

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
BIOLOGII  
KOMÓRKI

POLISH  
ANATOMICAL  
SOCIETY

POLISH SOCIETY  
FOR CELL  
BIOLOGY

VOL. 30, ISSUE 3/2003  
(403–602)

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 BILIŃSKI – 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, hybrydocytochemistry), 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

Indexed in: National Library of Medicine, Bathesda, Biosis, Philadelphia, Ulrich's International Periodicals Directory, New Jersey

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

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

Ark. wyd.16,5. Ark. druk.12,5. Podpisano do druku w czerwcu 2003 r. Druk ukończono w lipcu 2003 r.

## W TYM ZESZYCIE PBK



- Zwykle dyskutuje się funkcje czynnika martwicy nowotworów (TNF- $\alpha$ ) w kontekście jego własności przeciwnowotworowych i immunomodulujących. W artykule na stronie 405 jest dyskutowany wpływ TNF- $\alpha$  na metabolizm lipidów.
- W artykule na stronie 461 przedstawiono mechanizm działania estrogenów i ich znaczenie dla prawidłowego rozrodu u samca. W gonadzie męskiej estrogeny są produkowane przez komórki Leydiga i Sertoliego oraz przez kolejne stadia komórek gametogenicznych.
- Komórki dendrytyczne (DC) stanowią heterogenną populację leukocytów obecnych w większości tkanek i narządów organizmu. Jedną z populacji DC są folikularne komórki dendrytyczne, które opisano na stronie 587. Występują one w strefie limfocytów B grudek chłonnych wtórnych narządów limfatycznych
- IRP1 jest białkiem kontrolującym homeostazę żelaza w komórkach ssaków (str. 497). Białko to potranskrypcyjnie reguluje ekspresje białek biorących udział w utrzymaniu homeostazy żelaza.
- Do rozpoczęcia odpowiedzi immunologicznej wymagana jest prezentacja antygeny limfocytom T przez komórki prezentujące antygen (*Antigen Presenting Cells*; APC). Prezentowany antygen jest rozpoznawany przez receptor limfocyta T (*T Cell Receptor*, TCR). Do pełnej stymulacji limfocyta T konieczne jest zaangażowanie cząsteczek kostymulujących: CD28 na powierzchni limfocyta oraz cząsteczek rodziny B.7 na komórkach APC. Receptor CD28 stale występuje na limfocytach T. Podobna w budowie cząsteczka określana jako CTLA-4 (*Cytotoxic T Lymphocyte associated Antigen-4*; CD152) pojawia się okresowo na limfocytach i hamuje odpowiedź immunologiczną. Więcej na temat stymulacji i hamowania odpowiedzi immunologicznej przez cząsteczki CTLA-4 można znaleźć na stronie 549.



## WPLYW CYTOKINY TNF- $\alpha$ NA METABOLIZM TKANKI TŁUSZCZOWEJ

EFFECT OF TNF- $\alpha$  ON FATTY TISSUE METABOLISM

Adam ŚLEDZIEWSKI<sup>1</sup>, Maciej KINALSKI<sup>2</sup>, Sławomir J. TERLIKOWSKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Zakład Rozwoju Płodu i Noworodka w Białymstoku

<sup>2</sup> Zakład Patofizjologii Ciąży Akademii Medycznej w Białymstoku

*Streszczenie.* TNF- $\alpha$  stanowi kluczowe ogniwo w fizjologicznych i patologicznych mechanizmach regulujących przemiany energetyczne zachodzące w organizmie. W pracy przedstawiono aktualne poglądy dotyczące wpływu TNF- $\alpha$  na metabolizm lipidów. Podkreślono rolę cytokiny w biosyntezie PAI-1, leptyny oraz powstawaniu insulinooporności.

*Słowa kluczowe:* czynnik martwicy nowotworów (TNF- $\alpha$ ), tkanka tłuszczowa, metabolizm lipidów.

*Summary.* TNF- $\alpha$  plays a key role in regulating energy metabolism under both physiological and pathological states. Current opinions of TNF- $\alpha$  actions on lipid metabolism were presented. The influence of TNF- $\alpha$  on both leptin and PAI-1 biosynthesis was underlined. The role of the cytokine as an essential factor in development of insulin resistance was pointed out.

*Key words:* tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), adipose tissue, lipid metabolism.

### WSTĘP

Cytokinami nazywamy peptydy i niskocząsteczkowe białka wpływające na funkcje komórek oraz warunkujące ich wzajemne oddziaływanie. Wytwarzane są one przez komórki wykazujące właściwości regulacyjne, które znajdują się bardzo blisko lub stykają się bezpośrednio z komórkami regulowanymi (docelowymi). Wiążąc się z wysoką swoistością z receptorami komórkowymi wpływają na ich proliferację, różnicowanie i funkcje. Ich podstawową cechą jest różnorodność wywieranych efektów (plejotropizm). Uwalniane do krwi zachowują się jak hormony i wywierają wpływ na

różne tkanki i narządy, często odległe od miejsca wytwarzania. Regulują odpowiedź zarówno komórkową, jak i humoralną. Mogą działać antagonistycznie, addycyjnie i synergistycznie na te same procesy biologiczne. Współdziałają w genetycznie zaprogramowanej sieci, której prawidłowe funkcjonowanie warunkuje odpowiedź immunologiczną [10].

## ODKRYCIE TNF- $\alpha$

Czynnik martwicy nowotworów (*Tumor Necrosis Factor*, TNF- $\alpha$ ) jest cytokiną o właściwościach przeciwnowotworowych i immunomodulujących. Jego odkrycie w roku 1975 było późną konsekwencją opublikowanych już na przełomie XIX i XX wieku obserwacji klinicznych amerykańskiego chirurga Williama B. Coley'a. Stwierdził on remisje nieoperacyjnych mięsaków w przebiegu ciężkich zakażeń bakteryjnych. Ponadto opracował metodę uzyskiwania „szczepionek” z nadsącza hodowli początkowo żywych, następnie martwych bakterii i stosował je u chorych uzyskując jednak niejednoznaczne wyniki [67, 71]. Zastosowanie u zwierząt lipopolisacharydu (*lipopolysaccharide*, LPS; głównego składnika „toksyny Coley'a”) doprowadziło do wykrycia w ich surowicy krwi białka, które wywoływało martwicę krwotoczną i regresję mięsaka indukowanego metylocholanem. Właśnie ze względu na te właściwości białko to nazwano czynnikiem martwicy nowotworów. Niezależnie, w tym samym czasie wykryto w surowicy krwi czynnik odpowiedzialny za wywołanie przewlekłego stanu katabolicznego, prowadzącego do wyniszczenia i śmierci w przebiegu nowotworów złośliwych oraz ciężkich zakażeń bakteryjnych i pasożytniczych. Nazwano go kachektyną (*cachectin*). Sklonowanie genów odpowiedzialnych za syntezę TNF- $\alpha$  i kachektyny pozwoliło ustalić, że jest to, to samo białko [1].

## BIOSYNTeza I DYSTRYBUCJA TNF- $\alpha$

Po raz pierwszy naturalny TNF- $\alpha$  uzyskano z nadsącza hodowli linii HL-60 komórek białaczki promielocytarnej stymulowanej estrem forbolowym. Cytokina ta jest polipeptydem występującym w formie dimeru, trimeru lub pentameru, w zależności od gatunku i metody izolacji. Wykazano, że TNF- $\alpha$  wytwarzany jest w postaci nieaktywnego prohormonu. Biologicznie aktywną formą TNF- $\alpha$  jest trimer. Ludzki pro-TNF- $\alpha$  w wyniku translacji liczy 233 aminokwasy, ma masę cząsteczkową 26 kDa i zawiera sekwencję hydrofobową. Po jej odłączeniu postać aktywna liczy 157 aminokwasów i ma masę cząsteczkową 17 kDa. Gen dla TNF- $\alpha$  zlokalizowany jest na ramieniu krótkim chromosomu 6, w pobliżu genów kodujących główny kompleks antygenów zgodności tkankowej (*Major Histocompatibility Complex*, MHC), w

regionie długości ok. 7 kb nazywanym locus TNF. Zawiera 4 eksony rozproszone w obszarze 3000 par zasad, przy czym ok. 80% sekwencji kodującej znajduje się w eksonie 4. Lokalizacja ta sugeruje ścisły związek z układem regulującym odpowiedź immunologiczną. Badania nad syntezą TNF- $\alpha$  potwierdzają, iż jest ona ściśle regulowana. W makrofagu, który jest podstawowym źródłem TNF- $\alpha$ , regulacja ta odbywa się na poziomach: transkrypcyjnym, potranskrypcyjnym i translacyjnym. W odpowiedzi na czynniki aktywujące transkrypcja genu TNF- $\alpha$  wzrasta trzykrotnie. Poziom informacyjnego RNA (mRNA) rośnie gwałtownie osiągając wartości 100x większe, a ilość syntetyzowanego i wydzielanego TNF- $\alpha$  może wzrastać 10000x [1, 3, 74].

## RECEPTORY KOMÓRKOWE TNF- $\alpha$

Aby cytokina mogła przekazać polecenie komórce docelowej, musi być przez nią rozpoznana. Zachodzi to przez jej połączenie ze swoistym receptorem komórkowym, którego zewnątrzłonowy fragment zlokalizowany jest na powierzchni komórki. Swoistość receptorowa polega na wiązaniu tylko jednej, właściwej dla niego cytokiny. W przypadku receptorów o mniejszej swoistości dochodzi do zjawiska konkurencji wiązania pomiędzy różnymi czynnikami. W przekazywaniu sygnału do jądra komórkowego, niezależnie od struktury receptora niezbędna jest domena zewnątrzkomórkowa wiążąca cytokinę, domena przezłonowa przekazująca sygnał powstały w wyniku związania cytokiny z receptorem oraz system przekazujący sygnał do jądra komórkowego. W wyniku aktywacji komórka regulująca wydziela do otoczenia cytokinę, która po swobodnej migracji jest wiązana przez receptor przekazujący informację na powierzchni komórki regulowanej. W przypadku takiego przebiegu interakcji nie jest wymagany bezpośredni kontakt obu komórek. Inną formą przekazu informacji są cytokiny związane z błoną komórkową, bez możliwości uwalniania do środowiska. Tutaj konieczny jest bezpośredni kontakt pomiędzy komórkami. Jeszcze inną możliwością jest występowanie receptorów niezwiązanych z wytwarzającą je komórką, które pozbawione są domeny przezłonowej i wewnątrzkomórkowej (receptory rozpuszczalne, *R-soluble*, Rs). Receptory te wytwarzane są celowo, a jedną z ról, jaką mogą pełnić, jest konkurencja z receptorami błonowymi w wychwytywaniu i blokowaniu cytokin, gdzie wykazują działanie antagonistyczne. Uczestniczą także we wzmacnianiu sygnału przez kooperację z receptorem błonowym tworząc kompleks Rs-cytokina i wspólnie aktywują receptor błonowy [10].

Podobnie jak inne cytokiny, TNF- $\alpha$  wywiera wpływ na komórki docelowe za pomocą specyficznych receptorów (TNF-R). Badania wykazały istnienie dwóch odmiennych, immunologicznie różnych TNF-R, określanych jako p55R (55 kDa) i p75R (75 kDa) [1]. Reakcja z nimi aktywuje kinazę białkową serynowo-treoninową oraz białko G lub kinazę tyrozynową, a następnie przekazuje pobudzenie do struktur jądra komórkowego. Biologiczne następstwa działania TNF- $\alpha$  zależą od rodzaju

komórek docelowych i współdziałania innych cytokin. Wykazano, że p55R jest odpowiedzialny za cytotoksyczność TNF- $\alpha$  w stosunku do komórek nowotworowych, natomiast p75R odpowiada za indukcję ostrej fazy i niektóre efekty immunologiczne. Wielokierunkowe działanie TNF- $\alpha$  wynika głównie ze zdolności aktywacji dużej liczby genów w komórkach docelowych, stymulacji wiązania trifosforanu guanozyny (GTP) i aktywności GTP-azy w błonie komórkowej, aktywacji fosfolipaz (głównie A<sub>2</sub>, C i D) i neutralnej sfingomielinazy, pobudzania fosforylacji białek oraz tworzenia reaktywnych form tlenu. Receptor p55R występuje przeważnie na komórkach pochodzenia nabłonkowego, p75R na komórkach pochodzenia szpikowego. Oba są glikoproteinami integralnie związanymi z błoną komórkową. Gen dla p55R znajduje się na chromosomie 12, natomiast dla p75R na chromosomie 1. Forma rozpuszczalna TNF-Rs powstaje wskutek działania proteaz i wykazuje zdolność wiązania i neutralizacji TNF- $\alpha$  [1, 3, 74].

## BIOLOGICZNE DZIAŁANIE TNF- $\alpha$

Badania doświadczalne i obserwacje kliniczne wskazują, że oprócz działania przeciwnowotworowego TNF- $\alpha$  odgrywa istotną rolę w patogenezie licznych zaburzeń organizmu i schorzeń – wstrząsie septycznym, schorzeniach autoimmunologicznych, reakcji odrzucania przeszczepu, ostrej niewydolności oddechowej, zespole nabytego niedoboru odporności (AIDS), zastoinowej niewydolności krążenia, stwardnieniu rozsianym, zakażeniach pasożytniczych, schorzeniach nerek o podłożu immunologicznym, reumatoidalnym zapaleniu stawów, łuszczycy i gruźlicy [1, 66]. Wydaje się, że na skutek działania TNF- $\alpha$  następujące uszkodzenie tkanek i narządów jest wynikiem kierunkowego działania cytokiny, które prowadzi do indukcji syntezy innych mediatorów. Duży udział w tych procesach mają: interleukina 1 (IL-1), IL-6, czynnik aktywujący płytki krwi (*Platelet Activating Factor*, PAF) oraz układ dopełniacza. TNF- $\alpha$  indukuje biosyntezę IL-1, która potęguje toksyczne działanie TNF- $\alpha$ . W podobny, synergistyczny sposób wpływa na działanie TNF- $\alpha$  endotoksyna/LPS. Przewlekła i niekontrolowana synteza i uwalnianie TNF- $\alpha$  prowadzą do postępującego wyniszczenia organizmu i kacheksji [1, 3, 74].

Tkanka tłuszczowa stanowi nie tylko magazyn substancji energetycznych, ale pełni także rolę narządu endokrynnego [41]. Wpływa na stan odżywienia i metabolizm ustroju oraz przekazuje sygnały innym tkankom, co ma odzwierciedlenie w bilansie energetycznym organizmu. TNF- $\alpha$  syntetyzowany i uwalniany przez adipocyty może bezpośrednio zmieniać homeostazę glukozy i metabolizm lipidów oraz odgrywa istotną rolę w mechanizmach rozwijającej się insulinooporności, otyłości, cukrzycy, dyslipidemii i miażdżycy.



## TNF- $\alpha$ A METABOLIZM LIPIDÓW

Najważniejszą funkcją adipocytów jest regulacja metabolizmu lipidów i wpływ na energetyczną równowagę ustroju, który polega na wychwycie z krwiobiegu kwasów tłuszczowych oraz udziale w procesach lipogenezy i lipolizy. Każdy z tych procesów może być modulowany poprzez bodźce pozakomórkowe wynikające z mechanizmów działania insuliny, kortyzolu, katecholamin, hormonu wzrostu, testosteronu, wolnych kwasów tłuszczowych (*Free Fatty Acids*, FFA) i cytokin [51].

Wpływ TNF- $\alpha$  na metabolizm lipidów poparty jest wieloma dowodami. Podwyższone stężenie TNF- $\alpha$  może stanowić o nadmiernej lipolizie, która charakterystyczna jest dla adipocytów w otyłości [51]. U gryzoni z niedoborem TNF- $\alpha$  wykazano niskie wartości FFA i triglicerydów (TG) [70]. Podawanie egzogennej cytokiny *in vitro* i *in vivo* pobudza lipolizę i zwiększa poziomy FFA [58]. Stąd też wynika stwierdzenie, że TNF- $\alpha$  zwiększając lipolizę może być mediatorem insulinooporności [4, 17, 20, 40, 42, 50].

Zgromadzone w adipocytach kwasy tłuszczowe pochodzą głównie z krwiobiegu i/ lub wewnątrzkomórkowej lipolizy, w mniejszym zaś stopniu z syntezy *de novo*. Wychwyt kwasów tłuszczowych ułatwia lipaza lipoproteinowa (*Lipoprotein Lipase*, LPL). Wahania jej aktywności zależą od stanu endokrynnego oraz odżywienia organizmu [51]. Jakkolwiek działanie TNF- $\alpha$  u ludzi pozostaje nadal przedmiotem sporów, przeprowadzone badania *in vitro* i *in vivo* wykazują, że TNF- $\alpha$  hamuje aktywność LPL oraz obniża tkankową ekspresję nośników FFA, wychwyt FFA z krwiobiegu i może mieć znaczny wpływ na rozwój hiperlipidemii w otyłości [39, 54].

TNF- $\alpha$  osłabia aktywność kluczowych dla procesu lipogenezy enzymów: karboksylazy acetylo-CoA i syntazy kwasów tłuszczowych. Wpływ ten nie dotyczy jednak dojrzałych adipocytów. Ostatnie doniesienia sugerują, że TNF- $\alpha$  może również wpływać na zmniejszenie ilości mRNA syntetazy acetylo-CoA oraz jej aktywność [39]. Wraz z obniżoną biodostępnością substratu powoduje to redukcję reestryfikacji FFA. Przez hamowanie wychwytu glukozy związanego z wrażliwością na insulinę może być to przyczyną zmniejszenia akumulacji triglicerydów.

Wiadomo już, że mechanizm indukowanej przez TNF- $\alpha$  lipolizy różni się od fizjologicznego. W porównaniu do procesów lipolitycznych, które zachodzą głównie w wyniku pobudzenia układu adrenergicznego za pośrednictwem szlaku cAMP zależnego, jest on do chwili obecnej niewystarczająco poznany i udokumentowany. Tym niemniej przeprowadzone badania biochemiczne i genetyczne wyraźnie wykazują, że działanie lipolityczne TNF- $\alpha$  zachodzi za pośrednictwem TNF-R1 [35]. Dane te poparte są także wynikami badań, w których rekombinowanym ludzkim (rh) TNF- $\alpha$  pobudzano lipolizę u gryzoni wykorzystując znaną zależność, że rhTNF- $\alpha$  u myszy łączy się jedynie z TNF-R1. Poreceptorowe działanie TNF- $\alpha$  może obejmować regulację transkrypcji kluczowych białek zaangażowanych w proces lipolizy, który wzbudzony przez TNF- $\alpha$  może być blokowany przez aktywatory czynnika transkrypcji, egzogenne ligandy receptora aktywowanego przez proliferatory peroksyosomów (*Peroxisome Proliferator Activated-Receptor*

*Gamma*, PPAR $\gamma$ ) – takie jak: indometacyna i tiazolidinodiony oraz ligandy endogenne, które są pochodnymi prostaglandyn [18, 31, 60, 65].

Białkiem, którego poziom i aktywność może podlegać regulacji w wyniku działania TNF- $\alpha$ , jest także hormonowrażliwa lipaza (*Hormone Sensitive Lipase*, HSL) – enzym ograniczający szybkość przebiegu reakcji lipolizy. W hodowlach adipocytów TNF- $\alpha$  nie wpływając na poziom HSL zwiększa szybkość zachodzącej lipolizy. Nasuwa się pytanie, czy TNF- $\alpha$  może bezpośrednio modulować aktywność HSL, czy też działa za pośrednictwem innych, nieznanych jeszcze czynników. W świetle współczesnych badań wydaje się, że miejsce to może zająć perilipina – fosfoproteina zaangażowana w proces lipolizy. Wiadomo, że białko to umiejscowione jest na powierzchni kropelek lipidowych i chociaż jego funkcja pozostaje nadal niejasna, to ściśle wiąże się z regulacyjnym wpływem TNF- $\alpha$  i mechanizmem sprzężenia zwrotnego, w wyniku którego dochodzi do blokowania syntezy TNF- $\alpha$  z powodu nadmiernej produkcji perilipiny [13, 61].

Ekspresja białek lipogennych i lipolitycznych wiąże się z różnicowaniem adipocytów. TNF- $\alpha$  może „wyciszać” geny odpowiedzialne za adipogenezę, np. PPAR $\gamma$  i X/EBP $\alpha$  zmieniając tym samym program różnicowania się komórek tkanki tłuszczowej. Mechanizmy te nie muszą jednak funkcjonować *in vivo*. Nie jest wykluczone, że w działaniach lipolitycznych TNF- $\alpha$ , nie pośredniczą mechanizmy związane z uruchomieniem kluczowych enzymów lipolitycznych. Pośrednictwo to może natomiast dotyczyć białek zaangażowanych w wychwytywanie FFA w adipocytach. Zatem pośrednie działanie lipolityczne TNF- $\alpha$  może przebiegać z uruchomieniem syntetazy acylo-CoA i perilipiny. Regulacji przez TNF- $\alpha$  podlega także ekspresja adrenergicznego receptora  $\beta_2$  w adipocytach. Proces ten zachodzi przy znaczącym spadku ekspresji receptorów  $\beta_1$  i  $\beta_3$  [15]. Pozostaje do wykazania *in vivo*, czy wspomniana regulacja różnicowania adipocytów ma wpływ na zaburzenia metaboliczne będące wynikiem działania TNF- $\alpha$ .

## TNF- $\alpha$ A INSULINOOPORNOŚĆ

Istnieją sugestie, że podwyższone stężenia TNF- $\alpha$  w stanach przewlekłego katabolizmu, który towarzyszy złośliwym procesom nowotworowym, posocznicy oraz urazom termicznym indukują insulinooporność [20, 50]. Ostatnie doniesienia ugruntowały pogląd, że TNF- $\alpha$  jest istotnym mediatorem oporności na insulinę związanej z otyłością [25, 70, 72]. W mięśniach i tkance tłuszczowej osobników otyłych (także u gryzoni) stwierdzana jest nadekspresja TNF- $\alpha$  [29, 72]. Potwierdzają to zarówno badania ilościowe mRNA, jak i poziomy samego białka. Wykazano, że stężenia TNF- $\alpha$  wzrastają w surowicy krwi w cukrzycy typu 2 [8, 42, 48]. Spostrzeżenia te sugerują, że ekspresja TNF- $\alpha$  wyraźnie koreluje z hiperinsulinemią i obniżoną wrażliwością na insulinę.

Farmakologiczne i dietetyczne leczenie otyłości poprawia wrażliwość na insulinę i koreluje ze spadkiem syntezy i wydzielania TNF- $\alpha$  [6, 26]. Niepożądane działanie cytokiny można odwrócić przez podanie tiazolidinodionów, leków zwiększających wrażliwość na insulinę [18, 44, 46, 64]. W rezultacie, *in vivo* obserwuje się spadek ekspresji tkankowej oraz stężeń obwodowych TNF- $\alpha$  [40].

Rozstrzygające doniesienia potwierdzające rolę TNF- $\alpha$  w indukowaniu insulinooporności pochodzą z badań nad otyłością [69, 70]. Wykazują one, że brak TNF- $\alpha$  albo TNF-R zapobiega wystąpieniu insulinooporności. Potwierdzono to w różnych modelach otyłości (genetycznej, farmakologicznej i indukowanej dietą). Na ich podstawie udowodniono, że TNF- $\alpha$  wpływając na transport glukozy, produkcję leptyny oraz oddziaływanie na receptor insulinowy zmienia metabolizm lipidów [4, 17, 32, 38, 53]. Jednak do chwili obecnej mechanizm działania TNF- $\alpha$  w zakresie indukcji insulinooporności nie jest do końca poznany [57].

W warunkach prawidłowych wiązanie się insuliny z receptorem uruchamia kaskadę sygnałów, wynikiem których jest szereg reakcji komórkowych. Jedną z ich końcowych odpowiedzi jest zwiększone przemieszczanie insulinowrażliwego nośnika glukozy (*Glucose Transporter 4*, GLUT 4) do błony plazmatycznej adipocytów i miocytów, co ma ułatwiać stymulowany insuliną wychwyt glukozy. Badania *in vitro* wskazują, że TNF- $\alpha$  regulując w adipocytach ekspresję genu GLUT 4 obniża insulinozależny transport glukozy [34, 38]. Z drugiej strony w adipocytach osobników otyłych z cukrzycą typu 2, ilość nośnika ulega zmniejszeniu [21]. Badania poziomów GLUT 4 w tkance tłuszczowej otyłych gryzoni z genetycznie uwarunkowanym brakiem TNF- $\alpha$  są zbliżone do poziomów zwierząt zdrowych [70]. Sugeruje to, że w tkance tłuszczowej TNF- $\alpha$  działa niezależnie od ekspresji GLUT 4.

Wykazano, że TNF- $\alpha$  działa w początkowych etapach przekazywania sygnałów przez insulinę. W hodowlach adipocytów TNF- $\alpha$  moduluje przy resztkach seryny fosforylację substratu 1 receptora insulinowego (*Insulin Receptor Substrate*, IRS-1). W insulinooporności indukowanej TNF- $\alpha$  i otyłością, IRS-1 pośredniczy w hamowaniu aktywności kinazy tyrozynowej receptora insuliny (IR) [19]. Stwierdzono, że TNF- $\alpha$  promuje fosforylację i wiązanie się IRS-1 z kinazą-3 fosfatydyloinozytolową [14]. Obecnie nie dysponujemy jednak wystarczającą wiedzą na temat mediatorów szlaku przekazywania sygnałów, które tworzą wzajemną komunikację pomiędzy TNF-R i IR. Ponieważ *in vivo* TNF-R1 i TNF-R2 nie wykazują aktywności kinazy, poszukuje się białek towarzyszących receptorom, które sprzęgają aktywację TNF-R z fosforylacją IRS-1. Szczególnego znaczenia w tym przypadku nabiera kinaza białkowa C (*Protein kinase C*, PKC), która wzmacnia hamujący wpływ TNF- $\alpha$  na przekazywanie sygnałów przez IR w embrionalnych komórkach nerki człowieka [23]. Niedawno wykazano, że izoenzymy PCK ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\beta_1$  i  $\theta$ ) hamują aktywność kinazy IR w sposób zależny od IRS-1 [24]. Z drugiej strony TNF- $\alpha$  może hamować przekazywanie sygnałów IR przez blokowanie fosfatazy białkowej serynowo-treoninowej i/lub pozyskuje aktywność specyficznych białkowych fosfataz tyrozynowych (*Protein Tyrosine Phosphatases*, PTPases) [2]. Rola tych enzymów (zaangażowanych w hamowanie receptora insulinowego poprzez TNF- $\alpha$ ) w patogenezie otyłości i cukrzycy typu 2 pozostaje jednak nadal niewyjaśniona [9, 42].

W insulinooporności indukowanej przez TNF- $\alpha$  może również istotną rolę odgrywać metabolizm sfingolipidów. TNF- $\alpha$  zwiększa stężenie wewnątrzkomórkowych ceramidów. Poddanie komórek działaniu obojętnej sfingomielinazy i syntetycznych analogów ceramidów może naśladować działanie TNF- $\alpha$  na IR i fosforylację substratu-1 receptora insulinowego [22]. Wiadomo, że tworzenie się ceramidów, spełniających funkcję drugiego przekaźnika, reguluje aktywność kinaz serynowo-treoninowych PCK $\xi$  i Raf 1 oraz fosfataz białkowych [28, 30, 43].

Prawdopodobnie jeden lub więcej z tych enzymów może być powiązany z modulacją IRS-1 w odpowiedzi na działanie TNF- $\alpha$ . IRS-1 jest głównym substratem IR ulegającym modulacji biochemicznej [19]. W hodowlach adipocytów długotrwała ekspozycja na działanie TNF- $\alpha$  wpływa na ilościową regulację IR i IRS-1 [62]. Ponadto przez zaangażowanie dodatkowych mediatorów pozakomórkowych wpływa na sekrecję z tkanki tłuszczowej leptyny oraz zmienia poziom FFA.

## TNF- $\alpha$ A WYTWARZANIE LEPTYNY

Leptyna, podobnie jak TNF- $\alpha$  wywiera znaczny wpływ zarówno na metabolizm, jak i na łaknienie [17, 53]. Uważa się, że głównym źródłem krążącej w krwiobiegu leptyny jest tkanka tłuszczowa [16]. Synteza i sekrecja leptyny może być regulowana przez insulinę, glikokortykoidy, glukozaminę oraz cytokiny [56, 68]. W badaniach *in vivo* stwierdzono, że TNF- $\alpha$  zwiększa produkcję leptyny, *in vitro* odnotowano natomiast efekt odwrotny – hamowanie ekspresji genu leptyny i spadek jej produkcji [17, 73]. Brak TNF- $\alpha$  lub TNF-R u otyłych gryzoni wpływa na obniżenie stężenia leptyny w surowicy krwi [57]. Sugeruje to, że w tym przypadku TNF- $\alpha$  pełni rolę kluczowego ogniwa pobudzającego syntezę leptyny. Podobną funkcję przypisuje się cytokinie w otyłości u ludzi, ponieważ wykazano istotny związek pomiędzy stężeniami leptyny, TNF- $\alpha$  i wskaźnikiem masy ciała (*Body Mass Index*, BMI) [37, 52]. Przypuszcza się, że TNF- $\alpha$  poprzez działanie auto- lub parakrynne wykorzystuje leptynę w celu wzmacniania własnych oddziaływań prowadzących do insulinooporności.

Uwalnianie z tkanki tłuszczowej za pośrednictwem TNF- $\alpha$  leptyny może stanowić fragment mechanizmu, który pozwala utrzymać stałą relację pomiędzy leptyną a krążącymi TG. Sugerowano, że w indukowanej przez TNF- $\alpha$  anoreksji występującej w przebiegu stanów zapalnych, może dochodzić do zwiększonej sekrecji leptyny [17, 56]. Okazuje się, że jest to wynik aktywności TNF-R1 [59]. Spowodowane oddziaływaniem TNF- $\alpha$  zwiększone stężenia leptyny nie mają odzwierciedlenia we wzroście ekspresji mRNA leptyny w tkance tłuszczowej [27]. Niezgodność ta była przedmiotem analiz zarówno *in vitro* w hodowlach adipocytów, jak i *in vivo* u otyłych gryzoni i ludzi [27, 52]. Przeprowadzone badania wskazują, że TNF- $\alpha$  działa na etapie potranslacyjnym i prawdopodobnie przez uruchomienie utworzonej wstępnie pewnej puli leptyny.

## TNF- $\alpha$ A BIOSYNTENZA PAI-1

Zarówno w tkance tłuszczowej, jak i we krwi ekspresja inhibitora aktywatora plazminogenu (*Plasminogen Activator Inhibitor*, PAI-1) u osobników otyłych jest podwyższona [11]. Znacznemu obniżeniu ulega w przebiegu kacheksji, gdzie wykazuje silny związek z TNF- $\alpha$ , który w różnych komórkach pobudza biosyntezę PAI-1 [5, 36, 55]. Hamowanie syntezy TNF- $\alpha$  ma z kolei odzwierciedlenie w ograniczeniu ekspresji PAI-1. Potwierdza to istnienie autokrynnego mechanizmu działania TNF- $\alpha$ , który może być szczególnie istotny w etiopatogenezie powikłań wynikających z otyłości. Na zwiększenie biosyntezy PAI-1 poza TNF- $\alpha$  wpływa także TGF $\beta$  (*Transforming Growth Factor Beta*), insulina, TG i FFA, których stężenia (z wyjątkiem TGF $\beta$ ) w otyłości są podwyższone i modulowane przez TNF- $\alpha$  [36].

## TNF- $\alpha$ A RÓŻNICOWANIE ADIPOCYTÓW

Wykazano, że TNF- $\alpha$  jest nie tylko silnym inhibitorem różnicowania adipocytów, ale może także tłumić ekspresję niektórych genów swoistych dla dojrzałych adipocytów obecnych w tkance tłuszczowej [47]. Należy podkreślić, że działanie antyadipogenne TNF- $\alpha$ , polegające na delipidacji nowo powstałych komórek tłuszczowych można odwrócić, podając adipogenne środki, takie jak: dexametazon lub indometacyna [63]. Tak więc różnicowanie adipocytów może być procesem odwracalnym, podlegającym kontroli regulatorów pozytywnych i negatywnych [63].

Wykazano, że TNF- $\alpha$  reguluje ekspresję czynników transkrypcyjnych PPAR $\gamma$  oraz czynników odpowiedzialnych za wczesne stadia powstawania adipocytów, które biorą udział w modulacji transkrypcyjnej kontroli adipogenezy [33]. Wyjaśnia to regulacyjne działanie specyficznych dla tkanki tłuszczowej genów (GLUT 4 i aP2), które mają miejsca wiążące dla PPAR $\gamma$  lub czynników zwiększających wiązanie specyficznego białka. Dane te potwierdzają, że zarówno w hodowlach adipocytów, jak i u zwierząt doświadczalnych, ligandy PPAR $\gamma$ , takie jak: troglitazon i indometacyna, mogą zapobiegać niepożądanym wpływom TNF- $\alpha$  [18, 40]. Ostatnie badania przeprowadzone na makrofagach gryzoni dowodzą jednak, że TNF- $\alpha$  bezpośrednio moduluje syntezę prostaglandyn (PG) na poziomie PGD $_2$  i/lub syntezę PGE $_2$  [12]. Ponieważ PGD $_2$  jest metabolizowana do PGJ $_2$  i jej pochodnych (przypuszczalnych endogennych ligandów dla PPAR $\gamma$ ), można wnioskować, że to na tym szlaku znajduje się główny punkt uchwytu działania TNF- $\alpha$  w adipocytach. W procesie blokowania adipogenezy, brany jest także pod uwagę alternatywny szlak wzajemnego oddziaływania kinaz (z ich kaskadą fosforylacji) z TNF- $\alpha$ .

## TNF- $\alpha$ A APOPTOZA ADIPOCYTÓW

Ostatnio zwrócono uwagę na działanie TNF- $\alpha$  związane z programowaną śmiercią (apoptozą) adipocytów. Pojawiają się doniesienia o cytotoksycznym działaniu cytokiny zarówno na adipocyty, jak i preadipocyty [49]. Wskazuje to, że poza wpływem TNF- $\alpha$  na różnicowanie się adipocytów, możliwa jest także inna funkcja cytokiny, zmierzająca w kierunku normalizowania ilości tkanki tłuszczowej zapobiegając w ten sposób otyłości [45].

Ponieważ oba TNF-R mogą inicjować proces apoptozy, bierze się je pod uwagę w analizie mechanizmów programowanej śmierci adipocytów [7]. Trwają prace nad identyfikacją receptora TNF- $\alpha$  zaangażowanego w apoptozę komórek tkanki tłuszczowej *in vivo* [54]. Rozważa się, czy ten mechanizm działania TNF- $\alpha$  może mieć miejsce w otyłości. Wciąż jest jednak zbyt mało danych dotyczących przenoszenia sygnałów cytotoksycznych.

## PODSUMOWANIE

W warunkach fizjologicznych, a także i w patologicznych TNF- $\alpha$  pełni kluczową rolę w regulacji przemian energetycznych zachodzących w organizmie. Ostatnie doniesienia jednoznacznie wskazują na zaangażowanie cytokiny w metabolizm lipidów i glukozy. Staje się to podstawą do poszukiwania nowych metod leczenia schorzeń metabolicznych, w których etiopatogenezę zaangażowany jest TNF- $\alpha$ .

## LITERATURA

- [1] AGGARWAL BB, NATARAJAN K. Tumor necrosis factors: Developments during the last decade. *Eur Cytokine Netw* 1996; **2**: 93–128.
- [2] AHMAD F, GOLSTEIN BJ. Effect of tumor necrosis factor-alpha on the phosphorylation of tyrosine kinase receptors is associated with dynamic alterations in specific protein-tyrosine phosphatases. *J Cell Biochem* 1997; **64**: 117–127.
- [3] BEYAERT R, FIERS W. Tumor necrosis factor and lymphotoxin. [W] Mire-Sluits AR, Thorpe R, red. *Cytokines*. San Diego - London: Academic Press 1998: 335–360.
- [4] CHEUNG AT, REE D, KOLLS JK, FUSELIER J, COY DH, BRYER-ASH M. An *in vivo* model for elucidation of the mechanism of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-induced insulin resistance: evidence for differential regulation of insulin signaling by TNF-alpha. *Endocrinology* 1998; **139**: 4928–4935.
- [5] CIGOLINI M, TONOLI M, BORGATO L, FRIGOTTO L, MANZATO F, ZEMINIAN S, CARDINALE C, CAMIN M, CHIARAMONTE E, DE SANDRE G, LUNARDI C. Expression of plasminogen activator inhibitor-1 in human adipose tissue: a role for TNF-alpha? *Atherosclerosis* 1999; **143**: 81–90.
- [6] DANDONA P, WEINSTOCK R, THUSU K, ABDELRAHMAN E, ALJADA A, WADDEN T. Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients – fall with weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; **83**: 2907–2910.

- [7] DECLERCQ W, DENECKER G, FIERS W, VANDENABEELE P. Cooperation of both TNF receptors in inducing apoptosis: involvement of the TNF-receptor-associated factor binding domain of the TNF receptor 75. *J Immunol* 1998; **161**: 390–399.
- [8] DESFAITS AC, SERRI O, RENIER G. Normalization of plasma lipid peroxides, monocyte adhesion, and tumor necrosis factor-alpha production in NIDDM patients after gliclazide treatment. *Diabetes Care* 1998; **21**: 487–493.
- [9] DONNELLY R, QU X. Mechanisms of insulin resistance and new pharmacological approaches to metabolism and diabetic complications. *Clin Expt Pharmacol Physiol* 1998; **25**: 79–87.
- [10] DY M, VAZQUEZ A, BERTOGLIO J, THEZE J. General aspects of cytokine properties and functions. [W] Theze J [red.] The cytokine network and immune functions. New York: Oxford University Press 1999: 1–13.
- [11] ERIKSSON P, REYNISDOTTIR S, LONNQVIST F, STEMME V, HAMSTEN A, ARNER P. Adipose tissue secretion of plasminogen activator inhibitor-1 in non-obese and obese individuals. *Diabetologia* 1998; **41**: 65–71.
- [12] FOURNIER T, FADOK V, HENSON PM. Tumor necrosis factor-alpha inversely regulates prostaglandin D2 and prostaglandin E2 production in murine macrophages. Synergistic action of cyclic AMP on cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 synthesis. *J Biol Chem* 1997; **272**: 31065–31072.
- [13] GREENBERG AS, EGAN JJ, WEK SA, GARTY NB, BLANCHETTE-MACKIE EJ, LONDOS C. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of the lipid storage droplets. *J Biol Chem* 1991; **266**: 11341–11346.
- [14] GUO D, DONNER D. Tumor necrosis factor promotes phosphorylation and binding of insulin receptor substrate-1 to phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 1996; **271**: 615–618.
- [15] HADRI KE, COURTALON A, GAUTHEREAU X, CHAMBAUT-GUERIN AM, PAIRAULT J, FEVE B. Differential regulation by tumor necrosis factor-alpha of beta1-, beta2-, and beta3-adrenoreceptor gene expression in 3T3-F442A adipocytes. *J Biol Chem* 1997; **272**: 24514–24521.
- [16] HALAAS JL, FRIEDMAN JM. Leptin and its receptor. *J Endocrinol* 1997; **155**: 215–216.
- [17] HALLE M, BERG A, NORTHOFF H, KEUL J. Importance of TNF-alpha and leptin in obesity and insulin resistance: a hypothesis on the impact of physical exercise. *Exerc Immunol Rev* 1998; **4**: 77–94.
- [18] HAUNER H. The mode of action of thiazolidinediones. *Diabetes Metab Res Rev* 2002; **18** Suppl 2: S10–15.
- [19] HOTAMISLIGIL GS, PERALDI P, BUDAVARI A, ELLIS R, WHITE MF, SPIEGELMAN BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996; **271**: 665–668.
- [20] HOTAMISLIGIL GS. Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1999; **107**: 119–125.
- [21] KAHAN BB. Type 2 diabetes: When insulin secretion fails to compensate for insulin resistance. *Cell* 1998; **92**: 593–596.
- [22] KANETY H, HEMI R, PAPA MZ, KARASIK A. Sphingomyelinase and ceramide suppress insulin-induced tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate-1. *J Biol Chem* 1996; **271**: 9895–9897.
- [23] KELLERER M, MUSHACK J, MISCHAK H, HARING HU. Protein kinase C (PKC) epsilon enhances the inhibitory effect of TNF alpha on insulin signaling in HEK293 cells. *FEBS Lett* 1997; **418**: 119–122.
- [24] KELLERER M, MUSHACK J, SEFFER E, MISCHAK H, ULLRICH A, HARING HU. Protein kinase C isoforms alpha, delta and theta require insulin receptor substrate-1 to inhibit the tyrosine kinase activity of the insulin receptor in human kidney embryonic cells (Hek 293 cells). *Diabetologia* 1998; **41**: 833–838.
- [25] KERN PA, RANGANATHAN S, LI C, WOOD L, RANGANATHAN G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; **280**: E745–751.
- [26] KERN PA, SAGHIZADEH M, ONG JM, BOSCH RJ, DEEM R, SIMSOLO RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 1995; **95**: 2111–2119.
- [27] KIRCHGESSNER TG, UYSAL KT, WIESBROCK SM, MARINO MW, HOTAMISLIGIL GS. Tumor necrosis factor-alpha contributes to obesity-related hyperleptinemia by regulating leptin release from adipocytes. *J Clin Invest* 1997; **100**: 2777–2782.
- [28] LAW B, ROSSIE S. The dimeric and catalytic subunit forms of protein phosphatase 2A from rat brain are stimulated by C2 ceramide. *J Biol Chem* 1995; **270**: 12808–12813.

- [29] LAYNE MD, FARMER SR. Tumor necrosis factor-alpha and basic fibroblast growth factor differentially inhibit the insulin-like growth factor-I induced expression of myogenin in C2C12 myoblasts. *Exp Cell Res* 1999; **249**: 177–187.
- [30] LAZONO J, BERRA E, MUNICO MM, DIAZ-MECO MT, DOMINGUES I, SARZ L, MOSCAT J. Protein kinase C  $\zeta$  (zeta) isoform is critical for  $\kappa$ B-dependent promoter activation by sphingomyelinase. *J Biol Chem* 1994; **269**: 19200–19202.
- [31] LEHMANN JM, LENHARD JM, OLIVER BB, RINGOLD GM, KLIEWER SA. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 1997; **272**: 3406–3410.
- [32] LOFGREN P, VAN HARMELEN V, REYNISDOTTIR S, NASLUNDE E, RYDEN M, ROSSNER S, ARNER P. Secretion of tumor necrosis factor-alpha shows a strong relationship to insulin-stimulated glucose transport in human adipose tissue. *Diabetes* 2000; **49**: 688–692.
- [33] LOFTUS TM, LANE MD. Modulating the transcriptional control of adipogenesis. *Curr Opin Gen Dev* 1997; **7**: 603–608.
- [34] LONG SD, PEKALA PH. Lipid mediators of insulin resistance: ceramide signaling down-regulates GLUT 4 gene transcription in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J* 1996; **319**: 179–184.
- [35] LOPEZSORIANO J, LLOVERA M, CARBON, GARCIA MARTINEZ C, LOPEZSORIANO FJ, ARGILES JM. Lipid metabolism in tumour-bearing mice – studies with knockout mice for tumor necrosis factor receptor 1 protein. *Mol Cell Endocrinol* 1997; **132**: 93–99.
- [36] LOSKUTOFF DJ, SAMAD F. The adipocyte and hemostatic balance in obesity: studies of PAI-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; **18**: 1–6.
- [37] MANTZOROS CS, MOSCHOS S, AVRAMOPOULOS I, KAKLAMANI V, LIOLIOS A, DOULGERAKIS DE, GRIVEAS I, KATSILAMBROS M, FLIER JS. Leptin concentrations in relation to body mass index and the tumor necrosis factor-alpha system in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 3408–3413.
- [38] MEDINA EA, STANHOPE KL, MIZUNO TM, MOBBS CV, GREGOIRE F, HUBBARD NE, ERICKSON KL, HAVEL PJ. Effects of tumor necrosis factor alpha on leptin secretion and gene expression: relationship to changes of glucose metabolism in isolated rat adipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999; **23**: 896–903.
- [39] MEMON RA, FEINGOLD KR, MOSER AH, FULLER J, GRUNFELD C. Regulation of fatty acid transport protein and fatty acid translocate mRNA levels by endotoxin and cytokines. *Am J Physiol* 1998; **37**: E210–E217.
- [40] MILES PD, ROMERO OM, HIGO K, COHEN A, RAFAAT K, OLEFSKY JM. TNF-alpha-induced insulin resistance *in vivo* and its prevention by troglitazone. *Diabetes* 1997; **46**: 1678–1683.
- [41] MOHAMED-ALI V, PINKNEY JH, COPPACK SW. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes* 1998; **22**: 1145–1158.
- [42] MOLLER DE. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 2000; **11**: 212–217.
- [43] MULLER G, STORZ P, BOURTEELE S, DOPPLER H, PFIZENMAIER K, MISCHAK H, PHILIPP A, KAISER C, KOLCH W. Regulation of Raf-1 kinase by TNF via its second messenger ceramide and cross-talk with mitogenic signaling. *EMBO J* 1998; **17**: 732–742.
- [44] MURASE K, ODAKA H, SUZUKI M, TAYUKI N, IKEDA H. Pioglitazone time-dependently reduces tumor necrosis factor-alpha level in muscle and improves metabolic abnormalities in Wistar fatty rats. *Diabetologia* 1998; **41**: 257–264.
- [45] NISOLI E, BRISCINI L, TONELLO C, DEGIUMORGHEN C, CARRUBA MO. Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis in rat brown adipocytes. *Cell Death Diff* 1997; **4**: 771–778.
- [46] PERALDI P, XU M, SPIEGELMAN BM. Thiazolidinediones block tumor necrosis factor-alpha-induced inhibition of insulin signaling. *J Clin Invest* 1997; **100**: 1863–1869.
- [47] PETRUSCHKE T, HAUNER H. Tumor necrosis factor-alpha prevents the differentiation of human adipocyte precursor cells and causes delipidation of newly developed fat cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; **76**: 742–747.
- [48] PFEIFFER A, JANOTT J, MOHLIG M, RISTOW M, ROCHLITZ H, BUSCH K, SCHATZ H, SCHIFFER-DECKER E. Circulating tumor necrosis factor alpha is elevated in male but not in female patients with type II Diabetes Mellitus. *Horm Metab Res* 1997; **29**: 111–114.



- [49] PRINS JB, NIESLER CU, WINTERFORD CM, BRIGHT NA, SIDDLE K, O'RAHILLY S, WALKER NI, CAMERON DP. Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis of human adipose cells. *Diabetes* 1997; **46**: 1939–1944.
- [50] QI C, PEKALA PH. Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in adipocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; **223**: 128–135.
- [51] RAMSAY TG. Fat cells. *Endocrinol Metab Clin N Am* 1996; **25**: 847–870.
- [52] RANGANATHAN S, MAFFEI M, KERN PA. Adipose tissue of mRNA expression in humans: discordance with plasma leptin and relationship with adipose TNF alpha expression. *J Lipid Res* 1998; **39**: 724–730.
- [53] ROURU J, CUSIN I, ZAKRZEWSKA KE, JEANRENAUD B, ROHNER-JEANRENAUD F. Effects of intravenously infused leptin on insulin sensitivity and on the expression of uncoupling proteins in brown adipose tissue. *Endocrinology* 1999; **140**: 3688–3692.
- [54] RUAN H, HACOHEN N, GOLUB TR, VAN PARIJS L, LODISH HF. Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. *Diabetes* 2002; **51**: 1319–1336.
- [55] SAMAD F, UYSAL KT, WIESBROCK SM, PANDEY M, HOTAMISLIGIL GS, LOSKUTOFF DJ. Tumor necrosis factor alpha is a key component in the obesity-linked elevation of plasminogen activator inhibitor 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 6902–6907.
- [56] SARRAF P, FREDERICH RC, TURNER EM, MA G, JASKOWIAK NT, RIVET D JR, FLIER JS, LOWELL BB, FRAKER DL, ALEXANDER HR. Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. *J Exp Med* 1997; **185**: 171–175.
- [57] SCHREYER SA, CHUA JR SC, LEBOEUF RC. Obesity and diabetes in TNF alpha and receptor deficient mice. *J Clin Invest* 1998; **102**: 402–411.
- [58] SETHI JK, HOTAMISLIGIL GS. The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. *Semin Cell Dev Biol* 1999; **10**: 19–29.
- [59] SETHI JK, UYSAL KT, WIESBROCK SM, HOTAMISLIGIL GS. A novel role for tumor necrosis factor receptor 1 as regulator of leptin secretion. *Int J Obes* 1998; **21**: S80.
- [60] SOUZA SC, YAMAMOTO MT, FRANCIOSA MD, LIEN P, GREENBERG AS. BRL 49653 blocks the lipolytic action of tumor necrosis factor-alpha: a potential new insulin-sensitizing mechanism for thiazolidinediones. *Diabetes* 1998; **47**: 691–695.
- [61] SOVZA SC, DEVARGAS LM, YAMAMOTO MT, LIEN P, FRANCIOSA MD, MOSS LG, GREENBERG AS. Overexpression of perilipin A and B blocks the ability of tumor necrosis factor alpha to increase lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 1998; **273**: 24665–24669.
- [62] STEPHENS JM, LEE J, PLICH PF. Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and Glut4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 1997; **272**: 971–976.
- [63] SUL HS, SMAS CM. Positive and negative regulators of adipocyte differentiation. *J Nutr Biochem* 1993; **4**: 554–562.
- [64] SZALKOWSKI D, WHITE-CARRINGTON S, BERGER J, ZHANG B. Antidiabetic thiazolidinediones block the inhibitory effect of tumor necrosis factor-alpha on differentiation, insulin-stimulated glucose uptake, and gene expression in 3T3-L1 cells. *Endocrinology* 1995; **136**: 1474–1481.
- [65] TANG Y, OSAWA H, ONUMA H, NISHIMIYA T, OCHI M, MAKINO H. Improvement in insulin resistance and the restoration of reduced phosphodiesterase 3B gene expression by pioglitazone in adipose tissue of obese diabetic KKAY mice. *Diabetes* 1999; **48**: 1830–1835.
- [66] TERLIKOWSKI S, SULKOWSKI S. Czynniki martwicy nowotworów- $\alpha$  w komórkach żeńskiego układu rozrodczego. *Post Biol Kom* 1997; **24**: 449–468.
- [67] TERLIKOWSKI SJ. Tumour necrosis factor and cancer treatment: a historical review and perspectives. *Ann Acad Med Bial* 2001; **46**: 5–18.
- [68] UR E, GROSSMAN A, DESPERS JP. Obesity results as a consequence of glucocorticoid induced leptin resistance. *Horm Metab Res* 1996; **28**: 744–747.
- [69] UYSAL KT, WIESBROCK SM, HOTAMISLIGIL GS. Functional analysis of TNF receptors in TNF-alpha-mediated insulin resistance in genetic obesity. *Endocrinology* 1998; **139**: 4832–4838.
- [70] UYSAL KT, WIESBROCK SM, MARINO MW, HOTAMISLIGIL GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 1997; **389**: 610–614.
- [71] WIEMANN B, STARNES CO. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmac Ther* 1994; **64**: 529–564.

- [72] XU H, HIROSUMI J, UYSAL KT, GULER AD, HOTAMISLIGIL GS. Exclusive action of transmembrane TNF alpha in adipose tissue leads to reduced adipose mass and local but not systemic insulin resistance. *Endocrinology* 2002; **143**: 1502–1511.
- [73] YAMAGUCHI M, MURAKAMI T, TOMIMATSU T, NISHIO Y, MITSUDA N, KANZAKI T, KURACHI H, SHIMA K, AONO T, MURATA Y. Autocrine inhibition of leptin production by tumor necrosis factor-alpha through TNF-alpha receptor 1 *in vitro*. *Biochem Biophys Res Comm* 1998; **244**: 30–34.
- [74] ZHANG M, TRACEY KJ. Tumor necrosis factor. [W] Thomson AW, [red.] The cytokine handbook. San Diego – London: Academic Press 1998: 517–548.

*Redaktor prowadzący – Maciej Zabel*

*Otrzymano: 05.12.2002 r.*

*Przyjęto: 17.01.2003 r.*

*ul. M.C. Skłodowskiej 24A, 15-276 Białystok*

## MOLEKULARNE PODŁOŻE ZESPOŁU ALAGILLE’A\*

### MOLECULAR BASIS OF ALAGILLE SYNDROME

Dorota JURKIEWICZ, Ewa POPOWSKA, Małgorzata KRAJEWSKA-WALASEK

Zakład Genetyki Medycznej, Instytut “Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”,  
Warszawa

*Streszczenie:* Zespół Alagille’a (AGS), choroba dziedzicząca się w sposób autosomalny dominujący, występuje z częstością 1 : 70 000 żywych urodzeń. Za występowanie zespołu Alagille’a odpowiedzialny jest gen *JAG1*, kodujący ligand dla receptora Notch biorącego udział w silnie konserwowanym mechanizmie przekazywania sygnału między komórkami. Do tej pory zidentyfikowano 193 różne mutacje (delecje, insercje, tranzycje i transwersje) w genie *JAG1*. Za patogenezę AGS prawdopodobnie odpowiedzialna jest częściowa utrata funkcji genu i/lub dominujący negatywny wpływ uszkodzonego białka *JAG1*. U pacjentów z AGS dotychczas nie stwierdzono znaczącej korelacji pomiędzy genotypem a fenotypem choroby.

*Słowa kluczowe:* zespół Alagille’a, AGS, gen *JAG1*, białko *JAG1*, mutacje, sygnalizacja Notch.

*Summary:* Alagille syndrome (AGS) is a congenital disorder with autosomal dominant inheritance. It occurs with a frequency 1 : 70 000 births. The *JAG1* gene, responsible for AGS, codes a ligand for a Notch receptor involved in a highly conserved process of signal transmission between cells. Up to now 193 different mutations (deletions, insertions, transitions and transversions) have been identified in the *JAG1* gene. Probably the haploinsufficiency and/or the dominant negative effect are mechanisms involved in AGS pathogenesis. There is no significant correlation between genotype and phenotype of AGS patients.

*Key words:* Alagille syndrome, AGS, *JAG1* gene, *JAG1* protein, mutations, Notch signaling.

\*Praca częściowo przygotowana w ramach Grantu Statutowego IP-CZD nr S73/99 i Subsydium FNP 2000 nr 6/2000.

## WPROWADZENIE

Zespół Alagille'a (ang. *Alagille syndrome, arteriohepatic dysplasia, syndromic paucity of interlobular bile ducts*, AGS [MIM 118450]) jest wieloukładowym zespołem zaburzeń rozwojowych. Został on po raz pierwszy opisany w 1975 roku przez Alagille'a [2]. AGS charakteryzuje się występowaniem zaburzeń w budowie wątroby, serca, nerek i trzustki. Kryterium diagnostycznym jest występowanie skąpości dróg żółciowych w połączeniu z trzema z pięciu głównych cech klinicznych, takich jak: cholestaza wewnątrzwątrobowa, wady serca, wady kręgosłupa (najczęściej tzw. kręgi motyle), wady narządu wzroku (*embryotoxon posterior* – uwydatnienie linii Schwalbego) oraz charakterystyczny wygląd twarzy [1]. AGS występuje z częstością 1: 70 000 żywych urodzeń. Badania całych rodzin z AGS ujawniły, że zespół ten dziedziczy się w sposób autosomalny dominujący z 94% penetracją oraz niezwykle wysoką zmiennością ekspresji objawów u poszczególnych osób [10]. Obserwuje się przypadki uszkodzenia wątroby lub serca w stopniu zagrażającym życiu, jak również występowanie tylko łagodnych objawów (zmiany wyglądu twarzy, występowanie kręgów motyli) oraz postaci bezobjawowe. Śmiertelność chorych z AGS szacuje się na 10–20%, przy czym może być ona spowodowana wadami zarówno wątroby, jak i serca [13]. Zespół Alagille'a jest jedną z najczęstszych przyczyn cholestazy wewnątrzwątrobowej niemowląt.

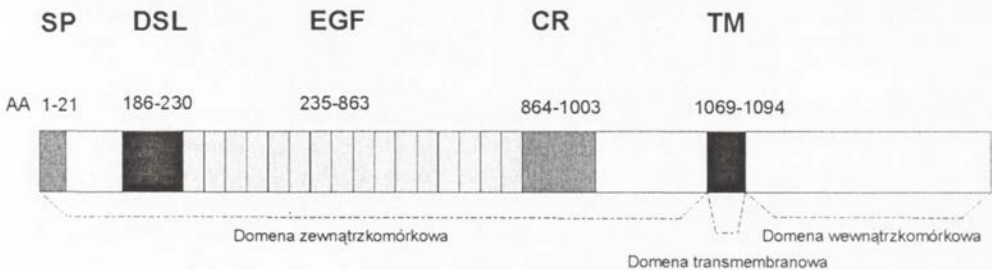
## GEN *JAG1* ODPOWIEDZIALNY ZA AGS

Pojawiające się od 1986 roku doniesienia wskazały na występowanie u chorych z AGS delecji interstycjalnych na krótkim ramieniu chromosomu 20, mapujących się w regionie p11.2-p12 [6, 3]. Analiza sprzężeń wykonana na trzypokoleniowej rodzinie potwierdziła, że region ten może być odpowiedzialny za występowanie choroby [19]. Ponieważ częstość występowania mikrodelecji na krótkim ramieniu chromosomu 20 u pacjentów z AGS jest niewielka, od początku sugerowano, że choroba jest wywołana przez mutacje pojedynczego genu, a nie delecje zespołu genów.

W roku 1997 w regionie 20p12 został zidentyfikowany ludzki gen *JAG1*, będący homologiem szczurzego genu *jagged1* [28]. Gen *JAG1* obejmuje 36 kpz (tysięcy par zasad) i składa się z 26 egzonów, których wielkość waha się od 28 pz do 2284 pz. Sekwencja kodująca (cDNA) obejmuje łącznie 5942 pz. Długość intronów wynosi od 89 pz do około 9 kpz [27, 23].

## PRODUKT BIAŁKOWY GENU *JAG1*

Gen *JAG1* koduje białko JAG1, składające się z 1218 aminokwasów [28]. Białko zawiera kilka silnie konserwowanych regionów [25]. W obrębie domeny zewnątrzkomórkowej utworzonej przez aminokwasy w pozycjach 1–1068 jest to peptyd sygnałny (SP), region DSL (jego nazwa pochodzi od konserwowanych regionów w genach *delta* i *serrate* u *Drosophila melanogaster* i *lag2* u *Caenorhabditis elegans* [25]), obszar 16 powtórzeń typu EGF (ang. *epidermal growth factor*) oraz region bogaty w cysteinę (CR). Konserwowaną budowę ma także domena transmembranowa (TM) zbudowana z aminokwasów w pozycjach 1069–1094, natomiast domena wewnątrzkomórkowa, utworzona z aminokwasów w pozycjach 1095–1218, nie jest ewolucyjnie konserwowana (ryc.1).



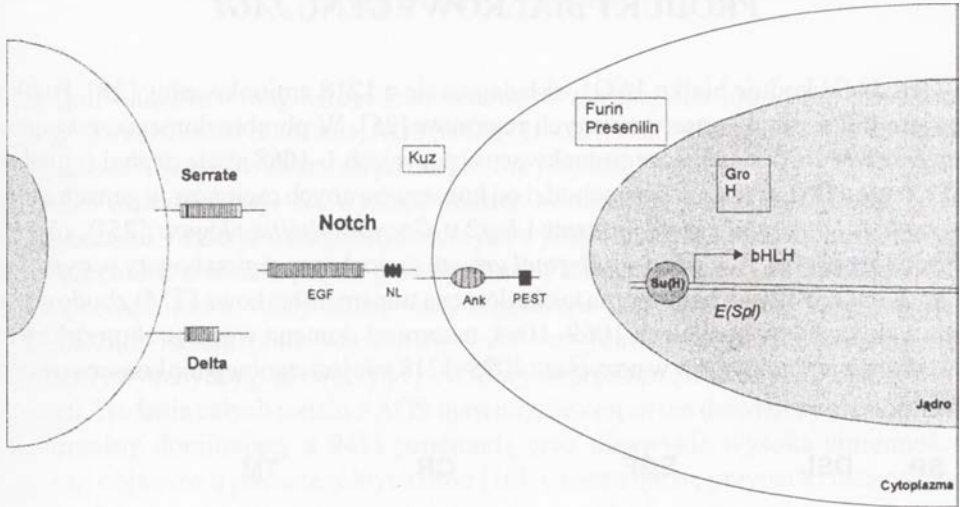
RYCINA 1. Schemat budowy białka JAG1, oznaczenia: SP – peptyd sygnałny, DSL – region Delta-Serrate-Lag2, EGF – region 16 powtórzeń typu EGF, CR – region bogaty w cysteinę, TM – domena transmembranowa, AA – aminokwasy

Budowa ludzkiego białka JAG1 wykazuje 92% homologii z białkiem Jagged1 szczura, 41% homologii z białkiem Serrate i 34% homologii z białkiem Delta *Drosophila melanogaster* [23].

Białko JAG1 występuje w wielu dojrzałych tkankach i narządach, takich jak: żołądek, tarczyca, rdzeń kręgowy, węzły chłonne, tchawica, nadnercza, szpik kostny, serce, łożysko, płuca, mięśnie szkieletowe, nerki i trzustka. U płodu białko JAG1 zostało wykryte w nerce, płucach, mózgu i wątrobie. Nieprawidłowości w budowie i funkcjonowaniu serca, wątroby, płuc i nerek, obserwowane u pacjentów z zespołem Alagille'a, wskazują na pełnienie przez białko JAG1 ważnej roli w prawidłowym rozwoju tych narządów [23].

## ROLA BIAŁKA JAG1 W SYGNALIZACJI NOTCH

Białko JAG1 jest ligandem dla receptora Notch, biorącego udział w silnie konserwowanym mechanizmie przekazywania sygnału między komórkami (ang. *Notch signaling pathway*). Sygnalizacja Notch kontroluje proces różnicowania komórek



RYCINA 2. Proponowany schemat procesu przekazywania sygnału międzykomórkowego przez receptor Notch, oznaczenia: Serrate, Delta – ligandy, Notch – receptor, Kuz – metaloproteaza Kuzbanian, Presenilin – presenilina, Furin – konwertaza furynowa, Su(H) – czynnik transkrypcyjny, Gro – białko jądrowe Groucho, H – białko jądrowe Hairless, *E(Spl)* – kompleks genów, bHLH – białka jądrowe typu heliks-pętla-heliks

podczas embriogenezy oraz w czasie dalszych etapów rozwoju organizmu [5]. Droga sygnałowa Notch jest uniwersalna dla wszystkich organizmów kręgowych i bezkręgowych, a najlepiej została poznana u muszki *Drosophila melanogaster* i nicienia *Caenorhabditis elegans*. Gen kodujący receptor Notch wykryto u muszki owocowej na podstawie obserwacji powstania charakterystycznych nacięć na skrzydełkach (w jęz. angielskim „notch” oznacza „nacięcie”) przy częściowej utracie funkcji tego genu (ang. *haploinsufficiency*). Całkowita utrata funkcji genu *Notch* prowadzi do hipertrofii układu nerwowego i śmierci muszki owocowej, co wynika z braku zdolności prawidłowego różnicowania komórek prekursorowych.

Gen *Notch* koduje receptor transmembranowy o wielkości 300 kDa. Duża zewnątrzkomórkowa domena receptora obejmuje 36 powtórzeń EGF i 3 powtórzenia Notch/LIN-12 (NL) bogate w cysteinę. Domena wewnątrzkomórkowa zawiera 6 powtórzeń ankyrynowych (Ank), obszar bogaty w glutaminę oraz sekwencję PEST (ryc. 2). Przy przekazywaniu sygnału przez receptor Notch oraz regulacji poszczególnych etapów procesu uczestniczy wiele białek. Mechanizm całego procesu został najlepiej poznany u muszki owocowej. Zewnątrzkomórkowe domeny dwóch transmembranowych ligandów Delta i Serrate oddziałują z zewnątrzkomórkową domeną receptora Notch, zlokalizowanego na sąsiedniej komórce. Receptor Notch prezentowany jest na powierzchni komórki w formie heterodimeru, który powstaje w wyniku proteolitycznego cięcia przez konwertazę furynową (ang. *Furin convertase*) na terenie aparatu Golgiego. Po związaniu się ligandów z receptorem Notch następuje odcięcie

domeny zewnątrzkomórkowej w wyniku działania metaloproteazy Kuzbanian (Kuz). Następnie presenilina dokonuje proteolitycznego cięcia w obrębie domeny transmembranowej, w wyniku czego wewnątrzkomórkowa domena receptora oddziela się od błony komórkowej i przemieszcza się do jądra komórkowego, gdzie dwa jej regiony oddziałują z czynnikiem transkrypcyjnym Su(H) (ang. *Suppressor of Hairless*). W wyniku aktywacji czynnik transkrypcyjny Su(H) wiąże się do regulatorowej sekwencji kompleksu genów *E(spl)* (ang. *Enhancer of split*) i wzmacnia ich ekspresję [26]. Geny *E(spl)* kodują białka typu heliks-pętla-heliks (bHLH), które wpływają na regulację wielu genów istotnych dla rozwoju organizmu. Na przykład białka bHLH razem z czynnikiem Groucho mogą hamować ekspresję genów *Ac-Sc* (ang. *Achaete-Scute*), uczestniczących w różnicowaniu się neuronowych i epidermalnych linii komórkowych. Omówiona powyżej podstawowa droga przekazywania sygnału zależy od wielu dodatkowych czynników. Na poziomie zewnątrzkomórkowym jest to białko Fng (ang. *Fringe*), będące negatywnym regulatorem ligandu Serrate. Natomiast cytoplazmatyczne białka Deltex, Disheveled, Disabled i Numb (oraz omówione powyżej jądrowe białka Hairless (H) i Su(H)) oddziałują z wewnątrzkomórkową domeną receptora Notch, głównie z rejonem powtórzeń ankyrynowych. Uważa się, że podstawowym czynnikiem regulującym przekazywanie sygnału Notch jest białko Su(H), którego aktywność może być negatywnie regulowana przez białko Hairless [5].

Interakcje między receptorem i ligandem zachodzą w obszarze powtórzeń EGF receptora Notch oraz konserwowanego regionu DSL w zewnątrzkomórkowej domenie ligandu. Stwierdzono, że tylko dwa z 36 powtórzeń EGF (powtórzenie 11 i 12) są niezbędne do zainicjowania interakcji z ligandami Delta lub Serrate. Pozostała część zewnątrzkomórkowej domeny receptora Notch prawdopodobnie zawiera miejsca wiązania dla innych ligandów, co czyniłoby Notch wielofunkcyjnym receptorem i tłumaczyłoby plejotropowość jego działania [4].

Kierunek różnicowania komórkowego jest kontrolowany przez receptor Notch na poziomie sąsiadujących ze sobą komórek. Funkcja, jaką przyjmują przyległe komórki, zależy od poziomu ekspresji ligandu i receptora. W danej komórce ekspresji może ulegać zarówno Notch, jak i Delta. Komórka, produkująca większą ilość ligandu Delta niż sąsiednia komórka, będzie pełniła rolę „sygnałową”. Badania przeprowadzone na *Drosophila melanogaster* wykazały istnienie regulacji zwrotnej między białkami Notch i Delta. Stwierdzono, że wzrost aktywności receptora Notch w danej komórce redukuje produkcję ligandu Delta [20]. Zmniejszenie tworzenia Delta następuje przez omówioną powyżej aktywację genów *E(spl)* z udziałem supresora Su(H). Mechanizm regulacji zwrotnej umożliwia zwiększenie początkowo małych różnic w ekspresji Delta i Notch oraz przyjęcie przez komórkę określonej funkcji. Poziom białek Delta i Notch, niezbędny do skierowania komórek prekursorowych na określoną drogę rozwojową, może być różny w zależności od typu komórek i ich stanu metabolicznego.

Sygnalizacja Notch uczestniczy w niezwykle szerokim spektrum procesów zachodzących w organizmach zarówno kręgowych, jak i bezkręgowych. U kręgowców brak sygnalizacji Notch związany jest z występowaniem różnych typów nowotworów, zaburzeniami neurogenezy, formacji somitów i angiogenezy [11, 16]. Sygnalizacja

Notch, poza wpływem na różnicowanie komórkowe, bierze udział w proliferacji komórek i apoptozie. Różnorodność procesów, na które wpływa białko Notch wskazuje, że droga sygnalizacji Notch nie tylko jest regulowana przez różne czynniki zewnątrzkomórkowe i wewnątrzkomórkowe, lecz także musi współdziałać z innymi ścieżkami sygnałowymi.

U człowieka zidentyfikowano 4 geny (*Notch1*, 2, 3 i 4), kodujące receptor Notch i trzy geny (*JAG1*, *JAG2* i *H-Delta-1*) kodujące homologi ligandów Delta i Serrate. Gen *JAG1* został zmapowany na chromosomie 20p11-12, *JAG2* na 14q32, a *H-Delta-1* na chromosomie 6q27 [15]. Do tej pory nie wiadomo, która forma Notch oddziałuje z ligandem *JAG1*. Badania u szczura wykazały, że w zależności od czasu i lokalizacji, białka *JAG1* mogą współdziałać z każdą formą receptora Notch [24].

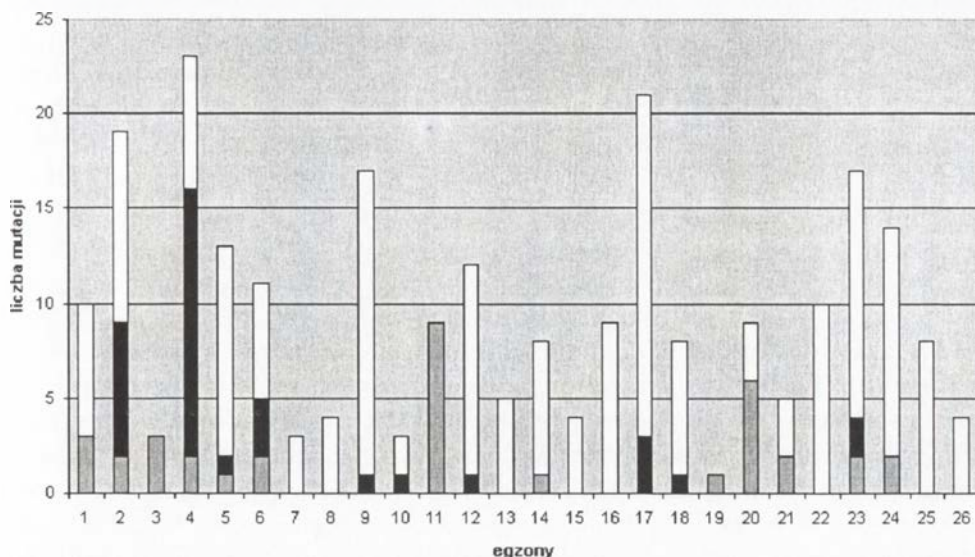
Zaburzenia w ścieżce sygnałowej Notch stwierdzono w kilku chorobach: zespole Alagille'a, białaczce typu T oraz zespole CADASIL (ang. *cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy*) [12]. U pacjentów z zespołem Alagille'a stwierdzono obecność mutacji w genie *JAG1*, głównie w rejonie kodującym zewnątrzkomórkowe fragmenty ligandu. U chorych na białaczkę wykryto translokację w genie *Notch1*, natomiast u 90% pacjentów z zespołem CADASIL zaobserwowano mutacje w genie *Notch3* [21]. Zarówno *Notch 1* i 2, jak również *JAG1*, *JAG2* i *H-Delta-1* ulegają nadmiernej ekspresji w komórkach raka szyjki macicy.

## MUTACJE W GENIE *JAG1*

Badania przeprowadzone w Europie, Stanach Zjednoczonych, Australii i Japonii wykazały obecność 193 różnych mutacji w genie *JAG1* u 250 chorych z zespołem Alagille'a [7, 8, 9, 18, 22, 23, 28, 29, 30, 35, 36]. W małej grupie pacjentów z AGS (3–7% w zależności od populacji) wykryto delecje całego genu *JAG1* [7, 8, 22]). Wśród zidentyfikowanych mutacji wewnątrzgenowych u 33% pacjentów występują delecje, u 21% insercje, u 1% delecje połączone z insercjami, u 26% transycje i u 19% transwersje. Ponad 2/3 wszystkich przypadków choroby (180/250) wynika z mutacji prowadzących do powstania kodonu terminacyjnego, co ósmy chory (34/250) ma mutację powodującą zmianę informacji kodonu, natomiast co siódmy chory (36/250) ma mutację prowadzącą do zaburzeń w prawidłowym składaniu genu. Mutacje rozproszone są wzdłuż całego genu. Około 40% mutacji występuje w pięciu egzonach 2, 4, 9, 17, i 23, których łączna długość stanowi 28% kodującego regionu genu *JAG1* (ryc. 3). Kolejne 25% mutacji występuje w sześciu innych egzonach 1, 5, 6, 12, 20 i 24. Powyższe dane wskazują, że około 65% mutacji zostało zidentyfikowanych w 11 egzonach genu *JAG1*.

Większość mutacji (171) jest unikatowa i specyficzna dla danej rodziny, a jedynie 22 mutacje zostały zidentyfikowane u kilku lub kilkunastu niespokrewnionych pacjentów. Do najczęściej powtarzających się mutacji należą: 4-nukleotydomowa delecja





RYCINA 3. Różne typy mutacji zidentyfikowane w genie *JAG1*, oznaczenia: □ – mutacje zmieniające ramkę odczytu i terminacyjne, ■ – mutacje zmieniające informację kodonu, ▒ – mutacje zaburzające wycinanie intronów

w egzonie 17 (2122-2125delCAGT) wykryta u 11 pacjentów, podstawienie 703C>T w egzonie 5 (R235X) u 10 pacjentów, wstawienie pojedynczego nukleotydu C w egzonie 9 (1205-1206insC) u 5 pacjentów, 2-nukleotydomowa delecja w egzonie 12 (1485-1286delCT) u 4 pacjentów oraz substytucja w intronie 11 (1395+3A>G) u 4 pacjentów i delecja w intronie 20 (2458+2delTAAG) u 4 pacjentów.

Ponad 70% chorych ma mutacje powodujące przedwczesne pojawienie się kodonu terminacyjnego i translację skróconego białka. Są to mutacje typu „stop kodon”, delecje, insercje oraz delecjo-insercje. Mutacje te usytuowane są wzdłuż całego genu, z wyjątkiem egzonów 3, 11 i 19. W zależności od lokalizacji, mutacje terminacyjne mogą prowadzić do utraty części lub całej domeny zewnątrzkomórkowej, domeny transmembranowej i domeny wewnątrzkomórkowej. Utrata domeny transmembranowej uniemożliwia zakotwiczenie ligandu *JAG1* w błonie komórkowej. Całkowitą utratę możliwości tworzenia produktu białkowego zaobserwowano u pacjenta z insercją w kodonie 1 egzonu 1 (3GC>TT), która zaburza sekwencję kodonu startowego i uniemożliwia rozpoczęcie translacji [7]. Przewiduje się, że znacznie skrócone białko będzie tworzone u chorego z delecją nukleotydów AG w pozycji 693-694 w egzonie 4. Dwunukleotydomowa delecja prowadzi do przesunięcia ramki odczytu począwszy od kodonu 231 (na końcu domeny DSL), co powoduje wprowadzenie przedwczesnego sygnału stop w kodonie 240 [23]. Podobnie tranzycja 703C>T w egzonie 5, prowadząca do powstania kodonu terminacyjnego w pozycji 235 (region EGF1) spowoduje tworzenie skróconego białka pozbawionego 984 aminokwasów, a mającego jedynie domenę DSL i 5 pierwszych aminokwasów z regionu powtórzeń EGF. Natomiast 5-nukleotydomowa insercja (2694-2695insGTGGC) w egzonie 23, powodująca pojawienie się kodonu

stop w pozycji 945 (domena CR), spowoduje powstanie białka pozbawionego 274 aminokwasów, wchodzących w skład części domeny CR, domeny TM i domeny wewnątrzkomórkowej. Powstający w wyniku mutacji polipeptyd zawiera całą domenę DSL i powtórzenia typu EGF oraz 1/3 domeny CR i odcinek zawierający 47 niespecyficznych aminokwasów (będący rezultatem przesunięcia ramki odczytu).

Dotychczas zidentyfikowano 27 różnych mutacji zaburzających prawidłowe składanie genu (ang. *splice site mutations*). Najwięcej tego typu zmian występuje w intronie 11 oraz intronie 20. Nieprawidłowe wycinanie intronów jest spowodowane zarówno przez punktowe podstawienia w silnie konserwowanej sekwencji GT w regionie donorowym (np. 886+2T>G w intronie 6, 2916+1G>C w intronie 23) lub sekwencji AG w regionie akceptorowym intronu (np. 695-2A>G w intronie 4, 2459-1G>C w intronie 20), jak i kilkunukleotydowe delecje obejmujące swym zasięgiem sekwencje konserwowane intronu (np. 1395+4 del8 w intronie 11, 2458+2 delTAAG w intronie 20). Mutacje w konserwowanych rejonach intronów prowadzą zazwyczaj do usunięcia sąsiadującego egzonu i w konsekwencji do syntezy skróconego białka. Na przykład tranzycja A>G w pozycji +3 intronu 11 prowadzi do usunięcia egzonu 11, co powoduje przesunięcie ramki odczytu i pojawienie się kodonu terminacyjnego w pozycji 469. Przewiduje się, że będzie syntetyzowany polipeptyd skrócony o 749 aminokwasów [18]. Konsekwencją mutacji typu *splice site* może też być utworzenie nowego regionu akceptorowego. Na przykład duplikacja 8 nukleotydów TTTTAGGG, obejmujących sekwencję na granicy intronu 23 i egzonu 24, i ich insercja w pozycji 2918-2919 na początku egzonu 24 prowadzi do powstania dłuższego transkryptu zawierającego 8 niespecyficznych nukleotydów, co powoduje syntezę nieprawidłowego białka skróconego o 245 aminokwasów i mającego w swym końcowym fragmencie 12 niespecyficznych aminokwasów [30].

W opisanej grupie pacjentów z AGS zidentyfikowano 29 różnych mutacji, powodujących zmianę informacji kodonów (ang. *missense mutations*), które są zlokalizowane w regionach istotnych dla prawidłowego funkcjonowania kodowanego białka JAG1. Około 50% tego typu mutacji wykryto w obrębie domeny DSL (4 mutacje) i w obszarze pomiędzy peptydem sygnałnym a domeną DSL (13 mutacji). Fakt, że wykryto dużą liczbę mutacji typu *missense* w tym regionie, jest zgodny ze znaną doniosłą rolą regionu DSL w działaniu białka Jagged1. Eksperymenty przeprowadzone na myszach wykazały, że region DSL jest niezbędny podczas wiązania białka Jagged1 do receptora Notch2. Mutacje zmiany sensu najczęściej dotyczą konserwowanego aminokwasu w pozycji 184 (egzon 4), który jest usytuowany tuż koło domeny DSL (od strony 5'). We wszystkich analizowanych gatunkach w pozycji tej występuje arginina. Ważna rola argininy (R-184) wynika z jej położenia w regionie obejmującym aminokwasów 184-192 [RVTCTDDYYY], w którym następuje fosforylacja tyrozyny (Y). Potranslacyjna fosforylacja tyrozyny jest prawdopodobnie istotna dla prawidłowego funkcjonowania białka JAG1 [18]. W kodonie 184 wykryto 4 różne substytucje, powodujące zamianę argininy na glicynę (550C>G), cysteinę (550C>T), leucynę (551G>T) i histydynę (551G>A). Wykazano, że efektem mutacji prowadzącej do podstawienia argininy przez histydynę jest nieprawidłowa glikozylacja białka JAG1, co powoduje, że uszkodzone

białko jest akumulowane w retikulum endoplazmatycznym i nie jest transportowane na powierzchnię błony komórkowej [26]. Poza omówionymi powyżej substytucjami występują też inne mutacje zlokalizowane między peptydem sygnałnym a domeną DSL lub w samej domenie DSL, na przykład tranzycje 110T>C (L37S) i 379G>A (A127T) w egzonie 2 lub transwersje 233G>C (C78S) w egzonie 2 i 685T>G (C229G) w egzonie 4.

Spośród pozostałych 50% mutacji typu zmiany sensu kodonu, dziesięć wykryto w regionie powtórzeń typu EGF i dwie w regionie bogatym w cysteinę. Główną funkcją regionu EGF jest pośredniczenie w interakcjach typu białko - białko. Region EGF zawiera 6 konserwowanych pozycji cysteinowych, które tworzą wiązania dwusiarczkowe w układzie 1-3, 2-4 i 5-6 [31]. Ten układ wiązań jest obecny w każdym z powtórzeń typu EGF. Większość omawianych mutacji w tym rejonie prowadzi do utraty reszt cysteinowych w ich konserwowanych pozycjach (np. substytucja 851G>T powoduje włączenie fenyloalaniny w miejsce cysteiny-284, a substytucja 2191T>A włączenie seryny w miejsce cysteiny-731). Zmiany te powodują zerwanie wiązań dwusiarczkowych i destabilizację struktury białka JAG1. W białku JAG1 i receptorach Notch znajdują się powtórzenia typu EGF wiążące jony wapnia  $Ca^{2+}$  (cbEGF), które wymagają obecności tych jonów do zachowania biologicznej aktywności [31]. Fakt zidentyfikowania różnych mutagennych substytucji w domenach cbEGF (np. tranzycji 1156G>A powodującej podstawienie glicyny-386 przez argininę) daje podstawy przypuszczeniom, że omawiane aminokwasy i ich usytuowanie odgrywają istotną rolę w procesie wiązania wapnia i prawdopodobnie w procesie oddziaływania pomiędzy ligandem a receptorem [18].

W genie *JAG1* zidentyfikowano też występowanie 18 substytucji, które mają charakter zmian polimorficznych i nie prowadzą do zaburzenia struktury kodowanego białka. Najczęściej są to podstawienia nukleotydu w trzeciej pozycji kodonu, które nie wprowadzają zmiany informacji danego kodonu (ang. *silent mutation*). Najwięcej substytucji polimorficznych wykryto w egzonie 2. Zmiany polimorficzne wynikają najczęściej z tranzycji C>T, np. w pozycji 105 (Phe35) w egzonie 2, w pozycji 1389 (Ser463) w egzonie 11, w pozycji 2382 (Ser794) w egzonie 20. Zdarzają się także inne tranzycje, np. T>C w pozycji 765 (Tyr255) w egzonie 6, G>A w pozycji 1707 (Thr569) w egzonie 13. Zidentyfikowano także transwersje, np. G>T w pozycji 270 (Gly90) w egzonie 2 lub A>C w pozycji 2214 (The738) w egzonie 17. Tylko dwie z 18 opisanych zmian polimorficznych, wynikające z podstawienia 2231G>A (R744Q) w egzonie 18 i podstawienia 2612C>G (P871R) w egzonie 22, powodują wprowadzenie innego aminokwasu podczas translacji. Wszystkie omówione zmiany polimorficzne zostały wykryte w kodującej sekwencji genu *JAG1* i występowały zarówno u zdrowych niespokrewnionych osób, członków rodziny pacjenta, którzy nie wykazywali objawów chorobowych, jak i u chorych pacjentów ze zidentyfikowaną mutacją wywołującą AGS [22, 8, 30].

mozaikowatości [17]. W zespole Alagille'a częstość mozaikowatości szacuje się na co najmniej 8% [14]. Liczba wykrytych przypadków mozaikowatości może być zaniżona, gdyż badania są prowadzone głównie na leukocytach, gdzie stopień mozaikowatości komórek jest niski, natomiast dostęp do innych tkanek pacjenta jest ograniczony. Mozaikowatości komórkowej najczęściej towarzyszą łagodne objawy chorobowe. Fakt występowania mozaikowatości komórek i możliwość wystąpienia mozaikowatości germinalnej należy uwzględnić w poradnictwie genetycznym przy określaniuprawdopodobieństwa ponownego wystąpienia przypadku AGS w danej rodzinie.

Mutacje w genie *JAG1* zostały zidentyfikowane tylko u 60–75% pacjentów z klinicznie rozpoznanymi objawami zespołu Alagille'a. Występowanie mozaikowatości w AGS i pewne trudności w jej identyfikacji mogą stanowić jedną z przyczyn niewykrycia mutacji u wszystkich pacjentów z podejrzeniem zespołu Alagille'a. Inną przyczyną tego faktu może być zastosowanie do wstępnego poszukiwania mutacji w genie *JAG1* metody SSCP (ang. *single strand conformation polymorphism*), która umożliwia wykrycie jedynie 80–90% istniejących zmian. Duży procent chorych bez wykrytych mutacji w genie *JAG1* może wynikać też z możliwości wystąpienia zmian w rejonach niepoddanych badaniu, np. sekwencjach regulatorowych (5' i 3') genu i w wewnętrznych sekwencjach intronowych. W ujawnieniu objawów AGS nie można też wykluczyć udziału innych genów, które pełnią funkcję w procesie sygnalizacji Notch [8].

## ZALEŻNOŚĆ MIĘDZY GENOTYPEM A FENOTYPEM

Badania wpływu genotypu na prezentowane objawy choroby nie przyniosły jednoznacznych wyników. Większość badaczy nie stwierdziła znaczącej korelacji między genotypem a fenotypem pacjentów z AGS. Według ich obserwacji ta sama mutacja może być związana z występowaniem bardzo różnorodnych objawów klinicznych, nawet w obrębie jednej rodziny. Na przykład pacjent z łagodną formą AGS przekazał mutację w intronie 11 (1395+3A>G) córce, która urodziła się z ostrymi objawami AGS i wymagała transplantacji wątroby. Druga córka pacjenta, mająca taką samą mutację, prezentowała jedynie łagodne symptomy choroby w postaci szmeru serca [18]. Zmienność ekspresji objawów choroby u osób z taką samą mutacją pozwala na wysunięcie hipotezy, że fenotyp pacjentów z AGS może zależeć nie tylko od rodzaju mutacji w genie *JAG1*, lecz także od całości tzw. tła genetycznego pacjenta.

Ostatnio ukazała się praca [35] donosząca o istnieniu pewnej korelacji między genotypem a fenotypem. Postuluje się w niej, że stopień uszkodzenia wątroby u pacjentów z AGS zależy od stopnia uszkodzenia domeny DSL w białku *JAG1*. Hipoteza ta opiera się na obserwacji, że mutacje powodujące utratę domeny DSL zostały zidentyfikowane w grupie pacjentów z bardzo ciężkimi uszkodzeniami wątroby (wymagających transplantacji tego organu), natomiast nie wykryto mutacji powodujących zmiany w budowie domeny DSL w grupie pacjentów z łagodniejszymi

## PRZYCZYNY WYSTĘPOWANIA ZESPOŁU ALAGILLE’A

Dotychczasowe badania wykazały, że mutacje w genie *JAG1* mogą być jedyną lub główną przyczyną wystąpienia objawów zespołu Alagille’a. Rozpatrywane są dwa potencjalne mechanizmy tłumaczące ujawnienie się choroby. Jednym z nich jest dominujący negatywny wpływ tworzonoego uszkodzonego białka *JAG1* (ang. *dominant negative effect*). Mechanizm ten polega na antagonistycznym działaniu produktu zmutowanego genu w stosunku do prawidłowego białka i w efekcie zaburzeniu jego funkcji. Badania przeprowadzone u *Drosophila melanogaster* potwierdziły, że produkty zmutowanych genów *Delta* i *Serrate* działają według powyższego mechanizmu. Przypuszcza się, że zmutowane cząsteczki ligandu bądź wiążą się z receptorem Notch uniemożliwiając wiązanie prawidłowych form ligandu lub wiążą się bezpośrednio z prawidłowymi cząsteczkami ligandu, co zapobiega ich interakcji z receptorem Notch [33]. Należy podjąć badania w celu wyjaśnienia, czy uszkodzone ludzkie białko *JAG1* zachowuje się podobnie do białek *Drosophila*.

Drugim proponowanym mechanizmem tłumaczącym ujawnienie AGS jest częściowa utrata funkcji genu (ang. *haploinsufficiency*). Według tego modelu mutacja genu *JAG1* na jednym allelu prowadzi do braku produktu lub powstania poważnie uszkodzonego białka. Mimo iż drugi nieuszkodzony allel koduje prawidłowy produkt białkowy, to jednak jego ilość jest niewystarczająca do pełnienia prawidłowej funkcji. Wydaje się, że działanie mechanizmu niedoboru prawidłowego produktu lepiej tłumaczy ujawnienie się choroby. Obecność jednego prawidłowego allela z genem *JAG1* i drugiego z dużą delecją obejmującą cały gen *JAG1*, co równoznaczne jest z mniejszą ilością prawidłowego białka i całkowitym brakiem szkodliwego zmutowanego białka, nie zapobiega wystąpieniu zespołu Alagille’a. Również ujawnienie się choroby u chorych z mutacjami powodującymi powstanie przedwczesnego kodonu stop jest argumentem na korzyść mechanizmu *haploinsufficiency*. Stwierdzono, że mRNA niosący w swojej sekwencji przedwczesny kodon stop jest często degradowany w wyniku działania mechanizmów nadzorujących prawidłową budowę RNA (*nonsense-mediated mRNA decay pathway*) [32] i w rezultacie nie powstaje żaden produkt białkowy. Przedstawione przykłady wskazują, że hemizygotyczność prawidłowego genu *JAG1* jest główną przyczyną wystąpienia AGS. Nie można też wykluczyć możliwości, że oba mechanizmy, zarówno niedobór jednego allela jak i negatywny dominujący wpływ uszkodzonego allela, są odpowiedzialne za ujawnienie objawów choroby.

## MOZAIKOWATOŚĆ W AGS

Analiza przypadków choroby w rodzinie wykazała, że 60–70% wszystkich zidentyfikowanych zmian w budowie genu *JAG1* pojawia się *de novo* [8]. Tylko około 30% mutacji jest przekazywane przez rodziców. Uważa się, że w zespole chorobowym z dużą liczbą mutacji *de novo* należy się liczyć z wysoką częstością występowania

uszkodzeniami wątroby. Doniosłą rolę regionu DSL w zachowaniu regulatorowych funkcji białka JAG1 postulują także inne ośrodki badawcze [34]. Wykazano, że zewnątrzkomórkowy fragment białka JAG1 lub tylko mały peptyd zawierający 16 z 50 aminokwasów domeny DSL są zdolne do pełnienia takiej samej funkcji inhibitora różnicowania komórek krwiotwórczych, jak całe nieuszkodzone białko JAG1. Część wewnątrzkomórkowa białka i fragmenty odpowiadające domenom EGF i TM nie mają takich właściwości. Fakt ten może tłumaczyć występowanie zróżnicowanych objawów choroby u pacjentów z różnymi mutacjami usytuowanymi w różnych częściach genu *JAG1*.

Odkrycie obecności mutacji w genie *JAG1* jako przyczyny wystąpienia zespołu Alagille'a umożliwiło zrozumienie powiązania między wieloukładowym zespołem zaburzeń rozwojowych a istotną dla rozwoju organizmu drogą sygnałową Notch. Przewiduje się, że zaburzenia tej drogi sygnałowej leżą także u podstaw patogenezy innych chorób uwarunkowanych genetycznie. Dalsze badania w tej dziedzinie pozwoliłyby na poszerzenie wiedzy o ich molekularnym podłożu.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ALAGILLE D, ESTRADA A, HADCHOUËL M, GAUTIER M, ODIEVRE M, DOMMÈRGUES JP. Syndromic paucity of interlobular bile ducts (Alagille syndrome or arteriohepatic dysplasia): review of 80 cases. *J Pediatr* 1987; **110**: 195–200.
- [2] ALAGILLE D, ODIEVRE M, GAUTIER M, DOMMÈRGUES JP. Hepatic ductular hypoplasia associated with characteristic facies, vertebral malformations, retarded physical, mental and sexual development, and cardiac murmur. *J Pediatr* 1975; **86**: 63–71.
- [3] ANAD F, BURN J, MATTHEWS D, CROSS I, DAVISON BCC, MUELLER R, SANDS M, LILLINGTON DM, EASTHAM E. Alagille syndrome and deletion of 20p. *J Med Genet* 1990; **27**: 729–737.
- [4] ARTAVANIS-TSAKONAS S, MATSUNO K, FORTINI ME. Notch signaling. *Science* 1995; **268**: 225–232.
- [5] ARTAVANIS-TSAKONAS S, RAND MD, LAKE RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999; **284**: 770–776.
- [6] BYRNE JLB, HARROD MJE, FRIEDMAN JM, HOWARD-PEEBLES PN. Del (10p) with manifestations of arteriohepatic dysplasia. *Am J Med Genet* 1986; **24**: 673–678.
- [7] COLLITON RP, BASON L, LU F-M, PICCOLI DA, KRANTZ ID, SPINNER NB. Mutation analysis of Jagged1 (JAG1) in Alagille syndrome patients and six novel mutations. *Hum Mutat* 2001; **17**: 151–152.
- [8] CROSNIER C, DRIANCOURT C, RAYNAUD N, DHORNE-POLLET S, POLLET N, BERNARD O, HADCHOUËL M, MEUNIER-ROTIVAL M. Analysis of mutations of the *Jagged1* gene in patients with Alagille syndrome: evidence for most cases being sporadic. *Gastroenterology* 1999; **116**: 1141–1148.
- [9] CROSNIER C, DRIANCOURT C, RAYNAUD N, HADCHOUËL M, MEUNIER-ROTIVAL M. Novel mutations in the JAGGED1 gene of patients with Alagille syndrome. Mutation in Brief #385 (Online). *Hum Mutat* 2000; **17**: 72–73.
- [10] DHORNE-POLLET S, DELEUZE JF, HADCHOUËL M, BONAÏTI-PELLIÉ C. Segregation analysis of Alagille syndrome. *J Med Genet* 1994; **31**: 453–457.
- [11] EGAN SE, ST-PIERRE B, LEOW CC. Notch receptors, partners and regulators: from conserved domains to powerful functions. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998; **228**: 273–324.
- [12] ELLISON LW, BIRD J, WEST DC, SORENG AL, REYNOLDS TC, SMITH SD, SKLAR J. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila Notch* gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 1991; **66**: 649–661.

- [13] EMERICK KM, RAND EB, GOLDMUTZ E, KRANTZ ID, SPINNER NB, PICCOLI DA. Features of Alagille syndrome in 92 patients: frequency and relation to prognosis. *Hepatology* 1999; **29**: 822–829.
- [14] GIANNAKUDIS J, ROPKE A, KUJAT A, KRAJEWSKA-WALASEK M, HUGHES H, FRYNS JP, BANKIER A, AMOR D, SCHLICHER M, HANSMANN I. Parental mosaicism of JAG1 mutations in families with Alagille syndrome. *Europ J Hum Genet* 2001; **9**: 209–216.
- [15] GRAY GE, MANN RS, MITSIADIS E, HENRIQUE D, CARCANGIU ML, BANKS A, LEIMAN J, WARD D, ISH-HOROWITZ D, ARTAVANIS-TSAKONAS S. Human ligands of the Notch receptor. *Am J Pathol* 1999; **154**: 785–794.
- [16] GRIDLEY T. Notch signaling in vertebrae development and disease. *Mol Cell Neurosci* 1997; **9**: 103–108.
- [17] HALL JG. Somatic mosaicism: observations related to clinical genetics. *Am J Hum Genet* 1988; **43**: 355–363.
- [18] HERITAGE ML, MACMILLAN JC, COLLITON RP, GENIN A, SPINNER NB, ANDERSON GJ. *Jagged1* (JAG1) mutation detection in an Australian Alagille syndrome population. *Hum Mutat* 2000; **16**: 408–416.
- [19] HOL FA, HAMEL BCJ, GEURDS MPA, HANSMANN I, NABBEN FAE, DANIËLS O, MARIMAN ECM. Localization of Alagille syndrome in 20p11.2-p12 by linkage analysis of a three-generation family. *Hum Genet* 1995; **95**: 687–690.
- [20] HUPPERT SS, JACOBSEN TL, MUSKAVITCH MA. Feedback regulation in central to Delta-Notch signaling required for *Drosophila* wing vein morphogenesis. *Development* 1997; **124**: 3283–3291.
- [21] JOUTEL A, VAHEDI K, CORPECHOT C, TROESCH A, CHABRIAT H, VAYSSIERE C, CRUAUD C, MACIAZEK J, WEISSENBACH J, BOUSSER MG, BACH JF, TOURNIER-LASSERVE E. Strong clustering and stereotyped nature of Notch3 mutations in CADASIL patients. *Lancet* 1997; **350**: 1511–1515.
- [22] KRANTZ ID, COLLITON RP, GENIN A, RAND EB, LI L, PICCOLI DA, SPINNER NB. Spectrum and frequency of Jagged1 (JAG1) mutations in Alagille syndrome patients and their families. *Am J Hum Genet* 1998; **62**: 1361–1369.
- [23] LI L, KRANTZ ID, DEN Y, GENIN A, BANTA AB, COLLINS CC, QI M, TRASK BJ, KUO WL, COCHRAN J, COSTA T, PIERPONT MEM, RAND EB, PICCOLI DA, HOOD L, SPINNER NB. Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. *Nature Genet* 1997; **16**: 243–251.
- [24] LINDSELL CE, BOULTER J, DISIBIO G, GOSSLER A, WEINMASTER G. Expression patterns of *Jagged*, *Delta*, *Notch1*, *Notch2* and *Notch3* genes identify ligand-receptor pairs that may function in neural development. *Mol Cell Neurosci* 1997; **8**: 14–27.
- [25] LINDSELL CE, SHAWBER DJ, BOULTER J, WEINMASTER G. Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1. *Cell* 1995; **80**: 909–917.
- [26] MORRISSETTE JJD, COLLITON RP, SPINNER NB. Defective intracellular transport and processing of JAG1 missense mutations in Alagille syndrome. *Hum Mol Genet* 2001; **10**: 405–413.
- [27] ODA T, ELKAHLOUN A, MELTZER A, CHANDRASEKHARAPPA S. Identification and cloning of the human homolog (JAG1) of the rat Jagged 1 gene from Alagille syndrome critical region at 20p12. *Genetics* 1997; **43**: 376–379.
- [28] ODA T, ELKAHLOUN AG, PIKE BL, OKAJIMA K, KRANTZ ID, GENIN A, PICCOLI DA, MELTZER PS, SPINNER NB, COLLINS FS, CHANDRASEKHARAPPA SC. Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. *Nature Genet* 1997; **16**: 235–242.
- [29] ONOUCHI Y, KURAHASHI H, TAJIRI H, IDA S, OKADA S, NAKAMURA Y. Genetic alterations in the JAG1 gene in Japanese patients with Alagille syndrome. *J Hum Genet* 1999; **44**: 235–239.
- [30] PILIA G, UDA M, MACIS D, FRAU F, CRISPONIL, BALLI F, BARBERA C, COLOMBO C, FREDIANI T, GATTI R, IORIO R, MARAZZI MG, MARCELLINI M, MUSUMECI S, NEBBIA G, VAJRO P, RUFFA G, ZANCAN L, CAO A, DE VIRGILIS S. Jagged-1 mutation analysis in Italian Alagille syndrome patients. *Hum Mutat* 1999; **14**: 394–400.
- [31] RAND M, LINDBLOM A, CARLSON J, VILBUTREIX B, STENFLO J. Calcium binding to tandem repeats of EGF-like modules. Expression and characterization of the EGF-like modules of human Notch 1 implicated in receptor-ligand interactions. *Protein Sci* 1997; **6**: 2059–2071.
- [32] RUIZ-ECHEVARRIA MJ, GONZALEZ CI, PELTZ SW. Identifying the right stop: determining how the surveillance complex recognizes and degrades an aberrant mRNA. *EMBO J* 1998; **17**: 575–589.
- [33] SUN X, ARTAVANIS-TSAKONAS S. Secreted forms of Delta and Serrate define antagonists of Notch signaling in *Drosophila*. *Development* 1997; **124**: 3439–3448.

- [34] VARNUM-FINNEY B, PURTON LE, YU M. The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic cells. *Blood* 1998; **91**: 4084–4091.
- [35] YUAN ZR, OKANIWA M, NAGATA I, TAZAWA Y, ITO M, KAWARAZAKI H, INOMATA Y, OKANO T, YOSHIDA T, KOBAYASHI N, KOHSAKA T. The DSL domain in mutant JAG1 ligand is essential for the severity of the liver defect in Alagille syndrome. *Clin Genet* 2001; **59**: 330–337.
- [36] YUAN ZR, ZOHSAKA T, IKEGAYA T, SUZUKI T, OKANO S, ABE J, KOBAYASHI N, YAMADE M. Mutational analysis of the Jagged1 gene in Alagille syndrome families. *Hum Mol Genet* 1998; **7**: 1363–1369.

*Redaktor prowadzący – Maciej Zabel*

*Otrzymano: 07.11.2002 r.*

*Przyjęto: 10.01.2003 r.*

*Al. Dzieci Polskich 20, 04-730 Warszawa*



## STRATEGIE SYMBIOTYCZNYCH RIZOBIÓW W POKONYWANIU REAKCJI OBRONNYCH ROŚLIN MOTYLKOWATYCH\*

STRATEGIES OF SYMBIOTIC RHIZOBIA IN OVERCOMING  
OF DEFENSE REACTIONS IN LEGUMES

Jerzy WIELBO, Anna SKORUPSKA

Zakład Mikrobiologii Ogólnej, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii,  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

*Streszczenie:* W artykule przedstawiono interakcje pomiędzy endosymbiotycznymi rizobiami a ich roślinnymi gospodarzami zachodzące w trakcie nawiązywania symbiozy. Scharakteryzowano mechanizmy obronne roślin (lokalne i systemiczne), aktywowane w odpowiedzi na zakażenie i penetrację tkanek roślinnych przez rizobia oraz strategie umożliwiające mikroorganizmom unikanie reakcji obronnych roślin. Ponadto scharakteryzowano czynniki roślinne wspomagające infekcję zgodnymi bakteriami, dzięki którym może dojść do nawiązania efektywnej symbiozy rizobiów z roślinami motylkowatymi.

*Słowa kluczowe:* roślinne mechanizmy obronne, symbioza *Rhizobium* – rośliny motylkowe

*Summary:* The review discusses the specific interactions between endosymbiotic rhizobia and their plant hosts during the development of symbiosis. Plant defense reactions (local and systemic) activated in the response to the infection and the penetration of plant tissues by rhizobia are characterized. Several bacterial strategies that permit to overcome or suppress the plant defense reactions are presented. Moreover, the plant factors are characterized that support bacterial invasion and the development of effective symbiosis of rhizobia with legume plants.

*Key words:* plant defense mechanisms, *Rhizobium*RYCINA 3. Lokalizacja aromatazy i receptorów estrogenowych w męskim układzie rozrodczym: T – testosteron, E<sub>2</sub> – estradiol; strzałki wskazują występowanie aromatazy oraz receptorów estrogenowych a i b w poszczególnych typach komórek (wg [54], zmienione) – legume symbiosis

\*Dofinansowanie: grant KBN no. 6P04A 05818

## 1. WSTĘP

Redukcja azotu atmosferycznego ( $N_2$ ) może być przeprowadzana jedynie przez wolnożyjące i symbiotyczne diazotrofy. Diazotrofy symbiotyczne to promieniowce z rodzaju *Frankia* oraz bakterie należące do różnych jednostek systematycznych, określane wspólnym terminem „rizobia”. Mają one szczególne znaczenie dla roślin, gdyż dostarczają swoim gospodarzom znacznych ilości zredukowanego azotu, który z brodawek jest transportowany do innych organów. W roślinach strefy umiarkowanej zredukowany azot jest transportowany w postaci amidów (asparaginy, glutaminy), natomiast w roślinach tropikalnych w postaci ureidów (alantoiny, kwasu alantoinowego) [30]. W najwydajniejszych układach symbiotycznych rizobiów i roślin motylkowatych ilość zredukowanego azotu szacuje się na kilkadziesiąt do kilkuset kg N/ha/rok [69].

Nawiązanie i utrzymanie efektywnej symbiozy między diazotroficznymi mikro-symbiontami i ich roślinnymi gospodarzami zależy od spełnienia dwu podstawowych warunków: właściwego wzajemnego rozpoznania partnerów oraz zahamowania reakcji obronnych gospodarza skierowanych przeciwko mikroorganizmom kolonizującym tkanki rośliny. W procesie rozpoznawania symbiotycznych partnerów bierze udział wiele związków sygnałnych, wymienianych między rizobiami i roślinami w ściśle określonej sekwencji [54, 70]. Z kolei za supresję mechanizmów obronnych rośliny oraz pokonanie struktur ochronnych gospodarza odpowiedzialne są głównie bakterie, aktywnie kolonizujące tkanki roślin.

## 2. MECHANIZMY OBRONNE ROŚLIN

Rośliny narażone są na atak licznych organizmów roślinożernych (bezkęgowców i kęgowców) oraz patogenicznych (wirusów, bakterii, grzybów). Do obrony przed patogenami rośliny wykształciły wiele barier utrudniających infekcję oraz mechanizmów obronnych pozwalających na pozbycie się patogena z zakażonych tkanek.

Czynnikami, które mogą zapobiec kontaktowi patogena z komórkami roślinnymi, są izoflawonoidowe fitoaleksyny wydzielane do ryzosfery i hamujące wzrost bakterii [12, 72] oraz chitynazy i glukanazy hydrolizujące ściany komórkowe patogennych grzybów [18]. Bierną obronę stanowią również wielowarstwowe ściany komórkowe, złożone z opornych na hydrolizę polisacharydów [14]. Bariery strukturalne i czynniki tworzące system pasywnej obrony często nie wystarczają do zapobieżenia inwazji mikroorganizmów patogenicznych. W przypadku udanej infekcji, czyli wnikięcia patogena do tkanek roślinnych, aktywowane są mechanizmy aktywnie zwalczające mikroorganizmy wnikaące do rośliny. Mechanizmy obronne można podzielić na dwie grupy: reakcje lokalne, ograniczone do bezpośredniego sąsiedztwa zainfekowanych tkanek oraz reakcje systemiczne.

Reakcje lokalne określane są mianem reakcji nadwrażliwości (*hypersensitive response*, HR) i występują w przypadku zakażenia odpornej rośliny żywicielskiej przez bakterie chorobotwórcze. Boddźcem wywołującym HR jest kontakt komórek rośliny i patogena oraz następujące bezpośrednio po nim w komórkach roślinnych zmiany stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  oraz stosunku ilości jonów  $\text{K}^+/\text{H}^+$ , czyli tzw. reakcja wymiany (*exchange response*, XR) [4]. Zmiany stężenia kationów oraz równoczesne zmiany stężenia cAMP pociągają za sobą wzrost aktywności enzymów komórkowych, głównie peroksydaz, co prowadzi do gwałtownego wzrostu ilości aktywnych form tlenu (*active oxygen species*, AOS), takich jak  $\text{O}_2^-$  oraz  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Zjawisko to określane jest mianem wybuchu tlenowego (*oxydative burst*). Aktywne formy tlenu wraz z tlenkiem azotu (NO) wywierają cytotoksyczny wpływ na zakażone przez patogena komórki roślinne [15], dlatego mechanizm wybuchu tlenowego jest aktywowany jedynie lokalnie w zainfekowanych komórkach i pozostaje pod ścisłą kontrolą rośliny. Regulacja występowania i nasilenia wybuchu tlenowego odbywa się zarówno na poziomie transkrypcji genów kodujących uczestniczące w nim białka [32], jak i na poziomie aktywności tych białek, wpływając tym samym na poziom syntezy poszczególnych form AOS [13]. W reakcji nadwrażliwości udział biorą również tzw. białka obronne, takie jak kwaśne białka bogate w glicynę i serynę (*glycine and serine rich proteins*, GSRP), które są strukturalnymi białkami ścian komórek roślinnych. W odpowiedzi na rosnące stężenie AOS białka GSRP ulegają sieciowaniu, drastycznie zmniejszając przepuszczalność ścian komórkowych, co ogranicza rozprzestrzenianie się infekcji [19]. Zarówno tworzenie AOS, jak i reakcje z udziałem białek GSRP są procesami zachodzącymi bezpośrednio po kontakcie z patogenem, ponieważ przeprowadzają je białka strukturalne lub enzymatyczne już znajdujące się w komórkach roślinnych.

W reakcji HR mogą brać udział również tzw. białka związane z patogenezą (*pathogenesis-related proteins*, PR), takie jak: chitynazy, proteinazy, glukanazy, inhibitory enzymów wydzielanych przez patogeny, białka o działaniu bakteriobójczym, enzymy uczestniczące w syntezie bakteriostatyków oraz białka z nadrodziny PID (*proliferation, ion, death*) zaangażowane w apoptozę komórek roślinnych [23, 45, 65, 79]. Ich aktywność w miejscu występowania reakcji HR obserwuje się nieco później niż aktywność peroksydaz czy białek GSRP, ponieważ nie są one syntetyzowane konstytutywnie. Ekspresja genów dla białek PR uzależniona jest od obecności specyficznego bodźca (elicytora), czyli związku lub białka pochodzącego z komórek patogena. Obecność elicytora rejestrowana jest przez specyficzne receptory, a następnie sygnał wymagany do indukcji genów PR przekazywany jest za pośrednictwem kinaz należących do rodziny MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) [49, 57, 59, 86]. W regulacji ekspresji genów PR obok kinaz MAPK uczestniczą także cytokiny, białka regulatorowe oraz geny epistatyczne kontrolujące powstawanie reakcji HR [53, 59, 66]. Szacuje się, że w wyniku kontaktu z patogenem zmiany poziomu syntezy dotyczą ponad 200 białek [17], z których większość to białka indukowane niespecyficzenie, niezależnie od rodzaju patogena. Białka te funkcjonują u różnych gatunków roślin nasiennych, uważa się więc, że pojawiły się one u wspólnych przodków roślin jedno- i dwuliściennych [44].

Reakcja nadwrażliwości prowadzi do licznych zmian cytologicznych w zakażonych komórkach: przeorganizowania struktury cytoszkieletu, zwiększenia grubości ścian komórkowych oraz do fragmentacji roślinnego DNA [62, 68], w wyniku czego następuje odcięcie miejsca inwazji patogena od niezakażonych tkanek roślinnych oraz apoptoza zainfekowanych komórek [5]. Mechanizm HR skutecznie hamuje postęp infekcji rośliny przez patogeny, gdyż pozbawia je kontaktu z żywymi komórkami stanowiącymi źródło substancji pokarmowych. Wyjątkiem są grzyby nekrotroficzne, których rozwój uzależniony jest od występowania martwych tkanek gospodarza, a pojawianie się lokalnych nekroz będących skutkiem reakcji HR jest niezbędne dla kolonizacji roślin [21].

Następstwem lokalnej reakcji nadwrażliwości jest aktywowanie mechanizmów systemicznych: systemicznej oporności nabytej (*systemic acquired resistance*, SAR) i systemicznej oporności indukowanej (*induced systemic resistance*, ISR), które pozwalają na obronę całej rośliny przed atakiem patogena wywołującego reakcję HR. W reakcji SAR główną endogenną cząsteczką sygnałną jest kwas salicylowy, natomiast w reakcji ISR rolę tę pełnią kwas jasmonowy i etylen. Endogenne cząsteczki sygnałne wraz z białkiem NPR1 uruchamiają skoordynowaną ekspresję licznych genów dla białek PR [22, 34, 55, 56]. Oba mechanizmy są aktywowane przez podobne klasy elicytorów i prowadzą do:

- (i) akumulacji fenoli w bliskim sąsiedztwie miejsca pierwotnej inwazji patogena,
- (ii) zwiększenia ilości obronnych flawonoidów w tkankach przylegających do miejsca inwazji,
- (iii) syntezy wielu nowych białek PR, które są transportowane do wszystkich organów rośliny za pośrednictwem plazmodesm w systemie międzykomórkowej dystrybucji białek lub są wydzielane do ryzosfery [16, 79].

Reakcje systemiczne mogą być również aktywowane bez wcześniejszego zaangażowania odpowiedzi lokalnych w zwalczanie patogena. Enzymy roślinne (glukanazy lub chitynazy) uwalniane wraz z flawonoidami do ryzosfery mogą służyć do „przeszukiwania” bezpośredniego sąsiedztwa systemu korzeniowego. Wskutek ich działania dochodzi do rozkładu ścian komórkowych grzybów znajdujących się w ryzosferze i do uwalniania  $\beta$ -glukanowych lub N-acetylooligosacharydowych cząsteczek będących elicytorami. Cząsteczki te wiążąc się z odpowiednimi receptorami, takimi jak białko GEBP ( *$\beta$ -glucan elicitor binding protein*) lub białka wiążące monomery chityny, mogą przyczyniać się do aktywacji reakcji SAR/ISR za pośrednictwem kinaz MAPK [50, 78].

### 3. STRATEGIE RIZOBIÓW POZWALAJĄCE NA UNIKNIĘCIE ODPOWIEDZI OBRONNEJ ROŚLIN

Symbioza między roślinami motylkowatymi a rizobiami przynosi korzyści nie tylko roślinom korzystającym ze związków azotu dostarczanych przez mikrosymbionta, lecz również mikrosymbiontom kolonizującym tkanki roślin. System korzeniowy roślin motylkowatych stanowi dla rizobiów bardzo atrakcyjne i obfite w związki

pokarmowe środowisko, które dzieli ze sobą niewielka liczba gatunków bakterii. W porównaniu z ryzosferą czy ryzoplanem (powierzchnią korzeni) konkurencja między szczepami zasiedlającymi brodawki korzeniowe jest znacznie słabsza i nie pojawia się presja selekcyjna promująca gatunki aktywnie zwalczające szczepy konkurencyjne [64, 67, 75, 85].

Rizobia napotykać na reakcje obronne roślin już w ryzosferze, gdzie obecne są wydzielane przez rośliny fitoaleksyny oraz chitynazy. Antybakteryjna aktywność fitoaleksyn jest niespecyficzna i potencjalnie może hamować wzrost wszystkich mikroorganizmów znajdujących się w ryzosferze. Jednak zgodne mikrosymbionty (tj. zdolne do nawiązania efektywnej symbiozy z roślinnym gospodarzem) są w porównaniu z patogenami lub saprofitami znacznie mniej wrażliwe na działanie fitoaleksyn swojego gospodarza roślinnego [43]. Obserwowane w rizobiach mechanizmy obrony przed działaniem flawonoidów są zarówno mechanizmami pasywnymi, jak i aktywnymi. Badania prowadzone głównie na *Bradyrhizobium* wykazały, że w obu przypadkach są w nie zaangażowane przede wszystkim bakteryjne cykliczne  $\beta$ -glukany [7]. Cykliczne  $\beta$ -(1,3)- $\beta$ -(1,6)-glukany przylegające do powierzchni komórek bakteryjnych stanowią barierę niedopuszczającą do kontaktu fitoaleksyn z rizobiami (obrona pasywna) [43], natomiast cykliczne  $\beta$ -(1,3)- $\beta$ -(1,6)-glukany wydzielane do otoczenia bakterii i niezwiązane z ich strukturami powierzchniowymi hamują produkcję roślinnych izoflawonoidów (obrona aktywna). Struktura cyklicznych  $\beta$ -(1,3)- $\beta$ -(1,6)-glukanów jest podobna do struktury  $\beta$ -glukanów uwalnianych przez roślinne sekrecyjne glukanazy w wyniku hydrolizy ścian komórkowych grzybów patogenicznych dla roślin, które jako elicytory prowadzą do wywołania u roślin systemicznych reakcji obronnych – m.in. zwiększenia sekrecji fitoaleksyn. Bakteryjne cykliczne  $\beta$ -(1,3)- $\beta$ -(1,6)-glukany blokują, na zasadzie kompetycji, roślinne receptory odpowiedzialne za rozpoznanie grzybowych  $\beta$ -glukanów [3], dlatego w przypadku zakażenia roślin przez rizobia nie obserwuje się szybkiego wzrostu poziomu syntezy fitoaleksyn, charakterystycznego dla infekcji wywoływanych przez patogeniczne grzyby [40, 42]. O udziale bakteryjnych glukanów w wyłączeniu roślinnych mechanizmów obronnych decyduje ich struktura. Stwierdzono, że niektóre formy strukturalne bakteryjnych  $\beta$ -glukanów, takie jak  $\beta$ -glukany *Bradyrhizobium* pozbawione wiązań  $\beta$ -1,6, nie odgrywają istotnej roli w symbiozie [3].

W ochronie rizobiów przed roślinnymi izoflawonoidami uczestniczą również inne składniki bakteryjnych struktur powierzchniowych – lipopolisacharydy (LPS) i egzopolisacharydy (EPS). Budowa LPS jest gatunkowo, a nawet szczepowo specyficzna i może zmieniać się w zależności od warunków środowiskowych oraz stanu fizjologicznego bakterii, co jest odzwierciedleniem licznych pełnionych przez LPS funkcji: od ochrony komórek po prezentację określonych antygenów istotnych dla interakcji z komórkami roślinnymi. W obronę przed fitoaleksynami najbardziej zaangażowany jest, z racji swojej budowy chemicznej, polisacharydowy łańcuch O-swoisty LPS [31].

Podobnie jak LPS, również egzopolisacharydy (EPS) rizobiów są specyficzne gatunkowo [2, 27]. Pomimo znacznych różnic w ich budowie chemicznej można wyróżnić szereg cech wspólnych:

- (i) są wysokocząsteczkowymi heteropolimerami,
- (ii) ich jednostka podstawowa składa się z oligocukrowego szkieletu modyfikowanego resztami kwasów organicznych,
- (iii) występują we frakcjach – wysokocząsteczkowej (*high molecular weight*, HMW) i niskocząsteczkowej (*low molecular weight*, LMW),
- (iv) pełnią bardzo istotną rolę w symbiozie z roślinami motylkowatymi [2, 84].

W obronie przed roślinnymi izoflawonoidami EPS funkcjonuje podobnie do  $\beta$ -glukanów, chroniąc rizobia przed bakteriostatycznym działaniem fitoaleksyn [60]. Szlaki biosyntezy bakteryjnych EPS i O-swoistego łańcucha LPS są na pewnych etapach ze sobą powiązane, co wpływa na podobieństwo ich budowy chemicznej i wspólne zaangażowanie w ochronę bakterii przed działaniem roślinnych fitoaleksyn.

Roślinne chitynazy obecne obok fitoaleksyn w ryzosferze nie działają bezpośrednio na rizobia. Mogą one jednak zakłócić wymianę sygnałów między nawiązującymi symbiozę mikrosymbiontami a ich roślinnym gospodarzem, przez hydrolizę czynników Nod syntetyzowanych przez bakterie [51]. Czynniki Nod (chitolipooligosacharydy, CLOS) są oligomerami N-acetyloglukozaminy wzbogaconymi licznymi podstawnikami, takimi jak: długołańcuchowe, wielonienasycone kwasy tłuszczowe, reszty kwasów organicznych lub nieorganicznych [41]. Brak czynników Nod uniemożliwia nawiązanie symbiozy, ponieważ CLOS są niezbędne zarówno do deformacji włóśników korzeniowych, która poprzedza inwazję mikrosymbiontów, jak również do indukcji merystemów brodawek [83]. Hydrolizie czynników Nod zapobiegają niektóre chemiczne modyfikacje, dzięki czemu CLOS przestają być substratami rozpoznawanymi przez roślinne sekrecyjne chitynazy [51].

Kolejną barierę obronną roślin, jaką są ściany komórek korzenia, bakterie pokonują w dwu etapach. Pierwszym z nich jest adhezja bakterii na włóśnikach korzeniowych, a następnym częściowa degradacja ścian komórek roślinnych. W adhezji biorą udział elementy struktur powierzchniowych bakterii, takie jak egzopolisacharydy oraz włókna celulozowe. Egzopolisacharydy uczestniczą w adhezji przez łączenie z roślinnymi lektynami. Ponadto, podobne połączenia mogą się tworzyć między roślinnymi lektynami i bakteryjnymi kapsularnymi polisacharydami (KPS), powiązanymi znacznie bardziej trwale niż EPS ze ścianą komórkową rizobiów. Po adhezji z udziałem lektyn i polisacharydów następuje faza trwalszego związania mikrosymbiontów ze ścianami komórek epidermy korzeni za pomocą włókien celulozowych. Włókna te są powszechnie syntetyzowane przez rizobia, a ich budowa i funkcja prawdopodobnie są zbliżone do obserwowanych u *Agrobacterium* [24, 37, 38].

Po adhezji mikrosymbiontów na powierzchni korzeni następuje częściowa degradacja ścian komórek roślinnych przy pomocy bakteryjnych enzymów pektynolitycznych i celulitycznych związanych ze ścianą komórkową [29], która przebiega podobnie do opisanej dla bakterii patogenicznych [26]. W degradacji ścian komórek roślinnych pośredni udział mają również bakteryjne osmoregulacyjne glukany peryplazmatyczne

(OPG), których obecność jest niezbędna dla prawidłowej aktywności szeregu bakteryjnych enzymów hydrolitycznych [52].

Degradacja ścian komórkowych umożliwia mikrosymbiontom wniknięcie do włóśników korzeniowych oraz powstanie nici infekcyjnych, w obrębie których bakterie przemieszczają się do zawiązków brodawek rozwijających się w korze korzenia. Degradacja ścian komórkowych włóśników nieuchronnie wyzwala mechanizmy reakcji nadwrażliwości, prowadzącej do ograniczenia zasięgu infekcji. Skuteczność inwazji rizobioów zależy zatem od szybkości kolonizacji tkanek roślinnych. Nici infekcyjne pozwalają na przyspieszenie inwazji na tyle, aby przebiegała ona w tkankach jeszcze niezmiennych przez wybuch tlenowy towarzyszący reakcji HR [81]. W przypadku zbyt wolnego tempa rozwoju nici infekcyjnych, ich rozwój zostaje zatrzymany przez powstające na ich drodze lokalne nekrozy [82]. Nić infekcyjna powstaje ze składników pochodzenia roślinnego oraz bakteryjnego. Bakterie mogą namnażać się w niciach infekcyjnych, po czym już w obrębie brodawki są uwalniane do cytoplazmy komórek roślinnych. Rizobia w procesie endocytozy są otaczane błonami peribakteroidalnymi pochodzenia roślinnego, co prowadzi do powstania symbiosomów, a bakteroidy mogą wiązać azot atmosferyczny [54].

Tworzenie nici infekcyjnych wspomagane jest przez roślinne białka strukturalne i lektyny [24, 77]. Duży udział w budowie tych struktur mają bakteryjne egzopolisacharydy [10, 27, 36]. Nie bez znaczenia pozostaje również udział lipopolisacharydów, szczególnie łańcucha O-swoistego LPS [31]. Prawidłowy i przebiegający bez opóźnień rozwój nici infekcyjnych nie wywołuje u roślinnego gospodarza aktywacji systemicznych mechanizmów obronnych, tym bardziej że wnikające do tkanek roślinnych rizobia otoczone błonami peribakteroidalnymi nie powodują rozległych uszkodzeń. Mechanizmy systemiczne ulegają aktywacji w przypadku opóźnień w przebiegu infekcji, realizowanej przez symbiotycznie defektywne lub niezgodne szczepy rizobioów. Obserwuje się wówczas wzrost ekspresji białek PR (np. akumulację glikoprotein bogatych w hydroksyprolinę lub chitynaz), akumulację związków fenolowych w ścianach komórek roślinnych, wydzielanie i utlenianie lignin oraz wzrost wydzielania fitoaleksyn do ryzosfery. Zmiany te są elementem systemicznej reakcji obronnej i mają za zadanie zapobiec penetracji tkanek roślinnych przez szczepy o zmniejszonych zdolnościach inwazyjnych lub o zmienionych antygenach somatycznych, które prawdopodobnie nie byłyby zdolne do pełnego kolonizowania brodawek [8, 28, 48]. Na tym etapie inwazji rizobia mogą bronić się przed roślinnymi flawonoidami, syntetyzowanymi m.in. w brodawkach, poprzez produkcję specjalnego egzopolisacharydu – tzw. polisacharydu wiążącego flawolany (FBP, *flavolan-binding polysaccharide*), obecnego w *Bradyrhizobium*, pełniącego funkcje ochronne, lecz niezaangażowanego w procesy penetracji tkanek roślinnych [25]. W inhibicji systemicznych reakcji obronnych występujących w brodawkach uczestniczy również EPS, a szczególnie jego niskocząsteczkowa frakcja [2, 39].

Zakażaniu brodawek przez szczepy nieefektywne lub wykazujące defekty w zdolności do infekcji zapobiega również mechanizm przedłużonego wybuchu tlenowego (*prolonged oxydative burst*). Podobnie jak typowy wybuch tlenowy prowadzi on do

powstania lokalnych nekroz, funkcjonuje jednak w wewnętrznych tkankach brodawek, a nie w zewnętrznych tkankach organów roślinnych narażonych na kontakt z patogenem. Przedłużony wybuch tlenowy stanowi ostatnią linię obrony roślin i daje możliwość usunięcia z brodawek szczepów nieefektywnych [63].

#### 4. CZYNNIKI ROŚLINNE UŁATWIAJĄCE INFEKCJĘ

Symbioza z wiążącymi azot cząsteczkowy rizobiami jest bardzo korzystna dla roślin-gospodarzy, dlatego wykształciły one wiele mechanizmów ułatwiających bakteriom pokonanie barier i reakcji obronnych, które są aktywowane w kontakcie z bakteriami.

Wraz z fitoaleksynami i hydrolazami (chitynazy, glukonazy) rośliny wydzielają do ryzosfery niskocząsteczkowe związki, takie jak cukry i kwasy organiczne, które mogą służyć bakteriom jako substancje odżywcze. W wydzielinach korzeniowych występują również flawonoidy nienależące do fitoaleksyn, które są atraktantami wywołującymi pozytywną reakcję chemotaktyczną rizobiów oraz pełnią funkcję induktorów genów *nod* odpowiedzialnych za syntezę chitolipooligosacharydów, czyli czynników Nod [35, 70]. Ponadto w wydzielinach korzeni występują lektyny, które przez interakcję z bakteryjnymi zewnątrzkomórkowymi polisacharydami powodują agregację mikroorganizmów, ich skupianie w bezpośrednim sąsiedztwie korzeni oraz wspomagają adhezję bakterii na włóśnikach korzeniowych [24]. W przypadku lektyn i polisacharydów układ jest symetryczny dla obu nawiązujących symbiozę partnerów, gdyż mikrosymbionty również syntetyzują lektyny, które z kolei specyficznie wiążą się z cukrami występującymi na powierzchni komórek zgodnego gospodarza roślinnego. Wzrost różnorodności cukrów obecnych na powierzchni komórek epidermy korzenia jest skorelowany z poszerzeniem grupy gatunków potencjalnych mikrosymbiontów [58].

Wydzielane przez bakterie czynniki Nod wywołują u roślin liczne zmiany fizjologiczne i morfologiczne: fenotyp *Hac<sup>+</sup>* (*root hair curling*), czyli zwijanie się włóśników korzeniowych oraz indukcję merystemów brodawek w komórkach kory korzenia [70]. Zakłada się, że percepcja specyficznych czynników Nod przez komórki roślinne jest możliwa dzięki występowaniu selektywnych receptorów w błonie komórkowej. Jednakże nadal niewiele wiadomo o czynnikach roślinnych rozpoznających rizobiowe cząsteczki sygnałne. Dotychczas zidentyfikowano receptory wykazujące podobieństwo do receptorów wiążących oligosacharydowe fragmenty chityny. Receptory te, występujące u roślin motylkowatych zdolnych do symbiozy, są specyficzne dla czynników Nod, wykazują zdolność wiązania oligomerów chityny z niskim powinowactwem i są obecne w błonach komórkowych obok typowych receptorów chitynowych aktywnych w procesach obronnych roślin [46, 47, 73]. Ostatnio zidentyfikowano geny roślin motylkowatych, które kodują szczególną klasę białek receptorowych. Białka te charakteryzują się powtórzonym motywem bogatym w leucynę (*leucine rich repeat*, LRR), występującym w zewnątrzkomórkowej domenie. Domena wewnątrzkomórkowa jest kinazą serynowo/treoninową, która przekazuje sygnał do



wnętrza komórki roślinnej [20, 74]. Białka LRR tworzą dużą rodzinę i u zwierząt funkcjonują we wrodzonym systemie immunologicznym, natomiast u roślin uczestniczą w systemach obrony przed patogenami oraz w procesie różnicowania łądyg. Opisane dotychczas białka LRR są receptorami dla białek zewnątrzkomórkowych, dlatego zakłada się, że pierwotne rozpoznanie partnerów symbiozy zachodziłoby poprzez białkowe cząsteczki zewnątrzkomórkowe, np. lektyny, które byłyby rozpoznawane przez receptory LRR dopiero po związaniu sygnału bakteryjnego [71].

Po wnikięciu do tkanek korzenia nie tylko bakterie angażują się w hamowanie mechanizmów reakcji nadwrażliwości oraz reakcji SAR/ISR. Rośliny rozpoznające zgodnego mikrosymbionta kontrolują nasilenie aktywowanych mechanizmów obronnych, utrzymując je na umiarkowanym, wolno rosnącym poziomie. Taki typ infekcji i towarzyszących im reakcji obronnych, charakterystyczny dla symbiotycznych rizobiów, określany jest mianem pasywnego ominięcia (*passive evasion*) [11, 61].

W dalszych etapach inwazji, rośliny wspomagają wzrost nici infekcyjnej, co jest możliwe dzięki obecności trzech grup białek:

- (i) lektyn współdziałających z bakteryjnymi egzopolisacharydami [24],
- (ii) białek strukturalnych uczestniczących w budowie nici infekcyjnych [77] oraz
- (iii) enzymów hydrolitycznych, degradujących wraz z enzymami bakteryjnymi, ściany komórek roślinnych znajdujących się na drodze rosnących nici infekcyjnych [80].

Rizobia redukujące  $N_2$  w brodawkach (w obrębie symbiosomów) wymagają prawidłowego i efektywnego działania wielu czynników pochodzenia roślinnego. W powstaniu symbiosomów uczestniczą liczne białka roślinne oraz błony biologiczne pochodzenia roślinnego, które stanowią powierzchnię wymiany metabolitów i sygnałów pomiędzy mikrosymbiontem a komórką gospodarza [6, 9]. Ponadto rośliny zapewniają rizobiom warunki sprzyjające symbiotycznej redukcji azotu cząsteczkowego. Niskie stężenie tlenu niezbędne dla aktywności nitrogenazy utrzymywane jest dzięki syntezie białek wiążących tlen – leghemoglobin [1, 33] oraz dzięki specyficznej budowie ścian brodawki. Wewnętrzne, zasiedlone przez rizobia tkanki brodawek otoczone są przez warstwę komórek niezakażonych, których ściany komórkowe wysyczone są białkami bogatymi w prolinę, „uszczelniającymi” ściany brodawki, co znacznie utrudnia dyfuzję gazów.

Hamowanie reakcji obronnych przez roślinnego partnera symbiozy prawdopodobnie nie kończy się w momencie wykształcenia wiążących azot bakteroidów. W wykształconych brodawkach korzeniowych typu niezdeteminowanego zaobserwowano powstawanie tzw. strefy ponownej inwazji (*reinvasion zone*), która jest najstarszą strefą brodawki. Komórki roślinne tej strefy są ponownie zakażane przez rizobia, lecz mikrosymbionty występują tutaj w formie saprofitycznych, niewiążących azotu rizoboidów [76]. Te rizobia nie powodują uszkodzeń tkanek roślinnych, a rośliny nie aktywują żadnych skierowanych przeciwko nim mechanizmów obronnych. W ten sposób strefa reinwazji, do końca sezonu wegetacyjnego rośliny-gospodarza, pozostaje dla rizobiów odpowiednim siedliskiem pozbawionym konkurujących szczepów, a rośliny „przechowują” mikrosymbionta w swoim otoczeniu na potrzeby własne (rośliny wieloletnie) lub roślin potomnych (rośliny jednoroczne).

## 5. PODSUMOWANIE

Nawiązanie efektywnej symbiozy pomiędzy rizobiami i roślinami motylkowatymi poprzedzone jest kolonizacją tkanek roślinnych przez bakterie, w trakcie której rizobia przemieszczają się z ryzosfery do nowych organów symbiotycznych, czyli brodawek korzeniowych. Inwazja rizobiów w głąb tkanek roślinnych aktywuje u gospodarza lokalne i systemiczne mechanizmy obronne, które mogą udaremnić zasiedlenie przez bakterie rozwijających się brodawek korzeniowych. W odpowiedzi na reakcje obronne roślin, endosymbionty wykształciły szereg strategii chroniących bakterie i przyspieszających przebieg infekcji. Wśród nich wyróżnić można oporność na działanie związków roślinnych i białek obronnych, wykształcenie specyficznych struktur powierzchniowych (EPS, LPS, włókna celulozowe), synteza czynników zaangażowanych w adhezję i penetrację tkanek roślinnych oraz supresję mechanizmów obronnych gospodarza.

Efektywna symbioza z bakteryjnymi diazotrofami jest bardzo korzystna dla roślin. W związku z tym rośliny motylkowe wykształciły receptory umożliwiające percepcję sygnałów pochodzenia bakteryjnego oraz szereg mechanizmów ograniczających zakres odpowiedzi obronnej aktywowanej w stosunku do mikrosymbiontów kolonizujących tkanki roślinne.

## LITERATURA

- [1] APPLEBY CA. Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Ann Rev Plant Physiol* 1984; **35**: 443–478.
- [2] BECKER A, PÜHLER A. Production of exopolysaccharides. [W] Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ [red.] *The Rhizobiaceae. Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers 1998: 97–118.
- [3] BHAGAWAT AA, MITHÖFER A, PFEFFER PE, KRAUS C, SPICKERS N, HOTCHKISS A, EBEL J, KEISTER DL. Further studies of the role of cyclic beta-glucans in symbiosis. An NdvC mutant of *Bradyrhizobium japonicum* synthesizes cyclodecakis-(1-3)-beta-glucosyl. *Plant Physiol* 1999; **119**: 1057–1064.
- [4] BOLWELL GP. Role of active oxygen species and NO in plant defense responses. *Curr Opin Plant Biol* 1999; **2**: 287–294.
- [5] BORECKI Z. Nauka o chorobach roślin. Warszawa: PWRiL wyd. III 2001: 45–60.
- [6] BORISOV AY, ROZOV SM, TSYGANOW VE, MORZHINA EV, LEBSKY VK, TIKHONOVICH IA. Sequential functioning of Sym-13 and Sym-31, two genes affecting symbiosome development in root nodules of pea (*Pisum sativum* L.). *Mol Gen Genet* 1997; **254**: 592–598.
- [7] BREEDVELD MW, MILLER KJ. Cyclic  $\beta$ -glucans of members of family *Rhizobiaceae*. *Microbiol Rev* 1994; **58**: 145–161.
- [8] CAMPBELL GRO, REUHS BL, WALKER GC. Chronic intracellular infection of alfalfa nodules by *Sinorhizobium meliloti* requires correct lipopolysaccharide core. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 3938–3943.
- [9] CARINA A, SIMONSEN W, ROSENDAHL L. Origin of *de novo* synthesized proteins in the different compartments of pea – *Rhizobium* sp. symbiosomes. *Mol Plant-Microbe Interact* 1999; **12**: 319–327.
- [10] CHENG H-P, WALKER GC. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 1998; **180**: 5183–5191.
- [11] CROCKARD MA, BJORSON AJ, COOPER JE. A new peroxidase cDNA from white clover: its characterization and expression in root tissue challenged with homologous rhizobia, heterologous rhizobia, or *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant-Microbe Interact* 1999; **12**: 825–828.

- [12] DAKORA FD, PHILIPS DA. Diverse functions of izoflawonoids in legumes transcend anti-microbial definitions of phytoalexins. *Physiol Mol Plant Pathol* 1996; **49**: 1–20.
- [13] DAT J, VANDENABEELE S, VRANOVA E, VAN MONTAGU M, INZE D, BREUSEGEM F. Dual action of the reactive oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* 2000; **57**: 779–795.
- [14] DARVILL AG, ALBERSHEIM P, McNEIL M, LAU JM, YORK WS, STEVENSON TT, THOMAS J, DOARES S, GOLLIN DJ, CHELF P, DAVIS K. Structure and function of plant cell wall polysaccharides. *J Cell Sci Suppl* 1985; **2**: 203–217.
- [15] DELLEDONNE M, ZEIER J, MAROCCO A, LAMB C. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 13454–13459.
- [16] DING B. Intercellular protein trafficking through plasmodesmata. *Plant Mol Biol* 1998; **38**: 279–310.
- [17] DITT RF, NESTER EW, COMAI L. Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 10954–10959.
- [18] DUMAS-GAUDOT E, SLEZACK S, DASSI B, POZO MJ, GIANINAZZI-PEARSON V, GIANINAZZI S. Plant hydrolytic enzymes (chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases) in root reactions to pathogenic and symbiotic microorganisms. *Plant Soil* 1996; **185**: 211–221.
- [19] EL-GENDY W, BROWNLEADER MD, ISMAIL H, CLARKE PJ, GILBERT J, EL-BORDINY F, TREVAN M, HOPKINS J, NALDRETT M, JACKSON P. Rapid deposition of wheat cell wall structural proteins in response to *Fusarium*-delivered elicitors. *J Exp Bot* 2001; **52**: 85–90.
- [20] ENDRE G, KERESZT A, KEVEI Z, MIHACEA S, KALO P, KISS BG. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 2002; **417**: 962–966.
- [21] GOVRIN EM, LEVINE A. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr Biol* 2000; **10**: 751–757.
- [22] HEIL M, BOSTOCK RM. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens on the context of induced plant defenses. *Ann Bot* 2002; **89**: 503–512.
- [23] HILPERT B, BOHLMANN H, OP DEN CAMP RO, MIERSCH O, BUCHALA A, APEL K. Isolation and characterization of signal transduction mutants of *Arabidopsis thaliana* that constitutively activate the octadecanoid pathway and form necrotic microlesions. *Plant J* 2001; **26**: 435–446.
- [24] HIRSCH A. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Curr Op Plant Biol* 1999; **2**: 320–326.
- [25] HOTTER GS, SCOTT DB. The requirement for exopolysaccharide precedes the requirement for flavan-binding polysaccharide in nodulation of *Leucaena leucocephala* by *Rhizobium loti*. *Arch Microbiol* 1997; **167**: 182–186.
- [26] HUGOUIEUX-COTTE-PATTAT N, SHEVCHIK VE, NASSER W. PehN, a polygalacturonase homologue with a low hydrolase activity, is coregulated with the other *Erwinia chrysanthemi* polygalacturonases. *J Bacteriol* 2002; **184**: 2664–2673.
- [27] JANCZAREK M, MAZUR A, WIELBO J, KRÓL J, SKORUPSKA A. Egzopolisacharydy rizobiowe: struktura, biosynteza i funkcja w symbiozie. *Post Mikrobiol* 1999; **38**: 217–243.
- [28] JANCZAREK M, KRÓL J, KUTKOWSKA J, MAZUR A, WIELBO J, BORUCKI W, KOPCIŃSKA J, ŁOŹKA B, URBANIK-SYPNIEWSKA T, SKORUPSKA A. Mutation in *pssB-pssA* intergenic region of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* affects the surface polysaccharide synthesis and nitrogen fixation ability. *J Plant Physiol* 2001; **158**: 1565–1574.
- [29] JIMENEZ-ZURDO JI, MATEOS PF, DAZZO FB, MARTINEZ-MOLINA E. Cell-bound cellulase and polygalacturonase production by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species. *Soil Biol Biochem* 1996; **28**: 917–921.
- [30] KAHN ML, McDERMOTT TR, UDVARDI MK. Carbon and nitrogen metabolism in rhizobia. [W] Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ [red.] *The Rhizobiaceae. Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers 1998: 97–118.
- [31] KANNENBERG EL, REUHS BL, FORSBERG LS, CARLSON RW. Lipopolysaccharides and K-antigens: their structure, biosynthesis and functions. [W] Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ [red.] *The Rhizobiaceae. Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers 1998: 119–154.
- [32] KAWASAKI T, HENMI K, ONO E, HATEKEYAMA S, IWANO M, SATOH H, SHIMAMOTO K. The small GTP-binding protein rac is a regulator of cell death in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 10922–10926.

- [33] KAWASHIMA K, SUGANUMA N, TAMAOKI M, KOUCHI H. Two types of pea leghemoglobin genes showing different O<sub>2</sub>-binding affinities and distinct patterns of spatial expression in nodules. *Plant Physiol* 2001; **125**: 641–651.
- [34] KINKEMA M, FAN W, DONG X. Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene. *Plant Cell* 2000; **12**: 2339–2350.
- [35] KNEE EM, GONG FC, GAO M, TEPLITSKI M, JONES AR, FOXWORTHY A, MORT A.J., BAUER W.D. Root mucilage from pea and its utilization by rhizosphere bacteria as a sole carbon source. *Mol Plant-Microbe Interact* 2001; **14**: 775–784.
- [36] KRÓL J, WIELBO J, MAZUR A, KOPCIŃSKA J, ŁOTOCKA B, GOLINOWSKI W, SKORUPSKA A. Molecular characterisation and symbiotic importance of *prsD* gene of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain TA1: *pssD* mutant is affected in exopolysaccharide synthesis and endocytosis of bacteria. *Mol Plant - Microbe Interact* 1998; **11**: 1142–1148.
- [37] MATEOS PF, BAKER DL, PHILIP-HOLLINGSWORTH S, SQUARTINI A, PERUFFO ADB, NUTI MP, DAZZO FB. Direct *in situ* identification of cellulose microfibrils associated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* attached to the root epidermis of white clover. *Can J Microbiol* 1995; **41**: 202–207.
- [38] MATTHYSSE AG, KIJNE JW. Attachment of *Rhizobiaceae* to plant cells. [W] Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ [red.] *The Rhizobiaceae. Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers 1998: 235–249.
- [39] MAZUR A, KRÓL J, WIELBO J, URBANIK-SYPNIEWSKA T, SKORUPSKA A *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* PssP protein is required for exopolysaccharide biosynthesis and polymerization. *Mol Plant - Microbe Interact* 2002; **15**: 388–397.
- [40] MCKHANN HI, PAIVA NL, DIXON RA, HIRSCH AM. Chalcone synthase transcripts are detected in alfalfa root hairs following inoculation with wild-type *Rhizobium meliloti*. *Mol Plant - Microbe Interact* 1997; **10**: 50–58.
- [41] MERGAERT P, VAN MONTAGU M, HOLSTERS M. Molecular mechanisms for Nod factor diversity. *Mol Microbiol* 1997; **25**: 811–817.
- [42] MITHÖFER A, BHAGAWAT AA, FEGER M, EBEL J. Suppression of fungal  $\beta$ -glucan-induced plant defense in soybean (*Glycine max* L.) by cyclic 1,3-1,6- $\beta$ -glucans from the symbiont *Bradyrhizobium japonicum*. *Planta* 1996; **199**: 270–275.
- [43] MITHÖFER A, BHAGAWAT AA, KEISTER DL, EBEL J. *Bradyrhizobium japonicum* mutants defective in cyclic beta-glucan synthesis show enhanced sensitivity to plant defense responses. *Z Naturforsch* 2001; **56**: 581–584.
- [44] MORRIS SW, VERNOOIJ B, TITATARN S, STARRETT M, THOMAS S, WILTSE CC, FREDERIKSEN RA, BHANDHUFALCK A, HULBERT S, UKNES S. Induced resistance response in maize. *Mol Plant-Microbe Interact* 1998; **11**: 643–648.
- [45] NADIMPALLI R, YALPANI N, JOHAL GS, SIMMONS CR. Prohibitans, stomatins, and plant disease response genes compose a protein superfamily that controls cell proliferation, ion channel regulation, and death. *J Biol Chem* 2000; **275**: 29579–29586.
- [46] NIEBEL A, BONO JJ, RANJEVA R, CULLIMORE JV. Identification of a high affinity binding site for lipooligosaccharidic NodRm factors in the microsomal fraction of *Medicago* cell suspension cultures. *Mol Plant - Microbe Interact* 1997; **10**: 132–134.
- [47] NIEBEL A, GRESSENT F, BONO JJ, RANJEVA R, CULLIMORE JV. Recent advances in the study of Nod factor perception and signal transduction. *Biochimie* 1999; **81**: 669–674.
- [48] NIEHAUS K, LAGARES A, PÜHLER A. A *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant induces effective nodules on the host plant *Medicago sativa* (alfalfa) but fails to establish a symbiosis with *Medicago truncatula*. *Mol Plant - Microbe Interact* 1998; **9**: 906–914.
- [49] NUHSE TS, PECK SC, HIRT H, BOLLER T. Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the *Arabidopsis thaliana* MAPK 6. *J Biol Chem* 2000; **275**: 7521–7526.
- [50] OKADA M, MATSUMURA M, ITO Y, SHIBUYAN. High-affinity binding proteins for N-acetylooligosaccharide elicitor in the plasma membranes of wheat, barley and carrot cells: conserved presence and correlation with the responsiveness to the elicitor. *Plant Cell Physiol* 2002; **43**: 505–512.
- [51] OVTSYNA AO, SCHULTZE M, TIKHONOVICH IA, SPAINK HP, KONDOROSI E, KONDOROSI A, STAEHELIN C. Nod factors of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and their fucosylated derivatives stimulate a Nod factor cleaving activity in pea roots and are hydrolyzed *in vitro* by plant chitinases at different rates. *Mol Plant - Microbe Interact* 2000; **13**: 799–807.

- [52] PAGE F, ALTABE S, HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT N, LACROIX JM, ROBERT-BAUDOY J, BOHIN JP. Osmoregulated periplasmic glucan synthesis is required for *Erwinia chrysanthemi* pathogenicity. *J Bacteriol* 2001; **183**: 3134–3141.
- [53] PASTERNAK O, SIKORSKI MM. Cytokiny w mechanizmach obronnych roślin. *Biotechnologia* 2002; **58**: 153–164.
- [54] PERRET X, STAEHELIN C, BROUGHTON W. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; **64**: 180–201.
- [55] PIETERSE CMJ, VAN PELT JA, TON J, PARCHMANN S, MÜELLER MJ, BUCHALA AJ, METRAUX JP, VAN LOON LC. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiol Mol Plant Pathol* 2000; **57**: 123–134.
- [56] PIETERSE CM, VAN WEES SC, VAN PELT JA, KNOESTER M, LAAN R, GERRITS H, WEISBEEK PJ, VAN LOON LC. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1998; **10**: 1571–1580.
- [57] REN D, YANG H, ZHANG S. Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 2002; **277**: 559–565.
- [58] RIDGE RW, KIM RA, YOSHIDA F. The diversity of lectin-detectable sugar residues on root hair tips of selected legumes correlates with diversity of their host ranges for rhizobia. *Protoplasma* 1998; **202**: 84–90.
- [59] ROBATZEK S, SOMSSICH IE. Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes Dev* 2002; **16**: 1139–1149.
- [60] ROLFE BG, CARLSON RW, RIDGE RW, DAZZO FB, MATEOS PF, PANKHURST CE. Defective infection and nodulation of clovers by exopolysaccharide mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Aust J Plant Physiol* 1996; **23**: 285–303.
- [61] RUIZ-LOZANO JM, ROUSSEL H, GIANINAZZI S, GIANINAZZI-PEARSON V. Defense genes are differentially induced by a mycorrhizal fungus and *Rhizobium* sp. in wild-type and symbiosis-defective pea genotypes. *Mol Plant - Microbe Interact* 1999; **12**: 976–984.
- [62] RYERSON DE, HEATH MC. Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments. *Plant Cell* 1996; **8**: 393–402.
- [63] SANTOS R, HEROUART D, SIGAUD S, TOUATI D, PUPPO A. Oxydative burst in alfalfa – *Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. *Mol Plant - Microbe Interact* 2001; **14**: 86–89.
- [64] SARATHCHANDRA SU, BURCH G, COX NR. Growth patterns of bacterial communities in the rhizosphere and rhizosphere of white clover (*Trifolium repens* L.) and perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) in long-term pasture. *Appl Soil Ecol* 1997; **6**: 293–299.
- [65] SASABE M, TAKEUCHI K, KAMOUN S, ICHINOSE Y, GOVERS F, TOYODA K, SHIRASHI T, YAMADA T. Independent pathways leading to apoptotic cell death, oxydative burst and defense gene expression in response to elicitor in tobacco cell suspension culture. *Eur J Biochem* 2000; **267**: 5005–5013.
- [66] SCHIENE K, PÜHLER A, NIEHAUS K. Transgenic tobacco that express an antisense construct derived from *Medicago sativa* cDNA encoding a Rac-related small GTP-binding protein fail to develop necrotic lesions upon elicitor infiltration. *Mol Gen Genet* 2000; **263**: 761–770.
- [67] SCHLOTTER M, WIEHE W, ASSMUS B, STEINDL H, BECKE H, HÖFLICH H, HARTMANN A. Root colonization of different plants by plant-growth-promoting *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* R39 studied with monospecific polyclonal antisera. *Appl Environ Microbiol* 1997; **63**: 2038–2046.
- [68] SCHMELZER E. Cell polarization, a crucial process in fungal defence. *Trends Plant Sci* 2002; **7**: 411–415.
- [69] SHANTHARAM S., MATTOO AK. Enhancing biological nitrogen fixation; an appraisal of current and alternative technologies for N input into plants. *Plant Soil* 1997; **194**: 205–216.
- [70] SPAINK HP. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2000; **54**: 257–288.
- [71] SPAINK HP. Plant-microbe interactions: a receptor in symbiotic dialogue. *Nature* 2002; **417**: 910–911.
- [72] STAFFORD HA. Roles of flavonoids in symbiotic and defense functions in legume roots. *Bot Rev* 1997; **63**: 27–39.
- [73] STACEY G, SHIBUYA N. Chitin recognition in rice and legumes. *Plant Soil* 1997; **194**: 161–169.
- [74] STRACKE S, KISTNER C, YOSHIDA S, MULDER L, SATO S, KANEKO T, TABATA S, SANDAL N, STOUGAARD J, SZCZYGLOWSKI K, PARNISKE M. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* 2002; **417**: 959–962.

- [75] STURZ AV, CHRISTIE BR, MATHESON BG, NOWAK J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biol Fertil Soils* 1997; **25**: 13–19.
- [76] TIMMERS ACJ, SOUPENE E, AURIAC MC, DE BILLY F, VASSE J, BOISTARD P, TRUCHET G. Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Mol Plant-Microbe Interact* 2000; **13**: 1204–1213.
- [77] TSYGANOV VE, MORZINA EV, STEFANOV SY, BORISOV AY, LEBSKY VK, TIKHONOVICH IA. The pea (*Pisum sativum* L.) genes *sym33* and *sym40* control infection thread formation and root nodule function. *Mol Gen Genet* 1998; **259**: 491–503.
- [78] UEMOTO N, KAKITANI M, IWAMATSU A, YOSHIKAWA M, YAMAOKA N, ISHIDA I. The structure and function of soybean beta-glucan-elicitor-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 1029–1034.
- [79] VAN LOON LC, VAN STRIEN EA. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* 1999; **55**: 85–97.
- [80] VAN SPRONSEN PC, BAKHUIZEN R, VAN BRUSSEL AAN, KIJNE JW. Cell wall degradation during infection thread formation by the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a two-step process. *Eur J Cell Biol* 1994; **64**: 88–94.
- [81] VAN WORKUM WAT, VAN SLAGEREN S, VAN BRUSSEL AAN, KIJNE JW. Role of exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* as host plant-specific molecules required for infection thread formation during nodulation of *Vicia sativa*. *Mol Plant-Microbe Interact* 1998; **12**: 1233–1241.
- [82] VASSE J, DE BILLY F, TRUCHET G. Abortion of infection during the *Rhizobium* – alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. *Plant J* 1993; **4**: 555–566.
- [83] WALKER SA, DOWNIE JA. Entry of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* into root hairs requires minimal Nod factor specificity, but subsequent infection thread growth requires *nodO* or *nodM*. *Mol Plant-Microbe Interact* 2000; **13**: 754–762.
- [84] WANG LX., WANG Y, PELLOCK B, WALKER GC. Structural characterization of the symbiotically important low-molecular-weight succinoglycan of *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 1999; **181**: 6788–6796.
- [85] WILSON RA, HANDLEY BA, BERINGER JE. Bacteriocin production and resistance in a field population of *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae*. *Soil Biol Biochem* 1998; **30**: 413–417.
- [86] ZHANG S, LIU Y. Activation of salicylic acid-induced protein kinase, a mitogen-activated protein kinase, induces multiple defense responses in tobacco. *Plant Cell* 2001; **13**: 1877–1889.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 02.12.2002 r.

Przyjęto: 08.01.2003 r.

20-033 Lublin, ul. Akademicka 19

e-mail: genet@biotop.umcs.lublin.pl

## JASMONIDY W USTĘPOWANIU SPOCZYNKU I KIEŁKOWANIU NASION

### JASMONIDES IN BREAKING DORMANCY AND SEED GERMINATION

Bożena BIAŁECKA, Jan KĘPCZYŃSKI

Zakład Fizjologii Roślin, Katedra Fizjologii Roślin, Wydział Nauk Przyrodniczych,  
Uniwersytet Szczeciński

**Streszczenie:** Kwas jasmonowy (JA) i jego ester metylowy (JA-Me) są najbardziej znanymi przedstawicielami nowej grupy regulatorów wzrostu i rozwoju roślin określanej jako jasmonidy. Występowanie tych związków stwierdzono w nasionach wielu gatunków roślin, najwięcej identyfikacji jasmonidów przeprowadzono w nasionach roślin należących do rodziny *Leguminosae*. Zawartość tych związków w nasionach wynosi 10–100 ng · g<sup>-1</sup> świeżej masy. Wpływ jasmonidów na nasiona zależy od ich stanu fizjologicznego; stymulują one kiełkowanie nasion spoczynkowych, a hamują kiełkowanie nasion nieznajdujących się w spoczynku głębokim. Stymulujący wpływ JA na kiełkowanie nasion charakteryzujących się spoczynkiem głębokim oraz zmiany zawartości endogennego JA podczas stratyfikacji tych nasion sugerują udział endogennych jasmonidów w regulacji ustępowania spoczynku w nasionach. Uzyskane dane wskazują, że jest on związany ze stymulowaniem aktywności lipaz: kwaśnej i zasadowej, enzymów katalizujących hydrolizę lipidowych substancji zapasowych niezbędnych do wzrostu zarodka. Wiedza dotycząca udziału jasmonidów w regulacji kiełkowania nasion nieznajdujących się w spoczynku głębokim opiera się wyłącznie na badaniu wpływu egzogenego JA-Me na ten proces. Inhibicję kiełkowania nasion *Amaranthus caudatus* wywołaną JA-Me odwraca egzogenny etylen, gibereliny i cytokiny. Działanie endogennego etylenu jest niezbędne giberelinom i cytokininom do zniesienia hamującego wpływu JA-Me na kiełkowanie. W nasionach *Amaranthus caudatus* i *Xanthium pennsylvanicum* JA-Me reguluje biosyntezę etylenu; hamuje aktywność i/lub syntezę syntazy ACC i oksydazy ACC. Prawdopodobnie JA-Me uczestniczy także w kontroli innych procesów metabolicznych podczas kiełkowania nasion, np. oddychania czy mobilizacji węglowodanowych rezerw zapasowych. W pracy przedstawiono aktualne wyniki badań dotyczące udziału jasmonidów w regulacji ustępowania spoczynku pierwotnego i kiełkowania nasion nieznajdujących się w spoczynku.

**Słowa kluczowe:** kwas jasmonowy (JA), jasmonian metylu (JA-Me), przerywanie spoczynku nasion, kiełkowanie nasion.

**Summary:** Jasmonic acid (JA) and its methyl ester (JA-Me) is the most known representative of the new plant growth regulators called jasmonides. Occurrence of these compounds was detected in the seeds of many plant species, most of them from *Leguminosae* family. The content of jasmonides in the seeds varies in the range of 10–100 ng · g<sup>-1</sup> fresh weight. The influence of jasmonides on seed germination is

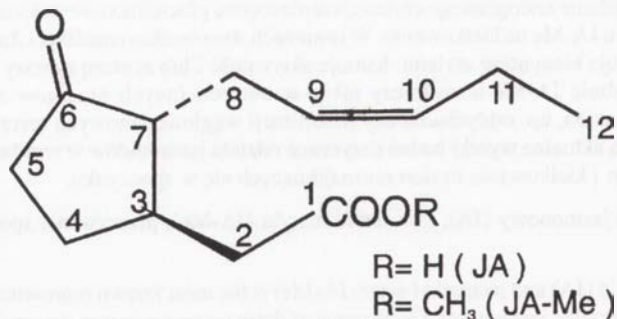
dependent on physiological status of seeds. They stimulate dormant and inhibit non-dormant seed germination. Changes in the content of these regulators during stratification of primary dormant oily seeds suggest jasmonates involvement in the regulation in these seeds of primary dormancy breaking. Obtained data indicate that this effect is involved with stimulation of acid and alkaline lipase activity, enzymes hydrolysing storage oil materials necessary in the embryo growth. The knowledge about jasmonates involvement in the regulation of non-dormant seeds germination is based only on determination of exogenous JA-Me significance in the control of this process. Inhibitory effect of JA-Me on *Amaranthus caudatus* seed germination is reversed by exogenous ethylene, gibberellins and cytokinins. Gibberellins and cytokinins need ethylene action for reversing JA-Me inhibition. The influence of JA-Me on *Amaranthus caudatus* and *Xanthium pennsylvanicum* seed germination involves ethylene biosynthesis control: the inhibition of ACC synthase activity and/or synthesis as well as activity of ACC oxidase. Probably JA-Me also is involved in the control of other metabolic processes during seed germination i.e. respiration or mobilisation of carbohydrate storage materials. Current data on this topic are presented in this paper.

**Key words:** jasmonic acid (JA), methyl jasmonate (JA-Me), breaking dormancy, seed germination.

**Wykaz skrótów:** **ABA** (*abscisic acid*) – kwas abscysynowy, **ACC** (*1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid*) – kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy, **BA** (*benzyladenine*) – benzyloadenina, **GA<sub>3</sub>** (*gibberellin A<sub>3</sub>*) – giberelina A<sub>3</sub>, **GA<sub>4+7</sub>** (*gibberellin A<sub>4+7</sub>*) – giberelina A<sub>4+7</sub>, **IAA** (*indoleacetic acid*) – kwas indoliloctowy, **JA** (*jasmonic acid*) – kwas jasmonowy, **JA-Me** (*methyl jasmonate*) – jasmonian metylu, **MACC** (*1-malonylaminocyclopropane-1-carboxylic acid*) – kwas malonylo-aminocyklopropano-1-karboksylowy, **NBD** (*2,5-norbornadiene*) – 2,5-norbornadien, **PG** (*n-propyl gallate*) – galusan n-propylu, **RNA** (*ribonucleic acid*) – kwas rybonukleinowy, **SHAM** (*salicylhydroxamic acid*) – N,2-dwuhydrobenzamid.

## 1. WSTĘP

Kwas jasmonowy (JA) i jego ester metylowy (JA-Me) (ryc. 1) są najbardziej znanymi przedstawicielami grupy związków określanych jasmonidami. Podstawę budowy wszystkich jasmonidów stanowi cyklopentanonowy pierścień. Pierwszym wykrytym związkiem z tej grupy był JA-Me wyizolowany około 40 lat temu z olejków *Jasminum grandiflorum* [11] i *Rosmarinus officinalis* [9]. 10 lat później wyizolowano JA z filtratów grzyba *Botryodiplodia theobromae* [1]. Jasmonidy są pochodnymi wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Prekursorem biosyntezy JA w roślinach



RYSUNEK 1. Budowa kwasu jasmonowego (JA) i jego estru metylowego (JA-Me)



jest kwas  $\alpha$ -linolenowy, a kluczowym enzymem lipooksygenaza [25]. Zasadnicze przemiany w syntezie tego regulatora obejmują utlenianie kwasu linolenowego, utworzenie cyklopentanonowego pierścienia oraz  $\beta$ -oksydacje, w wyniku których ulega skróceniu boczny łańcuch. Jasmonidy, ze względu na powszechność występowania w roślinach i udział w regulacji wielu procesów fizjologicznych, zostały zaliczone do endogennych regulatorów wzrostu i rozwoju roślin.

Zagadnienia dotyczące odkrycia, biosyntezy, występowania, biologicznej aktywności, interakcji z innymi regulatorami wzrostu oraz mechanizmu działania jasmonidów przedstawiono w kilku pracach przeglądowych [3, 18, 23]. Dotychczas nie ukazała się żadna publikacja, dotycząca udziału tych związków w regulacji ustępowania spoczynku i kiełkowania nasion. Niniejsza praca przedstawia aktualne wyniki badań dotyczące udziału jasmonidów w regulacji powyższych procesów fizjologicznych.

## 2. WYSTĘPOWANIE W NASIONACH

Kwas jasmonowy wykryto w nasionach wielu gatunków roślin o różnej przynależności systematycznej (tab. 1). Najwięcej identyfikacji tego regulatora przeprowadzono w nasionach roślin należących do rodziny *Leguminosae*. JA wykrywano częściej niż JA-Me. Jedynie w nasionach *Malus domestica* obydwa regulatory występowały jednocześnie [22]. Dotychczas tylko w nasionach *Malus domestica* wykryto obecność koniugatów JA [22]. Chemiczny charakter tych koniugatów nie został określony. Przypuszcza się, że podobnie jak w innym materiale roślinnym, również w nasionach, JA tworzy połączenia z aminokwasami (walina, izoleucyna i leucyna) i cukrami (glukoza i gencjobjoza). Uważa się, że części generatywne roślin, w tym nasiona, zawierają większe ilości badanych regulatorów niż części wegetatywne [16]. Zawartość JA w nasionach waha się w granicach 10–100 ng · g<sup>-1</sup> świeżej masy, w zależności od gatunku rośliny. Nasiona *Acer tataricum* zawierały trzykrotnie więcej JA niż nasiona *Malus domestica* [2, 22]. Różną zawartością związków jasmonowych charakteryzowały się nasiona *Malus domestica* w zależności od głębokości spoczynku [22]. Spoczynkowe nasiona oraz nasiona, w których spoczynek ustąpił w wyniku ich stratyfikacji, zawierały około 9 ng · g<sup>-1</sup> świeżej masy JA [22]. Po 30 dniach stratyfikacji nasion zawartość JA zwiększyła się stukrotnie. W tym czasie nasiona zawierały najwięcej JA podczas całego okresu stratyfikacji. Dane te wskazują, że w początkowym okresie stratyfikacji zachodzi w nasionach wzmoczona synteza tego regulatora. Podobny charakter zmian zawartości w tym okresie stratyfikacji nasion dotyczył koniugatów JA. W połowie okresu stratyfikacji nasion *Malus domestica* zawartość wolnego JA i jego koniugatów zmniejszyła się bardzo wyraźnie. Nasiona takie zawierały podobne ilości jasmonidów jak nasiona spoczynkowe. Uważa się, że obniżenie zawartości jasmonidów w zarodkach *Malus domestica* między 30 a 45 dniem stratyfikacji nasion jest prawdopodobnie związane jednocześnie z zahamowaniem ich syntezy oraz degradacją [22]. Ponowne zwiększenie zawartości wolnego JA

obserwowano w nasionach po 75 dniach ich stratyfikacji. Jednak nasiona te zawierały tylko 3 razy więcej wolnego JA niż nasiona znajdujące się w spoczynku. Przypuszcza się, że zwiększenie zawartości wolnego JA w tym okresie stratyfikacji nasion jest wynikiem jego uwalniania z form związanych. Natomiast obniżenie zawartości wolnej formy tego regulatora w ostatnim okresie stratyfikacji nasion jest wynikiem jego wiązania w koniugaty. Na korzyść powyższej sugestii przemawiają zmiany zawartości wolnego JA i stosunku ilościowego koniugatów JA do formy wolnej.

### 3. USTĘPOWANIE SPOCZYNKU PIERWOTNEGO

Niewiele wiadomo na temat znaczenia jasmonidów w regulacji kiełkowania nasion znajdujących się w spoczynku głębokim. W badaniach zmierzających do wyjaśnienia tego zagadnienia stosowano nasiona oleiste trzech gatunków roślin drzewiastych *Acer tataricum*, *Acer platanoides* i *Malus domestica* [2, 10, 19]. Spoczynek w tych nasionach ustępował w wyniku chłodnej stratyfikacji (0–5°C) trwającej 45–90 dni, w zależności od gatunku. Egzogenny kwas jasmonowy stymulował kiełkowanie zarodków

TABELA 1. Występowanie JA w nasionach różnych gatunków roślin, objaśnienia do tabeli: GC – chromatografia gazowa, GC-MS – chromatografia gazowa + spektrometria masowa, GC-MS/SIM – chromatografia gazowa + spektrometria masowa/selektywny monitoring jonów, HPLC – wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa, RIA – analiza radioimmunologiczna

Rodzina/Gatunek	Stan fizjologiczny nasion	Zawartość, ng · g <sup>-1</sup> świeżej masy	Metoda	Literatura
<b>Aceraceae:</b> <i>Acer tataricum</i>	spoczynkowe	30	GC-MS	[2]
<b>Compositae:</b> <i>Helianthus annuus</i>	niedojrzałe	10–100	GC, HPLC	[16]
<b>Leguminosae:</b>				
<i>Dolichos lablab</i>	niedojrzałe	77	GC-MS	[27]
	dojrzałe	10–100	RIA	[16]
<i>Glycine max.</i>	dojrzałe	10–100	RIA	jw.
<i>Lupinus albus</i>	dojrzałe	10–100	GC	
<i>Phaseolus vulgaris</i>	dojrzałe	10–100	GC	
		śladowe ilości	RIA	
<i>Pisum sativum</i>	niedojrzałe	10–100	GC	
<i>Vicia narbonensis</i>	niedojrzałe	10–100	GC	
<b>Rosaceae:</b> <i>Malus domestica</i>	spoczynkowe	8,9	GC-MS/SIM	[22]

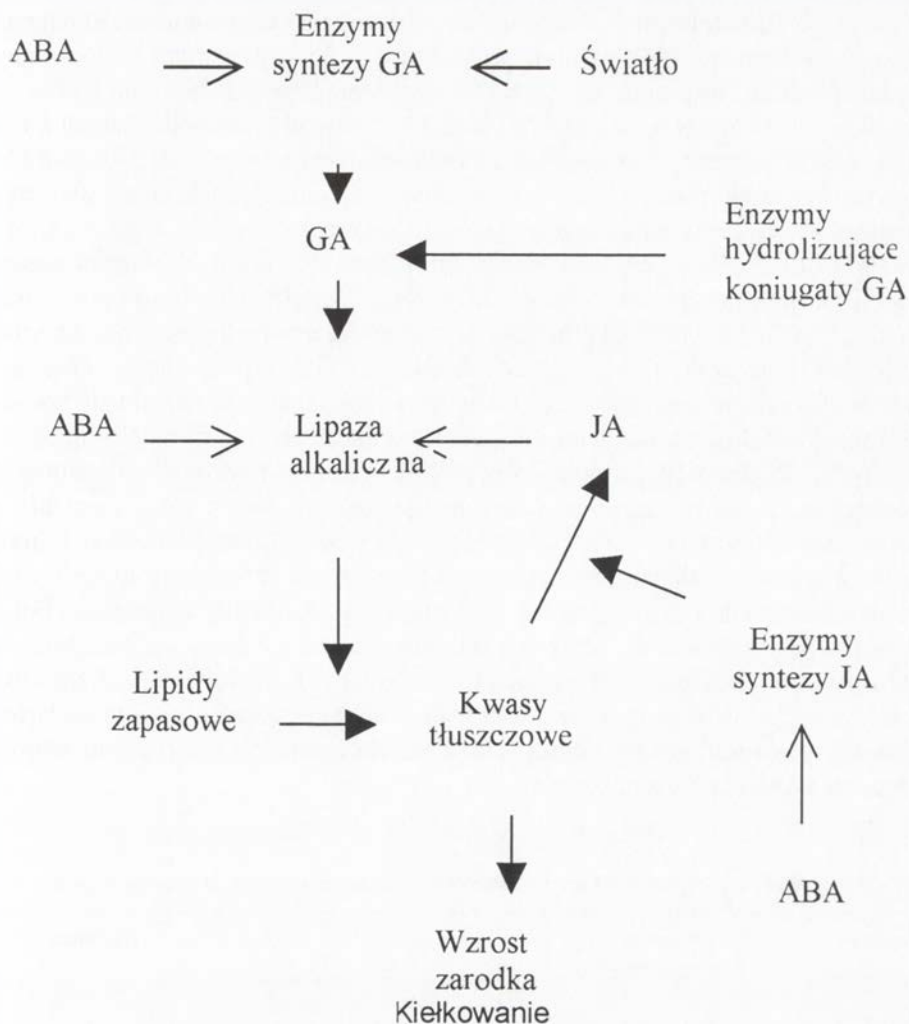
wyzolowanych ze spoczynkowych nasion tych roślin. Stwierdzono, że zarodki z nasion *Malus domestica* były najbardziej wrażliwe na ten regulator. JA stymulował kiełkowanie zarodków *Malus domestica* na świetle i w ciemności. JA stymulował także kiełkowanie zarodków wyizolowanych z nasion *Acer platanoides* i *Malus domestica* charakteryzujących się różną głębokością spoczynku [10, 21]. Wrażliwość zarodków wyizolowanych z nasion *Malus domestica* na egzogenny JA zmniejszała się w miarę wydłużania okresu ich stratyfikacji [21]. Zarodki takie charakteryzowały się również mniejszą wrażliwością na N,2-dwuhydrobenzamid (SHAM), inhibitor aktywności lipooksygenazy, obniżający zawartość endogennego JA w roślinach [22]. Powyższy fakt jest zrozumiały w powiązaniu ze zmianami zawartości jasmonidów w nasionach *Malus domestica* poddanych stratyfikacji (patrz rozdział 2) [22]. Kiełkowanie zarodków wyizolowanych z nasion *Acer tataricum*, w których spoczynek ustąpił w wyniku ich stratyfikacji, było hamowane przez JA [2]. Pochodna kwasu jasmonowego, jego ester metylowy podwyższał procent kiełkowania zarodków wyizolowanych z nasion *Malus domestica* znajdujących się w spoczynku głębokim. JA-Me bardziej stymulował kiełkowanie zarodków niż JA [22]. Prawdopodobnie jest to związane z większą lotnością JA-Me i łatwiejszą penetracją związku do komórek. Natomiast egzogenny koniugat JA z izoleucyną wyraźnie hamował kiełkowanie zarodków. Zatem znaczenie endogennych koniugatów JA w posprzętnym dojrzewaniu nasion *Malus domestica*, jeśli charakteryzują się one aktywnością fizjologiczną podobną do egzogennej JA izoleucyny, jest trudne do wytłumaczenia. Być może zawartość endogennego, wolnego JA jest równoważona przez ilość endogennych koniugatów JA. Podczas pierwszego okresu stratyfikacji biosynteza tych związków zachodzi równolegle. Wobec powyższego zmiany ilościowe endogennych jasmonidów podczas stratyfikacji nasion *Malus domestica* nie mają znaczenia w regulacji ustępowania spoczynku w tych nasionach [22]. Nie wyklucza się również, że endogenne koniugaty JA charakteryzują się aktywnością fizjologiczną podobną do wolnego JA lub są nieaktywne w kontroli ustępowania spoczynku. Zgodnie z tą sugestią ich znaczenie może ograniczać się do regulowania zawartości wolnego JA przez ich wzajemne przemiany.

Podstawowym założeniem hipotezy dotyczącej udziału endogennego, wolnego JA w regulacji ustępowania spoczynku nasion *Malus domestica* jest akumulacja odpowiedniej ilości tego regulatora w nasionach [22]. Prowadzi to do uruchomienia pewnych, „kardynalnych” procesów powodujących całkowite przerwanie spoczynku. Jednym z takich procesów jest prawdopodobnie mobilizacja rezerw lipidowych (triacylogliceroli), niezbędnych do kiełkowania zarodków nasion *Malus domestica*. Enzymem inicjującym ten proces jest alkaliczna lipaza. Na korzyść hipotezy dotyczącej udziału endogennych jasmonidów w regulacji przerywania spoczynku przemawia także fakt, że procent skiełkowanych zarodków zwiększał się wraz ze zwiększeniem zawartości endogennych jasmonidów w zarodkach, podczas ich kiełkowania [21]. Kolejnym potwierdzeniem udziału endogennego JA w regulacji ustępowania spoczynku nasion tego gatunku były wyniki badań z wykorzystaniem SHAM i galusanu n-propylu (PG – podobnie do SHAM obniża zawartość jasmonidów w nasionach) [24]. Związki te hamowały kiełkowanie i aktywność alkalicznej lipazy w zarodkach wyizolowanych

z niestratyfikowanych nasion *Malus domestica* [19]. Za słusznością powyższej koncepcji przemawia fakt, że endogenne JA można zastąpić egzogenne. Wykazano, że egzogenne JA stymulował zarówno kiełkowanie zarodków wyizolowanych z niestratyfikowanych nasion oraz aktywność alkalicznej lipazy *in vivo* [19, 20, 21]. Egzogenne JA prawie całkowicie znosił hamujący wpływ SHAM i PG na aktywność alkalicznej lipazy oraz częściowo na kiełkowanie zarodków. Prawdopodobnie wpływ JA na aktywność alkalicznej lipazy związany jest z jego udziałem w kontroli aktywności enzymu bez wpływu na jego syntezę. Wykazano, że egzogenne JA stymulował również aktywność tego enzymu, jeśli stosowano go w mieszaninie reakcyjnej *in vitro* [21]. JA zwiększał także aktywność kwaśnej lipazy w nasionach *Malus domestica*. Wpływ JA zależał od głębokości spoczynku nasion i zmniejszał się w miarę jego ustępowania podczas stratyfikacji nasion [21]. Zwiększenie aktywności kwaśnej lipazy pod wpływem JA obserwowano również po zastosowaniu regulatora w mieszaninie reakcyjnej. Dane te sugerują, że wpływ JA, podobnie jak na alkaliczną lipazę, jest związany z udziałem w regulacji aktywności tego enzymu, a nie syntezy. Egzogenne JA stymulował także aktywność proteaz w zarodkach wyizolowanych ze spoczynkowych nasion *Malus domestica*, zarówno *in vivo* jak i *in vitro* [21]. Antagonistyczny wpływ egzogenne JA i kwasu abscysynowego (ABA) na kiełkowanie i aktywność alkalicznej i kwaśnej lipazy w zarodkach wyizolowanych z niestratyfikowanych nasion *Malus domestica* sugeruje przeciwstawny udział obydwu regulatorów w kontroli ustępowania spoczynku w tych nasionach [20, 21].

Prawdopodobnie JA uczestniczy w regulacji przerywania spoczynku zarodków *Malus domestica* inaczej niż przez działanie gibereliny i światła. Świadczy o tym addytywny wpływ egzogenne JA i gibereliny  $A_3$  ( $GA_3$ ) na kiełkowanie wyizolowanych zarodków [19, 20]. Podobny rodzaj współdziałania stwierdzono pomiędzy JA i światłem [19, 20]. Ponadto zarodki wyizolowane z niestratyfikowanych nasion charakteryzowały się zróżnicowaną wrażliwością na JA i  $GA_3$ , w zależności od czasu ich inkubacji.

Na podstawie uzyskanych wyników badań Ranjan i Lewak [21] zaproponowali model działania JA, w powiązaniu z innymi regulatorami, w kontroli ustępowania spoczynku w nasionach *Malus domestica* (ryc. 2). Według tych autorów egzogenne lub endogenne JA uczestniczy w regulacji aktywności alkalicznej lipazy w inny sposób niż pod wpływem światła i gibereliny. Odpowiednia zawartość endogenne JA lub dostarczenie egzogenne JA prowadzi do uruchomienia lipidowych rezerw zapasowych i umożliwia kiełkowanie nasion. ABA, działający przeciwstawnie do JA, prawdopodobnie hamuje aktywność alkalicznej lipazy niezależnie od JA lub blokuje syntezę endogenne JA w nasionach.



RYSUNEK 2. Proponowany model działania JA w regulacji ustępowania spoczynku nasion *Malus domestica* związany z aktywowaniem alkalicznej lipazy [21], giberelina i JA stymuluje, ABA hamuje

#### 4. KIEŁKOWANIE NASION NIE ZNAJDUJĄCYCH SIĘ W SPOCZYNKU

Niewiele jest danych dotyczących udziału jasmonidów w regulacji kiełkowania nasion nieznajdujących się w spoczynku głębokim. W dotychczas przeprowadzonych badaniach zmierzających do wyjaśnienia tego zagadnienia wykorzystano nasiona zaledwie kilku gatunków roślin. Stwierdzono zależność między działaniem tych związków a rodzajem materiału zapasowego w nasionach. Wykazano, że jasmonidy są inhibitorami kiełkowania nasion, w których materiał zapasowy stanowiła skrobia. Egzogenny JA hamował kiełkowanie skrobiowych nasion *Avena sativa*, *Triticum durum* i *Lactuca*

*sativa* [10, 27]. Natomiast regulator ten nie wpływał na kiełkowanie oleistych nasion *Linum usitatissimum* [10]. Jedynie w stężeniu  $2 \times 10^{-3}$  M, najwyższym ze stosowanych, w niewielkim stopniu ograniczał ten proces. JA nie wpływał także na kiełkowanie skrobiowych nasion *Amaranthus caudatus* [4]. Spośród badanych, nasiona *Lactuca sativa* charakteryzowały się największą wrażliwością na JA (tab. 2). Choć JA nie wpływał na kiełkowanie nasion *Amaranthus caudatus*, jednak jasmonian metylu hamował kiełkowanie nasion tego gatunku [12] oraz skrobiowych nasion *Amaranthus paniculatus*, *Xanthium pennsylvanicum*, pszenżyta [15, 17, 26] jak również oleistych nasion *Helianthus annuus* [8]. Zróżnicowana wrażliwość nasion *Amaranthus caudatus* na JA i JA-Me jest prawdopodobnie związana, podobnie jak w przypadku zarodków *Malus domestica* z większą lotnością metylowej pochodnej w stosunku do wolnego kwasu i wynikającą z tego faktu łatwiejszą penetracją związku do komórek. Nasiona *Xanthium pennsylvanicum* charakteryzowały się największą, spośród badanych, wrażliwością na egzogeny JA-Me. Nasiona *Amaranthus caudatus* były bardziej wrażliwe na jasmonian metylu niż nasiona *Amaranthus paniculatus* i *Helianthus annuus* (tab. 3). Hamujący wpływ JA-Me na kiełkowanie nasion *Helianthus annuus* zależał od stężenia tlenu w atmosferze, im stężenie  $O_2$  było wyższe tym działanie inhibitora mniejsze [8]. Sugeruje to, że JA-Me ulega utlenianiu. Ponadto JA-Me hamował pobieranie tlenu przez te nasiona, co może wskazywać na ograniczanie intensywności procesu oddychania w kiełkujących nasionach. Zróżnicowana wrażliwość nasion na jasmonidy jest prawdopodobnie związana z różną zawartością endogennych regulatorów, różną wrażliwością komórek lub różnym stopniem przepuszczalności okrywy nasiennych.

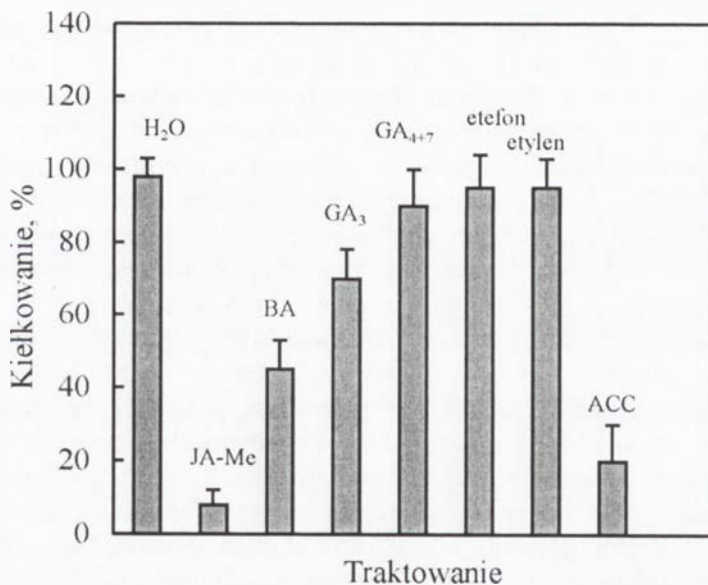
TABELA 2. Wpływ JA  $4,5 \times 10^{-7}$  M lub  $10^{-3}$  M na kiełkowanie nasion różnych gatunków roślin

Gatunek	Materiał zapasowy	% inhibicji		Literatura
		$4,5 \times 10^{-7}$ M	$10^{-3}$ M	
<i>Amaranthus caudatus</i>	skrobia	0±2	5±3	[4]
<i>Avena sativa</i>	skrobia	0±3	0	[10]
<i>Lactuca sativa</i>	skrobia	13±5	nie badano	[27]
<i>Linum usitatissimum</i>	lipidy	0±4	6±5	[10]
<i>Triticum durum</i>	skrobia	0±2	0	[10]

TABELA 3. Wpływ JA-Me  $10^{-4}$  M lub  $10^{-3}$  M na kiełkowanie różnych gatunków nasion

Gatunek	Materiał zapasowy	% inhibicji		Literatura
		$10^{-4}$ M	$10^{-3}$ M	
<i>Amaranthus caudatus</i>	skrobia	15±5	95±1	[12]
<i>Amaranthus paniculatus</i>	skrobia	10±8	82±5	[15]
<i>Helianthus annuus</i>	lipidy	0	20±7	[8]
Pszennyto	skrobia	2±5	28±8	[26]
<i>Xanthium pennsylvanicum</i>	skrobia	60±10	100	[17]

Odwracanie inhibicji kiełkowania nasion *Amaranthus caudatus* spowodowanej JA-Me przez egzogenne cytokininy, gibereliny i etylen wskazuje, że nasiona poddane działaniu JA-Me charakteryzują się zwiększonym zapotrzebowaniem na te stymulatory w porównaniu z nasionami nietraktowanymi JA-Me [6, 7, 12, 13, 14]. Podobna zależność dotyczyła nasion *Amaranthus paniculatus* [15]. Spośród zastosowanych stymulatorów etylen był najskuteczniejszy w znoszeniu inhibicji kiełkowania nasion *Amaranthus caudatus* (ryc. 3). JA-Me zwiększał jedynie zapotrzebowanie na egzogenne etylen u



RYSUNEK 3. Wpływ BA  $10^{-5}$  M, GA<sub>3</sub>  $3 \times 10^{-4}$  M, GA<sub>4</sub>  $3 \times 10^{-5}$  M, etefonu  $3 \times 10^{-4}$  M, etylenu  $4,5 \times 10^{-7}$  M i ACC  $10^{-3}$  M na kiełkowanie nasion *Amaranthus caudatus* w obecności  $10^{-3}$  M JA-Me, w temperaturze 25° C, w ciemności, po 5 dniach inkubacji. Wpływ etylenu określono po 3 dniach inkubacji [6, 12, 13, 14]

nasion *Xanthium pennsylvanicum*, natomiast nie zmieniał ich wrażliwości na giberelinę  $A_3$  ( $GA_3$ ), benzyloadeninę (BA) i kwas indolilo-3-octowy (IAA) [17]. Odwracanie inhibicji kiełkowania nasion spowodowanej JA-Me przez cytokininy, gibereliny lub etylen wskazuje, że regulator ten i wymienione stymulatory w sposób przeciwstawny kontrolują procesy prowadzące do skiełkowania nasion. Ponadto wskazuje, że działanie JA-Me nie było toksyczne. Znoszenie inhibicji kiełkowania nasion spowodowanej JA-Me przez egzogenne etylen sugerowało udział tego inhibitora w kontroli biosyntezy etylenu podczas ich kiełkowania. Także odwracanie hamującego wpływu JA-Me na kiełkowanie nasion *Amaranthus caudatus* przez kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowy (ACC), bezpośredni prekursor biosyntezy etylenu wskazywało na taką możliwość [4, 12, 13]. ACC był jednak mniej skuteczny niż gibereliny, etefon i etylen, jego wpływ zależał od zastosowanego stężenia JA-Me. Nasiona *Amaranthus caudatus* i *Amaranthus paniculatus* preinkubowane w obecności JA-Me, prawie całkowicie lub częściowo odzyskiwały zdolność do kiełkowania po przeniesieniu do wody [4, 15]. Dane te również wskazują na nietoksyczne działanie JA-Me. Stopień ustępowania inhibicji był ściśle związany z okresem preinkubacji w obecności tego związku. Synergizm pomiędzy gibereliną  $A_3$ ,  $A_{4+7}$  i etefonem [12], BA i etefonem (Białicka i Kępczyński, dane niepublikowane) w odwracaniu inhibicji kiełkowania nasion *Amaranthus caudatus* spowodowanej JA-Me prawdopodobnie oznacza, że stymulatory te kontrolują te same lub pokrewne procesy prowadzące do kiełkowania nasion, zahamowane przez JA-Me. Synergistyczne współdziałanie pomiędzy giberelinami i ACC [12], BA i ACC (Białicka i Kępczyński, dane niepublikowane) w znoszeniu inhibicji kiełkowania nasion *Amaranthus caudatus* wywołanej przez JA-Me sugerowało, że stymulatory te mogą wpływać na przekształcanie egzogenego ACC do etylenu, czyli uczestniczą w kontroli aktywności oksydazy ACC, enzymu przekształcającego ACC do etylenu. Hipoteza dotycząca udziału JA-Me w regulacji biosyntezy etylenu została potwierdzona w doświadczeniach przeprowadzonych z wykorzystaniem nasion *Amaranthus caudatus* i *Xanthium pennsylvanicum*. Egzogenne JA-Me hamował produkcję etylenu podczas kiełkowania nasion *Amaranthus caudatus* [13, 14] oraz *Xanthium pennsylvanicum* [17]. Ograniczenie wydzielania etylenu przez te nasiona było związane z obniżoną zawartością endogenego ACC. Dane te wskazują, że JA-Me hamuje także aktywność syntazy ACC, enzymu odpowiedzialnego za formowanie endogenego ACC podczas kiełkowania nasion *Amaranthus caudatus* i *Xanthium pennsylvanicum*. JA-Me obniżał również zawartość malonylo-ACC (MACC tworzy się w reakcji ACC z kwasem malonowym) w nasionach *Amaranthus caudatus* [13, 14]. Prawdopodobnie oznacza to, że JA-Me hamuje aktywność MACC transferazy, enzymu katalizującego przemianę ACC do MACC. Takiej zależności nie stwierdzono w przypadku nasion *Xanthium pennsylvanicum*. Zmniejszenie wydzielania etylenu spowodowane JA-Me przez nasiona *Amaranthus caudatus* [14] i *Xanthium pennsylvanicum* [17] związane było z obniżeniem aktywności oksydazy ACC *in vivo*. JA-Me zastosowany w stężeniu  $3 \times 10^{-4}$  M, mimo iż wyraźnie hamował kiełkowanie nasion *Amaranthus caudatus* [14] nie wpływał na aktywność oksydazy ACC *in vivo*. Dane te tłumaczą, dlaczego



inhibicja kiełkowania nasion spowodowana przez JA-Me zastosowany w tym stężeniu była odwracana przez egzogenny ACC. JA-Me obniżał również aktywność oksydazy ACC *in vitro* w nasionach *Amaranthus caudatus* [14]. Na podstawie badań przeprowadzonych z wykorzystaniem nasion *Xanthium pennsylvanicum* sugerowano, że prawdopodobnie przyczyną zahamowania kiełkowania tych nasion spowodowaną przez JA-Me jest zahamowanie produkcji etylenu związane z obniżeniem aktywności syntazy ACC [17]. Kępczyński i wsp. [14] sugerują, że jedną z najważniejszych przyczyn zahamowania kiełkowania nasion *Amaranthus caudatus* wywołaną przez JA-Me jest również ograniczenie wydzielania etylenu. Zahamowanie produkcji etylenu przez te nasiona związane jest z obniżeniem aktywności i/lub syntezy oksydazy ACC. Hipoteza dotycząca udziału giberelin i cytokinin w regulacji aktywności oksydazy ACC w nasionach *Amaranthus caudatus* nie została potwierdzona. GA<sub>3</sub> lub BA nie wpływały na aktywność tego enzymu *in vivo* w nasionach poddanych działaniu JA-Me, w stadium przed wyłonieniem się korzenia zarodkowego [7]. Jednak działanie endogennego etylenu jest niezbędne dla zniesienia hamującego wpływu JA-Me na kiełkowanie nasion *Amaranthus caudatus* przez GA<sub>3</sub>, GA<sub>4+7</sub> oraz BA [7]. Wykazano to w doświadczeniach z wykorzystaniem specyficznego inhibitora działania etylenu, norbornadienu (NBD). Prawdopodobnie hamujący wpływ JA-Me na kiełkowanie nasion *Amaranthus caudatus* związany jest także z udziałem tego regulatora w kontroli uruchamiania węglowodanowych substancji zapasowych w nasionach. JA-Me obniżał podczas kiełkowania tych nasion aktywność  $\alpha$ -amylazy, jednego z kluczowych enzymów odpowiedzialnych za hydrolizę skrobi [5]. Odwracanie inhibicji kiełkowania nasion wywołanej JA-Me przez egzogenny etylen lub gibereliny jest być może związane z udziałem tych stymulatorów w regulacji aktywności tego enzymu w obecności JA-Me. Egzogenny etylen lub GA<sub>3</sub> podwyższały aktywność  $\alpha$ -amylazy w nasionach poddanych działaniu JA-Me, przed wyłonieniem się korzonka zarodkowego [5]. Etylen był bardziej skuteczny niż giberelina. BA nie wpływała na aktywność tego enzymu w nasionach poddanych działaniu JA-Me [5]. JA-Me w niewielkim stopniu wpływał na formowanie się polirybosomów w ziarniakach pszenżyta [26]. Czy oznacza to, że JA-Me nie wpływa na transkrypcję RNA i translację białek rybosomalnych w kiełkujących ziarniakach pszenżyta należałoby potwierdzić stosując znakowane prekursorzy, szczególnie mRNA.

Udział egzogennego JA-Me w regulacji kiełkowania nasion niespoczynkowych jest prawdopodobnie związany z kontrolą wielu procesów metabolicznych. Do tych procesów należy zaliczyć: oddychanie nasion, biosyntezę etylenu czy też uruchamianie rezerw zapasowych w kiełkujących nasionach.

## 5. PODSUMOWANIE

Jasmonidy wykryto w nasionach wielu gatunków roślin. Wpływ egzogennych jasmonidów na nasiona zależy od stanu fizjologicznego tych organów. Jasmonidy są stymulatorami kiełkowania nasion charakteryzujących się spoczynkiem głębokim,

natomiast hamują kiełkowanie nasion nieznajdujących się w spoczynku. Prawdopodobnie w spoczynkowych nasionach *Malus domestica*, a niewykluczone, że w spoczynkowych nasionach innych gatunków roślin, w których materiał zapasowy stanowią lipidy, endogenny kwas jasmonowy jest jednym z fitohormonów uczestniczących w kontroli ustępowania spoczynku pierwotnego. Udział JA związany jest ze stymulowaniem aktywności lipaz, enzymów odpowiedzialnych za uruchamianie substancji zapasowych. Regulacja ustępowania spoczynku pierwotnego w nasionach *Malus domestica* przez JA zachodzi w inny sposób niż kontrolowanie przez gibereliny i światło. JA i ABA w sposób przeciwstawny kontrolują proces ustępowania spoczynku w tych nasionach. Hamujący wpływ JA-Me na kiełkowanie niespoczynkowych nasion *Amaranthus caudatus* i *Xanthium pennsylvanicum* związany jest z udziałem tego regulatora w regulacji biosyntezy etylenu. JA-Me obniża produkcję etylenu, poprzez zahamowanie aktywności i/lub syntezy syntazy ACC, enzymu odpowiedzialnego za formowanie kwasu l-aminocyklopropano-1-karboksylowego (ACC), bezpośredniego prekursora biosyntezy etylenu oraz oksydazy ACC, enzymu odpowiedzialnego za przekształcanie ACC do etylenu. Nasiona *Amaranthus caudatus* poddane działaniu JA-Me wykazują zwiększone zapotrzebowanie na egzogenne cytokiny i gibereliny. Stymulatory te w odwracaniu inhibicji kiełkowania nasion wywołanej przez JA-Me działają za pośrednictwem endogennego etylenu. Prawdopodobnie, oprócz zahamowania produkcji etylenu, przyczyną inhibicji kiełkowania nasion *Amaranthus caudatus* spowodowaną JA-Me jest udział tego regulatora w kontroli uruchamiania węglowo-danowych substancji zapasowych. Zaangażowanie jasmonidów w regulację ważnych procesów metabolicznych prowadzi do przzerwania spoczynku lub też zahamowania kiełkowania nasion, w zależności od ich stanu fizjologicznego.

## LITERATURA

- [1] ALDRIDGE DG, GALT S, GILES D, TURNER WB. Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. *J Chem Soc* 1971; (C):1623–1627.
- [2] BERESTETZKY V, DATHE W, DALETSKAYA T, MUSATENKO L, SEMBDNER G. Jasmonic acid in seed dormancy of *Acer tataricum*. *Biochem Physiol Pflanz* 1991; **187**: 13–19.
- [3] BIAŁECKA B, KĘPCZYŃSKI J. Rola kwasu jasmonowego i jego estru metylowego we wzroście i rozwoju roślin. *Wiad Bot* 1998; **42** (3/4): 61–78.
- [4] BIAŁECKA B, KĘPCZYŃSKI J. Wpływ etefonu, ACC i gibereliny A<sub>3</sub> na kiełkowanie nasion *Amaranthus caudatus* L. preinkubowanych w obecności estru metylowego kwasu jasmonowego. *Zesz Nauk US Acta Biol.* 1998; **5**: 17–28.
- [5] BIAŁECKA B, KĘPCZYŃSKI J. The regulation of  $\alpha$ -amylase activity in *Amaranthus caudatus* seeds by methyl jasmonate, gibberellin A<sub>3</sub>, benzyladenine and ethylene. *Plant Growth Regul.* 2003; **39**:51–56.
- [6] BIAŁECKA B, KĘPCZYŃSKI J. Współdziałanie JA-Me ze stymulatorami wzrostu w regulacji kiełkowania nasion *Amaranthus caudatus* L. II Ogólnopolskie Sympozjum „Człowiek i Środowisko Przyrodnicze Pomorza Zachodniego”. Szczecin – Łukęcin. 2001; 129.
- [7] BIAŁECKA B, KĘPCZYŃSKI J. The role of ethylene i reversing methyl jasmonate inhibition of *Amaranthus caudatus* seed germination induced by gibberellins or benzyladenine. 2002; (*Plant Growth Regul* w druku).
- [8] CORBINEAU F, RUDNICKI RM, COME D. The effect of methyl jasmonate on sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed germination and seedling development. *Plant Growth Regul* 1988; **7**: 157–169.

- [9] CRABALONA L. Presence of levorotatory methyl jasmonate, methyl cis-2 (2-pente-1-yl)-3-oxo-cyclopentenyl acetate, in the essential oil of Tunisian rosemary. *C R Acad Sci Paris C* 1967; **264**: 2074–2076.
- [10] DALETSKAYA TV, SEMBDNER G. Effect of jasmonic acid on germination of nondormant and dormant seeds. *Fiziol Rast* 1989; **36**: 118–1123.
- [11] DEMOLE E, LEDERER E, MERCIER D. Isoelement et determination de la structure de jasmonate de methyle, constituant odorant caracteristique de l' essence de jasmin. *Helv Chim Acta* 1962; **45**: 675–685.
- [12] KĘPCZYŃSKI J, BIAŁECKA B. Stimulatory effect of ethephon, ACC, gibberellin A<sub>3</sub> and A<sub>4,7</sub> on germination of methyl jasmonate inhibited *Amaranthus caudatus* L. seeds. *Plant Growth Regul* 1994; **14**: 211–216.
- [13] KĘPCZYŃSKI J, BIAŁECKA B. The role of methyl jasmonate in germination of *Amaranthus caudatus* L. seeds. [w] Ellis RH, Black M, Murdoch AJ, Hong TD (red.) *Basic and Applied Aspects of Seed Biology*; Dordrecht: Kluwer Academic Publishers 1997; 523–529.
- [14] KĘPCZYŃSKI J, BIAŁECKA B, KĘPCZYŃSKA E. Ethylene biosynthesis in *Amaranthus caudatus* seeds in response to methyl jasmonate. *Plant Growth Regul* 1999; **28**: 59–65.
- [15] KĘPCZYŃSKI J, BIHUN M. Wpływ stymulatorów wzrostu na kielkowanie nasion *Amaranthus paniculatus* w obecności estru metylowego kwasu jasmonowego. *Zesz Nauk US Acta Biol* 1997; **4**: 61–71.
- [16] MEYER A, MIERSCH O, BUTNER C, DATHE W, SEMBDNER G. Occurrence of the plant growth regulator jasmonic acid in plants. *J Plant Growth Regul* 1984; **3**: 1–8.
- [17] NOJAVAN-ASGHARI M, ISHIZAWA K. Inhibitory effects of methyl jasmonate on the germination and ethylene production in coclebur seeds. *J Plant Growth Regul* 1998; **17**: 13–18.
- [18] PARTHIER B, BRUCKNER C, DATHE W, HAUSE B, HERMANN G, KNOFEL HD, KRAMELL HM, KRAMELL R, LEHMANN J, MIERSCH O, REINBOTHE S, SEMBDNER G, WASTERNAK C, NIEDEN U. Jasmonates: Metabolism, biological activities, and modes of action in senescence and stress responses. [w] Karssen CM, Vreugdenhil LC. (red.) *Progress in plant growth regulation*, Dordrecht, Boston, London. Kluwer Academic Publishers 1992; 276–285.
- [19] RANJAN R, LEWAK S. Jasmonic acid promotes germination and lipase activity in non-stratified apple embryos. *Physiol Plant* 1992; **86**: 335–339.
- [20] RANJAN R, LEWAK S. Interaction of jasmonic acid with some plant growth regulators in the control of apple (*Malus domestica*) embryo germination. *Plant Growth Regul* 1994; **14**: 159–166.
- [21] RANJAN R, LEWAK S. Interaction of jasmonic acid and abscisic acid in the control of lipases and proteases in germinating apple embryos. *Physiol Plant* 1995; **93**: 421–426.
- [22] RANJAN R, MIERSCH O, SEMBDNER G, LEWAK S. Presence and role of jasmonate in apple embryos. *Physiol Plant* 1994; **90**: 548–552.
- [23] SEMBDNER G, PARTHIER B. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1993; **44**: 569–589.
- [24] STASWICK PE, JING-FENG H, YOON R. Nitrogen and methyl jasmonate induction of soybean vegetative storage protein genes. *Plant Physiol* 1991; **96**: 130–136.
- [25] VICK BA, ZIMMERMANN DC. Oxidative systems for the modification of fatty acids. [w] Stumpf P, Conn E (red.) *Biochemistry of Plants, Lipids*. New York: Academic 1984; **9**: 40–53.
- [26] WIDEJKO D, ZALEWSKI K, LAHUTA LB, SOCHA A. Wpływ estru metylowego kwasu jasmonowego na formowanie polirybosomów i kielkowanie ziarna pszenżyta ozimego odmiany Ugo. *Folia Univ Agric Stet (Zesz Nauk AR w Szczecinie)* 2000; **82**: 321–324.
- [27] YAMANE H, TAKAGI H, ABE T, YOKATA T, TAKAHASHI N. Identification of jasmonic acid in three species of higher plants and its biological activities. *Plant Cell Physiol* 1981; **22**: 689–697.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 15.12.2002 r.

Przyjęto: 17.01.2003 r.

ul. Wąska 13, 71-415 Szczecin,

e-mail: b.bial@jycos.com,

The first part of the paper discusses the importance of the user's perspective in the design of information systems. It argues that a user-centred approach is essential for creating systems that are effective and usable. The second part of the paper describes the methods used to collect and analyse user requirements. This includes interviews, focus groups, and surveys. The third part of the paper discusses the design of the information system, including the selection of features and the development of the user interface. The fourth part of the paper discusses the evaluation of the information system, including the use of usability testing and user feedback. The paper concludes by discussing the implications of the findings for the design of information systems.

## ESTROGENY I ICH ROLA W REGULACJI SPERMATOGENEZY\*

### ESTROGENS AND THEIR ROLE IN THE REGULATION OF SPERMATOGENESIS

Anna PAZIEWSKA, Barbara BILIŃSKA

Pracownia Endokrynologii i Hodowli Tkanki, Instytut Zoologii,  
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

*Streszczenie:* W artykule przedstawiono mechanizm działania estrogenów i ich znaczenie dla prawidłowego rozrodu samca. W gonadzie męskiej estrogeny produkowane są przez komórki Leydiga i Sertoliego oraz przez kolejne stadia komórek gametogenicznych. Obecność receptorów estrogenowych stwierdzono w jądrach, kanalikach odprowadzających, najądrzach i gruczołach dodatkowych. Estrogeny oddziałują na męski układ rozrodczy pośrednio, regulując wydzielanie gonadotropin przez przysadkę mózgową, i bezpośrednio, wpływając na proliferację, dojrzewanie i funkcje komórek Leydiga i Sertoliego oraz kontrolując podziały, różnicowanie i przeżywanie komórek plemnikotwórczych. Najnowsze badania prowadzone na myszach transgenicznym pozbawionych receptorów estrogenowych i aromatazy dostarczyły jednoznacznych dowodów, że estrogeny i ich receptory są konieczne do prawidłowego przebiegu spermatogenezy i płodności samców. Mimo licznych badań prowadzonych na modelach zwierzęcych, hodowlach komórkowych oraz obserwacji pacjentów z zaburzeniami syntezy estrogenów, wiele aspektów działania tych hormonów na męskie funkcje reprodukcyjne wymaga jeszcze wyjaśnienia.

*Słowa kluczowe:* estrogeny, receptory estrogenowe, aromataza, spermatogeneza, gonada męska, myszy transgeniczne.

*Summary:* In this review the site of aromatization as well as new biochemical and molecular aspects of the action of estrogens are presented. In the male gonad, estrogens are synthesized by Leydig cells, Sertoli cells, and germ cells. Estrogen receptors are expressed in the testis, efferent ductules, epididymis, and prostate. In males, estrogens are clearly involved in the negative feedback effects of testosterone on the brain to control pituitary gonadotropin release. Recent evidence suggests that estrogens may also exert paracrine actions within the testis itself. These hormones play an important role in proliferation and differentiation of Sertoli and Leydig cells as well as they are implicated in the regulation of germ cell development. Recent studies on the spermatogenic phenotypes in knockout mice lacking functional estrogen receptors and aromatase provide clear evidence that estrogens and their receptors are required

\*W artykule wykorzystano materiały zakupione w ramach Badawczego Projektu Zamawianego: PBZ-KBN 084/PO6/2002 realizowanego w latach 2003–2005..

for induction and/or maintenance of spermatogenesis. However, precise, physiological functions of estrogens and their mechanisms of action in the male reproductive tract are still not fully understood.

*Key words:* estrogens, estrogen receptors, aromatase, spermatogenesis, testis, transgenic mice.

## WSTĘP

Estrogeny przez wiele lat były postrzegane jako żeńskie hormony płciowe, chociaż ich obecność w gonadzie męskiej została wykryta już w 1921 roku. Jednak do połowy lat dziewięćdziesiątych znaczenie tych hormonów dla funkcjonowania męskiego układu rozrodczego pozostawało niejasne.

Prowadzone w ostatnich latach, intensywne badania nad rolą estrogenów u samców wykazały, że hormony te wpływają na wiele aspektów męskiej fizjologii, m.in. odpowiadają za ekspresję zachowań seksualnych. Wiadomo bowiem od dawna, że różnicowanie płciowe mózgu oraz jego organizacja są zależne od testosteronu wydzielanego w okresie życia płodowego samca, natomiast w wyniku najnowszych badań wiadomo, że efekty te są wynikiem konwersji testosteronu do estradiolu i działania tych hormonów poprzez receptory estrogenowe obecne w mózgu (patrz, praca przeglądowa [83]). Wykazanie znacznej aktywności aromatazy w jądrze nadwzrokowym podwzgórza stanowi potwierdzenie zachodzącego tam procesu aromatyzacji androgenów będących substratem dla estrogenów [16]. Fakt, że dymorfizm zachowań seksualnych jest zależny od estrogenów potwierdza wykazana ostatnio odmienna ekspresja receptorów estrogenowych w jądrach nadwzrokowych samców i samic [35]. Estrogeny wpływają ponadto na mineralizację kości i rozwój układu szkieletowego. W świetle najnowszych badań wiadomo, że hormony te są odpowiedzialne za zanikanie chrząstki nasadowej kości długich oraz zakończenie wzrostu w okresie pokwitania [83]. Niedobór estrogenów (spowodowany np. mutacją w genie kodującym aromatazę) prowadzi do osteoporozy i zaburzeń rozwoju układu kostnego [18, 22]. Estrogeny wywierają też protekcyjny wpływ na układ krążenia, hamując odpowiedź na jego uszkodzenia i rozwój arteriosklerozy [59].

Kluczowe znaczenie dla postępu badań nad wpływem estrogenów na funkcjonowanie męskiego układu rozrodczego miało odkrycie i sklonowanie w 1996 roku receptora estrogenowego  $\beta$ , który poza wieloma innymi tkankami obecny jest też w jądrach i prostaty [42, 62]. Wykazanie receptora dla estrogenów w męskich komórkach gametogenicznych oraz w komórkach Sertoliego pozwoliło na stwierdzenie, że hormony te biorą udział w regulacji spermatogenezy. Przez wiele lat główną rolę w regulacji tego procesu przypisywano testosteronowi, który może działać pośrednio na komórki szeregu spermatogenezy poprzez receptory androgenowe zlokalizowane w komórkach Sertoliego, gdyż komórki plemnikotwórcze nie mają receptorów androgenowych [5]. Hormon ten może wpływać na różnicowanie komórek plemnikotwórczych także bezpośrednio, ale dopiero po konwersji do estradiolu poprzez receptory estrogenowe.

Odkrycie tego faktu stało się przyczyną rozpoczęcia wielu badań nad rolą estrogenów w gonadzie męskiej.

## LOKALIZACJA AROMATAZY I JEJ DZIAŁANIE W JĄDRZE

Estrogeny są hormonami płciowymi należącymi do grupy hormonów steroidowych, pochodnych cholesterolu. Substratem do syntezy estrogenów są androgeny: testosteron i androstendion. Biosynteza estrogenów jest katalizowana przez aromatazę, kompleks enzymatyczny składający się z dwóch białek. Jednym jest specyficzna mikrosomalna hemoglikoproteina, cytochrom P450arom (P450arom), która jest odpowiedzialna za przyłączanie substratu i katalizowanie reakcji prowadzących do utworzenia fenolowego pierścienia charakterystycznego dla estrogenów. Drugim białkiem jest niespecyficzna mikrosomalna reduktaza flawoproteinowa (reduktaza NADPH cytochromu P450) odpowiedzialna za transfer elektronów z NADPH na cytochrom P450 [12, 13].

Aromataza jest produktem genu *CYP19* zlokalizowanego u człowieka na 15 chromosomie. Gen ten składa się z 17 eksonów, z których 9 ulega translacji. W jądrach i jajnikach ekspresja genu *CYP19* zachodzi pod kontrolą proksymalnego promotora, promotora II, którego aktywność jest regulowana przez cAMP i wymaga obecności czynników transkrypcyjnych CREB (ang. *cAMP Response Element Binding Protein*) i SF-1 (ang. *Steroidogenic Factor 1*) [9, 10, 14, 55]. W innych tkankach ekspresja tego genu jest uzależniona od innych czynników, np. w tkance tłuszczowej zachodzi ona pod kontrolą promotora I.4 i wymaga udziału IL-6, IL-11, onkostatyny M i TNF $\alpha$  [84].

Kompleks aromatazy jest zlokalizowany w gładkiej siateczce śródplazmatycznej większości komórek ssaków, a zatem biosynteza estrogenów jest szeroko rozpowszechniona w organizmie. Ekspresję aromatazy i zdolność do syntezy estradiolu wykryto u ludzi w jajnikach, jądrach, łożysku, wątrobie płodowej, tkance tłuszczowej, chondrocytach, osteoblastach oraz w mózgu (w podwzgórzcu, układzie limbicznym i korze mózgowej) [34, 69, 83].

Precyzyjna lokalizacja P450arom w gonadzie męskiej stała się w ciągu ostatnich kilkunastu lat przedmiotem wielu kontrowersji. Badania prowadzone na gryzoniach wykazały, że aromataza jest wytwarzana w komórkach jądra już podczas życia płodowego. W jądrze szczura aktywność aromatazy wykryto przed 19 dniem rozwoju prenatalnego. [95]. Na podstawie badań *in vitro* przypuszcza się, że aromataza jest wytwarzana w komórkach Sertoliego, gdyż w hodowlach tych komórek, izolowanych z jąder płodowych produkcja estrogenów jest stymulowana przez FSH, a właśnie receptory dla FSH pojawiają się w komórkach Sertoliego w tym okresie. Inne badania wskazują, że płodowe komórki Leydiga również mają zdolność do aromatyzacji androgenów [91]. U niedojrzałych płciowo samców szczura i innych gryzoni aktywność aromatazy wykryto w komórkach Sertoliego [11], natomiast po osiągnięciu dojrzałości płciowej głównym miejscem aromatyzacji są komórki Leydiga [24, 78, 90]. Wynika stąd, że zarówno komórki Sertoliego, jak i Leydiga są ważnym źródłem estrogenów w

rozwoju postnatalnym. W ostatnich latach przełomowymi stały się badania wykazujące obecność aromatazy w komórkach plemnikotwórczych dojrzałych samców gryzoni [36, 37, 50, 65]. Aromataza pojawia się w spermatocytach pachytenowych i pozostaje obecna aż do stadium spermatyd [13, 51]. Podczas rozwoju spermatyd następuje zmiana lokalizacji aromatazy w komórce. Przemieszcza się ona z aparatu Golgiego do cytoplazmy podstawowej. W wydłużonych spermatydach aromataza jest zlokalizowana w cytoplazmie przy podstawie witki, a jej aktywność jest wyższa niż w kulistych spermatydach lub spermatocytach [75]. Fakt ten wskazuje, że komórki plemnikotwórcze stanowią dodatkowe i ważne źródło estrogenów. Podczas spermiacji aromataza pozostaje w kropli cytoplazmatycznej, a reszta cytoplazmy jest fagocytowana przez komórki Sertoliego. Plemnik opuszczając nabłonek plemnikotwórczy zachowuje kroplę cytoplazmatyczną, która wraz z przemieszczaniem się plemnika od głowy do ogona najądrza przesuwa się do części dystalnej witki plemnika. Zawarta w kropli aromataza jest zdolna do katalizowania syntezy estrogenów podczas przechodzenia plemnika przez kanaliki odprowadzające i najądrze [36]. Dzięki obecności aromatazy w plemnikach dochodzi do bezpośredniej kontroli poziomu estrogenów w płynie kanalikowym.

Lokalizacja aromatazy w jądrze zależy jednak nie tylko od wieku zwierzęcia. U gryzoni rozmnażających się sezonowo, takich jak normice, dzięki zastosowaniu kilku komplementarnych technik, wykazano zależność immunoekspresji oraz aktywności aromatazy od długości fotoperiodu [39]. U niedojrzałych samców normic hodowanych w warunkach krótkiego fotoperiodu wykazano obecność badanego enzymu tylko w cytoplazmie komórek Leydiga, podczas gdy eksponowanie samców będących w tym samym wieku na długi fotoperiod wywołało ekspresję aromatazy także w komórkach Sertoliego i w komórkach gametogenicznych. U dojrzałych płciowo samców normic trzymany w warunkach dnia długiego lub krótkiego stwierdzono ekspresję aromatazy w kanalikach plemnikotwórczych oraz w tkance interstycjalnej [6, 7].

## **MECHANIZM DZIAŁANIA I LOKALIZACJA RECEPTORÓW ESTROGENOWYCH W MĘSKIM UKŁADZIE ROZRODCZYM**

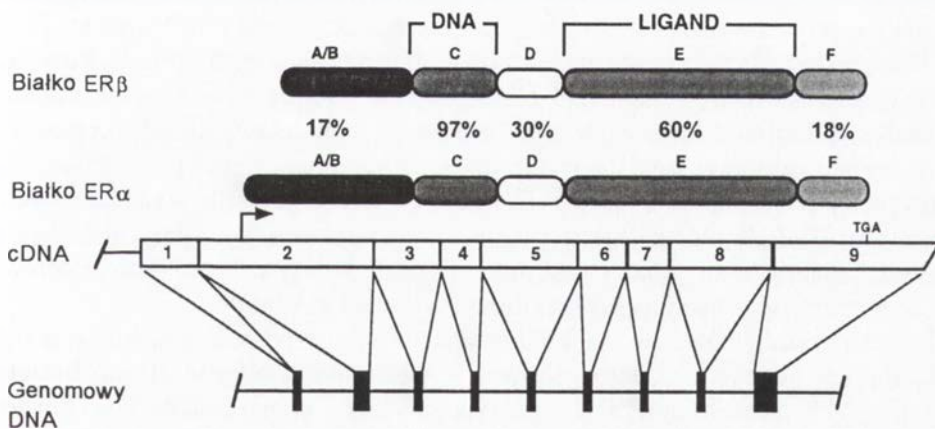
Działanie estrogenów na komórki odbywa się za pośrednictwem wewnątrzkomórkowych receptorów estrogenowych  $\alpha$  i  $\beta$  (ER $\alpha$  i ER $\beta$ ), które należą do dużej nadrodziny receptorów obejmującej m.in. receptory innych hormonów steroidowych, kwasu retinowego i witaminy D<sub>3</sub> [85]. ER $\alpha$  i ER $\beta$  nie są swoimi izoformami, lecz produktami różnych genów znajdujących się na różnych chromosomach [42, 62]. Zarówno ER $\alpha$ , jak i ER $\beta$  zbudowane są z 6 domen oznaczonych literami od A do F, z których każda oddzielnie lub współdziałając z innymi domenami pełni określoną funkcję biologiczną. N-końcowa domena A/B jest słabo konserwatywna i wykazuje tylko 17% homologii pomiędzy obydwojema receptorami estrogenowymi (ryc. 1). Zawiera ona



region pełniący funkcję niezależnej od przyłączenia liganda aktywacji transkrypcji (AF1). Wysoce konserwatywna domena C (95% homologii) zbudowana jest z 66 reszt aminokwasowych zawierających 8 reszt cysteinowych wiążących koordynacyjnie dwa jony  $Zn^{2+}$  i tworzących charakterystyczną strukturę tzw. palców cynkowych. Domena C odpowiada za związanie receptora z DNA, a ściślej, z jego odcinkiem zwanym ERE (ang. *Estrogen Response Element*). Domena E, czyli domena wiążąca ligand, jest umiarkowanie konserwatywna. Homologia sekwencji aminokwasów między  $ER\alpha$  i  $ER\beta$  w tej domenie wynosi 60%. W domenie E występują miejsca wiązania korepresorów, koaktywatorów i innych czynników wchodzących w skład kompleksu transkrypcyjnego. Domena E zawiera też główne miejsce dimeryzacji receptorów i drugie miejsce transaktywacji (AF2), zlokalizowane przy jej końcu C [44].

Lokalizacja receptorów  $ER\alpha$  i  $ER\beta$  jest tkankowo zależna.  $ER\alpha$  występuje w przysadce mózgowej, podwzgórzu, tkance tłuszczowej, mięśniach szkieletowych, wątrobie i macicy, natomiast  $ER\beta$  jest obecny w określonych rejonach mózgu, takich jak: układ limbiczny, mózdzek i kora mózgowa oraz w prostaty i płucach. W kościach, układzie krwionośnym, najądrzu, tarczycy, nadnerczach, nerkach i gonadach występują obydwa typy receptorów [43]. Oprócz specyficzności tkankowej w rozmieszczeniu receptorów estrogenowych obserwuje się różnice międzygatunkowe; np.  $ER\beta$  mRNA wykryto w przysadce mózgowej szczura i człowieka, natomiast nie został wykryty w przysadce myszy [17].

Mechanizm działania estrogenów przez  $ER\alpha$  i/lub  $ER\beta$  jest analogiczny do mechanizmu działania pozostałych hormonów steroidowych (ryc. 2). Po przyłączeniu liganda, od receptora oddysocjują białka Hsp90, co prowadzi do fosforylacji receptora. Kompleksy hormon-receptor ulegają dimeryzacji i w formie dimerów są transportowane do jądra. W transport ten jest zaangażowana domena D receptora mająca sygnał lokalizacji jądrowej (ang. *Nuclear Localization Signal*, NLS). Dimer,



RYCINA 1. Struktura ludzkich receptorów estrogenowych  $\alpha$  i  $\beta$  (z zaznaczeniem domen i stopnia ich homologii oraz miejsc wiązania DNA i liganda) i kodujących je genów, strzałka oznacza miejsce rozpoczęcia transkrypcji (wg [16], zmienione)

dzięki domenie C, wiąże się z DNA w obszarze promotorowym docelowego genu, następnie dochodzi do rekrutacji odpowiednich koaktywatorów oraz czynników transkrypcyjnych, co prowadzi do aktywacji bądź modulacji transkrypcji. Należy zaznaczyć, że ER $\alpha$  i ER $\beta$  mogą tworzyć homo- lub heterodimery. Homodimery ER $\alpha$  w większości wypadków są silniejszymi aktywatorami transkrypcji niż homodimery ER $\beta$ . Heterodimery w środowisku wysyconym hormonem mają aktywność zbliżoną do homodimerów ER $\alpha$ , natomiast przy niższym stężeniu hormonu ich zdolność do aktywacji transkrypcji spada [73]. Ponadto warto zauważyć, że nie tylko estrogeny mają zdolność do aktywacji receptorów estrogenowych. Z receptorami tymi mogą wiązać się konkurencyjnie inne ligandy, np. 3 $\beta$ -androstendiol, którego stężenie w prostaty jest około 100 razy wyższe niż stężenie estradiolu [94]. Obydwa receptory estrogenowe wiążą estradiol z podobnym powinowactwem, lecz różnią się powinowactwem do innych ligandów, np. genisteina będąca fitoestrogenem wiąże się ze znacznie wyższym powinowactwem z ER $\beta$  niż z ER $\alpha$  [44]. Różnice pomiędzy ER $\alpha$  i ER $\beta$  dotyczą także wpływu agonistów i antagonistów na transkrypcję. Związki takie zostały nazwane selektywnymi modulatorami receptorów estrogenowych (ang. *Selective Estrogen Receptor Modulator*, SERM). Na niektóre tkanki wywierają one działanie antagonistyczne do estrogenów, a na inne – agonistyczne. Np. tamoksifen działa antagonistycznie tylko przez ER $\alpha$ , a więc jego wpływ na daną tkankę zależy od względnego poziomu ekspresji ER $\alpha$  i ER $\beta$  w komórkach tej tkanki [21].

Innym przejawem funkcjonalnych różnic pomiędzy ER $\alpha$  i ER $\beta$  jest zdolność do przyłączania przez nie koaktywatorów i korepresorów [58]. Koaktywatory np. SRC1 (ang. *Steroid Receptor Coactivator 1*) ułatwiają transkrypcję przez acetylację histonów. Acetylacja histonów prowadzi natomiast do dekondensacji chromatyny, co umożliwia interakcję aparatu transkrypcyjnego z promotorem [40]. W przeciwieństwie do koaktywatorów, korepresory, np. NCoR (ang. *Nuclear receptor Co-Repressor*) lub SHP (ang. *Short Heterodimer Partner*), wiążą się z receptorem pod nieobecność liganda albo do receptora związanego z antagonistą i hamują aktywność transkrypcyjną [31, 82]. Korepresory aktywują deacetylazę histonów lub same mają jej aktywność. Różnice w aktywacji transkrypcji przez agonistów i antagonistów estrogenów działających poprzez ER $\alpha$  lub ER $\beta$  są spowodowane odmienną zdolnością kompleksów ligand-receptor do wiązania koaktywatorów, która jest wynikiem zmian konformacyjnych powodowanych przez agonistę lub antagonistę w helisie H12 miejsca wiążącego ligand w każdym z tych receptorów [40]. Zdolność każdego z typów receptorów estrogenowych do stymulowania transkrypcji zależy zatem od promotora, rodzaju liganda, koaktywatorów i korepresorów oraz od względnego poziomu ekspresji ER $\alpha$  i ER $\beta$  w danej komórce.

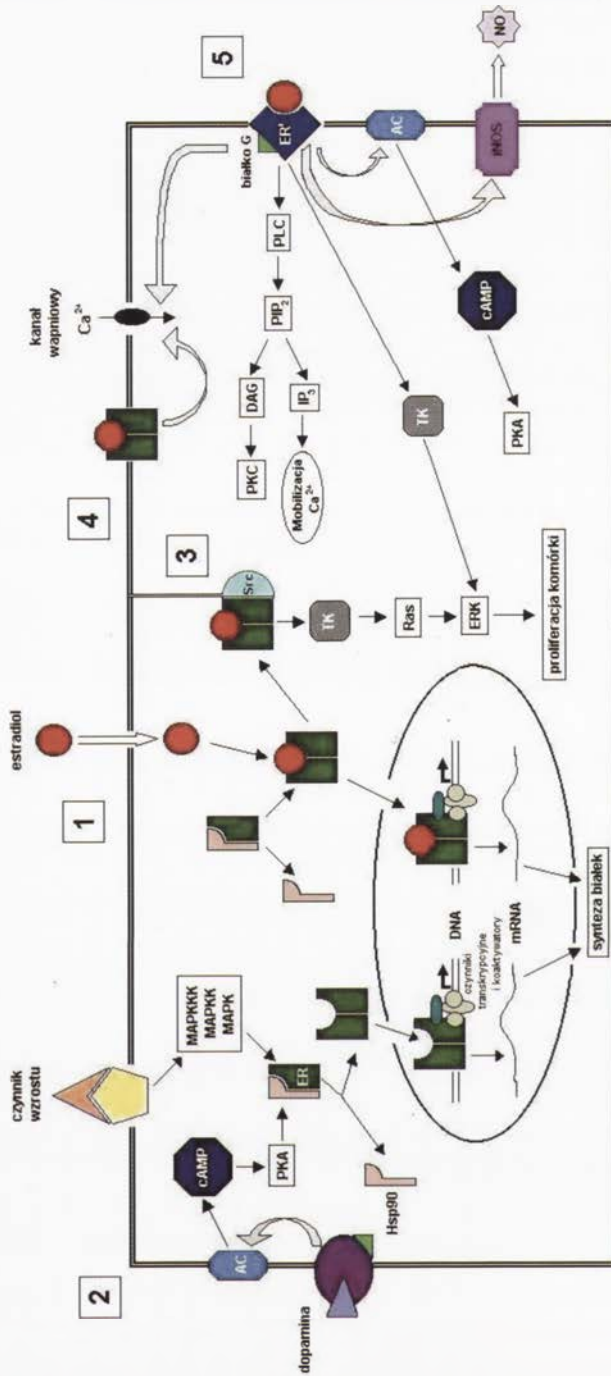
Receptory estrogenowe związane z ligandem oprócz bezpośredniego wiązania się z elementem odpowiedzi estrogenowej w DNA mogą wiązać się do białek wchodzących w skład kompleksów transkrypcyjnych, np. poprzez białka Fos i Jun do czynnika transkrypcyjnego AP1 i w ten sposób pośrednio modulować transkrypcję [46]. Także w tym wypadku ER $\alpha$  i ER $\beta$  wykazują różne właściwości. Ostatnio pojawiły się dowody na zdolność receptorów estrogenowych do niezależnej od liganda aktywacji transkrypcji. Białkowe czynniki wzrostu prowadzą do aktywacji kinazy białkowej MAP

(ang. *Mitogen-Activated Protein*), która może fosforylować region AF-1 zarówno w ER $\alpha$ , jak i ER $\beta$ . Ufosforylowany ER $\beta$  ma zdolność wiązania koaktywatora SRC1 mimo nieobecności liganda [89]. Także inne czynniki, takie jak cyklina D1 lub dopamina, mogą brać udział w aktywacji transkrypcji przez receptory estrogenowe pod nieobecność liganda [48].

Oprócz klasycznej drogi działania przez wewnątrzkomórkowe receptory estrogenowe, estradiol może działać także przez receptory błonowe. Działanie to przejawia się bardzo szybkim, zachodzącym w ciągu sekund lub minut, wzrostem stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia lub wzrostem akumulacji cAMP. Badania z zastosowaniem metod immunohistochemicznych prowadzone na komórkach przysadki mózgowej wspierają hipotezę, że receptory te w niektórych tkankach są formami ER $\alpha$  i ER $\beta$  związanymi z błoną komórkową [93]. Ponieważ receptory estrogenowe nie mają domen hydrofobowych ani potencjalnych miejsc mirystylacji czy palmitynacji, które mogłyby zakotwiczyć receptor w błonie komórkowej, trudno wyobrazić sobie, że receptory te są bezpośrednio związane z błoną. Jedną z możliwości występowania klasycznych receptorów estrogenowych na powierzchni komórki może być ich asocjacja ze związanymi z błoną komórkową kaweolami. Np. ER $\alpha$  występujące w kaweolach błon komórek śródbłónka pośredniczą w krótkotrwałym działaniu estradiolu przez aktywację syntazy tlenu azotu (ang. *endothelial Nitric Oxide Synthase*, eNOS) i gwałtownym uwolnieniu tlenu azotu przez komórki śródbłónka [15].

Niegenomowe działanie estradiolu przez klasyczne receptory estrogenowe może zachodzić również z wykorzystaniem innego mechanizmu. Stwierdzono, że estradiol stymuluje proliferację komórek nowotworów piersi przez bezpośrednią aktywację białka Src. Receptor estrogenowy tworzy z nieaktywnym białkiem Src kompleks asocjujący z wewnętrzną stroną błony komórkowej. Kompleks ten aktywuje kinazę tyrozynową Src, która za pośrednictwem białka Ras uruchamia kaskadę kinaz MAP/ERK, czego końcowym efektem jest stymulacja proliferacji komórek nowotworowych [60].

Najnowsze badania wykazują, że estradiol może również działać przez receptory błonowe, inne niż ER $\alpha$  czy ER $\beta$ , kodowane przez gen zawierający 4–8 eksonów identycznych jak w genie ER $\alpha$  oraz dodatkowy ekson S, które nie występuje ani w genie ER $\alpha$ , ani w ER $\beta$ . Takie receptory znaleziono w macicy, wątrobie, komórkach  $\beta$  trzustki i ludzkich plemnikach [4]. Niedawno udowodniono, że estrogeny stymulują ruchliwość plemników i produkcję mleczanów przez plemniki, działając za pośrednictwem estrogenowego receptora błonowego o masie cząsteczkowej 29 kDa. Pierwszym efektem działania estradiolu przez ten receptor jest szybki napływ jonów wapnia do komórki. Późniejszym skutkiem jest fosforylacja reszt tyrozynowych różnych białek oraz hamowanie stymulującego wpływu progesteronu na reakcję akrosomową. [53, 63].



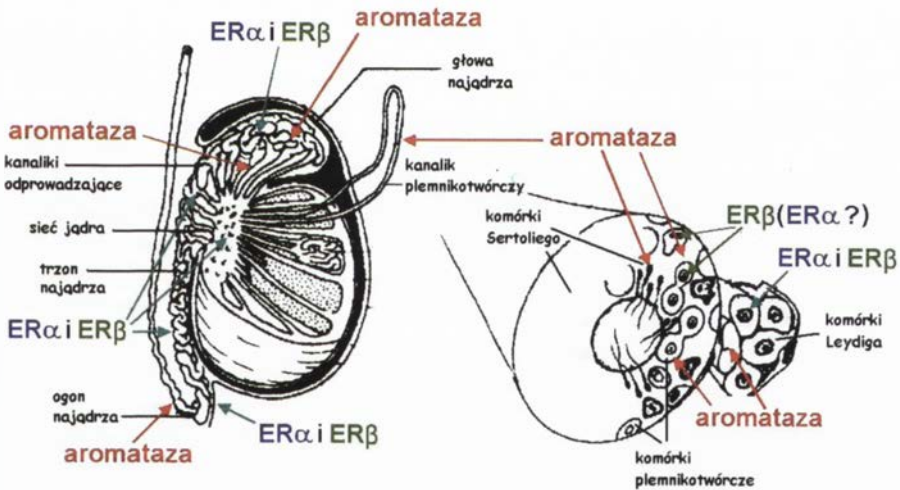
RYCINA 2. Genomowe i pozagenomowe działanie estrogenów: 1) genomowa droga działania przez „klasyczne” (cytoplazmatyczne) receptory estrogenowe oraz 2) niezależna od wiązania hormonu droga aktywacji „klasycznych” receptorów estrogenowych; 3) nienomowe działanie przez białkowy kompleks zasocjowany z wewnętrzną stroną błony komórkowej; 4) przez „klasyczne” receptory związane z błoną komórkową oraz 5) przez „nieklasyczne” receptory błonowe (szczegóły w tekście): ER – klasyczny receptor estrogenowy (a lub b), ER’ – błonowy receptor estrogenowy, AC – cyklaza adenylanowa, cAMP – cykliczny adenosinomonofosforan, PLC – fosfolipaza C, PKA – kinaza białkowa A, PKC – kinaza białkowa C, PIP<sub>2</sub> – difosforan fosfatydyloinozytolu, IP<sub>3</sub> – inozytolotrifosforan, DAG – diacyloglicerol, TK – kinaza tyrozynowa, iNOS – indukowalna syntaza tlenu azotu, NO – tlenek azotu, MAPK – kinaza białkowa aktywowana mitogenami, MAPKK – kinaza aktywująca MAPK, MAPKKK – kinaza aktywująca MAPKK, ERK – kinaza regulowana czynnikami zewnętrznymi

## RECEPTORY ESTROGENOWE $\alpha$

Badania immunohistochemiczne wykazały, że ER $\alpha$  jest obecny już w płodowych komórkach Leydiga w 10 dniu życia prenatalnego samca myszy. Ekspresja ER $\alpha$  występuje również w rozwijających się przewodnikach odprowadzających i najądrzu [25]. W okresie neonatalnym, w niedojrzałym jądrze myszy, ER $\alpha$  wykazano w tkance interstycjalnej jądra, w sieci jądra, kanalikach odprowadzających i najądrzu, co sugeruje, że estrogeny pełnią w nich istotną rolę [23, 64]. U dojrzałych samców gryzoni ER $\alpha$  jest obecny w komórkach Leydiga, natomiast lokalizacja tego receptora w komórkach Leydiga naczelnych budzi wciąż kontrowersje [70, 81]. Wyniki doświadczeń przeprowadzonych na samcach normicy rudej hodowanych w warunkach długiego lub krótkiego fotoperiodu wykazały, że w obu przypadkach ekspresja ER $\alpha$  występuje jedynie w komórkach Leydiga, a poziom jej nie jest zależny od reżimu świetlnego [6, 7].

## RECEPTORY ESTROGENOWE $\beta$

U myszy, ekspresję ER $\beta$  obserwuje się już w 16 dniu rozwoju płodowego w gonocytach, płodowych komórkach Leydiga i Sertoliego oraz w przewodach pranercza, które później różnicują się w kanaliki odprowadzające i najądrze. Jednak najwyższą



RYCINA 3. Lokalizacja aromatazy i receptorów estrogenowych w męskim układzie rozrodczym: T – testosteron, E $_2$  – estradiol; strzałki wskazują występowanie aromatazy oraz receptorów estrogenowych  $\alpha$  i  $\beta$  w poszczególnych typach komórek (wg [54], zmienione)

ekspresję ER $\beta$  stwierdzono w gonocytach, co wskazuje, że estrogeny odgrywają bezpośrednią rolę w ich dojrzewaniu [80, 92]. U szczurów pomiędzy 10 a 26 dniem życia ekspresja ER $\beta$  jest nieznaczna w spermatogoniach i w komórkach Sertoliego, a znacznie silniejsza w spermatocytach pachytenowych. Wyniki badań nad rozmieszczeniem ER $\beta$  w komórkach rozrodczych różnych stadiów zarówno u naczelnych, jak i u gryzoni wciąż pozostają sprzeczne, dlatego też lokalizacja ER $\beta$  w jądrach dojrzałych samców gryzoni i naczelnych do tej pory nie została jednoznacznie ustalona. Według powyższych autorów ER $\beta$  jest jedynym receptorem estrogenowym występującym w kanaliku plemnikotwórczym, chociaż znane są nieliczne doniesienia o wykryciu ER $\alpha$  w szczurzych i ludzkich komórkach gametogenicznych [70, 72]. Ustalono natomiast, że ER $\beta$  ulega ekspresji w komórkach Sertoliego szczurów i naczelnych [71, 81]. U normicy rudej, ekspresja ER $\beta$  zależy również od długości fotoperiodu. U niedojrzałych samców normicy hodowanych w warunkach dnia krótkiego słaba immunоекспресja występuje w komórkach Sertoliego i w spermatocytach, silniejsza – u zwierząt eksponowanych na długi fotoperiod. W jądrach dojrzałych samców hodowanych w długim fotoperiodzie ER $\beta$  są obecne w komórkach Sertoliego, spermatocytach i spermatydach. Poziom ekspresji jest szczególnie wysoki w późniejszych stadiach komórek szeregu spermatogenezy [6, 7].

Z wyżej przytoczonych informacji wynika, że w jądrze dochodzi do produkcji estrogenów oraz do odpowiedzi na nie podczas całego rozwoju, poczynając od okresu życia płodowego. Obecność receptorów estrogenowych i aromatazy w somatycznych i germinalnych komórkach jądra, a także wysoki poziom estrogenów w kanalikach odprowadzających, wskazuje, że hormony te odgrywają znaczącą rolę w funkcjonowaniu męskiego układu rozrodczego (ryc. 3).

## WPLYW NIEDOBORU LUB PODAWANIA ESTROGENÓW NA PRZEBIEG SPERMATOGENEZY

Estrogeny są zaangażowane w rozpoczęcie i podtrzymanie spermatogenezy, działając na wielu poziomach hormonalnej regulacji tego procesu:

- 1) na oś podwzgórze-przysadka-jądra,
- 2) na komórki Leydiga, Sertoliego i komórki gamatogeniczne oraz
- 3) na kanaliki odprowadzające i najądrza.

W rezultacie zarówno podawanie estrogenów, jak i pozbawienie samca tych hormonów wpływa na proces spermatogenezy i płodność.

Inicjacja i przebieg spermatogenezy wymagają obecności gonadotropin wydzielanych przez przysadkę mózgową. Sekrecja gonadotropin jest regulowana głównie przez testosteron działający przez ujemne sprzężenie zwrotne na przysadkę i podwzgórze. Androgeny, jak i estrogeny działają hamująco na wydzielanie FSH i LH. Wykazanie

obecności receptorów estrogenowych w komórkach podwzgórza i przysadki mózgowej gryzoni i małą jest potwierdzeniem działania estradiolu jako regulatora sekrecji gonadotropin [47, 71].

Dalsze badania prowadzone na gryzoniach wykazały, że ekspozycja na estrogeny lub substancje estrogenopodobne samców w okresie noworodkowym powoduje zmiany w sekrecji gonadotropin w okresie dojrzewania i może trwale zmieniać organizację osi podwzgórze-przysadka-jądra [2, 3, 86]. Ekspozycja męskich płodów na estrogeny lub na związki estrogenopodobne (np. dietylstilbestrol) podawane ciężarnym samicom może zaburzać funkcjonowanie osi podwzgórze-przysadka-jądra u potomstwa i powodować zahamowanie syntezy androgenów, czego konsekwencją jest niezstąpienie jąder i bezpłodność [66]. Pojedyncza, wysoka dawka benzoesanu estradiolu podana jednodziennym szczirom wywołuje redukcję sekrecji gonadoliberyny (GnRH) oraz osłabienie odpowiedzi przysadki na ten hormon, a także znaczne obniżenie w surowicy krwi poziomu FSH i LH, a w konsekwencji, testosteronu [74]. Małe dawki estrogenów podawane szczirom w okresie neonatalnym mogą powodować w okresie dojrzewania wzrost poziomu FSH w surowicy [3]. Właściwe stężenia FSH i LH, a także dokładnie regulowany czas sekrecji gonadotropin podczas okresu noworodkowego i pokwitania, mają fundamentalne znaczenie dla prawidłowego przebiegu spermatogenezy. Podawanie estrogenów dojrzałym samcom również wpływa na wydzielanie gonadotropin. Od dawna znany jest fakt, że u dojrzałych szczurów, którym przez 10 dni podawano wzrastające dawki estradiolu, obserwowano spadek poziomu FSH, LH i testosteronu w krwiobiegu [19]. Wyniki powyżej przedstawionych badań wskazują na zdolność estrogenów do działania zarówno pobudzającego, jak i hamującego na przysadkę samców w zależności od zastosowanej dawki.

Oprócz oddziaływania na oś podwzgórze-przysadka-jądra oraz na najądrza i kanaliki odprowadzające jąder, estrogeny kontrolują też bezpośrednio różnicowanie i funkcjonowanie somatycznych i gerymalnych komórek jądra. Występujące w przedziale interstycjalnym komórki Leydiga pojawiają się u szczurów w 15 dniu rozwoju płodowego. Te embrionalne komórki syntetyzują duże ilości androgenów niezbędnych do rozwoju przewodów Wolffa i wykształcenia męskich narządów rozrodczych. Traktowanie płodów samców szczurów estrogenami może prowadzić do zahamowania różnicowania komórek Leydiga w okresie dojrzewania [1]. Ponadto, wysoka aktywność aromatazy w dojrzałych komórkach Leydiga i możliwość oddziaływania produkowanych przez nie estrogenów w drodze parakrynnnej doprowadziły do wysunięcia hipotezy, że dojrzałe komórki Leydiga wywierają hamujący wpływ na rozwój prekursorowych komórek Leydiga. Estradiol wpływa też na steroidogenezę w dojrzałych komórkach Leydiga, hamując działanie jej kluczowych enzymów (np. P450c17), co wyraża się obniżeniem produkcji testosteronu [8]. U mężczyzn, hamujący wpływ estradiolu na steroidogenezę spowodowany jest natomiast zmniejszeniem liczby receptorów LH w komórkach Leydiga [32]. Z powyżej przytoczonych informacji wynika, że estrogeny regulują rozwój i funkcjonowanie komórek Leydiga, a więc wpływają na przebieg dojrzewania samców i ich płodność.

Występujące w obrębie kanalików plemnikotwórczych somatyczne komórki Sertoliego pojawiają się w jądrach szczurów w 16 dniu życia płodowego. Komórki te intensywnie proliferują aż do 2 tygodni po urodzeniu. Wtedy podziały ustają, a rozpoczyna się ich różnicowanie się i dojrzewanie. Zarówno proliferacja, jak i różnicowanie się są kontrolowane przez liczne czynniki parakryne i endokryne [20]. Wysoka produkcja estrogenów w proliferujących komórkach, a niższa w bardziej zróżnicowanych stanowi potwierdzenie stymulującego działania estradiolu na proliferację komórek Sertoliego, a hamującego na ich dojrzewanie [68]. Estradiol, wiążąc się z ER $\beta$  obecnymi w komórkach Sertoliego, stymuluje je do podziałów [70, 71, 92]. Mechanizm tego procesu jest prawdopodobnie analogiczny do mechanizmu działania estrogenów na komórki warstwy ziarnistej jajnika. FSH wiążąc się z receptorami błonowymi w tych komórkach indukuje syntezę aromatazy, która z kolei jest odpowiedzialna za konwersję androgenów w estrogeny.

Poza pośrednim oddziaływaniem estradiolu na spermatogenezę przez regulację funkcjonowania komórek somatycznych, estrogeny wpływają też bezpośrednio na komórki plemnikotwórcze, co zostało potwierdzone wykazaniem obecności aromatazy i ER $\beta$  w tych komórkach (patrz poprzednie podrozdziały). Podawanie szczurom estrogenów pomiędzy 5 a 11 dniem życia wywołuje wzrost liczby niezróżnicowanych i różnicujących się spermatogoniów [45]. Trudno jednak stwierdzić, czy jest to efekt bezpośredniego działania tych steroidów na komórki gametogeniczne, czy zaburzenia sygnałów hormonalnych z przysadki. Na możliwość bezpośredniego oddziaływania wskazują badania przeprowadzone na węgorzach japońskich: poddawanie spermatogoniów tych ryb działaniu estrogenów pobudzało ich odnowę, natomiast tamoksifen, antagonistą estrogenów, miał na nią wpływ hamujący [61]. Także wyniki badań *in vitro*, prowadzonych na szczurzych gonocytach, wyraźnie wskazują na stymulujący wpływ niewysokich dawek estradiolu na podziały tych komórek; pobudzające działanie estradiolu okazał się hamować jego antagonistą [52]. Estrogeny odgrywają rolę również w utrzymaniu prawidłowej struktury nabłonka plemnikotwórczego przez regulację ekspresji kadheryny NCad odpowiadającej za oddziaływania pomiędzy komórkami Sertoliego a komórkami germinalnymi [56]. Chociaż większość badań wskazuje na stymulujący wpływ estrogenów na różnicowanie komórek szeregu spermatogenezy, pojawiły się też doniesienia kwestionujące bezpośredni wpływ tych steroidów na spermatogenezę [49]. Autorzy są natomiast zgodni, że ekspozycja samców na wysokie dawki egzogennych estrogenów powoduje zakłócenia różnicowania komórek plemnikotwórczych. Podawanie dorosłym samcom myszy dużych dawek benzoesu estradiolu przez kilka tygodni prowadziło do wyprodukowania nieprawidłowych plemników. W świetle kanalików nasiennych tych myszy znaleziono uwolnione okrągłe spermatydy z licznymi anomaliami strukturalnymi: zdeformowaną czapeczką akrosomalną, zniekształconym jądrem komórkowym i zaburzeniami w połączeniach między komórkami Sertoliego a późnymi spermatydami. Wyniki tych badań sugerują zatem, że choć endogenne estrogeny są niezbędne do prawidłowego przebiegu spermatogenezy, to estrogeny i związki estrogenopodobne obecne w wysokich stężeniach w środowisku mogą wywierać negatywny wpływ na męskie funkcje rozrodcze [88].

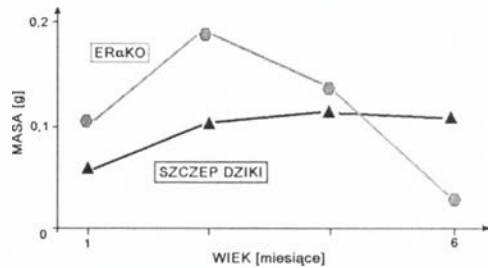


## MYSZY $\alpha$ ERKO, $\beta$ ERKO, $\alpha\beta$ ERKO ORAZ ArKO JAKO MODELE DO BADAŃ NAD FUNKCJĄ ESTROGENÓW W MĘSKIM UKŁADZIE ROZRODCZYM

Badania prowadzone na myszach pozbawionych receptorów estrogenowych  $\alpha$  / lub  $\beta$  ( $\alpha$ ERKO,  $\beta$ ERKO,  $\alpha\beta$ ERKO) oraz myszach pozbawionych aromatazy, a więc nie mających zdolności do syntezy estrogenów (ArKO), dostarczyły wielu danych pozwalających na zrozumienie roli tych hormonów u samców [16].

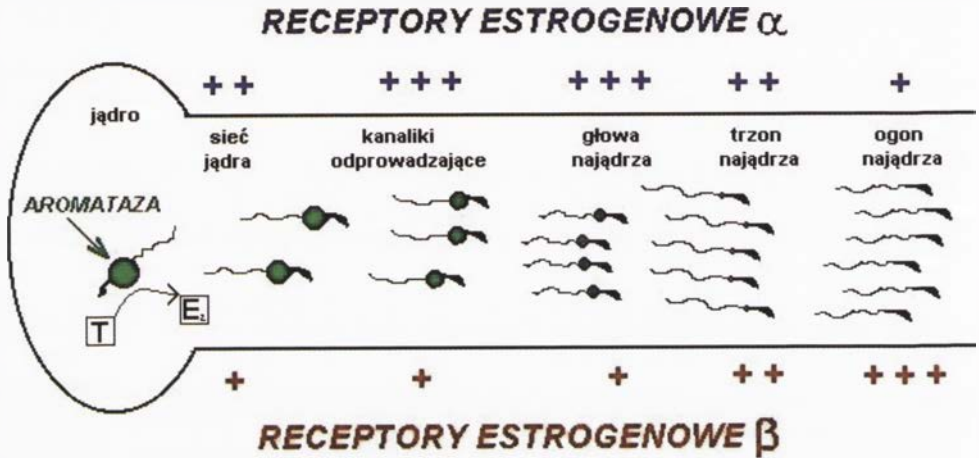
Na podstawie licznych eksperymentów prowadzonych przez Hessa i współpracowników [26, 27, 28, 29] stwierdzono, że samce do pełnej płodności wymagają obecności funkcjonalnych ER $\alpha$ . Najbardziej charakterystyczną cechą samców  $\alpha$ ERKO jest bezpłodność oraz postępująca degeneracja jąder i nabłonka kanalików odprowadzających. Jądra rozwijają się normalnie do okresu pokwitania, a następnie ich masa i objętość wzrasta nadmiernie między 30 a 80 dniem życia, po czym gwałtownie spada, aż do całkowitej atrofii około 150 dnia. Gruczoły pęcherzykowe, koagulujące i prostata zachowują normalne rozmiary, sieć jądra natomiast rozszerza się, a kanaliki odprowadzające nabrzmiwają wskutek akumulacji płynu w ich świetle. Komórki nabłonka tych kanalików stopniowo tracą organelle i mikrokosmki, wchłanianie zwrotne płynu ulega zahamowaniu, co powoduje gromadzenie się w płynie w kanalikach i wzrost ciśnienia w jądrze. Efektem tego jest początkowe powiększenie się jąder, a następnie spadek ich masy. Ponieważ prawidłowa reabsorpcja płynu kanalikowego jest konieczna do utrzymania odpowiedniego stężenia plemników w nasieniu, samce  $\alpha$ ERKO wykazują postępujące zaburzenia płodności. Wraz z wiekiem obniża się liczba i ruchliwość ich plemników. Plemniki te wykazują nieprawidłowości w budowie morfologicznej oraz stopniowo tracą zdolność do zapłodnienia [26, 29].

Niepłodność u myszy  $\alpha$ ERKO nie jest jednak wynikiem defektu w komórkach plemnikotwórczych, bowiem po ich transplantacji do jąder myszy szczepu dzikiego pozbawionych wcześniej komórek plemnikotwórczych, stwierdzono, że komórki niemające ER $\alpha$  mogą rozwijać się w środowisku, w którym jest obecna aromataza i receptory estrogenowe [57]. Zmniejszona zdolność do zapłodnienia jest więc wynikiem zaburzonego wchłaniania płynu kanalikowego w kanalikach odprowadzających. Pośrednio do obniżonej płodności samców  $\alpha$ ERKO przyczyniają się też zmiany w



RYCINA 4. Porównanie zmian masy jąder samców myszy  $\alpha$ ERKO i myszy szczepu dzikiego następujących wraz z wiekiem; akumulacja płynu w kanalikach odprowadzających samców  $\alpha$ ERKO powoduje przejściowy wzrost masy jąder, a następnie ich atrofię (wg [27], zmienione)

zachowaniu seksualnym [67]. Takie same zmiany w przewodnikach odprowadzających jak u samców myszy  $\alpha$ ERKO zaobserwowano u samców szczepu dzikiego, u których zablokowano ER $\alpha$  poprzez podawanie anty-estrogenu. Eksperyment ten stanowi dodatkowe potwierdzenie roli ER $\alpha$  w funkcjonowaniu męskiego układu rozrodczego [49]. ER $\alpha$  ulegają ekspresji nie tylko w kanalikach odprowadzających jądra, ale także w najądrzu; ilość receptorów  $\alpha$  ulega wyraźnemu spadkowi w kierunku ogona najądrza, a rozmieszczenie receptorów  $\beta$  jest odwrotne [28, 54]. Estradiol, działając przez ER $\alpha$ , reguluje wchłanianie zwrotnego płynu w kanalikach odprowadzających i najądrzu, a zatem, pośrednio odpowiada za prawidłową koncentrację plemników w nasieniu. Plemniki wykazujące wysoką ekspresję aromatazy, czyli syntetyzujące estradiol, funkcjonują jako „ruchome jednostki endokryne” zdolne do modulowania swojego własnego transportu przez kanalik odprowadzający i najądrze [30] (ryc. 5).



RYCINA 5. Plemniki zwane *ruchomymi jednostkami endokrynnymi* syntetyzują estrogeny podczas przechodzenia przez kanalik odprowadzający i najądrze. Produkcja estrogenów ( $E_2$ ) z testosteronu (T) odbywa się dzięki obecności aromatazy w kropli cytoplazmatycznej plemników. Podczas wędrówki plemniki stopniowo tracą kroplę cytoplazmatyczną, a więc także zawartą w niej aromatazę, co powoduje spadek syntezy estrogenów. Estrogeny oddziałując na komórki nabłonka kanalików odprowadzających poprzez receptory estrogenowe regulują wchłanianie zwrotnego płynu kanalikowego przez ten nabłonek. Reabsorpcja płynu powoduje zagęszczenie plemników. Liczba znaków + odpowiada stężeniu receptorów estrogenowych (wg [54], zmienione)

W przeciwieństwie do samców myszy  $\alpha$ ERKO, samce  $\beta$ ERKO rozwijają się prawidłowo i wykazują normalną płodność. Nie zaobserwowano u nich żadnych zmian morfologicznych i funkcjonalnych w gonadzie ani kanalikach odprowadzających [41]. Podwójne mutanty  $\alpha\beta$ ERKO są nieplodne i mają fenotyp bardzo podobny do samców  $\alpha$ ERKO. Choć wydaje się, że tylko ER $\alpha$  jest konieczny do prawidłowego dojrzewania

plemników, należy wziąć pod uwagę fakt, że ER $\beta$  został odkryty stosunkowo niedawno i jego fizjologiczna rola nie jest jeszcze w pełni poznana. Istnieje też możliwość, iż przyczyną normalnego przebiegu spermatogenezy u  $\beta$ ERKO jest kompensacja braku ER $\beta$  przez ER $\alpha$ . W kanalikach odprowadzających myszy  $\alpha$ ERKO receptor estrogenowy  $\beta$  ma inną subkomórkową lokalizację niż w tkankach myszy szczepu dzikiego [79]. Zatem, prawdopodobnie, występuje całkowita zmiana w rozmieszczeniu ER $\alpha$  w jądrach myszy  $\beta$ ERKO. Nie można także wykluczyć działania estrogenów na komórki plemnikotwórcze przez „nieklasyczne” receptory, np. inicjujące niegenomową drogę działania przez wzrost wewnątrzkomórkowego wapnia lub aktywację kaskady kinaz MAP [33, 54].

Fenotyp samców myszy pozbawionych aromatazy (ArKO) różni się od fenotypu myszy  $\alpha$ ERKO. Młode samce ArKO są płodne i nie wykazują żadnych zaburzeń w funkcjonowaniu ani budowie układu rozrodczego, a zmiany patologiczne obserwuje się dopiero u starszych samców (powyżej 14 tygodnia). Pojawia się u nich postępujące osłabienie spermatogenezy, prowadzące do znacznego spadku liczby okrągłych spermatyd. Nie jest ono jednak spowodowane zaburzeniami w reabsorpcji płynu w kanalikach plemnikotwórczych i przewodnikach odprowadzających (ponieważ nie zaobserwowano znaczącego wzrostu masy jąder ani objętości światła kanalików odprowadzających), lecz nieprawidłowościami w różnicowaniu się komórek szeregu spermatogenezy [77]. Normalny rozwój kanalików odprowadzających u myszy ArKO umożliwia ich ekspozycja na matczyne estrogeny podczas rozwoju płodowego. Przypuszcza się też, że w układzie rozrodczym może następować niezależna od liganda aktywacja receptorów estrogenowych [48]. Może również dochodzić do aktywacji transkrypcji przez receptory estrogenowe związane z innymi endogennymi ligandami (tzn. niebędącymi estrogenami). Badania *in vitro* wykazały, że receptory estrogenowe mogą wiązać się z wieloma ligandami niezależnymi od aromatazy, np. 5 $\alpha$ -androsten-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diolem i 5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diolem [43]. Jeśli receptory estrogenowe u myszy ArKO wiązałyby się z alternatywnymi ligandami, takimi jak te wywodzące się z androgenów, prawdopodobnie następowałoby stopniowe znikanie tych ligandów w jądrach po okresie dojrzewania, prowadzące do zakłóceń w spermatogenezie [76].

Najnowsze doniesienia dotyczące bezpłodności u myszy pozbawionych receptorów witaminy D wskazują, że w jądrach tych myszy synteza estrogenów jest zakłócona z powodu niskiej ekspresji aromatazy [38]. Chociaż autorzy twierdzą, że fenotyp spermatogeniczny tych myszy jest podobny do fenotypu  $\alpha$ ERKO i ArKO, konieczne są dalsze badania, które pozwolą ustalić, czy redukcja liczby plemników i zaburzenia morfologii nabłonka plemnikotwórczego są spowodowane zakłóceniem rozwoju komórek gametogenicznych (jak u myszy ArKO), czy dysfunkcją kanalików odprowadzających (jak u  $\alpha$ ERKO). Wykazano także, że estradiol działa jako czynnik przeżywania dla okrągłych spermatyd. Brak lokalnej produkcji tego steroidu powoduje apoptozę okrągłych spermatyd i spadek ilości plemników. U samców ArKO powyżej 1 roku życia obserwuje się już znaczące zmniejszenie ilości i ruchliwości plemników. U samców tych zdolność do zapłodnienia spada o 50%, co wskazuje, że brak aromatazy wpływa negatywnie na uzyskanie przez gamety męskie zdolności do zapłodnienia [54]. Ostatnio, dzięki badaniom na hodowanych *in vitro* ludzkich kanalikach nasiennych,

uzyskano kolejne dowody na bezpośredni wpływ estrogenów na przeżywanie komórek gametogenicznych. W kanalikach hodowanych pod nieobecność surowicy i czynników wzrostowych następowała indukcja apoptozy spermatocytów i spermatyd. Apoptozę zahamowano, poddając kanaliki działaniu niskich dawek estradiolu lub wyższych dawek dihydrotestosteronu. Można stąd wnioskować, że estradiol jest silnym inhibitorem apoptozy komórek plemnikotwórczych. Szybki efekt działania tego hormonu (w ciągu 4 godzin) doprowadził autorów do stwierdzenia, że był to, przynajmniej częściowo, wynik niegenomowego działania estradiolu [72].

U samców myszy ArKO nie ulegające apoptozie okrągłe spermatydy mają zaburzenia w tworzeniu akrosomu. Akrosom jest pęcherzykiem wypełnionym enzymami hydrolitycznymi, które są zaangażowane w penetrację osłonki przejrzystej komórki jajowej przez plemniki podczas zapłodnienia. Akrosom powstaje z aparatu Golgiego. Pochodzące z niego granule zlewają się, tworząc pojedynczy duży pęcherzyk, który kontaktuje się z przednim biegunem jądra spermatydy. Pęcherzyk ten stopniowo rozciąga się i opłaszcza jądro. Nieprawidłowy rozwój akrosomu u samców ArKO wskazuje, że jego biogeneza może być procesem zależnym od estrogenów [76]. Hipotezę tę wsparło wykazanie wysokiego poziomu aromatazy w aparacie Golgiego spermatyd oraz obecności ER $\beta$  w spermatydach [65, 79, 92]. Dalsze badania wykazały, że u myszy ArKO należących do innego szczepu (C57BL) niż omawiane poprzednio nie następowały zakłócenia spermatogenezy pomiędzy 14 tygodniem a 10 miesiącem życia – nie stwierdzono u nich różnicy w liczbie plemników w najądrzu oraz zdolności plemników do zapłodnienia komórek jajowych *in vitro* w stosunku do samców szczepu dzikiego. U myszy tych zaobserwowano natomiast znaczne zmniejszenie wysokości nabłonka plemnikotwórczego i zaburzenia w zachowaniu seksualnym [87]. Powód heterogeniczności fenotypów różnych szczepów myszy ArKO nie jest do tej pory jednoznacznie ustalony. Przypuszcza się, że przyczynia się do niej zróżnicowany poziom fitoestrogenów w diecie. Innym źródłem różnic może być stopień ekspozycji męskich płodów ArKO w macicy na estrogeny pochodzące z matczyne go krwiobiegu oraz produkowane przez rodzeństwo heterozygotyczne lub noworodków na estrogeny wytwarzane przez matkę w okresie laktacji [66].

Badania na transgenicznych myszach  $\alpha$ ERKO i ArKO dostarczyły jednoznacznych dowodów, że estrogeny i ich receptory są konieczne do prawidłowego przebiegu spermatogenezy i płodności samców. Eksperymenty prowadzone na samcach  $\alpha$ ERKO dowiodły, że jedną z najważniejszych funkcji estrogenów w męskim układzie rozrodczym jest regulacja rozwoju i funkcjonowania kanalików odprowadzających, natomiast wyniki badań na myszach ArKO pozwalają twierdzić, że estrogeny mają bezpośredni wpływ na różnicowanie komórek plemnikotwórczych. Dotąd jednak pozostaje niejasne, w jaki sposób hormony te działają na komórki szeregu spermatogenezy, ponieważ komórki te mają tylko ER $\beta$ , a samce myszy pozbawione tych receptorów są w pełni płodne. Wyjaśnienie tego problemu mogą przynieść dalsze badania dotyczące błonowych receptorów estrogenowych oraz pozagenomowego działania tych hormonów.

## LITERATURA

- [1] ABNEY TO. The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: A review. *Steroids* 1999; **64**: 610–617.
- [2] ATANASSOVA N, MCKINNELL C, WALKER M, TURNER KJ, FISHER JS, MORLEY M, MILLAR MR, GROOME NP, SHARPE RM. Permanent effects of neonatal estrogen exposure in rats on reproductive hormone levels, Sertoli cell number, and the efficiency of spermatogenesis in adulthood. *Endocrinology* 1999; **140**: 5364–5373.
- [3] ATANASSOVA N, MCKINNELL C, TURNER KJ, WALKER M, FISHER JS, MORLEY M, MILLAR MR, GROOME NP, SHARPE RM. Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. *Endocrinology* 2000; **141**: 3898–3907.
- [4] BALDI E, LUCONI M, MURATORI M, FORTI G. A novel functional estrogen receptor on human sperm membrane interferes with progesterone effects. *Mol Cell Endocrinol* 2000; **161**: 31–35.
- [5] BILIŃSKA B, DRAĞ E, SCHMALZ-FRĄCZEK B. Immunolocalization of androgen receptors in testicular cells during postnatal development of bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Tissue Cell* 1999; **31**: 621–626.
- [6] BILIŃSKA B, SCHMALZ-FRĄCZEK B, SADOWSKA J, CARREAU S. Immunolocalisation of cytochrome P450 aromatase and estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in bank vole testicular cells. *Acta Histochem* 2000; **102**: 167–181.
- [7] BILIŃSKA B, SCHMALZ-FRĄCZEK B, KOTULA M, CARREAU S. Photoperiod-dependent capability of androgen aromatization and the role of estrogens in the bank vole testis visualized by means of immunohistochemistry. *Mol Cell Endocrinol* 2001; **178**: 189–198.
- [8] BRINKMANN AO, LEEMBORG FG, ROODNAT EM, DE JONG FH, VAN DER MOLEN HJ. A specific action of estradiol on enzymes involved in testicular steroidogenesis. *Biol Reprod* 1980; **23**: 801–809.
- [9] BULUN SE, ROSENTHAL IM, BRODIE AM, INKSTER SE, ZELLER WP, DIGEORGE AM, FRASIER SD, KILGORE MW, SIMPSON ER. Use of tissue-specific promoters in the regulation of aromatase cytochrome P450 gene expression in human testicular and ovarian sex cord tumors, as well as in normal fetal and adult gonads. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; **78**: 1616–1621.
- [10] CARLONE DL, RICHARDS JS. Functional interactions, phosphorylation, and levels of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-regulatory element binding protein and steroidogenic factor-1 mediate hormone-regulated and constitutive expression of aromatase in gonadal cells. *Mol Endocrinol* 1997; **11**: 292–304.
- [11] CARPINO A, PEZZI V, RAGO V, BILIŃSKA B, ANDO S. Immunolocalization of cytochrome P450 aromatase in rat testis during postnatal development. *Tissue Cell* 2001; **33**: 349–353.
- [12] CARREAU S, BILIŃSKA B, LEVALLET J. Male germ cells: a new source of estrogens in the mammalian testis. *Ann Endocrinol* 1998; **59**: 79–92.
- [13] CARREAU S, GENISSEL C, BILIŃSKA B, LEVALLET J. Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. *Int J Androl* 1999; **22**: 211–223.
- [14] CARREAU S, BOURGUIBA S, LAMBARD S, GALERAUD-DENIS I, GENISSEL C, BILIŃSKA B, BENAHMED M, LEVALLET J. Aromatase expression in male germ cells. *J Steroid Biochem Molec Biol* 2001; **79**: 203–208.
- [15] CHAMBLISS KL, YUHANNA IS, MINEO C, LIU P, GERMAN Z, SHERMAN TS, MENDELSON ME, ANDERSON RG, SHAUL PW. Estrogen receptor alpha and endothelial nitric oxide synthase are organized into functional signaling module in caveolae. *Circ Res* 2000; **87**: E44–52.
- [16] COUSE JF, KORACH KS. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 1999; **20**: 358–417.
- [17] COUSE JF, LINDZEY J, GRANDIEN K, GUSTAFSSON JA, KORACH KS. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and estrogen receptor- $\beta$  (ER $\beta$ ) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER-knockout mouse. *Endocrinology* 1997; **138**: 4613–4621.
- [18] CUTLER GB. The role of estrogen in bone growth and maturation during childhood and adolescence. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997; **61**: 141–144.

- [19] DE JONG FH, UILENBROEK TJ, VAN DER MOLEN HJ. Oestradiol-17 $\beta$ , testosterone and gonadotrophins in oestradiol-17 $\beta$ -treated intact adult male rats. *J Endocrinol* 1975; **65**: 281–282.
- [20] DORRINGTON JH, KHAN SA. Steroid production, metabolism and release by Sertoli cells. [W] Russell LD, Griswold MD [red.] *The Sertoli Cell*. Cache River Press, Clearwater, 1993: 538–549.
- [21] DUTERTRE M, SMITH CL. Molecular mechanisms of selective estrogen receptor modulator (SERM) action. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; **295**: 431–437.
- [22] FAUSTINI-FUSTINI M, ROCHIRA V, CARANI C. Oestrogen deficiency in men: where are we today? *Eur J Endocrinol* 1999; **140**: 111–129.
- [23] FISHER JS, MILLAR MR, MAJDIC G, SAUNDERS PT, FRASER HM, SHARPE RM. Immunolocalisation of oestrogen receptor- $\alpha$  within the testis and excurrent ducts of the rat and marmoset monkey from perinatal life to adulthood. *J Endocrinol* 1997; **153**: 485–495.
- [24] GENISSEL C, LEVALLET J, CARREAU S. 2001 Regulation of cytochrome P450 aromatase gene expression in adult rat Leydig cells: comparison with estradiol production. *J Endocrinol* 2001; **168**: 95–105.
- [25] GRECO TL, FURLOW JD, DUELLO TM, GORSKI J. Immunodetection of estrogen receptors in fetal and neonatal male mouse reproductive tracts. *Endocrinology* 1992; **130**: 421–429.
- [26] HESS RA. Oestrogen in fluid transport and reabsorption in efferent ducts of the male reproductive tract. *Rev Reprod* 2000; **5**: 84–92.
- [27] HESS RA, BUNICK D, LEE KH, BAHR J, TAYLOR JA, KORACH KS, LUBAHN DB. A role for oestrogen in the male reproductive tract. *Nature* 1997; **390**: 509–512.
- [28] HESS RA, GIST DH, BUNICK D, LUBAHN DB, FARRELL A, BAHR J, COOKE PS, GREENE GL. Estrogen receptor (alpha and beta) expression in the excurrent ducts of the adult male rat reproductive tract. *J Androl* 1997; **18**: 602–611.
- [29] HESS RA, BUNICK D, LUBAHN DB, ZHOU Q, BOUMA J. Morphologic changes in efferent ductules and epididymis in estrogen receptor-alpha knockout mice. *J Androl* 2000; **21**: 107–121.
- [30] HESS RA, BUNICK D, BAHR J. Oestrogen, its receptors and function in the male reproductive tract – a review. *Mol Cell Endocrinol* 2001; **178**: 29–38.
- [31] HORLEIN AJ, NAAR AM, HEINZEL T, TORCHIA J, GLOSS B, KUROKAWA R, RYAN A, KAMEI Y, SODERSTROM M, GLASS CK, ROSENFELD MG. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 1995; **377**: 397–404.
- [32] HUHTANIEMI I, LEINONEN P, HAMMOND GL, VIHKO R. Effect of oestrogen treatment on testicular LH/HCG receptors and endogenous steroids in prostatic cancer patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1980; **13**: 561–568.
- [33] IMPROTA-BREARS T, WHORTON AR, CODAZZI F, YORK JD, MEYER T, McDONNELL DP. Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 4686–4691.
- [34] INKSTER S, YUE W, BRODIE A. Human testicular aromatase: immunocytochemical and biochemical studies. *J Clin Endocr Metab* 1995; **80**: 1941–1947.
- [35] ISHUNINA TA, KRUIJVER FP, BALESAR R, SWAAB DF. Differential expression of estrogen receptor alpha and beta immunoreactivity in the human supraoptic nucleus in relation to sex and aging. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; **85**: 3283–3291.
- [36] JANULIS L, HESS RA, BUNICK D, NITTA H, JANSSEN S, OSAWA Y, BAHR JM. Mouse epididymal sperm contain active P450 aromatase which decreases as sperm traverse the epididymis. *J Androl* 1996; **17**: 111–116.
- [37] JANULIS L, BAHR JM, HESS RA, JANSSEN S, OSAWA Y, BUNICK D. Rat testicular germ cells and epididymal sperm contain active P450 aromatase. *J Androl* 1998; **19**: 65–71.
- [38] KINUTA K, TANAKA H, MORIWAKE T, AYA K, KATO S, SEINO Y. Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads. *Endocrinology* 2000; **141**: 1317–1324.
- [39] KOTULA-BALAK M, SŁOMCZYŃSKA M., FRĄCZEK B, BOURGUIBA S, TABAROWSKI Z, CARREAU S, BILIŃSKA B. Complementary approaches demonstrate that the cellular aromatization in bank vole testes is related to photoperiod. *Eur J Histochem* 2003; **47**: 55–62.
- [40] KRAICHELY DM, SUN J, KATZENELLENBOGEN JA, KATZENELLENBOGEN BS. Conformational changes and coactivator recruitment by novel ligands for estrogen receptor- and estrogen receptor- $\beta$ : correlations with biological character and distinct differences among SRC coactivator family members. *Endocrinology* 2000; **141**: 3534–3545.

- [41] KREGE JH, HODGIN JB, COUSE JF, ENMARK E, WARNER M, MAHLER JF, SAR M, KORACH KS, GUSTAFSSON JA, SMITHIES O. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor  $\beta$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 15677–15682.
- [42] KUIPER GG, ENMARK E, PELTO-HUIKKO M, NILSSON S, GUSTAFSSON JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 5925–5930.
- [43] KUIPER GG, CARLSSON B, GRANDIEN K, ENMARK E, HAGGBLAD J, NILSSON S, GUSTAFSSON JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology* 1997; **138**: 863–870.
- [44] KUIPER GG, CARLQUIST M., GUSTAFSSON JA. Estrogen is a male and female hormone. *Sci Med* 1998; **5**: 36–45.
- [45] KULA K. Induction of precocious maturation of spermatogenesis in infant rats by human menopausal gonadotropin and inhibition by simultaneous administration of gonadotropins and testosterone. *Endocrinology* 1988; **122**: 34–39.
- [46] KUSHNER PJ, AGARD DA, GREENE GL, SCANLAN TS, SHIAU AK, UHT RM, WEBB P. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000; **74**: 311–317.
- [47] LAFLAMME N, NAPPI RE, DROLET G, LABRIE C, RIVEST S. Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype. *J Neurobiol* 1998; **36**: 357–378.
- [48] LAMB J, LADHA MH, MCMAHON C, SUTHERLAND RL, EWEN ME. Regulation of the functional interaction between cyclin D1 and the estrogen receptor. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 8667–8675.
- [49] LEE KH, HESS RA, BAHR J, LUBAHN DB, TAYLOR J, BUNICK D. Estrogen receptor  $\alpha$  has a functional role in the mouse rete testis and efferent ductules. *Biol Reprod* 2000; **63**: 1873–1880.
- [50] LEVALLET J, CARREAU S. Aromatase gene expression in rat testicular cells *in vitro*. *CR Acad Sci (Paris)* 1997; **320**: 123–129.
- [51] LEVALLET J, BILIŃSKA B, MITTRE H, GENISSEL C, FRESNEL J, CARREAU S. Expression and immunolocalization of functional cytochrome P450 aromatase in mature rat testicular cells. *Biol Reprod* 1998; **58**: 919–926.
- [52] LI H, PAPADOPOULOS V, VIDIC B, DYM M, CULTY M. Regulation of rat testis gonocyte proliferation by platelet-derived growth factor and estradiol: identification of signaling mechanisms involved. *Endocrinology* 1997; **138**: 1289–1298.
- [53] LUCONI M, MURATORI M, FORTI G, BALDI E. Identification and characterization of a novel functional estrogen receptor on human sperm membrane that interferes with progesterone effects. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; **84**: 1670–1678.
- [54] LUCONI M, FORTI G, BALDI E. Genomic and nongenomic effects of estrogens: molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002; **80**: 369–381.
- [55] LYNCH JP, LALA DS, PELUSO JJ, LUO W, PARKER KL, WHITE BA. Steroidogenic factor 1, an orphan nuclear receptor, regulates the expression of the rat aromatase gene in gonadal tissues. *Mol Endocrinol* 1993; **7**: 776–786.
- [56] MacCALMAN CD, BLASCHUK OW. Gonadal steroids regulate N-cadherin mRNA levels in the mouse testis. *Endocr J* 1994; **2**: 157–163.
- [57] MAHATO D, GOULDING EH, KORACH KS, EDDY EM. Spermatogenic cells do not require estrogen receptor- $\alpha$  for development or function. *Endocrinology* 2000; **141**: 1273–1276.
- [58] McKENNA NJ, LANZ RB, O'MALLEY BW. 1999 Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 1999; **20**: 321–344.
- [59] MENDELSON ME, KARAS RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *New Engl J Med* 1999; **340**: 1801–1811.
- [60] MIGLIACCIO A, CASTORIA G, DI DOMENICO M, DE FALCO A, BILANCIO A, LOMBARDI M, BARONE MW, AMETRANO D, ZANNINI MS, ABBONDANZA C, AURICCHIO F. Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor  $\beta$ -Src complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO J* 2000; **19**: 5406–5417.
- [61] MIURA T, MIURA C, OHTA T, NADER MR, TODO T, YAMAUCHI K. Estradiol-17 $\beta$  stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **264**: 230–234.
- [62] MOSSELMAN S, POLMAN J, DIJKEMA R. ER $\beta$ : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 1996; **392**: 49–53.
- [63] NADAL A, ROPERO AB, LARIBI O, MAILLET M, FUENTES E, SORIA B. Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor and estrogen receptor  $\beta$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 11603–11608.

- [64] NIELSEN M, BJORNSDOTTIR S, HOYER PE, BYSKOV AG. Ontogeny of oestrogen receptor  $\alpha$  in gonads and sex ducts of fetal and newborn mice. *J Reprod Fertil* 2000; **118**: 195–204.
- [65] NITTA H, BUNICK D, HESS RA, JANULIS L, NEWTON SC, MILLETTE CF, OSAWA Y, SHIZUTA Y, TODA K, BAHN JM. Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. *Endocrinology* 1993; **132**: 1396–13401.
- [66] O'DONNELL L, ROBERTSON KM, JONES ME, SIMPSON ER. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev* 2001; **22**: 289–318.
- [67] OGAWA S, LUBAHN DB, KORACH KS, PFAFF DW. Behavioural effects of estrogen receptor gene disruption in male mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 1476–1481.
- [68] PAPAPOULOS V, JIA MC, CULTY M, HALL PF, DYM M. Rat Sertoli cell aromatase cytochrome P450: regulation by cell culture conditions and relationship to the state of cell differentiation. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1993; **29A**: 943–949.
- [69] PELLETIER G, EL-ALFY M. Immunocytochemical localization of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the human reproductive organs. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; **85**: 4835–4840.
- [70] PELLETIER G, LABRIE C, LABRIE F. Localization of oestrogen receptor  $\alpha$ , oestrogen receptor  $\beta$  and androgen receptors in the rat reproductive organs. *J Endocrinol* 2000; **165**: 359–370.
- [71] PELLETIER G, LUU-THE V, CHARBONNEAU A, LABRIE F. Cellular localization of estrogen receptor  $\beta$  messenger ribonucleic acid in cynomolgus monkey reproductive organs. *Biol Reprod* 1999; **61**: 1249–1255.
- [72] PENTIKAINEN V, ERKKILA K, SUOMALAINEN L, PARVINEN M, DUNKEL L. Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; **85**: 2057–2067.
- [73] PETTERSSON K, GUSTAFSSON JA. Role of estrogen receptor  $\beta$  in estrogen action. *Annu Rev Physiol* 2001; **63**: 165–192.
- [74] PINILLA L, GARNELO P, GAYTAN F, AGUILAR E. Hypothalamic-pituitary function in neonatally oestrogen-treated male rats. *J Endocrinol* 1992; **134**: 279–286.
- [75] RAGO V, BILIŃSKA B, PALMA A, ANDO S, CARPINO A. Evidence of aromatase localization in cytoplasmic droplet of human immature ejaculated spermatozoa. *Folia Histochem Cytobiol* 2003; **41**: 23–27.
- [76] ROBERTSON KM, O'DONNELL L, JONES ME, MEACHEM SJ, BOON WC, FISHER CR, GRAVES KH, McLACHLAN RI, SIMPSON ER. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 7986–7991.
- [77] ROBERTSON KM, SIMPSON ER, LACHAM-KAPLAN O, JONES ME. Characterization of the fertility of male aromatase knockout mice. *J Androl* 2001; **23**: 825–830.
- [78] ROMMERTS FF, DE JONG FH, BRINKMANN AO, VAN DER MOLEN HJ. Development and cellular localization of rat testicular aromatase activity. *J Reprod Fertil* 1982; **65**: 281–288.
- [79] ROSENFELD CS, GANJAM VK, TAYLOR JA, YUAN X, STIEHR JR, HARDY MP, LUBAHN DB. Transcription and translation of estrogen receptor- $\beta$  in the male reproductive tract of estrogen receptor- $\alpha$  knock-out and wild-type mice. *Endocrinology* 1998; **139**: 2982–2987.
- [80] SAUNDERS PT, FISHER JS, SHARPE RM, MILLAR MR. Expression of oestrogen receptor  $\beta$  (ER  $\beta$ ) occurs in multiple cell types, including some germ cells, in the rat testis. *J Endocrinol* 1998; **156**: R13–17.
- [81] SAUNDERS PT, SHARPE RM, WILLIAMS K, MacPHERSON S, URQUART H, IRVINE DS, MILLAR MR. Differential expression of oestrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates. *Mol Hum Reprod* 2001; **7**: 227–236.
- [82] SEOL W, HANSTEIN B, BROWN M, MOORE DD. Inhibition of estrogen receptor action by the orphan receptor SHP (short heterodimer partner). *Mol Endocrinol* 1998; **12**: 1551–1557.
- [83] SHARPE RM. The roles of oestrogen in the male. *Trends Endocrinol Metab* 1998; **9**: 371–377.
- [84] SIMPSON ER, ZHAO Y, AGARWAL VR, MICHAEL MD, BULUN SE, HINSHELWOOD MM, GRAHAM-LORENCE S, SUN T, FISHER CR, QIN K, MENDELSON CR. Aromatase expression in health and disease. *Recent Prog Horm Res* 1997; **52**: 185–213.
- [85] SŁOMCZYŃSKA M. Receptory hormonów steroidowych – budowa i funkcja. *Post Biol Kom* 1995; **22**: 3–21.
- [86] TENA-SEMPERE M, NAVARRO J, PINILLA L, GONZALEZ LC, HUHTANIEMI I, AGUILAR E. Neonatal exposure to estrogen differentially alters estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  mRNA expression in rat testis during postnatal development. *J Endocrinol* 2000; **165**: 345–357.
- [87] TODA K, OKADA T, TAKEDA K, AKIRA S, SAIBARA T, SHIRAIISHI M, ONISHI S, SHIZUTA Y. Oestrogen at the neonatal stage is critical for the reproductive ability of male mice as revealed by supplementation with 17 $\beta$ -oestradiol to aromatase gene (Cyp19) knockout mice. *J Endocrinol* 2001; **168**: 455–463.



- [88] TOYAMA Y, HOSOI I, ICHIKAWA S, MARUOKA M, YASHIRO E, ITO H, YUASA S.  $\beta$ -estradiol 3-benzoate affects spermatogenesis in the adult mouse. *Mol Cell Endocrinol* 2001; **178**: 161–168.
- [89] TREMBLAY A, TREMBLAY GB, LABRIE F, GIGUERE V. Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor  $\beta$  through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol Cell* 1999; **3**: 513–519.
- [90] TSAI-MORRIS CH, AQUILANO DR, DUFAU ML. Cellular localization of rat testicular aromatase activity during development. *Endocrinology* 1985; **116**: 38–46.
- [91] TSAI-MORRIS CH, KNOX G, LUNA S, DUFAU ML. Acquisition of estradiol-mediated regulatory mechanism of steroidogenesis in cultured fetal rat Leydig cells. *J Biol Chem* 1986; **261**: 3471–3474.
- [92] VAN PELT MM, DE ROOIJ DG, VAN DER BURG B, VAN DER SAAG PT, GUSTAFSSON JA, KUIPER GJM. Ontogeny of estrogen receptor-beta expression in rat testis. *Endocrinology* 1999; **140**: 478–483.
- [93] WATSON CS, NORFLEET AM, PAPPAS T, GAMETCHU B. Rapid actions of estrogens in GH/B6 pituitary tumor cells via plasma membrane version of estrogen receptor- $\alpha$ . *Steroids* 1999; **64**: 5–13.
- [94] WEIHUA Z, MAKELA S, ANDERSSON LC, SALMI S, SAJIS, WEBSTER JI, JENSEN EV, NILSSON S, WARNER M, GUSTAFSSON JA. A role for estrogen receptor  $\beta$  in the regulation of growth of the ventral prostate. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 6330–6335.
- [95] WENIGER JP. Estrogen production by fetal rat gonads. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993; **44**: 459–462.

*Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak*

*Otrzymano: 24.01.2003 r.*

*Przyjęto: 25.02.2003 r.*

*30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*



## MECHANIZMY HYPERAKUMULACJI CYNKU I KADMU W ROŚLINACH

### MECHANISMS OF ZINC AND CADMIUM HYPERACCUMULATION IN PLANTS

Eugeniusz MAŁKOWSKI, Renata KURTYKA

Katedra Fizjologii Roślin, Uniwersytet Śląski, Katowice

**Streszczenie:** Najbardziej znanymi hyperakumulatorami cynku i kadmu są *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl oraz *Arabidopsis halleri* (L.) O'Kane & Al.-Shehbaz. Charakteryzują się one zwiększonym pobieraniem tych metali z podłoża, szybszym ich przemieszczaniem do pędów oraz opornością na wysokie stężenia metali w tkankach w porównaniu z gatunkami niebędącymi hyperakumulatorami. U *T. caerulescens* wykazano, że pobieranie Zn odbywa się poprzez nośnik ZNT1 charakteryzujący się wysokim powinowactwem do tego metalu. O zwiększonym pobieraniu Zn przez hyperakumulatora decyduje wzmożona ekspresja genu odpowiedzialnego za syntezę nośników ZNT1 w korzeniach i pędach. Przypuszczalnie podobny mechanizm funkcjonuje u *A. halleri*. Transport Cd do komórek *T. caerulescens* może odbywać się poprzez nośnik ZNT1, który wykazuje niskie powinowactwo do Cd lub poprzez IRT1 (nośnik specyficzny dla żelaza), który wykazuje wysokie powinowactwo do Cd. Jak do tej pory nie stwierdzono, czy pozostałe systemy transportujące kadm do komórek roślin niebędących hyperakumulatorami (LCT1, układy transportujące z rodziny Nramp), które wykazują niskie powinowactwo do Cd, biorą udział w pobieraniu kadmu przez hyperakumulatorów. Miejscem odkładania cynku w roślinach *T. caerulescens* są wakuole komórek epidermy liści, z wyjątkiem komórek aparatów szparkowych, w których stwierdzono bardzo niskie stężenia tego metalu. W przypadku *A. halleri* najwyższe stężenia Cd i Zn zaobserwowano we włoskach epidermy liści, podczas gdy w pozostałych komórkach epidermy stężenie obu metali było niższe w porównaniu z mezofilem. Przypuszczalnie jest to związane z małymi rozmiarami, a tym samym słabą wakuolizacją komórek epidermy u tego gatunku. Fakt ten wskazuje, iż u *A. halleri*, w przeciwieństwie do *T. caerulescens*, podstawową rolę w kumulacji cynku i kadmu odgrywają wakuole komórek mezofilu liści. Zn i Cd skumulowane w pędach obu gatunków roślin występują głównie w formach rozpuszczalnych w wodzie. Odkładanie obu metali w wakuolach lub włoskach komórek liści prawdopodobnie decyduje o hyperakumulacji i oporności *T. caerulescens* i *A. halleri* na toksyczne działanie Zn i Cd. Wyniki ostatnich badań wykazały, iż w odróżnieniu od gatunków niebędących hyperakumulatorami oporność *T. caerulescens* na Cd nie jest związana z syntezą i stężeniem fitochelatyn.

**Słowa kluczowe:** hyperakumulatory, cynk i kadm, mechanizm pobierania, miejsca kumulacji, oporność.

*Summary:* Among plant species that accumulate a large amount of zinc and cadmium *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl and *Arabidopsis halleri* (L.) O' Kane & Al.-Shehbaz have recently received considerable attention in studies examining the mechanisms of metal hyperaccumulation. They are characterized by higher rate of Zn and Cd uptake from a substrate, higher transport rate of the metals from root to shoot and higher tolerance to Zn and Cd in comparison with non-hyperaccumulating species. It was shown that in *T. caerulescens* Zn is taken up via ZNT1, a high-affinity Zn transport system. It was found that higher uptake rate of Zn in *T. caerulescens* is caused by increased expression of ZNT1 transporter in the root and shoot. Similar mechanisms may be expected to be operating in *A. halleri*. Cadmium may be transported into *T. caerulescens* cells by ZNT1 transporter, which mediate low-affinity Cd uptake, or by high-affinity Fe transporter IRT1, which mediate high-affinity Cd uptake. There are not data whether Cd enter plant cells in hyperaccumulators by other cation transporters (LCT1, members of Nramp family), which mediate low-affinity Cd uptake in non-hyperaccumulator plant species. It was proved that in *T. caerulescens* Zn was mainly localized in the vacuoles of epidermal leaf cells and was almost absent from the vacuoles of the cells from the stomatal complex. In *A. halleri* leaves, the trichomes had the largest concentrations of Zn and Cd. The epidermal cells other than trichomes contained lower concentrations of Zn and Cd than mesophyll cells. Probably it is connected with small size of epidermal cells and their vacuoles. This indicates that the mesophyll cells in the leaves of *A. halleri* are the major storage sites for Zn and Cd in contrast to *T. caerulescens*. In both plant species most of Zn and Cd accumulated in shoots was water-soluble. It was proposed that vacuoles and trichomes of leaf cells play an important role in hyperaccumulation and tolerance to Zn and Cd in *A. halleri* and *T. caerulescens*. Accumulation of Cd in the vacuoles of *T. caerulescens* is not connected with synthesis and level of phytochelatins, as it was observed in most investigated nonaccumulator plant species.

*Key words:* hyperaccumulators, zinc, cadmium, mechanisms of uptake, localization of metals, tolerance.

## WSTĘP

Metale ciężkie mogą dostawać się do gleby w wyniku wietrzenia skał macierzystych lub pochodzić ze źródeł antropogenicznych. W przypadku pierwszego źródła z reguły stężenia metali nie są wysokie i nie stanowią zagrożenia dla organizmów żywych [23, 49]. Natomiast źródła antropogeniczne przyczyniają się do znacznego nagromadzenia w glebach metali ciężkich [26, 49]. Wysokie stężenia tych metali w glebach powodują zmniejszenie liczby mikroorganizmów i bardzo często są przyczyną obniżonej aktywności wielu enzymów glebowych [2, 40], słabszego wzrostu oraz plonowania roślin [28, 38, 39, 46], jak również stanowią zagrożenie dla zdrowia ludzi [13].

Metale ciężkie mogą przebywać w glebach dziesiątki, a nawet setki lat [23], w odróżnieniu od związków organicznych zanieczyszczających glebę, które mogą być stosunkowo łatwo rozłożone przez mikroorganizmy lub rośliny do dwutlenku węgla i wody [10, 22]. W związku z tym istnieje potrzeba usunięcia nadmiaru tych metali z gleb lub przekształcenia ich w formy trudno rozpuszczalne, niedostępne dla organizmów żywych.

Najlepszą metodą umożliwiającą ograniczenie narażenia organizmów żywych na toksyczne działanie tych metali jest ich usunięcie z gleby. Spośród aktualnie proponowanych metod oczyszczania gleb fitoekstrakcja wydaje się być najbardziej atrakcyjną ze względu na niskie koszty [27, 47] oraz brak negatywnego wpływu na

środowisko glebowe [16]. Fitoekstrakcja może być indukowana, kiedy to przy pomocy różnych związków chemicznych indukuje się zdolność do hyperakumulacji u roślin wytwarzających dużą biomasę oraz ciągła, w której wykorzystuje się naturalne zdolności roślin, zwanych hyperakumulatorami, do akumulacji wysokich stężeń metali [51]. Rośliny takie charakteryzują się wyższą akumulacją metali w pędach niż w korzeniach, w związku z czym stosunek stężenia metalu w pędzie do stężenia w korzeniu jest u wszystkich znanych hyperakumulatorów większy od 1, podczas gdy u pozostałych roślin jest zawsze mniejszy od 1 [50 i cyt. tam literatura]. Do najbardziej znanych hyperakumulatorów cynku i kadmu zalicza się *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl oraz *Arabidopsis halleri* (L.) O'Kane & Al.-Shehbaz [3, 4, 41]. Przynależność systematyczna drugiego z wymienionych hyperakumulatorów nie jest jeszcze ustalona i niektórzy specjaliści zaliczają go do rodzaju *Cardaminopsis*, jako *Cardaminopsis halleri* (L.) Hayek [65]. W ciągu ostatnich kilku lat nastąpił znaczny postęp w wyjaśnieniu mechanizmów akumulacji takich metali, jak cynk i kadm, przez oba wymienione hyperakumulatory.

## I. MECHANIZM POBIERANIA CYNKU I KADMU PRZEZ HYPERAKUMULATORY

Systemy transportowe funkcjonujące w komórkach roślin można podzielić na trzy klasy: pompy, kanały jonowe oraz nośniki [21, 34]. Pompy (ATPazy), zużywając energię pochodzącą z rozkładu ATP, pompują w poprzek błony substrat wbrew gradientowi jego potencjału chemicznego, natomiast kanały jonowe umożliwiają przepływ jonów zgodnie z gradientem ich potencjału elektrochemicznego na zasadzie dyfuzji prostej. Nośniki dzieli się na uniportowe lub kotransportujące (symportowe lub antyportowe) [44]. Nośniki uniportowe transportują substrat zgodnie z gradientem jego potencjału chemicznego na zasadzie dyfuzji ułatwionej, podczas gdy nośniki kotransportujące przemieszczają substrat wbrew gradientowi jego potencjału chemicznego, przez sprzężenie tego transportu z transportem innego substratu (np.  $H^+$ ) [34, 44].

Na podstawie przeprowadzonych dotychczas badań stwierdzono, że dwuwartościowe jony metali ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ) przemieszczane są do wnętrza komórek roślinnych przede wszystkim przez nośniki uniportowe [12, 14, 34, 43]. Jedynie jony wapnia transportowane są głównie przez kanały jonowe [55, 63], jak również przez nośniki [6]. W związku z tym uwaga naukowców badających mechanizm pobierania jonów cynku i kadmu przez hyperakumulatory skoncentrowała się przede wszystkim na nośnikach błonowych.

### 1. Mechanizm pobierania cynku

Badania prowadzone w latach 70. i 80. wskazywały, że cynk transportowany jest do komórek roślinnych przez specyficzny dla cynku nośnik błonowy [24]. Efektem późniejszych

badania mających na celu wykrycie układu transportującego cynk było wykazanie u *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. czterech nośników błonowych: ZIP1, ZIP2, ZIP3 i ZIP4, biorących udział w transporcie jonów  $Zn^{2+}$  [18]. Nośniki te wraz z ZRT (wyizolowany z drożdży) i IRT (wyizolowany z *Arabidopsis thaliana*) tworzą grupę nośników określaną wspólną nazwą rodziny ZIP (*ZRT, IRT-like Protein*). Nośniki z rodziny ZIP odpowiedzialne są za pobieranie jonów  $Zn^{2+}$  (ZRT, ZIP) lub  $Fe^{2+}$  (IRT) [6, 19, 20].

Spośród czterech nośników błonowych ZIP1, ZIP2, ZIP3 i ZIP4 biorących udział w transporcie jonów  $Zn^{2+}$ , w odpowiedzi na niedobory cynku, nośniki ZIP1 i ZIP3 podlegają zwiększonej ekspresji w korzeniach, co wskazuje na ich udział w transporcie cynku z gleby do roślin. Natomiast ZIP4 podlega zwiększonej ekspresji w korzeniach i pędach, co sugeruje, że bierze on udział w transporcie wewnątrzkomórkowym lub pomiędzy tkankami [18].

Początkowe badania nad mechanizmem pobierania jonów  $Zn^{2+}$  przez najbardziej znanego hyperakumulatora cynku *T. caerulescens* J. & C. Presl wskazywały, że proces hyperakumulacji związany jest z większą liczbą nośników na jednostkę powierzchni plazmolemy tego gatunku w porównaniu z gatunkiem niebędącym hyperakumulatorem (*T. arvense* L.). Równocześnie translokacja cynku z korzeni do pędów była znacznie większa u *T. caerulescens* J. & C. Presl niż u *T. arvense* L. [31]. Dalsze badania potwierdziły, że zwiększone pobieranie cynku przez *T. caerulescens* J. & C. Presl jest efektem znacznie większej liczby nośników ZNT1 zarówno w komórkach korzeni, jak i pędów hyperakumulatora [1, 33, 45].

Większa liczebność nośnika ZNT1 u *T. caerulescens* J. & C. Presl (ekotyp Prayon) była skorelowana z wyższą maksymalną szybkością ( $V_{max}$ ) pobierania cynku. Podczas gdy w obecności  $1 \mu M$  cynku w pożywce,  $V_{max}$  dla hyperakumulatora wynosiła 271 pmol cynku pobranych przez  $10^6$  komórek na min., to u gatunku niebędącego hyperakumulatorem (*T. arvense* L.) wartość ta wynosiła tylko 43 pmol cynku [45]. Zaobserwowano ponadto odmienny system indukcji genu ZNT1 u *T. caerulescens* J. & C. Presl i *T. arvense* L. U hyperakumulatora *T. caerulescens* J. & C. Presl wysoki poziom ekspresji stwierdzono zarówno w przypadku braku cynku w pożywce, jak również w obecności  $1 \mu M$  cynku. Dopiero stężenie  $50 \mu M$ , które jest porównywalne ze stężeniem biodostępnego cynku w roztworze glebowym gleb zanieczyszczonych, powodowało zdecydowane obniżenie ekspresji genu ZNT1. Natomiast u *T. arvense* L. brak cynku w pożywce zwiększał ekspresję genu w porównaniu ze stężeniem  $1$  i  $10 \mu M$  cynku, przy czym wielkość ekspresji, niezależnie od stężenia metalu, była u tego gatunku niewielka w porównaniu z hyperakumulatorem [33, 45]. Przedstawione powyżej dane wskazują wyraźnie, że zwiększone pobieranie cynku przez hyperakumulatory jest wynikiem zwiększonej ekspresji genu ZNT1, a co za tym idzie większej liczby nośników ZNT1 w komórkach hyperakumulatorów w porównaniu z roślinami niebędącymi hyperakumulatorem [25].

## 2. Mechanizm pobierania kadmu

Jakkolwiek kadm, w odróżnieniu od cynku, nie jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania roślin, jest przez nie pobierany i kumulowany [5, 60, 66]. W związku z brakiem funkcji fizjologicznej występowanie nośnika specyficznego dla kadmu wydawało się niemożliwe. Początkowe próby wyjaśnienia mechanizmów pobierania kadmu skoncentrowały się więc na udziale systemów transportujących inne dwuwartościowe jony, przede wszystkim  $\text{Fe}^{2+}$ . Skoncentrowanie się na żelazie było efektem obserwacji, że oba pierwiastki działają na siebie antagonistycznie, tzn. kadm ogranicza kumulację żelaza, a żelazo kumulację kadmu [56, 57].

Pobieranie żelaza stymulowane jest przez niedobory żelaza w roślinie, co związane jest ze zwiększaniem się liczby nośników transportujących ten pierwiastek [18, 19]. W związku z tym Rodecap i wsp. [48] zbadali wpływ niedoborów żelaza na kumulację kadmu w tkankach *A. thaliana* (L.) Heynh. Stwierdzili oni, że niedobory żelaza zwiększały kumulację kadmu, co sugerowało, iż kadm może być pobierany przez system(y) transportujący(e) żelazo. Badania przeprowadzone na grochu (*Pisum sativum* L. cv. Sparkle) [9] potwierdziły wyniki uzyskane przez Rodecap i wsp. [48]. W eksperymencie tym siewki grochu rosnące na pożywce bez żelaza wykazywały siedmiokrotnie wyższą  $V_{\max}$  (236 nmol/g ś.m. · h) pobierania kadmu w porównaniu z siewkami rosnącymi na pożywce z żelazem ( $V_{\max} = 34$  nmol/g ś.m. · h). Wyższa  $V_{\max}$  pobierania kadmu przez siewki grochu rosnące na pożywce bez żelaza była skorelowana z wyższą ekspresją genu IRT1, co wskazywało, że kadm jest pobierany przez specyficzny dla żelaza nośnik IRT1 [9]. Hipoteza ta była dodatkowo potwierdzona przez wyniki wcześniejszych eksperymentów, w czasie których zaobserwowano silne hamowanie pobierania żelaza przez nośnik IRT1 w obecności kadmu [12].

W 1997 roku opisano po raz pierwszy system LCT1 transportujący kationy w komórkach roślin wyższych. System ten wyizolowany z pszenicy (*Triticum aestivum* cv. Atlas 66), podlegał ekspresji w korzeniach i liściach, charakteryzując się małą wybiórczością w stosunku do kationów [54]. Zakłada się, że w warunkach fizjologicznych główną jego funkcją jest transport jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , jednak ma on również zdolność transportowania kadmu [7]. Pobieranie wapnia przez system transportujący LCT1 było hamowane nie tylko przez jony  $\text{Cd}^{2+}$ , ale także  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , a szczególnie silnie przez  $\text{Pb}^{2+}$ , co mogłoby sugerować, iż również te jony są transportowane przez LCT1. Niepewna jest również budowa i sposób funkcjonowania systemu transportującego LCT1 (nośnik błonowy lub kanał jonowy) [7].

Badania ostatnich lat wykazały w roślinach obecność jeszcze jednej grupy integralnych białek błonowych pełniących funkcję systemów transportujących jony metali [59]. Z *A. thaliana* ekotypu Columbia wyizolowano, a następnie sklonowano geny należące do rodziny Nramp: AtNramp1, AtNramp2, AtNramp3, AtNramp4, AtNramp5, AtNramp6. Gen AtNramp1 podlega ekspresji w korzeniach, natomiast AtNramp3 i AtNramp4 w korzeniach i pędach siewek *A. thaliana*. Ekspresja tych genów u drożdży wykazała, że geny AtNramp1, AtNramp3 i AtNramp4 kodują białka biorące udział w transporcie jonów  $\text{Mn}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{2+}$ . AtNramp3 i AtNramp4 były tak samo skuteczne w transporcie żelaza do komórek drożdży, jak nośnik IRT1 specyficzny dla jonów  $\text{Fe}^{2+}$ , podczas gdy

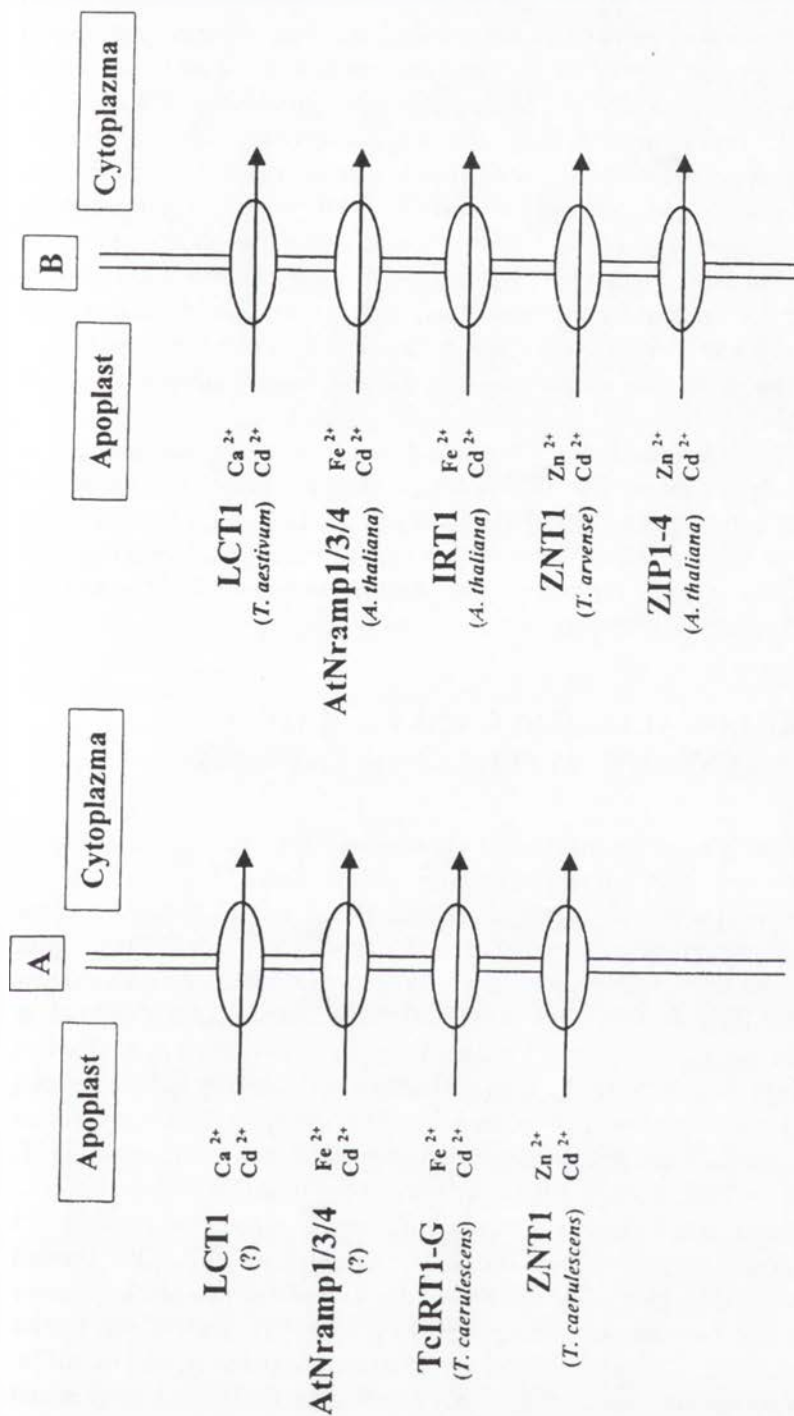
AtNramp1 charakteryzował się mniejszą efektywnością [59]. Na podstawie przedstawionych wyżej wyników postawiono hipotezę, że w pobieraniu żelaza przez rośliny bierze udział nie tylko nośnik IRT1, ale także systemy transportujące AtNramp3 i AtNramp4 [59]. Równocześnie stwierdzono, iż zwiększona ekspresja genów AtNramp1, AtNramp3 i AtNramp4, a co za tym idzie większa ilość układów transportujących AtNramp1, AtNramp3 i AtNramp4, powoduje blisko dwukrotnie większą akumulację kadmu u drożdży. W przypadku roślin (*Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia) zwiększona ilość tych systemów transportujących jest skorelowana z większą wrażliwością roślin na toksyczne działanie kadmu, co sugeruje, że systemy te transportują do wnętrza komórek nie tylko jony  $\text{Fe}^{2+}$ , lecz także jony  $\text{Cd}^{2+}$  [59].

W przypadku hyperakumulatorów (*T. caerulescens* J. & C. Presl, ekotyp Prayon) pierwszym potwierdzonym układem transportującym kadm był nośnik dla cynku ZNT1, który charakteryzował się niskim powinowactwem do jonów  $\text{Cd}^{2+}$  [45]. Dalsze badania [36] wykazały, że różne ekotypy *T. caerulescens* J. & C. Presl miały zdecydowanie odmienną zdolność do akumulowania kadmu, równocześnie charakteryzując się takimi samymi zdolnościami do kumulacji cynku. W celu określenia przyczyn tego zjawiska przeprowadzono badania fizjologiczne na dwóch ekotypach (Ganges i Prayon) wykazujących wyraźne różnice w akumulacji kadmu [37, 67]. Stwierdzono, że  $V_{\text{max}}$  dla kadmu była pięciokrotnie większa u ekotypu Ganges w porównaniu z ekotypem Prayon. Równocześnie u ekotypu Ganges stała Michaelisa-Mentena dla kadmu wynosiła  $0,18 \mu\text{M}$  wskazując, że układ transportujący charakteryzuje się wysokim powinowactwem do tego metalu [37]. Ponadto pobieranie kadmu u ekotypu Ganges nie było hamowane przez inne dwuwartościowe jony, w tym także żelazo [67]. Powyższe rezultaty pozwoliły na postawienie niezwykle zaskakującej hipotezy, że u ekotypu Ganges występuje specyficzny dla kadmu układ transportowy, charakteryzujący się wysokim powinowactwem do tego metalu [37, 67]. Dalsze badania udowodniły jednak, że wzmożone pobieranie kadmu przez rośliny ekotypu Ganges, w odpowiedzi na niedobory żelaza, jest związane ze zwiększoną ekspresją genu decydującego o syntezie specyficznego dla żelaza nośnika nazwanego TcIRT1-G [31]. Tak więc okazało się, iż nie istnieje specyficzny dla kadmu układ transportowy, natomiast szczególnie wysoka akumulacja kadmu u ekotypu Ganges w porównaniu z innymi ekotypami *T. caerulescens* J. & C. Presl jest wynikiem zwiększonej liczby specyficznego dla żelaza nośnika TcIRT1-G, którego skład aminokwasowy jest w około 90% identyczny ze składem nośnika IRT1 [35]. Na rycinie 1 przedstawiono systemy transportujące cynk i kadm przez plazmolemmę komórek roślin hyperakumulujących cynk i kadm oraz roślin niebędących hyperakumulatorami.

## II. TRANSPORT METALI Z KORZENI DO PĘDÓW

Hyperakumulatory charakteryzują się wyższą akumulacją metali w pędach niż w korzeniach, co świadczy o szybszym przemieszczaniu metali z korzeni do łodyg i liści. W ciągu eksperymentu trwającego 96 godz. zaobserwowano 10-krotnie wyższą





RYCINA 1. Systemy transportujące cynk i kadm przez plazmolemmę komórek roślinnych

**A** – Rośliny hyperakumulujące Zn i Cd – Rośliny nie będące hyperakumulatorami. Dużymi literami podano nazwę systemu transportującego. Kursywą w nawiasie podano nazwę gatunkową rośliny, u której stwierdzono występowanie danego systemu; znak zapytania świadczy, że dany system transportujący nie został wykryty u hyperakumulatorów. Obok nazwy systemu w pozycji górnej podano jon transportowany w warunkach fizjologicznych, natomiast w pozycji dolnej jon toksyczny również przenoszony do komórki przez dany system transportujący Fe<sup>2+</sup> Cd<sup>2+</sup>.

translokację znakowanego cynku z korzeni do pędów *T. caerulescens* J. & C. Presl w porównaniu z *T. arvense* L [32]. Ta różnica w szybkości przemieszczania cynku związana jest prawdopodobnie z różną kompartmentacją cynku w komórkach korzeni u *T. arvense* L. i *T. caerulescens* J. & C. Presl. W wakuolach komórek korzeni *T. arvense* L. kumulowane było 2,5 razy więcej cynku w porównaniu z wakuolą *T. caerulescens* J. & C. Presl. Ponadto cynk zgromadzony w wakuolach *T. arvense* L. był dwukrotnie wolniej przemieszczany ponownie do cytoplazmy. Zarówno mniejsza kumulacja w wakuolach, jak i szybsza wymiana cynku między wodniczkami a cytoplazmą u *T. caerulescens* J. & C. Presl, wskazywałyby na sprawniejsze przemieszczanie cynku do walca osiowego i sprawniejszy załadunek ksylemu w hyperakumulatorze. Potwierdzeniem tej hipotezy było wykazanie pięciokrotnie wyższego stężenia cynku w soku ksylemowym *T. caerulescens* J. & C. Presl w porównaniu z *T. arvense* L. [32]. Jak do tej pory nie przeprowadzono podobnych badań dotyczących kadmu.

W ksylemie *T. caerulescens* J. & C. Presl cynk transportowany jest głównie w postaci hydratyzowanych jonów  $Zn^{2+}$  (79%) oraz w znacznie mniejszym stopniu w postaci związanej z cytrynianem (21%) [52]. Brak jest informacji o formie, w jakiej transportowany jest cynk w ksylemie *A. halleri* (L.) O'Kane & Al.-Shehbaz, jak również brak jakichkolwiek danych podających, w jakiej postaci transportowany jest kadm w ksylemie hyperakumulatorów.

### III. LOKALIZACJA CYNKU I KADMU W TKANKACH HYPERAKUMULATORÓW

Stwierdzono, że w ścianach oraz cytoplazmie komórek korzeni *T. caerulescens* J. & C. Presl i *T. arvense* L. była gromadzona zbliżona ilość cynku [32].

Vázquez i wsp. [62] wykazali wysokie stężenia cynku w wakuolach komórek epidermalnych i subepidermalnych korzeni i liści *T. caerulescens* J. & C. Presl. Cynk w wakuolach występował w postaci globularnych kryształów lub mniejszych złogów zawierających różne ilości fosforu, wapnia i potasu. Akumulacja cynku w wakuoli w postaci nierozpuszczalnej została przez Vázquez i wsp. [62] powiązana ze zdolnością tego gatunku do hyperakumulacji [62]. Nowsze badania potwierdziły bardzo wysoką kumulację cynku w wakuolach komórek epidermalnych liści, jednak nie zaobserwowano różnic w stężeniu metalu w komórkach subepidermalnych i komórkach mezofilu [15, 30]. W przypadku roślin, zawierających w pędach cynk w ilości 20 000 mg/kg s.m., stężenie cynku w soku wakuolarnym komórek epidermy liści osiągało wartość 385 mM i było 5 do 6,5 razy wyższe niż stężenie w soku komórek mezofilu [30]. Bardzo ciekawym zjawiskiem jest bardzo niskie stężenie cynku w wakuolach komórek aparatów szparkowych (komórki szparkowe oraz przyszparkowe) [15]. Duże ilości cynku zakumulowane były także w ścianach komórkowych zarówno epidermy, jak i mezofilu, w związku z czym postawiono hipotezę, że ściany komórkowe liści biorą istotny udział w procesie hyperakumulacji cynku u *T. caerulescens* J. & C. Presl [15, 62]. Zdaniem

autorów niniejszego artykułu wyniki te muszą być jeszcze potwierdzone, zwłaszcza że nie stwierdzono żadnych różnic w ilości cynku skumulowanego w ścianach komórkowych korzeni *T. caerulea* J. & C. Presl i *T. arvensis* L. [32].

Frey i wsp. [15], w przeciwieństwie do Vázquez i wsp. [62], nie stwierdzili w wakuolach komórek *T. caerulea* obecności żadnych kryształów lub złogów zawierających cynk, a wprost przeciwnie był on rozmieszczony równomiernie w całej wodniczce. Wykazano ponadto, że powyżej 80% cynku skumulowanego w pędach tego hyperakumulatora jest rozpuszczalne w wodzie [30, 69]. Dalsze badania przy użyciu spektroskopii absorpcji promieniowania rentgenowskiego (*X-ray absorption spectroscopy* – XAS) potwierdziły występowanie cynku w postaci rozpuszczalnej. Wykazały one, że w pędach *T. caerulea* cynk występował w postaci hydratyzowanych jonów  $Zn^{2+}$  (26%), był związany z cytrynianem (38%), z histydyną (16%) i z kwasem szczawiovym (9%), podczas gdy tylko 12% było związane ze ścianą komórkową [52].

U *A. halleri* (L.) O’Kane & Al.-Shehbaz kadm i cynk przede wszystkim były kumulowane w mezofilu liści, zarówno w miększu palisadowym jak i gąbczastym, a nie w epidermie [29]. Przyczyną tego zjawiska mogą być małe rozmiary komórek epidermy liści, a co za tym idzie niewielkie rozmiary ich wakuol [68]. W epidermie bardzo wysokie stężenia obu metali, znacznie wyższe niż w mezofilu, zaobserwowano w bazalnej części włosków [29, 68]. Przypuszcza się, że mezofil oraz włoski odgrywają bardzo ważną rolę w hyperakumulacji obu metali, jednak wraz ze wzrostem stężenia cynku i kadmu w tkankach pędów wzrasta rola mezofilu w procesie hyperakumulacji [29, 68]. Podobnie jak u *T. caerulea* większa część (60%) cynku skumulowanego w pędach *A. halleri* (L.) O’Kane & Al.-Shehbaz jest rozpuszczalna w wodzie [68]. W kompleksowaniu części cynku skumulowanego w pędach *A. halleri* (L.) O’Kane & Al.-Shehbaz może brać udział cytrynian, tak jak to zaobserwowano u *T. caerulea* J. & C. Presl [68].

#### IV. OPORNOŚĆ NA METALE

Istotnym czynnikiem decydującym o hyperakumulacji jest oporność roślin na bardzo wysokie stężenia toksycznych metali w tkankach [42]. Zakłada się, że oporność polega na wiązaniu metali z fitochelatynami i/lub odkładaniu ich w pewnych przedziałach komórkowych (np. wakuola, ściana komórkowa), jak również wytrącaniu w postaci złogów/kryształów [17, 53, 58, 61, 64].

Odkładanie cynku i kadmu w wakuolach komórek epidermy liści *T. caerulea* J. & C. Presl lub w wakuolach mezofilu i włoskach epidermy liści *A. halleri* (L.) O’Kane & Al.-Shehbaz prawdopodobnie decyduje o oporności hyperakumulatorów na toksyczne działanie obu metali. Zakłada się również, iż odkładanie cynku w ścianach oraz przestworach międzykomórkowych liści *T. caerulea* J. & C. Presl także może zwiększać oporność na ten metal [15]. Wyniki ostatnich badań wykazały, iż oporność na Cd *T. caerulea* J. & C. Presl nie jest związana z syntezą i stężeniem

fitochelatyn, jak to było obserwowane w przypadku roślin niebędących hyperakumulatorami [8, 11].

## PODSUMOWANIE

Do najbardziej znanych hyperakumulatorów cynku i kadmu zalicza się *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl oraz *Arabidopsis halleri* (L.) O'Kane & Al.-Shehbaz [3, 4, 41]. O hyperakumulacji decyduje zwiększone pobieranie metalu z podłoża i przemieszczanie do pędów oraz oporność na wysokie stężenia metalu w tkankach [42].

Zwiększone pobieranie cynku z podłoża przez *T. caerulescens* związane jest ze znacznie intensywniejszą ekspresją genu *ZNT1* u tego gatunku w porównaniu z *T. arvense*, gatunku niebędącego hyperakumulatorem cynku. Wzmocniona ekspresja genu powoduje występowanie znacznie większej liczby na jednostkę powierzchni błony specyficznych dla cynku nośników *ZNT1* [1, 33, 45]. Efektem tego jest intensywniejsze pobieranie cynku przez korzenie hyperakumulatora [31]. Zakumulowany w komórkach korzeni *T. caerulescens* cynk jest następnie znacznie łatwiej uruchamiany z wakuol, przemieszczany do walca osiowego i ładowany do ksylemu w porównaniu z *T. arvense*. Skutkiem tego stężenie cynku w soku ksylemowym hyperakumulatora jest pięciokrotnie wyższe w porównaniu ze stężeniem w soku ksylemowym *T. arvense* L., co ostatecznie prowadzi do szybszego przemieszczania metalu do pędów [32]. Przypuszcza się, że podobny mechanizm funkcjonuje u *A. halleri* drugiego hyperakumulatora cynku [68].

Stwierdzono ponadto, że u *T. caerulescens* (ekotyp Prayon) kadm może być pobierany przez ten sam nośnik *ZNT1*, który funkcjonuje wówczas jako system transportowy o niskim powinowactwie [45]. U ekotypu Ganges, charakteryzującego się szczególnie wysoką kumulacją kadmu, wykazano, że pobieranie tego metalu zachodzi poprzez nośnik specyficzny dla żelaza *IRT1* (*TcIRT1-G*) i niedobory żelaza w roślinie stymulują akumulację zarówno jonów  $Fe^{2+}$ , jak i  $Cd^{2+}$  [35, 37]. Jak do tej pory nie stwierdzono, czy pozostałe systemy transportujące kadm do komórek roślin niebędących hyperakumulatorami (*LCT1*, układy transportujące z rodziny *Nramp*), które wykazują niskie powinowactwo do kadmu [7, 59], biorą udział w pobieraniu kadmu przez hyperakumulatory.

Dostarczany do pędów w bardzo dużych ilościach cynk jest u *T. caerulescens* przede wszystkim kumulowany w wakuolach komórek epidermy górnej i dolnej liści, nie tworząc żadnych kryształów lub złogów, a jego stężenie w soku wakuolarnym może osiągać wartość 385 mM [30]. Miejscem odkładania cynku i kadmu u *A. halleri* są również wakuole komórek liści. Jednak w przypadku tego gatunku podstawową rolę w kumulacji obu metali odgrywają komórki mezofilu liści. Przypuszczalnie jest to związane z małymi rozmiarami komórek epidermy u *A. halleri*, a co za tym idzie słabą ich wakuolizacją. Bardzo duże ilości obu metali stwierdzono także we włoskach epidermy liści *A. halleri* [29, 68]. U obu gatunków metale skumulowane w wakuolach występują głównie w formach rozpuszczalnych w wodzie [68, 69], są więc biodostępne. Z drugiej jednak strony ich akumulacja w wodniczkach i włoskach komórek liści

decyduje prawdopodobnie o hyperakumulacji i oporności *A. halleri* i *T. caerulescens* na toksyczne działanie cynku i kadmu. Zakłada się również, iż odkładanie cynku w apoplacie liści *T. caerulescens* może także decydować o wysokiej oporności na ten metal [15]. Wyniki ostatnich badań wykazały, że oporność na Cd *T. caerulescens*, w odróżnieniu od gatunków niebędących hyperakumulatorami, nie jest związana z syntezą i stężeniem fitochelatin [11]. Ostatnie badania wykazują, że w liściach *A. halleri* w odróżnieniu od *T. caerulescens* Zn jest głównie skompleksowany z jabłczanem (Plant Physiol. 2002; **130**: 1815–1826).

## PODZIĘKOWANIA

Autorzy pragną podziękować dr hab. Małgorzacie Wierzbickiej, prof. UW, oraz prof. dr hab. Waldemarowi Karczowi za dyskusję i cenne uwagi. Autorzy składają również podziękowania dr Halinie Lekacz i dr Zbigniewowi Burdachowi za uwagi redakcyjne.

## LITERATURA

- [1] ASSUNÇÃO AGL, DE COSTA MARTINS P, DE FOLTER S, VOOIJS R, SCHAT H, AARTS MGM. Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Cell Environ* 2001; **24**: 217–226.
- [2] BADURA L, PIOTROWSKA-SEGET Z, SZELIGIEWICZ M. Lead-induced changes of rhizospheric bacterium populations in different root zones. *Zentralbl Mikrobiol* 1993; **148**: 432–440.
- [3] BAKER AJM, WALKER PL. Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. [w] Shaw AJ [red.] Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects. CRC Press, Inc Boca Raton, Florida USA, 1990: 155–177.
- [4] BERT V, MACNAIR MR, DE LAGUERIE P, SAUMITOU-LAPRADE, PETIT D. Zinc tolerance and accumulation in metalcolous and nonmetalcolous populations of *Arabidopsis halleri* (*Brassicaceae*). *New Phytol* 2000; **146**: 225–233.
- [5] BURZYŃSKI M. The uptake and accumulation of phosphorous and nitrates and the activity of nitrate reductase in cucumber seedlings treated with PbCl<sub>2</sub> or CdCl<sub>2</sub>. *Acta Soc Bot Pol* 1988; **57**: 349–359.
- [6] CLEMENS S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 2001; **212**: 475–486.
- [7] CLEMENS S, ANTOSIEWICZ DM, WARD JM, SCHACHTMAN DP, SCHROEDER JI. The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 12043–12048.
- [8] COBBETT CS. Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol* 2000; **123**: 825–832.
- [9] COHEN C K, FOX TC, GARVIN DF, KOCHIAN LV. The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. *Plant Physiol* 1998; **116**: 1063–1072.
- [10] CUNNINGHAM S D, OW DW. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol* 1996; **110**: 715–719.
- [11] EBBS S, LAU I, AHNER B, KOCHIAN L. Phytochelatin synthesis is not responsible for Cd tolerance in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (J. & C. Presl). *Planta* 2002; **214**: 635–640.
- [12] EIDE D, BRODERIUS M, FETT J, GUERINOT ML. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 5624–5628.
- [13] FERGUSSON J. The heavy elements: chemistry, environmental impact and health effects. Pergamon Press plc, Oxford, England, 1991: 614.
- [14] FOX TC, GUERINOT ML. Molecular biology of cation transport in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1998; **49**: 669–696.

- [15] FREY B, KELLER C, ZIEROLD K, SCHULIN R. Distribution of Zn in functionally different leaf epidermal cells of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Cell Environ* 2000; **23**: 675–687.
- [16] GALIULIN RV, BASHKIN VN, GALIULINA RR, KUCHARSKI R, MAŁKOWSKI E, MARCHWIŃSKA E. The impact of phytoextraction effectors on the enzymatic activity of soil contaminated by heavy metals. *Agricultural Chemistry* 1998; **2**: 243–251.
- [17] GLIŃSKA S, GABARA B. Influence of selenium on lead absorption and localization in meristematic cells of *Allium sativum* L. and *Pisum sativum* L. roots. *Acta Biol Cracov Series Bot* 2002; **44**: 39–48.
- [18] GROTZ N, FOX T, CONNOLLY E, PARK W, GUERINOT ML, EIDE D. Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 7220–7224.
- [19] GUERINOT ML. Molecular mechanisms of ion transport in plant cells. [w] Raskin I, Ensley BD [red.] Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment, John Wiley & Sons, Inc, New York, USA 2000, 271–285.
- [20] GUERINOT ML. The ZIP family of metal transporters. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1465**: 190–198.
- [21] HEDRICH R, SCHROEDER JI. The physiology of ion channels and electrogenic pumps in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1989; **40**: 539–569.
- [22] HUANG JW, CUNNIGHAM SD. Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. *New Phytol* 1996; **134**: 75–84.
- [23] KABATA-PENDIAS A, PENDIAS H. Biogeochemia pierwiastków śladowych. PWN, Warszawa 1999.
- [24] KOCHIAN LV. Zinc absorption from hydroponic solutions by plant roots. [w] Robson AD [red.] Zinc in soil and plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1993; 45–57.
- [25] KOCHIAN LV, PENCE NS, LETHAM DLD, PINEROS MA, MAGALHAES JV, HOEKENGA OA, GARVIN DF. Mechanisms of metal resistance in plants: aluminum and heavy metals. *Plant Soil* 2002; **247**: 109–119.
- [26] KUCHARSKI R, MARCHWIŃSKA E, GZYL J. Agricultural policy in polluted areas. *Ecol Eng* 1994; **3**: 299–312.
- [27] KUCHARSKI R, SAS-NOWOSIELSKA A, POGRZEBA M, KRYŃSKI K, MAŁKOWSKI E. Perspektywy stosowania metody fitoekstrakcji do oczyszczania gleb w warunkach polskich. *Ochr Środ Zasobów Natur* 1999; **18**: 469–475.
- [28] KURTYKA R, KARCZ W, MAŁKOWSKI E. Interrelation between calcium and cadmium in their effect on IAA-induced elongation growth. *Acta Physiol Plant* 2001; **23**, 3 suppl.: 64.
- [29] KÜPPER H, LOMBI E, ZHAO FJ, MCGRATH SP. Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta* 2000; **212**: 75–84.
- [30] KÜPPER H, ZHAO FJ, MCGRATH SP. Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol* 1999; **119**: 305–311.
- [31] LASAT MM, BAKER AJM, KOCHIAN LV. Physiological characterization of root Zn<sup>2+</sup> absorption and translocation to shoots in Zn hyperaccumulator and non-accumulator species of *Thlaspi*. *Plant Physiol* 1996; **112**: 1715–1722.
- [32] LASAT MM, BAKER AJM, KOCHIAN LV. Altered Zn compartmentation in the root symplasm and stimulated Zn absorption into the leaf as mechanisms involved in Zn hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol* 1998; **118**: 875–883.
- [33] LASAT MM, PENCE NS, GARVIN DV, EBBS SD, KOCHIAN LV. Molecular physiology of zinc transport in the Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J Exp Bot* 2000; **51**: 71–79.
- [34] LOGAN H, BASSET M, VÉRY A-A, SENTENAC H. Plasma membrane transport systems in higher plants: from black boxes to molecular physiology. *Physiol Plant* 1997; **100**: 1–15.
- [35] LOMBI E, TEARALL KL, HOWARTH JR, ZHAO FJ, HAWKESFORD MJ, MCGRATH SP. Influence of iron status on cadmium and zinc uptake by different ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol* 2002; **128**: 1359–1367.
- [36] LOMBI E, ZHAO FJ, DUNHAM SJ, MCGRATH SP. Cadmium accumulation in populations of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi goesingense*. *New Phytol* 2000; **145**: 11–20.
- [37] LOMBI E, ZHAO FJ, MCGRATH SP, YOUNG SD, SACCHI GA. Physiological evidence for a high-affinity cadmium transporter highly expressed in a *Thlaspi caerulescens* ecotype. *New Phytol* 2001; **149**: 53–60.
- [38] MAŁKOWSKI E, STOLAREK J, KARCZ W. Toxic effect of Pb<sup>2+</sup> ions on extension growth of cereal plants. *Pol J Environ Studies* 1996; **5** (1): 41–45.
- [39] MAŁKOWSKI E, KITA A, GALAS W, KARCZ W, KUPERBERG JM. Lead distribution in corn seedlings (*Zea mays* L.) and its effect on the growth and the concentrations of potassium and calcium. *Plant Growth Regul* 2002; **37**: 69–76.

- [40] McGRATH SP. Effects of heavy metals from sewage sludge on soil microbes in agricultural ecosystems. [w] Ross SM [red.] Toxic metals in soil-plant systems. John Wiley and Sons, Chichester, England 1994; 247–274.
- [41] McGRATH SP. Phytoextraction for soil remediation. [w] Brooks RR [red.] Plants that hyperaccumulate heavy metals their role in phytoremediation, microbiology, archaeology, mineral exploration and phytominig. University Press, Cambridge, UK 1998; 261–287.
- [42] McGRATH SP, ZHAO FJ, LOMBI E. Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal contaminated soils. *Plant Soil* 2001; **232**: 207–214.
- [43] MORI S. Iron acquisition by plants. *Curr Opin Plant Biol* 1999; **2**: 250–253.
- [44] NICHOLLS DG, FERGUSON SJ. Bioenergetyka 2. Wydawnictwa Naukowe PWN, Warszawa 1995.
- [45] PENCE NS, LARSEN PB, EBBS SD, LETHAM DLD, LASAT MM, GARVIN DF, EIDE D, KOCHIAN LV. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 4956–4960.
- [46] PIOTROWSKA M, DUDKA S, BOLIBRZUCH E. Wpływ zróżnicowanych dawek metali śladowych na plon oraz zawartości tych pierwiastków w kukurydzy (*Zea mays* L.). Część II. Miedź i ołów. *Arch Ochr Środ* 1992; **18** (2): 145–152.
- [47] POGRZEBA M, KUCHARSKI R, SAS-NOWOSIELSKA A, KRYŃSKI K, MAŁKOWSKI E. Ocena metody fitoekstrakcji do oczyszczania gleb z metali ciężkich. *Maszyny Górnicze* 2001; **87** (3): 37–41.
- [48] RODECAP KD, TINGEY DT, LEE EH. Iron nutrition influence on cadmium accumulation by *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *J Environ Qual* 1994; **23**: 239–246.
- [49] ROSS SM. Sources and forms of potentially toxic metals in soil - plant systems [w] Ross SM [red.] Toxic metals in soil-plant systems, John Wiley and Sons, Chichester, England, 1994: 3–25.
- [50] SALT DE, KRÄMER U. Mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. [w] Raskin I, Ensley BD [red.] Phytoremediation of toxic metals, using plants to clean up the environment, John Wiley & Sons, Inc New York, USA 2000: 231–246.
- [51] SALT DE, SMITH RD, RASKIN I. Phytoremediation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1998; **49**: 643–668.
- [52] SALT DE, PRINCE RC, BAKER AJM, RASKIN I, PICKERING IJ. Zinc ligands in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as determined using X-ray absorption spectroscopy. *Environ Sci Technol* 1999; **33**: 713–717.
- [53] SAMARDAKIEWICZ S, WOŹNY A. The distribution of lead in duckweed (*Lemna minor* L.) root tip. *Plant Soil* 2000; **226**: 107–111.
- [54] SCHACHTMAN DP, KUMAR R, SCHROEDER JI, MARSH EL. Molecular and functional characterization of a novel low-affinity cation transporter (LCT1) in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 11079–11084.
- [55] SHROEDER JI, THULEAU P. Ca<sup>2+</sup> channels in higher plant cells. *Plant Cell* 1991; **3**: 555–559.
- [56] SIEDLECKA A, KRUPA Z. Interaction between cadmium and iron. Accumulation and distribution of metals and changes in growth parameters of *Phaseolus vulgaris* L. seedlings. *Acta Soc Bot Pol* 1996; **65**: 277–282.
- [57] SIEDLECKA A, KRUPA Z. Cd/Fe interaction in higher plants – its consequences for the photosynthetic apparatus. *Photosynthetica* 1999; **36**: 321–331.
- [58] STROIŃSKI A, ZIELEZIŃSKA M. Cadmium and oxidative stress influence on phytochelatin synthase activity in potato tuber. *Acta Physiol Plant* 2001; **23**: 157–160.
- [59] THOMINE S, WANG R, WARD JM, CRAWFORD NM, SCHROEDER JI. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 4991–4996.
- [60] TRIVEDI S, ERDEI L. Effects of cadmium and lead on the accumulation of Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> and on the influx and translocation of K<sup>+</sup> in wheat of low and high K<sup>+</sup> status. *Physiol Plant* 1992; **84**: 94–100.
- [61] TUKENDORF A. Fitochelatyiny – roślinne peptydy wiążące metale ciężkie. *Post Biochem* 1993; **39**: 60–67.
- [62] VÁZQUEZ MD, POSCHENRIEDER CH, BARCELÓ J, BAKER AJM, HATTON P, COPE GH. Compartmentation of zinc in roots and leaves of the zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* J. & C. *Presl. Bot Acta* 1994; **107**: 243–250.
- [63] VÉRY AA, SENTENAC H. Cation channels in the *Arabidopsis* plasma membrane. *Trends Plant Sci* 2002; **7**: 168–175.
- [64] WIERZBICKA M, POTOCKA A. Lead tolerance in plants growing on dry and moist soils. *Acta Biol Cracov Series Bot* 2002; **44**: 21–28.

- [65] WIERZBICKA M, ROSTAŃSKI A. Microevolutionary changes in ecotypes of calamine waste heap vegetation near Olkusz, Poland: a review. *Acta Biol Cracov Series Bot* 2002; **44**: 7–19.
- [66] WÓJCIK M, TUKENDORF A. Cd-tolerance of maize, rye and wheat seedlings. *Acta Physiol Plant* 1999; **2**: 99–107.
- [67] ZHAO FJ, HAMON RE, LOMBI E, MCLAUGHLIN MJ, MCGRATH SP. Characteristics of cadmium uptake in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J Exp Bot* 2002; **53**: 535–543.
- [68] ZHAO FJ, LOMBI E, BREEDON T, MCGRATH SP. Zinc hyperaccumulation and cellular distribution in *Arabidopsis halleri*. *Plant Cell Environ* 2000; **23**: 507–514.
- [69] ZHAO FJ, SHEN ZG, MCGRATH SP. Solubility of zinc and interactions between zinc and phosphorus in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Cell Environ* 1998; **21**: 108–114.

*Redaktor prowadzący – Maria Olszewska*

*Otrzymano: 11.12.2002 r.*

*Przyjęto: 26.02.2003 r.*

*Adres autora: ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice*

*e-mail: malkowsk@us.edu.pl*



## IRP1, BIAŁKO KONTROLUJĄCE HOMEOSTAZĘ ŻELAZA W KOMÓRKACH SSAKÓW: REGULACJA JEGO AKTYWNOŚCI PRZEZ JONY ŻELAZA I TLENEK AZOTU\*

IRP1, PROTEIN CONTROLLING IRON HOMEOSTASIS IN MAMMALIAN  
CELLS: REGULATION OF ITS ACTIVITIES BY IRON AND NITRIC OXIDE

Rafał R. STARZYŃSKI, Paweł LIPIŃSKI

Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN

*Streszczenie:* IRP1 potranskrypcyjnie reguluje ekspresję białek biorących udział w utrzymaniu homeostazy jonów Fe u ssaków. IRP1 jest białkiem dwufunkcyjnym, które występuje w cytoplazmie jako akonitaza, enzym zawierający katalityczne centrum [4Fe-4S] (holo-IRP1) lub jako białko *trans*-regulatorowe, pozbawione tego centrum (apo-IRP1). Dwie aktywności IRP1 wzajemnie się wykluczają i są odwrotnie regulowane przez jony Fe zawarte w zmiennej puli żelaza (LIP). Przy niedoborze jonów Fe, w komórce przeważa apo-IRP1, które przyłącza się do sekwencji reagujących na żelazo (IREs), występujących w mRNA podjednostek ferrytyny (Ft) oraz receptora transferyny (TfR). Gdy IRP1 wiąże się z IRE w końcu 5'UTR mRNA podjednostek Ft, powoduje zahamowanie ich translacji. Wiązanie IRP1 z IREs występującymi w końcu 3'UTR mRNA TfR zwiększa jego stabilność, a w konsekwencji syntezę receptora. Odwrotna regulacja syntezy obu białek, wynikająca z braku wiązania holo-IRP1 z IRE, ma miejsce, gdy w komórce poziom LIP jest wysoki. Zarówno przy niedoborze, jak i nadmiarze jonów Fe skutkiem regulacji syntezy Ft i TfR przez IRP1 jest szybki powrót do fizjologicznego poziomu LIP. Tlenek azotu (NO), opisano jako drugi po jonach Fe czynnik biologiczny regulujący aktywność IRP1. Podobnie jak chelatory jonów Fe, NO hamuje aktywność akonitazy IRP1 i indukuje aktywność wiązania się z IRE. Szybkie pojawienie się apo-IRP1 w komórkach poddanych działaniu NO jest jednak, w przeciwieństwie do niedoboru żelaza, efektem interakcji NO z centrum [4Fe-4S], jego destabilizacji i usunięcia z cząsteczki IRP1. Poza modulowaniem aktywności IRP1, NO powoduje także zmniejszenie poziomu IRP1 w komórkach.

*Słowa kluczowe:* IRP1, akonitaza, IRE, centrum [4Fe-4S], metabolizm żelaza, ferrytyna, receptor transferyny, LIP, reakcja Fentona, tlenek azotu (NO), NOS.

*Summary:* IRP1 posttranscriptionally regulates the expression of proteins involved in iron metabolism in mammals. IRP1 is a cytosolic bifunctional protein, which exhibits aconitase activity when it contains a catalytic [4Fe-4S] center (holo-IRP1) or *trans*-regulatory activity when it lacks this center (apo-IRP1). These activities are mutually exclusive and are conversely regulated by iron in the labile iron pool (LIP). In iron deficiency apo-IRP1 predominates in the cells and binds iron responsive elements (IREs) present in mRNAs encoding ferritin (Ft) subunits and transferrin receptor (TfR). The interaction of IRP1 with IRE located in the 5'UTR of Ft mRNA causes the inhibition of its translation and Ft synthesis. Binding of IRP1 to IRE located in the 3'UTR of TfR mRNA increases its stability and consequently increases TfR synthesis. The converse regulation of Ft and TfR synthesis resulting from the lack of binding of holo-IRP1 to IRE occurs in cells with high LIP level. In both, iron deficiency and excess IRP1-mediated regulation rapidly restores physiological LIP level. Apart from the regulation mediated by iron, nitric oxide (NO) was the first biological factor found to be able to regulate IRP1 activities. Similarly to iron chelators, NO inhibits aconitase activity of IRP1 and induces its IRE-binding activity. However, in contrast to iron deprivation, quick appearance of apo-IRP1 in cells exposed to NO results from the interaction of NO with [4Fe-4S] cluster of IRP1, its disassembly and removal from IRP1 molecule. Besides the modulation of IRP1 activities NO has been shown to down-regulate IRP1 level in the cells.

*Key words:* IRP1, aconitase, IRE, [4Fe-4S] center, iron metabolism, ferritin, transferrin receptor, Fenton reaction, nitric oxide, NOS.

## WPROWADZENIE

Żelazo jest metalem drugim po glinie pod względem zawartości w skorupie ziemskiej ( $5 \times 10^4$  ppm) i stanowi około 5% jej składu [14]. Pierwiastek ten jest nieodzownym elementem organizmów żywych. Wyjątkiem są bakterie z rodzaju *Lactobacillus* [60]. Przypuszcza się, że przy udziale jonów żelaza (Fe) występujących w formie siarczku żelazawego ( $\text{FeS}_2$ , pirytu) katalizowane były pierwsze reakcje metaboliczne [81]. Bezwzględne biologiczne zapotrzebowanie na żelazo wiąże się z udziałem jonów tego metalu w procesach istotnych dla komórki i organizmu. Jony Fe są funkcjonalnym elementem centrów aktywnych białek uczestniczących w przenoszeniu tlenu, eliminowaniu reaktywnych jego form, oddychaniu komórkowym, cyklu Krebsa, syntezie DNA oraz regulacji transkrypcji genów [15]. Tak szeroki zakres biologicznej reaktywności jonów Fe wynika z ich właściwości oksydoredukcyjnych. Żelazo występuje w dwóch głównych stopniach utlenienia: jako jon żelazawy, Fe(II) (d6) i jon żelazowy, Fe(III) (d5). Oddawanie elektronu przez jon Fe(II) z niewypełnionej powłoki d lub przyjmowanie na nią elektronu przez jon Fe(III) może dokonywać się w szerokim zakresie potencjału oksydoredukcyjnego. Potencjał ten może być modyfikowany przez kompleksy jonów Fe, takie jak hem czy centra żelazowo-siarkowe, oraz przez rodzaj i strukturę przestrzenną ligandów, które te kompleksy wiążą. Umożliwia to zastosowanie właściwości chemicznych żelaza do potrzeb określonego enzymu, charakteryzującego się specyficzną aktywnością. W obecności tlenu i przy fizjologicznym pH termodynamicznie korzystną formą występowania żelaza jest jon Fe(III), powstający w wyniku utlenienia jonu Fe(II). Wolny jon Fe(III) charakteryzuje się jednak niską rozpuszczalnością w roztworach fizjologicznych ( $10^{-18}$  M) [66] i jest biologicznie niedostępny. Z kolei jony Fe(II), bardzo dobrze rozpuszczalne, mogą

katalizować reakcję Fentona, w której generowany jest rodnik wodorotlenowy ( $\bullet\text{OH}$ ), cząsteczka odpowiedzialna za peroksydację lipidów, podwójne pęknięcia DNA czy uszkodzenia białek [28]. Ograniczeniem niekorzystnych oddziaływań jonów Fe w komórkach, a także sposobem na zapewnienie ich biodostępności okazało się wykształcenie w toku ewolucji białek, tworzących kompleksy, w których jony Fe występują w formie jonów Fe(III). Skoordynowana regulacja ekspresji tych białek jest kluczowym elementem ogólnoustrojowej i komórkowej homeostazy żelaza, której istota polega na utrzymaniu ciągłości procesów metabolicznych, odbywających się z udziałem jonów tego metalu przy jednoczesnym zmniejszeniu puli jonów Fe(II) katalizujących reakcję Fentona.

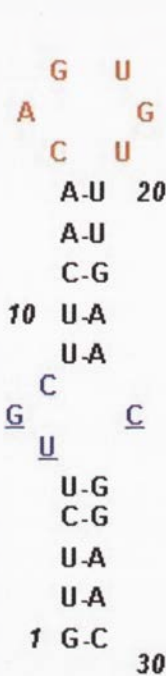
## ELEMENTY POTRANSKRYPCYJNEJ REGULACJI KOMÓRKOWEGO METABOLIZMU JONÓW ŻELAZA

Wewnątrzkomórkowa homeostaza żelaza jest wynikiem zharmonizowanej regulacji napływu żelaza do komórki, jego wykorzystania w reakcjach biochemicznych, magazynowania oraz uwalniania poza komórkę. W procesach tych uczestniczą liczne białka, spośród których do najlepiej poznanych należą receptor transferyny (TfR) [67], białko przy pomocy którego komórki ssaków pobierają żelazo oraz ferrytyna (Ft), białko powszechnie występujące w bakteriach, roślinach i zwierzętach, którego cząsteczka średnio wiąże 2000 atomów żelaza [29]. Bez względu na rodzaj komórek, kontrola ekspresji tych białek odbywa się głównie, choć nie wyłącznie, przez potranskrypcyjny mechanizm regulujący gotowość translacyjną lub stabilność kodujących te białka mRNA [34;71]. Głównymi elementami tego mechanizmu są struktury RNA określane jako IREs, sekwencje reagujące na jony Fe (ang. *iron responsive elements*) oraz dwa cyto-plazmatyczne białka regulujące homeostazę żelaza, IRP1 i IRP2 (ang. *Iron Regulatory Proteins*).

### IRE – SEKWENCJA REAGUJĄCA NA JONY ŻELAZA

Poszukiwania molekularnego mechanizmu potranskrypcyjnej regulacji syntezy Ft i TfR przez jony Fe doprowadziły do wyodrębnienia sekwencji *cis* występujących w niepodlegających translacji regionach, UTR (ang. *untranslated regions*) mRNA podjednostek Ft i TfR. Po raz pierwszy pojedynczą sekwencję IRE opisano w końcach 5'UTR mRNA H- i L-Ft (podjednostki ciężkiej i lekkiej Ft) z komórek raka wątroby szczura [2, 34, 35]. Kolejnym krokiem było wyodrębnienie w końcu 3'UTR mRNA TfR regionu (3514–3970 nt) składającego się z dwóch domen (po około 120 pz) przedzielonych około 300 pz, który podobnie jak sekwencja w mRNA dwóch podjednostek Ft determinował ekspresję mRNA TfR w odpowiedzi na zmiany poziomu

jonów Fe w komórce [58]. Późniejsze szczegółowe badania dowiodły istnienia pięciu sekwencji IRE w tym regionie [12]. Analiza struktury tych sekwencji oznaczonych jako A, B, C, D i E oraz ukierunkowana mutagenaza wykazały, że jedynie sekwencje B, C, D pełnią istotną rolę w regulacji syntezy TfR [58]. Obok wspomnianych już mRNA funkcjonalną sekwencję IRE zlokalizowano w końcach 5'UTR mRNA kodujących syntazę  $\delta$ -aminolewulinową, [16] i akonitazę mitochondrialną (mt-akonitazę) [16, 87]. Obecność sekwencji IRE wykazano również w końcach 5'UTR mRNA podjednostki b



RYCINA 1. Schemat drugorzędowej struktury IRE, występującej w końcach 5'UTR mRNA podjednostek H- i L-Ft człowieka. IREs są strukturami RNA typu spinki do włosów (ang. *hairpin structure*), składającymi się z 30 nukleotydów tworzących komplementarne pary, zakończone 6-nukleotydową pętlą (ang. *loop*) (kolor czerwony) o sekwencji: 5'-C<sub>1</sub>A<sub>2</sub>G<sub>3</sub>U<sub>4</sub>G<sub>5</sub>N<sub>6</sub>-3', gdzie N<sub>6</sub> może być każdym nukleotydem oprócz G, gdyż mogłoby to zakłócać oddziaływanie między nukleotydami w parze C<sub>1</sub>-G<sub>6</sub>. Podkreślone zasady są charakterystyczne jedynie dla IRE podjednostek Ft i tworzą wybrzuszenie (ang. *bulge*) (kolor niebieski) oddziałujące na interakcję IRP1/IRE. (schemat zaadaptowano na podstawie [78])

dehydrogenazy bursztynianowej *Drosophila melanogaster* [45], ferroportyny myszy [55] oraz w końcach 3'UTR mRNA oksydazy glikolowej myszy [46] i jednej z izoform powstałych przez różne składanie pierwotnego transkryptu przenośnika jonów Fe, DMT1 (ang. *Divalent Metal Transporter 1*) [27].

Porównanie sekwencji IRE pochodzących z różnych gatunków zwierząt wykazało wysoki filogenetyczny konserwatyzm tego motywu [78] (ryc. 1.). Istotne, dla interakcji IRE z IRP1, znaczenie sekwencji nukleotydów w IRE wykazano dzięki wykryciu spontanicznych, pojedynczych mutacji, powodujących wielokrotne zmniejszenie powinowactwa IRP1 do IRE [1, 13]. Przykładem może być mutacja w sekwencji pętli IRE znajdującej się w 5'UTR mRNA podjednostki L-Ft, polegająca na zmianie A w G, uniemożliwiająca interakcję IRE z IRP1, czego skutkiem jest podwyższony poziom syntezy podjednostek L-Ft [3]. U ludzi zaburzenia związane z tą mutacją opisano jako zespół dziedzicznej katarakty związanej z hyperferrytynemią (ang. *Hereditary hyperferritinemia Cataract Syndrome*), którego objawy przypominają kataraktę, i któremu towarzyszy odkładanie w soczewce gałki ocznej Ft o profilu L [51].

## IRP1 – DWUFUNKCYJNE BIAŁKO ZAWIERAJĄCE CENTRUM AKTYWNE [4FE-4S]

Krokiem milowym na drodze do poznania mechanizmów regulacji homeostazy żelaza w komórkach ssaków było odkrycie i scharakteryzowanie białek cytozolowych, biorących udział w potranskrypcyjnej regulacji Ft i TfR. Zidentyfikowano dwa białka cytozolowe – IRP1 i IRP2, mogące rozpoznawać sekwencje *cis* IRE. W niniejszym opracowaniu ograniczymy się jedynie do omówienia IRP1, uznawanego za główne białko regulujące poziom jonów Fe w większości komórek ssaków.

IRP1 jest białkiem o masie 98 kDa, które po raz pierwszy zlokalizowano w wątrobie i komórkach wątrobiaka szczura, dzięki wykorzystaniu techniki spowolnienia migracji sondy RNA w żelu, EMSA (ang. *electromobility shift assay*) [50] oraz chromatografii opartej na powinowactwie IRP1 do IRE [83]. Występowanie IRP1 stwierdzono w większości tkanek ssaków. Müllner i wsp. udokumentowali zróżnicowaną jego ekspresję w 12 tkankach myszy. Wykazali oni przy użyciu techniki EMSA, że największa ekspresja IRP1 ma miejsce w nerkach i wątrobie, a najmniejsza w płucach [59]. Nieoczekiwanie okazało się, że IRP1 wykazuje około 30% identyczność sekwencji aminokwasowej oraz ponad 50% podobieństwa struktury białkowej z mt-akonitazą z serca świni oraz akonitazami *Saccharomyces cerevisiae* [72, 31] i *Escherichia coli* [68]. Opierając się na wysokim podobieństwie IRP1 do mt-akonitazy Robbins i Stout zaproponowali model strukturalny IRP1 [70]. Cząsteczka IRP1 zbudowana jest z 889 aminokwasów tworzących cztery domeny białkowe. Trzy spośród nich położone są blisko siebie, czwarta połączona jest z pozostałymi peptydem. Pomiędzy domenami 1–3 a domeną 4 znajduje się szczelina, w której znajduje się żelazowo-siarkowe centrum aktywne [4Fe-4S]. Trzy spośród czterech atomów żelaza znajdujących się w tym centrum są koordynowane przez cysteiny 437, 503 i 506 należące do trzech domen, podczas gdy czwarty atom określany jako tzw. atom labilny ( $Fe_a$ ) nie jest koordynowany przez żadną resztę aminokwasową. Reaguje on natomiast bezpośrednio z substratem akonitazy, cytrynianem, który z kolei jest wiązany przez cztery argininy należące do czterech domen białkowych [49]. Usunięcie atomu  $Fe_a$  prowadzi do powstania nieaktywnej enzymatycznie formy IRP1 zawierającej centrum [3Fe-4S]. Badania krystalograficzne, analiza sekwencji i ukierunkowana mutagenaza wykazały, że fragment łańcucha aminokwasowego IRP1 umożliwiający zakotwiczenie w jego cząsteczce centrum [4Fe-4S] ma 100-procentową homologię z analogicznym fragmentem wiążącym centrum w cząsteczce mt-akonitazy z serca świni [48, 88]. Obecność identycznych centrów żelazowo-siarkowych w cząsteczkach mt-akonitazy z serca świni i IRP1 izolowanego z wątroby bydłej potwierdzono spektroskopią elektronowego rezonansu paramagnetycznego, EPR (ang. *electron paramagnetic resonance*) [43]. Wysoką aktywność enzymatyczną IRP1 wykazano w mysich fibroblastach transfekowanych mysim cDNA IRP1, co jednoznacznie pozwoliło zakwalifikować IRP1 do grupy enzymów z rodziny akonitaz (EC 4.2.1.3.) [40]. Dwuetapowa reakcja katalizowana przez akonitazy polega na izomerycznej konwersji cytrynianu w izocytrynian, z *cis*-akonitanem jako przejściowym produktem reakcji.

Do tej pory nie udało się jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie, jaka jest rola IRP1 jako akonitazy cytoplazmatycznej i czemu służy konwersja cytrynianu w izocytrynian w cytoplazmie. Według jednej z hipotez przewaga formy enzymatycznej IRP1 w cytoplazmie powoduje przesunięcie równowagi cytrynian : izocytrynian w stronę izocytrynianu, który jest substratem dla dehydrogenazy izocytrynianowej zależnej od NAD. Produktami reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę izocytrynianową są oksalobursztynian i NADH. NADH jest kofaktorem niektórych enzymów oksydoredukcyjnych błony komórkowej, biorących udział w redukcji jonów Fe(III) do Fe(II), reakcji niezbędnej przy pobieraniu jonów Fe w procesie endocytozy. Tak więc, IRP1 w formie akonitazy miałoby sprzyjać transportowi żelaza do komórki [69]. Inna hipoteza zakłada, że niska aktywność enzymatyczna IRP1 w komórce wpływa na wzrost stężenia cytrynianu w cytoplazmie. Cytrynian jest chelatorem żelaza transportującym jony Fe pomiędzy organellami komórkowymi. Efektem niskiej aktywności enzymatycznej i wysokiej aktywności *trans*-regulatorowej IRP1 jest również wysoki poziom jonów Fe w komórce. Tak więc, funkcją IRP1-akonitazy byłoby dostosowywanie poziomu cytrynianu w cytoplazmie do poziomu wiązanych przez ten ligand jonów Fe [9].

Druga, *trans*-regulatorowa aktywność IRP1 polega na wiązaniu się IRP1 z IRE. Tę właściwość ma apo-IRP1, forma IRP1 całkowicie pozbawiona centrum [4Fe-4S] [23]. Na podstawie licznych badań sugeruje się, że to właśnie obecność centrum aktywnego uniemożliwia dostęp sekwencji IRE do reszt aminokwasowych IRP1 biorących udział w wiązaniu, wśród których ważną rolę odgrywają cysteiny 503 i 506, odpowiedzialne również za koordynację centrum [4Fe-4S] [76]. Biorąc pod uwagę strukturę krystalograficzną mt-akonitazy zaproponowano mechaniczny model hamowania dostępu IRP1 do IRE przez centrum [4Fe-4S] [71]. Zgodnie z tym modelem centrum [4Fe-4S] stabilizowane przez cytrynian „zbliża” do siebie domeny 1–3 i 4, i czyni konformację IRP1 „zamkniętą”. Pod nieobecność centrum [4Fe-4S] domena 4 oddala się od domen 1–3, a tym samym „odślania” i czyni dostępnymi dla IRE reszty aminokwasowe odpowiedzialne za wiązanie tej sekwencji. Ostatecznym dowodem na zasadniczą rolę centrum [4Fe-4S] w determinowaniu funkcji IRP1 było uzyskanie zmutowanych cząsteczek IRP1: Cys437Ser oraz podwójnego mutantu Cys503Ser i Cys506Ser. Cząsteczki te nie włączają centrum aktywnego [4Fe-4S], mają natomiast zdolność konstytutywnego wiązania sekwencji IRE [37].

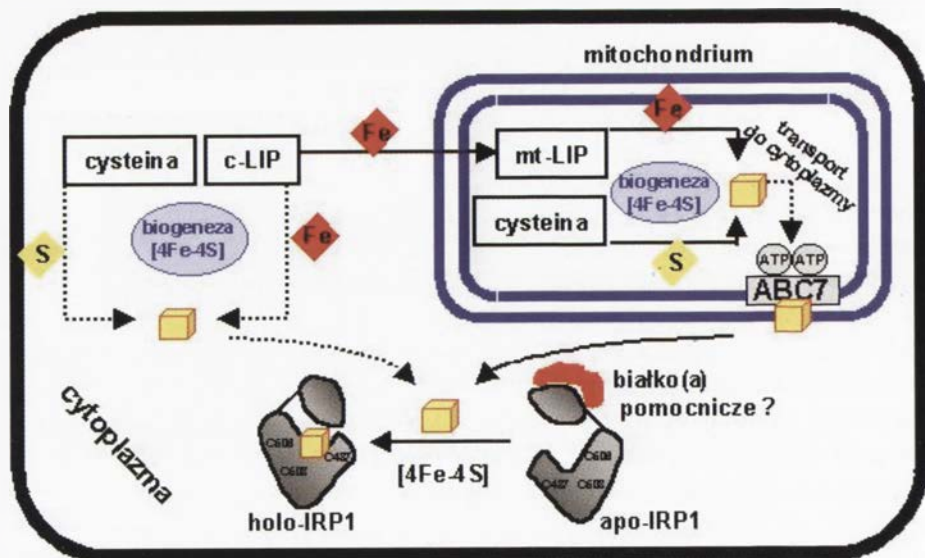
Wiązanie IRP1 z IRE ma zasadnicze znaczenie w przeciwstawnej regulacji syntezy Ft oraz TfR. Wykazano, że interakcja IRP1 z IRE z jednej strony hamuje translację mRNA podjednostek Ft [82, 83], a z drugiej stabilizuje mRNA TfR [58]. Wiązanie się IRP1 z IRE znajdującym się w końcu 5'UTR mRNA H- i L-Ft uniemożliwia utworzenie się kompleksu preinicjującego translację 43S, mimo że czynniki inicjujące translację wiążą się bez przeszkód z mRNA. Skutkiem jest brak kompleksu translacyjnego 80S, a w konsekwencji brak translacji mRNA podjednostek Ft [56]. Mechanizm regulacji stabilności mRNA TfR nie został do końca poznany. Uważa się, że przyłączenie IRP1 w 3'UTR mRNA TfR chroni matrycowy RNA przed działaniem endonukleaz rozpoznających miejsce cięcia mRNA w regionie między IRE<sub>C</sub> a IRE<sub>D</sub> [4].

## CYTOPLAZMATYCZNA ZMIENNA PUŁA ŻELAZA (LIP) – FRAKCJA ŻELAZA KOMÓRKOWEGO REGULUJĄCA AKTYWNOŚCI IRP1

Poszukiwania frakcji żelaza, bezpośrednio wpływającej na regulację komórkowych mechanizmów homeostazy tego metalu, zbiegły się z opracowaniem metody pozwalającej oznaczać stężenie jonów Fe w tzw. zmiennej pułi żelaza, LIP (ang. *labile iron pool*), w żywych komórkach [24]. LIP obejmuje jony Fe zawarte w cytoplazmie komórki, które w odróżnieniu od jonów Fe silnie i specyficznie wiązanych przez wyspecjalizowane białka, są słabo związane z niskocząsteczkowymi chelatorami. LIP jest zasilana przez jony Fe przeniesione do komórki, jak również pochodzące z rozpadu białek wiążących ten metal. Z drugiej strony, z pułi tej czerpane jest żelazo do syntezy hemu i biogenezy centrów [Fe-S]. Oznacza to, że jony Fe zawarte w LIP podlegają dynamicznej wymianie z jonami Fe w mitochondriach, lizosomach i jądrze komórkowym [38]. Znaczącym czynnikiem obniżającym poziom LIP jest Ft [39]. Jony Fe zawarte w LIP są dostępne dla farmakologicznych chelatorów żelaza [86]. LIP jest również źródłem żelaza czynnego w reakcji Fentona w cytoplazmie [10]. Autorzy sugerują, że nieprecyzyjny, ale powszechnie używany w piśmiennictwie termin „wewnątrzkomórkowy poziom jonów Fe” jako określenie frakcji żelaza, która wpływa na potranskrypcyjny mechanizm IRE/IRP1, odnosi się właśnie do poziomu LIP. W świetle obecnych badań uważa się, że poziom LIP bezpośrednio wpływa na proporcję między formami holo- i apo-IRP1 w komórce [38], która z kolei jest kluczem do odpowiednio skoordynowanej regulacji syntezy Ft i TfR.

Gdy poziom LIP w komórce jest wysoki, dominującą formą IRP1 pozostaje holo-IRP1, a obecność centrum [4Fe-4S] uniemożliwia wiązanie białka ze strukturami IRE. Brak interakcji IRP1 z motywami IRE znajdującymi się w końcu 5'UTR mRNA obu podjednostek Ft oznacza swobodny dostęp tych mRNA do rybosomów, ich translację, a w konsekwencji syntezę polipeptydów H i L i formowanie się cząsteczek apo-Ft. Efektem syntezy apo-Ft jest zwiększone magazynowanie żelaza, a tym samym zmniejszenie poziomu LIP w komórce. Równoległy brak wiązania się holo-IRP1 z sekwencjami IRE położonymi w końcu 3'UTR mRNA TfR wpływa na destabilizację tego mRNA, jego szybszą degradację, co pociąga za sobą ograniczenie syntezy TfR, czego efektem jest zmniejszenie zasilania LIP przez egzogenne żelazo.

Przy niedoborze żelaza w komórce, dominującą formą IRP1 jest apo-IRP1. Niski poziom LIP ogranicza biogenezę grup [4Fe-4S], włączanie ich do syntezowanych *de novo* cząsteczek apo-IRP1 i rekonstytucję cząsteczek holo-IRP1. Apo-IRP1 wiąże się ze strukturami IRE w końcach 5'UTR mRNA podjednostek Ft i poprzez zablokowanie translacji przyczynia się do zmniejszenia syntezy obu polipeptydów i obniżenia poziomu Ft w komórce. Oznacza to mniejszą inkorporację jonów Fe zawartych w LIP do Ft. Apo-IRP1 wiążąc się z motywami IRE w 3'UTR mRNA TfR chroni ten mRNA przed degradacją, zwiększa jego stabilność, a tym samym syntezę receptora. Zwiększona gęstość TfR na błonie komórkowej uaktywnia transport egzogenne żelaza do komórki, co znajduje odzwierciedlenie w zwiększonym poziomie LIP.



RYCINA 2. Hipotetyczny mechanizm rekonstrukcji holo-IRP1. Jony Fe niezbędne do syntezy centrum są przenoszone z LIP w cytoplazmie (c-LIP) do podobnej puli w mitochondriach (mt-LIP) [65]. W biogenezie centrów [Fe-S] uczestniczy zespół białek odłączających atomy siarki od cysteiny (desulfurazy) oraz włączających jony Fe do tworzących się centrów [52, 57]. Centra [4Fe-4S] są transportowane przez błony mitochondrialne do cytoplazmy przy udziale przenośników z rodziny ABC (ang. *ATP-binding cassette*), występujących na wewnętrznej błonie mitochondriów [73]. We włączaniu centrum [4Fe-4S] do cząsteczki IRP1 biorą prawdopodobnie udział białka pomocnicze (ang. *chaperone proteins*), modyfikujące konformację apo-IRP1, tak jak ma to miejsce w przypadku wbudowywania centrów [Fe-S] do apo-enzymów mitochondrialnych [52, 57]. W komórkach ssaków niektóre elementy biorące udział w biogenezie centrów [Fe-S] występują w cytoplazmie [79]. Przerwanymi strzałkami oznaczono hipotetyczne etapy biogenezy centrów [4Fe-4S]

Mimo że zależność między poziomem LIP a występowaniem dwóch głównych form IRP1 w komórce została wielokrotnie opisana, to precyzyjne mechanizmy, przez które jony Fe lub ich niedobór wpływają na obecność lub brak centrum [4Fe-4S] w cząsteczkach IRP1, nie są jeszcze poznane. Hipotetyczny model biogenezy i wbudowywania centrum [4Fe-4S] do cząsteczki apo-IRP1, oparty głównie na badaniach przeprowadzonych na komórkach bakterii i drożdży [57], przedstawiono na rycinie 2. Przy fizjologicznym poziomie LIP biogeneza centrów [Fe-S] przeznaczonych również dla białek cytoplazmatycznych odbywa się w mitochondriach [52]. Centra [Fe-S] są następnie transportowane przez błony mitochondrialne do cytoplazmy [73]. Cały proces rekonstrukcji holo-IRP1 wymaga syntezy ATP [6]. Obniżenie poziomu LIP powoduje powolny (ok. 15 godzin) wzrost aktywności wiązania IRP1 z IRE. Czas ten zbliżony jest do czasu połowicznego rozpadu IRP1 w komórce (12 godzin) [63]. Uważa się, że niski poziom LIP jest czynnikiem ograniczającym biogenezę centrów [4Fe-4S]. Ich niedobór przy ciągłej syntezie *de novo* cząsteczek apo-IRP1 powoduje, że właśnie ta forma IRP1 zaczyna przeważać w komórce.



## REGULACJA AKTYWNOŚCI IRP1 PRZEZ TLENEK AZOTU

Stosunkowo niedawna identyfikacja biochemicznego szlaku syntezy NO u ssaków, która odbywa się przy udziale enzymów z rodziny syntaz NO, NOS (ang. *nitric oxide synthases*) [5], pozwoliła zrozumieć mechanizmy wielu procesów biologicznych, które wcześniej nie znajdowały wyjaśnienia. Ze względu na liczne funkcje fizjopatologiczne, opisane w lawinowo rosnącej liczbie publikacji, NO ogłoszono cząsteczką 1992 roku [47]. Wkrótce potem pionierom badań nad NO przyznano Nagrodę Nobla [18]. Tlenek azotu (NO\*) jest wolnym rodnikiem, cząsteczką nieobciążoną ładunkiem elektrycznym, dobrze rozpuszczalną w wodzie, z łatwością dyfundującą przez błony biologiczne, charakteryzującą się kilkusekundowym okresem półtrwania [41]. Jednym z elementów niezwykle bogatej reaktywności biochemicznej NO jest powinowactwo tej cząsteczki do jonów Fe, które leży u podłoża wielu funkcji biologicznych NO. NO reguluje aktywność żelazozależnych enzymów i czynników transkrypcyjnych odgrywających kluczową rolę w regulacji ciśnienia krwi (cyklaza guanylowa) [75], hamowaniu proliferacji komórek (mt-akonitaza, reduktaza rybonukleotydowa) [20, 26.], adaptacji organizmów do zmiennego stężenia tlenu (soxR, oxyR, HIF-1 $\alpha$ ) [17, 44, 30]. Najważniejszym jednak ogniwem wiążącym biosyntezę NO z metabolizmem żelaza jest udział NO w kontroli ekspresji mRNA kodujących białka odpowiedzialne za utrzymanie komórkowej homeostazy żelaza [32]. Główny biologiczny mechanizm tej regulacyjnej funkcji polega na modulowaniu przez NO *trans*-regulatorowej aktywności IRP1.

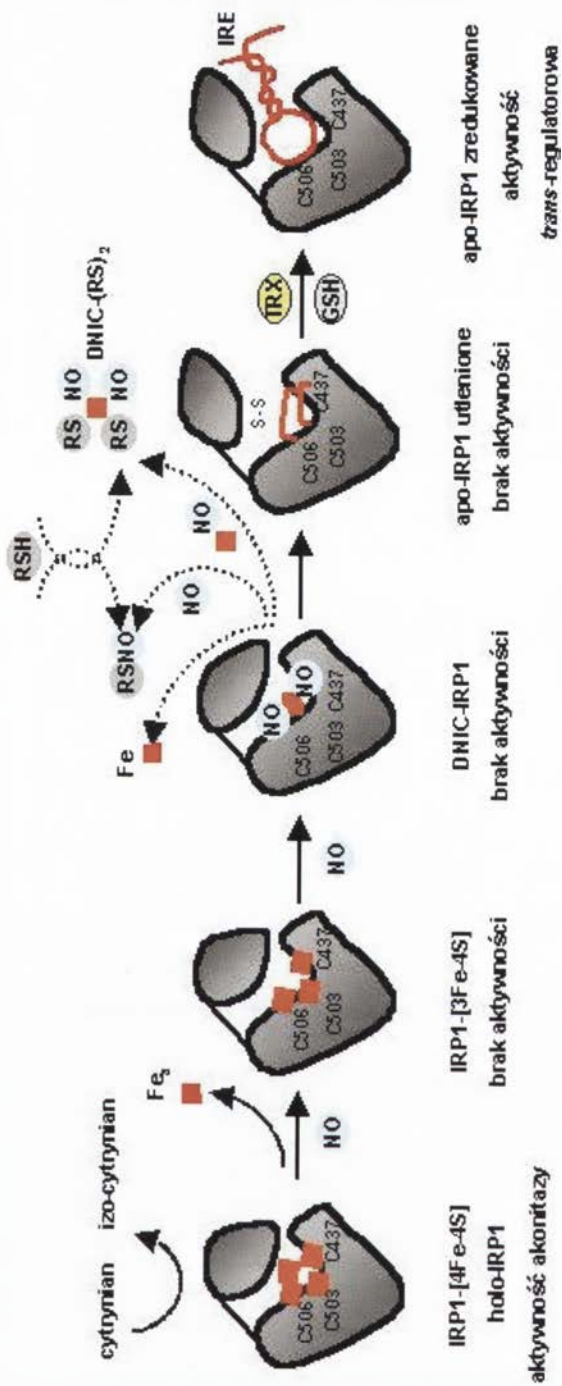
Impulsem do badań nad regulacją IRP1 przez NO stały się obserwacje dotyczące odwracalnego hamowania aktywności mt-akonitazy w makrofagach syntezujących NO oraz w hodowanych w ich obecności ludzkich komórkach z linii białaczkowych [21]. W 1993 roku dwie grupy badawcze równolegle wykazały, że NO syntezowany przez aktywowane makrofagi lub dodany do ich hodowli w postaci gazu przeciwnie moduluje dwie aktywności IRP1: hamuje aktywność akonitazy i zwiększa aktywność wiązania z IRE [22, 85]. Tę obserwację potwierdzono następnie na komórkach różnego typu, przy użyciu naturalnych źródeł NO (synteza przez zaaktywowane komórki wykazujące ekspresję indukowalnej NOS2) oraz chemicznych prekursorów uwalniających w różnym tempie, różne formy oksydoredukcyjne NO [54]. Obecnie, NO należy do najbardziej intensywnie badanych czynników biologicznych sterujących potranskrypcyjnym mechanizmem IRE/IRP1. Z badań tych wyłaniają się dwie przeciwstawne koncepcje: bezpośredniego i pośredniego oddziaływania NO na cząsteczkę IRP1, a ściślej na jej centrum aktywne [4Fe-4S]. Uważamy za istotne szczegółowe omówienie tych hipotez, gdyż stanowią one ważny element w dyskusji na temat kinetyki zmian zachodzących w komórkowym metabolizmie żelaza pod wpływem NO.

Wczesne badania nad regulacją przez NO aktywności białek zawierających centra [Fe-S] sugerowały, że mechanizm regulacyjny polega na chemicznej interakcji NO z tymi centrami [36]. W tę stronę swoje badania nad IRP1 skierowali Drapier i wsp., którzy zaproponowali, że aktywacja IRP1 przez NO odbywa się przez stopniową

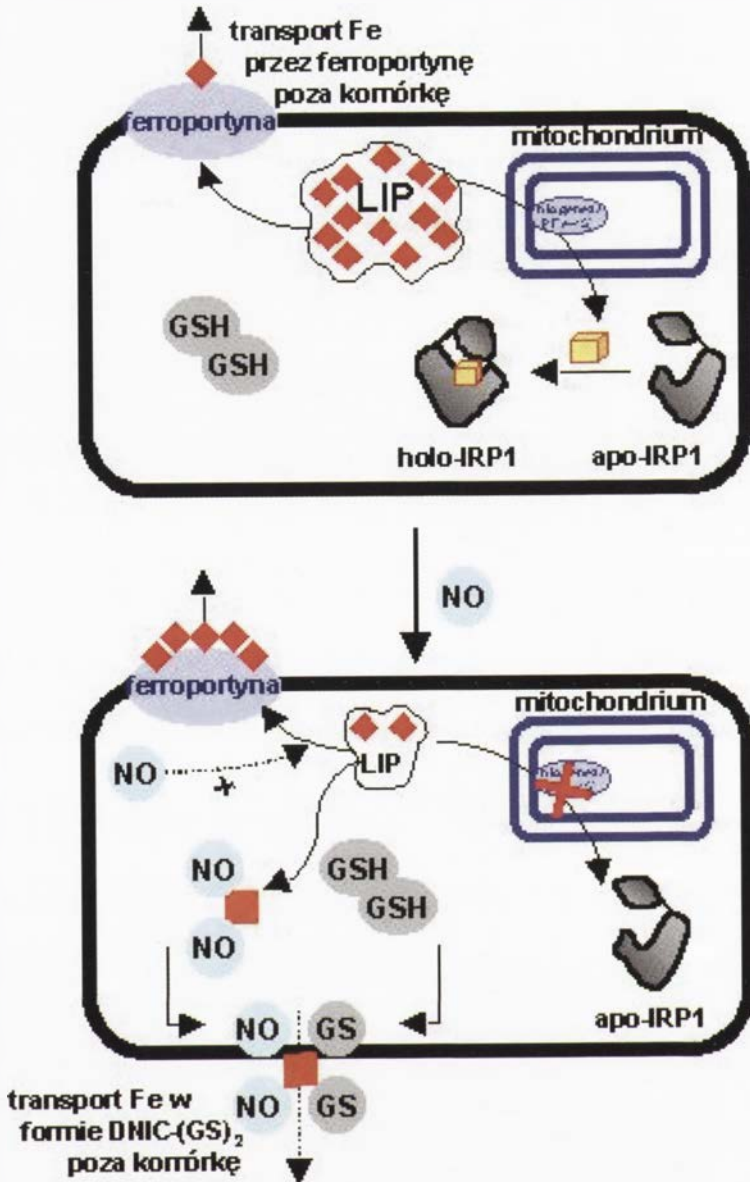
modyfikację centrum [4Fe-4S], jego destabilizację i usunięcie z cząsteczki IRP1 [19] (ryc. 3). Z postulatem bezpośredniego działania NO na centrum [4Fe-4S] powiązano szybkość działania NO. Stosując pomiar aktywności akonitazy, spektroskopię EPR i technikę EMSA, wykazano, że kolejne modyfikacje centrum [4Fe-4S] IRP1, wywołane przez NO, następują szybko. W uzasadnieniu tej koncepcji wykazano, że cytrynian bezpośrednio wiążący się z atomem Fe<sub>a</sub> centrum [4Fe-4S] IRP1 chroni je przed interakcją z NO i w znacznym stopniu zapobiega aktywacji IRP1 przez NO [8]. W wyniku parakrynowego działania NO, syntezowanego przez makrofagi i dyfundującego do hodowanych z nimi komórek, w tych ostatnich stwierdzono zwiększone wiązanie IRP1 z IRE już po godzinie od rozpoczęcia wspólnej hodowli [7]. Maksymalną aktywność wiązania IRP1 do IRE w cytozolowych ekstraktach komórkowych poddanych *in vitro* działaniu chemicznych donorów NO obserwowano już po 15 minutach, a sukcesywne dodanie fizjologicznego czynnika redukującego, tioredoksyny pozwoliło uzyskać 2–6-krotny wzrost aktywności *trans*-regulatorowej IRP1 już po 5 minutach [62]. W wyniku traktowania rekombinowanego IRP1 (rIRP1) donorami NO, obserwowano pojawienie się widma EPR, charakterystycznego dla paramagnetycznego dinitrozylo-ditiolanowego kompleksu jonów żelaza, DNIC-(RS)<sub>2</sub> (ang. *dinitrosyl dithiolato iron complex*), powstałego w wyniku przyłączenia cząsteczki NO do jednego z atomów Fe, koordynowanego przez cysteiny wiążące centrum aktywne IRP1 [42]. Za rozpadem centrum [4Fe-4S] IRP1 pod wpływem NO przemawia również fakt uwalniania jonów Fe z holo-IRP1, co stwierdzono zarówno przy użyciu rIRP1 [74], jak i w ekstraktach cytozolowych [11]. Ścisłą korelację między szybką aktywacją IRP1 a wzrostem poziomu LIP obserwowano w limfoblastach mysich L5178Y inkubowanych z donorem NO [badania własne niepublikowane].

Alternatywna hipoteza aktywacji IRP1 przez NO zakłada oddziaływanie NO na LIP podobne do działania chelatorów jonów Fe, a więc polegające na ograniczeniu ich dostępności dla biogenezy centrów [4Fe-4S], a tym samym na ograniczonej rekonstytucji cząsteczek holo-IRP1 na bazie cząsteczek apo-IRP1 syntezowanych *de novo* [33]. Tę hipotezę oparto głównie na obserwacji późnego wzrostu aktywacji IRP1 w makrofach stymulowanych do syntezy NO, która następowała dopiero po upływie 8 godzin od chwili dodania do hodowli makrofagów czynników aktywujących NOS2 [64]. Ten kinetyczny argument poddany został krytyce, a w uzasadnieniu stwierdzono, że „uruchomienie” genu *NOS2* wymaga czasu (kilku godzin), po upływie którego syntezowane są pierwsze cząsteczki NO [19]. W celu wsparcia koncepcji pośredniego i opóźnionego mechanizmu działania NO wysunięto również przypuszczenie, że przejście holo-IRP1 w apo-IRP1 nie może być procesem zachodzącym szybko, ponieważ zmiany konformacyjne cząsteczki IRP1 (przejście od „zamkniętej” do „otwartej” struktury przestrzennej) następujące po usunięciu centrum [4Fe-4S] wymagają czasu [33].

Wydaje się, że siła argumentów doświadczalnych przemawia za zdecydowaniem za hipotezą bezpośredniej interakcji NO z centrum [4Fe-4S] jako głównym mechanizmem aktywacji IRP1. Nie można jednak wykluczyć, że w drugiej kolejności, z kilkunastu-minutowym opóźnieniem w stosunku do pierwszego efektu, NO może aktywować czy utrzymywać zainicjowaną poprzez pierwszy mechanizm aktywację IRP1 poprzez



RYCINA 3. Mechanizm aktywacji IRP1 przez NO: bezpośrednie oddziaływanie na centrum [4Fe-4S]. Schemat przedstawia stopniową konwersję między IRP1-akonitazą a zredukowanym apo-IRP1, wiążącym się z IRE, zachodzącą pod wpływem NO [19]. Formy pośrednie IRP1 związane z kolejnymi etapami destabilizacji centrum [4Fe-4S] przez NO scharakteryzowano *in vitro* lub *in vivo* na podstawie analizy ich widm EPR i pomiaru ich aktywności biologicznych [9, 37, 42, 62]. IRP1-[3Fe-4S] powstaje w wyniku reakcji NO z atomem Fe<sub>4</sub> i jego usunięcia z centrum. Efektem dalszego działania NO jest paramagnetyczna forma DNIC-IRP1, utworzona przy udziale przynajmniej jednego z atomów Fe destabilizowanego centrum i dwóch koordynujących je reszt cysteinowych. Kolejnym etapem jest odłączenie od DNIC-IRP1 NO lub grupy Fe-NO i przeniesienia ich na niskocząsteczkowe tiole (RSH) [77, 80]. Powstanie utlenionego apo-IRP1 (mającego prawdopodobnie mostki dwusiarkkowe między Cys437 i Cys503 lub Cys506) jest efektem utlenienia przez NO reszt cysteinowych. W obecności GSH, a szczególnie tioredoksyny (TRX), utlenione apo-IRP1 szybko ulega redukcji i przyjmuje aktywność wiązania się z IRE [42]. Przerwywanymi strzałkami oznaczono hipotetyczne reakcje biochemiczne



RYCINA 4. Hipotetyczne szlaki usuwania jonów Fe z komórek poddanych działaniu NO. Kluczową rolę w usuwaniu z komórki jonów Fe poddanych działaniu NO odgrywa glutation (GSH) [84], lecz biologiczny mechanizm tego procesu nie jest znany. Jony Fe mogą być usuwane z komórki w postaci kompleksów paramagnetycznych DNIC-(GS), które powstają w komórkach pod wpływem NO przy udziale jonów Fe zawartych w LIP oraz GSH [80]. Inną hipotetyczną drogą jest transport jonów Fe poza komórkę przez ferroportynę (Fp), jedyne jak dotychczas poznane białko transportujące jony Fe z komórki. Chociaż w mRNA Fp zlokalizowano sekwencję IRE w końcu 5'UTR, co sugeruje hamowanie syntezy Fp przez NO, to jednak nie wyklucza się, że innego rodzaju oddziaływanie NO/Fp wpływa na zwiększone usuwanie jonów Fe z komórki przy udziale tego białka

obniżenie poziomu LIP. Już wczesne badania Hibbsa i wsp. wykazały, że zawartość żelaza w komórkach ssaków poddanych działaniu endo- i egzogenego NO zmniejsza się o około 60% [36]. Szlaki biologiczne uwalniania jonów Fe z komórki pod wpływem NO nie zostały jednak poznane. Ostatnio zaproponowano, że kluczową rolę w tym procesie odgrywa glutation [84]. Jako kolejną drogę usuwania żelaza z komórki wskazano stymulację przez NO transportu jonów Fe poza komórkę w kompleksie z ferroportyną, niedawno odkrytym przenośnikiem jonów Fe [55]. Hipotetyczne szlaki uwalniania jonów Fe przez NO z komórki przedstawiono na rycinie 4.

## REGULACJA EKSPRESJI IRP1 PRZEZ ŻELAZO I TLENEK AZOTU

Proporcja między cząsteczkami apo- i holo-IRP1, która określa status aktywności IRP1 w komórce, w dużej mierze zależy nie tylko od poziomu LIP, ale również od poziomu IRP1. Znaczenie ekspresji IRP1 uwidoczniły badania nad regulacją metabolizmu żelaza w dwóch liniach limfoblastów mysich L5178Y. Mimo 2–3-krotnej różnicy w poziomie LIP konstytutywna, *trans*-regulatorowa aktywność IRP1 w komórkach dwóch linii jest niemal identyczna. Przyczyną tego stanu, pozornie sprzecznego z kanonem regulacji aktywności IRP1 przez jony Fe, jest to, że komórki LY-R, o wysokim poziomie LIP wykazują jednocześnie 2-krotnie wyższy poziom IRP1 w porównaniu z komórkami LY-S, charakteryzującymi się niskim poziomem LIP i niską ekspresją IRP1. Wyniki te podkreślają znaczenie zależności między poziomami LIP i IRP1 w regulacji aktywności IRP1 w komórce [53]. Na podstawie pierwszych badań z użyciem chelatorów żelaza sugeruje się, że szczególnie w komórkach LY-R ekspresja IRP1 jest regulowana przez jony Fe [badania własne niepublikowane]. Sugestia o oddziaływaniu jonów Fe na ekspresję IRP1 wypływa również z innych badań, w których obserwowano spadek poziomu IRP1 w wątrobach chorych na hemochromatozę [61] oraz wzrost poziomu IRP1 skorelowany ze wzrostem poziomu Ft w różnicujących się adipocytach [25].

Niewątpliwie pierwszym poznany czynnikiem biologicznym, który wpływa nie tylko na potranslacyjną modyfikację IRP1, ale i na jego ekspresję, jest NO. W stymulowanych makrofagach, syntezujących NO obserwowano znaczny (40%) spadek ekspresji mRNA i białka IRP1 przy jednoczesnej, wysokiej aktywności *trans*-regulatorowej IRP1 [63]. Autorzy sugerują, że regulacja ekspresji IRP1 przez NO prowadzi do zmniejszenia liczby cząsteczek IRP1 wiążących się z IRE, a tym samym do ograniczenia skutków biologicznych hamowania syntezy Ft i stymulacji syntezy TfR, polegających na wzroście LIP do poziomu toksycznego.

## PODSUMOWANIE

Istotą regulacji komórkowego metabolizmu żelaza przez IRP1 jest utrzymanie fizjologicznego stężenia jonów Fe zawartych w LIP, co odbywa się przez skoordynowaną kontrolę ekspresji mRNA podjednostek Ft i TfR, białek przeciwnie wpływających na poziom LIP. Zarówno przy niskim, jak i wysokim poziomie LIP ta dwukierunkowa regulacja ma istotne znaczenie w szybkim powrocie do homeostazy, czyli w przywróceniu biologicznej dostępności jonów Fe lub w ograniczeniu ich toksyczności.

Modulowanie aktywności IRP1 przez NO jest stosunkowo dobrze poznany biologicznym mechanizmem regulacji przez tę cząsteczkę ekspresji grupy genów związanych z metabolizmem żelaza u ssaków. Podłożem tej skomplikowanej i wyspecjalizowanej w toku ewolucji regulacji genetycznej, jest chemiczna interakcja między NO a nieorganicznymi, żelazowo-siarkowymi strukturami, których istnienie, podobnie jak istnienie NO, prawdopodobnie poprzedzało pojawienie się na ziemi pierwszych organizmów żywych.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ALLERSON CR, CAZZOLA M, ROUAULT TA. Clinical severity and thermodynamic effects of iron-responsive element mutations in hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome. *J Biol Chem* 1999; **274**: 26439–26447.
- [2] AZIZ N, MUNRO HN. Iron regulates ferritin mRNA through a segment of its 5' untranslated region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 8478–8482.
- [3] BEAUMONT C, LENEUVE P, DEVAUX I, SCOAZEC JY, BERTHIER M, LOISEAU MN, GRAND CHAMP B, BONNEAU D. Mutation in the iron responsive element of the L ferritin mRNA in a family with dominant hyperferritinemia and cataract. *Nat Genet* 1995; **11**: 444–446.
- [4] BINDER R, HOROWITZ JA, BASILION JP, KOELLER DM, KLAUSNER RD, HARFORD JB. Evidence that the pathway of transferrin receptor mRNA degradation involves an endonucleolytic cleavage within the 3' UTR and does not involve poly(A) tail shortening. *EMBO J* 1994; **13**: 1969–1980.
- [5] BOUCHER JL, MOALI CM, TENU JP. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilisation. *Cell Mol Life Sci* 1999; **55**: 1015–1028.
- [6] BOUTON C, CHAUVEAU MJ, LAZEREG S, DRAPIER JC. Recycling of RNA binding iron regulatory protein 1 into an aconitase after nitric oxide removal depends on mitochondrial ATP. *J Biol Chem* 2002; **277**: 31220–31227.
- [7] BOUTON C, OLIVEIRA L, DRAPIER JC. Converse modulation of IRP1 and IRP2 by immunological stimuli in murine RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem* 1998; **273**: 9403–9408.
- [8] BOUTON C, RAVEAU M, DRAPIER JC. Modulation of iron regulatory protein functions. Further insights into the role of nitrogen- and oxygen-derived reactive species. *J Biol Chem* 1996; **271**: 2300–2306.
- [9] BOUTON C. Nitrosative and oxidative modulation of iron regulatory proteins. *Cell Mol Life Sci* 1999; **55**: 1043–1053.
- [10] BREUER W, GREENBERG E, CABANTCHIK ZI. Newly delivered transferrin iron and oxidative cell injury. *FEBS Lett* 1997; **403**: 213–219.
- [11] CAIRO G, RONCHI R, RECALCATI S, CAMPANELLA A, MINOTTI G. Nitric oxide and peroxynitrite activate the iron regulatory protein-1 of J774A.1 macrophages by direct disassembly of the Fe-S cluster of cytoplasmic aconitase. *Biochemistry* 2002; **41**: 7435–7442.

- [12] CASEY JL, HENTZE MW, KOELLER DM, CAUGHMAN SW, ROUAULT TA, KLAUSNER RD, HARFORD JB. Iron-responsive elements: regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation. *Science* 1988; **240**: 924–928.
- [13] CAZZOLA M. Hereditary hyperferritinemia cataract syndrome. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002; **15**: 385–398.
- [14] CRICHTON R. Preface. [w] CRICHTON R. [red.] *Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism*. Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Sigapore, Toronto: John Wiley&Sons, LTD 2001: XV–XXII.
- [15] CRICHTON R. The Importance of Iron for Biological Systems. [w] CRICHTON R [red.] *Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism*. Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Sigapore, Toronto: John Wiley&Sons, LTD 2001: 17–48.
- [16] DANDEKAR T, STRIPECKER, GRAY NK, GOOSEN B, CONSTABLE A, JOHANSSON HE, HENTZE MW. Identification of a novel iron responsive element in murine and human erythroid delta aminolevulinic acid synthase mRNA. *EMBO J* 1990; **10**: 1903–1909.
- [17] DING H, DEMPTE B. Direct nitric oxide signal transduction via nitrosylation of iron-sulfur centers in the SoxR transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 5146–5150.
- [18] DINH-XUAN AT. Nobel 98: la belle part au NO. *Med Sci* 1998, **14**: 1297–1300.
- [19] DRAPIER JC, BOUTON C, OLIVEIRA L. Redox regulation of iron regulatory proteins by nitric oxide and peroxyntirite. [W] Ignarro LJ. [red.] *Nitric Oxide, Biology and Pathobiology*. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Academic Press, 2000: 314–328.
- [20] DRAPIER JC, HIBBS JB Jr. Aconitases: a class of metalloproteins highly sensitive to nitric oxide synthesis. *Methods Enzymol* 1996; **269**: 26–36.
- [21] DRAPIER JC, HIBBS JB Jr. Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells. *J Immunol* 1988; **140**: 2829–2838.
- [22] DRAPIER JC, HIRLING H, WIETZERBIN J, KALDY P, KÜHN LC. Biosynthesis of nitric oxide activates iron regulatory factor in macrophages. *EMBO J* 1993; **2**: 3643–3649.
- [23] EMERY-GOODMAN A, HIRLING H, SCARPELLINO L, HENDERSON B, KÜHN LC. Iron regulatory factor expressed from recombinant baculovirus: conversion between the RNA-binding apoprotein and Fe-S cluster containing aconitase. *Nucleic Acids Res* 1993; **21**: 1457–1461.
- [24] EPSZTEJN S, KAKHLON O, GLICKSTEIN H, BREUER W, CABANTCHIK I. Fluorescence analysis of the labile iron pool of mammalian cells. *Anal Biochem* 1997; **248**: 31–40.
- [25] FESTA M, RICCIARDELLI G, MELE G, PIETROPAOLO C, RUFFO A, COLONNA A. Overexpression of H ferritin and up-regulation of iron regulatory protein genes during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* 2000; **275**: 36708–36712.
- [26] GUITTET O, ROY B, LEPOIVRE M. Nitric oxide: a radical molecule in quest of free radicals in proteins. *Cell Mol Life Sci* 1999; **55**: 1054–1067.
- [27] GUNSHIN H, ALLERSON CR, POLYCARPOV-SCHWARZ M, ROFTS A, ROGERS JT, KISHI F, HENTZE MW, ROUAULT TA, ANDREWS NC, HEDIGER MA. Iron-dependent regulation of the divalent metal ion transporter. *FEBS Lett* 2000; **509**: 309–316.
- [28] GUTTERIDGE JM, HALLIWELL B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 2000; **899**: 136–47.
- [29] HARRISON PM, AROSIO P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1275**:161–203.
- [30] HEIWA O, SHUIN T, FUJII-KURIYAMA Y, SOGAWA K, SEKINE H, KIKUCHI Y, TAKASAKI C, MIURA C, WANG F. HIF-1alpha-prolyl hydroxylase: molecular target of nitric oxide in the hypoxic signal transduction pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **295**: 657–662.
- [31] HENTZE MW, ARGOS P. Homology between IRE-BP, a regulatory RNA-binding protein, aconitase, and isopropylmalate isomerase. *Nucleic Acids Res* 1991; **19**: 1739–1740.
- [32] HENTZE MW, KÜHN LC. Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 8175–8182.
- [33] HENTZE MW, PANTOPOULOS K. Nitric oxide, oxygen radicals, and iron metabolism. [w] Ignarro LJ. [red.] *Nitric Oxide, Biology and Pathobiology*. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Academic Press, 2000: 292–313.
- [34] HENTZE MW, ROUAULT TA, CAUGHMAN SW, DANCIS A, HARFORD JB, KLAUSNER RD. A cis-acting element is necessary and sufficient for translational regulation of human ferritin expression in response to iron. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 6730–6734.

- [35] HENTZE MW, ROUAULT TA, CAUGHMAN SW, DANCIS A, HARFORD JB, KLAUSNER RD. A model for the structure and functions of iron-responsive elements. *Gene* 1988; **72**: 201–208.
- [36] HIBBS JB Jr, TAINTOR RR, VAVRIN Z, RACHLIN EM. Nitric oxide: acytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; **157**: 87–94.
- [37] HIRLING H, HENDERSON BR, KUHN LC. Mutational analysis of the [4Fe-4S]-cluster converting iron regulatory factor from its RNA-binding form to cytoplasmic aconitase. *EMBO J* 1994; **13**: 453–461.
- [38] KAKHLON O, ZI CABANTCHIK. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radic Biol Med* 2002; **33**: 1037–1046.
- [39] KAKHLON O, GRUENBAUM Y, CABANTCHIK ZI. Repression of the heavy ferritin chain increases the labile iron pool of human K562 cells. *Biochem J* 2001; **356**: 311–316.
- [40] KAPTAIN S, DOWNEY WE, TANG C, PHILPOTT C, HAILE D, ORLOFF DG, HARFORD JB, ROUAULT TA, KLAUSNER RD. A regulated RNA binding protein also possesses aconitase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 10109–10113.
- [41] KELM M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1411**: 273–289.
- [42] KENNEDY MC, ANTHOLINE WE, BEINERT H. An EPR investigation of the products of the reaction of cytosolic and mitochondrial aconitases with nitric oxide. *J Biol Chem* 1997; **272**: 20340–20347.
- [43] KENNEDY MC, MENDE-MUELLER L, BLONDIN GA, BEINERT H. Purification and characterization of cytosolic aconitase from beef liver and its relationship to the iron-responsive element binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 11730–11734.
- [44] KIM SO, MERCHANT K, NUDELMAN R, BEYER WF JR, KENG T, DEANGELO J, HAUSLADEN A, STAMLER JS. OxyR: a molecular code for redox-related signalling. *Cell* 2002; **109**: 383–396.
- [45] KOHLER S.A., HENDERSON BR, KÜHN LC. SDHb mRNA of *Drosophila melanogaster* has a functional iron-responsive element in its 5'-untranslated region. *J Biol Chem* 1995; **270**: 30781–30786.
- [46] KOHLER SA, MENOTTI E, KÜHN LC. Molecular cloning of mouse glycolate oxidase. High evolutionary conservation and presence of an iron-responsive element-like sequence in the mRNA. *J Biol Chem* 1999; **274**: 2401–2407.
- [47] KOSHLAND DE. The molecule of the year. *Science* 1992; **258**: 1861.
- [48] LAUBLE H, KENNEDY MC, BEINERT H, STOUT CD. Crystal structures of aconitase with isocitrate and nitroisocitrate bound. *Biochemistry* 1992; **31**: 2735–2748.
- [49] LAUBLE H, KENNEDY MC, BEINERT H, STOUT CD. Crystal structures of aconitase with trans-aconitate and nitrocitrate bound. *J Mol Biol* 1994; **237**: 437–451.
- [50] LEIBOLD EA, MUNRO HN. Cytoplasmic protein binds *in vitro* to a highly conserved sequence in the 5'-untranslated region of ferritin heavy- and light-subunit mRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 2171–2175.
- [51] LEVI S, GIRELLI D, PERRONE F, PASTI M, BEAUMONT C, CORROCHER R, ALBERTINI A., AROSIO P. Analysis of ferritins in lymphoblastoid cell lines and in the lens of subjects with hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome. *Blood* 1988; **91**: 4180–4187.
- [52] LILL R, KISPAL G. Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *TIBS* 2000; **25**: 352–355.
- [53] LIPIŃSKI P, DRAPIER JC, OLIVEIRA L, RETMAŃSKA H, SOCHANOWICZ B, KRUSZEWSKI M. Intracellular iron status as a hallmark of mammalian cell susceptibility to oxidative stress: a study of L5178Y mouse lymphoma cell lines differentially sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Blood* 2000; **95**: 2960–2966.
- [54] LIPIŃSKI P, DRAPIER JC. Interplay between ferritin metabolism, reactive oxygen species and nitric oxide. *J Biol Inorg Chem* 1997; **2**: 559–566.
- [55] MCKIE AT, MARCIANI P, ROLFS A, BRENNAN K, WEHR K, BARROW D, MIRET S, BOMFORD A, PETERS TJ, FERZANEH F, HEDIGER MA, HENTZE MW, SIMPSON RJ. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell* 2000; **5**: 299–309.
- [56] MUCKENTHALER M, GRAY NK, HENTZE MW. IRP-1 binding to ferritin mRNA prevents the recruitment of the small ribosomal subunit by the cap-binding complex eIF4F. *Mol Cell Biol* 1998; **2**: 383–388.
- [57] MÜHLENHOFF U, LILL R. Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1459**: 370–382.
- [58] MÜLLNER EW, KÜHN LC. A stem-loop in the 3' untranslated region mediates iron-dependent regulation of transferrin receptor mRNA stability in the cytoplasm. *Cell* 1988; **53**: 815–825.



- [59] MÜLLNER EW, ROTHENBERGER S, MULLER AM, KÜHN LC. *In vivo* and *in vitro* modulation of the mRNA-binding activity of iron-regulatory factor. Tissue distribution and effects of cell proliferation iron levels and redox state. *Eur J Biochem* 1992; **208**: 597–605.
- [60] NEILANDS JB. Microbial envelope proteins related to iron. *Annu Rev Microbiol* 1982; **36**: 285–309.
- [61] NEONAKI M, CUNNINGHAME-GRAHAM D, WHITE KN, BOMFORD A. Down-regulation of liver iron-regulatory protein 1 in haemochromatosis. *Biochem Soc Trans* 2002; **30**: 726–781.
- [62] OLIVEIRA L, BOUTON C, DRAPIER JC. Thioredoxin activation of iron regulatory proteins. Redox regulation of RNA binding after exposure to nitric oxide *J Biol Chem* 1998; **274**: 516–521.
- [63] OLIVEIRA L, DRAPIER JC. Down-regulation of iron regulatory protein 1 gene expression by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 6550–6555.
- [64] PANTOPOULOS K, WEISS G, HENTZE M. Nitric oxide and oxidative stress ( $H_2O_2$ ) control mammalian iron metabolism by different pathways. *Mol Cell Biol* 1996; **16**: 3781–3788.
- [65] PETRAT F, WEISHEIT D, LENSEN M, DE GROOT H, SUSTMANN R, RAUEN U. Selective determination of mitochondrial chelatable iron in viable cells with a new fluorescent sensor. *Biochem J* 2002; **362**: 137–147.
- [66] PIERRE JL, FONTECAVE M. Iron and activated oxygen species in biology: the basic chemistry. *BioMetals* 1999; **12**: 195–199.
- [67] PONKA P, LOK CN. The transferrin receptor: role in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; **31**: 1111–1137.
- [68] PRODROMOU C, ARTYMIUK PJ, GUEST JR. The aconitase of *Escherichia coli*. Nucleotide sequence of the aconitase gene and amino acid sequence similarity with mitochondrial aconitases, the iron-responsive-element-binding protein and isopropylmalate isomerases. *Eur J Biochem* 1992; **204**: 599–609.
- [69] RABIE A, SIMPSON RJ, BOMFORD A, CUNNINGHAME-GRAHAM D, PETERS TJ. Relationship between duodenal cytosolic aconitase activity and iron status in the mouse. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1245**: 414–420.
- [70] ROBBINS AH, STOUT CD. Structure of activated aconitase: formation of the [4Fe-4S] cluster in the crystal. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 3639–3643.
- [71] ROUAULT TA, KLAUSNER RD. Regulation of iron metabolism in eukaryotes. *Curr Top Cell Regul* 1997; **35**: 1–19.
- [72] ROUAULT TA, STOUT CD, KAPTAIN S, HARFORD JB, KLAUSNER RD. Structural relationship between an iron-regulated RNA-binding protein (IRE-BP) and aconitase: functional implications. *Cell* 1991; **64**: 881–883.
- [73] SAVARY S, ALLIKMENTS R, DENIZOT F, LUCIANI MF, MATTEI MG, CHIMINI G. Isolation and chromosomal mapping of a novel ATP-binding cassette transporter conserved in mouse and human. *Genomics* 1997; **15**: 275–278.
- [74] SOUM E, DRAPIER JC. Nitric oxide and peroxynitrite promote complete disruption of the [4Fe-4S] cluster of recombinant human iron regulatory protein 1. *J Biol Inorg Chem* 2003; **8**: 226–232.
- [75] STONE JR, MARLETTA MA. Synergistic activation of soluble guanylate cyclase by YC-1 and carbon monoxide: implications for the role of cleavage of the iron-histidine bond during activation by nitric oxide. *Chem Biol* 1998; **5**: 255–261.
- [76] SWENSON GR, WALDEN WE. Localisation of an RNA binding element of the iron responsive element binding protein within a proteolytic fragment containing iron coordination ligands. *Nucleic Acids Res* 1994; **22**: 2627–2633.
- [77] UENO T, SUZUKI Y, FUJII S, VANIN AF, YOSHIMURA T. *In vivo* nitric oxide transfer of a physiological NO carrier, dinitrosyl dithiolato iron complex, to target complex. *Biochem Pharmacol* 2002; **63**: 485–493.
- [78] THEIL EC. The iron responsive element (IRE) family of mRNA regulators. Regulation of iron transport and uptake compared in animals, plants, and microorganisms. *Met Ions Biol Syst* 1998; **35**: 403–434.
- [79] TONG WH, ROUAULT TA. Distinct iron-sulfur cluster assembly complexes exist in the cytosol and mitochondria of humans. *EMBO J* 2000; **19**: 5692–5700.
- [80] VANIN AF, KLESCHYOV AL. EPR detection and biological implications of nitratesyl iron complexes. [w] Lukiewicz S, Zweier JL [red.] Nitric oxide in transplant rejection and anti-tumor defense. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999: 49–82
- [81] WÄCHTERSCHÄUSER G. Evolution of the first metabolic cycles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 200–204.

- [82] WALDEN WE, DANIELS-MCQUEEN S, BROWN PH, GAFFIELD L, RUSSELL DA, BIELSER D, BAILEY LC, THACH RE. Translational repression in eukaryotes: partial purification and characterization of a repressor of ferritin mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 9503–9507.
- [83] WALDEN WE, PATINO MM, GAFFIELD L. Purification of a specific repressor of ferritin mRNA translation from rabbit liver. *J Biol Chem* 1989; **264**: 13765–13769.
- [84] WATTS RN, RICHARDSON DR. Nitrogen monoxide (NO) and glucose. Unexpected links between energy metabolism and NO-mediated iron mobilisation from cells. *J Biol Chem* 2001; **276**: 4724–4732.
- [85] WEISS G, GOOSEN B, DOPPLER W, FUCHS D, PANTOPOULOS K, WERNER-FELMAYER G, WACHTER H, HENTZE MW. Translational regulation via iron responsive elements by the nitric oxide/NO-synthase pathway. *EMBO J* 1993; **12**: 3651–3657.
- [86] ZANNINELLI G, GLICKSTEIN H, BREUER W, MILGRAM P, BRISSOT P, HIDER RC, KONIJN AM, LIBMAN J, SHANZER A, CABANTCHIK ZI. Chelation and mobilisation of cellular iron by different classes of chelators. *Mol Pharmacol* 1997; **51**: 842–852.
- [87] ZHENG L, KENNEDY MC, BLONDIN GA, BEINERT H, ZALKIN H. Binding of cytosolic aconitase to the iron responsive element of porcine mitochondrial aconitase mRNA. *Arch Biochem Biophys* 1992; **299**: 356–360.
- [88] ZHENG L, KENNEDY MC, BLONDIN GA, BEINERT H, ZALKIN H. Mutational analysis of active site residues in pig heart aconitase. *J Biol Chem* 1992; **267**: 7895–7903.

*Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak*

*Otrzymano: 22.01. 2003 r.*  
*Przyjęto: 25.02.2003 r.*  
*Jastrzębiec, ul. Postępu 1*  
*05-552 Wólka Kosowska*

## ORGANELLE WYDZIELNICZE *TOXOPLASMA GONDII* – ICH ROLA W PROCESIE PENETRACJI I ZASIEDLANIA KOMÓREK ŻYWCIELA

SECRETORY ORGANELLES OF *TOXOPLASMA GONDII* –  
THEIR ROLE IN HOST CELL INVASION

Justyna Małgorzata GATKOWSKA

Zakład Immunoparazytologii, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej,  
Uniwersytet Łódzki

**Streszczenie:** Pierwotniak *Toxoplasma gondii* to bezwzględny pasożyt wewnątrzkomórkowy zdolny do zasiedlenia wielu typów komórek zwierząt kręgowych. Wnikanie do komórki żywiciela jest procesem aktywnym sterowanym przez samego pasożyta. Proces ten wiąże się bezpośrednio z uwolnieniem białek zawartych w organellach wydzielniczych: mikronemach, roptrach i granulach o dużej gęstości. Białka mikronem odpowiadają za adhezję *T. gondii* do komórek żywiciela, a białka roptrów uczestniczą w wytworzeniu wakuoli pasożytniczej. Białka granul o dużej gęstości zaś są wydzielane w sposób ciągły w trakcie wewnątrzkomórkowego rozwoju pierwotniaka zapewniając mu dostęp do substancji odżywczych i replikację. W pracy tej przedstawiono obecny stan wiedzy na temat organelli wydzielniczych *T. gondii* i ich roli w procesie penetracji i zasiedlania komórek żywiciela.

**Słowa kluczowe:** *Toxoplasma gondii*, organelle wydzielnicze, białka wydzielnicze.

**Summary:** *Toxoplasma gondii* is an obligate, intracellular parasite that can infect nearly any vertebrate cell type. *T. gondii* invades host cell by an active process driven by the parasite. The invasion is associated with secretion of proteins from three sets of secretory organelles: the micronemes, rhoptries and dense granules. Microneme proteins are responsible for attachment to the host cell; rhoptry content participates in the formation of parasitophorous vacuole. Dense granule proteins are secreted continuously during intracellular development of the parasite and they play an important role in nutrient acquisition. This assay presents all known facts about secretory organelles of *T. gondii* and their role in host cell invasion.

**Key words:** *Toxoplasma gondii*, secretory organelles, secretory proteins.

## WSTĘP

Pierwotniak *Toxoplasma gondii*, bezwzględny pasożyt wewnątrzkomórkowy, został wykryty w 1908 roku u północnoafrykańskiego gryzonia *Ctenodactylus gondii* [19]. Pasożyt ten atakuje wiele gatunków kręgowców stałocieplnych, w tym także ludzi. Charakteryzuje się złożonym cyklem rozwojowym przebiegającym u różnych żywicieli pośrednich oraz żywiciela ostatecznego, którym jest zawsze zwierzę z rodziny kociaków. W organizmie żywiciela ostatecznego pasożyt namnaża się w komórkach nabłonka jelita cienkiego zarówno płciowo, jak i bezpłciowo. W wyniku rozmnażania płciowego powstają oocysty trafiające wraz z kałem do środowiska zewnętrznego [13]. Rozwijające się z nich sporozycyty stanowią postacie inwazyjne dla wszystkich żywicieli pośrednich i żywiciela ostatecznego [42].

Po namnożeniu w jelicie żywiciela pośredniego pierwotniaki rozprzestrzeniają się w makroorganizmie wraz z krwią i limfą wewnątrz monocytów i granulocytów obojętnochłonnych [14]. Po replikacji w komórkach pasożyty potomne opuszczają je i natychmiast atakują sąsiednie komórki, a pierwotnie zarażone komórki ulegają lizie [6,22]. Za destrukcję tkanek odpowiedzialne są agresywne, szybko namnażające się formy zwane tachyzoitami. Wewnątrz zarażonej komórki *Toxoplasma gondii* zamyka się w wakuoli pasożytniczej (PV – *Parasitophorous Vacuole*), która stanowi barierę pomiędzy pasożytem a cytosolem komórki żywiciela [26]. PV nie ulega fuzji z lizosomami, chroniąc w ten sposób pierwotniaka przed działaniem wewnątrzkomórkowych enzymów litycznych. W odróżnieniu od fagolizosomu, wewnątrz wakuoli pH jest zbliżone do obojętnego [8,27]. Rozwijająca się odpowiedź immunologiczna zarażonego makroorganizmu hamuje dalszą replikację *T. gondii* i indukuje konwersję tachyzoitów w wolno namnażające się formy spoczynkowe – bradyzoity. Bradyzoity pozostają zamknięte w cystach tkankowych, zlokalizowanych głównie w ośrodkowym układzie nerwowym, gałce ocznej i mięśniach poprzecznie prążkowanych [30,32]. Wewnątrz cyst pasożyt zachowuje pełną inwazyjność przez szereg lat. Uważa się, iż stan nosicielstwa trwa do końca życia zarażonego organizmu. Co więcej, cysty są niewrażliwe na działanie soku żołądkowego, tak więc stanowią kolejną postać inwazyjną pasożyta [42].

*Toxoplasma gondii* jest czynnikiem etiologicznym toksoplazmozy, która u ludzi jest chorobą odzwierzęcą, jedną z najbardziej rozpowszechnionych chorób pasożytniczych w skali światowej [14]. Najczęstszym źródłem zarażenia jest surowe, niedogotowane lub niedosmażone mięso zawierające cysty tkankowe, ale bierze się również pod uwagę inne źródła, jak zanieczyszczona żywność czy woda [13], ponieważ oocysty nawet po roku przebywania w wilgotnej glebie zachowują pełną żywotność [19]. Możliwa jest także transmisja pierwotniaka w obrębie populacji ludzkiej, np. przez przeszczepy tkankowe bądź przetoczenie zarażonej krwi [14]. Wyjątkową drogą zarażenia jest przenikanie pasożyta przez łożysko do rozwijającego się płodu [30,42].

Obraz toksoplazmozy bywa różny. U osób ze sprawnym układem odpornościowym faza ostra zarażenia przebiega bezobjawowo lub skąpo objawowo przypominając grype

[19]. Silna odpowiedź immunologiczna hamuje namnażanie pasożyta z równoczesnym przeobrażeniem tachyzoitów w bradyzoity; w ten sposób faza ostra zarażenia przechodzi w przewlekłą. Jednakże przebieg toksoplazmozy może być ciężki i stwarzać bezpośrednio zagrożenie życia. Tak się dzieje w przypadku osób o obniżonej odporności [32]. U pacjentów chorych na nowotwory, przyjmujących leki immunosupresyjne czy chorych na AIDS, w wyniku reaktywacji latentnego zarażenia dochodzi do uwolnienia bradyzoitów z cyst, ich przemiany w tachyzoity i niekontrolowanego namnożenia się w różnych tkankach [13,30], co z kolei prowadzi do poważnych uszkodzeń organów. Szczególnie ciężki przebieg toksoplazmozy mózgu obserwuje się u chorych na AIDS, stąd też jest ona jedną z chorób wskaźnikowych tego syndromu [10,42].

Poważny problem stwarza także możliwość transmisji pasożyta przez łożysko do płodu w przypadku pierwotnego zarażenia kobiety ciężarnej. Namnożenie się pierwotniaka w tkankach płodu może doprowadzić do jego obumarcia bądź też spowodować nieodwracalne zmiany i w konsekwencji narodziny dziecka z toksoplazmozą wrodzoną [19,32].

## PROCES INWAZJI

*Toxoplasma gondii* ma zdolność wnikania do różnych typów komórek ludzkich zarówno fagocytarnych, jak i nefagocytujących [20]. Zasiedlenie wnętrza komórki jest warunkiem niezbędnym do przeżycia i replikacji pasożyta, gdyż poza komórką pasożyt nie namnaża się, pozostając w stanie spoczynku aż do momentu wnikięcia do kolejnej komórki [39]. Pomimo że ten eukariotyczny jednokomórkowiec ma rybosomy, mitochondria i aparat Golgiego [6], nie jest zdolny do przeżycia poza komórką żywiciela. Przyczyną takiego stanu jest auksotrofizm pasożyta w stosunku do pirymidyn, spowodowany brakiem enzymu – syntetazy karbamoilofosforanowej, która warunkuje pierwszy etap biosyntezy nukleotydów pirymidynowych. Co więcej, pierwotniak nie jest także zdolny do syntezy steroli *de novo*. Niezbędny do budowy błon cholesterol uzyskuje z komórki żywiciela [29].

Bezwzględnym warunkiem inwazji jest odpowiednie zorientowanie pozakomórkowe pierwotniaka w stosunku do atakowanej komórki. Fizyczny kontakt obu komórek inicjuje proces wnikania pasożyta [16], który zachodzi bardzo szybko, przez 15–30 sekund [11], czyli znacznie szybciej niż proces fagocytozy (120 sekund) [42]. W odróżnieniu także od fagocytozy, komórka żywiciela pozostaje całkowicie bierna; nie dochodzi w niej do kondensacji aktyny, sfaldowania błony zewnętrznej ani fosforylacji tyrozyny [12]. Wskazuje to, iż inwazja pierwotniaka jest aktywnym procesem sterowanym przez samego pasożyta [15,16]. W końcowym stadium *Toxoplasma* zostaje zamknięta w wakuoli pasożytniczej utworzonej w znacznej części z błony komórki żywiciela, jednakże pozbawionej białek przezbłonowych [11,16,17]. Całość procesu jest koordynowana za pośrednictwem wydzielanych w ściśle określonym momencie białek znajdujących się w specjalnych organelach

wydzielniczych: mikronemach, roptrach i granulach o dużej gęstości elektronowej [6]. Zawartość każdego rodzaju tych organelli ma inne specyficzne znaczenie w procesie penetracji i zasiedlania komórki żywiciela.

## BUDOWA KOMÓRKI

W postaci wegetatywnej *Toxoplasma gondii* ma charakterystyczny kształt przypominający cząstkę pomarańczy. Wymiary komórki zawierają się w przedziale 2–4 x 4–7 mm [42]. Pasożyt otoczony jest potrójną błoną (pellikulą), pod którą zlokalizowany jest cytoszkielet odpowiedzialny za stabilizację ciała i ruchliwość pasożyta. Charakterystyczną cechą wszystkich pierwotniaków należących do Typu *Apicomplexa*, w tym także *Toxoplasma gondii*, jest kompleks apikalny (ciało biegunowe), na który składają się: konoid, 2 pierścienie prekonoidalne, pierścień biegunowy oraz organelle wydzielnicze – mikronemy i roptra. Konoid jest motorem penetracji komórki żywiciela i to właśnie w nim znajdują swe ujścia roptra. Także mikronemy uwalniają swą zawartość na przednim biegunie komórki pasożyta [6, 11]. Granule o dużej gęstości (trzeci rodzaj organelli wydzielniczych) są rozmieszczone równomiernie w cytoplazmie komórek *T. gondii*, zaś proces wydzielania zawartych w nich białek zachodzi ciągle, najprawdopodobniej w różnych miejscach powierzchni pasożyta [3]. W trakcie każdej rundy replikacyjnej tachyzoitów roptra i mikronemy są zawsze tworzone *de novo* we wszystkich komórkach potomnych [38], podczas gdy biosynteza granul o dużej gęstości zachodzi w sposób ciągły [37].

## MIKRONEMY

Mikronemy (gr. *mikrós* – mały, *néma* – nic) są niewielkimi wydłużonymi tworami o kształcie nasion kminku, znajdującymi się wyłącznie w przednim biegunie komórki



RYCINA 1. Wakuola pasożytnicza (PV) – schemat

pierwotniaka [6]. Ich aktywność wydzielnicza ma charakter konstytutywny, ciągły, jednakże proces wydzielania ulega gwałtownej intensyfikacji w momencie kontaktu z komórką docelową, co sugeruje znaczenie mikronem w procesie rozpoznawania i adhezji do komórek żywiciela [4]. Potwierdza to występowanie sekwencji adhezyjnych w strukturze aminokwasowej białek tych organelli [6]. Wydzielnicza funkcja mikronem jest zależna od temperatury (ulega zahamowaniu poniżej 25°C – czym tłumaczy się wrażliwość procesu inwazji na warunki temperaturowe) oraz od aktywności wrażliwych na staurosporynę kinaz białkowych [4,43]. Jak dotąd opisano 11 białek tych organelli (MICs – *Microneme Proteins*) [35].

Białko MIC2 ma domeny wiążące białka zewnątrzkomórkowej macierzy, takie jak lamininę czy kolagen, oraz sekwencję rozpoznającą glikozaminoglikany obecne powszechnie na komórkach eukariotycznych. To właśnie zdolność wiązania tych substancji odpowiada za szerokie spektrum komórek zasiedlanych przez *T. gondii*. Domeny adhezyjne wraz z domeną przezbłonową i krótką sekwencją cytoplazmatyczną warunkują prawdopodobnie kontakt z receptorami na komórce docelowej, co umożliwia adhezję, a potem uruchomienie aktywnej penetracji do komórki żywiciela [6]. Białko MIC2 jest wydzielane z przedniego bieguna komórki *T. gondii* w momencie przylegania pasożyta do atakowanej komórki; następnie podlega relokalizacji przed uwolnieniem z tylnego bieguna komórki pierwotniaka, co wskazuje na jego udział w procesie wnikania do komórki żywiciela [4]. Także białka MIC1 i MIC3 włączają się w proces adhezji do komórek żywiciela. MIC1 wykazuje aktywność lektyny wiążącej laktozę [28], natomiast MIC3 jest zdolne do wiązania zarówno komponentów komórek pasożyta, jak i żywiciela, a więc może tworzyć pomost pomiędzy tymi komórkami [20,40]. Białko MIC3 występuje w postaci heterodimeru złożonego z dwóch izoform o masie 38 kDa każda. Różnice między izoformami mogą wynikać z modyfikacji potranslacyjnych białek [6].

Białka mikronem mogą także pełnić inne funkcje. MIC6 i MIC8 kierują do mikronem nowo zsintetyzowane białka odpowiednio: MIC1 i MIC4 oraz MIC3 [40]. Udowodniono, że przy braku MIC6 białka MIC1 i MIC4 kierowane są nie do mikronem, lecz do granul o dużej gęstości, a z nich do wakuoli pasożytniczej. MIC7 i MIC9 spełniają podobne zadania co MIC6 i MIC8, ale ich geny ulegają silniejszej ekspresji w bradyzoitach, podczas gdy MIC6 i MIC8 są bardziej charakterystyczne dla postaci tachyzoitu [31].

Białko MIC5 pozostaje związane z komórką pasożyta w czasie penetracji, a więc bierze udział w inwazji. Stosunkowo niedawno odkryte inhibitory proteinaz serynowych TgPI-1 i TgPI-2 (*Toxoplasma Gondii serine Proteinase Inhibitors*) przypuszczalnie chronią pierwotniaka przed działaniem hydrolaz w jelicie cienkim, gdzie przeważnie rozpoczyna się proces wnikania do komórek makroorganizmu. Możliwe jest także, że nie dopuszczają do zniszczenia pasożyta przez układ dopełniacza ustroju żywiciela [5].

## ROPTRA

Roptra (gr. *rhoptron* – kołatka) występują w liczbie 6–12 na komórkę, jako duże maczugowate struktury zlokalizowane w cytosolu przedniego bieguna komórki *T. gondii* [6,7,26]. Są to jedyne organelle w komórce pierwotniaka o charakterze kwaśnym [33,38].

Zawartość tych organeli jest uwalniana natychmiast po zaistnieniu kontaktu między komórką żywiciela i pasożyta, a zatem jeszcze przed penetracją do komórki docelowej [6], a także w trakcie wnikania, jako że białka roptrów (ROPs – *RhOptry Proteins*) znaleziono w błonie wakuoli pasożytniczej (PVM – *Parasitophorous Vacuole Membrane*) wkrótce po inwazji [15,25]. Białka ROP są syntetyzowane jako pre-pro-białka i ulegają przekształceniu najpierw do form probiałek, a potem do form dojrzałych [1,2,34]. Wielkość 10 opisanych dotąd białek roptrów zawarta jest w przedziale 40–200 kDa [8,34,35].

Białko ROP1 ma wysoce kwaśną domenę N-terminalną i zasadową domenę C-końcową, co sugeruje jego udział w oddziaływaniach białko-białko, jednakże jego funkcja w inwazji pozostaje dotąd niewyjaśniona. Chociaż uważa się, że białko to przyspiesza wnikanie do komórek żywiciela, to mutanty ROP1-ujemne szczepu RH *T. gondii* zachowują pełną zdolność do zarażania komórek w warunkach *in vitro* [1,6].

ROP2, ROP3, ROP4 i ROP8 są białkami przezbłonowymi o zbliżonej budowie i prawdopodobnie podobnej funkcji [1,6]. Jest interesujące, że ROP2 zawiera N-terminalną sekwencję, która ulega ekspresji po cytoplazmatycznej stronie PVM, co może wskazywać, iż białko to łączy organelle komórki żywiciela, takie jak mitochondria czy siateczka śródplazmatyczna, z zewnętrzną stroną PV [6,34].

Wciąż niewiele wiadomo o białkach ROP5, ROP6 i ROP7, ponieważ zidentyfikowano je wyłącznie za pomocą przeciwciał monoklonalnych i nie poznano ich struktury aminokwasowej [6]. Mało także wiadomo o ROP9. Białko to nie ma domeny przezbłonowej i pozostaje w formie rozpuszczalnej. Przypuszcza się, że ROP9, podobnie jak ROP1, jest zaangażowane we wczesne etapy penetracji komórki żywiciela. Białko ROP9 jest charakterystyczne wyłącznie dla postaci tachyzoitu *T. gondii* [35].

## GRANULE O DUŻEJ GĘSTOŚCI

Granule (łac. *granulum* – ziarnko) te są kulistymi organellami o różnej wielkości, rozmieszczonymi równomiernie w komórce *T. gondii* [6]. Pod wieloma względami przypominają one organelle wydzielnicze komórek ssaków, w związku z tym uważa się przez analogię, iż granule o dużej gęstości (DG – *Dense Granule*) powstają przez oddzielenie się od aparatu Golgiego [8,21]. Wydaje się, że ich zawartość ulega ciągłej sekrecji w trakcie wewnątrzkomórkowego rozwoju pierwotniaka [10] zapewniając mu dopływ substancji odżywczych i umożliwiając replikację [3]. Wszystkie znane białka DG (GRAs – *Dense Granule Proteins*) są uwalniane do PV po wniknięciu pasożyta do komórki żywiciela. W wakuoli pasożytniczej PV pozostają one w formie rozpuszczalnej lub luźno związanej z jej wewnętrzną siecią tubularną i błoną lub z



obiema strukturami. Do tej pory zidentyfikowano 11 białek GRA [9]. Ich masa cząsteczkowa waha się w granicach 20–40 kDa [8].

Białka rodziny GRA pełnią różnorodne funkcje. Na przykład GRA1, stanowiące niemal 2% całkowitej puli białek pasożyta, wykazuje zdolność wiązania wapnia i uczestniczy prawdopodobnie w utrzymywaniu homeostazy wapniowej wewnątrz PV. Ma to szczególne znaczenie w późniejszych stadiach rozwoju pasożyta, jako że podwyższony poziom wolnych jonów  $\text{Ca}^{2+}$  może promować uwalnianie pierwotniaków z zarażonych komórek [6].

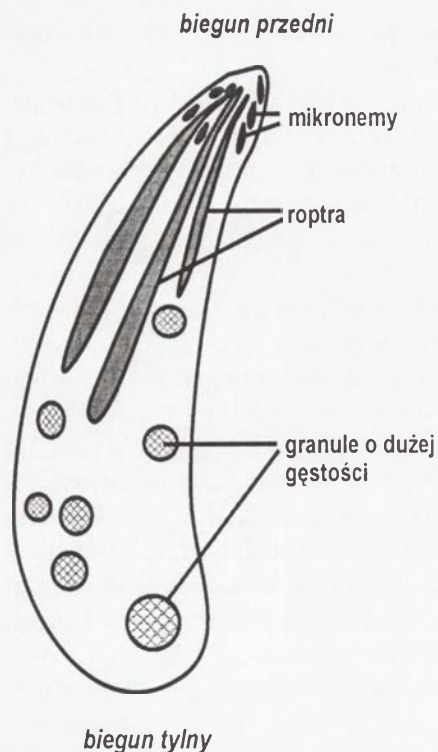
Kolejnym białkiem o dość dużej zawartości w komórce jest GRA2 stanowiące około 1,3% wszystkich białek. GRA2 wiąże się wyłącznie z siecią tubularną przez dwie  $\alpha$ -helisy [21,23]. Udowodniono, że mutanty *knock-out* szczepu RH pozbawione tego białka wykazywały mniejszą zjadliwość w stosunku do myszy, uważa się więc, że GRA2 wpływa bezpośrednio na zjadliwość szczepów *T. gondii* [6]. Białko GRA3 z kolei tworzy kompleksy, które łączą się z PVM poprzez oddziaływania hydrofobowe. GRA4, GRA5, GRA6 i GRA7 mają domeny przezbłonowe [24], z tego względu przypisuje się im rolę sit molekularnych umożliwiających swobodny przepływ małych cząsteczek (<1300 Da) przez PVM [6,22]. Ponadto, białko GRA7, które stanowi niemal 0,5% puli białek pasożyta, obecne jest także w cytoplazmie komórek zasiedlanych przez *T. gondii*, będąc markerem ich zarażenia [18]. Udowodniono także, że GRA4 i GRA6 oddziałują z GRA2 tworząc kompleks związany z wewnętrzną siecią tubularną PV, przy czym zarówno GRA4, jak i GRA6 mają w swej strukturze fragmenty hydrofobowe mogące tworzyć domeny przezbłonowe [23].

Kolejnym białkiem granul jest GRA8. Charakteryzuje się ono obecnością domeny przezbłonowej i wyjątkowo wysoką zawartością proliny (24%). Po wydzieleniu do światła PV wiąże się z powierzchnią wakuoli [3]. Spośród białek DG warto także wymienić NTP-azy (*nucleotide triphosphatase*), dwa blisko spokrewnione izoenzymy o masie 69 kDa, które rozszczepiają pochodzące od żywiciela nukleotydy [15,36] kompensując auksotrofizm *T. gondii* [6,22].

Białko GRA1 i NTP-azy jako jedyne pozostają w formie rozpuszczalnej w świetle PV [21,25]; wszystkie inne poznane do tej pory białka GRA po uwolnieniu z komórki pasożyta wiążą się z siecią tubularną PV, błoną wakuoli pasożytniczej lub z obiema strukturami, np. GRA2, GRA4 i GRA6 wiążą się raczej z siecią tubularną PV [7], zaś GRA3, GRA5 i GRA7 tworzą kompleksy związane z PVM [7,25]; przy czym GRA5 włączane jest do PVM jako białko przezbłonowe, którego domena N-terminalna kontaktuje się z cytoplazmą, a część C-końcowa ze światłem wakuoli pasożytniczej [24].

## SYNTEZA I UWALNIANIE BIAŁEK WYDZIELNICZYCH

Wszystkie dotąd opisane białka wydzielnicze *T. gondii* mają w swej strukturze aminokwasowej typową dla komórek eukariotycznych sekwencję liderową, która kieruje je do siateczki śródplazmatycznej. Stamtąd trafiają one do aparatu Golgiego, a z niego do odpowiednich organelli wydzielniczych [33,41]. Los już wydzielonych białek jest różny [6].



RYCINA 2. Organelle wydzielnicze *Toxoplasma gondii* – schemat

Białka GRA mogą pozostawać w formie rozpuszczalnej w świetle PV lub też wiązać się z PVM lub wewnętrzną siecią tubularną. Białka MIC wiążą się z powierzchnią błony komórek pasożyta lub pozostają w stanie wolnym poza komórkami *T. gondii*. Białka roptrów są selektywnie akumulowane w PVM i nie wykrywa się ich obecności ani na komórkach pierwotniaka, ani żywiciela [6].

Wciąż nie został poznany dokładny mechanizm uwalniania białek sekrecyjnych. Przypuszczalnie w proces ten są zaangażowane jony wapnia, wykazano bowiem, że ich brak hamuje, zaś podwyższony poziom stymuluje aktywność wydzielniczą mikronem [4,43]. Co ciekawe, nie stwierdzono w analogicznych doświadczeniach aktywacji procesu sekrecji białek z roptrów i granul o dużej gęstości, co może wskazywać na odmienny mechanizm procesu wydzielania zawartości różnych organelli *T. gondii* [6,33].

## PODSUMOWANIE

Zasiedlenie komórki żywiciela przez *T. gondii* uwarunkowane jest przez ściśle skoordynowane, etapowe wydzielanie określonych białek z organelli sekrecyjnych pasożyta – najpierw z mikronem w momencie adhezji komórek, następnie z roptrów w trakcie wnikania i tworzenia wakuoli pasożytniczej i wreszcie z granul o dużej gęstości po zakończeniu procesu inwazji. Ten sekwencyjny, skomplikowany, lecz perfekcyjny mechanizm gwarantuje pasożytowi przeżycie, a o jego skuteczności świadczy fakt, że *Toxoplasma gondii* z powodzeniem zasiedla komórki człowieka i wielu gatunków zwierząt w różnych strefach klimatycznych [16].

## LITERATURA

- [1] BRADLEY PJ, BOOTHROYD JC. The pro region of *Toxoplasma* ROP1 is a rophtry-targeting signal. *Inter J Parasitol* 2001; **31**: 1177–1186.
- [2] BRADLEY PJ, BOOTHROYD JC. Identification of the pro-mature processing site of *Toxoplasma* ROP1 by mass spectrometry. *Mol Bioch Parasitol* 1999; **100**: 103–109.

- [3] CAREY KL, DONAHUE CG, WARD GE. Identification and molecular characterization of GRA8, a novel, proline-rich, dense granule protein of *Toxoplasma gondii*. *Mol Bioch Parasitol* 2000; **105**: 25–37.
- [4] CARRUTHERS VB, GIDDINGS OK, SIBLEY LD. Secretion of micronemal proteins is associated with toxoplasma invasion of host cells. *Cell Microbiol* 1999; **1**: 225–235.
- [5] CARRUTHERS VB. Carruthers Lab Research Interests. <http://www.jhsph.edu/mmi/faculty/carruthers/carruthers.html>
- [6] CARRUTHERS VB. Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells. *Parasitol Inter* 1999; **48**: 1–10.
- [7] CESBRON-DELAUW MF, CAPRON A. Excreted/secreted antigens of *Toxoplasma gondii* – their origin and role in the host-parasite interaction. *Res Immunol* 1993; **144**: 41–45.
- [8] CESBRON-DELAUW MF. Dense-granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship. *Parasitol Today* 1994; **10**: 293–297.
- [9] DŁUGOŃSKA H, DYTNEŃSKA K, REICHMANN G, STACHELHAUS S, FISCHER H-G. Towards the *Toxoplasma gondii* proteome: position of 13 parasite excretory antigens on a standardized map of two-dimensionally separated tachyzoite proteins. *Parasitol Res* 2001; **87**: 634–637.
- [10] DŁUGOŃSKA H, DYTNEŃSKA K. Antygeny *Toxoplasma gondii*. *Wiad Parazytol* 1999; **45**: 473–480.
- [11] DŁUGOŃSKA H. *Toxoplasma gondii* – wewnątrzkomórkowy pasożyt. *Wiad Parazytol* 2002; **48**: 23–28.
- [12] DOBROWOLSKI J, SIBLEY LD. The role of the cytoskeleton in host invasion by *Toxoplasma gondii*. *Behring Institute Mitteilungen* 1997; **99**: 90–96.
- [13] DUBEY JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Inter J Parasitol* 1998; **28**: 1019–1024.
- [14] DUBEY JP. Toxoplasmosis. [W:] Cox FEG, Kreier J., Wakelin D. (red.) Topley and Wilsons Microbiology and Microbial Infection. *Parasitology* 1998; **5**: 303–318.
- [15] DUBREMETZ JF, GARCIA-REGUET N, CONSEIL V, FOURMAUX MN. Apical organelles and host-cell invasion by *Apicomplexa*. *Inter J Parasitol* 1998; **28**: 1007–1013.
- [16] DUBREMETZ JF. Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Trends in Microbiol* 1998; **6**: 27–30.
- [17] DUBREMETZ JF, SCHWARTZMAN JD. Subcellular organelles of *Toxoplasma gondii* and host cell invasion. *Res Immunol* 1993; **144**: 31–33.
- [18] FISCHER HG, STACHELHAUS S, SAHM M, MEYER HE, REICHMANN G. GRA7, an excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells. *Mol Bioch Parasitol* 1998; **91**: 251–262.
- [19] GARCIA LS, BRUCKNER DA. Tissue Protozoa. *Diagn Med Parasitol* 1997; **3**: 111–121.
- [20] GARCIA-REGUET N, LEBRUN M, FOURMAUX MN, MERCEREAU-PUIJALON O, MANN T, BECKERS CJM, SAMYN B, BEEUMEN JV, BOUT D, DUBREMETZ J-F. The microneme protein MIC3 of *Toxoplasma gondii* is a secretory adhesin that binds to both the surface of the host cells and the surface of the parasite. *Cell Microbiol* 2000; **2**: 353–364.
- [21] GROSS U. *Toxoplasma gondii*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1996: 60–61.
- [22] HOFF EF, CARRUTHERS VB. Is *Toxoplasma* egress the first step in invasion? *Trends in Parasitol* 2002; **18**: 251–255.
- [23] LABRUYERE E, LINGNAU M, MERCIER C, SIBLEY LD. Differential membrane targeting of the secretory proteins GRA4 and GRA6 within the parasitophorous vacuole formed by *Toxoplasma gondii*. *Mol Bioch Parasitol* 1999; **102**: 311–324.
- [24] LECORDIER L, MERCIER C, SIBLEY LD, CESBRON-DELAUW MF. Transmembrane insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA5 protein occurs after soluble secretion into the host cell. *Mol Biol Cell* 1999; **10**: 1277–1287.
- [25] LIENDO A, JOINER KA. *Toxoplasma gondii*: conserved protein machinery in an unusual secretory pathway? *Microbes Infect* 2000; **2**: 137–144.
- [26] LINGELBACH K, JOINER KA. The parasitophorous vacuole membrane surrounding *Plasmodium* and *Toxoplasma*: an unusual compartment in infected cells. *J Cell Sci* 1998; **111**: 1467–1475.
- [27] LINGELBACH K. Life in vacuoles – a strategy for parasite survival. *Inter J Parasitol* 2001; **31**: 5–6.
- [28] LOURENCO EV, PEREIRA SR, FACA VM, COELHO-CASTELO AA, MINEO JR, ROQUE-BARREIRA MC, GREENE LJ, PANUNTO-CASTELO A. *Toxoplasma gondii* micronemal protein MIC1 is a lactose-binding lectin. *Glycobiol* 2001; **11**: 541–547.
- [29] LÜDER CGK, BOHNE W, SOLDATI D. Toxoplasmosis: a persisting challenge. *Trends in Parasitol* 2001; **17**: 460–463.
- [30] LYONS RE, McLEOD R, ROBERTS CW. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. *Trends in Parasitol* 2002; **18**: 198–200.

- [31] MEISSNER M, REISS M, VIEBIG N, CARRUTHERS VB, TOURSEL C, TOMAVO S, AIJOKA JW, SOLDATI D. A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorts. *J Cell Sci* 2002; **115**: 563–574.
- [32] MILLER CM, SMITH NC, JOHNSON AM. Cytokines, nitric oxide, heat shock proteins and virulence in *Toxoplasma*. *Parasitol Today* 1999; **15**: 418–422.
- [33] NGO HM, HOPPE HC, JOINER KA. Differential sorting and post-secretory targeting of proteins in parasitic invasion. *Trends in Cell Biol* 2000; **10**: 67–72.
- [34] QUE X, NGO H, LAWTON J, GRAY M, LIU Q, ENGEL J, BRINEN L, GHOSH P, JOINER KA, REED SL. The cathepsin B of *Toxoplasma gondii*, toxopain-1, is critical for parasite invasion and rhoptry protein processing. *J Biol Chemistry* 2002; **277**: 25791–25797.
- [35] REICHMANN G, DŁUGOŃSKA H, FISCHER H-G. Characterization of TgROP9 (p36), a novel rhoptry protein of *Toxoplasma gondii* tachyzoites identified by T cell clone. *Mol Bioch Parasitol* 2002; **119**: 43–54.
- [36] SAM-YELLOW TY. Rhoptry organelles of the *Apicomplexa*: their role in host cell invasion and intracellular survival. *Parasitol Today* 1996; **12**: 308–316.
- [37] SHAW MK, ROOS DS, TILNEY LG. Cysteine and serine protease inhibitors block intracellular development and disrupt the secretory pathway of *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect* 2002; **4**: 119–132.
- [38] SHAW MK, TILNEY LG. Acidic compartments and rhoptry formation in *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 1998; **117**: 435–443.
- [39] SIBLEY LD. Invasion of vertebrate cells by *Toxoplasma gondii*. *Trends in Cell Biol* 1995; **5**: 129–132.
- [40] SOLDATI D, DUBREMETZ JF, LEBRUN M. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Inter J Parasitol* 2001; **31**: 1293–1302.
- [41] STRIEPEN B, SOLDATI D, GARCIA-REGUET N, DUBREMETZ JF, ROOS DS. Targeting of soluble proteins to the rhoptries and micronemes in *Toxoplasma gondii*. *Mol Bioch Parasitol* 2001; **113**: 45–53.
- [42] ŚPIEWAK E, MAŁAFIEJE. Toksoplazmoza – wybrane zagadnienia epidemiologii, kliniki i diagnostyki. *Mikrobiologia Medycyna* 1996; **1**: 14–28.
- [43] TOMLEY FM, SOLDATI DS. Mix and match modules: structure and function of microneme proteins in apicomplexan parasites. *Trends in Parasitol* 2001; **17**: 81–88.

Redaktor prowadzący – Barbara Płytycz

Otrzymano: 05.01.2003 r.

Przyjęto: 18.03.2003 r.

Adres autora: ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź;

e-mail: gatjus@biol.uni.lodz.pl

## PEPTYDY PACAP I VIP: WYSTĘPOWANIE, RECEPTORY I ROLA FIZJOLOGICZNA

### PACAP AND VIP PEPTIDES: LOCALIZATION, RECEPTORS, AND PHYSIOLOGICAL FUNCTION

Paulina SĘDKOWSKA<sup>1</sup>, Paweł NIEWIADOMSKI<sup>2</sup>, Jolanta B. ZAWILSKA<sup>1,2</sup>  
i Jerzy Z. NOWAK<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Zakład Amin Biogennych PAN, <sup>2</sup>Zakład Farmakodynamiki  
i <sup>3</sup>Zakład Farmakologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

**Streszczenie:** Polipeptyd aktywujący przysadkową cyklazę adenylanową (PACAP) oraz naczyniowoaktywny peptyd jelitowy (VIP) należą do rodziny hormonów peptydowych, której przedstawicielami są m.in. glukagon, sekretyna oraz hormon uwalniający hormon wzrostu. PACAP i VIP są szeroko rozpowszechnione zarówno w ośrodkowym układzie nerwowym, jak i w tkankach obwodowych różnych gatunków kręgowców. PACAP występuje w dwóch formach: dominującej, 38-aminokwasowej (PACAP<sub>38</sub>) i krótszej – 27-aminokwasowej (PACAP<sub>27</sub>). PACAP<sub>27</sub> wykazuje 68% identyczności z VIP składającym się z 28 aminokwasów. Struktury pierwszorzędowe PACAP i VIP są dobrze ewolucyjnie zachowane. Oba peptydy działają za pośrednictwem wspólnych receptorów: VPAC<sub>1</sub> i VPAC<sub>2</sub>, które wiążą VIP i PACAP z podobnym powinowactwem. Dodatkowo PACAP może oddziaływać za pośrednictwem receptorów typu PAC<sub>1</sub>, które wiążą PACAP ze znacznie większym powinowactwem niż VIP. PACAP i VIP działają jako neuroprzekazniki i neuromodulatory, a także jako czynniki regulacyjne, neurotroficzne i neuroprotektcyjne.

**Słowa kluczowe:** polipeptyd aktywujący przysadkową cyklazę adenylanową (PACAP), naczyniowoaktywny peptyd jelitowy (VIP), receptory PAC<sub>1</sub>, VPAC<sub>1</sub>, VPAC<sub>2</sub>, cyklaza adenylanowa, cAMP, kinaza białkowa A, fosfolipaza C, trisfosforan inozytolu, diacyloglicerol, Ca<sup>2+</sup>, neuroprotekcja.

**Summary:** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal peptide (VIP) belong to a superfamily of polypeptide hormones which also includes glucagon, secretin and growth hormone-releasing hormone. PACAP and VIP are widely distributed both in the central nervous system and peripheral organs of various vertebrates. PACAP exists in two biologically active forms: a dominant 38-amino acid form (PACAP<sub>38</sub>) and a shorter 27-amino acid form (PACAP<sub>27</sub>). PACAP<sub>27</sub> shows 68% sequence identity with VIP (a 28-amino acid polypeptide). The sequence of both PACAP and VIP has been remarkably well conserved in the course of evolution. Both peptides exert their actions via common receptors: VPAC<sub>1</sub> and VPAC<sub>2</sub>, which bind VIP and PACAP with similar affinity. Additionally, PACAP also stimulates PAC<sub>1</sub>

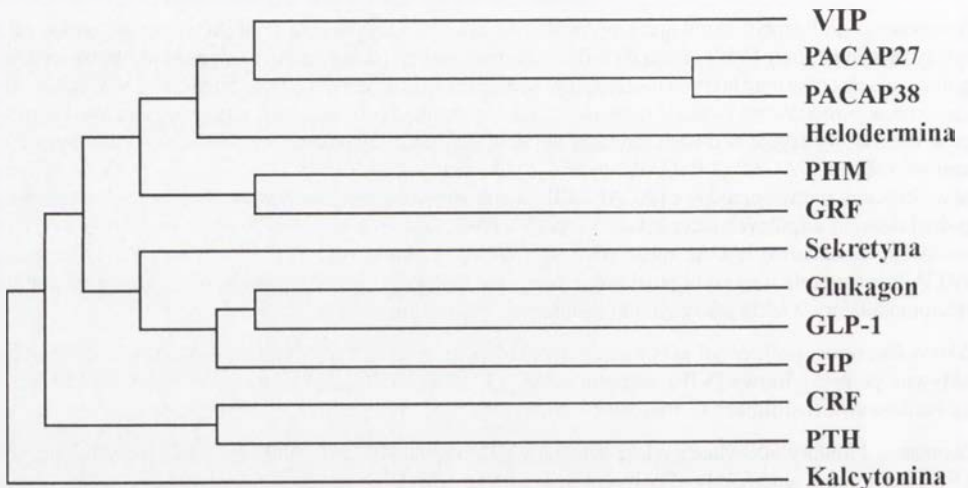
\*Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych (KBN), grant nr 6 PO5A 077-21.

type receptors, which bind PACAP with much higher affinity than VIP. PACAP and VIP act as neuro-regulatory agents, neurotransmitters, as well as neurotrophic and neuroprotective factors.

**Key words:** pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), vasoactive intestinal peptide (VIP), PAC<sub>1</sub>, VPAC<sub>1</sub>, VPAC<sub>2</sub> receptors, adenylate cyclase, cAMP, protein kinase A, phospholipase C, inositol trisphosphate, diacylglycerol, Ca<sup>2+</sup>, neuroprotection.

## WPROWADZENIE

Polipeptyd aktywujący przysadkową cyklazę adenylanową (ang. *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide*, PACAP) i naczyniowoaktywny peptyd jelitowy (ang. *Vasoactive Intestinal Peptide*, VIP) są przedstawicielami rodziny hormonów polipeptydowych, do której należą również sekretyna, peptyd insulinotropowy zależny od glukozy (ang. *Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide*, GIP), hormon uwalniający hormon wzrostu (ang. *Growth Hormone Releasing Hormone*, GHRH), peptyd histydyno-izoleucynowy (ang. *Peptide Histidine-Isoleucine*, PHI), peptyd histydyno-metioninowy (ang. *Peptide Histidine-Methionine*, PHM), peptyd glukagonopodobny 1 (ang. *Glucagon-Like Peptide 1*, GLP 1), GLP 2, oraz glukagon (ryc. 1) [89]. Obecność PACAP, VIP i receptorów dla tych peptydów w wielu tkankach różnych gatunków zwierząt, w tym w ośrodkowym układzie nerwowym, oraz



RYCINA 1. Dendrogram przedstawia pokrewieństwo między VIP, PACAP<sub>38</sub>, PACAP<sub>27</sub> i pozostałymi przedstawicielami rodziny hormonów peptydowych, oparte na homologii sekwencji aminokwasowych, skróty: VIP, naczynioaktywny peptyd jelitowy; PACAP, polipeptyd aktywujący przysadkową cyklazę adenylanową; PHM, peptyd histydyno-metioninowy; GRF (GHRH), hormon uwalniający hormon wzrostu; GLP, peptyd podobny do glukagonu; GIP, insulinotropowy polipeptyd zależny od glukozy; CRF, czynnik uwalniający hormon adrenokortykotropowy; PTH, parathormon (hormon gruczołów przytarczycznych)

wyjątkowo dobrze zachowana w toku ewolucji struktura pierwszorzędowa obu peptydów wskazują na ich istotną rolę fizjologiczną [89].

## POLIPEPTYD AKTYWUJĄCY PRZYSADKOWĄ CYKLAZĘ ADENYLANOWĄ (PACAP)

Badania dotyczące poznania struktury i funkcji PACAP mają zaledwie dwunastoletnią historię. Odkrycie peptydu było wynikiem poszukiwań nowych regulatorów aktywności przysadki mózgowej, tzw. czynników przysadkotropowych (ang. *hypophysiotropic factors*). PACAP został po raz pierwszy wyizolowany z ekstraktu podwzgórzy owiec i scharakteryzowany jako czynnik silnie pobudzający cyklazę adenyklanową w hodowli komórek przedniego płata przysadki mózgowej szczura [4,79]. W wyniku dalszych badań wykryto dwie formy PACAP – dominującą formę zbudowaną z 38 aminokwasów (PACAP<sub>38</sub>) oraz występującą w niższych stężeniach formę 27-aminokwasową (PACAP<sub>27</sub>). Forma krótsza odpowiada pierwszym 27 aminokwasom formy dłuższej i powstaje z niej w wyniku selektywnej proteolizy (ryc. 2) [4,79]. Obie formy różnią się od siebie rozmieszczeniem tkankowym, ale mają zbliżoną aktywność biologiczną.

PACAP powstaje z peptydu prekursorowego, preproPACAP, w procesie proteolizy katalizowanej przez konwertazy prohormonów (ang. *prohormone convertases* – PCs) [4,79,89]. U ssaków z preproPACAP powstaje ponadto 29-aminokwasowy peptyd, tzw. *PACAP-Related Peptide* (PRP) o dotychczas nieustalonej roli biologicznej. U człowieka gen *pacap/prp* znajduje się na chromosomie 18 i składa się z pięciu eksonów, przy czym sekwencja kodująca PACAP znajduje się w eksonie piątym, a ekson czwarty koduje m.in. PRP. Wykazano, że gen *pacap/prp* zawiera sekwencje regulatorowe homologiczne z sekwencjami CRE, TRE i GHF-1 [4,89]. U ptaków i niższych kręgowców gen *pacap/grf* koduje syntezę zarówno PACAP, jak i GHRH (GRF), natomiast u ssaków te dwa peptydy są kodowane przez odrębne geny (ryc. 3) [4,61,79,89,112].

PACAP jest najlepiej zachowanym ewolucyjnie spośród wszystkich hormonów peptydowych. PACAP ma identyczną strukturę pierwszorzędową u wszystkich przebadanych dotychczas gatunków ssaków, a sekwencja pierwszych 27 aminokwasów, koniecznych do zachowania aktywności biologicznej peptydu, jest identyczna z ludzką nawet u tak odległych ewolucyjnie organizmów, jak płazy i ryby. PACAP ptaków różni się od peptydu ssaków tylko jednym aminokwasem (znajdującym się w pozycji 2), a u osłonicy jedna z form PACAP różni się od ssaczego PACAP<sub>27</sub> jedynie w pozycji 15 (ryc. 2) [4,79,89].

Obecność mRNA kodującego PACAP bądź immunoreaktywność dla tego peptydu wykryto w neuronach wielu regionów ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Największe stężenie PACAP stwierdzono w podwzgórzu (głównie w jądrach przykomorowym, nadwzrokowym i łukowatym oraz w okolicy wyniosłości przyśrodkowej) oraz w substancji czarnej, gałce bladej, korze mózgowej, kompleksie ciała migdałowatego, przegrodzie, wzgórzu, pniu mózgu i rdzeniu kręgowym. PACAP

Porównanie sekwencji aminokwasowych VIP u różnych gatunków kregowców.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
<b>człowiek, krowa, szczur, świnka, pies, koza, owca,</b>	H	S	D	A	V	F	T	D	N	Y	T	R	L	R	K	Q	M	A	V	K	K	Y	L	N	S	I	L	N
<b>królik, mysz, małpa</b>																												
<b>świnka morska</b>	H	S	D	A	L	F	T	D	T	Y	T	R	L	R	K	Q	M	A	M	K	K	Y	L	N	S	V	L	N
<b>opos</b>	H	S	D	A	V	F	T	D	S	Y	T	R	L	L	K	Q	M	A	M	R	K	Y	L	D	S	I	L	N
<b>kurczę, indyk, żaba, aligator</b>	H	S	D	A	V	F	T	D	N	Y	S	R	F	R	K	Q	M	A	V	K	K	Y	L	N	S	V	L	T
<b>dorsz</b>	H	S	D	A	V	F	T	D	N	Y	S	R	F	R	K	Q	M	A	A	K	K	Y	L	N	S	V	L	A
<b>pstrąg</b>	H	S	D	A	I	F	T	D	N	Y	S	R	F	R	K	Q	M	A	V	K	K	Y	L	N	S	V	L	T

Porównanie sekwencji aminokwasowej PACAP u różnych gatunków kregowców i oslonic.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	
<b>człowiek, owca, mysz, świnka</b>	H	S	D	G	I	F	T	D	S	Y	S	R	Y	R	K	Q	M	A	V	K	K	Y	L	A	A	V	L	G	K	R	Y	K	Q	R	V	K	N	K	
<b>morska, szczur</b>																																							
<b>kurczę</b>	H	I	D	G	I	F	T	D	S	Y	S	R	Y	R	K	Q	M	A	V	K	K	Y	L	A	A	V	L	G	K	R	Y	K	Q	R	V	K	N	K	
<b>żaba</b>	H	S	D	G	I	F	T	D	S	Y	S	R	Y	R	K	Q	M	A	V	K	K	Y	L	A	A	V	L	G	K	R	Y	K	Q	R	I	K	N	K	
<b>łoś</b>	H	S	D	G	I	F	T	D	S	Y	S	R	Y	R	K	Q	M	A	V	K	K	Y	L	A	A	V	L	G	K	R	Y	R	Q	R	Y	R	N	K	
<b>sum</b>	H	S	D	G	I	F	T	D	S	Y	S	R	Y	R	K	Q	M	A	V	K	K	Y	L	A	A	V	L	G	R	R	Y	R	Q	R	F	R	N	K	
<b>jaszczurka</b>	H	S	D	G	I	F	T	D	S	Y	S	R	Y	R	K	Q	M	A	V	K	K	Y	L	A	A	V	L												
<b>oslonice 1</b>	H	S	D	G	I	F	T	D	S	Y	S	R	Y	R	N	Q	M	A	V	K	K	Y	L	A	A	V	L												
<b>oslonice 2</b>	H	S	D	G	I	F	T	D	S	Y	S	R	Y	R	N	Q	M	A	V	K	K	Y	L	N	A	L	L												

RYCINA 2. Porównanie sekwencji aminokwasowych u różnych gatunków kregowców – VIP oraz kregowców i oslonic – PACAP; aminokwasy pogrubione oznaczają różnice względem peptydów człowieka

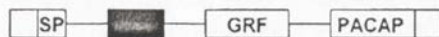


## OSŁONICE

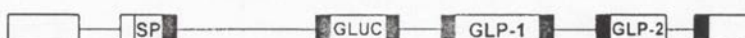
PACAP-GRF-1



PACAP-GRF-1



## KRĘGOWCE

PACAP-GRF  
(łosoś/kurczak)PACAP  
(człowiek)GRF  
(człowiek)VIP-PHM/PHI  
(ssaki)GLUC-GLP1-GLP2  
(łosoś/kurczak/człowiek)GIP  
(człowiek)SEKRETYNA  
(ssaki)

RYCINA 3. Porównanie struktury genów kodujących peptydy z rodziny glukagon/VIP/sekretyna u różnych gatunków zwierząt i człowieka, prostokąty oznaczają eksony, natomiast linie – introny, SP – peptyd sygnałowy; objaśnienia innych skrótów jak na rycinie 1

występuje ponadto w przysadce mózgowej, rdzeniu nadnerczy, jądrach (w niedojrzałych komórkach rozrodczych), trzustce, jajnikach, układzie oddechowym, przewodzie pokarmowym i elementach układu limfatycznego [3,4,58,73,89,105].

PACAP wywiera swoje działania biologiczne przez aktywację specyficznych receptorów błonowych, obecnych w neuronach oraz komórkach glejowych, określanych terminami PAC<sub>1</sub>, VPAC<sub>1</sub> i VPAC<sub>2</sub> [105]. Receptory typu PAC<sub>1</sub> preferencyjnie wiążą PACAP wykazując jednocześnie małe powinowactwo do VIP, natomiast receptory typu VPAC<sub>1</sub> i VPAC<sub>2</sub> mają zbliżone powinowactwo do PACAP i VIP [105].

Fakt, że PACAP stymuluje układ cykazy adenylanowej w przysadce mózgowej, świadczy o jego roli jako czynnika przysadkotropowego. Sądzi się, że rola PACAP w przysadce polega na stymulowaniu ekspresji genów odpowiedzialnych z jednej strony za produkcję hormonów przysadkowych, a z drugiej – za wzrost i różnicowanie komórek przysadki [73]. Wykazano, że peptyd ten stymuluje uwalnianie hormonu wzrostu (GH) i prolaktyny (PRL) u szczurów z uszkodzonym podwzgórzem, a także hormonu adrenokortykotropowego (ACTH) i hormonu luteinizującego (LH) z przysadki [4,73]. Poza bezpośrednim wpływem na przysadkę mózgową PACAP prawdopodobnie jest istotnym regulatorem aktywności wydzielniczej podwzgórza, albowiem po podaniu peptydu do komór mózgowych obserwowano znamienne wzrost poziomu mRNA dla kortykoliberyny [41], gonadoliberyny i somatostatyny [53]. Istnieją badania wskazujące, że PACAP i noradrenalina, wydzielane z tych samych zakończeń nerwowych,

synergistycznie wpływają na zależną od wewnątrzkomórkowego stężenia jonów  $Ca^{2+}$  produkcję wazopresyny. Ponadto, PACAP zwiększa uwalnianie wazopresyny i oksytocyny z tylnego płata przysadki [4]. Sugeruje to, że PACAP pełni rolę neuroprzekaźnika lub neuromodulatora w podwzgórzu i w przysadce mózgowej.

PACAP uczestniczy w kontroli czynności wydzielniczych innych gruczołów dokrewnych. Wykazano, że PACAP podnosi poziom kortyzolu we krwi po podaniu dożylnym [47], stymuluje syntezę tyroksyny [9] i nasila syntezę aldosteronu w skrawkach gruczołu nadnerczowego [73]. PACAP jest również najsilniejszym dotychczas poznanym niecholinergicznym neuroprzekaźnikiem stymulującym wydzielanie amin katecholowych z rdzenia nadnerczy [4]. Sądzi się, że PACAP odgrywa istotną rolę w układzie rozrodczym. W badaniach *in vitro* wykazano, że PACAP nasila produkcję testosteronu przez komórki Leydiga [82], produkcję estradiolu i inhibiny przez komórki Sertoliego [4] i powoduje wzrost produkcji progesteronu przez komórki warstwy ziarnistej pęcherzyka Graafa [37]. Ponadto peptyd ten zwiększa przepływ krwi w jądrach i najądrzach [55].

Wyniki najnowszych badań wskazują na rolę PACAP jako czynnika regulującego pracę kompleksu zegara okołodobowego. Obecność peptydu stwierdzono w subpopulacji neuronów zwojowych siatkówki ssaków zawierających melanopsynę, których aksony dochodzą do jąder nadskrzyżowaniowych podwzgórza (ang. *suprachiasmatic nuclei* – SCN) tworząc tzw. szlak siatkówkowo-podwzgórzowy (ang. *retino-hypothalamic tract*). Jak się obecnie sądzi, neurony te przekazują do nadrzędnego zegara biologicznego zlokalizowanego w SCN informacje o oświetleniu otoczenia, co pozwala na precyzyjną regulację pracy zegara [42]. U myszy pozbawionych genu dla receptora PAC<sub>1</sub>, tzw. myszy *PAC<sub>1</sub>-knockout*, zaobserwowano zmiany w ekspresji tzw. genów zegarowych (ang. *clock genes*) w SCN [43]. Dodatkowo wykazano, że PACAP wpływa bezpośrednio na ekspresję takich genów zegarowych, jak *per1* i *per2* w skrawkach mózgu szczura [65]. Szyszynka i produkowany przez nią w rytmie okołodobowym hormon melatonina odgrywają istotną rolę w regulacji pracy zegara biologicznego. W badaniach przeprowadzonych na hodowanych pinealocytach szczura (komórkach szyszynki, w których przebiega proces biosyntezy melatoniny) zaobserwowano wzrost syntezy melatoniny pod wpływem PACAP [93]. Z drugiej zaś strony w badaniach *in vitro* wykazano, że melatonina hamuje wywołany przez PACAP proces fosforylacji czynnika transkrypcyjnego CREB (ang. *cAMP response element-binding protein*) w SCN ssaków [49] i wzrost syntezy cAMP w podwzgórzu ptaków [68]. Powyższe obserwacje sugerują występowanie funkcjonalnej interakcji między melatoniną a PACAP w zakresie kontroli systemu okołodobowego.

Szereg badaczy analizowało wpływ PACAP na układ pokarmowy. PACAP wzmacnia sekrecję histaminy z komórek enterochromafinowych żołądka [86,116] i zwiększa ich proliferację [52]. Peptyd ten zmniejsza napięcie mięśni gładkich jelita cienkiego [15] oraz zwiększa sekrecję insuliny i glukagonu w trzustce [21]. W badaniach przeprowadzonych na myszach transgenicznym pozbawionych genu dla PACAP zaobserwowano, że większość zwierząt padała w drugim tygodniu po urodzeniu z powodu znacznego zaburzenia metabolizmu węglowodanów i lipidów [38].

PACAP jest czynnikiem silnie rozszerzającym naczynia krwionośne (działanie to jest najprawdopodobniej związane ze zdolnością peptydu do obniżania napięcia mięśni gładkich w ścianach naczyń) [6] i zwiększającym ich przepuszczalność [1]. PACAP rozkurcza mięśnie gładkie oskrzeli [113], co sugeruje możliwość użycia jego analogów w leczeniu astmy. Wiele danych doświadczalnych wskazuje na istotne oddziaływanie PACAP na elementy układu odpornościowego. Peptyd ten posiada własności przeciwzapalne – w limfocytach T zmniejsza wydzielanie interleukin wywołujących efekt zapalny [99], a w makrofagach obniża wydzielanie cytokin prozapalnych IL-6 i TNF- $\alpha$  [12] oraz nasila wydzielanie przeciwzapalnej interleukiny 10 [13].

W okresie ostatnich kilku lat obserwuje się wzrost zainteresowania właściwościami neurotroficznymi i neuroprotektoryjnymi PACAP. Wykazano, że peptyd ten nasila proliferację komórek przysadki mózgowej [4], a także zwiększa przeżycie i produkcję wypustek nerwowych w komórkach mózdzku [104], kory mózgowej [63], śródmózgowia [97] i przegrody mózgu [98]. PACAP chroni wiele rodzajów komórek nerwowych przed apoptozą wywołaną takimi czynnikami, jak: glikoproteina otoczki wirusa HIV – gp120 [31,109], kwas glutaminowy [84,93], etanol [107], nadtlenuk wodoru [106] i niedokrwienie [100].

## NACZYNIOWOAKTYWNY PEPTYD JELITOWY (VIP)

VIP został po raz pierwszy wyizolowany z jelita świni i scharakteryzowany jako czynnik zmniejszający napięcie mięśni gładkich w ścianach naczyń krwionośnych [34]. Ten 28-aminokwasowy polipeptyd powstaje z prekursorowego peptydu, tzw. preproVIP, kodowanego u człowieka przez gen zlokalizowany na chromosomie 6 [32]. Z preproVIP w wyniku proteolizy powstaje ponadto 27-aminokwasowy peptyd, nazywany, w zależności od gatunku, peptydem histydyno-metioninowym (PHM; człowiek) lub peptydem histydyno-izoleucynowym (PHI; świnia, szczur) (ryc. 2 i 3) [73,89]. Gen kodujący preproVIP zawiera 7 eksonów, przy czym VIP kodowany jest przez ekson piąty, a PHM lub PHI przez ekson czwarty [89]. Organizacja genu *vip/phi(m)* w znacznym stopniu przypomina organizację genu *pacap/prp* lub *pacap/grf* [89].

Struktura pierwszorzędowa VIP jest dobrze ewolucyjnie zachowana. Jest ona identyczna u wszystkich przebadanych dotychczas gatunków ssaków (wyjątek stanowią świnka morska i opos), a u pozostałych gatunków kręgowców różni się czterema do pięciu resztami aminokwasowymi (ryc. 2) [89]. Sekwencja aminokwasowa VIP jest w 68% homologiczna z sekwencją PACAP<sub>27</sub> [3,105]. Ponieważ geny dla PACAP, VIP i GHRH mają zbliżoną organizację strukturalną, przypuszcza się, że powstały one w toku ewolucji z tego samego genu poprzez duplikację (ryc. 3) [89].

VIP wykryto w neuronach różnych struktur OUN, w tym przede wszystkim w jądrach podwzgórza (głównie w jądrze nadskrzyżowaniowym). Ponadto peptyd ten występuje w korze mózgowej, a w niższym stężeniu w hipokampie i jądrze migdałowatym [32]. Obecność VIP stwierdzono również w przedniej części przysadki

mózgowej [85], w rdzeniu nadnerczy [58], zakończeniach nerwowych układu oddechowego [50], moczowo-płciowego [34] oraz układu pokarmowego (szczególnie wysoki poziom tego peptydu stwierdzono w trzustce) [2,19,20], a także w zakończeniach komórek nerwowych unerwiających węzły chłonne [22].

Sądzi się, że VIP uczestniczy jako czynnik neurotroficzny w rozwoju układu nerwowego. Peptyd ten występuje w mózgu i wpływa na jego rozwój w bardzo wczesnych stadiach rozwoju embrionalnego [40,89]. Wykazano, że VIP stymuluje tworzenie synaps i zwiększa przeżycie neuroblastów [34]. Poza właściwościami neurotroficznymi, VIP wykazuje silnie zaznaczone działania neuroprotektoryjne. W różnych modelach doświadczalnych VIP chronił komórki nerwowe przed toksycznym wpływem takich substancji, jak: dopamina, 6-hydroksydopamina [74], kwas glutaminowy [84], gp120 [4,34] i tetrodotoksyna [34]. Przypuszcza się, że VIP wywiera swoje neuroprotektoryjne działanie przez stymulację sekrecji czynników pochodzących z komórek glejowych, m.in. ADNF (ang. *Activity-Dependent Neurotrophic Factor*) [34] i ADNP (ang. *Activity-Dependent Neuroprotective Protein*) [35]. Wykazano ponadto, że VIP reguluje równowagę energetyczną w korze mózgowej ssaków przez wpływ na poziom glikogenolizy i glikogenogenezy w astrocytach [95].

W badaniach elektrofizjologicznych wykazano, że VIP modulował wpływ neuroprzekazników, takich jak kwas  $\gamma$ -aminomasłowy i acetylocholina, na iskrzenie (ang. *firing rates*) neuronów kory mózgowej. Ponadto VIP wpływał bezpośrednio na iskrzenie neuronów kory mózgowej i miejsca sinawego, przy czym obserwowany efekt był zależny od badanego obszaru mózgu [34].

VIP stymuluje sekrecję hormonów przedniego płata przysadki – prolaktyny i hormonu wzrostu [34] oraz zwiększa biosyntezę i wydzielanie melatoniny z szyszynki [94]. W tkankach obwodowych VIP zmniejsza napięcie mięśni gładkich w ścianach naczyń krwionośnych [45], rozkurcza mięśniówkę żołądka i zmniejsza jego perystaltykę [32], a także zmniejsza absorpcję wody i elektrolitów w układzie trawiennym przeżuwaczy [36]. W wyniku działania VIP na trzustkę dochodzi do zwiększenia sekrecji insuliny i glukagonu [87]. VIP wywiera analogiczny do PACAP wpływ na układ immunologiczny; sądzi się zatem, że oba peptydy oddziałują na komórki immunologiczne przez receptory typu VPAC [12,13,99].

## RECEPTORY PACAP/VIP

Receptory PAC<sub>1</sub>, VPAC<sub>1</sub> i VPAC<sub>2</sub> należą do nadrodziny receptorów związanych z białkami G (ang. *G-Protein Coupled Receptors – GPCRs*). Receptory te, wraz z innymi receptorami, m.in. dla sekretyny, GHRH, glukagonu i GLP-1, a także dla kalcytoniny, peptydu związanego z genem kalcytoniny (ang. *Calcitonin Gene-Related Peptide – CGRP*), kortykoliberyny (ang. *Corticotropin Releasing Factor – CRF*), parathormonu (PTH) i białka związanego z parathormonem (ang. *ParaThyroid Hormone-related Protein – PTHrP*), tworzą rodzinę receptorów o stosunkowo

wysokiej homologii strukturalnej i funkcjonalnej – tzw. rodzinę B GPCR [34,89]. Receptory PACAP/VIP są, podobnie jak pozostałe GPCRs, białkami integralnymi błony komórkowej. Białko receptorowe, składające się z kilkuset aminokwasów, tworzy siedem  $\alpha$ -helikalnych odcinków przechodzących przez błonę komórkową, tzw. domen transbłonowych (ang. *transmembrane domains* – TM), połączonych między sobą oligopeptydowymi pętlami wewnątrz- i zewnątrzkomórkowymi. N-końcowy fragment łańcucha białkowego znajduje się na zewnątrz komórki i może ulegać glikozylacji, natomiast C-koniec znajduje się wewnątrz komórki.

Na podstawie powinowactwa do różnych endogennych ligandów receptory wiążące PACAP i VIP podzielono na dwie klasy – receptory typu PAC<sub>1</sub> oraz typu VPAC (obejmujące VPAC<sub>1</sub> i VPAC<sub>2</sub>) [44]. Receptory typu PAC<sub>1</sub>, opisywane wcześniej w literaturze jako receptory PACAP typu I lub receptory PVR<sub>1</sub>, charakteryzują się około tysiąckrotnie wyższym powinowactwem do PACAP ( $K_d < 0,5$  nM) niż do VIP ( $K_d > 500$  nM) [26]; receptory te wiążą PACAP<sub>27</sub> i PACAP<sub>38</sub> ze zbliżonym powinowactwem. Receptory typu VPAC<sub>1</sub> i VPAC<sub>2</sub>, dawniej nazywane receptorami PACAP typu II lub odpowiednio VIP<sub>1</sub> i VIP<sub>2</sub>, albo PVR<sub>2</sub> i PVR<sub>3</sub>, wiążą PACAP<sub>38</sub> i PACAP<sub>27</sub> oraz VIP z podobnym wysokim powinowactwem. Receptor VPAC<sub>1</sub> wykazuje ponadto słabe powinowactwo do sekretyny i heloderminy, a receptor VPAC<sub>2</sub> bardzo słabe powinowactwo do sekretyny, a silne do heloderminy. Receptory PAC<sub>1</sub> dominują w strukturach OUN, natomiast VPAC<sub>1</sub> i VPAC<sub>2</sub> występują przede wszystkim w narządach obwodowych, takich jak: płuca, wątroba, dwunastnica i śledziona, oraz w mięśniach gładkich naczyń krwionośnych i komórkach układu immunologicznego.

## RECEPTOR PAC<sub>1</sub>

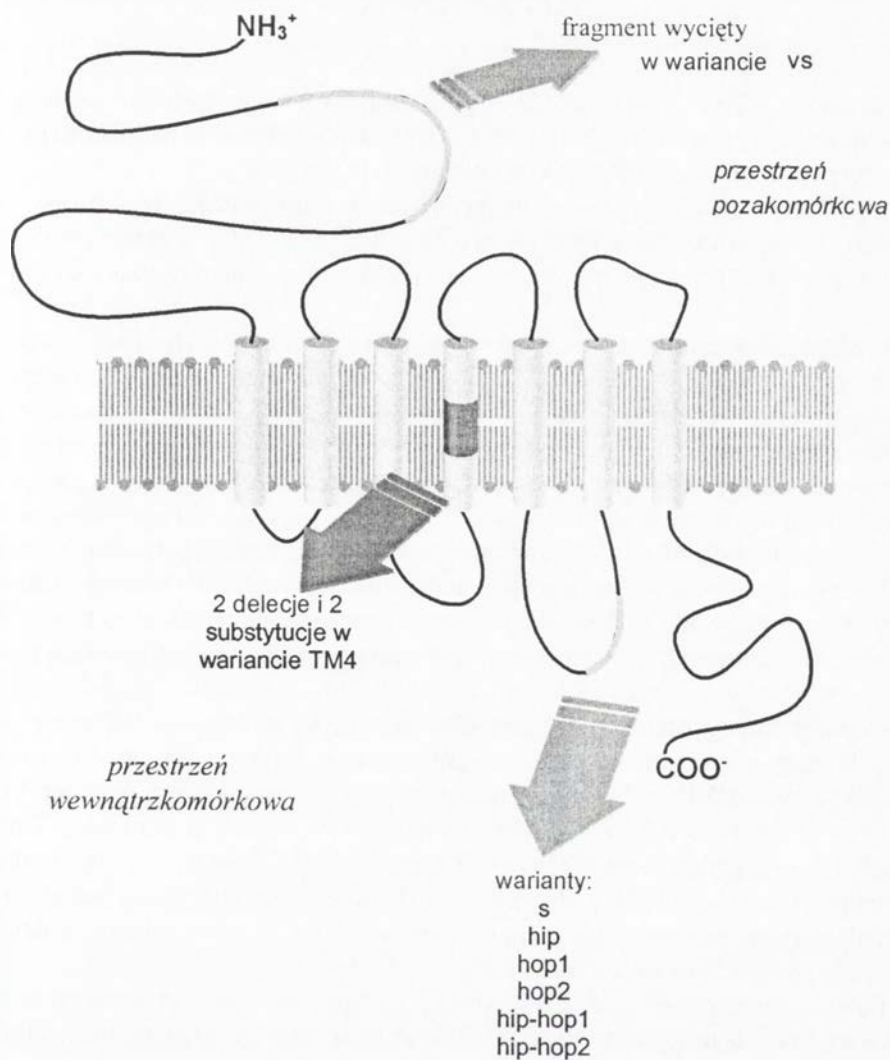
Receptory PAC<sub>1</sub> są obecne w podwzgórzu (dużą gęstość receptorów PAC<sub>1</sub> odnotowano w jądrach nadwzrokowych) [26,34], przednim płacie przysadki [4,73], hipokampie (w szczególności w zakręcie zębatym), mózdzku i opuszkach węchowych [34,92]. Obecność receptorów PAC<sub>1</sub> wykazano ponadto w siatkówce [88], rdzeniu nadnerczy [67], jądrach [4], płucach [7], komórkach enterochromafinopodobnych żołądka [116], jelitach [16], trzustce [5], tkance tłuszczowej [110] oraz w makrofagach [77]. Receptory PAC<sub>1</sub> wykrywa się u kręgowców w bardzo wczesnych stadiach rozwoju embrionalnego. Wysoki stopień ekspresji receptorów PAC<sub>1</sub> w embrionalnych tkankach mózgowych wskazuje na istotną rolę PACAP w procesach różnicowania i dojrzewania komórek OUN [117].

U człowieka sklonowano cDNA dla receptora PAC<sub>1</sub>. Jego sekwencja nukleotydowa odpowiada polipeptydowi o długości 525 aminokwasów, przy czym pierwsze 77 aminokwasów odpowiada tzw. peptydowi sygnałowemu [4,79]. Schemat budowy drugo- i trzeciorzędowej receptora PAC<sub>1</sub> nie różni się zasadniczo od budowy innych receptorów z rodziny GPCRs (patrz wyżej).

W czasie badań nad szczegółową strukturą receptora PAC<sub>1</sub> odkryto, że występuje on w co najmniej dziewięciu wariantach, które różnią się od siebie względną siłą wiązania PACAP<sub>38</sub>, PACAP<sub>27</sub> i VIP oraz oddziaływaniem na poszczególne szlaki wewnątrzkomórkowego przetwarzania sygnału receptorowego. Warianty s (od ang. *short*), hip, hop1, hop2, hip-hop1 i hip-hop2 różnią się od siebie obecnością w obrębie trzeciej pętli wewnątrzkomórkowej receptora fragmentów hip (28 aminokwasów), hop1 (28 aminokwasów), hop2 (27 aminokwasów) oraz ich kombinacji hip-hop1 lub hip-hop2 [46]. Wariant vs (od ang. *very short*) różni się od wariantu s delecją 21 aminokwasów w obrębie N-końcowego fragmentu receptora [105] (ryc. 4). Odkryto również wariant nazwany PAC<sub>1</sub>(3a), który posiada w obrębie N-końca dodatkowy fragment 24-aminokwasowy [10]. Wszystkie powyższe warianty receptora PAC<sub>1</sub> powstają ze wspólnego mRNA w procesie alternatywnego wycinania i składania. Wariant TM4 różni się natomiast od wariantu s mutacjami punktowymi – dwiema delecjami i dwiema substytucjami w obrębie czwartej domeny transbłonowej oraz dwiema dalszymi substytucjami w obrębie odpowiednio N-końcowej części receptora oraz drugiej domeny transbłonowej [109]. Ustalono, że dla wiązania receptora PAC<sub>1</sub> z białkiem G istotny jest C-końcowy fragment białka receptorowego [76]. Mutacje w obrębie tej części receptora powodują utratę zdolności receptora do aktywacji wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych. Z drugiej strony, mutacje Glu<sup>261</sup> w obrębie drugiej pętli wewnątrzkomórkowej prowadzą do konstytutywnej, niezależnej od liganda, aktywacji receptora [8].

Przyłączenie liganda do receptora PAC<sub>1</sub> powoduje, za pośrednictwem białka G<sub>s</sub>, silną stymulację cykazy adenylationowej (ang. *adenylate cyclase* – AC). Jedynym wyjątkiem jest wariant TM4 receptora, który nie jest związany z tym efektem [4,46,68,72,109]. W wyniku wzrostu aktywności AC w komórce zwiększa się stężenie cAMP i dochodzi do aktywacji kinazy białkowej zależnej od tego cyklicznego nukleotydu (ang. *Protein Kinase A* – PKA). Wszystkie poznane dotąd warianty receptora PAC<sub>1</sub>, z wyjątkiem TM4 i hip, poprzez interakcję z białkami z rodziny G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub> aktywują fosfolipazę C typu b (ang. *PhosphoLipase C* – PLC) [71,109]. Stymulacja PLC-b prowadzi do uwolnienia z błonowych fosfolipidów dwóch wtórnych przekaźników informacji – 1,2-Diacyloglicerolu (DAG) i 1,4,5-trifosforanu inozytolu (IP<sub>3</sub>). Następnie IP<sub>3</sub> uwalnia Ca<sup>2+</sup> z siateczki śródplazmatycznej, a DAG aktywuje kinazy białkowe typu C (zależne od jonów wapniowych i fosfolipidów; PKC) [70]. Pobudzenie receptorów PAC<sub>1</sub> może również stymulować fosfolipazę D (PLD), enzym, który katalizuje przemianę fosfolipidów do kwasu fosfatydowego [59]. Wariant TM4, biorący udział w wywołanej przez PACAP stymulacji sekrecji insuliny w trzustce, nie jest sprzężony z wymienionymi powyżej układami efektorowymi. Pobudzenie tego typu receptora prowadzi do otwarcia zależnych od napięcia kanałów wapniowych typu L i, w konsekwencji, do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia Ca<sup>2+</sup> [109].

Szereg danych doświadczalnych wskazuje na to, że stymulacja przez PACAP szlaku AC → cAMP → PKA odgrywa kluczową rolę w działaniu neurotroficznego peptydu. Wzrost stężenia cAMP w komórce prowadzi do fosforylacji i aktywacji białek CREB;



RYCINA 4. Warianty receptora PACAP, w obrębie trzeciej pętli wewnątrzkomórkowej mogą występować kasety hip1, hop1, hop2 lub odpowiednie ich kombinacje; wariant TM4 zawiera modyfikacje punktowe w obrębie drugiej i czwartej domeny transbłonowej; wariant vs charakteryzuje się delecją 21 aminokwasów w obrębie N-końcowego zewnątrzkomórkowego fragmentu białka

stymulacja PKA uaktywnia ponadto kaskadę kinaz MAP (ang. *Mitogen Activated Protein kinases*) [109]. W wyniku powyższych procesów następuje inicjacja transkrypcji białek regulatorowych, które powstrzymują apoptozę [114].

## RECEPTOR VPAC<sub>1</sub>

Receptor VPAC<sub>1</sub> wiąże PACAP<sub>27</sub>, PACAP<sub>38</sub> i VIP ze zbliżonym, wysokim powinowactwem, sekretynę z niskim (szczur) lub bardzo niskim (człowiek) powinowactwem oraz heloderminę z niskim powinowactwem [44].

Stosunkowo wysoki poziom ekspresji receptorów VPAC<sub>1</sub> wykryto w korze mózgowej i hipokampie. Receptory tego typu występują również w znacznych ilościach poza OUN, głównie w jelitach, płucach, grasicy, rdzeniu nadnerczy, trzustce i wątrobie [4].

U człowieka receptor VPAC<sub>1</sub> zbudowany jest z 457 aminokwasów [34]. Dotychczas nie wykryto wariantów receptora VPAC<sub>1</sub>. Sądzi się, że w interakcji VIP z receptorem VPAC<sub>1</sub> szczególną rolę odgrywa N-końcowy fragment białka receptorowego. Według najnowszego modelu, aminokwasy Glu<sup>36</sup>, Trp<sup>67</sup>, Asp<sup>68</sup>, Trp<sup>73</sup> oraz Gly<sup>109</sup> otaczają ujemnie naładowane zagłębienie, tzw. „kieszęń”, w zewnątrzkomórkowej części receptora; z kieszenią tą wiążą się dodatkowo naładowane reszty peptydu VIP, prawdopodobnie Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup> i Lys<sup>21</sup>. Słuszność powyższego założenia potwierdziły wyniki badań z zastosowaniem ukierunkowanej mutagenazy. Mutacja punktowa wyżej wymienionych aminokwasów powodowała znamienne zmniejszenie powinowactwa receptora VPAC<sub>1</sub> do VIP. Aminokwasy Trp<sup>67</sup>, Trp<sup>73</sup> i Trp<sup>110</sup> w białku receptorowym odgrywają ponadto ważną rolę w tworzeniu kompleksu ligand-receptor, stanowiąc miejsce wiązania występujących w strukturze VIP aminokwasów hydrofobowych – Val<sup>5</sup>, Leu<sup>23</sup> i Ile<sup>26</sup> [54]. Wykazano ponadto, że wymiana Asp<sup>196</sup> na inny aminokwas powoduje zarówno spadek wiązania VIP, jak i zmniejszenie stopnia aktywacji przez receptor VPAC<sub>1</sub> wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych [14]. Mutacje punktowe Thr<sup>343</sup> w obrębie drugiej pętli wewnątrzkomórkowej receptora [24] lub His<sup>178</sup> w obrębie drugiej domeny transbłonowej [25] powodują pojawienie się konstytutywnej, niezależnej od liganda aktywności receptora. Efekt ten zanika, gdy naruszona zostanie struktura N-końcowej części białka receptorowego.

Pobudzenie receptora VPAC<sub>1</sub> powoduje, podobnie jak w przypadku receptora PAC<sub>1</sub>, uaktywnienie szlaku sygnałowego G<sub>s</sub> → AC → cAMP → PKA. VIP i obie formy PACAP działają za pośrednictwem tego receptora z jednakową siłą. Istnieją również doniesienia o stymulującym wpływie receptora VPAC<sub>1</sub> na szlaki PLC-β → IP<sub>3</sub>, DAG → PKC [57,102] oraz PLD → kwas fosfatydowy [59]. Pobudzenie receptora VPAC<sub>1</sub> może ponadto wywołać wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca<sup>2+</sup> [4].

## RECEPTOR VPAC<sub>2</sub>

Receptor VPAC<sub>2</sub> wykazuje wysokie, zbliżone powinowactwo do PACAP<sub>38</sub>, PACAP<sub>27</sub> i VIP. Ponadto, receptor ten wiąże sekretynę z niskim, a heloderminę z wysokim powinowactwem [44].



Receptory VPAC<sub>2</sub> są obecne we wzgórzu, w kompleksie ciała migdałowatego, podwzgórzu, przedniej części przysadki, jądrach mostu oraz w tkankach i narządach obwodowych, takich jak: kora nadnerczy, żołądek, trzustka (komórki β wysp Langerhansa), jądra, jajniki i śledziona [4].

Ludzki receptor VPAC<sub>2</sub> zawiera 438 reszt aminokwasowych i jest w 85% homologiczny do receptora szczurzego [56]. U człowieka stopień homologii pomiędzy receptorem VPAC<sub>2</sub> a receptorem VPAC<sub>1</sub> i PAC<sub>1</sub> wynosi odpowiednio 49 i 52%. Nie wykryto dotychczas żadnych wariantów receptora VPAC<sub>2</sub>. Mutacje w pozycjach Arg<sup>172</sup> i Lys<sup>179</sup> oraz w pozycji Pro<sup>280</sup> powodują znaczne obniżenie powinowactwa receptora VPAC<sub>2</sub> do VIP; sądzi się zatem, że aminokwasy te uczestniczą w tworzeniu aktywnego kompleksu ligand-receptor [108].

Receptor VPAC<sub>2</sub> stymuluje cyklazę adenylanową, przy czym stopień pobudzenia tego szlaku efektorowego przez PACAP<sub>38</sub>, PACAP<sub>27</sub> i VIP jest podobny. Receptor VPAC<sub>2</sub>, podobnie jak receptory PAC<sub>1</sub> i VPAC<sub>1</sub>, może ponadto aktywować szlak PLC-β → IP<sub>3</sub>, DAG → PKC [57] i szlak PLD → kwas fosfatydowy [59]. Ostatnie dane uzyskane w naszym laboratorium wykazały, iż w korze mózgowej kurcząt PACAP i VIP z podobną siłą indukowały translokację PKC z cytosolu do błony komórkowej, jednakże tylko PACAP aktywował syntezę fosforanów inozytolu [70,72]. Obserwacja ta może sugerować – przynajmniej u ptaków – możliwość zależnej od PACAP i VIP (receptor VPAC<sub>2</sub>?) aktywacji PKC bez udziału toru zależnego od PLC.

## REGULACJA RECEPTORÓW PACAP/VIP

Wiele receptorów z rodziny GPCR podlega autoregulacji krzyżowej i regulacji określanej jako desensytyzacja. Proces ten, szczególnie w odniesieniu do homologicznej (auto)desensytyzacji, stanowi ważny mechanizm przywracający równowagę systemu sygnalizacyjnego w sytuacji nadmiernej i przedłużającej się stymulacji określonego receptora. Stymulacja taka może być źródłem potencjalnego uszkodzenia komórki/tkanki. Mechanizmy leżące u podstaw homologicznej (auto)desensytyzacji są uruchamiane tuż po pobudzeniu receptora i mogą obejmować szereg procesów we wnętrzu komórki, takich jak fosforylacja receptora katalizowana przez specyficzną kinazę sprzężoną z danym receptorem (ang. *G-protein-coupled Receptor Kinase*, GRK) i internalizacja (albo sekwestracja) receptora, prowadzących w wielu przypadkach do tzw. *down*-regulacji receptora [18].

Ostatnie dane doświadczalne dowodzą, że w tkankach ssaków i ptaków pobudzenie receptorów PAC<sub>1</sub> i VPAC, uruchamia mechanizmy regulacyjne prowadzące do desensytyzacji receptora [11,60,66,90,91]. Ciekawą obserwacją jest to, że nawet w obrębie danego typu receptora proces desensytyzacji nie jest jednolity. Dla przykładu receptor PAC<sub>1</sub> występujący natywnie w ludzkich komórkach retinoblastoma Y-79 podlega homologicznej desensytyzacji w drodze aktywacji GRK typu 3 oraz PKC [11], natomiast w komórkach jajnika chomika chińskiego (CHO; ang. *Chinese Hamster*

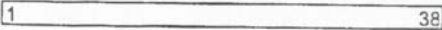
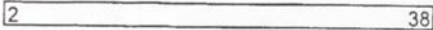
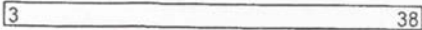

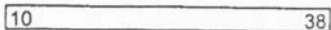
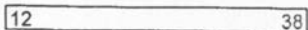
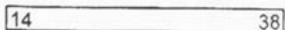
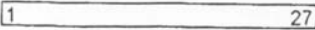


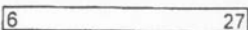


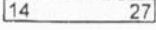

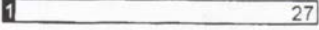
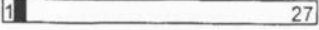
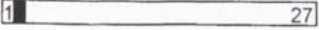
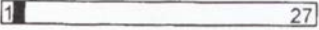
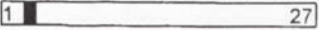
*Ovary*), w których dokonano ekspresji receptora tej klasy, proces desensytyzacji zachodził w wyniku sekwestracji receptora [100]. W korze mózgowej kurcząt proces desensytyzacji zależnej od PACAP odpowiedzi cAMP następował bardzo szybko, uzyskując plateau po 5–15 min preinkubacji tkanki z peptydem [66]. Podobną kinetykę procesu desensytyzacji obserwowano w odniesieniu do sklonowanego receptora VPAC<sub>1</sub>, którego ekspresji dokonano w linii komórek nerki embrionu ludzkiego (HEK-293). Proces ten obejmował, kolejno, zależną od GRK-6 fosforylację receptora, translokację β-arestyny i zależną do dynaminy internalizację receptora, której szczyt występował po 10–20 min interakcji ligand-receptor [90].

## AGONIŚCI I ANTAGONIŚCI RECEPTORÓW PAC<sub>1</sub>, VPAC<sub>1</sub> I VPAC<sub>2</sub>

Struktura peptydów PACAP i VIP pozostała w znacznym stopniu nienaruszona w toku ewolucji. Można stąd wnioskować, że zmiany w jej obrębie mogą prowadzić do znacznych zaburzeń w oddziaływaniu liganda na receptor. Istotnie, przeprowadzone badania wykazały, że pochodne PACAP, z których usunięto N-końcową część peptydu działają antagonistycznie w stosunku do PACAP. Najsilniejszym z antagonistów PACAP jest peptyd zawierający aminokwasy 6–38 oryginalnego związku (ryc. 5) [80,81]. Wycinanie kolejnych aminokwasów z N-końca łańcucha PACAP zmniejsza antagonistyczne własności tak powstałych peptydów, a nawet przywraca im zdolność do pobudzania receptora. PACAP<sub>10-27</sub> wykazuje właściwości agonistyczne, a najsilniejszym agonistą receptora PAC<sub>1</sub> z tej grupy peptydów jest PACAP<sub>14-38</sub> [103].

VIP, podobnie jak PACAP, również traci aktywność biologiczną po usunięciu aminokwasów z jego N-końca. VIP<sub>2-28</sub> zachowuje jeszcze stymulujący wpływ na cyklazę adenylnową, ale dalsze skracanie peptydu przynosi znaczne obniżenie jego zdolności do pobudzania wewnątrzkomórkowych szlaków przepływu informacji [34]. Antagonistycznie wobec VIP działa zsyntetyzowany peptyd hybrydowy, neurotensyna<sub>6-11</sub>-VIP<sub>7-28</sub>, znany także jako [Lys<sup>1</sup>,Pro<sup>2,5</sup>,Arg<sup>3,4</sup>,Tyr<sup>6</sup>]-VIP (LPAT-VIP). Peptyd ten wypiera VIP z jego miejsc wiążących oraz hamuje działanie neurotroficzne VIP [34]. W grupie lipofilowych pochodnych VIP, stearylo-norLeu<sup>17</sup>VIP (w skrócie SNV) ma wyjątkowo silne właściwości neuroprotektcyjne. Wykazano, że pochodna ta zwiększa przeżycie neuronów w hodowli 100 razy silniej niż VIP [33,39].

Na poszczególne podtypy receptorów dla PACAP/VIP oddziałują również związki wykazujące jedynie znikome podobieństwo do endogennych ligandów w strukturze pierwszorzędowej. Maxadilan, 61-aminokwasowy peptyd wyizolowany z gruczołów ślinowych muszki piaskowej *Lutzomia linigipalpis*, o strukturze pierwszorzędowej niehomologicznej z PACAP [64], jest agonistą receptorów PAC<sub>1</sub>, natomiast jego skrócony analog, związek M65 (fragment obejmujący aminokwasy 25-41), jest antagonistą tych receptorów [101]. Związkami, które swoiście wiążą się z receptorem VPAC<sub>1</sub>, są odpowiednie peptydy hybrydowe VIP i GRF (GHRH), przy czym – w zależności od

Pochodne PACAP <sub>38</sub>	Powinowactwo do receptora <i>IC<sub>50</sub> (nM)</i>	Stymulacja cykazy adenylnowej <i>EC<sub>50</sub> (nM)</i>
1  38	0.2	0.2
2  38	2	2
3  38	20	>1000
6  38	2	>1000
10  38	50	100
12  38	200	800
14  38	40	100
<b>Pochodne PACAP<sub>27</sub></b>		
1  27	0.4	0.3
2  27	20	30
3  27	600	>1000
6  27	200	>1000
10  27	1000	>1000
12  27	>1000	>1000
14  27	1000	>1000
<b>AcHis1</b>		
1  27	1	3
<b>Phe1</b>		
1  27	600	1000
<b>Ala2</b>		
1  27	8	30
<b>Phe2</b>		
1  27	100	>1000
<b>Arg2</b>		
1  27	1000	>1000
<b>Asn3</b>		
1  27	>1000	>1000

RYCINA 5. Analiza typu: struktura - aktywność biologiczna pochodnych PACAP, zdolność poszczególnych peptydów do wiązania się z receptorem PAC<sub>1</sub> (znakowanym radioligandem [<sup>125</sup>I] PACAP<sub>27</sub>) oraz do aktywacji szlaku: cykazy adenylnowa - cAMP w modelowych biosystemach

TABELA 1. Klasyfikacja receptorów dla PACAP i VIP

Nowa klasyfikacja	PAC <sub>1</sub>				VPAC <sub>1</sub>	VPAC <sub>2</sub>
Stare nazwy receptora	PACAP typu I, PACAP, PVR <sub>1</sub>				PACAP typu II, PVR <sub>2</sub> , VIP <sub>1</sub> /PACAP, VIP, VIP <sub>1</sub>	PVR <sub>3</sub> , VIP <sub>2</sub> /PACAP, VIP <sub>2</sub> /PACAP <sub>3</sub>
Locus genu w chromosomie ludzkim	7p14				3p22	7q36.3
Selektywni agoniści	Maxadilan*				[Arg <sup>16</sup> ]sekretyna kurczęcia; [K <sup>15</sup> R <sup>16</sup> L <sup>27</sup> ]VIP(1-7) GRF(8-27)-NH <sub>2</sub>	Ro 25-1553; Ro 25-1392**
Selektywni antagoniści	PACAP <sub>6-38</sub> ; PACAP <sub>6-27</sub> ; M65				[Ac-His <sup>1</sup> ,p-Phe <sup>2</sup> ,Lys <sup>15</sup> ,Arg <sup>16</sup> ]VIP(3-7)GRF(8-27)-NH <sub>2</sub> ; VIP <sub>6-28</sub>	PG 99-465***
Warianty	s, hop1, hop2, hip-hop1, hip-hop2	hip	vs	TM4	-	-
Wpływ na AC	+	+	+	?	+(P <sub>38</sub> ≈P <sub>27</sub> ≈VIP)	+(P <sub>38</sub> ≈P <sub>27</sub> ≈VIP)
Wpływ na PLC	+(P <sub>38</sub> ≈P <sub>27</sub> ≈VIP)	?	+(P <sub>38</sub> ≈P <sub>27</sub> ≈VIP)	?	?	?
Wpływ na [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	mobilizacja Ca <sup>2+</sup> wewnątrzkomórkowego	mobilizacja Ca <sup>2+</sup> wewnątrzkomórkowego	mobilizacja Ca <sup>2+</sup> wewnątrzkomórkowego	sprzężony z kanałem jonowym typu L	mobilizacja Ca <sup>2+</sup> wewnątrzkomórkowego	?

\*Maxadilan (aminokwasy homologiczne do odpowiednich aminokwasów PACAP i VIP zaznaczonym drukiem):

CDATCQFRKAIDDCQKQAHHSNVLQTSVQTTATFTSMDSQLPGNSVFKECMKQKKKEFKA

\*\* Ro 25-1392: Ac-His<sub>1</sub>[Glu<sup>8</sup>,OCH<sub>2</sub>-Tyr<sup>10</sup>,Lys<sup>12</sup>,Nle<sup>17</sup>,Ala<sup>19</sup>,Asp<sup>25</sup>,Leu<sup>26</sup>,Lys<sup>27,28</sup>]VIP (cyklo 21-25)

Ro 25-1553: Ac-His<sub>1</sub>[Glu<sup>8</sup>,Lys<sup>12</sup>,Nle<sup>17</sup>,Ala<sup>19</sup>,Asp<sup>25</sup>,Leu<sup>26</sup>,Lys<sup>27,28</sup>,Gly<sup>29,30</sup>,Thr<sup>31</sup>]-NH<sub>2</sub> VIP (cyklo 21-25)

\*\*\*PG 99-465: Myr-HSDAVFTDNYTKLRKQMAVKKYLNISIKKGGT

sekwencji aminokwasów – oddziałują one na receptor stymulująco lub antagonizują działanie endogennych ligandów (patrz tab. 1) [27,28]. Również Arg<sup>16</sup>-sekretyna kurczenia pobudza receptor VPAC<sub>1</sub> oraz dodatkowo receptor dla sekretyny. Specyficznymi agonistami receptora VPAC<sub>2</sub> są dwa cykliczne polipeptydy, znane jako Ro 25-1553 i Ro 25-1392 [29,111]. Antagonistą receptora VPAC<sub>2</sub> jest związek PG 99-465, będący acylowaną pochodną hybrydy fragmentów VIP i Ro 25-1553 (tab. 1) [62].

## PODSUMOWANIE

Występowanie PACAP i VIP oraz receptorów PAC<sub>1</sub>, VPAC<sub>1</sub> i VPAC<sub>2</sub> w wielu tkankach różnych gatunków zwierząt oraz oddziaływanie tych peptydów na rozmaite szlaki biochemiczne komórek i czynności fizjologiczne organizmu pozwalają przypuszczać, że te dwa polipeptydy są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania organizmu kręgowców. Powyższą tezę wzmacnia bardzo dobrze zachowana w toku ewolucji struktura polipeptydów oraz wielopłaszczyznowe zmiany obserwowane u zwierząt pozbawionych w drodze manipulacji genetycznych genów kodujących PACAP, VIP i ich receptory.

Spośród opisanych dotychczas efektów działania PACAP i VIP, na szczególną uwagę zasługuje neuroprotekcynny i neurotroficzny potencjał obu peptydów. Stwarza on możliwość wykorzystania wiedzy na temat tych peptydów do opracowywania nowych strategii leczenia chorób neurodegeneracyjnych, takich jak np. choroba Alzheimera i choroba Parkinsona. Ponadto, opisane dotychczas oddziaływania VIP i PACAP na drogi oddechowe (efekt przeciwestmatyczny), układ rozrodczy, pokarmowy i krwionośny, poszerzają zakres potencjalnego wykorzystania terapeutycznego związków syntetycznych działających na receptory PAC<sub>1</sub> i VPAC. Obserwując dynamiczny postęp w dziedzinie zarówno syntezy analogów peptydowych, jak i nowych form postaci leków można przypuszczać, że wkrótce zostaną zsyntetyzowane biologicznie aktywne pochodne PACAP i VIP o określonym działaniu receptorowym, mało wrażliwe na działanie proteaz ustrojowych i łatwo przechodzące przez bariery biologiczne, w tym przez barierę krew-mózg.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ABSOOD A, CHEN D, WANG ZY, HAKANSON R. Vascular effects of pituitary adenylate cyclase activating peptide: a comparison with vasoactive intestinal peptide. *Regul Pept* 1992; **40**: 323–329.
- [2] ADEGHATE E, PONERY AS, KÖVES K. Distribution of vasoactive intestinal polypeptide and its effect on glucagon secretion from normal and diabetic pancreatic tissue fragments in rat. *Ann N Y Acad Sci* 2000; **921**: 434–437.
- [3] ARIMURA A, SHIODA S. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptors: neuroendocrine and endocrine interaction. *Front Neuroendocrinol* 1995; **16**: 53–88.
- [4] ARIMURA A. Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. *Jpn J Physiol* 1998; **48**: 301–331.

- [5] BORBONI P, PORZIO O, PIERUCCI D, CICONI S, MAGNATERRA R, FEDERICI M, SESTI G, LAURO D, D'AGATA V, CAVALLARO S, MARLIER LN. Molecular and functional characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38)/vasoactive intestinal polypeptide receptors in pancreatic beta-cells and effects of PACAP-38 on components of the insulin secretory system. *Endocrinology* 1999; **140**: 5530–5537.
- [6] BRUCHL, BYCHKOV R, KÄSTNER A, BÜLOW T, RIED C, GOLLASCH M, BAUMANN G, LUFT FC, HALLER H. Pituitary adenylate-cyclase-activating peptides relax human coronary arteries by activating K(ATP) and K(Ca) channels in smooth muscle cells. *J Vasc Res* 1997; **34**: 11–18.
- [7] BUSTO R, PRIETO JC, BODEGA G, ZAPATERO J, CARRERO I. Immunohistochemical localization and distribution of VIP/PACAP receptors in human lung. *Peptides* 2000; **21**: 265–269.
- [8] CAO YJ, GIMPL G, FAHRENHOLZ F. A mutation in the second intracellular loop of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type I receptor confers constitutive receptor activation. *FEBS Lett* 2000; **469**: 142–146.
- [9] CHEN W, INUI T, HACHIYA T, OCHI Y, NAKAJIMA Y, KAJITA Y. Stimulatory action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on thyroid gland. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **194**: 923–929.
- [10] DANIEL PB, KIEFFER TJ, LEECH CA, HABENER JF. Novel alternatively spliced exon in the extracellular ligand-binding domain of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) type I receptor (PAC1R) selectively increases ligand affinity and alters signal transduction coupling during spermatogenesis. *J Biol Chem* 2001; **276**: 12938–12944.
- [11] DAUTZENBERG FM, HAUGER RL. G-protein-coupled receptor kinase 3- and protein kinase C-mediated desensitization of the PACAP receptor type I in human Y-79 retinoblastoma cells. *Neuropharmacology* 2001; **40**: 394–407.
- [12] DELGADO M, MARTINEZ C, POZO D, CALVO JR, LECETA J, GANEA D, GOMARIZ RP. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activation polypeptide (PACAP) protect mice from lethal endotoxemia through the inhibition of TNF-alpha and IL-6. *J Immunol* 1999; **162**: 1200–1205.
- [13] DELGADO M, MUNOZ-ELIAS EJ, GOMARIZ RP, GANEA D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide enhance IL-10 production by murine macrophages: *in vitro* and *in vivo* studies. *J Immunol* 1999; **162**: 1707–1716.
- [14] DU K, NICOLE P, COUVINEAU A, LABURTHE M. Aspartate 196 in the first extracellular loop of the human VIP1 receptor is essential for VIP binding and VIP-stimulated cAMP production. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **230**: 289–292.
- [15] EKBLAD E, EKELUND M, SUNDLER F. Relaxant responses of VIP and PACAP in rat ileum: receptors and adaptive supersensitivity. *Ann NY Acad Sci* 1998; **865**: 393–396.
- [16] EKBLAD E, JONGSMA H, BRABET P, BOCKAERT J, SUNDLER F. Characterization of intestinal receptors for VIP and PACAP in rat and in PAC1 receptor knockout mouse. *Ann NY Acad Sci* 2000; **921**: 137–147.
- [17] FAHRENKRUG J, HANNIBAL J. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide innervation of the rat female reproductive tract and the associated paracervical ganglia: effect of capsaicin. *Neuroscience* 1996; **73**: 1049–1060.
- [18] FERGUSON SSG. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 2001; **53**: 1–24.
- [19] FERRI GL, ADRIAN TE, ALLEN JM, SOIMERO L, CANCELLIERI A, YEATS JC, BLANK M, POLAK JM, BLOOM SR. Intramural distribution of regulatory peptides in the sigmoid-recto-anal region of the human gut. *Gut* 1988; **29**: 762–768.
- [20] FERRI GL, ADRIAN TE, SOIMERO L, BLANK M, CAVALLI D, BILIOTTI G, POLAK JM, BLOOM SR. Intramural distribution of immunoreactive vasoactive intestinal polypeptide (VIP), substance P, somatostatin and mammalian bombesin in the oesophago-gastro-pyloric region of the human gut. *Cell Tissue Res* 1989; **256**: 191–197.
- [21] FILIPSSON K, TORNOE K, HOLST J, AHRÉN B. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates insulin and glucagon secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 3093–3098.
- [22] FINK T, WEIHE E. Multiple neuropeptides in nerves supplying mammalian lymph nodes: messenger candidates for sensory and autonomic neuroimmunomodulation? *Neurosci Lett* 1988; **90**: 39–44.
- [23] FUKUSHIMA Y, HIKICHI H, MIZUKAMI K, NAGAYAMA T, YOSHIDA M, SUZUKI-KUSABA M, HISA H, KIMURA T, SATOH S. Role of endogenous PACAP in catecholamine secretion from the rat adrenal gland. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; **281**: R1562–R1567.

- [24] GAUDIN P, COUVINEAU A, ROUYER-FESSARD C, MAORET JJ, LABURTHE M. The human vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase activating peptide receptor 1 (VPAC1): constitutive activation by mutations at threonine 343. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **254**: 15–20.
- [25] GAUDIN P, MAORET JJ, COUVINEAU A, ROUYER-FESSARD C, LABURTHE M. Constitutive activation of the human vasoactive intestinal peptide 1 receptor, a member of the new class II family of G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 1998; **273**: 4990–4996.
- [26] GOTTSCHALL PE, TATSUNO I, ARIMURA A. Hypothalamic binding sites for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: characterization and molecular identification. *FASEB J* 1991; **5**: 194–199.
- [27] GOURLET P, DE NEEF P, CNUDE J, WAELEBROECK M, ROBBERECHT P. *In vitro* properties of a high affinity selective antagonist of the VIP1 receptor. *Peptides* 1997; **18**: 1555–1560.
- [28] GOURLET P, VANDERMEERS A, VERTONGEN P, RATHE J, DE NEEF P, CNUDE J, WAELEBROECK M, ROBBERECHT P. Development of high affinity selective VIP1 receptor agonists. *Peptides* 1997; **18**: 1539–1545.
- [29] GOURLET P, VERTONGEN P, VANDERMEERS A, VANDERMEERS-PIRET MC, RATHE J, DE NEEF P, WAELEBROECK M, ROBBERECHT P. The long-acting vasoactive intestinal polypeptide agonist RO 25-1553 is highly selective of the VIP2 receptor subclass. *Peptides* 1997; **18**: 403–408.
- [30] GOZES I, BARDEA A, RESHEF A, ZAMOSTIANO R, ZHUKOVSKY S, RUBINRAUT S, FRIDKIN M, BRENNEMAN DE. Neuroprotective strategy for Alzheimer disease: intranasal administration of a fatty neuropeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 427–432.
- [31] GOZES I, BRENNEMAN DE. A new concept in the pharmacology of neuroprotection. *J Mol Neurosci* 2000; **14**: 61–68.
- [32] GOZES I, BRENNEMAN DE. VIP: molecular biology and neurobiological function. *Mol Neurobiol* 1989; **3**: 201–236.
- [33] GOZES I, FRIDKIN M, BRENNEMAN DE. A VIP hybrid antagonist: from developmental neurobiology to clinical applications. *Cell Mol Neurobiol* 1995; **15**: 675–687.
- [34] GOZES I, FRIDKIN M, HILL JM, BRENNEMAN DE. Pharmaceutical VIP: prospects and problems. *Curr Med Chem* 1999; **6**: 1019–1034.
- [35] GOZES I, ZAMOSTIANO R, PINHASOV A, BASSAN M, GILADIE, STEINGART RA, BRENNEMAN DE. A novel VIP responsive gene. Activity dependent neuroprotective protein. *Ann NY Acad Sci* 2000; **921**: 115–118.
- [36] GOZES I. Neuroprotective peptide drug delivery and development: potential new therapeutics. *Trends Neurosci* 2001; **24**: 700–705.
- [37] GRÄS S, HANNIBAL J, FAHRENKRUG J. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is an auto/paracrine stimulator of acute progesterone accumulation and subsequent luteinization in cultured periovulatory granulosa/lutein cells. *Endocrinology* 1999; **140**: 2199–2205.
- [38] GRAY SL, CUMMINGS KJ, JIRIK FR, SHERWOOD NM. Targeted disruption of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene results in early postnatal death associated with dysfunction of lipid and carbohydrate metabolism. *Mol Endocrinol* 2001; **15**: 1739–1747.
- [39] GRESSENS P, BESSE L, ROBBERECHT P, GOZES I, FRIDKIN M, EVRARD P. Neuroprotection of the developing brain by systemic administration of vasoactive intestinal peptide derivatives. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; **288**: 1207–1213.
- [40] GRESSENS P, PAINDAVEINE B, HILL JM, BRENNEMAN DE, EVRARD P. Growth factor properties of VIP during early brain development. Whole embryo culture and *in vivo* studies. *Ann NY Acad Sci* 1997; **814**: 152–160.
- [41] GRINEVICH V, FOURNIER A, PELLETIER G. Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on corticotropin-releasing hormone (CRH) gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res* 1997; **773**: 190–196.
- [42] HANNIBAL J, DING JM, CHEN D, FAHRENKRUG J, LARSEN PJ, GILLETTE MU, MIKKELSEN JD. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: a potential daytime regulator of the biological clock. *J Neurosci* 1997; **17**: 2637–2644.
- [43] HANNIBAL J, JAMEN F, NIELSEN HS, JOURNOT L, BRABET P, FAHRENKRUG J. Dissociation between light-induced phase shift of the circadian rhythm and clock gene expression in mice lacking the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type 1 receptor. *J Neurosci* 2001; **21**: 4883–4890.
- [44] HARMAR AJ, ARIMURA A, GOZES I, JOURNOT L, LABURTHE M, PISEGNA JR, RAWLINGS SR, ROBBERECHT P, SAID SI, SREEDHARAN SP, WANK SA, WASCHKE JA. International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacol Rev* 1998; **50**: 265–270.

- [45] HUANG M, SHIRAHASE H, RORSTAD OP. Comparative study of vascular relaxation and receptor binding by PACAP and VIP. *Peptides* 1993; **14**: 755–762.
- [46] JOURNOT L, SPENGLER D, PANTALONI C, DUMUIS A, SEBEN M, BOCKAERT J. The PACAP receptor: generation by alternative splicing of functional diversity among G protein-coupled receptors in nerve cells. *Semin Cell Biol* 1994; **5**: 263–272.
- [47] KAWAI K, YOKOTA C, OHASHI S, ISOBE K, SUZUKI S, NAKAI T, YAMASHITA K. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: effects on pancreatic-adrenal hormone secretion and glucose-lipid metabolism in normal conscious dogs. *Metabolism* 1994; **43**: 739–744.
- [48] KLIMASCHEWSKI L. VIP – a „very important peptide” in the sympathetic nervous system? *Anat Embryol (Berl)* 1997; **196**: 269–277.
- [49] KOPP M, MEISSEL H, KORF HW. The pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-induced phosphorylation of the transcription factor CREB in the rat suprachiasmatic nucleus is inhibited by melatonin. *Neurosci Lett* 1997; **227**: 145–148.
- [50] LAITINEN A, PARTANEN M, HERVONEN A, PELTO-HUIKKO M, LAITINEN LA. VIP like immunoreactive nerves in human respiratory tract. Light and electron microscopic study. *Histochemistry* 1985; **82**: 313–319.
- [51] LAMOUCHE S, MARTINEAU D, YAMAGUCHI N. Modulation of adrenal catecholamine release by PACAP *in vivo*. *Am J Physiol* 1999; **276**: R162–R170.
- [52] LÄUFFER JM, MODLIN IM, HINOUE T, KIDD M, ZHANG T, SCHMID SW, TANG LH. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modulates gastric enterochromaffin-like cell proliferation in rats. *Gastroenterology* 1999; **116**: 623–635.
- [53] LI S, GRINEVICH V, FOURNIER A, PELLETIER G. Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on gonadotropin-releasing hormone and somatostatin gene expression in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1996; **41**: 157–162.
- [54] LINS L, COUVINEAU A, ROUYER-FESSARD C, NICOLE P, MAOURET JJ, BENHAMED M, BRASSEUR R, THOMAS A, LABURTHE M. The human VPAC1 receptor: three-dimensional model and mutagenesis of the N-terminal domain. *J Biol Chem* 2001; **276**: 10153–10160.
- [55] LISSBRANT E, COLLIN O, BERGH A. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP): effects on blood flow in the testis and caput epididymidis of the rat. *J Androl* 1999; **20**: 366–374.
- [56] LUTZ EM, SHEN S, MACKAY M, WEST K, HARMAR AJ. Structure of the human VIPR2 gene for vasoactive intestinal peptide receptor type 2. *FEBS Lett* 1999; **458**: 197–203.
- [57] MACKENZIE CJ, LUTZ EM, MCCULLOCH DA, MITCHELL R, HARMAR AJ. Phospholipase C activation by VIP1 and VIP2 receptors expressed in COS 7 cells involves a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Ann NY Acad Sci* 1996; **805**: 579–584.
- [58] MAZZOCCHI G, MALENDOWICZ LK, REBUFFAT P, GOTTARDO L, NUSSDORFER GG. Expression and function of vasoactive intestinal peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, and their receptors in the human adrenal gland. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; **87**: 2575–2580.
- [59] MCCULLOCH DA, LUTZ EM, JOHNSON MS, MACKENZIE CJ, MITCHELL R. Differential activation of phospholipase D by VPAC and PAC1 receptors. *Ann NY Acad Sci* 2000; **921**: 175–185.
- [60] MCDONALD TP, DINNIS DM, MORRISON CF, HARMAR AJ. Desensitization of the human vasoactive intestinal peptide receptor (hVIP2/PACAPR): evidence for agonist-induced receptor phosphorylation and internalization. *Ann NY Acad Sci* 1998; **865**: 64–72.
- [61] MCRORY JE, PARKER RL, SHERWOOD NM. Expression and alternative processing of a chicken gene encoding both growth hormone-releasing hormone and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *DNA Cell Biol* 1997; **16**: 95–102.
- [62] MORENO D, GOURLET P, DE NEEF P, CNUDE J, WAELBROECK M, ROBBERECHT P. Development of selective agonists and antagonists for the human vasoactive intestinal polypeptide VPAC(2) receptor. *Peptides* 2000; **21**: 1543–1549.
- [63] MORIO H, TATSUNO I, TANAKA T, UCHIDA D, HIRAI A, TAMURA Y, SAITO Y. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is a neurotrophic factor for cultured rat cortical neurons. *Ann NY Acad Sci* 1996; **805**: 476–481.
- [64] MORO O, LERNER EA. Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist. *J Biol Chem* 1997; **272**: 966–970.



- [65] NIELSEN HS, HANNIBAL J, KNUDSEN SM, FAHRENKRUG J. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces *period1* and *period2* gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus during late night. *Neuroscience* 2001; **103**: 433–441.
- [66] NIEWIADOMSKI P, NOWAK JZ, SĘDKOWSKA P, ZAWILSKA JB. Rapid desensitization of receptors for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in chick cerebral cortex. *Pol J Pharmacol* 2002; **54**: 717–721.
- [67] NOGI H, HASHIMOTO H, FUJITA T, HAGIHARA N, MATSUDA T, BABA A. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor mRNA in the rat adrenal gland: localization by *in situ* hybridization and identification of splice variants. *Jpn J Pharmacol* 1997; **75**: 203–207.
- [68] NOWAK JZ, KUBA K, ZAWILSKA JB. Stimulatory effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on cyclic AMP formation in the hypothalamus and cerebral cortex of four avians and rat. *Pol J Pharmacol* 1999; **51**: 87–91.
- [69] NOWAK JZ, KUBA K, ZAWILSKA JB. PACAP-induced formation of cyclic AMP in the chicken brain: regional variations and the effect of melatonin. *Brain Res* 1999; **830**: 195–199.
- [70] NOWAK JZ, DEJDA A, ZAWILSKA JB. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal peptide (VIP) activate protein kinase C in chick cerebral cortex. *Pol J Pharmacol* 2001; **53**: 695–699.
- [71] NOWAK JZ, PIĞUŁOWSKA A, KUBA K, ZAWILSKA JB. Stimulatory effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on inositol phosphates accumulation in avian cerebral cortex and hypothalamus. *Neurosci Lett* 2002; **323**: 179–182.
- [72] NOWAK JZ, ZAWILSKA JB. PACAP in avians: origin, occurrence, and receptors – pharmacological and functional considerations. *Curr Pharm Des* 2003; **9**: 467–481.
- [73] NUSSDORFER GG, MALENDOWICZ LK. Role of VIP, PACAP, and related peptides in the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Peptides* 1998; **19**: 1443–1467.
- [74] OFFEN D, SHERKI Y, MELAMED E, FRIDKIN M, BRENNEMAN DE, GOZES I. Vasoactive intestinal peptide (VIP) prevents neurotoxicity in neuronal cultures: relevance to neuroprotection in Parkinson's disease. *Brain Res* 2000; **854**: 257–262.
- [75] PARK SY, CHOI HJ, HWANG O. Regulation of basal expression of catecholamine-synthesizing enzyme genes by PACAP. *Mol Cells* 1999; **9**: 146–151.
- [76] PISEGNA JR, LYU RM, GERMANO PM. Essential structural motif in the C-terminus of the PACAP type I receptor for signal transduction and internalization. *Ann NY Acad Sci* 2000; **921**: 195–201.
- [77] POZO D, DELGADO M, MARTINEZ C, GOMARIZ RP, GUERRERO JM, CALVO JR. Functional characterization and mRNA expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) type I receptors in rat peritoneal macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1997; **1359**: 250–262.
- [78] PRATT BL, TAKAHASHI JS. Vasoactive intestinal polypeptide and alpha 2-adrenoceptor agonists regulate adenosine 3',5'-monophosphate accumulation and melatonin release in chick pineal cell cultures. *Endocrinology* 1989; **125**: 2375–2384.
- [79] RAWLINGS SR, HEZAREH M. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and PACAP/vasoactive intestinal polypeptide receptors: actions on the anterior pituitary gland. *Endocr Rev* 1996; **17**: 4–29.
- [80] ROBBERECHT P, GOURLET P, DE NEEF P, WOUSSEN-COLLE MC, VANDERMEERS-PIRET MC, VANDERMEERS A, CHRISTOPHE J. Structural requirements for the occupancy of pituitary adenylate-cyclase-activating-peptide (PACAP) receptors and adenylate cyclase activation in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes. Discovery of PACAP(6-38) as a potent antagonist. *Eur J Biochem* 1992; **207**: 239–246.
- [81] ROBBERECHT P, GOURLET P, DE NEEF P, WOUSSEN-COLLE MC, VANDERMEERS-PIRET MC, VANDERMEERS A, CHRISTOPHE J. Receptor occupancy and adenylate cyclase activation in AR 4-2J rat pancreatic acinar cell membranes by analogs of pituitary adenylate cyclase-activating peptides amino-terminally shortened or modified at position 1, 2, 3, 20, or 21. *Mol Pharmacol* 1992; **42**: 347–355.
- [82] ROSSATO M, NOGARA A, GOTTARDELLO F, BORDON P, FORESTA C. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide stimulates rat Leydig cell steroidogenesis through a novel transduction pathway. *Endocrinology* 1997; **138**: 3228–3235.

- [83] SAID SI, BERISHA HI, PAKBAZ H. N-methyl-D-aspartate receptors outside the central nervous system: activation causes acute lung injury that is mediated by nitric oxide synthesis and prevented by vasoactive intestinal peptide. *Neuroscience* 1995; **65**: 943–946.
- [84] SAID SI, DICKMAN K, DEY RD, BANDYOPADHYAY A, DE STEFANIS P, RAZA S, PAKBAZ H, BERISHA HI. Glutamate toxicity in the lung and neuronal cells: prevention or attenuation by VIP and PACAP. *Ann NY Acad Sci* 1998; **865**: 226–237.
- [85] SAMSON WK, SAID SI, MCCANN SM. Radioimmunologic localization of vasoactive intestinal polypeptide in hypothalamic and extrahypothalamic sites in the rat brain. *Neurosci Lett* 1979; **12**: 265–269.
- [86] SANDVIK AK, CUI G, BAKKE I, MUNKVOLD B, WALDUM HL. PACAP stimulates gastric acid secretion in the rat by inducing histamine release. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; **281**: G997–G1003.
- [87] SCHEBALIN M, SAID SI, MAKHLOUF GM. Stimulation of insulin and glucagon secretion by vasoactive intestinal peptide. *Am J Physiol* 1977; **232**: E197–E200.
- [88] SEKI T, SHIODA S, OGINO D, NAKAI Y, ARIMURA A, KOIDE R. Distribution and ultrastructural localization of a receptor for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its mRNA in the rat retina. *Neurosci Lett* 1997; **238**: 127–130.
- [89] SHERWOOD NM, KRUECKL SL, MCRORY JE. The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocr Rev* 2000; **21**: 619–670.
- [90] SHETZLINE MA, WALKER JKL, VALENZANO KJ, PREMONT RT. Vasoactive intestinal polypeptide type-1 receptor regulation. *J Biol Chem* 2002; **277**: 25519–25526.
- [91] SHINTANI N, HASHIMOTO H, KUNUGI A, KOYAMA Y, YAMAMOTO K, TOMIMOTO S, MORI W, MATSUDA T, BABA A. Desensitization, surface expression, and glycosylation of a functional, epitope-tagged type I PACAP (PAC ) receptor. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1509**: 195–202.
- [92] SHIODA S, SHUTO Y, SOMOGYVARI-VIGH A, LEGRADI G, ONDA H, COY DH, NAKAJO S, ARIMURA A. Localization and gene expression of the receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the rat brain. *Neurosci Res* 1997; **28**: 345–354.
- [93] SHOGE K, MISHIMA HK, SAITOH T, ISHIHARA K, TAMURA Y, SHIOMI H, SASA M. Attenuation by PACAP of glutamate-induced neurotoxicity in cultured retinal neurons. *Brain Res* 1999; **839**: 66–73.
- [94] SIMONNEAUX V, KIENLEN-CAMPARD P, LOEFFLER JP, BASILLE M, GONZALEZ BJ, VAUDRY H, ROBBERECHT P, PÉVET P. Pharmacological, molecular and functional characterization of vasoactive intestinal polypeptide/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors in the rat pineal gland. *Neuroscience* 1998; **85**: 887–896.
- [95] SORG O, MAGISTRETTI PJ. Vasoactive intestinal peptide and noradrenaline exert long-term control on glycogen levels in astrocytes: blockade by protein synthesis inhibition. *J Neurosci* 1992; **12**: 4923–4931.
- [96] SIMONNEAUX V, OUICHOU A, PÉVET P. Vasoactive intestinal peptide stimulates melatonin release from perfused pineal glands of rats. *J Neural Transm Gen Sect* 1990; **79**: 69–79.
- [97] TAKEI N, SKOGLÖSA Y, LINDHOLM D. Neurotrophic and neuroprotective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on mesencephalic dopaminergic neurons. *J Neurosci Res* 1998; **54**: 698–706.
- [98] TAKEI N, TORRES E, YUHARA A, JONGSMA H, OTTO C, KORHONEN L, ABIRU Y, SKOGLÖSA Y, SCHÜTZ G, HATANAKA H, SOFRONIEW MV, LINDHOLM D. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes the survival of basal forebrain cholinergic neurons *in vitro* and *in vivo*: comparison with effects of nerve growth factor. *Eur J Neurosci* 2000; **12**: 2273–2280.
- [99] TANG H, SUN L, XIN Z, GANEA D. Down-regulation of cytokine expression in murine lymphocytes by PACAP and VIP. *Ann NY Acad Sci* 1996; **805**: 768–778.
- [100] UCHIDA D, ARIMURA A, SOMOGYVÁRI-VIGH A, SHIODA S, BANKS WA. Prevention of ischemia-induced death of hippocampal neurons by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *Brain Res* 1996; **736**: 280–286.
- [101] UCHIDA D, TATSUNO I, TANAKA T, HIRAI A, SAITO Y, MORO O, TAJIMA M. Maxadilan is a specific agonist and its deleted peptide (M65) is a specific antagonist for PACAP type I receptor. *Ann NY Acad Sci* 1998; **865**: 253–258.
- [102] VAN RAMPPELBERGH J, POLOCZEK P, FRANÇOYS I, DELPORTE C, WINAND J, ROBBERECHT P, WAELBROECK M. The pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP I) and VIP (PACAP II VIP1) receptors stimulate inositol phosphate synthesis in transfected CHO cells through interaction with different G proteins. *Biochim Biophys Acta* 1997; **1357**: 249–255.

- [103] VANDERMEERS A, VANDENBORRE S, HOU X, DE NEEF P, ROBBERECHT P, VANDERMEERS-PIRET MC, CHRISTOPHE J. Antagonistic properties are shifted back to agonistic properties by further N-terminal shortening of pituitary adenylate-cyclase-activating peptides in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes. *Eur J Biochem* 1992; **208**: 815–819.
- [104] VAUDRY D, GONZALEZ BJ, BASILLE M, FOURNIER A, VAUDRY H. Neurotrophic activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on rat cerebellar cortex during development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 9415–9420.
- [105] VAUDRY D, GONZALEZ BJ, BASILLE M, YON L, FOURNIER A, VAUDRY H. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol Rev* 2000; **52**: 269–324.
- [106] VAUDRY D, PAMANTUNG TF, BASILLE M, ROUSSELLE C, FOURNIER A, VAUDRY H, BEAUVILLAIN JC, GONZALEZ BJ. PACAP protects cerebellar granule neurons against oxidative stress-induced apoptosis. *Eur J Neurosci* 2002; **15**: 1451–1460.
- [107] VAUDRY D, ROUSSELLE C, BASILLE M, FALLUEL-MOREL A, PAMANTUNG TF, FONTAINE M, FOURNIER A, VAUDRY H, GONZALEZ BJ. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat cerebellar granule neurons against ethanol-induced apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 6398–6403.
- [108] VERTONGEN P, SOLANO RM, PERRET J, LANGER I, ROBBERECHT P, WAELBROECK M. Mutational analysis of the human vasoactive intestinal peptide receptor subtype VPAC(2): role of basic residues in the second transmembrane helix. *Br J Pharmacol* 2001; **133**: 1249–1254.
- [109] WASCHEK JA. Multiple actions of pituitary adenylate cyclase activating peptide in nervous system development and regeneration. *Dev Neurosci* 2002; **24**: 14–23.
- [110] WEI Y, MOJSOV S. Tissue specific expression of different human receptor types for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide: implications for their role in human physiology. *J Neuroendocrinol* 1996; **8**: 811–817.
- [111] XIA M, SREEDHARAN SP, BOLIN DR, GAUFO GO, GOETZLEJ. Novel cyclic peptide agonist of high potency and selectivity for the type II vasoactive intestinal peptide receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; **281**: 629–633.
- [112] YAMAMOTO K, HASHIMOTO H, HAGIHARA N, NISHINO A, FUJITA T, MATSUDA T, BABA A. Cloning and characterization of the mouse pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene. *Gene* 1998; **211**: 63–69.
- [113] YOSHIHARA S, LINDÉN A, KASHIMOTO K, NAGANO Y, ICHIMURA T, NADEL JA. Long lasting smooth muscle relaxation by a novel PACAP analogue in guinea-pig and primate airways *in vitro*. *Br J Pharmacol* 1997; **121**: 1730–1734.
- [114] YUKIMASA N, ISOBE K, NAGAI H, TAKUWA Y, NAKAI T. Successive occupancy by immediate early transcriptional factors of the tyrosine hydroxylase gene TRE and CRE sites in PACAP-stimulated PC12 pheochromocytoma cells. *Neuropeptides* 1999; **33**: 475–482.
- [115] ZENG N, ATHMANN C, KANG T, LYU RM, WALSH JH, OHNING GV, SACHS G, PISEGNA JR. PACAP type I receptor activation regulates ECL cells and gastric acid secretion. *J Clin Invest* 1999; **104**: 1383–1391.
- [116] ZENG N, KANG T, LYU RM, WONG H, WEN Y, WALSH JH, SACHS G, PISEGNA JR. The pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type 1 receptor (PAC1-R) is expressed on gastric ECL cells: evidence by immunocytochemistry and RT-PCR. *Ann NY Acad Sci* 1998; **865**: 147–156.
- [117] ZHOU CJ, KIKUYAMA S, NAKAJO S, ARIMURA A, SHIODA S. Ontogeny of PACAP receptor and its splice variants in the rat brain. *Ann NY Acad Sci* 2000; **921**: 375–376.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 15.01.2002 r.

Przyjęto: 24.03.2003 r.

Uniwersytet Medyczny

90-950 Łódź 1, skryt. poczt. 225

email:jerzyn@amina1.zabpan.lodz.pl



## POLIMORFIZM GENU *CTLA-4*, KODUJĄCEGO ANTYGEN SUPRESOROWY – RYZIKO AUTOIMMUNIZACJI\*

SUPPRESSORY ANTIGEN *CTLA-4* GENE POLYMORPHISM –  
RISK OF AUTOIMMUNITY

Katarzyna SUWALSKA\*, Anna TUTAK\*, Irena FRYDECKA\*\*

\*Laboratorium Immunopatologii, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN;

\*\*Klinika Hematologii i Chorób Rozrostowych Krwi, Akademia Medyczna  
we Wrocławiu

*Streszczenie:* W pracy przedstawiono aktualny stan badań nad występowaniem najczęściej opisywanego polimorfizmu genu *CTLA-4* w pozycji 49 (G49A) w eksonie I w chorobach autoimmunizacyjnych. Omówiono krótko mechanizm negatywnej regulacji odpowiedzi odpornościowej, w której bierze udział antygen CTLA-4 (CD152). Przedstawiono strukturę genu *CTLA-4* oraz zamieszczono wyniki badań polimorfizmu tego genu w chorobie Addisona, cukrzycy insulino-zależnej typu I, chorobie Gravesa-Basedowa, chorobie Hashimoto oraz stwardnieniu rozsianym.

*Słowa kluczowe:* CTLA-4, CD152, limfocyty T, choroby autoimmunizacyjne, polimorfizm.

*Summary:* The actual state of study on the association between the most frequently reported the *CTLA-4* gene exon I G49A polymorphism with autoimmune diseases was described. The mechanism of the role of CTLA-4 (CD152) in negative regulation of immune response was briefly described. *CTLA-4* gene structure was presented. Critical evaluation of *CTLA-4* gene polymorphism in Addison's disease, insulin-dependent diabetes mellitus, Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis and multiple sclerosis was described.

*Key words:* CTLA-4, CD152, T lymphocytes, autoimmune diseases, polymorphism.

### WSTĘP

Zjawisko autoimmunizacji, to jest reaktywności immunologicznej skierowanej przeciwko własnym tkankom lub narządom, odgrywa istotną rolę w patogenezie uogólnionych i narządowych chorób autoimmunizacyjnych (toczeń rumieniowaty

\*Praca sponsorowana przez grant KBN 6 PO5B 120 21.

układowy, cukrzyca typu I, choroba Hashimoto, choroba Gravesa-Basedowa, choroba Addisona, stwardnienie rozsiane). Dowody na udział czynników genetycznych w tych schorzeniach pochodzą z badań nad zwiększeniem częstości ich wystąpienia w zależności od rodzaju antygeny czy allelu układu HLA [3, 42]. W ostatnich latach dużo prac poświęcono badaniom nad związkiem polimorfizmu genu kodującego antygen supresorowy CTLA-4 (*Cytotoxic T Lymphocytes Associated Antigen-4*) (antygen CD152), z ryzykiem zachorowania na schorzenia autoimmunizacyjne [2, 10-13, 15, 16, 21, 27-29, 34, 39, 40, 42, 44, 46, 48].

## MOLEKULARNE MECHANIZMY AKTYWACJI LIMFOCYTÓW T

Do zapoczątkowania odpowiedzi immunologicznej, zarówno humoralnej jak i komórkowej, wymagana jest prezentacja antygeny limfocytom T przez komórki prezentujące antygen APC (*Antigen Presenting Cells*). Strukturą limfocytu T rozpoznającą antygen jest receptor komórki T – TCR (*T Cell Receptor*). Funkcjonalny efekt stymulacji limfocytów T zależy od obecności sygnałów kostymulujących [5, 20, 33], co wymaga zaangażowania cząsteczek kostymulujących, z których najważniejszą rolę odgrywa cząsteczka (antygen) CD28 [4, 20, 33]. Brak dodatkowego sygnału stymulującego może prowadzić do braku odpowiedzi komórki na antygen, czyli anergii bądź apoptozy [20, 43]. Ligandami CD28 są cząsteczki z rodziny B7 (B7.1 i B7.2) obecne na komórkach APC [19, 20, 33].

Antygen CD28 występuje konstytutywnie na około 50% ludzkich limfocytów CD8 i na 95–100% limfocytów CD4 [18, 19]. Aktywacja antygeny CD28 wywołuje indukcję transkrypcji i stabilizację mRNA cytokin [35], a w następstwie wydzielanie IL-2, IFN- $\gamma$  oraz ekspresję ligandu CD40 [4, 20, 37, 45]. Zaangażowanie antygeny CD28 sprzyja przejściu komórek z fazy G0 do G1 cyklu komórkowego, co umożliwi proliferację limfocytów T [37, 38].

W utrzymaniu homeostazy limfocytów T biorą też udział mechanizmy negatywnej regulacji procesu aktywacji, w których kluczową rolę odgrywa glikoproteina CD152 – CTLA-4, pojawiająca się przejściowo na powierzchni aktywowanych limfocytów T [26, 36, 51]. Zgodnie z modelem zaproponowanym przez Chambers i wsp. [6], antygen CTLA-4 limfocytów T może pełnić dwie funkcje: na powierzchni komórek spoczynkowych uczestniczy w tworzeniu progno aktywacyjnego dla sygnałów płynących z receptora TCR i CD28, a tym samym przyczynia się do indukcji tolerancji obwodowej, natomiast na powierzchni stymulowanych limfocytów T antygen CTLA-4 uczestniczy w hamowaniu ich aktywności. Receptor CTLA-4 zapewnia więc utrzymanie odpowiedzi immunologicznej w dynamicznej równowadze przez wyhamowanie zarówno wstępnych, jak i końcowych etapów aktywacji limfocytów T. Dowodem na supresorowe działanie antygeny CTLA-4 są wyniki badań eksperymentalnych przeprowadzone na myszach z wyłączonym genem *CTLA-4*. Wykazano w nich, że zwierzęta ginęły w 3–4 tygodniu życia z powodu masywnej limfoproliferacji [7, 47, 52]. Ponadto zablokowanie tego

antygeny przeciwciałem anti-CTLA-4 nasila aktywację limfocytów, ich cytotoksyczność i prowadzi do regresji guzów nowotworowych indukowanych eksperymentalnie w modelach zwierzęcych [32, 49]. Na podstawie dotychczasowych badań nie można wykluczyć, że zjawiska autoimmunizacji mogą być wynikiem zaburzonej ekspresji antygeny CTLA-4.

## STRUKTURA I FUNKCJA BIAŁKA CTLA-4

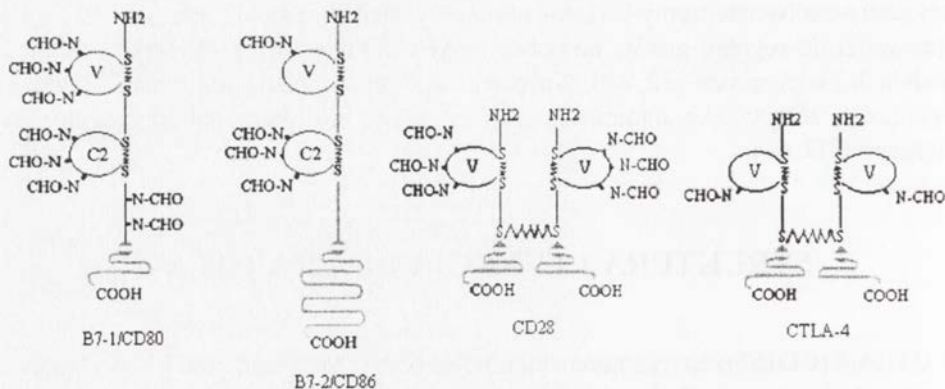
CTLA-4 (CD152) jest receptorem błonowym typu I (z zewnątrzkomórkowo położoną domeną N-końcową). Pod względem strukturalnym CTLA-4 jest glikozylowanym białkiem zaliczanym do nadrodziny immunoglobulin [36]. Białko CTLA-4 jest kodowane jako 223-aminokwasowy prekursor białkowy. Sekwencja sygnałowa (około 37 aminokwasów) jest wycinana podczas biosyntezy. Ostatecznie funkcjonalne białko składa się z części zewnątrzkomórkowej (zbudowanej ze 124 aminokwasów) – homologicznej do V-podobnej domeny immunoglobulin – i krótkiej domeny wewnątrzkomórkowej (36 aminokwasów), zakotwiczonej w błonie komórkowej krótkim, 26-aminokwasowym odcinkiem przezbłonowym [36].

Zarówno receptor CTLA-4, jak i CD28 są homodimerami. Na rysunku 1 przedstawiono ogólny schemat budowy antygeny supresorowego CTLA-4, kostymulującego CD28 oraz ich ligandów B7-1, B7-2 [19].

Szczególnie wysoki stopień podobieństwa domen zewnątrzkomórkowych CTLA-4 i CD28 decyduje o ich powinowactwie do tych samych ligandów B7 na komórkach prezentujących antygen (APC), zaś sekwencją o zasadniczym znaczeniu dla ich wiązania jest wysoce zachowawczy heksameryczny odcinek MYPPPY [41]. Stwierdzono jednak, że CTLA-4 przyłącza ligandy B7 za pośrednictwem sekwencji MYPPPY z 20–50-krotnie większym powinowactwem niż CD28 [38].

W obrębie populacji limfocytów T ekspresja antygeny CTLA-4 jest ograniczona do tych komórek, które mają na swojej powierzchni antygen CD28. Jednak pomimo homologii na poziomie genetycznym i strukturalnym oraz wiązania tych samych ligandów, antygeny CTLA-4 i CD28 charakteryzują się odmienną kinetyką ekspresji. W przeciwieństwie do receptora CD28, który jest stale obecny na powierzchni wszystkich mysich oraz większości ludzkich limfocytów T, CTLA-4 jest indukowany w trakcie stymulacji komórek T [33, 36], jakkolwiek pewna śladowa ekspresja tego receptora wykrywana jest również na spoczynkowych limfocytach T [50]. Maksymalna ekspresja CTLA-4 jest stosunkowo niewielka i stanowi zaledwie 2–3% maksymalnej ekspresji CD28 na powierzchni tej samej komórki [36, 51].

Ludzkie geny *CTLA-4* i *CD28* są blisko ze sobą związane. Są one rozdzielone jedynie przez łańcuch o długości od 25 do 150 kpz. Homologia między mysią i ludzką sekwencją genu *CTLA-4* wynosi 78%, homologia pomiędzy kodowanymi białkami sięga 74% na poziomie proteiny prekursorowej. Złożona homologia między genami *CTLA-4* i *CD28* oraz produktami białkowymi syntetyzowanymi podczas translacji u



RYCINA 1. Rodzina receptorów B7, CD28 i CTLA-4 [wg 19, zmodyfikowane]

myszy i człowieka, wyraźnie sugeruje, że oba geny są rezultatem duplikacji jednego genu [14, 30]. Sugeruje się, że duplikacja musiała nastąpić przed specjacją, czyli zróżnicowaniem się gatunków w toku ewolucji, ale stosunkowo niedawno, ze względu na zachowanie bardzo dużego podobieństwa obu kodowanych cząsteczek. Widoczne są jednakże różnice dotyczące sekwencji flankujących genu, sugerujące różne mechanizmy regulatorowe dla tych dwóch genów [14].

Czynnikiem indukującym transkrypcję genu *CTLA-4* jest stymulacja receptora TCR/CD3. Dodatkowe zaangażowanie kostymulującego antygeny CD28 lub dodatek egzogennej IL-2 wydatnie nasila procesy transkrypcyjne genu *CTLA-4*, a antygen CD28 dodatkowo wpływa na stabilizację mRNA dla CTLA-4 [36].

## STRUKTURA GENU *CTLA-4*

Ludzki gen *CTLA-4* umiejscowiony na chromosomie 2q33, funkcjonuje jako pojedyncza kopia haploidalnego genu i składa się z czterech eksonów [14, 21]. Schemat struktury chromosomu 2 przedstawiono na rysunku 2 [21]. Region 5' zawiera sekwencję kodującą promotorową, konserwatywną sekwencję ATG(Met), sygnał rozpoczynający translację, ramkę kodonu STOP oraz kasetę TATA. Sekwencja ludzkiego genu *CTLA-4* koduje dwa transkrypty o długościach 1,8 i 0,8 tysiąca par zasad, mające osobne miejsca poliadenylacji. Dłuższy transkrypt zawiera powtórzenia motywu AU [14].

W obrębie genu *CTLA-4* opisano kilka miejsc polimorficznych. Dostępne publikacje donoszą głównie o wynikach badań nad trzema miejscami polimorficznymi genu *CTLA-4*. Pierwszy polimorfizm został zidentyfikowany jako wielokrotne powtórzenie motywu AT w eksonie 4. Jest to tak zwany polimorfizm mikrosatelitarny, jedna z odmian VNTRS (ang. *Variable Number Tandem Repeat Sequences*). Z dostępnych publikacji wynika, że liczba powtórzeń wynosi średnio 23, przy czym możliwe jest występowanie od 7 do 30 powtórzeń, które rozpoczynają się od 642 pary zasad [31].

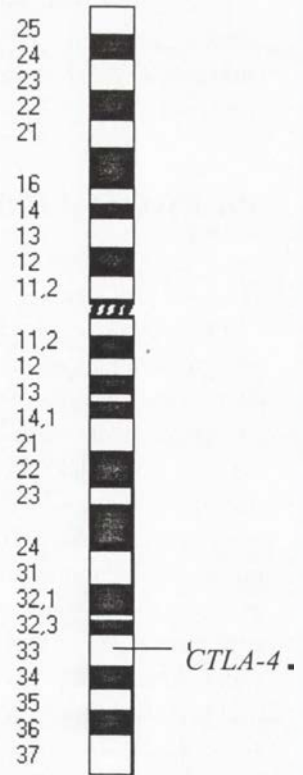


Drugi badany polimorfizm należy do typu RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) i dotyczy pozycji 49 w eksonie pierwszym (A49G). Substytucja jednego nukleotydu zawierającego adeninę (A) na nukleotyd zawierający guaninę (G) w kodonie 17 nici wiodącej powoduje wymianę aminokwasu z treoniny na alaninę w strukturze białka [28].

Trzeci polimorfizm został zidentyfikowany przez Deichmana i jego zespół [9]. Dotyczy on wymiany cytozyny na tyminę w pozycji -318(C-318T) w sekwencji promotorowej genu [9, 13]. Jedna z publikacji [40] donosi o zlokalizowaniu kolejnego miejsca polimorficznego (C159G) w eksonie 2. Na rysunku 3 przedstawiono schemat budowy genu *CTLA-4* z wyróżnieniem eksonów, intronów oraz zaznaczono dotychczas badane miejsca polimorficzne [34].

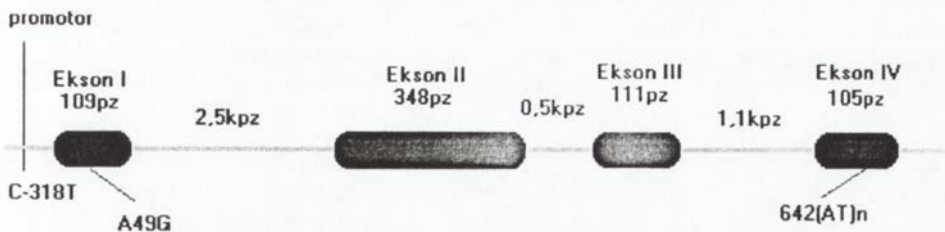
Badania ostatnich lat wykazały, że typ polimorfizmu genu *CTLA-4* może stanowić czynnik ryzyka zapadnięcia na choroby autoimmunologiczne [28]. Najwięcej badań dotyczy związku polimorfizmu genu *CTLA-4* w eksonie 1 w miejscu (A49G) z ryzykiem zachorowania na schorzenia o podłożu autoimmunizacyjnym.

Znaczenie biologiczne tego zjawiska nie jest do końca wyjaśnione. Kouki i wsp. [27] stwierdzili, że cząsteczka białka CTLA-4 kodowana przez gen *CTLA-4* z allelem G w miejscu 49 w eksonie 1 wykazuje mniejszą efektywność hamowania proliferacji aktywowanych limfocytów T niż cząsteczka determinowana przez gen z allelem A. Autorzy sugerują, że substytucja treoniny na alaninę w peptydzie liderowym może zmieniać zdolność przemieszczania się tego białka w komórce i w następstwie jego ekspresję powierzchniową.



2 chromosom

RYCINA 2. Struktura chromosomu 2 ze wskazaniem locus genu *CTLA-4* [wg 21, zmodyfikowane]



RYCINA 3. Schemat budowy genu *CTLA-4* [wg 34, zmodyfikowane]

Poniżej zamieszczono charakterystykę wybranych schorzeń oraz dane literaturowe dotyczące badań nad polimorfizmem tego genu w chorobie Addisona, Gravesa-Basedowa, Hashimoto, cukrzycy insulino-zależnej typu I oraz w stwardnieniu rozsianym.

## PIERWOTNA PRZEWLEKŁA NIEWYDOLNOŚĆ NADNERCZY – CHOROBA ADDISONA

Przyczyną tego schorzenia jest najczęściej proces autoimmunizacyjny (70% przypadków), którego efektem jest zanik kory nadnerczy. U większości chorych udaje się wykazać we krwi przeciwciała skierowane przeciw mikrosomom i mitochondriom ludzkiego nadnercza. Często współistnieje z innymi schorzeniami autoimmunizacyjnymi, takimi jak: choroba Hashimoto, niedokrwistość autoimmunologiczna, cukrzyca insulinozależna. Choroba Addisona może pojawiać się w każdym wieku i występuje nieznacznie częściej u kobiet niż u mężczyzn. W pierwotnej niedoczynności nadnerczy dochodzi do zaburzenia biosyntezy gliko- i mineralokortykosteroidów. Choroba może przebiegać bezobjawowo, jeśli chory nie jest ekspozowany na działanie silnego urazu, zakażenia, wysiłku fizycznego lub psychicznego. Natomiast objawy kliniczne to przede wszystkim: męczliwość, słabość mięśni, bóle mięśni, parestezje. Adymania może przybierać skrajne formy aż do porażen i osłabienia głosu. U chorego najczęściej stwierdzamy ciemną skórę spowodowaną gromadzeniem w niej melaniny [24].

Badania prowadzone w populacjach: brytyjskiej [48], niemieckiej [10] i kanadyjskiej [10] wykazały statystycznie istotną różnicę częstości występowania wybranej zasady (A lub G) w miejscu (A49G) w eksonie 1 między grupą chorych a grupą kontrolną (tab.1). Ogólnie znacznie częściej stwierdzano obecność guaniny w pozycji 49 u osób chorych w porównaniu z grupą kontrolną. Dane pozwalają na wyciągnięcie wniosku, iż kodowanie w miejscu 49 alaniny predysponuje do rozwoju choroby Addisona, natomiast kodowanie w tym miejscu treoniny zmniejsza ryzyko rozwoju choroby.

TABELA 1. Polimorfizm (A49G) genu *CTLA-4* u pacjentów z chorobą Addisona oraz w grupie kontrolnej

Grupa chorych N	Grupa kontrolna N	Badana populacja	Polimorfizm A49G w grupie chorych n (%)	Polimorfizm A49G w grupie zdrowych n (%)	Wartość P	Referencje
90	144	brytyjska	G/G 18(20) A/G 45(50) A/A 27(30)	G/G 19(13) A/G 58(40) A/A 67(47)	<0,04 <0,04 <0,04	48
76	466	niemiecka kanadyjska	G/G 14(18) A/G 39(52) A/A 23(30)	G/G 68(15) A/G 215(46) A/A 183(39)	<0,04 <0,04 <0,04	10

## CHOROBA GRAWESA-BASEDOWA

Patogeneza hipertyreozы w chorobie Gravesa-Basedowa jest spowodowana przeciwciałami TSI (*Thyroid Stimulating Immunoglobulin*), pobudzającymi receptory TSH (*Thyroid Stimulating Hormon*) w tyreocytach. U 75% chorych obecne są także objawy pozataarczycowe pod postacią oftalmopatii endokrynej, obrzęku przedgoleniowego, akropatii tarczycowej. Przyczynę defektu immunologicznego upatruje się w upośledzonej funkcji limfocytów T supresorowych. W tej sytuacji limfocyty T pomocnicze reagują ze specyficznym antygenem tarczycowym, pobudzając limfocyty B do wytwarzania przeciwciał TSI. Zaburzona funkcja limfocytów T wydaje się mieć podłoże genetyczne, gdyż choroba Gravesa-Basedowa występuje często rodzinnie i dziedziczona jest w sposób dominujący [22].

Związek polimorfizmu (A49G) z chorobą Gravesa-Basedowa badano w populacjach o różnym pochodzeniu (tab. 2). W populacjach pochodzenia kaukazydzalnego stwierdzono związek podatności na chorobę z obecnością nukleotydu G w pozycji 49.

TABELA 2. Polimorfizm (A49G) genu *CTLA-4* u pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa i w grupie kontrolnej

Liczba badanych pacjentów	Liczność grupy kontrolnej	Badana populacja	Polimorfizm A49G Liczba chorych (%)	Polimorfizm A49G Liczba zdrowych (%)	Wartość P	Referencje
196 109	325	niemiecka kanadyjska	G/G 63(21) A/G 161(53) A/A 81(26)	G/G 41(12) A/G 149(46) A/A 135(42)	0,0002 0,0002 0,0002	11
45	43	amerykańska	G/G 8(18) A/G 29(64) A/A 8(18)	G/G 5(12) A/G 23(53) A/A 15(35)	<0,05 <0,05 0,049*	27
379	363	brytyjska	G/G 65(17) A/G 192(51) A/A 122(32)	G/G 28(8) A/G 171(47) A/A 164(45)	<0,05 <0,05 <0,05	16
22	445	japońska	G/G 8(36) A/G 9(41) A/A 5(23)	G/G 177(40) A/G 207(46) A/A 61(14)	ns ns ns	1
112	425	japońska	G/G 57(51) A/G 44(39) A/A 11(10)	G/G 170(40) A/G 197(46) A/A 58(14)	ns ns ns	2
49	47	afro-amerykańska	G/G 4(8) A/G 25(51) A/A 20(41)	G/G 5(11) A/G 19(40) A/A 23(49)	ns ns ns	8

\* – wartość P na granicy istotności statystycznej

ns – brak istotności statystycznej

Asocjacja taka była bardzo wyraźna dla populacji niemieckiej [11] i kanadyjskiej [11], słabsza (na progu istotności statystycznej) dla populacji amerykańskiej [27], brytyjskiej [16]. Nie stwierdzono natomiast związku polimorfizmu genu *CTLA-4* z występowaniem choroby Gravesa-Basedowa w populacji japońskiej (orientalnej) [1, 2] i wśród Afroamerykanów [8].

## CHOROBA HASHIMOTO (WOLE LIMFOCYTARNE, AUTOIMMUNIZACYJNE ZAPALENIE TARCZYCY)

Wole Hashimoto jest przewlekłą chorobą tarczycy o podłożu autoimmunizacyjnym. Występuje głównie u kobiet w średnim wieku. W badaniu histologicznym tarczycy stwierdza się typowe nacieki limfocytarne. Istota choroby polega na wytwarzaniu przez organizm przeciwciał skierowanych przeciw antygenom, którymi są składniki gruczołu tarczycy. Stwierdza się wzrost miana przeciwciał antytyreoglobulinowych i antymikrosomalnych. W następstwie dochodzi do uszkodzenia struktury gruczołu, włóknienia, co prowadzi do niedoczynności tarczycy. U cierpiących na chorobę Hashimoto występują jednocześnie inne zaburzenia hormonalne o etiologii autoimmunologicznej, tj. choroba Addisona, niedoczynność przytarczyc czy cukrzyca [23].

Polimorfizm genu *CTLA-4* był badany w kilku populacjach, a wyniki przedstawione w tabeli 3 wskazują na pewien związek polimorfizmu genu i rozwoju choroby u Amerykanów [27], Niemców [10] i Kanadyjczyków [10]. W grupie chorych stwierdzono istotnie statystycznie wyższy odsetek osób homozygotycznych dla alaniny i heterozygotycznych dla alaniny i treoniny w stosunku do grupy kontrolnej. Dlatego można wnioskować, że występowanie allelu G jest czynnikiem ryzyka choroby Hashimoto. Natomiast u Włochów [42] i Japończyków [1, 2] nie wykazano znaczących różnic między grupą kontrolną a grupą chorych.

## CUKRZYCA INSULINOZALEŻNA TYPU I

Cukrzyca insulinozależna typu I (IDDM – *Insulin-Dependent Diabetes Mellitus*) stanowi 10–15% wszystkich przypadków cukrzycy i dotyka 0,4% populacji Europejczyków rasy białej. Decydującym przejawem tej choroby uwarunkowanej genetycznie jest zniszczenie komórek *beta* wysp trzustkowych i w następstwie niedobór insuliny. W roli antygeny może wystąpić insulina lub antygeny obecne na komórkach *beta*. Spośród nich określono bliżej białko będące antygenem enzymu dekarboksylazy kwasu glutaminowego (GAD). Ekspresja tych antygenów wywołuje u osób do tego predysponowanych reakcję autoagresji typu komórkowego z nacieczeniem wysp przez limfocyty cytotoksyczne i pomocnicze oraz makrofagi, zwiększoną produkcję cytokin, indukcję reakcji cytotoksycznych i cytolytycznych uszkadzających komórki oraz zwłóknienie tkanki trzustki. Ponadto u tych chorych stwierdza się obecność przeciwciał

TABELA 3. Polimorfizm (A49G) genu *CTLA-4* u pacjentów z chorobą Hashimoto oraz w grupie kontrolnej

Liczba badanych pacjentów	Liczność grupy kontrolnej	Badana populacja	Polimorfizm A49G Liczba chorych (%)	Polimorfizm A49G Liczba zdrowych (%)	Wartość P	Referencje
18	43	amerykańska	G/G 3(17) A/G 8(44) A/A 7(39)	G/G 5(12) A/G 23(53) A/A 15(35)	<0,05 <0,05 <0,05	27
73	466	kanadyjska niemiecka	G/G 16(22) A/G 39(53) A/A 18(25)	G/G 68(15) A/G 215(46) A/A 183(39)	<0,04 <0,04 <0,04	10
126	301	włoska	G/G 16(13) A/G 52(41) A/A 58(46)	G/G 25(8) A/G 138(46) A/A 138(46)	ns ns ns	42
41	445	japońska	G/G 18(45) A/G 17(42) A/A 6(13)	G/G 177(40) A/G 207(46) A/A 61(14)	ns ns ns	1
88	425	japońska	G/G 45(51) A/G 37(42) A/A 6(7)	G/G 217(51) A/G 179(42) A/A 29(7)	ns ns ns	2

ns – brak istotności statystycznej

przeciwwyspowych uszkodzających komórki *beta* [25]. W ostatnich latach wiele prac poświęcono badaniu polimorfizmu genu supresorowego *CTLA-4* z ryzykiem zachorowania na cukrzycę typu I [1, 2, 11, 15, 29, 39, 40, 46].

Dostępne publikacje (tab. 4) pozwalają stwierdzić, że zapadalność na IDDM jest związana z polimorfizmem (G49A) genu *CTLA-4* u Niemców [11], Kanadyjczyków [11], Polaków [29] i Chińczyków [40]. Dla tych grup allele *CTLA-4* typu (G49G), czyli homozygotyczność dla G lub obecność allelu G, podwyższają ryzyko zachorowania na cukrzycę insulinozależną typu I. Nie wykazano statystycznie znaczących różnic w populacji Afrykanów Zachodnich [40] i Japończyków [1, 2, 15, 46]. W roku 1996 Nisticin i wsp. [39] wykazali istotny statystycznie wpływ polimorfizmu *CTLA-4* na rozwój choroby u Belgów. Stwierdzili oni wyższą frekwencję allelu G u osób chorych, gdzie kontrolą była grupa włoska i hiszpańska. Natomiast nie wykazano takiej zależności w populacjach amerykańskiej i angielskiej. Sugeruje to istnienie odmienności genetycznych pomiędzy różnymi grupami etnicznymi.

TABELA 4. Polimorfizm (A49G) genu *CTLA-4* u pacjentów chorych na cukrzycę insulino-zależną i w grupie kontrolnej

Grupa chorych N	Grupa kontrolna N	Badana populacja	Polimorfizm A49G w grupie chorych n (%)	Polimorfizm A49G w grupie zdrowych n (%)	Wartość P	Referencje
293	325	niemiecka kanadyjska	G/G 55(19) A/G 147(50) A/A 91(31)	G/G 41(13) A/G 149(46) A/A 135(42)	0,01 0,01 0,01	11
74	107	japońska	G/G 33(45) A/G 25(34) A/A 16(22)	G/G 30(28) A/G 43(40) A/A 34(32)	0,016 0,016 0,016	46
111	445	japońska	G/G 50(45) A/G 45(41) A/A 16(14)	G/G 177(40) A/G 207(46) A/A 61(14)	ns ns ns	1
173	425	japońska	G/G 72(42) A/G 80(46) A/A 21(12)	G/G 170(40,0) A/G 197(46,4) A/A 58(13,6)	ns ns ns	2
192	136	polska	G/G 37(19) A/G 95(50) A/A 60(31)	G/G 21(15) A/G 76(56) A/A 39(29)	ns ns 0,002	29
117	141	japońska	G/G 54(46) A/G 42(36) A/A 21(18)	G/G 72(51) A/G 47(33) A/A 22(16)	ns ns ns	15
350	420	chińska	G/G 74(21) A/G 166(48) A/A 110(31)	G/G 42(10) A/G 177(42) A/A 201(48)	<0,001 <0,001 <0,001	40
182	201	afrykańska	G/G 9(5) A/G 67(37) A/A 106(58)	G/G 11(6) A/G 61(30) A/A 129(64)	ns ns ns	40

ns – brak istotności statystycznej

## STWARDNIENIE ROZSIANE

Stwardnienie rozsiane (MS – *Multiple Sclerosis*) jest demielizacyjnym schorzeniem ośrodkowego układu nerwowego. Przebieg kliniczny w początkowym okresie charakteryzuje się powtarzającymi się okresami zaostrzeń (rzutów) i remisji. Po około 10–15 latach choroba przechodzi w postać wtórnie postępującą, charakteryzującą się stopniowym narastaniem deficytu neurologicznego. Około 10–15% przypadków stwardnienia rozsianego przybiera postać schorzenia pierwotnie postępującego. W etiopatogenezie bierze się pod uwagę zaburzenia odporności komórkowej. Obecne we

TABELA 5. Polimorfizm (A49G) genu *CTLA-4* u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym i w grupie kontrolnej

Grupa chorych N	Grupa kontrolna N	Badana populacja	Polimorfizm A49G w grupie chorych n (%)	Polimorfizm A49G w grupie zdrowych n (%)	Wartość P	Referencje
74	93	japońska	G/G 29(39) A/G 36(49) A/A 9(12)	G/G 38(41) A/G 38(41) A/A 17(18)	ns ns ns	12
387	237	szwedzka	G/G 73(19) A/G 188(50) A/A 117(31)	G/G 5(10) A/G 28(55) A/A 18(35)	0,047* <0,05 <0,05	34
296	271	norweska	G/G 38(13) A/G 169(57) A/A 89(30)	G/G 56(21) A/G 119(44) A/A 95(35)	<0,05 <0,05 <0,05	13
84	125	duńska	G/G 17(20) A/G 39(47) A/A 28(33)	G/G 22(18) A/G 68(54) A/A 35(28)	ns ns ns	44
42	86	chińska (Szanghaj)	G/G 15(36) A/G 23(55) A/A 4(9)	G/G 45(52) A/G 34(40) A/A 7(8)	ns ns ns	44

\* – wartość P na granicy istotności statystycznej

ns – brak istotności statystycznej

krwi, potencjalnie autoreaktywne wobec antygenów mieliniowych limfocyty T ulegają aktywacji w procesie molekularnej mimikry lub w wyniku reakcji ze superantygenem. Nadmierna aktywacja tych limfocytów, przy braku prawidłowych mechanizmów supresji, umożliwia przejście aktywowanym, autoreaktywnym w stosunku do mieliny limfocytom T przez barierę krew-mózg. Wraz z tymi limfocytami przechodzą aktywowane, ale antygenowo nieswoiste limfocyty T oraz monocyty, prowadząc do rozwoju reakcji zapalnej i następnej demielinizacji. Zwiększona zapadalność na chorobę wśród członków rodziny wskazuje na możliwość udziału czynnika genetycznego w rozwoju tego schorzenia. Choroba ta występuje u 0,1% Europejczyków rasy białej i ma swój początek między 28 a 30 rokiem życia, nieco częściej u kobiet niż u mężczyzn i jest pięciokrotnie częstsza w umiarkowanej strefie klimatycznej niż w tropikalnej [17].

Według doniesień (tab. 5) wpływ polimorfizmu (G49A) jest statystycznie znaczący u Szwedów [34] i Norwegów [13]. W obu pracach wykazano wyraźnie większą częstość występowania allelu G u osób chorych. Daje to podstawy do stwierdzenia, iż obecność allelu G predysponuje do rozwoju tej choroby, a obecność allelu A przed nią chroni. Nie zauważono natomiast takiej korelacji u Japończyków [12], Chińczyków [44] i Duńczyków [44].

## PODSUMOWANIE

Związek zapadalności na choroby autoimmunologiczne w zależności od typu polimorfizmu genu *CTLA-4* jest zróżnicowany w zależności od badanej populacji. Oczywisty jest fakt, że wyjaśnienie roli *CTLA-4* w chorobach autoimmunizacyjnych wymaga przeprowadzenia większej liczby kompleksowych badań zarówno na modelach zwierzęcych, jak i na różnych populacjach ludzkich.

## LITERATURA

- [1] ABE T, TAKINO H, YAMASAKI H, OZAKI M, SERA Y, KONDO H, SAKAMAKI H, KAWASAKI E, AWATA T, YAMAGUCHI Y, EGUCHI K. *CTLA-4* gene polymorphism correlates with the mode of onset and presence of ICA512 Ab in Japanese type 1 diabetes. *Diab Res Clin Pract* 1999; **46**: 169–175.
- [2] AWATA T, KURIHARA S, IITAKA M, TAKEI S, INOUE I, ISHII C, NEGISHI K, IZUMIDA T, YOSHIDA Y, HAGURA R, KUZUYA N, KANAZAWA Y, KATAYAMA S. Association of *CTLA-4* gene A-G polymorphism (IDDM12 locus) with acute-onset and insulin-depleted IDDM as well as autoimmune thyroid disease (Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis) in the Japanese population. *Diabetes* 1998; **47**: 128–129.
- [3] BADENHOOP K, WALFISH PG., RAU H, FISHER S, NICOLAY A, BOGNER U, SCHLEUSENER H, USADEL KH. Susceptibility and resistance alleles of human leukocyte antigen (HLA) DQA1 and (HLA) DQB1 are shared in endocrine autoimmune disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; **80**: 2112–2117.
- [4] BOČKO D, KOSMACZEWSKA A, CISZAK L, TEODOROWSKA R, FRYDECKA I. CD28 costimulatory molecule – expression, structure and function. *Arch Immunol Ther Exp* 2002; **50**: 169–177.
- [5] BRETSCHER P. The two-signal model of lymphocyte activation twenty-one years later. *Immunol Today* 1992; **13**: 74–6.
- [6] CHAMBERS CA, KRUMMEL MF, BOITEL B, HURWITZ A, SULLIVAN TJ, FOUNIER S, CASSELL D, BRUNNER M., ALLISON JP. The role of *CTLA-4* in the regulation and initiation of T-cell responses. *Immunol Rev* 1996; **153**: 27–46.
- [7] CHAMBERS CA, SULLIVAN TJ, ALLISON JP. Lymphoproliferation in *CTLA-4* deficient mice is mediated by costimulation-dependent activation of CD4+ T cells. *Immunity* 1997; **7**: 885–895.
- [8] CHEN QY, NADELL D, ZHANG XY, KUKREJA A, HUANG YJ, WISE J, SVEC F, RICHARDS R, FRIDAY KE, VARGAS A, GOMEZ R, CHALEW S, LAN MS, TOMER Y, MACLAREN NK. The human leukocyte antigen HLA DRB3\*020/DQA1\*0501 haplotype is associated with Graves' disease in African Americans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; **85**: 1545–1549.
- [9] DEICHMAN K, HEINZMANN A, BRÜGGENOLTE E.: An Mse I RFLP in human *CTLA-4* promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **225**: 817–818.
- [10] DONNER H, BRAUN J, SEIDL C, RAU H, FINKE R, VENTZ M, WALFISH PG, USADEL KH, BADENHOOP K. Codon 17 polymorphism of the cytotoxic T lymphocyte antigen 4 gene *CTLA-4* in Hashimoto's Thyroiditis and Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 4130–4132.
- [11] DONNER H, RAU H, WALFISH PG, BRAUN J, THORSTEN S, FINKE R, HERWIG J, USADEL KH, BADENHOOP K. *CTLA-4* alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 143–146.
- [12] FUKAZAWA T, YANAGAWA T, KIKUCHI S, YABE I, SASAKI H., HAMADA T, MIYASAKA K, GOMI K, TASHIRO K. *CTLA-4* gene polymorphism may modulate disease in Japanese multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci* 1999; **171**: 49–55.
- [13] HARBO H, FLINSTAD C, GULOWSEN E, VARTDAL F. *CTLA-4* promoter and exon 1 dimorphisms in multiple sclerosis. *Tissue Antigens* 1999; **53**: 106–110.
- [14] HARPER K, BALZANO C, ROUVIER E, MATTEI M G, LUCIANI MF, GOLSTEIN P. *CTLA-4* and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *J Immunol* 1991; **147**: 1037–1044.



- [15] HAYASHI H, KUSAKA I, NAGASAKA S, KAWAKAMI A, ROKKAKU K, NAKAMURA T, SAITO T, HIGASHIYAMA M, HONDA K, ISHIKAWA S, SAITO T. Association of CTLA-4 polymorphism with positive anti-GAD antibody in Japanese subjects with type 1 diabetes mellitus. *Clin Endocrinol* 1999; **51**: 793–799.
- [16] HEWARD JM, ALLAHABADIA A, ARMITAGE M, HATTERSLEY A, DODSON PM, MACLEOD K, CARR-SMITH J, DAYKIN J, DALY A, SHEPPARD MC, HOLDER RL, BARNETT AH, FRANKLYN JA, GOUGH CL. The development of Graves' disease and *CTLA-4* gene on chromosome 2q33. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; **84**: 2398–2401.
- [17] JANKOWICZ E. Choroby Demielizacyjne. [w] Kokot F. [red] Choroby Wewnętrzne. Warszawa: Wyd. Lekarskie PZWL 1996; **698**: 702–704.
- [18] JENKINS MK. The ups and downs of costimulation. *Immunity* 1994; **1**: 443–446.
- [19] JUNE CH, BLUESTONE JA, NADLER LM, THOMPSON CB. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today* 1994; **15**: 321–331.
- [20] JUNE CH, LEDBETTER JA, LINSLEY PS, THOMPSON CB. Role of the CD28 receptor in T-cell activation. *Immunol Today* 1990; **11**: 211–216.
- [21] KING A L, MOODIE S J, FRASER J S, CURTIS D, REID E, DEARLOVE A M, ELLIS H J, CICLITIRA P J. CTLA-4/CD28 gene region is associated with genetic susceptibility to coeliac disease in UK families. *J Med Genet* 2002; **39**: 51–54.
- [22] KOKOT F. Endokrynologia. [w] Kokot F. [red.] Choroby wewnętrzne. Warszawa: Wyd. Lekarskie PZWL 1996: 646.
- [23] KOKOT F. Endokrynologia. [w] Kokot F. [red.] Choroby wewnętrzne. Warszawa: Wyd. Lekarskie PZWL 1996: 649, 652, 674.
- [24] KOKOT F. Endokrynologia. [w] Kokot F. [red.] Choroby wewnętrzne. Warszawa: Wyd. Lekarskie PZWL 1996: 660–661, 674.
- [25] KOKOT F, TATOŃ J. Zaburzenia Przemiany Materii. [w] Kokot F. [red.] Choroby Wewnętrzne. Warszawa, Wyd. Lekarskie PZWL 1996: 698, 702–704.
- [26] KOSMACZEWSKA A, CISZAK L, BOĆKO D, FRYDECKA I. Expression and functional significance of CTLA-4, a negative regulator of T cell activation. *Arch Immunol Ther Exp* 2001; **49**: 39–46.
- [27] KOUKI T, SAWAI Y, GARDINE CA, FISFALEN M, ALEGRE M, DEGROOT L J. CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' disease. *J Immunol* 2000; **165**: 6606–6611.
- [28] KRISTIANSEN OP, LARSEN ZM, POCIOT F. CTLA-4 in autoimmune diseases – a general susceptibility gene to autoimmunity? *Genes and Immunity* 2000; **1**: 170–184.
- [29] KROKOWSKI M, BODALSKI J, BRATEK A, MACHEJKO P, CAILLAT-ZUCMAN S. *CTLA-4* gene polymorphism is associated with predisposition to IDDM in a population from central Poland. *Diabetes Metab* 1998; **24**: 241–243.
- [30] LAFAGE-POCHITALOFF MR, COSTELLO D, COUEZ J, SIMONETTI D, MANNONI C, MAWAS C, OLIVE D. Human CD28 and *CTLA-4*lg superfamily genes are located on chromosome 2 at bands q33–34. *Immunogenetics* 1990; **31**: 198–201.
- [31] LARSEN CP, RITCHI SC, PEARSON TC, LINSLEY PS, LOWRY RP. Functional expression of the costimulatory molecule, B7/BB1, on murine dendritic cell populations. *J Exp Med* 1992; **176**: 1215–1220.
- [32] LEACH DR, KRUMMEL MF, ALLISON JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 1996; **271**: 1734–1736.
- [33] LENSCHOW DJ, WALUNGS TL, BLUESTONE JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Ann Rev Immunol* 1996; **14**: 233–258.
- [34] LIGERS A, XU C, SAARINEN S, HILLERT J, OLERUP O. The *CTLA-4* gene is associated with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1999; **97**: 182–190.
- [35] LINDSTEN T, JUNE CH, LEDBETTER JA, STELLA G, THOMPSON CB. Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface mediated T cell activation pathway. *Science* 1989; **244**: 339–343.
- [36] LINDSTEN T, LEE KP, HARRIS ES, PETRYNIAK B, CRAIGHEAD N, REYNOLDS PJ, LOMBARD DB, FREEMAN GJ, NADLER LM, GRAY GS, THOMPSON CB, JUNE CH. Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T-cells. *J Immunol* 1993; **151**: 3489–3499.
- [37] MUELLER DL, JENKINS M K, SCHWARTZ RH. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signaling pathway determinates the outcome of T cell antigen 4 receptor occupancy. *Annu Rev Immunol* 1991; **7**: 445–480.

- [38] LINSLEY PS, GREENE JL, BRANDY W, BAJORATH J, LEDBETTER JA, PEACH R. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1994; **1**: 793–801.
- [39] NISTIC L, BUZZETTI R, PRITCHARD LE, VAN DER AUWERA B, GIOVANNINI C, BOSI E, LARRAD MT, RIOS MS, CHOW CC, COCKRAM CS, JACOBS K, MIJOVIC C, BAIN SC, BARNETT AH, VANDEWALLE CL, SCHUIT F, GORUS FK, TOSI R, POZZILLI P, TODD JA. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes Belgian. *Diabetes Registry. Human Molecular Genetics* 1996; **5**: 1075–1080.
- [40] OSEI-HYIAMAN D, HOU L, ZHIYIN R, ZHIMING Z, YU H, AMANKWAH AA, HARADA S. Association of a novel point mutation (C159G) of the *CTLA4* gene with type 1 diabetes in West Africans but not in Chinese. *Diabetes* 2001; **50**: 2169–2171.
- [41] PEACH RJ, BAJORATH J, BRADY W, LEYITZ G, GREENE J, NAEMURA J, LINSLEY PS. Complementarity determining region 1 (CDR1)- and (CDR3)-analogous regions in CTLA-4 and CD28 determine the binding to B7.1. *J Exp Med* 1994; **180**: 2049–2058.
- [42] PETRONE A, GIORGI G, MESTURINO CA, CAPIZZI M, CASCINO I, NISTIC L, OSBORN J, DI MARIO U, BUZZETTI R. Association of DRB1 04-DQB1 0301 haplotype and lack of association of two polymorphic sites at CTLA-4 gene with Hashimoto's thyroiditis in an Italian population. *Thyroid* 2001; **11**: 171–174.
- [43] RADVANYI LG, SHI Y, VAZIRI H. CD28 costimulation inhibits TCR-induced apoptosis during a primary T cell response. *J Immunol* 1996; **156**: 1788–1798.
- [44] RASMUSSEN HB, KELLY MA, FRANCIS DA, CLAUSEN J. CTLA-4 in multiple sclerosis. Lack of genetic association in a European Caucasian population but evidence of interaction with HLA-DR2 among Shanghai Chinese. *J Neurol Sciences* 2001; **184**: 143–147.
- [45] SEDER RA, GERMAIN RN, LINSLEY PS, PAUL WE. CD28-mediated costimulation of interleukin 2 (IL-2) production plays a critical role in T cell priming for IL-4 and interferon- $\gamma$  production. *J Exp Med* 1994; **179**: 299–303.
- [46] TAKARA M, KOMIJA I, KINJO Y, TOMOYOSE T, YAMASHIRO S, AKAMINE H, MASUDA M, TAKASU N. Association of *CTLA-4* gene A/G polymorphism in Japanese type 1 diabetic patients with younger age of onset and autoimmune thyroid disease. *Diabetes Care* 2000; **23**: 975–978.
- [47] TIVOL EA, BOYD SD, MCKEON S, BORRIELLO F, NICKERSON P, STOM TB, SHARPE AH. CTLA-4 Ig prevents lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction in *CTLA-4*-deficient mice. *J Immunol* 1997; **158**: 5091–5094.
- [48] VAIDYA B, GEATCH HR, PERROS P, BALL SG, BAYLIS PH, CARR D, HURREL SJ, JAMES RA, KELLY WF, KEMPEH, YOUNG ET, WEETMAN AP, KENDALL-TAYLOR P, PEARCE SHS. Association analysis of the cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) and autoimmune regulator-1 (AIRE-1) genes in sporadic autoimmune Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; **82**: 688–691.
- [49] VAN ELSASA, SUTMULLER RPM, HURWITZ AA, ZISKIN J, VILLASEOR J, MEDEMA JP, OVERWIJK WW, RESTIFO NP, MELIEF CJM., OFFRINGA R, ALLISON JP. Elucidating the autoimmune and antitumor effector mechanisms of a treatment based on cytotoxic T lymphocyte antigen-4 blockade in combination with a B16 melanoma vaccine: comparison of prophylaxis and therapy. *J Exp Med* 2001; **194**: 481–489.
- [50] WALUNAS TL, BAKKER CY, BLUESTONE JA. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J Exp Med* 1996; **183**, 2541–2550.
- [51] WALUNAS TL, LENSCHAW PJ, BAKKER CY, LINSLEY PS, FREEMAN GJ, GREEN JM, THOMPSON CB, BLUESTONE JA. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1994; **1**: 405–413.
- [52] WATERHOUSE P, PENNIGER JM, TIMMS E, WAKENAM A, SHAHINIAN A, LEE KP, THOMPSON CB, GRIESSER H, MAK T. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in *CTLA-4*. *Science* 1995; **270**: 985–988.

Redaktor prowadzący – Barbara Płytycz

Otrzymano: 22.10.2002 r.

Przyjęto: 10.04.2003 r.

Adres autora: ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław,

e-mail: frydecka@hemat.um.wroc.pl

# SYNTEZA I HYDROLIZA KONIUGATÓW HORMONÓW ROŚLINNYCH W REGULACJI POZIOMU AKTYWNYCH HORMONÓW

## SYNTHESIS AND HYDROLYSIS OF PLANT HORMONE CONJUGATES IN REGULATION OF ACTIVE HORMONE LEVELS

Anna JAKUBOWSKA

Zakład Biochemii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

*Streszczenie:* Hormony roślinne pełnią funkcje regulatorowe w procesach wzrostu i rozwoju roślin, ale zjawisko homeostazy hormonalnej nie jest całkowicie poznane. Koniugacja fitohormonów jest uważana za istotny element mechanizmu odpowiedzialnego za poziom tych związków w komórce. Jest to proces zachodzący u wszystkich przebadanych roślin w odpowiedzi na czynniki fizjologiczne i środowiskowe. Mimo powszechności występowania i ogromnej różnorodności koniugatów, ich lokalizacja komórkowa i tkankowa, enzymatyczne szlaki syntezy i hydrolizy, geny w nich uczestniczące, a przede wszystkim funkcje fizjologiczne, nie są ostatecznie ustalone. Niektóre koniugaty auksyn, giberelin i cytokinin są uważane za formy zapasowe, z których aktywne fitohormony są uwalniane po hydrolizie. Koniugacja umożliwia również ich nieodwracalną inaktywację, transport, kompartmentację oraz ochronę przed degradacją oksydacyjną. W prezentowanej pracy podsumowano dotychczasowe i przedstawiono ostatnie wyniki badań biochemicznych i genetycznych, istotne dla poznania przemian metabolicznych, jakim podlegają koniugaty niektórych hormonów, jak również ustalenia ich funkcji biologicznych.

*Słowa kluczowe:* hormon roślinny, koniugacja, auksyny, cytokiny, gibereliny, kwas abscysynowy, etylen.

*Summary:* Plant hormones are important in all aspects of plant growth and development, but our understanding of hormonal homeostasis is far from complete. Phytohormone conjugation is considered as a part of the mechanism to control cellular levels of these compounds. This is a ubiquitous process in plants that responds to environmental and physiological factors. While numerous conjugates have been identified in higher plants, their location within cells and tissues, the enzymes and genes involved in their metabolism, and the biological functions, are not clearly understood. Some conjugates of auxin, gibberellins and cytokinins are thought to be temporary storage forms, from which free active hormones can be released after hydrolysis. It is also believed that conjugates serve functions such as irreversible inactivation, transport, compartmentalization and protection against oxidative degradation. In this paper previous results, and recent advances in studies on some phytohormone conjugation, involving biochemical and molecular biology approaches, in connection with their possible physiological functions, are reported.

*Key words:* plant hormone, conjugation, auxins, cytokinins, gibberellins, abscisic acid, ethylene.

## WSTĘP

Hormony roślinne (fitohormony) są drobnocząsteczkowymi substancjami endogennymi wpływającymi na wzrost i rozwój roślin. Występują one powszechnie w roślinach i wykazują aktywność biologiczną w bardzo niskich stężeniach ( $10^{-6}$ – $10^{-8}$ M), wykluczających ich funkcje odżywcze lub budulcowe. Często, podobnie jak hormony zwierzęce, wywołują specyficzne odpowiedzi w komórkach lub tkankach docelowych odległych od miejsca ich syntezy, ale w odróżnieniu od hormonów zwierzęcych mogą też działać w tej samej tkance, a nawet komórce, w której są syntetyzowane. Kryteria definiujące pojęcie hormonu roślinnego oraz „kryteria metodyczne” określające rodzaje prób eksperymentalnych, które należy przeprowadzić, aby uznać substancję czynną biologicznie za hormon, podaje Lewak [56] w obszernym opracowaniu dotyczącym kierunków badań nad regulatorami wzrostu i rozwoju roślin.

Fitohormony są stosunkowo prostymi strukturalnie związkami organicznymi, zróżnicowanymi pod względem budowy i aktywności biologicznej. Przez wiele lat wyróżniano wśród nich pięć odrębnych grup: auksyny, gibereliny, cytokininy, kwas abscysynowy i etylen, określanych dzisiaj jako hormony „klasyczne” lub „tradycyjne” [16,40]. W ostatnim dziesięcioleciu, dzięki zastosowaniu nowoczesnych technik fizykochemicznych, a także immunologicznych [29] umożliwiających identyfikację i ilościowe oznaczanie związków występujących w ilościach śladowych, odkryto szereg innych endogennych substancji uczestniczących w regulacji wzrostu i rozwoju roślin [16,34,36,49,56,60]. Niektóre z nich, np. jasmonidy i brasinosteroidy, spełniają kryteria stawiane hormonom roślinnym i są za nie uznawane, inne, takie jak: oligosacharyny, poliaminy czy grupa roślinnych regulatorów peptydowych (systemina, ENOD40, CLAVATA3, fitosulfokiny, POLARIS, SCR i inne), są uważane raczej za cząsteczki sygnałowe uczestniczące w przekazywaniu różnorodnych informacji, choć w literaturze można spotkać się z określaniem ich jako hormony [77].

Prowadzone od dziesięcioleci badania dostarczyły dowodów na udział hormonów roślinnych we wszystkich aspektach wzrostu i rozwoju roślin, jednak molekularny mechanizm działania tych związków wciąż nie jest dokładnie poznany. Wykorzystanie zaawansowanych metod biochemicznych, genetycznych oraz biologii molekularnej, w szczególności selekcja odpowiednich mutantów i konstruowanie roślin transgenicznych [73], przyczyniło się w ostatnich latach do ogromnego postępu badań nad molekularnymi mechanizmami działania fitohormonów. Znajduje to swoje odbicie w ilości ukazujących się prac eksperymentalnych i przeglądowych, a nawet całych numerów czasopism poświęconych temu zagadnieniu, jak np. specjalne wydanie „*The Plant Cell*” w 2002 roku [75]. Tematyka ta była także przedmiotem kilku opracowań przedstawionych w wydawnictwach i czasopismach polskich [35,36,46,47,101].

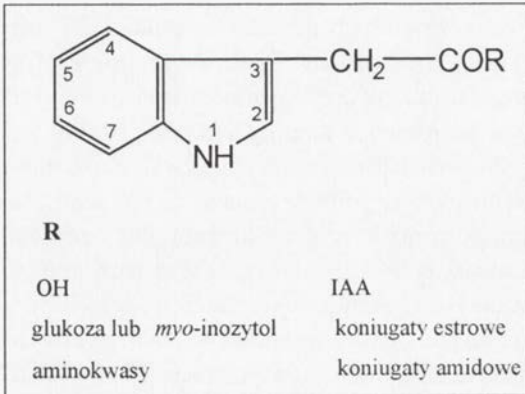
Fitohormony wpływają na rozwój roślin w całym ich cyklu życiowym, od kiełkowania do rozmnażania. Efekty wywoływane przez fitohormony są ściśle związane z ich stężeniem komórkowym, które jest kluczowym czynnikiem warunkującym aktywność biologiczną tych związków. Określony poziom wolnych hormonów, specyficzny dla

danej tkanki i etapu rozwoju, jest wynikiem złożonych procesów metabolicznych (biosynteza, koniugacja, degradacja) oraz transportu. Procesy te podlegają skoordynowanej regulacji w celu utrzymania homeostazy hormonalnej istotnej dla prawidłowego funkcjonowania organizmu roślinnego. Koniugacja jest jednym ze sposobów inaktywacji fitohormonów i stanowi istotną część mechanizmu determinującego endogenny poziom aktywnych hormonów poprzez zmianę ich właściwości fizycznych, chemicznych i biologicznych. Termin „koniugaty hormonów” oznacza hormony związane z innymi związkami niskocząsteczkowymi lub makrocząsteczkami za pomocą wiązań kowalencyjnych [85]. Tworzenie koniugatów jest zjawiskiem powszechnym u roślin wyższych, a ich różnorodność świadczy o tym, że koniugacja jest ważnym procesem metabolicznym. Występowanie form związanych stwierdzono w przypadku wszystkich fitohormonów, z wyjątkiem etylenu, a także innych endogennych regulatorów wzrostu, takich jak kwas salicylowy czy poliaminy [5,43,-84,85]. Prowadzone od dawna badania koniugatów fitohormonów dostarczyły wielu informacji dotyczących powstawania i struktury chemicznej tych związków, jednak molekularny mechanizm koniugacji, jak również jej fizjologiczne znaczenie nie są ostatecznie wyjaśnione. W ostatnich latach nastąpił widoczny postęp w identyfikacji i izolacji enzymów i genów uczestniczących w syntezie i hydrolizie koniugatów. W prezentowanej pracy, w nawiązaniu do wcześniejszych rezultatów, przedstawiono wyniki badań ostatnich lat nad enzymatyczną syntezą i hydrolizą koniugatów, koncentrując się na koniugatach hormonów zaliczanych do grupy hormonów „klasycznych”.

## KONIUGATY AUKSYN

Kwas indolilo-3-octowy (IAA) jest najważniejszą naturalną auksyną uczestniczącą w regulacji procesów fizjologicznych związanych ze wzrostem, podziałami i różnicowaniem komórek w cyklu życiowym roślin [17,36]. Aktywną biologicznie formą fitohormonu jest wolny kwas, który stanowi tylko niewielką część wewnątrzkomórkowej puli IAA. Poziom wolnego IAA w komórce decydujący o tempie i kierunku procesów wzrostowych i rozwojowych rośliny jest regulowany w drodze biosyntezy, koniugacji, degradacji i translokacji hormonu, a czasem konwersji do kwasu indolilo-3-masłowego [10,61,71,90]. Procesy te podlegają dynamicznej regulacji zarówno przez wewnątrzkomórkowe sygnały związane z programem morfogenetycznym rośliny, jak i przez zewnętrzne czynniki środowiskowe [71,72].

Większość IAA we wszystkich przebadanych roślinach występuje w postaci związanej, jako koniugaty [94] (ryc. 1). IAA może tworzyć dwa typy koniugatów: estrowe, w których przez grupę karboksylową jest przyłączony do cukrów i *myo*-inozytolu oraz amidowe będące połączeniami z aminokwasami, peptydami lub małymi białkami [6,90]. Ogólnie przyjmuje się, że rośliny jednoliścienne gromadzą koniugaty estrowe, natomiast u roślin dwuliściennych dominują koniugaty amidowe [6]. Ilość i rodzaj koniugatów są zróżnicowane w zależności od gatunku rośliny, tkanki i etapu

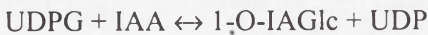


RYCINA 1. Kwas indolilo-3-octowy (IAA) i jego koniugaty

rozwoju, co wskazuje na różnice gatunkowe oraz sugeruje, że synteza lub transport koniugatów związane są z procesami rozwojowymi [10,43].

Stosunkowo najlepiej poznany jest metabolizm koniugatów estrowych w bielmie niedojrzałych nasion i młodych siewkach kukurydzy, badany od wielu lat przez Bandurskiego i współpracowników. Bielmo nasion kukurydzy jest bogatym źródłem tych związków, ponieważ stanowią one 97–99% endogennego IAA [15]. Ponad 50% całkowitej ilości koniugatów znajduje się w postaci nierozpuszczalnych w wodzie połączeń IAA z  $\beta$ -1,4-glukanem celulozowym o dużej masie cząsteczkowej, w których na jedną cząsteczkę IAA przypada 7–50 reszt glukozy. Pozostałą część stanowią niskocząsteczkowe estry IAA z *myo*-inozytolem i jego glikozydy z galaktozą lub arabinozą oraz śladowe ilości połączeń IAA z glukozą [6]. Koniugaty estrowe IAA zidentyfikowano również w tkankach wegetatywnych kukurydzy i rzodkiewnika, nasionach ryżu i owsa, owocach kasztanowca, a także w tkankach innych roślin [90,93].

Pierwszym etapem syntezy koniugatów estrowych jest reakcja powstawania 1-O-(indolilo-3-acetylo)- $\beta$ -D-glukozy (1-O-IAGlc), która zachodzi według równania:



Reakcja ta jest katalizowana przez glukozylotransferazę IAA (syntazę 1-O-IAGlc) zidentyfikowaną po raz pierwszy w bielmie nasion kukurydzy na początku lat 80. przez Michalczyka i Bandurskiego [67,68]. W dalszych badaniach enzym częściowo oczyszczono i scharakteryzowano [57,58]. Kowalczyk i Bandurski [45] oczyścili enzym do stopnia homogenności i uzyskali przeciwciała, które posłużyły do przeglądu biblioteki cDNA, co umożliwiło sklonowanie genu *iaglu* kodującego enzym [92]. W ostatnich latach zidentyfikowano gen *UGT84B1* kodujący glukozylotransferazę IAA uczestniczącą w syntezie IAA-glukozy u *Arabidopsis thaliana* oraz dokonano szczegółowej analizy biochemicznej rekombinowanego białka enzymatycznego [31]. Enzym charakteryzuje się wysoką specyficnością względem IAA, ale dobrymi akceptorami reszty glukozy są także kwas indolilo-3-masłowy, kwas indolilo-3-propionowy oraz kwas cynamonowy.

1-O-IAGlc jest połączeniem nietypowym wśród koniugatów estrowych, ponieważ wiązanie między grupą karboksylową IAA a hydroksylem półacetalowym przy C1

glukozy jest nietrwałe [6,44]. W roztworach wodnych, szczególnie w  $\text{pH} > 7$ , następuje samorzutna izomeryzacja 1-O-IAGlc do trwałych połączeń estrowych, 2-O-, 4-O- i 6-O-IAGlc [44]. Energia swobodna uwalniana podczas hydrolizy 1-O-IAGlc jest porównywalna z energią hydrolizy wiązania fosforanowego w UDPG [58]. Z tego powodu 1-O-IAGlc jest uważana za związek o wysokim potencjale przenoszenia reszty indolowej, który może uczestniczyć w reakcji syntezy IAA-*myo*-inozytolu (IAInos). Syntezę IAINos *in vivo* obserwowano po raz pierwszy w nasionach kukurydzy na początku lat 70. [90]. W późniejszych badaniach ustalono, że powstaje on w reakcji przeniesienia IAA z 1-O-IAGlc na *myo*-inozytol zgodnie z równaniem [67,68]:



Reakcja jest katalizowana przez acylotransferazę *myo*-inozytolu (syntazę IAINos) specyficzną względem 1-O-IAGlc i *myo*-inozytolu. Syntaza IAINos została oczyszczona do stopnia jednorodności elektroforetycznej [41,50]. Wyniki najnowszych badań dowodzą, że białko charakteryzuje się podwójną aktywnością enzymatyczną, wykazując zdolność także do hydrolizy IAA-inozytolu [50]. Analiza częściowej sekwencji aminokwasowej tego enzymu wskazuje na podobieństwo do sekwencji niektórych roślinnych acylotransferaz, należących do rodziny białek podobnych do karboksypeptydaz serynowych, tzw. SCLP (ang. *serine carboxypeptidase-like proteins*) [53,59,88].

Gromadzenie IAA w postaci koniugatów sugeruje możliwość uwalniania aktywnej auksyny drogą hydrolizy tych połączeń. Podając znakowany IAINos do bielma kiełkujących nasion kukurydzy wykazano, że był on transportowany do kielków, gdzie ulegał hydrolizie dostarczając wolnego IAA [6,90]. W badaniach tych ustalono, że IAA pochodzący z hydrolizy IAINos stanowił większość w całkowitej puli wolnego IAA w porównaniu z IAA syntetyzowanym *de novo*. Podobną hydrolizę obserwowano również w przypadku IAINos-galaktozydu podanego egzogennie do bielma kiełkujących nasion kukurydzy [6]. Stosując podwójnie znakowany koniugat wykazano, że hydroliza IAINos-galaktozydu jest niezbędna dla transportu IAA-inozytolu. Pierwsze próby wyizolowania enzymów uczestniczących w hydrolizie koniugatów estrowych doprowadziły do uzyskania wstępnie oczyszczonej frakcji białkowej z kielków kukurydzy wykazującej aktywność hydrolityczną względem IAINos, jednak wysoka labilność enzymu uniemożliwiła jego oczyszczenie [6]. Z bielma nasion kukurydzy oczyszczono dwa enzymy hydrolizujące estry glukozyzowane IAA: hydrolaza 1-O-IAGlc wykazywała aktywność w stosunku do wszystkich izomerów IAGlc, natomiast hydrolaza 6-O-IAGlc specyficznie hydrolizowała izomery 6-O- i 4-O-IAGlc [44]. Ten ostatni enzym oczyszczono częściowo także z bulw ziemniaka, a jego aktywność stwierdzono również w kielkach owsa i fasoli [33].

Znacznie skromniejsze są wyniki uzyskane w badaniach enzymatycznych szlaków syntezy i hydrolizy koniugatów amidowych. Powszechnie spotykanym i najlepiej poznanym koniugatem amidowym jest indolilo-3-acetyloasparaginian (IAA-Asp) zidentyfikowany u wielu gatunków roślin, na ogół wspólnie z indolilo-3-acetyloglutaminianem (IAA-Glu) [90,93]. Metabolizm tych koniugatów badano w nasionach

soi, owocach pomidora, kulturach tkankowych marchwi oraz siewkach *A. thaliana* [78,90,95]. IAA-Asp jest także głównym połączeniem powstającym w odpowiedzi na podanie egzogenego IAA, przy czym indukcja tego procesu jest hamowana przez inhibitory syntezy RNA i białek [90]. U *A. thaliana*, po podaniu egzogenego IAA obserwowano powstawanie także innych połączeń amidowych, takich jak: IAA-alanina, IAA-leucyna czy IAA-glutamina [8, 61]. W nasionach fasoli *Phaseolus vulgaris* IAA występuje w połączeniach z peptydami i małymi białkami, z których dotychczas, najlepiej poznany jest koniugat zawierający dwie reszty IAA połączone z hydrofobowym peptydem o masie cząsteczkowej 3,6 kDa [61]. Ostatnio, sklonowano gen *IAP1* kodujący obficie występujące w nasionach fasoli białko IAP1, modyfikowane przez kowalencyjnie związane IAA [97]. IAP1 o masie cząsteczkowej 35 kDa jest gromadzone podczas dojrzewania nasion fasoli, po czym we wczesnych etapach kiełkowania jego poziom wyraźnie obniża się podobnie jak poziom białek zapasowych.

Mimo dowodów świadczących o enzymatycznej syntezie koniugatów amidowych [8,90] nie udało się, jak dotąd, przeprowadzić reakcji syntezy *in vitro* żadnego z tych związków ani zidentyfikować żadnego enzymu uczestniczącego w powstawaniu połączeń amidowych. Jedynie z patogena roślinnego *Pseudomonas savastanoi* sklonowano gen biorący udział w powstawaniu IAA-ε-N-lizyny i ustalono, że przebieg tej reakcji zależy od dodanej L-lizyny, ATP i jonów dwuwartościowych, ale nie jest wymagany koenzym A [76]. Jednak do dziś, nie zidentyfikowano żadnego genu roślinnego, homologicznego do genu bakteryjnego lub pełniącego podobne funkcje. Uniemożliwia to uzyskanie odpowiedzi na pytanie, czy połączenia IAA z różnymi aminokwasami, występujące w określonym gatunku roślin, są syntetyzowane przez pojedynczy enzym, czy też przez kilka enzymów specyficznych względem różnych substratów. Więcej sukcesów uzyskano w badaniach enzymatycznej hydrolizy koniugatów amidowych. Pierwsze rezultaty wskazywały na możliwość uwalniania IAA z jego połączeń amidowych *in vivo*, w tkankach vegetatywnych grochu i fasoli [90]. W latach 90. zidentyfikowano i częściowo oczyszczono hydrolazy koniugatów amidowych IAA z kultur tkankowych marchwi, *Enterobacter agglomerans*, kapusty pekińskiej oraz *Arabidopsis* [90]. Geny kodujące hydrolazy sklonowano z *E. agglomerans* i *A. thaliana* [9,18,52]. Enzymy kodowane przez geny *ILR1*, *IAR3*, *ILL1* i *ILL2* z *Arabidopsis* wykazują podobieństwo do bakteryjnych amidohydrolaz i charakteryzują się zróżnicowaną specyficznością substratową względem amidowych połączeń IAA [52].

Możliwość hydrolitycznego rozszczepienia koniugatów sugeruje, że są one łatwo dostępnym zapasowym źródłem fitohormonu. Powszechnie przyjmuje się, że taką funkcję pełnią koniugaty IAA w nasionach, gdzie dostarczają aktywnej auksyny niezbędnej w czasie ich kiełkowania [10]. Na etapie wzrostu vegetatywnego, odwracalna koniugacja IAA jest uważana za jeden z kluczowych procesów utrzymujących homeostazę hormonalną. Potwierdzają to wyniki badań prowadzonych na roślinach transgenicznych i mutantach z zaburzoną syntezą IAA, w których wykazano, że w warunkach naruszonej równowagi fitohormonu następuje aktywacja syntezy koniugatów. W marchwi i tytoniu, transformowanych genami *Agrobacterium*



*tumefaciens* uczestniczącymi w biosyntezie IAA, obserwowano niewielki wzrost poziomu wolnego IAA, podczas gdy poziom koniugatów, szczególnie amidowych, wzrastał zdecydowanie. Rośliny transgeniczne nie różniły się fenotypowo w porównaniu z roślinami dzikimi. Sugeruje to, że nadmiar syntetyzowanego IAA ulega inaktywacji poprzez jego koniugację zapewniającą utrzymanie niskiego poziomu aktywnego hormonu [30,89]. Wyraźne zmiany w homeostazie auksyn są wywoływane nadprodukcją enzymów uczestniczących w metabolizmie koniugatów IAA. Rośliny z nadekspresją genów, biorących udział w syntezie koniugatów IAA, wykazują zmiany fenotypowe charakterystyczne dla roślin z niedoborem auksyn. Transgeniczne linie tytoniu transformowanego genem syntazy IAA-lizyny (*iaaL*) z *Pseudomonas savastanoi* charakteryzowały się zredukowaną dominacją wierzchołkową, zredukowanym systemem korzeniowym oraz zahamowanym różnicowaniem się tkanki naczyniowej [76]. Analiza biochemiczna wykazała, że endogenny poziom IAA jest w tych roślinach obniżony 19-krotnie. Efekty fenotypowe wywołane ekspresją genu *iaaL* można było odwrócić przez krzyżowanie z roślinami wykazującymi nadprodukcję IAA. Jackson i wsp. [32] analizowali u *Arabidopsis* efekty wywołane nadekspresją wspomnianego już genu *UGT84B1* kodującego glukozylotransferazę IAA. U roślin tych obserwowano przede wszystkim zmiany w morfologii liści spowodowane przypuszczalnie redukcją systemu naczyniowego. Transgeniczne rośliny charakteryzowały się wysokim wzrostem poziomu 1-O-IAGlc, występującej w normalnych roślinach *Arabidopsis* w ilościach śladowych. Wyniki tych badań wykazały także nieoczekiwany w tych warunkach, prawie 5-krotny wzrost poziomu wolnego IAA, który nie został jednoznacznie wytłumaczony przez autorów. Wyraźny wzrost stężenia koniugatów IAA stwierdzono również u kilku mutantów *A. thaliana* charakteryzujących się nadprodukcją IAA. Mutant *surl1* (ang. *superroot 1*) jest jednym z kilkunastu wyizolowanych niezależnie mutantów allelicznych (*surl1-1* do *surl1-7*, *rty1* i *rty3* (*rooty*), *ivr1* i *ivr2* (*invasive root*), *alf1* (*aberrant lateral root formation1*), *hls3* (*hookles3*), u których poziom endogennego IAA jest 2–17-krotnie wyższy w porównaniu z roślinami dzikimi [12,14,42,54]. Wykazuje on także podwyższony poziom połączeń amidowych i estrowych [20]. Obserwowane zmiany fenotypowe *surl1* były charakterystyczne dla roślin rosnących w obecności wysokiego stężenia auksyn. Przejawiało się to epinacją liścieni, zahamowaniem wzrostu kielków i nadmiernym wzrostem korzeni bocznych i przybyszowych, podobnie jak u mutantu *rty*, u którego zmutowany gen został sklonowany [25]. Gen *RTY* koduje białko o wysokim podobieństwie do zwierzęcej aminotransferazy tyrozynowej. Mimo że molekularne szczegóły działania *RTY* pozostają niejasne, to obserwowana nadprodukcja auksyny będąca efektem mutacji sugeruje, że enzym nie uczestniczy w syntezie, lecz raczej w degradacji IAA lub syntezie jego koniugatów. Dellarue i wsp. [19] wyselekcjonowali innego mutantu *A. thaliana*, *sur2*, który podobnie jak wspomniany mutant *rty* charakteryzuje się epinacją liścieni i zmianami w systemie korzeniowym, a więc fenotypem wskazującym na nadprodukcję auksyn. Obserwowany wzrost wolnego IAA, przy obniżonym poziomie związanej auksyny, sugerował zahamowanie inaktywacji i udział *SUR2* w regulacji koniugacji IAA. Sklonowanie *SUR2* nie potwierdziło tych sugestii, ponieważ okazało się, że gen

ten koduje monoooksygenazę należącą do rodziny cytochromów P450 i nie wpływa na syntezę koniugatów, lecz reguluje poziom IAA uczestnicząc w jego biosyntezie [7].

Utrzymanie homeostazy hormonalnej wymaga z pewnością precyzyjnej kontroli stosunku wolnego IAA do jego formy związanej w postaci koniugatów. Znanym przykładem takiej kontroli są wzajemne zależności poziomu wolnego IAA i jego koniugatów obserwowane w czasie dojrzewania nasion kukurydzy *Zea mays* [37]. Jak dotąd, niewiele jest danych wyjaśniających, w jaki sposób regulowany jest stosunek wolnego IAA do jego koniugatów i jakie sygnały endogenne i/lub środowiskowe mogą mieć na to wpływ. Wydaje się, że jednym z możliwych mechanizmów takiej regulacji może być indukcja enzymów uczestniczących w syntezie koniugatów przez wysokie stężenie wolnej auksyny. U *A. thaliana* obserwowano powstawanie koniugatów amidowych po inkubacji tkanek w środowisku zawierającym 500  $\mu\text{M}$  IAA [8]. Mechanizm indukcji nie jest jasny, gdyż, jak wcześniej wspomniano, nie udało się przeprowadzić syntezy koniugatów amidowych *in vitro*. Potwierdzenie takiej możliwości uzyskano natomiast dla IAA-glukozy, ponieważ w tkankach wegetatywnych kukurydzy wykazano zależną od cykloheksymidu indukcję syntazy I-O-IAGlc w obecności 50  $\mu\text{M}$  NAA [48].

Inne funkcje przypisuje się koniugatam IAA biologicznie nieaktywnym, powstającym w wyniku koniugacji nieodwracalnej. Takie połączenia, nie ulegając hydrolizie *in vivo*, nie stanowią puli zapasowego IAA, lecz są prawdopodobnie produktami jego przemian katabolicznych [10]. Badania metabolizmu koniugatów amidowych w tkankach wegetatywnych *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicon esculentum*, *Vicia faba*, *Dalbergia dolichopetala* i *Populus tremula* wykazały, że IAA-Asp, najpowszechniej występujący koniugat amidowy, jest produktem pośrednim w procesie nieodwracalnej degradacji fitohormonu [90]. Jednak w ekstraktach z kapusty pekińskiej obserwowano na niskim poziomie aktywność hydrolityczną względem IAA-Asp [62]. W badaniach tych interesujący był gwałtowny wzrost tempa hydrolizy IAA-Asp po infekcji przez patogenny grzyb *Plasmodiophora brassicae* wywołujący chorobę korzeni. Indukcja specyficznej aktywności hydrolitycznej w odpowiedzi na infekcję sugeruje, że IAA-Asp może być źródłem wolnej auksyny w procesach innych niż te, które tradycyjnie wymagają udziału IAA. Także najnowsze wyniki, uzyskane przez Tam i Normanly [96] w badaniach metabolizmu koniugatów u *Arabidopsis* z nadekspresją bakteryjnej hydrolazy IAA-Asp, potwierdzają, że IAA-Asp nie stanowi zapasowego źródła aktywnej auksyny.

Koniugaty IAA prawdopodobnie uczestniczą również w transporcie fitohormonu ze względu na to, że wszystkie formy związane auksyn są związkami hydrofilowymi, łatwiej rozpuszczalnymi w wodzie niż wolny IAA [6]. Za taką funkcją koniugatów może dodatkowo przemawiać fakt, że syntezę tych związków obserwowano dopiero u mszaków, przedstawicieli grupy systematycznej roślin zielonych, u których po raz pierwszy pojawiają się komórki wyspecjalizowane w transporcie wody [94]. Synteza koniugatów przypuszczalnie chroni IAA przed utleniającym działaniem roślinnych peroksydaz oraz umożliwia usunięcie nadmiaru hormonu z komórki poprzez połączenie z glutationem [6,70].

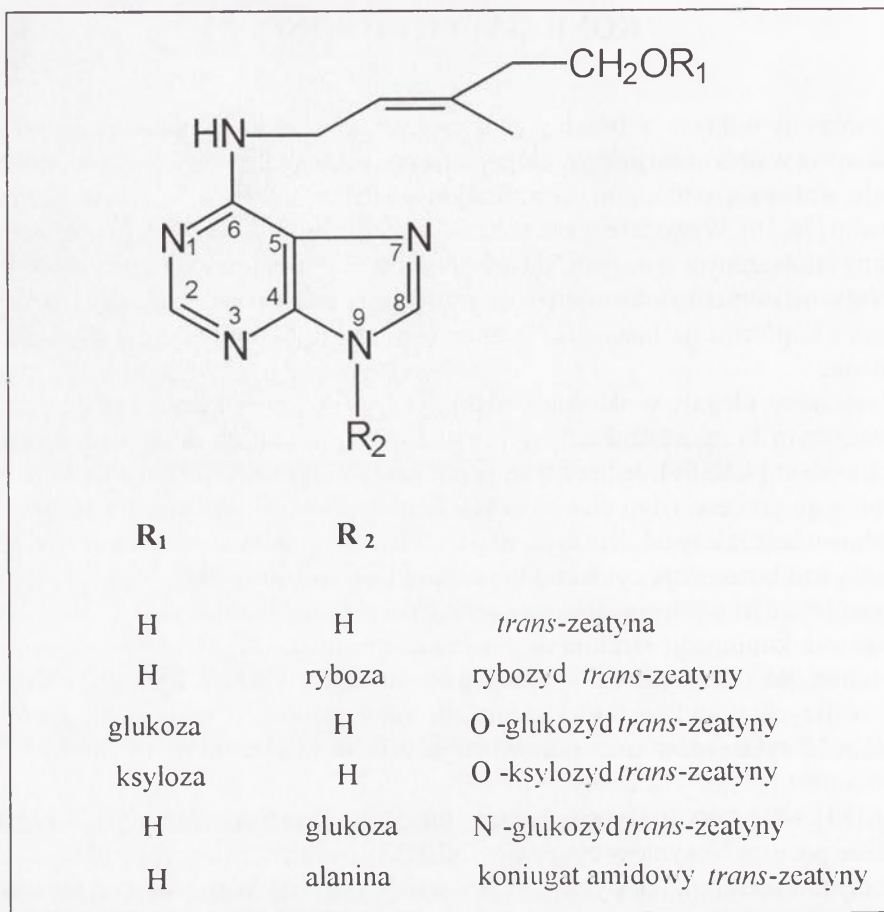
## KONIUGATY CYTOKININ

Cytokiny odkryto w latach pięćdziesiątych jako związki indukujące podziały komórkowe w obecności auksyn. Odgrywają one istotną rolę w morfogenezie roślin, a ponadto wpływają na transport i akumulację asymilatów oraz opóźniają proces starzenia się roślin [26,36]. Wszystkie znane naturalnie występujące cytokiny są pochodnymi adeniny z dołączonym w pozycji N<sup>6</sup> łańcuchem bocznym, najczęściej izoprenoidowym, chociaż w niektórych cytokininach może występować pierścień aromatyczny [36,69,91]. Rodzaj i konformacja łańcucha bocznego są istotne dla aktywności biologicznej hormonu.

Cytokiny ulegają w tkankach roślinnych wielu przemianom metabolicznym prowadzącym do zmian strukturalnych, mających wpływ na ich aktywność, stabilność oraz transport [4,66,69]. Jedną z tych przemian jest szybka koniugacja fitohormonu. Tempo tego procesu i typ powstających koniugatów jest specyficzny tkankowo i gatunkowo oraz zależy od stopnia rozwoju rośliny i czynników środowiskowych [3,84]. Badania nad koniugacją cytokinin koncentrują się na *trans*-zeatynie ze względu na powszechność jej występowania oraz wysoką aktywność biologiczną.

Podczas koniugacji strukturalnym zmianom może ulegać zarówno pierścień adeninowy, jak i izopentenyłowy łańcuch boczny cytokinin (ryc. 2). Jedną z najpowszechniejszych modyfikacji pierścienia adeninowego jest N<sup>9</sup>-rybozylacja z wytworzeniem N<sup>9</sup>-rybozydów oraz odpowiadających im nukleotydów (5'-mono-, di- i trifosforanów) [66,69]. Obecność cytokinin w takich formach stwierdzono u większości roślin [84]. N<sup>9</sup>-rybotydy i rybozydy mogą powstawać nie tylko w reakcji glikozylacji, ale także podczas biosyntezy cytokinin z udziałem transferazy izopentenyłowej oraz z nukleotydów adeninowych występujących w tRNA [36,66]. Wzajemne przekształcenia zasad i odpowiadających im nukleozydów i nukleotydów są główną cechą metabolizmu cytokinin. Potwierdziły to badania konwersji cytokinin *in vivo* [55]. W czasie inkubacji kultur tkankowych z tytoniu w środowisku zawierającym radioaktywne cytokiny w formie zasad, obserwowano powstawanie odpowiadających im radioaktywnych nukleozydów i nukleotydów jak również adeniny i adenozyne. Ustalono, że przekształcenia różnych form hormonu zachodzą z udziałem enzymów uczestniczących w metabolizmie puryn, jednak ich powinowactwo do cytokinin w każdej formie jest niższe niż dla adeniny czy adenozyne [69]. Biologiczne znaczenie tych przekształceń nie jest jasne, szczególnie, jeśli uwzględnimy fakt, że stężenia komórkowe adeniny, adenozyne czy AMP są kilka rzędów wyższe niż cytokinin. Jednak niektórzy z autorów, zajmujących się metabolizmem cytokinin, uważają, że metaboliczna konwersja cytokinin jako wolnych zasad, rybozydów i rybotydów jest fundamentalnym mechanizmem kontrolującym poziom aktywnych cytokinin wewnątrz komórek [2].

Innym typem modyfikacji pierścienia adeninowego jest N-glukozylicacja w pozycjach N<sup>3</sup>, N<sup>7</sup> i N<sup>9</sup> z wytworzeniem odpowiednich N-glukozydów [66,69,85]. Szczegółowe badania reakcji N-glukozylicacji różnych cytokinin z udziałem N-glukozylotransferazy częściowo oczyszczonej z tkanek rzodkiewki *Raphanus sativus* wykazały, że enzym

RYCINA 2. *Trans*-zeatyna i przykłady jej koniugatów

katalizuje syntezę N<sup>7</sup>- i N<sup>9</sup>-glukozydów [66]. Donorami glukozy są tylko UDPG i TDPG, natomiast wiele naturalnie występujących i syntetycznych cytokinin, a także pochodnych adeniny enzym rozpoznaje jako substraty. Ustalono, że reakcją uprzywilejowaną jest tworzenie N<sup>7</sup>-glukozydu, jednak stosunek ilości N<sup>7</sup>- i N<sup>9</sup>-glukozydów zależy od rodzaju substratu i wynosi 2:1 w przypadku benzyloadeniny i 10:1, gdy substratem jest zeatyna. Enzym nie katalizuje powstawania N<sup>3</sup>-glukozydów, co może sugerować udział innej, specyficznej glukozylotransferazy w tej reakcji.

Nietypową grupą N-glukozydów cytokinin są połączenia, w których glukoza jest przyłączona do rybozy podstawionej w pozycji N<sup>9</sup>. Występują one tylko u niektórych roślin, np. w pączkach sosny *Pinus radiata* zidentyfikowano glukozydy rybozydu zeatyny i dihydrozeatyny, natomiast u gerbery *Gerbera jamesonii* i petunii stwierdzono obecność glukozydu benzyloadenozyny [2,11,100]. W koniugatach tych glukoza jest przyłączona do jednej z grup hydroksylowych przypuszczalnie wiązaniem β-glikozydowym między C1 glukozy i C3 rybozy, jednak nie jest to ostatecznie potwierdzone.

Zidentyfikowano także ufosforylowane formy tego typu koniugatów, ale pozycja reszty fosforanowej nie została ustalona. Funkcje tej grupy glukozydów oraz ich form ufosforylowanych są niejasne i wymagają dalszych badań. Przypuszcza się, że ze względu na wysoki poziom takich połączeń w dojrzałych pąkach *P. radiata*, mogą one być charakterystyczne dla specyficznych procesów metabolicznych zachodzących podczas morfogenezy pąków. Podobną zależność obserwowano wcześniej w badaniach nad organogenezą w kulturach tkankowych *Gerbera jamesonii* [11] oraz *Petunia hybrida* [1].

Znacznie rzadszym rodzajem modyfikacji pierścienia adeninowego jest koniugacja alaniny w pozycji N<sup>9</sup>. Powstawanie koniugatów amidowych z alaniną obserwowano w nasionach łubinu *Lupinus* po podaniu egzogennej zeatyny [66]. Obecność połączeń alaniny z zeatyną oraz w znacznie mniejszych ilościach z dihydrozeatyną stwierdzono w nasionach, kielkach i niedojrzałych strąkach łubinu, a także w symbiotycznych brodawkach korzeniowych tej rośliny. Są to niezwykle strukturalnie połączenia, w których reszta aminokwasowa jest przyłączona do atomu azotu w pierścieniu purynowym. Z nasion łubinu oczyszczono transferazę katalizującą reakcję przyłączenia alaniny do zeatyny w pozycji N<sup>9</sup> [69].

N<sup>7</sup>- i N<sup>9</sup>-glukozydy cytokinin, podobnie jak ich koniugaty amidowe, są bardzo stabilne i nieaktywne biologicznie [69,85], co sugeruje, że synteza tego typu połączeń jest nieodwracalna. Ze względu na to, że nie ulegają one enzymatycznej hydrolizie, nie wydaje się, by mogły stanowić zapasowe źródło aktywnych cytokinin. Jest to raczej nieodwracalna inaktywacja w warunkach nadmiaru hormonu lub skierowanie go na drogę przemian katabolicznych. Przypuszcza się, że N-glukozyzacja cytokinin i koniugacja z aminokwasami są wspólną odpowiedzią tkanek roślinnych na składniki ksenobiotyczne. Przyłączenie polarnych reszt cukrowych lub aminokwasowych zwiększa rozpuszczalność powstałych koniugatów, a przez to prawdopodobnie ułatwia ich odkładanie w wakuolach. Interesujące w tym kontekście wyniki uzyskano w badaniach poziomu cytokinin w roślinach transgenicznych. Wykazano, że za drastyczne zmiany fizjologiczne i morfologiczne tytoniu transformowanego plazmidem R<sub>1</sub> *Agrobacterium rhizogenes* odpowiada znajdujący się w nim specyficzny gen *rol C*, kodujący β-glukozydazę [22]. Enzym ma zdolność hydrolizy N<sup>7</sup>- i N<sup>9</sup>-glukozydów zeatyny odpornych na endogenną glukozydazę, co zaburza właściwy dla normalnego wzrostu i rozwoju poziom fitohormonu.

Kolejnym typem koniugatów cytokinin są O-glikozydy hormonu powstające w reakcji O-glikozyzacji łańcucha bocznego przyłączonego w pozycji N<sup>6</sup> pierścienia adeninowego [4,84]. Z zarodków fasoli wyizolowano i oczyszczono dwie transferazy O-glikozyzowe uczestniczące w O-glikozyzacji cytokinin [4], a ostatnio sklonowano ich geny [63,64]. *ZOG1* (ang. *zeatin O-glucosyltransferase*) z niedojrzałych nasion *Phaseolus lunatus* koduje O-glikozylotransferazę, a *ZOX1* (ang. *zeatin O-xylosyltransferase*) z *Phaseolus vulgaris* O-ksylozylotransferazę. Geny wykazują 93% identyczności na poziomie nukleotydowym i 90% identyczności na poziomie aminokwasowym. Oba enzymy różnią się powinowactwem względem nukleotydów dostarczających reszt cukrowych w reakcjach glikozyzacji. Oczyszczona O-glikozylotransferaza katalizuje

reakcję syntezy O-glukozydotyminy i O-ksylozydotyminy z udziałem UDPG i UDP-Xyl jako donorami reszt cukrowych, z większym powinowactwem względem UDPG. O-ksylozylotransferaza jest bardziej specyficzna, ponieważ rozpoznaje jedynie UDP-Xyl [65]. Enzymy te mogą uczestniczyć także w syntezie O-glikozydów dihydrozydotyminy, ale tylko w przypadku gdy donorem reszty glikozydowej jest UDP-Xyl, oba enzymy nie rozpoznają natomiast *cis*-zydotyminy [65]. Wymagania enzymów względem określonych rodzajów cytokinin, jak również względem donorów reszt cukrowych świadczą o precyzyjnej kontroli syntezy O-glikozydów cytokinin.

W przeciwieństwie do N-glikozydów i koniugatów amidowych cytokinin, będących produktami nieodwracalnej inaktywacji, O-glikozydy występujące u wszystkich przebadanych roślin są uważane za stabilne, tylko czasowo inaktywowane formy zapasowe fitohormonu. O-glikozydacja chroni je przed atakiem oksydaz odszczepiających łańcuch boczny z pozycji N<sup>6</sup> i jednocześnie umożliwia konwersję do aktywnych cytokinin po hydrolizie glikozydów do odpowiadających im aglikonów (części nie cukrowych) z udziałem  $\beta$ -glikozydaz [13]. Na występowanie hydrolaz uwalniających aktywny fitohormon z nieaktywnych koniugatów wskazywała obserwowana zależność między aktywnością fizjologiczną koniugatu i tempem jego hydrolizy w tkankach roślinnych [55]. Biorąc pod uwagę ogromną różnorodność koniugatów O-glikozydowych należałoby się spodziewać obecności specyficznych hydrolaz. Jednak  $\beta$ -glikozydazy, które obficie występują w roślinach, wykazują niską specyficzność względem O-glikozydów cytokinin [69]. Do tej pory wyizolowano tylko dwie  $\beta$ -glukozydazy uwalniające aktywny hormon z jego koniugatów. Z koleoptyli kukurydzy sklonowano gen *Zm-p60.1*, którego produkt hydrolizuje O-glikozydy cytokinin oraz N<sup>3</sup>-glukozyd kinetyny [13,51]. Białko wykazuje 35–50% homologii z innymi glikozydazami bakteryjnymi i eukariotycznymi. Biologiczne znaczenie tego enzymu potwierdzono w doświadczeniach prowadzonych na protoplastach tytoniu transformowanych genem *Zm-p60.1*, w których obserwowano inicjacje podziałów komórkowych w obecności nieaktywnych glukozydów cytokinin jako jedynego źródła fitohormonu. Badania immunocytochemiczne wykazały obecność białka *Zm-p60.1* w komórkach merystematycznych kiełkujących nasion, gdzie może ono funkcjonować *in vivo* uwalniając aktywne cytokiny z glukozydów transportowanych z bielma.

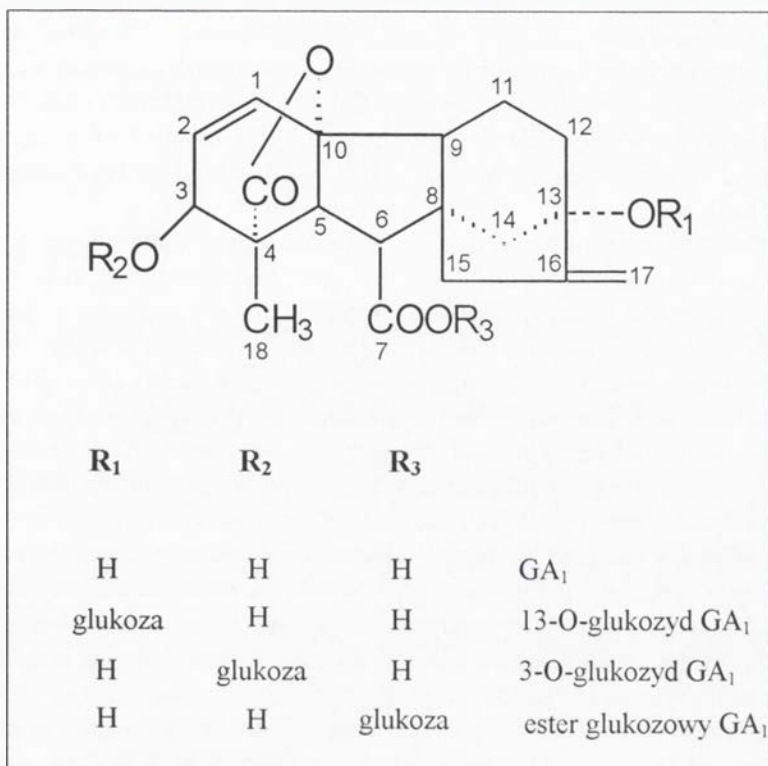
Gen podobny do *Zm-p60.1* (44% identyczności) sklonowano z nasion *Brassica napus* [23]. Koduje on  $\beta$ -glukozydazę, dla której jedynym, jak dotąd, znanym substratem jest O-glukozyd zydotyminy. Gen ulega najwyższej ekspresji w nasionach, a w mniejszym stopniu także w kiełkach i młodych korzeniach.

## KONIUGATY GIBERELIN

Gibereliny (GA) tworzą bardzo liczną grupę, do której należy obecnie ponad 120 związków wyizolowanych z roślin i mikroorganizmów, oznaczanych jako GA<sub>1</sub>, GA<sub>2</sub>, GA<sub>3</sub> itd. Większość z nich to produkty pośrednie powstające w reakcjach biosyntezy i degradacji, a tylko niektóre, jak np. GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>5</sub>, GA<sub>7</sub> czy GA<sub>32</sub>, wykazują

aktywność biologiczną. Najlepiej scharakteryzowaną funkcją aktywnych giberelin jest ich udział we wzroście wydłużeniowym łodygi [17,36]. GA mają także istotny wpływ na takie procesy, jak: dojrzewanie nasion, rozrost liści czy rozwój kwiatów i owoców. Pod względem chemicznym wszystkie gibereliny są pochodnymi kaurenu i różnią się między sobą obecnością dodatkowych pierścieni i podstawników bocznych [36].

Koniugaty giberelin były pierwszymi poznаныmi koniugatami fitohormonów. Odkryto je w 1967 roku, kiedy z dojrzałych nasion fasoli *Phaseolus coccineus* wyizolowano glukozyd  $GA_8$  [83] (ryc. 3). Zastosowanie nowoczesnych metod analitycznych doprowadziło do zidentyfikowania ogromnej ilości koniugatów giberelin zarówno endogennych, jak i uzyskanych w wyniku syntezy chemicznej. W jakościowej analizie tej bardzo licznej grupy związków należy jednak zachować dużą ostrożność ze względu na to, że większość z nich sklasyfikowano tylko na podstawie identyfikacji chromatograficznej lub rozpoznania gibereliny uzyskanej po rozpadzie hydrolitycznym. W wielu przypadkach nie ustalono dokładnej pozycji wiązań ani stereochemii podstawników. Największą grupę wśród poznanych do tej pory koniugatów giberelin stanowią koniugaty glukozydowe, ale oprócz nich znane są także połączenia acylowe, alkilowe, a także amidowe [83,84,85]. Glukoza, która jest jedynym zidentyfikowanym, jak dotąd, rodzajem reszty cukrowej związanej z giberelinami, może być przyłączona do szkieletu GA poprzez grupę hydroksylową w



pozycjach: 2-O-, 3-O-, 11-O-, 13-O- oraz 17-O- tworząc O-glukozydy lub przez grupę karboksylową przy C7 tworząc estry.

Mimo powszechnego występowania koniugatów GA i ich ogromnej różnorodności, udział specyficznych enzymów i genów w procesach koniugacji i dekoniegacji poznany jest w znikomym stopniu. Badania glukozytacji w niedojrzałych nasionach wykazały, że koniugaty giberelin są syntetyzowane głównie podczas ich dojrzewania osiągając najwyższy poziom w dojrzałych nasionach, czemu towarzyszy spadek poziomu wolnych giberelin [84,86]. Biosyntezę koniugatów GA *in vivo* potwierdzono w doświadczeniach, w których podawano egzogennie znakowane gibereliny [83]. W reakcjach tych głównym, jeśli nie jedynym, donorem reszty glukozydowej była UDPG. W dojrzewających nasionach *Phaseolus coccineus* zidentyfikowano transferazę, która przy udziale UDPG glukozylowała GA<sub>3</sub> i w mniejszym stopniu GA<sub>30</sub> tworząc wyłącznie 3-O-β-D-glukopiranozyd [85].

Podobnie jak w przypadku innych fitohormonów, glukozytacja giberelin powoduje obniżenie lub utratę ich aktywności biologicznej, która jest przywracana po hydrolizie glukozydów GA z udziałem β-glukozydaz. Stosując znakowane trytem koniugaty giberelin obserwowano ich hydrolizę *in vivo* w nasionach i kielkach kukurydzy oraz nasionach fasoli i jęczmienia [83,87]. Wyniki sugerujące uwalnianie aktywnych giberelin w reakcji dekoniegacji uzyskano w interesujących badaniach przeprowadzonych na roślinach infekowanych bakterią glebową *Azospirillum lipoferum*, mającą zdolność hydrolizy O-glukozydów GA<sub>20</sub> *in vitro* [74]. Siewki kukurydzy infekowanej *A. lipoferum* charakteryzowały się znacznie silniejszym wzrostem korzeni w porównaniu z roślinami nieinfekowanymi i wykazywały obecność GA<sub>3</sub>, która w roślinach nieinfekowanych była obserwowana wyłącznie po hydrolizie estrów glukozydowych lub połączeń glukozydowych [24]. Jest to kolejny dowód na to, że proces odwracalnej koniugacji może wpływać na komórkowy poziom aktywnego hormonu.

Połączenia 3-O-acetylowe GA<sub>1</sub> i GA<sub>3</sub> wyizolowano z kultur patogennego grzyba *Gibberella fujikuroi*, a n-propylowe estry GA<sub>3</sub> i przypuszczalnie GA<sub>1</sub> zidentyfikowano w nasionach *Cucumis sativus* [84]. Nietypowy koniugat, wyizolowany z niedojrzałych nasion *Pharbitis nil*, może powstawać przez przyłączenie do αβ-nienasyconych form ketonowych GA<sub>3</sub> kwasu merkaptopirogronowego lub cysteiny [84]. Struktura tego koniugatu (ang. *pharbitic acid*) została potwierdzona przez jego syntezę chemiczną. Gibereliny mogą także tworzyć koniugaty z aminokwasami poprzez wiązanie peptydowe, ale są to związki uzyskane wyłącznie w drodze syntezy chemicznej [84]. Jak dotąd nie zidentyfikowano endogennych koniugatów tego typu.

Fizjologiczne znaczenie koniugacji giberelin, podobnie jak pozostałych fitohormonów, jest przedmiotem intensywnych dyskusji, ale do ostatecznych rozstrzygnięć jest wciąż daleko. Ze względu na wzmoczoną syntezę i akumulację glukozydów GA w czasie dojrzewania nasion sugeruje się, że związki te, podobnie jak koniugaty IAA, mogą stanowić zapas fitohormonu, który podczas kiełkowania jest uwalniany w aktywnej formie po hydrolizie enzymatycznej, równoległe z biosyntezą zachodzącą *de novo* [43,84,85]. Powszechnie uważa się, że dotyczy to tylko tych glukozydów, które powstają w wyniku połączenia z giberelinami aktywnymi biologicznie, np. GA<sub>1</sub> czy GA<sub>3</sub>. W przypadku giberelin nieaktywnych, np. GA<sub>8</sub> czy GA<sub>29</sub>, koniugacja, która

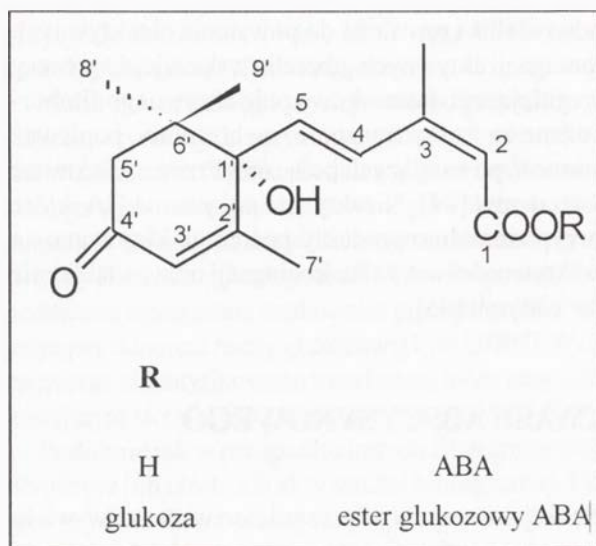


ma miejsce w pozycji 2 $\beta$ , jest nieodwracalna i prowadzi do powstania nieaktywnych metabolitów [84]. Odwracalność koniugacji aktywnych giberelin wskazuje, że procesy te mogą być częścią mechanizmu regulującego komórkową pulę aktywnego fitohormonu. Koniugaty GA są także uważane za formy transportowe hormonu, ponieważ przyłączenie glukozy zwiększa polarność powstających połączeń. Przemawiać może za tym obecność glukozydów w soku drzew [84]. Nieaktywne połączenia GA, które nie ulegają hydrolizie, stanowią przypuszczalnie produkty pośrednie kierowane na końcowy szlak kataboliczny. Utrata aktywności w wyniku koniugacji oraz zwiększenie polarności sprzyja ich odkładaniu w wakuoli [85].

## KONIUGATY KWASU ABCYSYNOWEGO

Kwas abscysynowy (ABA) działa jako negatywny regulator wzrostu w wielu procesach fizjologicznych i rozwojowych. Indukuje on stan spoczynkowy nasion i pąków, pobudza opadanie liści, stymuluje procesy starzenia i zamykania aparatów szparkowych oraz uczestniczy w regulacji procesów związanych z odpowiedzią roślin na abiotyczne czynniki stresowe, takie jak: susza, zasolenie czy niska temperatura [36,80]. ABA jest 15C kwasem organicznym z asymetrycznym atomem węgla przy C-1'. Naturalnie występującą formą jest S-(+)-ABA, w którym łańcuch boczny jest określany jako 2-*cis*,4-*trans* [36].

Podobnie jak w przypadku innych fitohormonów, poziom endogennego ABA zależy przede wszystkim od tempa biosyntezy, jego przemian metabolicznych oraz transportu. Regulacja stężenia komórkowego kwasu abscysynowego jest szczególnie interesująca, ponieważ zmienia się ono dramatycznie w odpowiedzi na zmiany rozwojowe oraz czynniki stresowe. Pierwszym zidentyfikowanym koniugatem ABA był jego ester glukozowy (ABA-Glc) wyizolowany jako naturalny składnik z nasion łubinu *Lupinus luteus* [17] (ryc. 4). ABA-glukoza jest u wielu roślin podstawowym koniugatem endogennym, a także powstaje najczęściej z egzogennie dostarczonego ABA. Koniugaty kwasu abscysynowego mogą stanowić 10–50% wolnego ABA [17]. Są one gromadzone w tkankach roślinnych w trakcie starzenia oraz w warunkach stresowych. Główna ich część jest stale odkładana w wakuoli jako końcowy produkt metabolizmu tej puli ABA, która ulega inaktywacji w wyniku koniugacji, a nie przez utlenienie do kwasu fazeinowego [43,85,99]. Enzymatyczne szlaki syntezy koniugatów ABA poznane są w niewielkim stopniu. Glukozylotransferazę katalizującą przeniesienie glukozy z UDPG na ABA z wytworzeniem ABA-Glc wyizolowano z kultur tkankowych *Macleaya microcarpa* [17]. Ostatnio, z kielków *Vigna angularis* oczyszczono podobny enzym i sklonowano gen kodujący to białko [98]. Jego sekwencja aminokwasowa wykazuje 30–44% identyczności ze znanymi UDP-glukozylotransferazami. Rekombinowane białko uzyskane z *E. coli* transformowanej genem glukozylotransferazy wykazywało specyficzność substratową względem ABA jako akceptora glukozy, natomiast inne regulatory wzrostu, takie jak: GA<sub>3</sub>, IAA, zeatyna, kwas salicylowy i kwas jasmonowy,



RYCINA 4. Kwas abscysnowy (ABA) i jego ester glukozowy (ABA-Glc)

nie były substratami dla tego enzymu. W normalnych warunkach poziom ekspresji genu był niski i zdecydowanie wzrastał pod wpływem wysokiego stężenia ABA, suszy czy zranienia. Indukcja glukozylotransferaz wysokim stężeniem hormonu znana jest w przypadku syntezy koniugatów IAA [8,49]. Można więc przypuszczać, że wzrost ekspresji genu glukozylotransferazy ABA w warunkach suszy lub zranienia jest rezultatem wzrostu poziomu fitohormonu w odpowiedzi na czynniki stresowe. Wyniki te potwierdzają wcześniejsze doniesienia o zwiększeniu stężenia koniugatów ABA pod wpływem stresu, choć znany jest także przykład spadku poziomu koniugatów, natomiast wzrost wolnego ABA w igłach *Pinus menziesci* podczas suszy [99]. Ekspresja genu specyficznej względem ABA glukozylotransferazy w warunkach stresowych sugeruje, że enzym ten uczestniczy w hormonalnej homeostazie redukując nadmiar wolnego hormonu poprzez jego glukozylację. Ustalono, że koniugaty syntetyzowane podczas stresu są bardzo stabilne i nie ulegają hydrolizie [99].

Inna pula koniugatów ABA jest syntetyzowana w korzeniach i transportowana do kielków za pośrednictwem ksylemu [27]. Obecność form związanych fitohormonu stwierdzono w soku ksylemowym u wielu roślin narażonych na suszę, zasolenie lub niedobór składników mineralnych [27,38,39]. Natura chemiczna oraz funkcje zewnątrzkomórkowej puli koniugatów ABA nie są dostatecznie poznane, jednak intensywne badania tej właśnie grupy koniugatów, prowadzone w ostatnich latach, dostarczają interesujących rezultatów. Przypuszcza się, że mogą one uczestniczyć w sygnalizacji stresu na drodze korzeń – łodyga, modyfikując intensywność sygnału ABA poprzez regulację stężenia hormonu [28,79,81,82]. Wśród autorów, zajmujących się poznaniem fizjologicznych funkcji ABA, panuje zgodna opinia, co do jego udziału w sygnalizacji stresowej. Korzenie wydają się być wrażliwe na wysuszenie gleby [cyt. za 82] i w

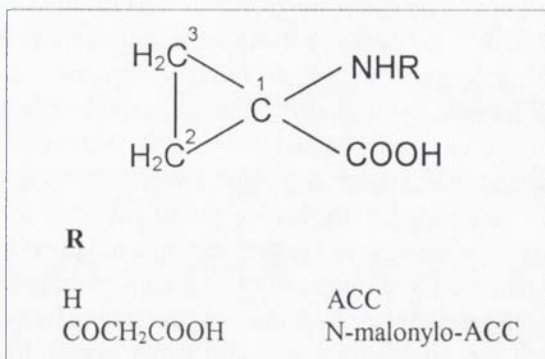
odpowiedzi na obniżony poziom wody w ich komórkach zachodzi wzrost biosyntezy hormonu. Jest on transportowany ksylemem do liści i merystemów łodygi jako sygnał stresu. Badania wykazały, że w czasie przemieszczania się hormonu obniża się jego poziom zarówno w soku ksylemowym, jak i komórkach parenchymy otaczających naczynia ksylemu, ponieważ znaczne jego ilości są kierowane do liści oraz komórek łodygi na obszarze międzywęzła [28,82]. Takich „strat” ABA w ksylemie nie obserwuje się, kiedy hormon jest transportowany w formie związanej. Estry glukozowe ABA mogą być transportowane na niezmienionym poziomie, gdyż błony cytoplazmatyczne są dla nich praktycznie nieprzepuszczalne [81]. Dzięki temu, koniugaty ABA przemieszczają się szybko do miejsc docelowych, w których ABA może być uwalniany w formie aktywnego hormonu. Aktywność zewnątrzkomórkowej  $\beta$ -glukozydazy stwierdzono w apoplacie z liści jęczmienia [21] i korzeniach kukurydzy [79,81]. Tak więc koniugaty ABA pełnią istotną rolę w utrzymaniu homeostazy ABA w ksylemie, co ma kluczowe znaczenie dla właściwej sygnalizacji w warunkach stresowych.

Koniugacja ABA ułatwia także transport wolnego fitohormonu, który jest ściśle związany z gradientem pH. Forma protonowa kwasu jest mocno hydrofobowa i łatwo penetruje przez błony biologiczne. Są one natomiast nieprzepuszczalne dla ABA w postaci anionu, co powoduje zatrzymywanie hormonu w alkalicznych przedziałach komórki i gromadzenie go w cytoplazmie. Glukozyllacja ABA umożliwiałaby eksport hormonu z komórki niezależnie od gradientu protonowego.

## KONIUGATY ACC – PREKURSORA ETYLENU

Etylen, jeden z najprostszych związków organicznych wykazujących aktywność biologiczną, jest nienasyconym węglowodorem występującym w formie gazowej. Oddziałuje on na rośliny w szerokim zakresie, między innymi hamuje wzrost wydłużeniowy roślin, stymuluje wzrost i dojrzewanie owoców, przerywa spoczynek bezwzględny nasion i pąków, przyspiesza proces starzenia się roślin oraz uczestniczy w odpowiedziach na stres wywołany przez wiele czynników środowiskowych [17,36].

Etylen jako jedyny spośród hormonów roślinnych nie tworzy koniugatów, natomiast koniugacji może ulegać jego bezpośredni prekursor, kwas 1-amino-cyklopropano-1-karboksylowy (ACC), który w reakcji z kwasem malonowym tworzy N-malonylo-ACC (ryc.5) [36,43]. Aktywność



RYCINA 5. Kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy (ACC) i jego koniugat

enzymu katalizującego tę reakcję wykazano w ekstraktach komórkowych z hipokotylu fasoli [cyt. za 43]. Sugestie odnośnie znaczenia reakcji malonylacji ACC są niejednoznaczne. Wyniki nielicznych w tym zakresie badań z zastosowaniem radioaktywnych ACC i N-malonylo-ACC sugerują, że w warunkach fizjologicznych koniugacja jest nieodwracalna, a powstały koniugat nie wykazuje żadnej aktywności i jest przypuszczalnie końcowym produktem metabolizmu ACC [43]. Jednak w niektórych przypadkach regulacja syntezy ACC poprzez tworzenie malonylo-ACC, może wpływać na poziom etylenu. Na przykład w pędach rzeżuchy wodnej oraz skrawkach liści tytoniu obserwowano przekształcanie malonylo-ACC do ACC [cyt. za 36].

## UWAGI KOŃCOWE

Wieloletnie badania nad hormonami roślinnymi dowodzą, że biologiczna aktywność tych związków zależy od ich właściwego stężenia, wzajemnych stosunków ilościowych, a także od wrażliwości komórek i tkanek docelowych, w których wywołują one specyficzne odpowiedzi. W celu utrzymania właściwego poziomu komórkowego aktywnych fitohormonów, rośliny wykształciły skomplikowany mechanizm regulacyjny, podatny na bodźce wewnętrzne i zewnętrzne sygnały środowiskowe. Jednym z elementów tego mechanizmu jest odwracalna i nieodwracalna koniugacja. Jeśli enzymatyczna synteza i hydroliza koniugatów może wpływać na homeostazę hormonalną, to wiedza na temat enzymów i genów uczestniczących w tych procesach jest istotna dla poznania mechanizmów wzrostu i rozwoju roślin.

Powszechność koniugacji, zarówno w odniesieniu do fitohormonów i pozostałych regulatorów wzrostu, które ulegają temu procesowi, jak i roślin, u których on zachodzi, wskazuje, że jest to ważny aspekt metabolizmu hormonów roślinnych. Ogromna różnorodność koniugatów jest przeszkodą w poznaniu szlaków ich biosyntezy i hydrolizy, a także ustaleniu, które z nich mają znaczenie biologiczne, a które są tylko wtórnymi produktami przemian fitohormonów. Uzyskane do tej pory wyniki wskazują, że o przeznaczeniu określonych koniugatów może decydować rodzaj reszty połączonej z hormonem [71]. W zależności od typu, poszczególne koniugaty pełnią różne funkcje w metabolizmie, transporcie, a niektóre wykazują również aktywność hormonalną. Niewykluczone, że związki te mają także inne niż przypisywane im do tej pory, ale jeszcze nie ustalone znaczenie. Dotyczy to szczególnie niektórych połączeń amidowych, na co wskazują uzyskane ostatnio rezultaty badań [96,97]. Obiecujące dla poznania roli koniugatów są badania genetyczne prowadzące do identyfikacji genów uczestniczących w koniugacji oraz umożliwiające selekcję mutantów i konstruowanie roślin transgenicznych transformowanych genami funkcjonującymi w metabolizmie hormonów lub ich koniugatów. Pozwoli to na manipulowanie poziomem tych związków, co umożliwi ustalenie ich roli fizjologicznej i przybliży poznanie udziału koniugatów w homeostazie hormonalnej.

## LITERATURA

- [1] AUER CA, COHEN JD, LALOUE M, COOKE TJ. Comparison of benzyl adenine metabolism in two *Petunia hybrida* lines differing in shoot organogenesis. *Plant Physiol* 1992; **98**:1035–1041.
- [2] AUER CA, COHEN JD. Identification of a benzyladenine disaccharide conjugate produced during shoot organogenesis in *Petunia* leaf explants. *Plant Physiol* 1993; **102**: 541–545.
- [3] AUER CA. Cytokinin conjugation: recent advances and patterns in plant evolution. *Plant Growth Regul* 1997; **23**: 17–32.
- [4] AUER CA. Discoveries and dilemmas concerning cytokinin metabolism. *J Plant Growth Regul* 2002; **21**: 24–31.
- [5] BAGNI N, TASSONI A. Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* 2001; **20**: 301–317.
- [6] BANDURSKI RS, COHEN JD, SLOVIN JP, REINECKE DM. Auxin biosynthesis and metabolism. [w] Davies PJ [red.] *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995: 39–65.
- [7] BARLIER I, KOWALCZYK M, MARCHANT A, LJUNG K, BHALERAO R, BENNETT M, SANDBERG G, BELLINI C. The *SUR2* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes the cytochrome P450 CYP83B1, a modulator of auxin homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 14819–14824.
- [8] BARRAT NM, DONG W, GAGE DA, MAGNUS V, TOWN CD. Metabolism of exogenous auxin by *Arabidopsis thaliana*: Identification of the conjugate *N*-(indol-3-ylacetyl)-glutamine and initiation of a mutant screen. *Physiol Plant* 1999; **105**: 207–217.
- [9] BARTEL B, FINK GR. ILR1, an amidohydrolase that releases active indole-3-acetic acid from conjugates. *Science* 1995; **268**: 1745–1748.
- [10] BARTEL B, LECLERE S, MAGIDIN M, ZOLMAN BK. Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: *de novo* synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid  $\beta$ -oxidation. *J Plant Growth Regul* 2001; **20**: 189–216.
- [11] BLAKESLEY D, LENTON JR, HORGAN R. Benzyladenine ribosylglucoside: a metabolite of benzyladenine in *Gerbera jamesonii*. *Phytochemistry* 1991; **30**: 387–388.
- [12] BOERJAN W, CERVERA MT, DELARUE M, BEECKMAN T, DEWITTE W, BELLINI C, CABOCHE M, van ONCKELEN H, van MONTAGU M, INZÉ D. *Superroot*, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. *Plant Cell* 1995; **7**: 1405–1419.
- [13] BRZOBHATY B, MOORE I, KRISTOFFERSEN P, BAKO L, CAMPOS N, SCHELL J, PALME K. Release of active cytokinin by  $\alpha$   $\beta$ -glucosidase localized to the maize root meristem. *Science* 1993; **262**: 1051–1054.
- [14] CELENZA jr JL, GRISAFI PL, FINK GR. A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 1995; **9**: 2131–2142.
- [15] COHEN JD, BANDURSKI RS. Chemistry and physiology of the bound auxins. *Ann Rev Plant Physiol* 1982; **33**: 403–430.
- [16] CREELMAN RA, MULLET JE. Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. *Plant Cell* 1997; **9**: 1211–1223.
- [17] DAVIES PJ. The plant hormones: Their nature, occurrence and functions. [w] Davies PJ [red.] *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers 1995: 1–12.
- [18] DAVIES RT, GOETZ DH, LASSWELL J, ANDERSON MN, BARTEL B. *IAR3* encodes an auxin conjugate hydrolase from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1999; **11**: 365–376.
- [19] DELARUE M, PRINSEN E, ONCKELEN HV, CABOCHE M, BELLINI C. *Sur2* mutations of *Arabidopsis thaliana* define a new locus involved in the control of auxin homeostasis. *Plant J* 1998; **14**: 603–611.
- [20] DELARUE M, MULLER P, BELLINI C, DELBARRE A. Increased auxin efflux in the IAA-overproducing *sur1* mutant of *Arabidopsis thaliana*: A mechanism of reducing auxin levels? *Physiol Plant* 1999; **107**: 120–127.
- [21] DIETZ K-J, SAUTER A, WICHERT K, MESSDAGHI D, HARTUNG W. Extracellular  $\beta$ -glucosidase activity in barley involved in the hydrolysis of ABA glucose conjugate in leaves. *J Exp Bot* 2000; **51**: 937–944.

- [22] ESTRUCH JJ, CHRIFI D, GROSSMANN K, SCHELL J, SPENA A. The plant oncogene *rolC* is responsible for the release of cytokinins from glucoside conjugates. *EMBO J* 1991; **10**: 2889–2895.
- [23] FALK A, RASK L. Expression of a zeatin-*O*-glucoside-degrading  $\beta$ -glucosidase in *Brassica napus*. *Plant Physiol* 1995; **108**: 1369–1377.
- [24] FULCHIERI M, LUCANGELI C, BOTTINI R. Inoculation with *Azospirillum lipoferum* affects growth and gibberellin status of corn seedling roots. *Plant Cell Physiol* 1993; **34**: 1305–1309.
- [25] GOPALRAY M, TSENG T-S, OLSZEWSKI N. The rooty gene of *Arabidopsis* encodes a protein with highest similarity to aminotransferases. *Plant Physiol* 1996; **111S**: 114.
- [26] HABERER G, KIEBER JJ. Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. *Plant Physiol* 2002; **128**: 354–362.
- [27] HANSEN H, DÖRFFLING K. Changes of free and conjugated abscisic acid and phaseic acid in xylem sap of drought-stressed sunflower plants. *J Exp Bot* 1999; **50**: 1599–1605.
- [28] HARTUNG W, SAUTER A, HOSE E. Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? *J Exp Bot* 2002; **53**: 27–32.
- [29] HEDDEN P. Modern methods for the quantitative analysis of plant hormones. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1993; **44**: 107–129.
- [30] ISHIKAWA K, KAMADA H, HARADA H. Morphology and hormone levels of tobacco and carrot tissues transformed by *Agrobacterium tumefaciens*. III. Formation of IAA conjugates in cultured carrot tissues transformed with wild-type and mutant T<sub>1</sub> plasmids. *Plant Cell Physiol* 1990; **31**: 777–782.
- [31] JACKSON RG, LIM E-K, LI Y, KOWALCZYK M., SANDBERG G, HOGGETT J, ASHFORD DA, BOWLES DJ. Identification and biochemical characterization of an *Arabidopsis* indole-3-acetic acid glucosyltransferase. *J Biol Chem* 2001; **276**: 4350–4356.
- [32] JACKSON RG, KOWALCZYK M, LI Y, HIGGINS G, ROSS J, SANDBERG G, BOWLES DJ. Over-expression of an *Arabidopsis* gene encoding a glucosyltransferase of indole-3-acetic acid: phenotypic characterization of transgenic lines. *Plant J* 2002; **32**: 573–583.
- [33] JAKUBOWSKA A, KOWALCZYK S, LEŻNICKI AJ. Enzymatic hydrolysis of 4-*O* and 6-*O*-indol-3-ylacetyl- $\beta$ -D-glucose in plant tissues. *J Plant Physiol* 1993; **142**: 61–66.
- [34] JAKUBOWSKA A, MURACH AP, KOWALCZYK S. Nowe cząsteczki sygnałowe i związki regulujące wzrost i rozwój roślin. *Post Biol Kom* 1996; **23**: 657–682.
- [35] JAKUBOWSKA A, KOWALCZYK S. Kwas abscysynowy – percepcja i transdukcja sygnału. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 633–656.
- [36] JANKIEWICZ LS. Regulatory wzrostu i rozwoju roślin. I. Właściwości i działanie. Warszawa: PWN 1997.
- [37] JENSEN PJ, BANDURSKI RS. Metabolism and synthesis of indole-3-acetic acid (IAA) in *Zea mays*. *Plant Physiol* 1994; **106**: 343–351.
- [38] JESCHKE WD, HOLOBRADA M, HARTUNG W. Growth of *Zea mays* L. plants with their seminal roots only. Effects on plant development, xylem transport, mineral nutrition and the flow and distribution of abscisic acid (ABA) as a possible shoot to root signal. *J Exp Bot* 1997a; **48**: 1229–1239.
- [39] JESCHKE W, PEUKE AD, PATE JS, HARTUNG W. Transport, synthesis and catabolism of abscisic acid (ABA) in intact plants of castor bean (*Ricinus communis* L.) under phosphate deficiency and moderate salinity. *J Exp Bot* 1997b; **48**: 1737–1747.
- [40] KENDE H, ZEEVAART JAD. The five „classical“ plant hormones. *Plant Cell* 1997; **9**: 1197–1210.
- [41] KESY JM, BANDURSKI RS. Partial purification and characterization of indol-3-ylacetylglucose: myo-inositol indol-3-ylacetyltransferase (indoleacetic acid-inositol synthase). *Plant Physiol* 1990; **94**: 1598–1604.
- [42] KING JJ, STIMART DP, FISHER RH, BLEECKER AB. A mutation altering auxin homeostasis and plant morphology in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 1995; **7**: 2023–2037.
- [43] KLECZKOWSKI K, SCHELL J. Phytohormone conjugates: nature and function. *Crit Rev Plant Sci* 1995; **14**: 283–298.
- [44] KOWALCZYK S, BANDURSKI RS. Isomerization of 1-*O*-indol-3-ylacetyl- $\beta$ -D-glucose. *Plant Physiol* 1990; **94**: 4–12.
- [45] KOWALCZYK S, BANDURSKI RS. Enzymic synthesis of 1-*O*-(indol-3-ylacetyl)- $\beta$ -D-glucose. *Biochem J* 1991; **279**: 509–514.
- [46] KOWALCZYK S, JAKUBOWSKA A. Receptory etylenu, cytokinin i brasinosteroidów – transmembranowymi kinazami białkowymi. *Post Biol Kom* 1999; **26**: 3–32.
- [47] KOWALCZYK S, JAKUBOWSKA A. Gibereliny – percepcja i transdukcja sygnału. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 397–423.

- [48] KOWALCZYK S, JAKUBOWSKA A, BANDURSKI RS. 1-Naphtalene acetic acid induces indole-3-ylacetylglucose synthase in *Zea mays*. *Plant Growth Regul* 2002; **38**: 127–134.
- [49] KOWALCZYK S, MACIEJEWSKA B. Roślinne peptydy sygnałowe. *Post Biol Kom* 2002; **29**: 181–201.
- [50] KOWALCZYK S, JAKUBOWSKA A, ZIELIŃSKA E, BANDURSKI RS. Bifunctional indole-3-acetyl transferase catalyzes synthesis and hydrolysis of indole-3-acetyl-*myo*-inositol in immature endosperm of *Zea mays*. *Physiol Plant* 2003 (w druku).
- [51] KRISTOFFERSEN P, BRZOBOHATY B, HÖHFELD I, BAKO L, MELKONIAN H, PALME K. Developmental regulation of the maize *Zm-p60.1* gene encoding  $\alpha$ - $\beta$ -glucosidase located to plastids. *Planta* 2000; **210**: 407–415.
- [52] LeCLERE S, TELLEZ R, RAMPEY RA, MATSUDA SPT, BARTEL B. Characterization of a family of IAA-amino acid conjugate hydrolases from *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 2002; **277**: 20446–20452.
- [53] LEHFELDT C, SHIRLEY AM, MEYER K, RUEGGER MO, CUSUMANO JC, VIITANEN PV, STRACK D, CHAPPLE C. Cloning of the *SNG1* gene of *Arabidopsis* reveals a role for a serine carboxypeptidase-like protein as an acyltransferase in secondary metabolism. *Plant Cell* 2000; **12**: 1295–1306.
- [54] LEHMAN A, BLACK R, ECKER JR. *Hookless1*, an ethylene response gene, is required for differential cell elongation in the *Arabidopsis* hypocotyl. *Cell* 1996; **85**: 183–194.
- [55] LETHAM DS, PALNI LMS. The biosynthesis and metabolism of cytokinins. *Ann Rev Plant Physiol* 1983; **34**: 163–197.
- [56] LEWAK S. Hormony roślinne – kierunki badań ostatniego dziesięciolecia. *Kosmos* 1995; **44**: 601–622.
- [57] LEZNICKI AJ, BANDURSKI RS. Enzymic synthesis of indole-3-acetyl-1-*O*- $\beta$ -D-glucose. I. Partial purification and characterization of the enzyme from *Zea mays*. *Plant Physiol* 1988a; **88**: 1474–1480.
- [58] LEZNICKI AJ, BANDURSKI RS. Enzymic synthesis of indole-3-acetyl-1-*O*- $\beta$ -D-glucose. II. Metabolic characteristics of the enzyme. *Plant Physiol* 1988b; **88**: 1481–1485.
- [59] LI AX, STEFFENS JC. An acyltransferase catalyzing the formation of diacylglycerol is a serine carboxypeptidase-like protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 6902–6907.
- [60] LINDSEY K, CASSON S, CHILLEY P. Peptides: new signaling molecules in plants. *Trends Plant Sci* 2002; **7**: 78–83.
- [61] LJUNG K, HULL AK, KOWALCZYK M, MARCHANT A, CELENZA J, COHEN JD, SANDBERG G. Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 2002; **49**: 249–272.
- [62] LUDWIG-MÜLLER J, EPSTEIN E, HILGENBERG W. Auxin-conjugate hydrolysis in Chinese cabbage: Characterization of an amidohydrolase and its role during infection with clubroot disease. *Physiol Plant* 1996; **97**: 627–634.
- [63] MARTIN RC, MOK MC, MOK DWS. Isolation of a cytokinin gene, *ZOG1*, encoding zeatin *O*-glucosyltransferase from *Phaseolus lunatus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999a; **96**: 284–289.
- [64] MARTIN RC, MOK MC, MOK DWS. A gene encoding the cytokinin enzyme zeatin *O*-xylosyltransferase of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol* 1999b; **120**: 553–557.
- [65] MARTIN RC, CLOUD KA, MOK MC, MOK DWS. Substrate specificity and domain analyses of zeatin *O*-glucosyltransferases. *Plant Growth Regul* 2000; **32**: 289–293.
- [66] McGAW BA, BURCH LR. Cytokinin biosynthesis and metabolism. [w] Davies PD [red.] *Plant Hormones Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publisher 1995: 98–117.
- [67] MICHALCZUK L, BANDURSKI RS. UDP-glucose: indoleacetic acid glucosyl transferase and indoleacetyl-glucose: *myo*-inositol indoleacetyl transferase. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; **93**: 588–592.
- [68] MICHALCZUK L, BANDURSKI RS. Enzymic synthesis of 1-*O*-indol-3-ylacetyl- $\beta$ -D-glucose and indol-3-ylacetyl-*myo*-inositol. *Biochem J* 1982; **207**: 273–281.
- [69] MOK DWS, MOK MC. Cytokinin metabolism and action. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 2001; **52**: 89–118.
- [70] NORMANLY J, SLOVIN JP, COHEN JD. Rethinking auxin biosynthesis and metabolism. *Plant Physiol* 1995; **107**: 323–329.
- [71] NORMANLY J. Auxin metabolism. *Physiol Plant* 1997; **100**: 431–442.
- [72] NORMANLY J, BARTEL B. Redundancy as a way of life – IAA metabolism. *Cur Opin Plant Biol* 1999; **2**: 207–213.
- [73] OFFRINGA R, HOOYKAAS P. Molecular approaches to study plant hormone signalling. [w] Hooykaas PJJ, Hall MA, Libbenga KR [red.] *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*. Elsevier Science B.V. 1999: 391–410.

- [74] PICCOLI P, LUCANGELI CD, SCHNEIDER G, BOTTINI R. Hydrolysis of [ $^{17,17-^2}\text{H}_2$ ]gibberellin  $\text{A}_{20}$ -glucoside and [ $^{17,17-^2}\text{H}_2$ ]gibberellin  $\text{A}_{20}$ -glucosyl ester by *Azospirillum lipoferum* cultured in a nitrogen-free biotin-based chemically-defined medium. *Plant Growth Regul* 1997; **23**: 179–182.
- [75] THE PLANT CELL. 2002. **14**; Supplement.
- [76] ROMANO CP, HEIN MB, KLEE HJ. Inactivation of auxin in tobacco transformed with the indoleacetic acid-lysine synthetase gene of *Pseudomonas savastanoi*. *Genes Dev* 1991; **5**: 438–446.
- [77] RYAN CA, PEARCE G, SCHEER J, MOURA DS. Polypeptide hormones. *Plant Cell* 2002; **14S**: 251–264.
- [78] SASAKI K, SAKAI S, KAMADA H, HARADA H. Identification of conjugated IAA in carrot crown gall as indole-3-acetylaspartic acid (IAAsp) by LC/MS. *J Plant Growth Regul* 1994; **13**: 183–186.
- [79] SAUTER A, HARTUNG W. Radial transport of abscisic acid conjugates in maize roots: ist implication for long distance stress signals. *J Exp Bot* 2000; **51**: 929–935.
- [80] SAUTER A, DAVIES WJ, HARTUNG W. The long-distance abscisic signal in the drought plant: the fate of the hormon on ist way from root to shoot. *J Exp Bot* 2001; **52**: 1991–1997.
- [81] SAUTER A, DIETZ K-J, HARTUNG W. A possible stress physiological role abscisic acid conjugates in root-to-shoot signalling. *Plant Cell Environ* 2002; **25**: 223–228.
- [82] SAUTER A, HARTUNG W. The contribution of internode and mesocotyl tissues to root-to-shoot signalling of abscisic acid. *J Exp Bot* 2002; **53**: 297–302.
- [83] SCHNEIDER G, SCHLIEMANN W. Gibberellin conjugates: an overview. *Plant Growth Regul* 1994; **15**: 247–260.
- [84] SEMBDNER G, GROSS D, LIFBISCH H-W, SCHNEIDER G. Biosynthesis and metabolism of plant hormones. [w] McMillan J [red.] Encyclopedia of Plant Physiology. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag 1980; **9**: 281–444.
- [85] SEMBDNER G, ATZORN R, SCHNEIDER G. Plant hormone conjugation. *Plant Molec Biol* 1994; **26**: 1459–1481.
- [86] SENNS B, FUCHS P, SCHNEIDER G. GC-MS quantification of gibberellin  $\text{A}_{20}$ -13-O-glucoside and gibberellin  $\text{A}_{20}$ -2-O-glucoside in developing barley caryopses. *Phytochemistry* 1998; **48**: 1275–1280.
- [87] SENNS B, FUCHS P, SCHNEIDER G. Distribution of  $\text{GA}_{20}$ -13-O-glucoside and reconversion of [ $^{17-^2}\text{D}$ ]GA $_{20}$ -13-O-glucoside in caryopses of *Hordeum vulgare* L.cv. Himalaya. *Plant Growth Regul* 1999; **27**: 199–204.
- [88] SHIRLEY AM, McMICHAEL CM, CHAPPLE C. The *sng2* mutant of *Arabidopsis* is defective in the gene encoding the serine carboxypeptidase-like protein sinapoylglucose: choline sinapoyltransferase. *Plant J* 2001; **28**: 83–94.
- [89] SITBON F, ÖSTIN A, SUNDBERG B, OLSSON O, SANDBERG G. Conjugation of indole-3-acetic acid (IAA) in wild-type and IAA-overproducing transgenic tobacco plants, and identification of the main conjugates by frit-fast atom bombardment liquid chromatography - mass spectrometry. *Plant Physiol* 1993; **101**: 313–320.
- [90] SLOVIN JP, BANDURSKI RS, COHEN JD. Auxin. [w] Hooykaas PJJ, Hall MA, Libbenga KR [red.] Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones. Elsevier Science B.V. 1999: 115–140.
- [91] STRNAD M. The aromatic cytokinins. *Physiol Plant* 1997; **101**: 674–688.
- [92] SZERSZEN JB, SZCZYGLÓWSKI K, BANDURSKI RS. *iaglu*, a gene from *Zea mays* involved in conjugation of growth hormone indole-3-acetic acid. *Science* 1994; **265**: 1699–1701.
- [93] SZTEIN AE, COHEN JD, SLOVIN JP, COOKE JD. Auxin metabolism in representative land plants. *Am J Bot* 1995; **82**: 1514–1521.
- [94] SZTEIN AE, COHEN JD, COOKE TJ. Evolutionary patterns in the auxin metabolism of green plants. *Int J Plant Sci* 2000; **16**: 849–859.
- [95] TAM YY, EPSTEIN E, NORMANLY J. Characterization of auxin conjugates in *Arabidopsis*. Low steady-state levels of indole-3-acetyl-aspartate, indole-3-acetyl-glutamate, and indole-3-acetyl-glucose. *Plant Physiol* 2000; **123**: 589–595.
- [96] TAM YY, NORMANLY J. Overexpression of a bacterial indole-3-acetyl-L-aspartic acid hydrolase in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 2002; **115**: 513–522.
- [97] WALZ A, PARK S, SLOVIN JP, LUDWIG-MÜLLER J, MOMONOKI YS, COHEN JD. A gene encoding a protein modified by the phytohormone indoleacetic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 1718–1723.



- [98] XU Z-J, NAKAJIMA M, SUZUKI Y, YAMAGUCHI I. Cloning and characterization of the abscisic acid-specific glucosyltransferase gene from adzuki bean seedlings. *Plant Physiol* 2002; **129**: 1285–1295.
- [99] ZEEVAART JAD. Abscisic acid metabolism and its regulation. [w] Hoooykaas PJJ, Hall MA, Libbenga KR [red.] *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*. Elsevier Science B.V. 1999: 189–207.
- [100] ZHANG H, HORGAN KJ, REYNOLDS PHS, NORRIS GE, JAMESON PE. Novel cytokinins: the predominant forms in mature buds of *Pinus radiata*. *Physiol Plant* 2001; **112**: 127–134.
- [101] ZIELIŃSKA E, KOWALCZYK S. Percepcja i transdukcja sygnału auksynowego. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 155–183.

*Redaktor prowadzący – Maria Olszewska*

*Otrzymano: 07.02.2003 r.*

*Przyjęto: 15.04.2003 r.*

*ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń*

*anjakubo@cc.uni.torun.pl*



## FOLIKULARNE KOMÓRKI DENDRYTYCZNE – ROZWÓJ I FUNKCJA

### FOLLICULAR DENDRITIC CELLS – DEVELOPMENT AND FUNCTION

Iwona HUS, Jacek ROLIŃSKI

Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku AM w Lublinie  
Zakład Immunologii Klinicznej AM w Lublinie

*Streszczenie:* Folikularne komórki dendrytyczne (ang. *follicular dendritic cells*, FDC) stanowią odrębną populację komórek prezentujących antygen i różnią się od mieloidalnych komórek dendrytycznych pochodzeniem, funkcją oraz obecnością odmiennych markerów powierzchniowych. FDC występują w obrębie strefy limfocytów B grudek chłonnych wtórnych narządów limfatycznych i odgrywają bardzo istotną rolę w rozwoju ośrodków rozmnażania. Mają one zdolność wychwytywania kompleksów antygen-przeciwciała, które przez długi czas (miesiące, a nawet lata) mogą pozostawać na ich powierzchni. Wypustki cytoplazmatyczne FDC tworzą gęstą sieć oplatającą limfocyty B. Bezpośredni kontakt między FDC i limfocytami B jest bowiem niezbędny w procesach mutacji somatycznej, dojrzewania powinowactwa, przełączania klas oraz powstawania limfocytów B pamięci immunologicznej.

*Słowa kluczowe:* folikularne komórki dendrytyczne, ośrodki rozmnażania, rozwój limfocytów B.

*Summary:* Follicular dendritic cells (FDC) are distinct antigen presenting cells, that differ from myeloid dendritic cells in origin, function and cell surface markers. FDC reside within B-cell follicles of secondary lymphoid tissue and play an essential role in germinal center formation. The hallmark of FDC is ability to trap antigen-antibody complexes and retain them on the surface for long periods of time (from months to years). Their long dendritic processes form a weblike network, which intimately associates with neighboring B cells. The intimate contact between these two cells is believed to be necessary for such important events, as: somatic mutation, affinity maturation, class switching and development of memory B cells.

*Key words:* follicular dendritic cells, germinal center, B cell growth.

Komórki dendrytyczne (ang. *dendritic cells*, DC) należą do komórek prezentujących antygen i stanowią heterogenną populację leukocytów obecnych w obrębie większości tkanek organizmu. Istnieje kilka odrębnych subpopulacji DC pochodzących od hematopoetycznych komórek macierzystych CD34+, różniących się morfologią, immunofenotypem i funkcją. Należą do nich: mieloidalne komórki dendrytyczne (wśród

których wyróżnia się śródmiąższowe DC, komórki Langerhansa, komórki welonowate oraz komórki splatające się) i limfoidalne komórki dendrytyczne. DC wywodzące się z linii mieloidalnej mają silne właściwości prezentacji antygeny limfocytom T i uczestniczą w rozwoju pierwotnej i wtórnej odpowiedzi immunologicznej. Spośród wszystkich komórek prezentujących antygen tylko one mają zdolność indukcji odpowiedzi pierwotnej. Dzięki tym właściwościom komórki te stanowią obecnie przedmiot badań doświadczalnych i klinicznych, dotyczących wykorzystania ich jako „naturalnych adiuwantów” w immunoterapii nowotworów. DC wywodzące się z linii limfoidalnej (komórki dendrytyczne grasicy) biorą udział w powstawaniu autotolerancji limfocytów T [22]. Natomiast DC grudek chłonnych (folikularne) wywierają wpływ na wzrost, różnicowanie i funkcję limfocytów B ośrodków rozmnażania.

Prawidłowy przebieg wtórnej odpowiedzi immunologicznej zależy od ścisłego współdziałania trzech rodzajów komórek w obrębie ośrodków rozmnażania grudek chłonnych: limfocytów B, limfocytów T oraz folikularnych komórek dendrytycznych. Folikularne komórki dendrytyczne (ang. *follicular dendritic cells*, FDC) odgrywają bardzo istotną rolę w rozwoju ośrodków rozmnażania. Bezpośredni kontakt między FDC i limfocytami B jest bowiem niezbędny w procesach mutacji somatycznej, dojrzewania powinowactwa, przełączania klas oraz powstawania limfocytów B pamięci immunologicznej.

## LOKALIZACJA ORAZ CECHY MORFOLOGICZNE FDC

Folikularne komórki dendrytyczne występują w obrębie strefy limfocytów B grudek chłonnych wtórnych narządów limfatycznych, np. węzłów chłonnych, śledziony, migdałków. Obecne są również w grudkach chłonnych narządów objętych przewlekłym procesem zapalnym związanym z aktywacją limfocytów B, w przebiegu chorób autoimmunologicznych, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów [13,28] czy choroba Hashimoto. FDC stanowią niewielką część (1–2%) wszystkich komórek ośrodków rozmnażania. Są one słabo widoczne w konwencjonalnym mikroskopie świetlnym. Charakteryzują się owalnym jądrem (częste są także 2 jądra) z niewielką ilością chromatyny i niewyraźnie zarysowanymi jąderkami [24]. Cechą charakterystyczną FDC, podobnie jak mieloidalnych komórek dendrytycznych są liczne wypustki cytoplazmatyczne (dendryty). Wypustki te tworzą gęstą sieć oplatającą limfocyty B ośrodków rozmnażania, co umożliwia bliski kontakt tych komórek. Sieć, którą tworzą FDC wewnątrz ośrodków rozmnażania w obrębie strefy jasnej wtórnych grudek chłonnych, uwidocznić można jedynie przy pomocy metod immunohistochemicznych z użyciem przeciwciał monoklonalnych, takich jak: Ki-M4, Ki-M4P, R4/23, DRC-1, HJ-2 [14,24]. Przeciwciała Ki-M4P i Ki-FDC1 mogą być stosowane w wycinkach tkankowych utrwalonych w formalinie i parafinie. Reakcja zaznaczona jest najsilniej w obrębie stref obszarów bogatych w centrocyty. Wypustki dendrytyczne znajdują się

tu w bliskim kontakcie z prawie każdą komórką limfoidalną. Intensywność reakcji jest słabsza w strefie ciemnej. Na granicy oraz między wewnętrzną warstwą komórek strefy płaszcza widoczny jest jedynie delikatny pierścień wypustek FDC [24].

## POCHODZENIE ORAZ IMMUNOFENOTYP FDC

FDC różnią się od mieloidalnych komórek dendrytycznych funkcją, pochodzeniem i obecnością odmiennych markerów powierzchniowych. Pochodzenie FDC pozostaje kontrowersyjne, przypuszczalne komórki prekursorowe to: komórki mezenchymy, podścieliska szpiku lub podścieliska wtórnej tkanki limfatycznej. Związek FDC z komórkami podścieliska sugeruje ekspresja aktyny mięśni gładkich oraz markera komórek podścieliska BST-1. [4]. Badania prowadzone na myszach SCID (ang. *Severe Combined ImmunoDeficiency syndrome*) przez Kapasiego i wsp. [12] wykazały, że FDC pochodzą od komórek prekursorowych rozwijających się w pierwotnych narządach limfatycznych, skąd migrują one następnie do wtórnych narządów limfatycznych. Istnieją także przypuszczenia, że FDC wywodzą się z hematopoetycznych komórek prekursorowych. Przemawiać za tym może fakt, iż przeciwciało monoklonalne KiM4 swoiste dla ludzkich FDC opracowane zostało początkowo dla komórek linii U-937, wywodzącej się z makrofagów i reaguje także z jednojądrzastymi komórkami ludzkiej krwi obwodowej. [12] Większość badaczy uważa jednak, że FDC nie należą do leukocytów, czego potwierdzeniem jest brak markera powierzchniowego CD45, a obecność na ich powierzchni innych markerów jest niewystarczająca, aby zakwalifikować je do określonej linii komórek hematopoetycznych. Interesujący jest fakt, iż na powierzchni FDC stwierdza się ekspresję zarówno markerów mieloidalnych, jak i markerów linii limfocytów B, przy braku antygenów typowych dla linii limfocytów T oraz NK [27]. Bardzo istotne znaczenie ma ekspresja receptorów dla trzeciej składowej dopełniacza: CR1 (CD35), CR2 (CD21-długa izoforma) i CR3 (CD11b) oraz jednego z trzech receptorów dla fragmentu Fc IgG (FcγRIIB). Przy pomocy tych receptorów następuje bowiem wiązanie kompleksów antygen-przeciwciało. Obecność cząsteczek adhezyjnych z grupy integryn, tj. VLA-3, -4, -5, -6, ICAM-1 na powierzchni FDC decyduje o adhezyjnych właściwościach tych komórek (24). Pełny fenotyp FDC przedstawiony jest w tabeli 1 [4,5,14,27].

## WPLYW CYTOKIN NA ROZWÓJ I FUNKCJĘ FDC

Zarówno prawidłowy rozwój, jak i funkcja dojrzałych FDC zależne są bezpośrednio od obecności w mikrośrodkowisku odpowiednich cytokin: czynnika martwicy nowotworów (ang. *Tumor Necrosis Factor*, TNF) oraz limfotoksyny (ang. *LymphoToxin*, LT)  $\alpha/\beta$ . Badania prowadzone na zwierzętach (myszy z delecją genów dla odpowiednich cytokin, ang. *knock-out mice*) wykazały, że wywierają one swe

TABELA 1 Ekspresja antygenów na powierzchni FDC

Antygeny	Przeciwciało monoklonalne	Pozycja literatury
<b>Swoiste liniowo:</b>		
<b>Linia mieloidalna</b>		
CD14	Mo2	4,5,14,27
CR3 (CD11b)	Mo1	4,5,27
63D3	63D3	27
<b>limfocyty B</b>		
CD19	B4	14,27
CR2 (CD21)	B2	27
CD73	7G2	5
<b>Receptory dopełniacza, cząsteczki adhezyjne, receptory Fc</b>		
<b>Receptory dopełniacza</b>		
CR1 CD35 (C3bR)	543	5,14,27
CR2 CD21 (C3dR)	B2	5,14,27
CR3 CD11b (C3biR)	Mo1	4,5,27
<b>Cząsteczki adhezyjne</b>		
CD29, integryna $\beta$ 1	K20	4,5
VLA 3	J143	27
VLA 4. CD49d	8F2	4,5,14,27
VLA 5	BIE5	27
VLA 6	GOH3	27
VLA łańcuch $\beta$	4B4	27
ICAM-1	RR1	5,14,27
VCAM-1	4B9	5,14
<b>Receptory Fc</b>		
Receptor Fc o niskim powinowactwie dla IgE (CD23)	Blast 2	14,27
<b>Inne</b>		
CD40	G28-5	4,5,14,27
DRC-1	R4/23	14,27
CD37	G28/1	27
HLA klasa I	W6/32	27
HLA klasa II	6/7	27

działanie poprzez dwa odrębne receptory. TNF oraz prawdopodobnie rozpuszczalna postać  $LT\alpha$  działają poprzez receptor dla TNF o masie 55 kD (TNF-RI), natomiast  $LT\alpha/\beta$  związana z błoną komórkową poprzez receptor dla  $LT\beta$  ( $LT\beta$ R) [23,28]. Według Wanga i wsp. [32] działanie obu cytokin jest komplementarne. Sygnał przekazywany przez TNF jest bardziej istotny we wczesnych fazach rozwoju FDC, natomiast obecność  $LT$  jest ważniejsza dla dojrzewania oraz zachowania już ukształtowanej sieci FDC [23,32]. Badania Mackay i Browinga [20] wykazały także odmienny wpływ obu cytokin na funkcję dojrzałych FDC. Zakres działania  $LT\alpha/\beta$  jest szerszy. Wspomaga ona zarówno utrzymanie dotychczasowej sieci FDC, jak i

prawdopodobnie transport kompleksów immunologicznych ze strefy brzeżnej, podczas gdy rola TNF wydaje się być ograniczona do zachowania już istniejącej sieci FDC [20]. Obie cytokiny wytwarzane są zarówno przez limfocyty B, jak i limfocyty T. Poglądy na temat wpływu pochodzenia obu cytokin na ich udział w rozwoju FDC pozostają kontrowersyjne. Badania Endresa i wsp. [7] wykazały, że jedynie TNF wytwarzany przez limfocyty B w efektywny sposób stymuluje rozwój FDC. Całkowicie odmiennie wyniki uzyskali Wang i wsp. [32], według nich pochodzenie TNF nie ma znaczenia, natomiast niezbędnym warunkiem prawidłowego rozwoju FDC jest obecność LT wydzielanej przez limfocyty B. Badania *in vitro* prowadzone na linii HK, wywodzącej się z FDC uzyskanych z ludzkich migdałków wykazały, że bardzo istotny wpływ na rozwój i proliferację FDC mają aktywowane limfocyty T [14] zarówno poprzez bezpośredni kontakt między komórkami przy udziale CD40 (na powierzchni komórek HK) i CD40L (na limfocytach T) oraz interakcji VLA-4/VCAM-1, LFA-1/ICAM-1, jak i w drodze parakrynej za pośrednictwem cytokin: interleukiny 4 (ang. *interleukin 4*, IL-4) oraz interferonu  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ). Zmiany fenotypu komórek HK oraz komórek innych linii wywodzących się z FDC, polegające na pojawieniu się ekspresji ICAM-1 (pod wpływem aktywowanych limfocytów T), ekspresji VCAM-1 (pod wpływem IL-4) oraz ekspresji HLA-DR (pod wpływem IFN $\gamma$ ), sugerują, iż udział limfocytów T w regulacji dojrzewania limfocytów B ośrodków rozmnażania odbywa się częściowo także poprzez wpływ na rozwój FDC [14]. Ekspresja antygeny DRC-1, swoistego markera ludzkich FDC szybko zanika w warunkach hodowli, co sugeruje, iż niezależnie od linii komórkowej, z której wywodzą się FDC, niezmiernie istotną rolę w ich rozwoju odgrywa właściwe mikrośrodowisko, tworzone prawdopodobnie głównie przez komórki limfoidalne.

## ROLA FDC W PROCESACH PROLIFERACJI I RÓŻNICOWANIA LIMFOCYTÓW B OŚRODKÓW ROZMNAŻANIA

W przebiegu wtórnej odpowiedzi immunologicznej immunogen ulega szybkiemu przekształceniu w kompleks immunologiczny przy udziale przeciwciał powstałych w wyniku wcześniejszej immunizacji. W pierwotnej odpowiedzi immunologicznej stymulacja dziewiczych limfocytów B i T przebiega bez udziału FDC, ponieważ muszą najpierw powstać przeciwciała, które biorą udział w tworzeniu kompleksów immunologicznych (ang. *immune complexes*, IC) wychwytywanych przez FDC. Należy jednak podkreślić, że natychmiast po powstaniu przeciwciał w ramach odpowiedzi pierwotnej tworzą się kompleksy immunologiczne, które wychwytywane są przez FDC, część z nich ulega przekształceniu w tzw. ikkosomy (ang. *icosomes*: *immune complex-coated bodies*). Następnie kompleksy te, rzadziej przetworzone antygeny przenoszone są na powierzchnię komórki, gdzie pozostają obecne przez długi czas – miesiące lub nawet

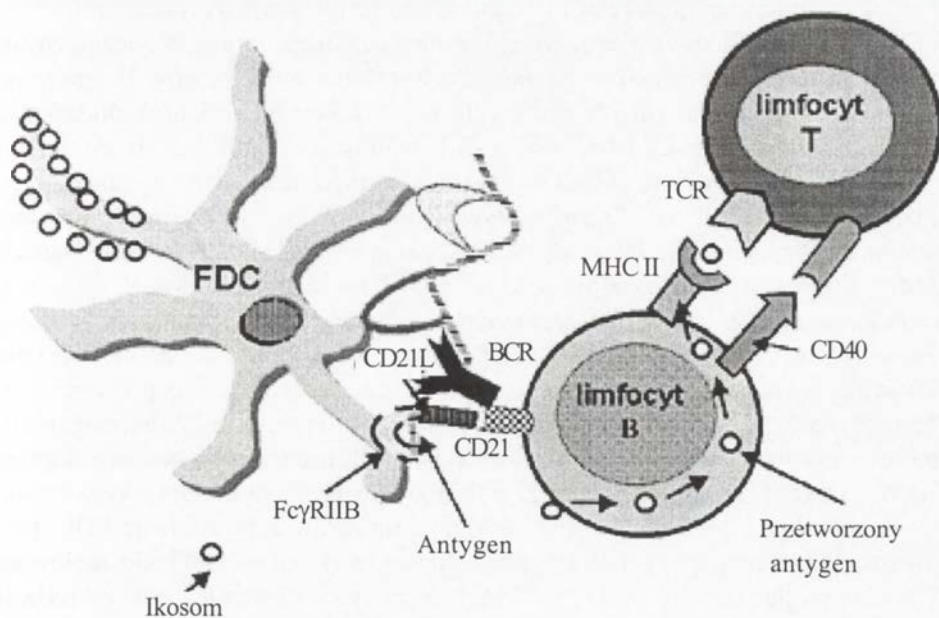
lata [29,30]. FDC występują w dużej ilości w obrębie strefy limfocytów B ośrodków rozmnażania grudek chłonnych. Obecne są tam proliferujące limfocyty B (centroblasty), które po zakończeniu podziałów przechodzą w postać centrocytów. Limfocyty B mające receptory o wysokim powinowactwie rozpoznają kompleks immunologiczny na powierzchni FDC, następuje pinocytoza i kossomu oraz przetworzenie antygeny. Kolejnym etapem jest prezentacja kompleksu: peptyd-MHC antygenowo swoistym limfocytom T, które dostarczają sygnałów wzrostu i różnicowania limfocytom B za pośrednictwem interakcji CD40-CD40L. Długotrwałe przetrzymywanie antygeny na powierzchni FDC zapewnia przetrwanie klonów limfocytów B pamięci immunologicznej, a tym samym utrzymanie odpowiedniego stężenia przeciwciał w surowicy.

W warunkach *in vitro* FDC oraz limfocyty B tworzą spontanicznie niewielkie skupiska komórkowe, w których jedna FDC obejmuje wypustkami kilka limfocytów B. Adhezja obu rodzajów komórek zachodzi przy udziale ICAM-1/CD54, VCAM-1 i receptora dla dopełniacza C3bi (CD11b) na powierzchni FDC oraz LFA-1- $\alpha$ /CD11a, LFA-1- $\beta$ /CD18, VLA-4/CD49d [11,16,17] na powierzchni limfocytów B. Wiązanie FDC i limfocytów B jest dynamicznym procesem zależnym od temperatury oraz regulowanym przez stężenie jonów  $Ca^{+2}$  oraz  $Mg^{+2}$ . Prawidłowy przebieg interakcji zachodzących między FDC i limfocytami B wymaga obecności odpowiednich receptorów oraz ligandów na powierzchni obu komórek: CD 21, CD11b, Fc $\gamma$ RIIB, CD21L/CR2R na FDC oraz BCR (receptor limfocyta B, ang. *B-cell receptor*) na limfocytach B. Li i wsp. na podstawie badań *in vitro* prowadzonych na linii komórkowej HK, odkryli na powierzchni FDC nową cząsteczkę sygnałową 8D6 Ag odgrywającą istotną rolę w proliferacji limfocytów B ośrodków rozmnażania [19,34]. Dwa główne mechanizmy niezbędne do indukcji silnej wtórnej odpowiedzi immunologicznej są następujące (ryc. 1):

1. antygen, związany w postaci IC na powierzchni FDC przy udziale dopełniacza oraz Fc $\gamma$ RIIB łączy się z BCR na powierzchni limfocytów B. Interakcja między antygenem i BCR stanowi silny sygnał indukujący aktywację i różnicowanie limfocytów B;
2. ligand dla CD21 (CD21L), stanowiący część składową dopełniacza, związany z IC na powierzchni FDC łączy się równocześnie z BCR oraz CD21 na powierzchni limfocytów B. To równoczesne wiązanie BCR i CD21 stanowi silny sygnał kostymulujący aktywację i różnicowanie limfocytów B [8].

W przypadku braku FDC w populacji limfocytów B i T pamięci immunologicznej kompleksy immunologiczne stymulują wytwarzanie przeciwciał w bardzo niewielkim stopniu lub w ogóle ze względu na fakt, iż za ich pośrednictwem dochodzi do krzyżowego wiązania BCR oraz Fc $\gamma$ RIIB na powierzchni limfocytów B. Powoduje to aktywację motywu hamowania w immunoreceptorze tyrozyny (ang. *Immunoreceptor Tyrosine based-Inhibition Motif*, ITIM) [31], co stanowi sygnał hamujący proliferację limfocytów B (działanie immunosupresyjne). Dodanie FDC do stymulowanych kompleksami immunologicznymi limfocytów dramatycznie zwiększa nasilenie wtórnej odpowiedzi immunologicznej w warunkach *in vitro* (od 10 do 10000 razy) [8]. W obecności





RYCINA 1. Interakcje zachodzące między FDC, limfocytami B i limfocytami T w ośrodkach rozmnażania: \* – antygen, związany w postaci IC na powierzchni FDC przy udziale dopełniacza oraz Fc $\gamma$ RIIB łączy się z BCR na powierzchni limfocytów B; interakcja między antygenem i BCR stanowi silny sygnał indukujący aktywację i różnicowanie limfocytów B; \* – ligand dla CD21 (CD21L), związany z IC na powierzchni FDC łączy się równocześnie z BCR oraz CD21 na powierzchni limfocytów B; to równoczesne wiązanie BCR i CD21 stanowi silny sygnał kostymulujący aktywację i różnicowanie limfocytów B; \* – przetworzony antygen prezentowany jest w postaci kompleksu: peptyd-MHC antygenowo swoistym limfocytom T, które dostarczają sygnałów wzrostu i różnicowania limfocytom B za pośrednictwem interakcji CD40-CD40L

FDC kompleksy immunologiczne uzyskują właściwości silnych immunogenów, łączą się bowiem z jednej strony z Fc $\gamma$ RIIB na powierzchni FDC, z drugiej zaś z BCR na limfocytach B, hamując tym samym krzyżowe wiązanie Fc $\gamma$ IIB i BCR na limfocytach B. Reakcja ta możliwa jest dzięki temu, iż stężenie Fc $\gamma$ RIIB na powierzchni FDC jest znacznie większe niż na limfocytach B. Interakcja między Fc $\gamma$ RIIB na powierzchni FDC oraz BCR na powierzchni limfocytów B przy udziale IC hamuje krzyżowe wiązanie BCR oraz Fc $\gamma$ RIIB na powierzchni limfocytów B, a tym samym aktywację ITIM [31].

Badania Wu i wsp. [33] wykazały, iż prawidłowy przebieg wtórnej odpowiedzi immunologicznej zależy nie tylko od antygeny obecny w ikkosomach FDC, lecz także bezpośredniego kontaktu między FDC i limfocytami B. Ikkosomy ulegają endocytozie przez limfocyty B, zawarty w nich antygen jest następnie przetwarzany i prezentowany limfocytom T pomocniczym, które stymulują proces wytwarzania przeciwciał. Bezpośredni kontakt między FDC i limfocytami B dostarcza sygnału niezbędnego dla proliferacji limfocytów B, co zapewnia utrzymanie odpowiedniej puli komórek pamięci. [33]. Wykazano, że FDC stymulują proliferację limfocytów B także

przy braku egzogenego antygeny, a dodanie antygeny do hodowli mysich limfocytów B i FDC miało stosunkowo niewielki wpływ na nasilenie proliferacji. Niezależny od obecności antygeny mechanizm promujący dojrzewanie limfocytów B opiera się zarówno na wspomnianym już kontakcie między komórkami oraz dodatkowo wydzielaniu cytokin przez FDC, np. IL-6 [4]. Innym czynnikiem stymulującym proliferację limfocytów B ośrodków rozmnażania w ludzkich migdałkach jest wydzielanie przez FDC IL-7, pod wpływem której następuje krzyżowe wiązanie receptora limfocyta B [18]. Uważa się, że FDC mogą wydzielać także inne, niepoznane dotąd cytokiny, stymulujące przeżycie i proliferację limfocytów B ośrodków rozmnażania [15,29]. Istnieje hipoteza poparta badaniami MacLennana i wsp. [20,21], że istnieją różne fenotypowo populacje FDC. Jedne, zlokalizowane w obrębie podstawy strefy jasnej promują dojrzewanie limfocytów B, inne zaś proliferację, przeżycie oraz tworzenie limfocytów B pamięci. Hipotezę tę może potwierdzać także heterogenność komórek linii wywodzących się z FDC: komórki linii HK cechujące się brakiem ekspresji VCAM-1 i CD14, stymulują proliferację limfocytów B nie stymulując wytwarzania immunoglobulin, a komórki linii FDC-1 stymulują zarówno proliferację FDC, jak i wytwarzanie IgG oraz IgM [4]. W badaniach *in vitro* wykazano, że ludzkie, izolowane FDC mogą nasilać lub hamować proliferację limfocytów B w zależności od rodzaju stosowanego czynnika aktywującego, np. w obecności *Staphylococcus aureus* szczep Cowan / FDC hamują proliferację limfocytów B, a zastosowanie przeciwciał anti-CD40 lub przeciwko powierzchniowej immunoglobulinie powoduje nasilenie proliferacji [14]. Grouard i wsp. [9] oceniając czynniki wpływające na stymulację rozwoju limfocytów B przez izolowane z migdałków FDC w warunkach *in vitro*, największe nasilenie proliferacji oraz wytwarzanie immunoglobulin obserwowali w hodowlach stymulowanych przeciwciałem anti-CD40, z dodatkiem cytokin IL2 + IL10 lub IL4 + IL10. Potwierdza to znaczenie interakcji CD40-CD40L, a tym samym udział limfocytów T oraz wydzielanych przez nie cząsteczek na różnicowanie i proliferację limfocytów B ośrodków rozmnażania. Dodanie do podłoża hodowli odpowiednich cytokin wydzielanych przez limfocyty T nie stymuluje proliferacji w takim stopniu jak obecność samych limfocytów T [17]. Komórki linii HK wywodzącej się z FDC także stymulują proliferację limfocytów B w warunkach *in vitro* w obecności anti-CD40 [15]. Obecność CD40 zarówno na limfocytach B, jak i FDC (w warunkach hodowli), oraz fakt, że cytokiny wytwarzane przez limfocyty T, takie jak: IL-4 oraz IFN $\gamma$ , mogą wywierać wpływ na czynność FDC, sugerują, że regulacja dojrzewania limfocytów B zależna jest przynajmniej częściowo od interakcji między limfocytami T i FDC [34]. Badania Thornhilla i Haskarda [5] wykazały, iż IL-4 wywiera zupełnie odmienny wpływ na FDC niż IFN $\gamma$ , IL-4 zwiększa ekspresję VCAM-1 oraz nasila adhezję, w przeciwieństwie do IFN $\gamma$  nie zwiększa natomiast ekspresji CD14, CD54 oraz cząsteczek MHC klasy II. Fakt, iż wydzielane przez limfocyty T cytokiny: IFN $\gamma$  oraz IL-4 wywierają odmienny wpływ na FDC, sugeruje, że w zależności od ekspozycji na określony rodzaj cytokin zmienia się charakter interakcji oraz efekt, jaki FDC wywierają na klasę przeciwciał wytwarzanych przez limfocyty B, np. w wyniku ekspozycji na

IL-4 FDC stymulują wytwarzanie IgE, natomiast pod wpływem IFN $\gamma$  FDC promują wydzielanie IgG2a [5].

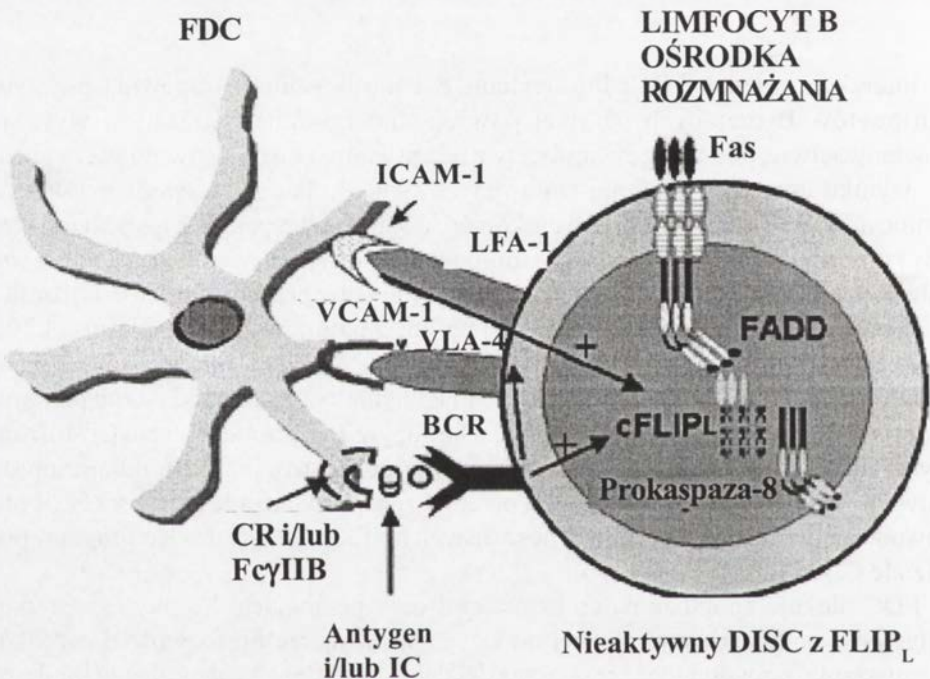
Ze względu na fakt, iż cząsteczki biorące udział w interakcjach między FDC i limfocytami B nie należą do rodziny białek MHC, skuteczność działania FDC nie wymaga zgodności w tym układzie. Ponadto przekracza również bariery gatunku, co potwierdziły badania *in vitro* Fakhera i wsp. [8] prowadzone na ludzkich i mysich FDC, które wykazały, iż zarówno ludzkie FDC stymulują mysie limfocyty, jak i mysie FDC stymulują limfocyty ludzkie. Badania Kapasiego i wsp. [12] wykazały ponadto, iż rozwój prekursorowych komórek FDC u myszy SCID stymulowany może być przez syngeniczne, allogeniczne lub nawet ksenogeniczne limfocyty.

## REGULACJA APOPTOZY LIMFOCYTÓW B OŚRODKÓW ROZMNAŻANIA

Interakcja między FDC, limfocytami B i limfocytami T zapewnia przeżycie limfocytów B mających na swej powierzchni immunoglobuliny o wysokim powinowactwie, podczas gdy limfocyty z receptorami o niskim powinowactwie giną w wyniku apoptozy. Dodanie izolowanych FDC do hodowli świeżo uzyskanych limfocytów B i T zapewnia przeżycie komórek w hodowli przez ok. 8 tygodni (podczas gdy komórki limfoidalne, zwłaszcza limfocyty B mogą przeżyć w warunkach *in vitro* zaledwie kilka dni), zachowane jest także wytwarzanie przeciwciał [26]. Badania *in vitro* prowadzone przez Choe i wsp. [3] na linii komórkowej centroblastów L3055 (wywodzącej się z komórek chłoniaka Burkitta) oraz linii komórkowej HK (uzyskanej z FDC ludzkich migdałków) wykazały, że FDC stymulują przede wszystkim przeżycie oraz proliferację centroblastów. Natomiast limfocyty T za pośrednictwem CD40L oraz wydzielania IL-4 indukują ich różnicowanie do centrocytów, hamują apoptozę antygenowo swoistych limfocytów B przebiegającą przy udziale receptora BCR oraz powodują eliminację antygenowo nieswoistych limfocytów B w drodze apoptozy przy udziale CD95 [26].

FDC blokują apoptozę na co najmniej dwóch poziomach. Po pierwsze blokują aktywność endonukleazy zależnej od katepsyny w jądrze limfocytów B ośrodków rozmnażania, prawdopodobnie poprzez działanie cystatyny A, naturalnego inhibitora katepsyny, którego wysokie stężenie stwierdzono w FDC. Istotnym faktem jest, iż w świeżo izolowanych limfocytach B ośrodków rozmnażania nie stwierdza się aktywności kaspazy 8 i kaspazy 3, pomimo występowania wewnątrzjądrowej aktywności endonukleazy. Sugeruje to, iż endonukleaza limfocytów B ośrodków rozmnażania różni się od endonukleaz zależnych od kaspazy, takich jak: DNaza aktywowana kaspazą/ czynnikiem fragmentacji DNA. Po drugie FDC zapobiegają gwałtownej aktywacji zarówno kaspazy 8, jak i kaspazy 3 w limfocytach B ośrodków rozmnażania przylegających do FDC. Ludzkie limfocyty B ośrodków rozmnażania oraz limfocyty B mysiego chłoniaka połączone odpowiednio z ludzkimi lub mysimi FDC pozostają niewrażliwe na apoptozę

indukowaną Fas. Prawdopodobnie przyczyną jest zachowanie wysokiego stężenia cFLIP<sub>L</sub> w ludzkich limfocytach B ośrodków rozmnażania (oraz prawdopodobnie w mysich nowotworowych limfocytach B) indukowane przez kontakt z FDC, które zapobiega aktywacji kaspazy 8 i w ten sposób chroni komórki przed apoptozą indukowaną Fas (ryc. 2). Dokładny mechanizm interakcji indukowanych wysokim stężeniem cFLIP<sub>L</sub> pozostaje niewyjaśniony. cFLIP<sub>L</sub> (ang. *Fas-associated death-domain(FADD)-Like LI-1 $\beta$  Converting-Enzyme(FLICE)-Inhibitory Protein*) jest jednym z najważniejszych regulatorów apoptozy ludzkich limfocytów B ośrodków rozmnażania, ze względu na fakt, iż kontroluje czynność kaspazy 8 poprzez unieczynnienie FasDISC (*Death-Inducing Signaling Complex*) [6]. Jest to czynnik działający w trakcie rozwoju limfocytów, jego ekspresja jest niska w dziewiczych limfocytach B oraz limfocytach B pamięci, a wysoka w limfocytach B ośrodków rozmnażania. Badania *in vitro* wykazały, iż usunięcie limfocytów B z ośrodków



RYCINA 2. Hamowanie apoptozy limfocytów B ośrodków rozmnażania przy udziale FDC. Wiązanie antygeny (Ag) w postaci IC na powierzchni FDC przy pomocy receptorów dopełniacza (*complement receptors*, CRs) oraz FcγRIIB, a następnie interakcja antygeny z BCR dostarcza pierwszego sygnału przeżycia dla limfocytów B o wysokim powinowactwie. Sygnał przekazywany za pośrednictwem BCR zapobiega utracie ekspresji cFLIP<sub>L</sub> oraz aktywuje integryny, takie jak VLA-4 oraz LFA-1. Interakcje między FDC i limfocytami B zachodzące przy udziale integryn umożliwiają dostarczenie innych sygnałów przeżycia i przyczyniają się do zachowania wysokiego stężenia cFLIP<sub>L</sub> w limfocytach B o wysokim powinowactwie. Zapobiega to aktywacji kaspazy 8 (która pozostaje w postaci prokaspazy 8) i chroni w ten sposób komórki przed apoptozą indukowaną Fas

rozmnażania powoduje gwałtowne obniżenie stężenia cFLIP<sub>L</sub>. Utrzymanie wysokiego stężenia cFILP<sub>L</sub>, a tym samym hamowanie apoptozy limfocytów B ośrodków rozmnażania przebiega, oprócz interakcji między limfocytami B a FDC za pośrednictwem wiązania BCR i CD40. Sygnał pochodzący od FDC jest niezależny od sygnałów przekazywanych za pośrednictwem CD40, receptorów Ig lub cząsteczek adhezyjnych [6]. Regulacja apoptozy ośrodków rozmnażania przy udziale FDC oraz limfocytów T zapewnia przeżycie limfocytów B o wysokim powinowactwie oraz eliminację limfocytów B o niskim powinowactwie oraz autoreaktywnych. Zaburzenia mechanizmów kontroli apoptozy prowadzić mogą do hiperplazji ośrodków rozmnażania, wytwarzania autoprzeciwciał oraz w istotny sposób upośledzać odpowiedź humoralną.

## REGULACJA FUNKCJI LIMFOCYTÓW T OŚRODKÓW ROZMNAŻANIA

FDC, niezależnie od wpływu na rozwój limfocytów B, mogą także regulować czynność limfocytów T ośrodków rozmnażania, chociaż działanie to jest poznane w znacznie mniejszym stopniu. Wykazano, że FDC mogą stymulować proliferację limfocytów T. Wiadomo, iż FDC nie mają właściwości przetwarzania antygeny, lecz mogą one wiązać kompleksy złożone z peptydów i cząsteczek MHC klasy II obecne na powierzchni sąsiadujących limfocytów B, co umożliwi prezentację antygeny limfocytom T, tym samym dostarcza sygnału stymulacji.

Badania prowadzone przez Butcha i wsp. [1] z użyciem sortowania magnetycznego (*magnetic cell separation*) i przeciwciał monoklonalnych przeciwko ludzkim FDC (HJ2) wykazały, że FDC hamują proliferację limfocytów B indukowaną przez superantygeny z wykorzystaniem dwóch odrębnych mechanizmów: w drodze interakcji międzykomórkowych przy udziale CD54 i CD106 oraz przy pomocy prostaglandyn. Prawdopodobnie o tym, czy FDC dostarczają limfocytom T sygnału stymulującego czy hamującego, decyduje stosunek liczby FDC do liczby limfocytów B. Dostarczenie sygnału hamującego wymaga przekroczenia pewnej progowej liczby FDC przypadającej na odpowiednią ilość limfocytów B. W warunkach fizjologicznych, gdy w ośrodkach rozmnażania przeważa proces hamowania, stosunek FDC do limfocytów T wynosi 1:5. Autorzy sugerują, iż FDC hamują odpowiedź proliferacyjną limfocytów T w celu zwiększenia wydzielania cytokin stymulujących rozwój limfocytów B w ośrodkach rozmnażania. We wcześniejszych badaniach stwierdzono bowiem, iż FDC zmniejszają wytwarzanie IL-2 i IFN $\gamma$ , zwiększają natomiast wydzielanie IL-4 i IL-6, cytokin wspomagających proces różnicowania limfocytów B [14].

## PODSUMOWANIE

Interakcje między limfocytami B i przenoszącymi kompleksy immunologiczne FDC stanowią kluczowe ogniwo w tworzeniu ośrodków rozmnażania, przebiegu mutacji

somatyecznej, powstawaniu komórek pamięci oraz komórek wytwarzających duże ilości przeciwciał o wysokiej swoistości.

## LITERATURA

- [1] BUTCH AW, KELLY KA, WILLBANKS MS, YU X. Human follicular dendritic cells inhibit superantigen-induced T-cell proliferation by distinct mechanisms. *Blood* 1999; **94**: 216–224.
- [2] CAUX C, LIU Y-J, BANCHEREAU J. Recent advances in the study of dendritic cells and follicular dendritic cells. *Immunol Today* 1995; **16**: 2–4.
- [3] CHOE J, LI L, ZHANG X, GREGORY CD, CHOI YS. Distinct role of follicular dendritic cells and T cells in the proliferation, differentiation and apoptosis of a centroblast cell line, L3055. *J. Immunol* 2000; **164**: 56–63.
- [4] CLARK EA, GRABSTEIN KH, GOWN AM, SKELLY M, KAISHO T, HIRANO T, SHU GL. Activation of B lymphocyte maturation by a human follicular dendritic cell line, FDC-1. *J Immunol* 1995; **155**: 545–555.
- [5] CLARK EA, GRABSTEIN KH, SHU GL. Cultured human follicular dendritic cells: growth characteristics and interactions with B lymphocytes. *J Immunol* 1992; **148**: 3327–3335.
- [6] van EIJK M, DEFRENCE T, HENNINO A, de GROOT C. Death-receptor contribution to the germinal center reaction. *Trends Immunol* 2001; **22**: 677–681.
- [7] ENDRES R, ALIMZHANOV MB, PLITZ T, FÜTTERER A, KOSCO-VILBOIS MH, NEDOSPASOV SA, RAJEWSKY K, PFEFFER K. Mature follicular dendritic cell network depend on expression of lymphotoxin  $\beta$  receptor by radioresistant stromal cells and lymphotoxin  $\beta$  and tumor necrosis factor by B cells. *J Exp Med* 1999; **189**: 159–167.
- [8] FAKHER M, WU J, QIN D, SZAKAL AK, TEW JG. Follicular dendritic cell accessory activity crosses MHC and species barriers. *Eur J Immunol* 2001; **31**: 176–185.
- [9] GROUARD G, BOUTEILLER O, BANCHEREAU J, LUI Y-J. Human follicular dendritic cells enhance cytokine-dependent growth and differentiation of CD40-activated B cells. *J Immunol* 1995; **155**: 3345–3352.
- [10] GROUARD G, DURAND I, FILGUEIRA L, BANCHEREAU J, LIU Y-J. Dendritic cells capable of stimulating T cells in germinal centers. *Nature* 1996; **384**: 364–367.
- [11] HUR YD, KIM DJ, KIM S, KIM YI, CHOD, LEE DS, HWANG Y, BAE K-W, CHANG KY, LEE WJ. Role of follicular dendritic cells in the apoptosis of germinal center B cells. *Immunol Letters* 2000; **72**: 107–111.
- [12] KAPASI ZF, QIN D, KERR WG, KOSCO-VILBOIS MH, SHULTZ LD, TEW J, SZAKAL AK. Follicular dendritic cell (FDC) precursors in primary lymphoid tissue. *J Immunol* 1998; **160**: 1078–1084.
- [13] KIM HJ, BEREK C. B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2000; **2**: 126–131.
- [14] KIM H-S, ZHANG X, CHOI YS. Activation and proliferation of follicular dendritic cell-like cells by activated T lymphocytes. *J Immunol* 1994; **153**: 2951–2961.
- [15] KIM H-S, ZHANG X, KLYUSHNENKOVA E, CHOI YS. Stimulation of germinal center B lymphocyte proliferation by FDC-like cell line, HK. *J Immunol* 1995; **155**: 1101–1109.
- [16] KOOPMAN G, PARMENTIER HK, SCHUURMAN H-J, NEWMAN W, MEIJER JLM, PALS ST. Adhesion of human B cells to follicular dendritic cells involves both the lymphocyte function-associated antigen 1/intercellular adhesion molecule 1 and very late antigen 4/vascular cell adhesion molecule 1 pathways. *J Exp Med* 1991; **173**: 1297–1304.
- [17] KOSCO M, PFLUGFELDER E, GRAY D. Follicular dendritic cell-dependent adhesion and proliferation of B cells *in vitro*. *J Immunol* 1992; **148**: 2331–2339.
- [18] KRÖNCKE R, LOPPNOW H, FLAD H-D, GERDES J. Human follicular dendritic cells and vascular cells produce interleukin-7: a potential role for interleukin-7 in the germinal center reaction. *Eur J Immunol* 1996; **26**: 2541–2544.
- [19] LI L, ZHANG X, KOVACIC S, LONG AJ, BOURQUE K, WOOD CR, CHOI YS. Identification of a human follicular dendritic cell molecule that stimulates germinal center B cell growth. *J Exp Med* 2000; **20**: 1077–1083.

- [20] MACKAY F, BROWNING JL. Turning off follicular dendritic cells. *Nature* 1998; **395**: 26–27.
- [21] MacLENNAN ICM. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 1994; **12**:117–139.
- [22] MacLENNAN ICM, LIU YJ, JOHNSON GD. Maturation and dispersal of B-cell clones during T-cell dependent antibody responses. *Immunol Rev* 1992; **126**: 143–151.
- [23] MATSUMOTO M, FU Y-X, MOLINA H, HUANG G, KIM J, THOMAS DA, NAHM MH, CHAPLIN DD. Distinct roles of lymphotoxin a and type I tumor necrosis factor in the establishment of follicular dendritic cells from non-bone marrow-derived cells. *J Exp Med* 1997; **186**: 1997–2004.
- [24] PETRASCH S, BRITTINGER G, WACKER HH, SCHMITZ J, KOSCO-VILBOIS M. Follicular dendritic cells in non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymph* 1994; **15**: 33–43.
- [25] PALUCKA K, BANCHEREAU J. Dendritic cells: A link between innate and adaptive immunity. *J Clin Immunol* 1999; **19**: 12–24.
- [26] QIN D, WU J, BURTON GF, SZAKAL AK, TEW JG. Follicular dendritic cells mediated maintenance of primary lymphocyte cultures for long-term analysis of a functional *in vitro* immune system. *J Immunol Methods* 1999; **226**: 19–27.
- [27] SCHRIEVIER P, FREEDMAN AS, FREEMAN G, MESSNER E, LEE G, DALEV J, NADLER LM. Isolated human follicular dendritic cells display a unique antigenic phenotype. *J Exp Med* 1989; **169**: 2043–2058.
- [28] TAKEMURA S, BRAUN A, CROWSON C, KURTIN PJ, CONFIELD RH, O'FALLON WM, GORONZY JJ, WEYAND CM. Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis. *J Immunol* 2001; **167**: 1072–1080.
- [29] TARLINTON D. Germinal centers: form and function. *Cur Op Immunol* 1998; **10**: 245–251.
- [30] TEW JG, WU J, QIN D, HELM S, BURTON GF, SZAKAL AK. Follicular dendritic cells and presentation of antigen and costimulatory signals to B cells. *Immunol Rev* 1997; **156**: 39–52.
- [31] TEW JG, WU J, FAKHER M, SZAKAL AK, QIN D. Follicular dendritic cells: beyond the necessity of T-cell help. *Trends Immunol* 2001; **22**: 361–367.
- [32] WANG Y, WANG J, SUN Y, WU Q, FU Y-X. Complementary effects of TNF and lymphotoxin on the formation of germinal center and follicular dendritic cells. *J Immunol* 2001; **166**: 330–337.
- [33] WU J, QIN D, BURTON GF, SZAKAL AK, TEW JG. Follicular dendritic cell-derived antigen and accessory activity in initiation of memory IgG responses *in vitro*. *J Immunol* 1996; **157**: 3404–3411.
- [34] ZHANG X, LI L, JUNG J, XIANG S, HOLLMANN C, CHOI Y-S. The distinct roles of T cell-derived cytokines and a novel follicular dendritic cell-signaling molecule 8D6 in germinal center-B cell differentiation. *J Immunol* 2001; **167**: 49–56.

*Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak*

*Otrzymano: 01.03.2003 r.*

*Przyjęto: 05.05.2003 r.*

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

*E-mail: iwohus@wp.pl*





## Dodatkowe informacje dla Autorów

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.

Prosimy Autorów o podawanie adresów e-mail, o ile je mają.

### Cennik w 2003 r.

	odbitki prac dla Autorów				barwne rysunki i zdjęcia	dotatkowe strony
Liczba odbitek	50	100	200	400	1 szt.	1 str.
Cena zł	100,00	120,00	150,00	200,00	400,00	50,00

Zamówienie na odbitki musi być złożone wraz z przesłaną korektą pracy

## Warunki prenumeraty kwartalnika PBK

### *Prenumerata na rok 2003 i 2004*

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 2004 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 201240105311110-00004-409-533.

Cena prenumeraty rocznika na rok 2003 i na rok 2004  
dla instytucji (bibliotek) wynosi 150 zł,  
dla odbiorców indywidualnych 40 zł.

### *Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2004*

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 201240105311110-00004-409-533.

Price per year 25 dollars USA or 21 €.

## 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. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach. Prosimy Autorów o nadsyłanie prac bezpośrednio do Redaktorów odpowiedniej specjalności (adresy na 2 str. okładki), a do Redakcji w Warszawie tylko te artykuły, które nie odpowiadają żadnej z wymienionych specjalności.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają

1) artykuły przeglądowe nie przekraczające 15 stron druku i do 100 pozycji bibliograficznych konieczne z ostatnich 5 lat (natomiast wcześniejsze prace mogą być pracami przeglądowymi);

2) doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach druku 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 przysyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 w układzie normalnym 1800 znaków na stronie z podwójnym odstępem. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki s. 600) 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, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencje, 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 na 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 zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

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

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

Tabele, opisy schematów i 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 niezmienionej 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 wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą oraz mogą zamówić odbitki odpłatnie odsyłając korektę. 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. Od stycznia 2003 r. Redakcja wprowadza odpłatność 300,- zł za artykuł nie przekraczający 15 str. druku.

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,

nie została wysłana do innej redakcji **tak nie**

Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę

Dołączono kopię pracy wraz z rycinami na dyskietce z

Jest zgoda osób, których informacje nie-

podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego

publikowane są zamieszczone w tekście

**tak nie** z komputera IBM

**tak nie**

Odpowiadam za całość pracy opisaną w załączonym maszynopisie **tak nie**

Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w „Postępach 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	403
ŚLEDZIEWSKI A., KINALSKI M., TERLIKOWSKI S.J.: Wpływ cytokiny TNF- $\alpha$ na metabolizm tkanki tłuszczowej Effect of TNF- $\alpha$ on fatty tissue metabolism	405
JURKIEWICZ D., POPOWSKA E., KRAJEWSKA-WALASEK M.: Molekularne podłoże zespołu Alagille'a Molecular basis of Alagille syndrome	419
WIELBO J., SKORUPSKA A.: Strategie symbiotycznych rizobiów w pokonywaniu reakcji obronnych roślin motylkowatych Strategies of symbiotic Rhizobia in overcoming of defense reactions in legumes	433
BIAŁECKA B., KĘPCZYŃSKI J.: Jasmonidy w ustępowaniu spoczynku i kiełkowaniu nasion Jasmonides in breaking dormancy and seed germination	447
PAZIEWSKA A., BILIŃSKA B.: Estrogeny i ich rola w regulacji spermatogenezy Estrogens and their role in the regulation of spermatogenesis	461
MAŁKOWSKI E., KURTYKA R.: Mechanizmy hyperakumulacji cynku i kadmu u roślin Mechanisms of zinc and cadmium hyperaccumulation in plants	483
STARZYŃSKI R. R., LIPIŃSKI P.: IRP1, białko kontrolujące homeostazę żelaza w komórkach ssaków: regulacja jego aktywności przez jony żelaza i tlenek azotu IRP1, protein controlling iron homeostasis in mammalian cells: regulation of its activities by iron and nitric oxide	497
GATKOWSKA J.M.:Organelle wydzielnicze <i>Toxoplasma gondii</i> – ich rola w procesie penetracji i zasiedlania komórek żywiciela Secretory organelles of <i>Toxoplasma gondii</i> – their role in host cell invasion	515
SĘDKOWSKA P., NIEWIADOMSKI P., ZAWILSKA J. B., NOWAK J.Z.: Peptydy PACAP i VIP: występowanie, Receptory i rola fizjologiczna PACAP and VIP peptides: localization, receptors, and physiological function	525
SUWALSKA K., TUTAK A., FRYDECKA I.: Polimorfizm genu CTLA-4, kodującego antygen supresorowy – ryzyko autoimmunizacji Suppressory antigen CTLA-4 gene polymorphism – risk of autoimmunity	549
JAKUBOWSKA A.: Synteza i hydroliza koniugatów hormonów roślinnych w regulacji poziomu aktywnych hormonów Synthesis and hydrolysis of plant hormone conjugates in regulation of active hormone levels	563
HUS I., ROLIŃSKI J.: Folikularne komórki dendrytyczne – rozwój i funkcja Follicular dendritic cells – development and function	587
Dodatkowe informacje dla Autorów oraz Warunki prenumeraty	601