RAAD S, COMTE M, NEF P, LENZ SE, GUNDELFINGER ED, COX JA. Distribution pattern of three neural calcium-binding proteins (NCS-1, VILIP and recoverin) in chicken, bovine and rat retina. *Histochem J* 1995; **27**: 524–535.
- [21] DEJDA A, GORCZYCA WA. Zmiany ewolucyjne układu fotoreceptyjnego szyszynki. *Post Biol Kom* 2001; **28**: 571–588.
- [22] DIZHOOR AM, BOIKOV SG, OLSHEVSKAYA EV. Constitutive activation of photoreceptor guanylate cyclase by Y99C mutant of GCAP-1. *J Biol Chem* 1998; **273**: 17311–17314.
- [23] DIZHOOR AM, ERICSSON LH, JOHNSON RS, KUMAR S, OLSHEVSKAYA E, ZOZULYA S, THOMAS AN, STRYER L, HURLEY JB, WALSH KA. The NH₂ terminus of retinal recoverin is acylated by a small family of fatty acids. *J Biol Chem* 1992; **267**: 16033–16036.
- [24] DIZHOOR AM, LOWE DG, OLSHEVSKAYA EV, LAURA RP, HURLEY JB. The human photoreceptor membrane guanylyl cyclase, RetGC, is present in outer segments and is regulated by calcium and a soluble activator. *Neuron* 1994; **12**: 1345–1352.
- [25] DIZHOOR AM, OLSHEVSKAYA EV, HENZEL WJ, WONG S, STULTS JT, ANKOUDI-NOVA I, HURLEY JM. Cloning, sequencing, and expressing of a 24-kDa Ca^{2+} -binding protein activating photoreceptor guanylyl cyclase. *J Biol Chem* 1995; **270**: 25200–25206.
- [26] DIZHOOR AM, RAY S, KUMAR S, NIEMI G, SPENCER M, BROLLEY D, WALSH KA, PHILIPPOV PP, HURLEY JB, STRYER L. Recoverin: a calcium sensitive activator of retinal rod guanylate cyclase. *Science* 1991; **251**: 915–918.

- [27] FLAHERTY KM, ZOZULYA S, STRYER L, MCKAY DB. Three-dimensional structure of recoverin, a calcium sensor in vision. *Cell* 1993; **75**: 709–716.
- [28] FRINS S, BONIGK W, MULLER F, KELLNER R, KOCH KW. Functional characterization of a guanylyl cyclase-activating protein from vertebrate rods. *J Biol Chem* 1996; **271**: 8022–8027.
- [29] GORCZYCA WA. Role of calcium ions in vertebrate phototransduction. *Pol J Pharmacol* 1999; **51**: 167–172.
- [30] GORCZYCA WA, GRAY-KELLER MP, DETWILER PB, PALCZEWSKI K. Purification and physiological evaluation of guanylate cyclase activating protein from retinal rods. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 4014–4018.
- [31] GORCZYCA WA, POLANS AS, SURGUCHEVA I, SUBBARAYA I, BAEHR W, PALCZEWSKI K. Guanylyl cyclase-activating protein: a calcium-sensitive regulator of phototransduction. *J Biol Chem* 1995; **270**: 22029–22036.
- [32] GRAY-KELLER MP, POLANS AS, PALCZEWSKI K, DETWILER PB. The effect of recoverin-like calcium binding proteins on the photoresponse of retinal rods. *Neuron* 1993; **10**: 523–531.
- [33] HAESELEER F, IMANISHI Y, SOKAL I, FILIPEK S, PALCZEWSKI K. Calcium-binding proteins: intracellular sensors from the calmodulin superfamily. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **290**: 615–623.
- [34] HAESELEER F, SOKAL I, LI N, PETTENATI M, RAO N, BRONSON D, WECHTER R, BAEHR W, PALCZEWSKI K. Molecular characterization of a third member of the guanylyl cyclase-activating protein subfamily. *J Biol Chem* 1999; **274**: 6526–6535.
- [35] HAESELEER F, SOKAL I, VERLINDE CHJML, ERDJUMENT-BROMAGE H, TEMPST P, PRONIN AN, BENOVIC JL, FARISS RN, PALCZEWSKI K. Five members of a novel Ca^{2+} -binding protein (CABP) subfamily with similarity to calmodulin. *J Biol Chem* 2000; **275**: 1247–1260.
- [36] HIDAKA H, OKAZAKI K. Neurocalcin family: a novel calcium-binding protein abundant in bovine central nervous system. *Neurosci Res* 1993; **16**: 73–77.
- [37] HISATOMI O, ISHINO T, MATSUDA S, YAMAGUCHI K, KOBAYASHI Y, KAWAMURA S, TOKUNAGA F. Functional expression and characterization of frog photoreceptor-specific calcium-binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **234**: 173–177.
- [38] HUGHES RE, BRZOVIC PS, DIZHOOR AM, KLEVIT RE, HURLEY JB. Ca^{2+} -dependent conformational changes in bovine GCAP-2. *Protein Science* 1998; **7**: 2675–2680.
- [39] HURLEY JB, DIZHOOR AM, RAY S, STRYER L. Recoverin's role: conclusion withdrawn. *Science* 1993; **260**: 740.
- [40] IKURA M. Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem Sci* 1996; **21**: 14–17.
- [41] IMANISHI Y, LI N, SOKAL I, SOWA ME, LICHTARGE O, WENSEL TG, SAPERSTEIN DA, BAEHR W, PALCZEWSKI K. Characterization of retinal guanylyl-cyclase activating protein 3 (GCAP3) from zebrafish to man. *Eur J Neurosci* 2002; **15**: 63–78.
- [42] KACHI S, NISHIZAWA Y, OLSHEVSKAYA E, YAMAZAKI A, MIYAKE Y, WAKABAYASHI T, DIZHOOR A, USUKURA J. Detailed localization of photoreceptor guanylate cyclase activating protein-1 and -2 in mammalian retinas using light and electron microscopy. *Exp Eye Res* 1999; **68**: 465–473.
- [43] KAJIMOTO Y, SHIRAI Y, MUKAI H, KUNO T, TANAKA Ch. Molecular cloning of two additional members of the neural visinin-like Ca^{2+} -binding protein gene family. *J Neurochem* 1993; **61**: 1091–1096.
- [44] KATO M, WATANABE Y, IINO S, TAKAOKA Y, KOBAYASHI S, HAGA T, HIDAKA H. Cloning and expression of a cDNA encoding a new neurocalcin isoform (neurocalcin α) from bovine brain. *Biochem J* 1998; **331**: 871–876.
- [45] KAWAMURA S, COX JA, NEF P. Inhibition of rhodopsin phosphorylation by non-myristoylated recombinant recoverin. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **203**: 121–127.

- [46] KAWAMURA S, HISATOMI O, KAYADA S, TOKUNAGA F, KUO Ch-H. Recoverin has S-modulin activity in frog rods. *J Biol Chem* 1993; **268**: 14579–14582.
- [47] KAWAMURA S, KUWATA O, YAMADA M, MATSUDA S, HISATOMI O, TOKUNAGA F. Photoreceptor protein s^{26} , a cone homologue of S-modulin in frog retina. *J Biol Chem* 1996; **271**: 21359–21364.
- [48] KLENCHIN VA, CALVERT PD, BOWNS MD. Inhibition of rhodopsin kinase by recoverin. *J Biol Chem* 1995; **270**: 16147–16152.
- [49] KOBAYASHI M, SAKAI E, FURUTA Y, TAKAMATSU K. Isolation of two human cDNAs, HLP3 and HLP4, homologous to the neuron-specific calcium-binding protein genes. *DNA Seq* 1998; **9**: 171–176.
- [50] KOBAYASHI M, TAKAMATSU K, FUJISHIRO M, SAITOH S, NOGUCHI T. Molecular cloning of a novel calcium-binding protein structurally related to hippocalcin from human brain and chromosomal mapping of its gene. *Biochem Biophys Acta* 1994; **1222**: 515–518.
- [51] KOBAYASHI M, TAKAMATSU K, SAITOH S, MIURA M, NOGUCHI T. Molecular cloning of hippocalcin, a novel calcium-binding protein of the recoverin family exclusively expressed in hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **189**: 511–517.
- [52] KOBAYASHI M, TAKAMATSU K, SAITOH S, NOGUCHI T. Myristoylation of hippocalcin is linked to its calcium-dependent membrane association properties. *J Biol Chem* 1993; **268**: 18898–18904.
- [53] KORF HW, WHITE BH, SCHAAD NC, KLEIN DC. Recoverin in pineal organs and retinae of various vertebrate species including man. *Brain Res* 1992; **595**: 57–66.
- [54] KRYLOV DM, NIEMI GA, DIZHOOR AM, HURLEY JB. Mapping sites in guanylyl cyclase-activating protein-1 required for regulation of photoreceptor membrane guanylyl cyclases. *J Biol Chem* 1999; **274**: 10833–10839.
- [55] KUMAR VD, VIJAY-KUMAR S, KRISHNAN A, DUDA T, SHARMA RK. A second calcium regulator of rod outer segment membrane guanylate cyclase, ROS-GC1: neurocalcin. *Biochemistry* 1999; **38**: 12614–12620.
- [56] KUNO T, KAJIMOTO Y, HASHIMOTO T, MUKAI H, SHIRAI Y, SAHEKI S, TANAKA C. cDNA cloning of a neural visinin-like Ca^{2+} -binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **184**: 1219–1225.
- [57] LENZ SE, HENSCHTEL Y, ZOPF D, VOSS B, GUNDELFINGER ED. VILIP, a cognate protein of the retinal calcium binding proteins visinin and recoverin, is expressed in the developing chicken brain. *Mol Brain Res* 1992; **15**: 133–140.
- [58] LI N, FARISS R N, ZHANG K, OTTO-BRUC A, HAESELEER F, BRONSON D, QIN N, YAMAZAKI A, SUBBARAYA I, MILAM AH, PALCZEWSKI K, BAEHR W. Guanylate-cyclase-inhibitory protein is a frog retinal Ca^{2+} -binding protein related to mammalian guanylate-cyclase-activating proteins. *Eur J Biochem* 1998; **252**: 591–599.
- [59] MATHISEN PM, JOHNSON JM, KAWCZAK JA, TUOHY VK. Visinin-like protein (VILIP) is a neuron-specific calcium-dependent double-stranded RNA-binding protein. *J Biol Chem* 1999; **274**: 31571–31576.
- [60] MATSUBARA S, YAMAJI Y, SATO M, FUJITA J, TAKAHARA J. Expression of a photoreceptor protein, recoverin, as a cancer-associated retinopathy autoantigen in human lung cancer cell lines. *British J Cancer* 1996; **74**: 1419–1422.
- [61] MATSUDA S, HISATOMI O, ISHINO T, KOBAYASHI Y, TOKUNAGA F. The role of calcium-binding sites in S-modulin function. *J Biol Chem* 1998; **273**: 20223–20227.
- [62] MATSUDA S, HISATOMI O, TOKUNAGA F. Role of carboxyl-terminal charges on S-modulin membrane affinity and inhibition of rhodopsin phosphorylation. *Biochemistry* 1999; **38**: 1310–1315.
- [63] McFERRAN BW, GRAHAM ME, BURGOYNE RD. Neuronal Ca^{2+} sensor 1, the mammalian homologue of frequenin, is expressed in chromaffin and PC12 cells and regulates neurosecretion from dense-core granules. *J Biol Chem* 1998; **273**: 22768–22772.
- [64] MCGINNIS JF, STEPANIK PL, JARIANGPRASERT S, LERIOUS V. Functional significance of recoverin localization in multiple retina cell types. *J Neurosci Res* 1997; **50**: 487–495.

- [65] NEF S, FIUMELLI H, DE CASTRO E, RAES MB, NEF P. Identification of neuronal calcium sensor (NCS-1) possibly involved in the regulation of receptor phosphorylation. *J Recept Signal Transduct Res* 1995; **15**: 365–378.
- [66] NIKI I, YOKOKURA H, SUDO T, KATO M, HIDAKA H. Ca^{2+} signaling and intracellular Ca^{2+} binding proteins. *J Biochem* 1996; **120**: 685–698.
- [67] OGHURO H, OGAWA I, MAEDA A, MARUYAMA I. Cancer-associated retinopathy induced by both anti-recoverin and anti-hsc70 antibodies *in vivo*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; **40**: 3160–3167.
- [68] OKAZAKI K, WATANABE M, ANDO Y, HAGIWARA M, TERASAWA M, HIDAKA H. Full sequence of neurocalcin, a novel calcium-binding protein abundant in central nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **185**: 147–153.
- [69] OLSHEVSKAYA EV, BOIKOV S, ERMILOV AN, HURLEY JB, DIZHOOR AM. Mapping functional domains of the guanylate cyclase regulator protein, GCAP-2. *J Biol Chem* 1999b; **274**: 10823–10832.
- [70] OLSHEVSKAYA EV, ERMILOV AN, DIZHOOR AM. Dimerization of guanylyl cyclase-activating protein and a mechanism of photoreceptor guanylyl cyclase activation. *J Biol Chem* 1999a; **274**: 25583–25587.
- [71] OLSHEVSKAYA EV, HUGHES RE, HURLEY JB, DIZHOOR AM. Calcium binding, but not a calcium-myristoyl switch, controls the ability of guanylyl cyclase-activating protein GCAP-2 to regulate photoreceptor guanylyl cyclase. *J Biol Chem* 1997; **272**: 14327–14333.
- [72] OTTO-BRUC A, FARISS RN, HAESELEER F, HUANG J, BUCZYŁKO J, SURGUCHEVA I, BAEHR W, MILAM AH, PALCZEWSKI K. Localization of guanylate cyclase-activating protein 2 in mammalian retinas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 4727–4732.
- [73] OTTO-BRUC A, FARISS RN, VAN HOOSER JP, PALCZEWSKI K. Phosphorylation of photolyzed rhodopsin is calcium-insensitive in retina permeabilized by alpha-toxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 15014–15019.
- [74] PALCZEWSKI K, POLANS AS, BAEHR W, AMES JB. Ca^{2+} -binding proteins in the retina: structure, function, and the etiology of human visual diseases. *BioEssays* 2000; **22**: 337–350.
- [75] PALCZEWSKI K, SUBBARAYA I, GORCZYCA WA, HELEKAR BS, RUIZ CC, OHGURU H, HUANG J, ZHAO X, CRABB JW, JOHNSON RS, WALSH KA, GRAY-KELLER MP, DETWILER PB, BAEHR W. Molecular cloning and characterization of retinal guanylyl cyclase-activating protein. *Neuron* 1994; **13**: 395–404.
- [76] PATERLINI M, REVILLA V, GRANT AL, WISDEN W. Expression of the neuronal calcium sensor protein family in the rat brain. *Neuroscience* 2000; **99**: 205–216.
- [77] POLANS AS, BUCZYŁKO J, CRABB J, PALCZEWSKI K. A photoreceptor calcium binding protein is recognized by autoantibodies obtained from patients with cancer-associated retinopathy. *J Cell Biol* 1991; **112**: 981–989.
- [78] POLANS AS, BURTON MD, HALEY TL, CRABB JW, PALCZEWSKI K. Recoverin, but not visinin, is an autoantigen in the human retina identified with a cancer-associated retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; **34**: 81–90.
- [79] POLANS AS, WITKOWSKA D, HALEY TL, AMUNDSON D, BAIZER L, ADAMUS G. Recoverin, a photoreceptor-specific calcium-binding protein, is expressed by the tumor of a patient with cancer-associated retinopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 9176–9180.
- [80] PONGS O, LINDEMEIER J, ZHU XR, THEIL T, ENGELKAMP D, KRAH-JENTGENS I, LAMBRECHT H-G, KOCH KW, SCHWEMER J, RIVOSECCHI R, MALLART A, GALCERAN, CANAL I, BARBAS JA, FERRÚS A. Frequenin – a novel calcium-binding protein that modulates synaptic efficacy in the *Drosophila* nervous system. *Neuron* 1993; **11**: 15–28.
- [81] POULAIN C, FERRUS A, MALLART A. Modulation of type A K^+ current in *Drosophila* larval muscle by internal Ca^{2+} ; effects of the overexpression of frequenin. *Pflugers Arch* 1994; **427**: 71–79.
- [82] RIVOSECCHI R, PONGS O, THEIL T, MALLART A. Implication of frequenin in the facilitation of transmitter release in *Drosophila*. *J Physiol* 1994; **474**: 223–232.

- [83] SANADA K, KOKAME K, YOSHIZAWA T, TAKAO T, SHIMONISHI Y, FUKADA Y. Role of heterogeneous N-terminal acylation of recoverin in rhodopsin phosphorylation. *J Biol Chem* 1995; **270**: 15459–15462.
- [84] SATPAEV DK, CHEN CH-K, SCOTTI A, SIMON MI, HURLEY JB, SLEPAK VZ. Auto-phosphorylation and ADP regulate the Ca^{2+} -dependent interaction of recoverin with rhodopsin kinase. *Biochemistry* 1998; **37**: 10256–10262.
- [85] SCHAAD NC, De CASTRO E, NEF S, HEGI S, HINRICHSEN R, MARTONE ME, ELLISMAN MH, SIKKINK R, RUSNAK F, SYGUSH J, NEF P. Direct modulation of calmodulin targets by the neuronal calcium sensor NCS-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 9253–9258.
- [86] SEIDENBECHER CI, LANGNAESE K, SANMARTI-VILA L, BOECKERS TM, SMALLA K-H, SABEL BA, GARNER CC, GUNDELFINGER ED, KREUTZ MR. Caldendrin, a novel neuronal calcium-binding protein confined to the somato-dendritic compartment. *J Biol Chem* 1998; **273**: 21324–21331.
- [87] SEMPLE-ROWLAND SL, GORCZYCA WA, BUCZYŁKO J, HELEKAR BS, RUIZ CC, SUBBARAYA I, PALCZEWSKI K, BAEHR W. Expression of GCAP1 and GCAP2 in the retinal degeneration (rd) mutant chicken retina. *FEBS Lett* 1996; **385**: 47–52.
- [88] SEMPLE-ROWLAND SL, LARKIN P, BRONSON JD., NYKAMP K, STREIT WJ, BAEHR W. Characterization of the chicken GCAP gene array and analyses of GCAP1, GCAP2, and GC1 gene expression in normal and rd chicken pineal. *Molecular Vision* 1999; **5**: 14.
- [89] SENIN II, ZARGAROV AA, ALEKSEEV AM, GORODOVIKOVA EN, LIPKIN VM, PHILIPPOV PP. N-myristoylation of recoverin enhances its efficiency as an inhibitor of rhodopsin kinase. *FEBS Lett* 1995; **376**: 87–90.
- [90] SOKAL I, OTTO-BRUC AE, SURGUCHEVA I, VERLINDE CHLMJ, WANG Ch-K, BAEHR W, PALCZEWSKI K. Conformational changes in guanylyl cyclase-activating protein 1 (GCAP1) and its tryptophan mutants as a function of calcium concentration. *J Biol Chem* 1999; **274**: 19829–19837.
- [91] SOKAL I, LI N, SURGUCHEVA I, WARREN MJ, PAYNE AM, BHATTACHARYA SS, BAEHR W, PALCZEWSKI K. GCAP1 (Y99C) mutant is constitutively active in autosomal dominant cone dystrophy. *Molecular Cell* 1998; **2**: 129–133.
- [92] SOKAL I, LI N, VERLINDE CHLMJ, HAESELEER F, BAEHR W, PALCZEWSKI K. Ca^{2+} -binding proteins in the retina: from discovery to etiology of human disease. *Acta Biochim Biophys* 2000; **1498**: 233–251.
- [93] SUBBARAYA I, RUIZ CC, HELEKAR BS, ZHAO X, GORCZYCA WA, PETTENATI MJ, RAO PN, PALCZEWSKI K, BAEHR W. Molecular characterization of human and mouse photoreceptor guanylate cyclase-activating protein (GCAP) and chromosomal localization of the human gene. *J Biol Chem* 1994; **269**: 31080–31089.
- [94] TACHIBANAKI S, NANDA K, SASAKI K, OZAKI K, KAWAMURA S. Amino acid residues of S-modulin responsible for interaction with rhodopsin kinase. *J Biol Chem* 2000; **275**: 3313–3319.
- [95] TANAKA T, AMES JB, HARVEY TS, STRYER L, IKURA M. Sequestration of the membrane-targeting myristoyl group of recoverin in the calcium-free state. *Nature* 1995; **376**: 444–446.
- [96] TAKAMATSU K, KOBAYASHI M, SAITOH S, FUJISHIRO M, NOGUCHI T. Molecular cloning of human hippocalcin cDNA and chromosomal mapping of its gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **200**: 606–611.
- [97] TERASAWA M, NAKANO A, KOBAYASHI R, HIDAKA H. Neurocalcin: a novel calcium-binding protein from bovine brain. *J Biol Chem* 1992; **267**: 19596–19599.
- [98] THIRKILL CHE, TAIT RC, TYLER NK, ROTH AM, KELTNER JL. The cancer-associated retinopathy antigen is a recoverin-like protein. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; **33**: 2768–2772.

- [99] VENKATARAMAN V, NAGELE R, DUDA T, SHARMA RK. Rod outer segment membrane guanylate cyclase type 1-linked stimulatory and inhibitory calcium signaling systems in the pineal gland: biochemical, molecular, and immunohistochemical evidence. *Biochemistry* 2000; **39**: 6042–6052.
- [100] WIECHMANN AF, HAMMARBACK JA. Molecular cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding recoverin from human retina. *Exp Eye Res* 1993; **56**: 463–470.
- [101] YAMAGATA K, GOTO K, KUO CH-H, KONDO H, MIKI N. Visinin: a novel calcium binding protein expressed in retinal cone cells. *Neuron* 1990; **2**: 469–476.
- [102] YU H, OLSHEVSKAYA EV, DUDA T, SENO K, HAYASHI F, SHARMA RK, DIZHOOR AM, YAMAZAKI A. Activation of retinal guanylyl cyclase-1 by Ca^{2+} -binding proteins involves its dimerization. *J Biol Chem* 1999; **274**: 15547–15555.
- [103] ZOZULYA S, STRYER L. Calcium-myristoyl protein switch. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 11569–11573.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 15.01. 2002 r.

Przyjęto: 12.02. 2002 r.

Adres autora: 90-950 Łódź, ul. Tylna 3

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. Rysunki, schematy zdjęcia i wykresy w podpisach i w powołaniach w tekście powinny nosić nazwę rycina (Ryc.) i być numerowane kolejno.

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.

Cennik odbitek prac dla Autorów w 2002 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

Warunki prenumeraty kwartalnika PBK

Prenumerata na rok 2002

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 2002 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 2002:

- dla instytucji (bibliotek) wynosi 90 zł,
- dla odbiorców indywidualnych 30 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2002

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

Wskazanie programowania i metodologii programowania

Wskazanie programowania i metodologii programowania jest kluczowym elementem w procesie tworzenia oprogramowania. Programowanie to proces definiowania, tworzenia i testowania kodu źródłowego, który służy do realizacji określonych funkcji. Metodologia programowania to zbiór zasad i procedur, które pomagają w organizacji i sterowaniu procesem programowania. Wskazanie programowania i metodologii programowania jest niezbędne do osiągnięcia wysokiej jakości i wydajności oprogramowania.

Wskazanie programowania i metodologii programowania

1. Wskazanie programowania

Wskazanie programowania to proces definiowania i tworzenia kodu źródłowego, który służy do realizacji określonych funkcji. Wskazanie programowania jest kluczowym elementem w procesie tworzenia oprogramowania. Wskazanie programowania i metodologii programowania jest niezbędne do osiągnięcia wysokiej jakości i wydajności oprogramowania.

2. Metodologia programowania

Metodologia programowania to zbiór zasad i procedur, które pomagają w organizacji i sterowaniu procesem programowania. Metodologia programowania jest kluczowym elementem w procesie tworzenia oprogramowania. Metodologia programowania i wskazanie programowania jest niezbędne do osiągnięcia wysokiej jakości i wydajności oprogramowania.

3. Wskazanie programowania i metodologii programowania

Wskazanie programowania i metodologii programowania jest kluczowym elementem w procesie tworzenia oprogramowania. Wskazanie programowania i metodologii programowania jest niezbędne do osiągnięcia wysokiej jakości i wydajności oprogramowania.

Wskazanie programowania i metodologii programowania

Wskazanie programowania i metodologii programowania

Wskazanie programowania i metodologii programowania jest kluczowym elementem w procesie tworzenia oprogramowania. Wskazanie programowania i metodologii programowania jest niezbędne do osiągnięcia wysokiej jakości i wydajności oprogramowania. Wskazanie programowania i metodologii programowania jest kluczowym elementem w procesie tworzenia oprogramowania. Wskazanie programowania i metodologii programowania jest niezbędne do osiągnięcia wysokiej jakości i wydajności oprogramowania.

Wskazanie programowania i metodologii programowania

Wskazanie programowania i metodologii programowania jest kluczowym elementem w procesie tworzenia oprogramowania. Wskazanie programowania i metodologii programowania jest niezbędne do osiągnięcia wysokiej jakości i wydajności oprogramowania. Wskazanie programowania i metodologii programowania jest kluczowym elementem w procesie tworzenia oprogramowania. Wskazanie programowania i metodologii programowania jest niezbędne do osiągnięcia wysokiej jakości i wydajności oprogramowania.

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, niepublikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązują 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 15 stron maszynopisu i do 100 pozycji bibliograficznych koniecznie z ostatnich 5 lat (natomiast wcześniejsze prace mogą być pracami przeglądowymi);

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

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

Tekst pracy i załączniki należy przesyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 w układzie normalnym 1800 znaków na stronie. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki s. 160) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nienumerowana 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 rycin. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwzakoładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 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 rycin, a jedynie zaznaczyć ołówkiem w marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, ryc. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według *Index Medicus* (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawiać alfabetycznie według następującego wzoru:

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

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

Tabele, opisy schematów i rycin 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. **Barwne ryciny i zdjęcia są płatne.** Wymiary poszczególnych rycin, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmiennionej formie. Wszystkie załączniki, np. wykaz skrótów, muszą mieć na odwrocie nazwisko 1. autora i oznaczenie góry i dołu ilustracji. 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 wprowadzonymi 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. 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 zrezygnuje z publikacji maszynopisu, którego autorzy do 30 dni nie odpowiedzą na list redaktora.

Redakcja prosi także o dołączenie tytułu artykułu i podpisanej odpowiedzi na następujące pytania:

Dołączono 2 kopie maszynopisu, tabel i rycin

Treść pracy nie była uprzednio publikowana,

tak nie nie została wysłana do innej redakcji

tak nie

Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę Jest zgoda osób, których informacje niepublikowane są zamieszczone w tekście

tak nie Dołączono kopię pracy wraz z rycinami na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM

tak nie

Odpowiadam za całość pracy opisanę w zał maszyn. **tak nie** Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w „Postęпах Biologii Komórki” przechodzi na własność Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji.

podpisy wszystkich autorów

TREŚĆ – CONTENTS

W tym zeszycie PKB	179
KOWALCZYK S., MACIEJEWSKA B.: Roślinne peptydy sygnałowe Plant signaling peptides	181
KMITA H., ANTOS N.: Udział kanałów błony zewnętrznej w fizjologii mitochondriów The outer membrane channels in mitochondria physiology	203
LENARTOWICZ M.: Genetyczna regulacja transportu i metabolizmu miedzi Genetic regulation of copper transport and metabolism	221
FRANCZAK A., KOTWICA G.: Mechanizm działania i funkcje oksytocyny w cyklu płciowym The mechanism of action and the role of oxytocin in the oestrous cycle	237
KUCIA M., DRUKAŁA J.: Postęp w metodach hodowli komórek dla transplantologii Komórki macierzyste Advance in methods of culturing cells for transplantology – Stem cells	257
CIERESZKO I.: Regulacyjna rola cukrów, percepcja cukrów i przekazywanie sygnału w komórkach roślinnych – Sugar regulation and signaling in the plant cells	269
ŻELISKO A., JACKOWSKI G.: Proteazy chloroplastowe – Chloroplast proteases	283
KLOC M., BILIŃSKI S.: Rola plazmy płciowej w specyfikacji komórek linii płciowej u bezkręgowców i kręgowców – Specification of the germ-line cells in invertebrates and vertebrates the function of the germ plasm	301
SŁOCIŃSKA M.: Peryferyczny receptor benzodiazepin – The peripheral benzodiazepine receptor	319
DEJDA A., MATCZAK I., GORCZYCA W. A.: Neuronalne sensory wapnia – Neuronal calcium sensors	341
Wskazówki przygotowania rycin i streszczeń do publikacji w PBK oraz Warunki prenumeraty kwartalnika PBK	361