

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
BIOLOGII  
KOMÓRKI

POLISH  
ANATOMICAL  
SOCIETY

POLISH SOCIETY  
FOR CELL  
BIOLOGY

VOL. 31, ISSUE 1/2004  
(1-212)

# 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-KACZMAREK – 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 UE, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*

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

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

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

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA, 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. 17,5. Ark. druk. 13,5. Nakład 400 egz. Podpisano do druku i druk ukończono w styczniu 2004.

## W tym Zeszytcie

- Możliwość zablokowania ekspresji wybranych genów wzbudza ogromne nadzieje w terapii nieuleczalnych jak dotąd schorzeń, takich jak choroby neurodegeneracyjne, autoimmunologiczne i nowotworowe. Odrycie zjawiska interferencji RNA (RNAi) zapoczątkowało nowe badania dotyczące hamowania ekspresji wybranych genów przez małe interferujące RNA (siRNA) w komórkach ssaków. Technika ta wykorzystuje naturalny proces wyciszania ekspresji genów zależny od dwuniciowego RNA, o czym można przeczytać na stronie 35.
- Prowadzone są próby terapii genowej w leczeniu niektórych chorób nowotworowych, AIDS czy zaburzeń sercowo-naczyniowych. Jej ograniczone aplikacje kliniczne wynikają przede wszystkim z trudności związanych z wprowadzaniem genów do tkanek i uzyskaniem w nich efektywnej ekspresji. Coraz częściej rozpatruje się możliwość zastosowania w tym celu wektorów konstruowanych z wirusów związanych z adenowirusami (*adeno-associated virus*, AAV), o czym więcej znajdzie Czytelnik na stronie 47.
- Komórki efektorowe układu immunologicznego są w stanie rozpoznawać komórki zakażone, transformowane i komórki poddane różnego rodzaju stresom. Jednym ze sposobów rozpoznawania tych ostatnich jest identyfikacja indukowanych stresem cząsteczek powierzchniowych, co opisano na stronie 71. Najlepiej poznanym receptorem uczestniczącym w tego typu reakcjach jest receptor lektynowy typu C o nazwie NKG2D obecny na komórkach NK, limfocytach T CD8<sup>+</sup> αβ, limfocytach Tγδ oraz makrofagach.
- Cytokiny są hormonami roślinnymi, które stymulują podziały oraz różnicowanie się komórek. W ostatniej dekadzie genetyczna i molekularna analiza mutantów dostarczyła cenny wkład w poznanie molekularnego mechanizmu działania tej klasy hormonów. W prezentowanej na stronie 93 pracy podsumowano wyniki badań zmierzających do poznania składników oraz zasad percepcji i funkcjonowania szlaku transdukcji sygnału cytokininowego w komórce roślinnej. Wspólną cechą receptorów cytokinin jest to, że białka te mają katalityczną aktywność kinazy histydynowej. Zaproponowany szlak transdukcji sygnału cytokininowego przypomina bakteryjny dwuskładnikowy układ odpowiedzi i opiera się na przenoszeniu grupy fosforanowej między białkowymi składnikami.
- Fitochromy są roślinnymi, cytoplazmatycznymi fotoreceptorami światła czerwonego i dalekiej czerwieni, które w odpowiedzi na określony bodziec świetlny ulegają fotokonwersji do aktywnej formy Pfr i migrują do jądra. Fitochromy mogą fosforylować szereg białek bądź w wyniku bezpośrednich oddziaływań z odpowiednimi białkami jądrowymi uczestniczą w regulacji transkrypcji genów. Stosunkowo duża liczba uczestniczy w regulowanej przez światło ubikwitynacji oraz degradacji w proteasomach białek regulujących transkrypcję. Więcej na ten temat znajdzie Czytelnik na stronie 155.

**WYKAZ RECENZENTÓW Z TOMU 30 Z ROKU 2003**  
**REFEREES OF THE VOLUME 30, 2003**

Prof. dr hab. Barbara Bilińska  
Dr Anna Ciemierych-Litwinienko  
Prof. dr hab. Zofia Błach-Olszewska  
Prof. dr hab. Franciszek Dubert  
Prof. dr hab. Barbara Gabara  
Prof. dr hab. Wojciech Gorczyca  
Prof. dr hab. Anna Goździcka-Józefiak  
Prof. dr hab. Ewa Gregoraszczyk  
Prof. dr hab. Barbara Grzelakowska-Sztabert  
Prof. dr hab. Lila Hryniewiecka  
Prof. dr hab. Leszek Kaczmarek  
Prof. dr hab. Bożena Kamińska-Kaczmarek  
Prof. dr hab. Jerzy Kawiak  
Prof. dr hab. Zbigniew Kmiec  
Prof. dr hab. Janina Kwiatkowska-Korczak  
Dr Marcin Majka  
Prof. dr hab. Magdalena Mikołajczyk-Chmiela  
Prof. dr hab. Stanisław Moskalewski

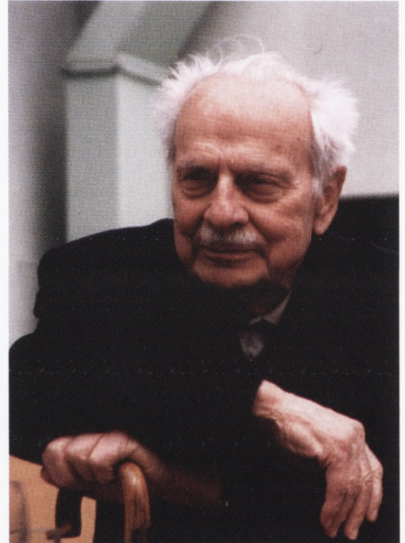
Doc. dr hab. Barbara Nawrot  
Prof. dr hab. Jerzy Nowak  
Prof. dr hab. Maria Olszewska  
Prof. dr hab. Zofia Osuchowska  
Prof. dr hab. Marek Pawlikowski  
Prof. dr hab. Barbara Płytycz  
Prof. dr hab. Marian Ratajczak  
Prof. dr hab. Lidia Różewicka  
Prof. dr hab. Zenon Szneider  
Prof. dr hab. Michał Sikorski  
Prof. dr hab. Ryszard Słomski  
Prof. dr hab. Jan Steffen  
Prof. dr hab. Andrzej Szutowicz  
Prof. dr hab. Maria Śmiałowska  
Prof. dr hab. Barbara Tomaszewska  
Prof. dr hab. Andrzej Tretyn  
Prof. dr hab. Tomasz Twardowski  
Prof. dr hab. Maciej Zabel  
Prof. dr hab. Jan Żeromski



## PROFESOR ANTONI HORST WYBITNA POSTAĆ PATOFIZJOLOGII I GENETYKI CZŁOWIEKA

„Nieraz zastanawiam się nad moją blisko półwieczną działalnością na polu medycyny. Jako wiejski chłopak nawet w marzeniach nie przypuszczałem, że będę w stanie pokonać przeszkody przy wychodzeniu ze środowiska wiejskiego na szerokie wody nauki. Mój wybór kierunku studiów po ukończeniu gimnazjum był raczej przypadkowy – wychowywany byłem w duchu religijnym i z myślą, że zostanę księdzem... O wyborze zawodu lekarza zadecydowała chęć bliższego poznania funkcji poszczególnych narządów człowieka, a przede wszystkim pragnienie zgłębienia istoty życia. Dzisiaj, z perspektywy lat, widzę, że były to marzenia na owe czasy czysto utopijne” – pisał profesor Antoni Horst w opublikowanych w 1995 roku „Wspomnieniach i refleksjach”[1].

W bieżącym roku polska nauka poniosła ogromną stratę, profesor Horst zmarł w dniu 14 lipca 2003 roku wracając ze spaceru w Ogrodzie Botanicznym. Po raz ostatni profesor Horst uczestniczył oficjalnie 16 maja 2003 roku w uroczystości poświęconej utworzeniu Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu. Instytut odwiedziło wtedy wiele osobistości, a Profesor chętnie wspominał początki genetyki i ciekawe zdarzenia ze swojej kariery naukowej. Była wtedy możliwość wykonania pamiątkowych zdjęć, z której prawie wszyscy skorzystali. Na tej uroczystości wygłosiłem wykład pt. „50. rocznica odkrycia struktury DNA”, który zadedykowałem Profesorowi i w którym zamieściłem informacje o początkach badań molekularnych w Zakładzie Genetyki Człowieka PAN (obecnie Instytucie), podjętych z inicjatywy i przy ogromnej pomocy Profesora. Na uroczystości profesor Horst, do ostatnich dni pozostający w pełni twórczej aktywności intelektualnej,



po raz ostatni zabrał oficjalnie głos wskazując na ogromny postęp w badaniach DNA w minionych latach. Odkrycie struktury DNA określił najważniejszym odkryciem XX wieku. Nawiązał również do wyników badań Griffitha z 1928 roku nad transformacją bakterii niechorobotwórczych w chorobotwórcze, twierdząc że w tych klasycznych eksperymentach „materia żywa” powstała z „materii martwej”, ponieważ w doświadczeniach stosowane były martwe bakterie chorobotwórcze. W swoim wystąpieniu mówił Profesor: „Odkrycie kodu genetycznego w 1953 roku przez Jamesa Watsona i Francisca Cricka zaliczane jest do największych odkryć w całej nauce światowej właśnie dlatego, że eliminując pierwiastek nadprzyrodzony w powstaniu i propagowaniu życia sprowadził ten proces do naturalnych, choć skomplikowanych procesów fizyczno-chemicznych”[2]. Obecnych na sali zadziwiła jasność wypowiedzi Profesora i dokładne przedstawienie wielu innych faktów, a przecież Profesor miał wtedy 88 lat. Ten dzień na pewno wszyscy zapamiętamy. Dla Profesora był to również szczególnie dzień, spełniły się Jego marzenia o utworzeniu Instytutu Genetyki Człowieka.

Profesor Horst był postacią wybitną. Urodził się 4 czerwca 1915 roku w Zakrzewie w Ziemi Złotowskiej należącej w okresie międzywojennym do Rzeszy Niemieckiej. We „Wspomnieniach i refleksjach” Profesor pisze „Ojciec mój Antoni już bardzo słabo mówił po niemiecku posługując się raczej narzeczem *plattdeutsch*. Matka Gertruda pochodziła z czysto polskiej rodziny Brzostowiczów. Rodzina moja była bardzo liczna, miałem 9 braci i 2 siostry... W trosce o przyszłość tak licznej rodziny rodzice starali się dać nam przede wszystkim wykształcenie, co nie było łatwe, bo utrzymywaliśmy się z niezbyt dużego gospodarstwa rolnego o powierzchni niespełna 20 hektarów.” Po ukończeniu szkoły powszechnej w Zakrzewie z językiem wykładowym niemieckim, świetnie znał język niemiecki, angielski i francuski, co było bardzo przydatne w dalszej pracy naukowej. W 1926 roku rozpoczął naukę w gimnazjum w Chojnicach (w Polsce). Nauka w gimnazjum trwała 8 lat i po zdaniu matury rozpoczął studia na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Poznańskiego, które przerwał wybuch wojny w 1939 roku. Miał wtedy za sobą 5 lat studiów, a do całkowitego ich ukończenia brakował jeszcze jeden trymestr i zdanie egzaminów końcowych. Od samego początku wojny zajęty był opatrywaniem rannych po nalotach niemieckiego lotnictwa na Poznań w Szpitalu Przemienienia Pańskiego. Lata okupacji spędził w Warszawie pracując jako lekarz, zaopatrując szpitale i ucząc się. W czasie Powstania Warszawskiego aż do stycznia 1945 roku był zastępcą szefa sanitarnego obszaru centralnego AK. Pełnił funkcję odpowiedzialnego za wysiedlane szpitale warszawskie i powstańcze, a także wysiedlaną ludność Warszawy. Na potrzeby zaopatrzenia zorganizował doraźną składnicę sanitarną, do której kupował ze środków Delegatury Rządu środki opatrunkowe i leki z całej Polski. Zastąpił sprzeciwieniem się ewakuacji szpitali przed ofensywą radziecką, zapobiegając w ten sposób ogromnym stratom, jakie byłyby poniesione przy ogromnym zagrożeniu życia w warunkach zimowych. Po latach Profesor wyrażał pogląd, że Powstanie Warszawskie było jednak błędem skierowanym militarnie przeciw Niemcom, a politycznie przeciw Rosji.

Podczas wojny, w 1944 roku ukończył Profesor studia lekarskie na Tajnym Uniwersytecie Ziemi Zachodnich. Pierwszym miejscem pracy po ukończeniu studiów był Szpital im. Dzieciątka Jezus w Warszawie. W tym czasie współpracował z profesorem Witoldem Orłowskim, którego podziwiał jeszcze jako student medycyny w Poznaniu. Później, po latach Profesor, często wspominał ten okres, podkreślając jak wiele nauczył się od profesora Orłowskiego.

Pod koniec wojny Profesor ożenił się z ówczesną studentką medycyny Marią Haliną Soboczyńską i wraz z nią przebywał w Warszawie współpracując z profesorem Orłowskim. Uczuciowo będąc związany z Poznaniem, już jako doktor medycyny ze stopniem uzyskanym na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Poznańskiego w 1945 roku, profesor Horst powrócił do Poznania, gdzie profesor Jan Roguski zaoferował mu stanowisko adiunkta w organizowanej przez siebie II Klinice Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Poznańskiego, która najpierw zlokalizowana była w Szpitalu Miejskim przy ul. Szkolnej, a później w Szpitalu Sióstr Diakonisek przy ul. Przybyszewskiego. W 2 lata później habilitował się na tej samej Uczelni. Prace stanowiące podstawę uzyskania stopni naukowych wykonał głównie w II Klinice Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Warszawskiego oraz w Szpitalu im. Dzieciątka Jezus w Warszawie, jeszcze w czasie okupacji niemieckiej. Od tego czasu przez wiele lat Profesor pozostawał ściśle związany z Akademią Medyczną w Poznaniu. W latach 1950–1974 był kierownikiem Zakładu Patologii Ogólnej i Doświadczalnej Akademii Medycznej prowadząc badania nad miażdżycą tętnic i nad zaburzeniami metabolicznymi cholesterolu i lipidów. W 1950 roku został profesorem nadzwyczajnym, a w roku 1956 profesorem zwyczajnym. W roku akademickim 1955/1956 pełnił funkcję Dziekana Wydziału Lekarskiego. Profesor wspomina: „Obejmując tę funkcję zastałem w dziekanacie wręcz niewyobrażalny chaos i bałagan. Z posiedzeń Rady Wydziału wiedziałem, że stale ginęły akta studenckie i często trudno było nawet odtworzyć przebieg studiów poszczególnych studentów” [1]. Nadszedł ważny 1956 rok z głośnymi wypadkami czerwcowymi w Poznaniu, w którym podczas pierwszych niezależnych wyborów został wybrany rektorem Akademii Medycznej na lata 1956–1959. Profesor natychmiast po objęciu funkcji zajął się opracowywaniem długofalowego programu rozwoju uczelni dbając przede wszystkim o to, aby czynniki merytoryczne odgrywały najistotniejszą rolę w rozwoju uczelni. Dzisiaj, z perspektywy czasu, można szczególnie dobrze ocenić starania Profesora o zabezpieczenie pod rozbudowę Uczelni ogródków działkowych ograniczonych ulicami Przybyszewskiego, Bukowską, Polną i Marcelińską. Dobrze rozumiał, że dla Uczelni można było uzyskać coś pozytywnego jedynie w przypadku dobrej współpracy z władzami. Ta jednak nie zawsze układała się dobrze, ponieważ Profesor nie należał do PZPR i nie zgadzał się na jej ingerencję w sprawy Uczelni. Z tego okresu Profesor lubił opowiadać o różnego rodzaju wydarzeniach z życia politycznego, życia Uczelni i wielu sprawach dotyczących poznańskich lekarzy. Uczelnia doceniła starania Profesora o jej rozwój, nadając mu tytuł doktora *honoris causa*.



W ostatnich latach w drodze z pracy do domu odwiedzałem Profesora, a On zawsze miał do opowiedzenia interesujące historie. Liczne opowieści dotyczyły także okresu, w którym tworzył Oddział Chorób Zawodowych i Medycyny Pracy. Często przywoływał różne postaci stawiając je w ciekawych kontekstach i świetle. Wspominał również wyjazd do USA na prestiżowe stypendium fundacji Rockefellera. Kontakty zawarte podczas pobytu umożliwiały później wyjazdy na staże naukowe kolejnym współpracownikom Profesora.

W historii środowiska naukowego profesor Antoni Horst zapisał się przede wszystkim jako genetyk, twórca Zakładu Genetyki Człowieka Akademii Medycznej w 1963 roku, pierwszego samodzielnego Zakładu Genetyki Człowieka w Polsce. W latach 70. powstały w Poznaniu placówki Polskiej Akademii Nauk, skupione wokół wybitnych uczonych. Profesor Stefan Barbacki zajął się tworzeniem Instytutu Genetyki Roślin, profesor Maciej Wiewiórowski Instytutu Chemii Bioorganicznej, a profesor Horst Instytutu Genetyki Człowieka. Placówka profesora Horsta została utworzona w 1974 roku jako Zakład Genetyki Człowieka zajmujący się badaniami z zakresu cytogenetyki, regulacji ekspresji genów, immunogenetyki, patologii molekularnej i funkcji kwasów nukleinowych. Piszący te wspomnienia związany jest z Zakładem Genetyki Człowieka od chwili jego powstania podobnie jak obecny Dyrektor Instytutu – profesor Jerzy Nowak. Należeliśmy do pierwszych doktorantów tej placówki, w zespole Profesora otrzymaliśmy pierwsze prestiżowe wyróżnienia – Nagrody Sekretarza Naukowego PAN w 1976 i 1977 roku.

Ogromnym sukcesem Profesora było zorganizowanie grupy tematycznej „Genetyka człowieka” w problemie węzłowym 09.7 „Molekularne podstawy procesów życiowych u drobnoustrojów i w organizmach wyższych”, koordynowanym przez Instytut Biochemii i Biofizyki PAN. Grupa tematyczna skupiała wykonawców zajmujących się genetyką człowieka w skali ogólnokrajowej. Z czasem utworzone zostały zespoły badawcze z zakresu genetyki człowieka w prawie wszystkich ośrodkach akademickich w kraju. Profesor corocznie organizował konferencje naukowo-sprawozdawcze przyczyniające się do scementowania grup zajmujących się genetyką człowieka i popularyzacją tej dziedziny w kraju. Po zmianie systemu finansowania nauki Profesor wielokrotnie wskazywał, że brak grup tematycznych prowadzi do realizacji tej samej tematyki przez kilka zespołów.

W działalności organizacyjnej Profesor skupił się na wybudowaniu przy ul. Strzeszyńskiej trzech pawilonów typu laboratoryjnego. W artykule „Genetyka – nauka o pochodzeniu i propagowaniu życia”[3], swojej ostatniej pracy, Profesor ustosunkował się do najważniejszych odkryć genetyki, a dalej pisał: „W pierwszej części niniejszego opracowania omówiłem badania, które doprowadziły do wykrycia kodu genetycznego, tego najważniejszego odkrycia w całej nauce światowej. Doceniając wagę tego odkrycia na dalszy rozwój nauk biologicznych, w tym również medycyny, zdałem sobie sprawę, że dla rozwinięcia tych badań niezbędne jest uzyskanie odpowiedniej bazy laboratoryjnej i naukowej”. Wkrótce powstały pawilony laboratoryjne przy ul. Strzeszyńskiej. Po



przebudowie w 2000 roku i doposażeniu, placówka Profesora sprawiła mu wielką radość zajmując dwukrotnie pierwsze miejsce w klasyfikacji KBN placówek medycznych w kraju.

Profesor Horst jest autorem książek poświęconych molekularnym aspektom chorób człowieka. Już w 1966 roku ukazała się Jego „Patologia molekularna”<sup>4</sup>, a w 1979 roku „Molekularne podstawy patogenezy chorób”[5]. W swoich opracowaniach nie tylko przedstawił najnowsze poglądy na molekularne podstawy patogenezy chorób, lecz również wskazywał nowe kierunki badawcze. Książki Profesora znane były szeroko w Polsce, szczególnie wydana w 1959 roku „Fizjologia patologiczna”[6], która doczekała się 9 wydań. Książki Profesora były również tłumaczone na język rosyjski i wietnamski. Wydawnictwo CRC Press z USA dostrzegło wagę problemów podejmowanych przez Profesora i w 1991 roku ukazała się książka „*Molecular pathology*”[7] z aktualnymi danymi molekularnymi dla wielu chorób. Dorobek naukowy profesora Horsta obejmuje 8 książek i ponad 250 publikacji naukowych z wszystkich głównych dziedzin genetyki człowieka. Moje pierwsze prace ukazały się z współautorstwem Profesora jak również, po latach, ostatnie prace Profesora pisaliśmy wspólnie. Ze wzruszeniem wspominam prace opublikowane z Profesorem i Jego córkami, dotyczącą cukrzycy z Wandą Horst-Sikorską [8] i dotyczącą polimorfizmu genu konwertazy angiotensyny z Anną Szymczyńską-Müllauer [9]. Profesor bardzo szybko orientował się, które kierunki badań należy rozwijać i np. zaraz po ukazaniu się publikacji o metodzie PCR zainteresował mnie tą metodą umożliwiając natychmiastowe jej wdrożenie w naszym zakładzie, a było to na długo przed rozpowszechnieniem się metody PCR w naszym kraju.

Profesor Horst był członkiem korespondentem Polskiej Akademii Nauk od 1969 roku, a w 1980 roku został członkiem rzeczywistym PAN. Promocja genetyki prowadzona była przez profesora Horsta przez wiele lat. Głównie przez przewodniczenie Komitetowi Patofizjologii Komórki PAN (obecnie Komitet Genetyki i Patologii Molekularnej), a także poprzez zaangażowanie w pracach Polskiego Towarzystwa Genetycznego, Polskiego Towarzystwa Immunologicznego, Polskiego Towarzystwa Histo- i Cytochemików, Poznańskiego Towarzystwa Przyjaciół Nauk. Towarzystwa uhonorowały Profesora tytułem członka honorowego.

Profesor Horst był wielokrotnie nagradzany najwyższymi odznaczeniami i wyróżnieniami m.in. Krzyżem Komandorskim Orderu Odrodzenia Polski z Gwiazdą (1986 rok), Złotym Krzyżem Zasługi (1957 rok), Krzyżem Komandorskim Orderu Odrodzenia Polski (1957 rok), Orderem Sztandaru Pracy II klasy (1978 rok), Odznaką za Wzorową Pracę w Służbie Zdrowia (1958 rok), Medalem Komisji Edukacji Narodowej (1973 rok), Medalem im. Mikołaja Kopernika (1998 rok).

Profesor na pewno zostanie zachowany w pamięci jako wychowawca i opiekun wielu pokoleń lekarzy, doktorów medycyny, samodzielnych pracowników nauki i profesorów zajmujących obecnie wysokie stanowiska zarówno w PAN, jak na uczelniach i w wielu ważnych placówkach naukowych. Zapamiętamy Go również

jako zapalonego myśliwego, a przy tym wielkiego miłośnika przyrody, stąd wspomniany już spacer po Ogrodzie Botanicznym.

Dla wielu z nas był surowym członkiem komisji w przewodach doktorskich i habilitacyjnych i trzeba dodać, że Profesor bardzo szybko wyrabiał sobie zdanie o osobie i jej dorobku, które później zachowywał przez całe lata i trudno było zmienić raz wyrobioną opinię. Jako uczniowie Profesora na pewno nie zmienimy o Nim opinii i zachowamy w pamięci jako jednego z najwybitniejszych uczonych. Wraz z odejściem profesora „skończyła się pewna epoka genetyki” napisała profesor Alina Midro [10] z Akademii Medycznej w Białymstoku, w pamięci Jego uczniów Profesor pozostanie na zawsze.

*Prof. dr hab. Ryszard Słomski*

*Zastępca dyrektora ds. naukowych w Instytucie Genetyki Człowieka PAN  
Kierownik Katedry Biochemii i Biotechnologii Akademii Rolniczej w Poznaniu*

## PIŚMIENNICTWO

- [1] HORST A. Wspomnienia i refleksje. Wyd. Kurpisz, Poznań 1995: 1–141.
- [2] HORST A. wystąpienie ustne 16 maja 2003 roku w Poznaniu na uroczystości poświęconej utworzeniu Instytutu Genetyki Człowieka PAN.
- [3] HORST A. Genetyka – nauka o pochodzeniu i propagowaniu życia. *Nauka* 2003; 1: 43–52.
- [4] HORST A. Patologia molekularna. Wyd. PZWL, Warszawa 1966: 1–294.
- [5] HORST A. Molekularne podstawy patogenezy chorób. Wyd. PZWL, Warszawa 1979: 1–348.
- [6] HORST A. Fizjologia patologiczna. Wyd. PZWL, Warszawa 1959: 1–808.
- [7] HORST A. Molecular pathology. Wyd. CRC Press, USA 1991: 1-458.
- [8] HORST-SIKORSKA W, ZOLL B, KWIATKOWSKA J, KRASZEWSKI A, HORST A, WILLMS B, SŁOMSKI R. Prevalence of beta allele of the insulin gene in type II diabetes mellitus. *Human Genetics* 1994; 93: 325–328.
- [9] TRZECIAK T, SZYMCZYŃSKA-MÜLLAUER A, KWIATKOWSKA J, HORST A, SŁOMSKI R. Analysis of polymorphism of angiotensin converting enzyme (ACE) gene in patients with myocardial infarction. *Acta Medica Lituanica* 1997; 1: 59–61.
- [10] MIDRO AT. Skończyła się pewna epoka genetyki. *Medyk Białostocki* 2003; 8–9: 26–27.

## POLARNY TRANSPORT AUKSYNY PRZEŁOM W BADANIACH?

POLAR AUXINE TRANSPORT – BREAKTHROUGH IN RESEARCH

Justyna WIŚNIEWSKA, Jarosław TYBURSKI, Andrzej TRETYN

Zakład Biotechnologii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej,  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

*Streszczenie:* Przełomem w badaniach nad polarnym transportem auksyny okazały się wyniki uzyskane dzięki zastosowaniu technik biologii molekularnej – charakterystyka odpowiednich mutantów, sklonowanie genów *AUX1* i *PIN*, kodujących przypuszczalne nośniki transportu auksyny, kontrolujące dokońrkowy i pozakońrkowy transport tego hormonu. Metodami immunocytochemicznymi wykazano specyficzną, polarną lokalizację tych białek w komórkach łodygi i korzenia rzodkiewnika pospolitego. Stwierdzono także, iż lokalizacja białek *PIN* może podlegać dynamicznym zmianom (transport pęcherzykowy), a ich rozmieszczenie w plazmalemmie kontrolowane jest przez elementy cytoszkieletu. Dodatkowych informacji na temat polarnego transportu auksyny dostarczyły badania, w których zastosowano jego inhibitory – fitotropiny. Chociaż nie jest do końca wyjaśniony mechanizm polarnego transportu auksyny w foto- i grawitropizmie roślin, w świetle nowych wyników badań, asymetryczny rozkład auksyny w komórkach podczas działania odpowiednich bodźców może być wynikiem ukierunkowanego transportu tego hormonu, regulowanego przez specyficzne zlokalizowane nośniki transportu auksyny.

*Słowa kluczowe:* auksyna, polarny transport auksyn, fitotropiny.

*Summary:* The results of molecular dissection of *aux1* and *pin* mutants were the breakthrough in understanding the phenomenon of auxin polar transport. The *AUX1* and *PIN* genes were found to encode cellular influx and efflux carriers of auxin. Using immunolocalization method, a specific and polar localization of those peptides in shoot and root cells of *Arabidopsis thaliana* has been indicated. It has been found that the localization of *PIN* proteins undergoes dynamic changes involving vesicular transport and cytoskeleton. Further information of auxin polar transport was provided by auxin transport inhibitor studies – fitotropins. Though the role of auxin polar transport in photo- and gravitropic responses is not fully established, the recent data suggest that action of photo- and gravistimuli results in asymmetric distribution of auxin that may be a consequence of the relocalisation of specific influx and efflux carriers.

*Key words:* auxin, auxin polar transport, fitotropins.



## WSTĘP

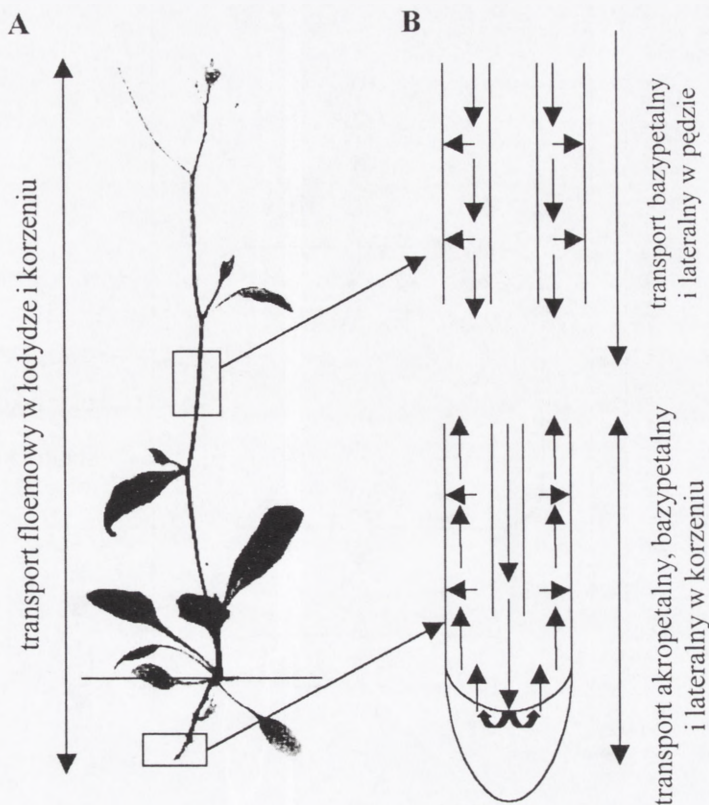
Wszystkie procesy wzrostu i rozwoju roślin regulowane są przez niskocząsteczkowe związki zwane (fito)hormonami, wśród których wyróżniamy: auksynę, cytokininy, gibbereliny, etylen, kwas abscysynowy, jasmoniany i brassinosteroidy [4, 22]. Każdy z tych związków oddzielnie lub we współdziałaniu z innymi hormonami roślinnymi odpowiada za regulację specyficznych procesów. Auksyna odpowiada za ustanowienie apikalno-bazalnej osi zarodka, tworzenie korzeni bocznych, różnicowanie się tkanek przewodzących, a także kontroluje filotaksję liści, foto- i grawitropizm pędu i korzenia, zjawisk dominacji wierzchołkowej [14, 30]. Auksyna uważana jest również za substancję morfogenną, której gradient stężeń „informuje” komórkę o jej położeniu względem innych komórek w tkance i organie [13, 47]. Jej synteza zachodzi w młodych rosnących regionach, głównie wierzchołku wzrostu pędu i korzenia, młodych liściach, pąkach, kwiatach, owocach i rozwijających się nasionach [28, 38]. W tkankach roślinnych hormon ten występuje w formie wolnego kwasu (indolilo-3-ocetowego – IAA) lub koniugatów (estrów) tworzonych z cukrami, *mezo*-inozytolem, aminokwasami, peptydami i białkami. W tej formie auksyna może być transportowana, akumulowana oraz chroniona przed degradacją [54].

## CHEMIOSMOTYCZNA TEORIA TRANSPORTU AUKSYNY

Już w latach dwudziestych ubiegłego wieku N. Cholodny [8] i F. Went [51] nawiązując do pionierskich badań C. Darwina [10] zaproponowali hipotezę, która tłumaczyła udział polarnego transportu auksyny (w owym czasie nie znano jeszcze jej budowy chemicznej) w regulacji procesów foto- i geotropizmu. Do końca ubiegłego wieku opisano dwa główne szlaki transportu auksyny: szybki (niekierunkowy, floemowy) i wolny (kierunkowy, polarny) (ryc. 1 A,B) [52]. Występowanie floemowego transportu potwierdziły doświadczenia prowadzone z użyciem radioaktywnie znakowanej naturalnej (IAA) i syntetycznych auksyn [34]. Stwierdzono, że ma on charakter zarówno bazypetalny (skierowany ku podstawie), jak i akropetalny (w kierunku wierzchołka), jest względnie szybki (5–20 cm/godz.) i prawdopodobnie skorelowany z transportem asymilatów oraz nieaktywnych koniugatów auksynowych [39] (ryc. 1A). Badania przeprowadzone na grochu wykazały, iż te same (znakowane izotopem) cząsteczki auksyny, które były transportowane floemem, po dotarciu do określonych miejsc, mogą przemieszczać się za pomocą transportu polarnego. Fakt ten wskazuje, iż obie drogi transportu mogą być powiązane ze sobą [6].

Transport polarny (w przeciwieństwie do floemowego) jest charakterystyczny dla aktywnych i wolnych auksyn, odbywa się od komórki do komórki i ma ściśle kierunkowy charakter. Główny prąd tego transportu biegnie bazypetalnie (w kierunku podstawy) z prędkością 5–20 mm/godz. [30]. Używając radioaktywnie znakowanej auksyny

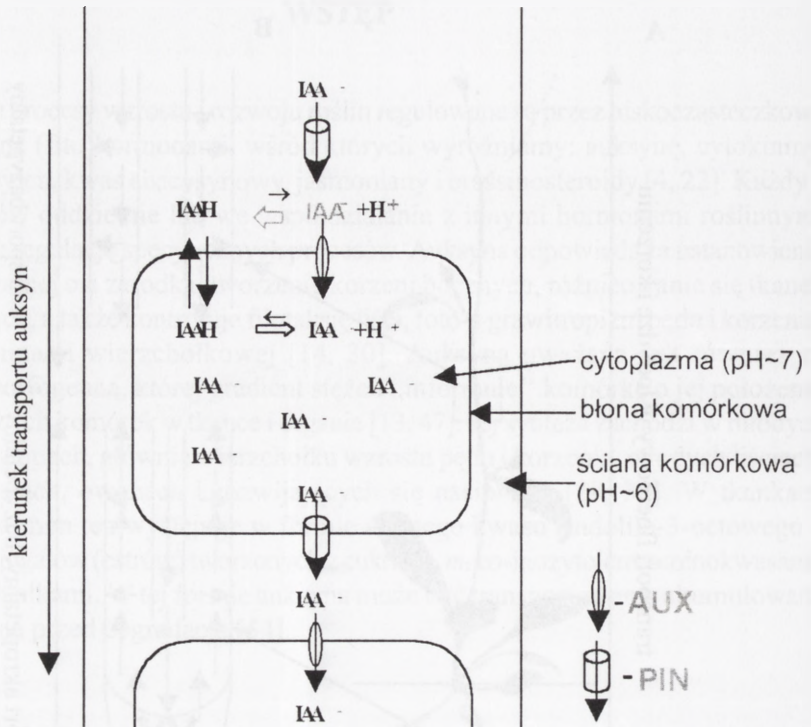




RYCINA 1. Szlaki transportu auksyny w roślinie: A – transport floemowy (niekierunkowy, szybki), B – transport polarny (kierunkowy, wolny) w łodydze i korzeniu

stwierdzono, iż ten typ transportu zachodzi w kambium i przyległych, częściowo zróżnicowanych komórkach ksylemu, a następnie fitohormon ten jest transportowany w kierunku bocznym [34]. W korzeniu auksyna transportowana jest akropetalnie (w kierunku wierzchołka), a jej część po dotarciu do szczytowej części tego organu przemieszcza się bazypetalnie, w kierunku epidermy do strefy wydłużania (ryc. 1B)[43].

W trakcie wieloletnich badań wykazano, że polarny transport auksyny wymaga stałego dopływu energii oraz ulega blokowaniu przez inhibitory biosyntezy białek. Wyniki tych doświadczeń przyczyniły się do sformułowania chemiosmotycznej teorii [45, 46], według której przemieszczanie się auksyny przez błonę komórkową ma charakter zarówno pasywny, jak i aktywny (ryc. 2). Według tej teorii w apoplacie (o  $\text{pH} \leq 6$ ) około 15% IAA występuje w formie niezdysonowanej (IAAH). Występująca w tej formie auksyna może swobodnie (w drodze dyfuzji) wnikać do cytoplazmy (o  $\text{pH} \geq 7$ ), gdzie ulega dysocjacji ( $\text{IAA} \rightleftharpoons \text{IAA}^- + \text{H}^+$ ). Lipofobowy anion  $\text{IAA}^-$  zaś jest transportowany z apoplastu przez specyficzny nośnik na zasadzie symportu z  $\text{H}^+$  do protoplastu. Wyższe pH wewnątrz komórki sprzyja dysocjacji grupy karboksylowej



RYCINA 2. Schemat polarnego transportu IAA z zaznaczoną lokalizacją w błonie komórkowej nośników transportujących IAA: AUX1 – nośnik transportujący auksynę do wnętrza komórki, PIN – nośnik transportujący auksynę z komórki

IAA i ustaleniu się równowagi, w której stężenie formy zdysocjowanej jest wyższe niż w apoplazmie. Anion IAA<sup>-</sup> jest usuwany na zewnątrz komórki przez inny specyficzny, zależny od ATP nośnik anionowy. Wektorowy charakter tego transportu tłumaczy się asymetrycznym (polarnym) rozmieszczeniem nośników auksyny w komórkach, warunkujących bazypetalny kierunek przemieszczania się tego hormonu. Poza pasywnym wnikaniem auksyny do komórek niektórzy badacze sugerowali również udział specyficznych nośników [19] oraz symportu IAA<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> [2, 29].

Zastosowanie technik biologii molekularnej umożliwiło zidentyfikowanie genów: *AUX*, *PIN* kodujących przypuszczalnie, białkowe nośniki, które ułatwiają wnikanie i usuwanie auksyny z komórek rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) [41]. Mutacje tych genów prowadzą do zaburzeń w przebiegu foto- i geotropizmu, procesów bezpośrednio związanych z polarnym transportem auksyny. Z kolei użycie przeciwciał skierowanych na białkowe produkty genów *AUX*, *PIN* pozwoliło określić ich tkankową i komórkową lokalizację. Na podstawie wyników tych badań stwierdzono, że zaproponowana przez Cholodnego-Wenta teoria polarnego transportu auksyny ma swoje naukowe uzasadnienie. Wyniki najnowszych badań wskazują również, że nośniki



ułatwiająca usuwanie auksyny z komórek mogą także występować poza plazmalemą i pozwalają również zrozumieć molekularny mechanizm działania inhibitorów polarnego transportu auksyny [18].

## DOKOMÓRKOWY TRANSPORT AUKSYNY BIAŁKO AUX1

Mutant *aux1 A. thaliana* wykazuje agrawitropizm korzeni i jest niewrażliwy na auksynę. Po sklonowaniu genu i dokładnej jego analizie stwierdzono, że koduje on 485-aminokwasowe białko, wykazujące znaczące podobieństwo do roślinnych permeaz [1]. Na tej podstawie wyciągnięto wniosek, że AUX1 pełni rolę nośnika IAA. Pomimo braku biochemicznych dowodów potwierdzających ten fakt, istnieje szereg danych wskazujących na zaangażowanie AUX1 w dokomórkowym transporcie auksyny. U mutantu *aux1* podany egzogennie kwas 3-naftylooctowy (1-NAA, przenikająca przez błony syntetyczna auksyna) skuteczniej znosi agrawitropizm w porównaniu z IAA lub kwasem 2,4-dwuchlorofenoksyoctowym (2,4-D, trudniej przenikający przez błony). Jest to prawdopodobnie wynik przywrócenia przez 1-NAA bazypetalnego transportu endogennej auksyny [33, 53]. Podobny efekt zaobserwowano stosując substancje hamujące wnikanie auksyny do komórek [42]. Bardziej przekonujących dowodów, wskazujących na udział AUX1 w transporcie auksyny, dostarczyły wyniki badań, w których zastosowano znakowany izotopowo IAA oraz jego syntetyczne analogi. Dowiodły one, iż w korzeniach mutantu *aux1* akumulacja 2,4-D jest znacząco niższa niż u formy dzikiej (WT). Natomiast po podaniu 1-NAA lub IAA nie stwierdzono takich różnic [33]. Swarup i inni [48] za pomocą przeciwciał skierowanych na białko AUX1 wykazali specyficzną akumulację tego domniemanego nośnika IAA w korzeniach *A. thaliana*. Białko to występowało wyłącznie w apikalnej części komórek: protofloemu, kolumelli, bocznych komórkach czapeczki korzenia i komórkach ryzodermi. U mutantów *aux1* stwierdzono zmiany w komórkowo-specyficjnej akumulacji auksyny – mniejsze ilości wolnej auksyny gromadzone były w wierzchołku korzenia w porównaniu z korzeniami roślin typu dzikiego. Prawdopodobnie brak ekspresji białka AUX1 w wierzchołku wzrostu korzenia u mutantu ze zknokautowanym genem *AUX1* prowadzi do zaburzeń w bazypetalnym transporcie auksyny [43, 48]. Lokalizacja AUX1 w komórkach protofloemu położonych w wyższych partiach korzenia *A. thaliana* sugeruje, iż jedną z funkcji tego białka może być ukierunkowywanie napływu auksyny przez protofloem do merystemu wierzchołkowego korzenia [48]. Być może AUX1 jest pierwszym molekularnym dowodem, który łączy polarny i niepolarny szlak transportu auksyny.

## POZAKOMÓRKOWY TRANSPORT AUKSYNY BIAŁKA PIN

Większość obserwowanych fenotypów mutantów ze znokautowanym genem *Atpin* przypomina rośliny *A. thaliana* traktowane substancjami, hamującymi usuwanie auksyny z komórki [14]. Szczegółowa analiza tych mutantów dostarczyła dodatkowych argumentów sugerujących, iż białka PIN odgrywają istotną rolę w transporcie auksyny z komórki.

Mutant *pin1* wykazuje silną redukcję bazypetalnego transportu auksyny [40]. Stwierdzono, iż gen *AtPIN1* koduje 622-aminokwasowe białko (67 kDa), zawierające 12 transbłonowych segmentów, które połączone są hydrofilową pętlą, występującą pomiędzy piątym a szóstym segmentem transbłonowym [16, 41]. W genomie rzodkiewnika stwierdzono występowanie rodziny genów homologicznych do *AtPIN1*: *AtPIN2/EIR1/AGRI* [7, 32, 37, 50], *AtPIN3* i *AtPIN4* [13, 15]. U wspomnianej rośliny rodzina genów *PIN* składa się z co najmniej ośmiu przedstawicieli. Ortologi genów *PIN* *A. thaliana* znaleziono także w genomach kukurydzy, ryżu i soi [14]. Białka *PIN* wykazują ponad 70-procentowe podobieństwo i mają identyczną topologię. Stwierdzono, iż niektóre sekwencje aminokwasowe białek *PIN* wykazują wysoką homologię do białek transportujących u *Prokaryota* i *Eucaryota* [7, 32, 37, 41, 50], co dodatkowo potwierdza proponowaną, transportową funkcję białek *PIN*. Pośrednim dowodem potwierdzającym to przypuszczenie są także wyniki badań Chena i innych [7], którzy wykazali, że nadekspresja *AtPIN2* w komórkach drożdży prowadzi do spadku akumulacji radioaktywnie znakowanej auksyny (lub jej toksycznego analogu) w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Wyniki te mogą sugerować, iż *AtPIN2* bierze udział w transporcie tego fitohormonu z cytoplazmy poza obręb komórki.

Jednym z założeń chemiosmotycznej teorii jest polarne rozmieszczenie nośników auksyny w komórkach uczestniczących w jej transporcie [45, 46]. Tego typu rozmieszczenie hipotetycznych nośników auksynowych zostało potwierdzone doświadczalnie. U rzodkiewnika białka *AtPIN* zlokalizowano metodą immunocytochemiczną w różnych komórkach i tkankach tej rośliny. Występowanie *AtPIN1* stwierdzono w bazalnej części komórek miękiszowych ksylemu i kambium oraz niższej części strefy wydłużeniowej pędu [16, 41], zaś w korzeniach także w bazalnej części komórek walca osiowego [13]. *AtPIN2*, w przeciwieństwie do *AtPIN1*, zlokalizowano także po bazalnej stronie komórek epidermy i bocznej części czapeczki korzenia [37]. Z kolei *AtPIN3* występują głównie w odosiowej części komórek endodermy pędów oraz w komórkach perycyklu i kolumelli korzeni [15]. Obecność *AtPIN4* stwierdzono natomiast w komórkach centrum spoczynkowego i otaczających go komórkach inicjalnych merystemu korzeniowego [13].

Argumentem przemawiającym za udziałem białek *PIN* w transporcie auksyny jest także stwierdzona redukcja polarnego transportu u mutantów, która bezpośrednio skorelowana była z brakiem ekspresji tych białek w odpowiednich tkankach [40, 43]. U mutantów *Atpin* brak ekspresji białek *PIN* powoduje także zmianę akumulacji auksyny



w odpowiednich komórkach [13, 15, 32]. Brak aktywności AtPIN2 wpływało na akumulację 1-NAA w komórkach i prowadziło do zwiększonej wrażliwości na te i inne analogi auksyny [37].

Opisana powyżej lokalizacja białek z rodziny PIN może podlegać dynamicznym zmianom, a ich rozmieszczenie w błonie komórkowej kontrolowane jest przez elementy cytoszkieletu. W korzeniu *A. thaliana* po podaniu BFA (brefeldyna A) szybko i odwracalnie zmienia się lokalizacja białek AtPIN1, które jako integralne składniki błony przemieszczają się do wnętrza cytoplazmy, tworząc pęcherzyki [14, 18]. Taką sytuację zaobserwowano także w obecności inhibitora syntezy białek. Traktowanie korzeni rzodkiewnika: BFA, cytochalazyną D lub latrunculiną B (związkami powodującymi dezintegrację filamentów aktyny) prowadziło do zahamowania cyrkulacji AtPIN1 między błoną komórkową a cytoplazmą. Sugeruje to, że pęcherzyki zawierające AtPIN1 są transportowane wzdłuż filamentów aktynowych cytoszkieletu. Okazało się, że substancje hamujące usuwanie auksyny z komórki blokują zarówno cykliczne zmiany lokalizacji AtPIN1, jak i innych niespokrewnionych z nimi białek błonowych. Sugeruje to bardziej ogólny, mniej specyficzny sposób działania tych substancji [14, 18].

Przedstawione powyżej dane trudno włączyć do starego, statycznego modelu, w którym cząsteczki nośników auksyny, transportujących ten fitohormon do, jak i z komórki, znajdują się wyłącznie w plazmalemmie. Jak dotąd nie poznano biologicznego znaczenia cyrkulacji białek PIN w komórkach rzodkiewnika. Istnieje kilka hipotez wyjaśniających to zjawisko. Pierwsza z nich zakłada, że zmiana lokalizacji kompleksu transportującego auksynę może odpowiadać za szybkie zmiany w ukierunkowanym transporcie tego fitohormonu [20]. Część badaczy zakłada, że białka PIN pełnią podwójną rolę – są zarówno nośnikami, jak i receptorami dla auksyny. Tego typu właściwości mają nośniki cukrów [24]. Cyrkulacja białek PIN może być związana z transdukcją sygnału auksynowego i procesem regeneracji receptorów tego fitohormonu – zjawiska, które jest dobrze znane dla wielu typu receptorów zwierzęcych [23]. Kolejna, trzecia hipoteza zakłada, że transport pęcherzykowy jest częścią mechanizmu transportu auksyny, analogicznego do tego, jaki obserwuje się w przypadku acetylocholin – jednego z tzw. neurotransmiterów występujących w tkankach zwierzęcych. Przez analogię przypuszcza się, że gromadzona we wnętrzu pęcherzyków auksyna mogłaby zostać usuwana (wydzielana) poza komórkę w drodze polarnej egzocytozy [14].

Jak dotąd nie wyjaśniono jednoznacznie, czy białka PIN są odpowiedzialne jedynie za transport lub/i biorą udział (jako jeden ze składników większego kompleksu) w jego regulacji. Odpowiedź na te pytania mogą przynieść jedynie badania biochemiczne, które pozwolą na określenie specyficzności substratowej, powinowactwa i kinetycznych właściwości wyizolowanych i oczyszczonych białek PIN.

## INHIBITORY POLARNEGO TRANSPORTU AUKSYNY I ICH MECHANIZM DZIAŁANIA

Zarówno transport auksyny do, jak i z komórki może być hamowany przez syntetyczne substancje zwane fitotropinami. Do substancji hamujących usuwanie auksyny z komórek należą m.in. kwas 1-N-naftyloflawinowy (NPA) i kwas 2,3,5-trijodobenzoesowy (TIBA). Wykazano, że fitotropiny blokują niekompetycyjny wpływ IAA z komórek, co sugeruje, że działają one w miejscu odmiennym od tego, które odpowiada za katalityczną aktywność nośników auksynowych [26]. Ostatnio wykazano, że wpływ z komórek polarnie transportowanej auksyny wymaga działania co najmniej dwóch polipeptydów. Pierwszy z nich pełni rolę właściwego błonowego transportera auksyny (kodowanego przez geny z rodziny *PIN*), drugi zaś pełni funkcję regulacyjną i stanowi miejsce wiązania fitotropin, takich jak NPA i TIBA [35]. Na podstawie wyników przeprowadzonych badań przyjmuje się, że białka wiążące NPA są peryferycznymi białkami błonowymi związanymi z cytoplazmatyczną powierzchnią błony komórkowej [36].

Mechanizm działania fitotropin nie został dotychczas poznany. Pierwsze modele zakładały, że w błonowym transporcie auksyny współdziałają ze sobą nośniki tego fitohormonu oraz białko wiążące NPA. Obydwa składniki tego kompleksu stabilizowane byłyby przez filamenty aktynowe, których funkcja może polegać na utrzymaniu jego stabilności [35]. Jednak wyniki najnowszych badań sugerują, że związek tych dwóch białek może mieć bardziej dynamiczny i mniej bezpośredni charakter. Podejrzewa się obecnie, że biochemiczny mechanizm działania inhibitorów transportu polarnego auksyny polega na blokowaniu zależnej od cytoszkieletu cyrkulacji przenośników auksyny między błoną komórkową a systemem błon wewnątrzkomórkowych (aparatem Golgiego) [35].

Stosując blokery transportu pęcherzykowego (brefeldynę A, monezynę) wykazano, że czynny transport pęcherzykowy między aparatem Golgiego i błoną komórkową jest warunkiem efektywnego wpływu auksyny z komórki. Stwierdzono ponadto, że cząsteczki transportera auksyny podlegają cyrkulacji między błoną komórkową a obłonionymi strukturami cytoplazmatycznymi [35]. Uważa się, że tego typu mechanizm redystrybucji nośników auksynowych może być związany z odbiorem przez komórki bodźców środowiskowych (patrz niżej).

Zablokowanie cyrkulacji pęcherzyków wewnątrz komórki, hamujące transport auksyny, nie wpływa na wiązanie NPA przez białka oddziałujące z tym inhibitorem [35]. Wnioskuje się na tej podstawie, że białko wiążące NPA nie jest, jak transporter auksyny, wbudowywane w pęcherzyki aparatu Golgiego, lecz przemieszcza się w komórce niezależnie od transportu pęcherzykowego [35]. Dodatkowe informacje o roli fitotropin uzyskano w wyniku przeprowadzonych badań, w których wykazano, że zastosowanie NPA i TIBA blokuje efekt działania BFA na lokalizację PIN1 oraz spowalnia tempo przywracania fizjologicznego poziomu transportu auksyny po uprzednim zastosowaniu tej substancji [35]. Sugeruje to, że główny mechanizm działania



inhibitorów transportu IAA polegać może na hamowaniu recyrkulacji cząsteczek przENOŚNIKA auksyny do błony komórkowej, nie zaś na blokowaniu przepływu auksyny przez te przENOŚNIKI. Stąd też przypuszcza się, że rola białek wiążących NPA i TIBA polega na regulacji transportu pęcherzyków przENOŚNĄCYCH cząsteczki transportera IAA między błoną komórkową a cytoplazmą [35]. Jak dotąd brak jest dowodów wskazujących na bezpośredni wpływ fitotropin na komórkową lokalizację białek PIN w tkankach, których uprzednio nie poddawano działaniu blokerów transportu pęcherzykowego.

Kluczowe dla wyjaśnienia biologicznej funkcji białek wiążących NPA mogą być wyniki badań wskazujące na oddziaływanie tych białek z cytoszkieletem. Stwierdzono, że omawiane białka wiążą się z włóknami aktywnymi tej struktury [9]. Uzyskano również wyniki sugerujące, że białka wiążące NPA mogą być integralnym składnikiem błon komórkowych [3]. Na tej podstawie wnioskuje się, że białko wiążące NPA oddziałuje jednocześnie z wbudowanymi w pęcherzyki nośnikami auksyny oraz z elementami cytoszkieletu. W konsekwencji dochodzi do ukierunkowanego transportu wspomnianych nośników z aparatu Golgiego wzdłuż włókien aktywnych do miejsca ich przeznaczenia w plazmalemmie bazalnej strony komórek. Umożliwia to właściwe rozmieszczenie cząsteczek transportera auksyny w komórce oraz ich orientację względem płaszczyzny plazmalemmy [35]. Znaczenie cytoszkieletu w mechanizmie ustanawiania polarnego charakteru transportu auksyny potwierdzają wyniki doświadczeń, w których koleoptyle pszenicy i hypokotyle cukinii traktowano cytochalazyną B lub D (powodujących fragmentację cytoszkieletu). Pod ich wpływem dochodziło do obniżenia tempa polarnego transportu auksyny i zniesienia wpływu NPA na ten proces [5]. Zastosowanie cytochalazyny D wpływało również na przypadkowy, nieregularny rozkład białek PIN w błonie plazmatycznej [18].

Aktywność białka wiążącego NPA może podlegać kontroli w drodze ich fosforylacji i defosforylacji [44]. Stwierdzono, że hamujący wpływ fitotropin na akropetalny transport auksyny w korzeniu wymaga aktywności fosfatazy białkowej 2A. Mutanty rzodkiewnika *rcn1*, u których następuje defekt regulatorowej podjednostki tego enzymu, charakteryzuje obniżona, w porównaniu z roślinami typu dzikiego, reaktywność korzeni na bodziec grawitropiczny. Ponadto ustalono, że wspomnianego mutantu charakteryzuje normalny poziom akropetalnego transportu auksyny, lecz jest on niewrażliwy na działanie NPA [17, 44]. Zniesienie hamowania akropetalnego transportu auksyny w korzeniu uzyskiwano natomiast stosując kantarydynę – inhibitor aktywności fosfataz. Tempo bazypetalnego transportu auksyny w korzeniu mutantu *rcn1* jest około 1,5 razy większe niż u roślin typu dzikiego. Jednak wrażliwość tego transportu na NPA nie podlega zmianie [44]. Przytoczone fakty sugerują odmienny mechanizm regulacji transportu auksyny w obydwu kierunkach. Uważa się, że wpływ fosfataz na transport auksyny musi być równoważony przez aktywność kinaz. Potwierdzono to stosując szerokie spektrum inhibitorów kinaz, takich jak staurosporyna i K252. Okazało się, że związki te hamują wpływ auksyny z komórek nie oddziałując jednak w żaden sposób na wnikanie hormonu do komórek [11]. Również inhibitory kinaz tyrozynowych znoszą wrażliwość transportu auksyny na NPA [3]. Ich działanie pozostaje jednocześnie bez wpływu na tempo bazypetalnego transportu IAA. Wyniki przytoczonych badań sugerują, że kinazy białkowe mogą regulować zarówno sam proces transportu auksyny, jak i jego wrażliwość na fitotropiny.

Wiele nowych informacji o naturze systemu regulacji transportu IAA przez fitotropiny wniosły badania przeprowadzone na mutancie *tir3* rzodkiewnika [31]. Mutant ten charakteryzuje się zredukowanym tempem transportu auksyny w osiach kwiatostanów oraz, co szczególnie istotne, brakiem hamowania transportu auksyny przez NPA. Ustalono, że komórki *tir3* cechuje zredukowana liczba miejsc wiążących NPA [31]. Wnioskuje się na tej podstawie, że gen *TIR3* może kodować białko wiążące NPA lub brać udział w jego syntezie. Jednocześnie wykazano, że locus *tir3* mapuje się w ramce odczytu kodującej białko BIG, które wykazuje znaczącą homologię z wieloma białkami eukariotycznymi [31]. Jednym z nich jest kalozyna występująca u muszki owocowej. Kalozyna zaangażowana jest w kontrolę synaptycznego transportu pęcherzykowego w połączeniach nerwowo-mięśniowych. Asymetryczne rozmieszczenie transportera auksyny w błonie komórkowej (podobnie jak transport synaptyczny) zależy od ukierunkowanego transportu pęcherzyków. BIG, zatem może uczestniczyć w kontrolowaniu dystrybucji przenośników auksyny przez regulacyjny wpływ białek wiążących NPA na transport pęcherzykowy [31].

Choć coraz bliżsi jesteśmy poznania mechanizmu działania NPA i TIBA, mało wiadomo na temat regulacji procesu wnikania auksyny do wnętrza komórek. Brak substancji hamujących ten proces utrudnia wyjaśnienie tego etapu transportu auksyny. Ostatnio uzyskano dwa związki: kwas 1-naftoctowy (1-NOA) i kwas 3-chloro-4-hydroksyfenyloctowy (CHPAA) specyficznym hamujące transport auksyny do komórek zawiesiny tytoniu, które mogą pomóc w wyjaśnieniu homeostazy i transportu auksyny w komórce [21].

## **ROLA POLARNEGO TRANSPORTU AUKSYN W FOTOTROPIZMIE I GEOTROPIZMIE**

Polarny transport auksyny odgrywa znaczącą rolę w regulacji wielu procesów zachodzących w roślinach. Odpowiedzialny jest za prawidłowy rozwój i wzrost zarodków (regulację płaszczyzny podziałów i różnicowania się komórek), tworzenie się tkanek przewodzących, organów i wzorców rozwojowych roślin, inicjację korzeni bocznych, dominację wierzchołkową, foto- i geotropizm roślin [30].

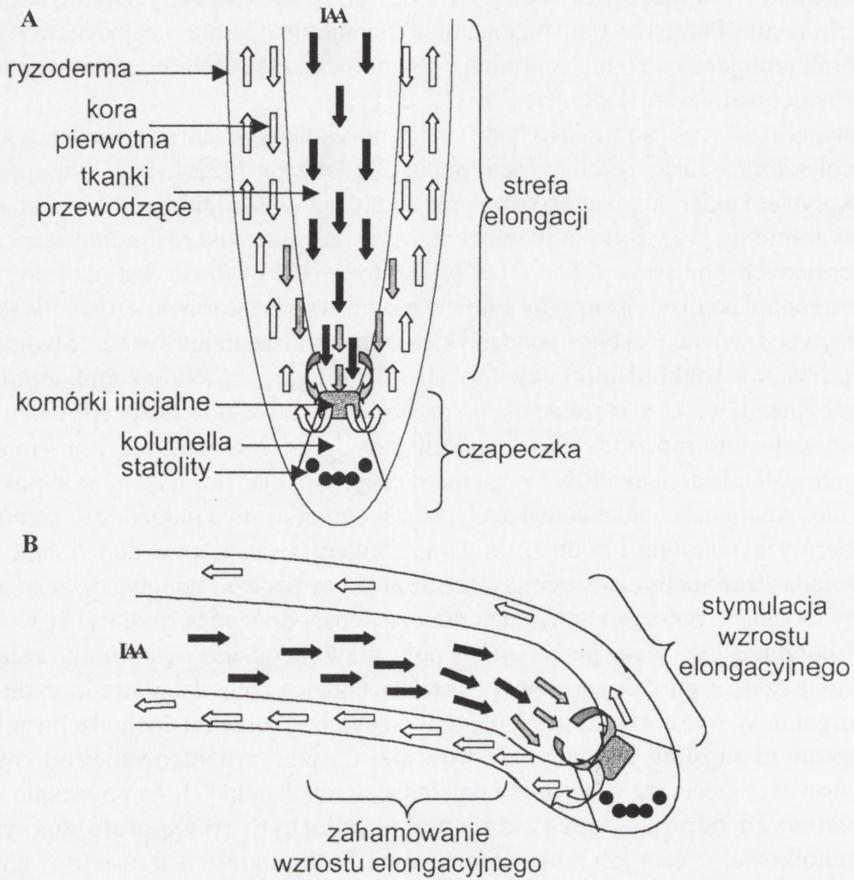
Rośliny regulują swój wzrost elongacyjny w odpowiedzi na kierunkowe działanie światła (fototropizm) lub siłę pola grawitacyjnego (grawitropizm) [52]. W 1926 roku Cholodny i Went stworzyli model tłumaczący reakcje tropiczne roślin, według którego reakcje wzrostowe roślin wynikają z asymetrycznego rozkładu auksyny, która w zależności od lokalnego stężenia stymuluje lub hamuje wzrost wydłużeniowy komórek pędu i korzenia, powodując ich wygięcie [8, 51, 52]. Inhibitory polarnego transportu auksyny blokują jej asymetryczne rozmieszczenie i reakcje wzrostowe wskazując tym samym na kluczową rolę tego procesu w odpowiedziach roślin na wspomniane czynniki środowiskowe. Istotną rolę odgrywa lateralny transport auksyny, który ułatwia prawdopodobnie wymianę tego fitohormonu między głównym (bazypetalnym)



strumieniem w tkankach przewodzących a obwodowymi (peryferycznymi) częściami pędu i korzenia. Pomiędzy tymi regionami występuje endoderma – pojedyncza warstwa komórek izolująca od siebie centralną i obwodową część tych organów i regulująca ich zróżnicowany wzrost elongacyjny [12, 25].

Ostatnio dzięki zastosowaniu technik biologii molekularnej udało się wizualnie wykazać, iż rozmieszczenie auksyny w łodygach tytoniu [27], korzeniu [32] i hypokotylu *A. thaliana* pod wpływem ukierunkowanego działania sił pola grawitacji lub światła ma charakter nierównomierny [15]. Było to możliwe przez skonstruowanie roślin transgenicznych zawierających konstrukt *DR5::GUS* [49], którego aktywność jest skorelowana z bezpośrednimi pomiarami auksyny. Etiolowane, transgeniczne siewki *A. thaliana* rosnące na pożywce zawierającej NPA poddano kierunkowemu działaniu światła. Stwierdzono asymetryczny rozkład auksyny (po stronie ulegającej szybszemu wzrostowi elongacyjnemu większe stężenie niż po przeciwnej), zaś w obecności NPA siewki nie wykazywały fototropizmu, a rozkład auksyny był równomierny. Friml i inni [15] zasugerowali udział białka PIN3 w asymetrycznym rozkładzie auksyny w hypokotyli. Immunocytologiczne badania wykazały, iż jest ono odosiowo położone w komórkach endodermy hypokotyli i pędu *A. thaliana*. Sugeruje się, iż prawdopodobnie PIN3 odpowiada za asymetryczne rozmieszczenie auksyny podczas odpowiedzi wzrostowej rośliny na światło poprzez kontrolę lateralnego transportu tego hormonu [15].

W korzeniu miejscem percepcji sił pola grawitacyjnego są komórki kolumelli (centralna część czapeczki), a odpowiedź na ten bodziec zachodzi w strefie wydłużania tego organu. W wyniku reakcji na pole grawitacyjne w korzeniu dochodzi do zmian w endogennym stężeniu auksyny, co prowadzi do jego zróżnicowanej odpowiedzi wzrostowej i zgięcia się w kierunku działania sił tegoż pola [7]. Za powstanie zmian wzrostowych odpowiadają zakłócenia w polarnym transporcie auksyny w wierzchołkowej części korzenia. Początkowo fitohormon ten transportowany jest akropetalnie – od podstawowej do szczytowej części tego organu. Po dotarciu do kolumelli następuje zmiana kierunku transportu auksyny z akro- na bazypetalny. Fitohormon przemieszcza się poprzez komórki epidermy do strefy wydłużania (ryc. 3A) [26]. Analiza molekularna mutantów charakteryzujących się zaburzeniami procesu grawitropizmu (*agr1/eir1/wav6/Atpin2*) pozwoliła lepiej zrozumieć opisany proces [37]. Okazało się, że za lokalny transport auksyny w wierzchołkach wzrostu korzeni rzodkiewnika odpowiadają prawdopodobnie białka z rodziny PIN. Uważa się, iż za gromadzenie auksyny w rejonie merystemu wierzchołkowego korzenia odpowiadają białka: AtPIN1, AtPIN2 oraz AtPIN4 (ryc. 3A). Z merystemu wierzchołkowego auksyna kierowana jest poprzez AtPIN4 do komórek kolumelli – miejsca percepcji bodźców geotropicznych. W kolumelli obserwuje się zarówno najwyższe stężenie auksyny (komórki inicjalne i pierwsza warstwa kolumelli), jak i najszybsze tempo podziałów komórkowych w całym korzeniu [47]. Z kolumelli omawiany fitohormon kierowany jest za pośrednictwem AtPIN2 do bocznej części czapeczki, a następnie do komórek kory pierwotnej i ryzodermis strefy wzrostu korzenia. W powstawaniu odpowiedzi geotropicznych korzeni najprawdopodobniej uczestniczą też białka AtPIN3, zlokalizowane w perycyklu i kolumelli. Friml i inni [15] stwierdzili, że zmianie kierunku



RYCINA 3. Udział i lokalizacja białek PIN w transporcie auksyny w korzeniu: A – korzeń w pozycji pionowej, B – korzeń w pozycji poziomej (◼ AtPIN1, ◻ AtPIN2, ◄ AtPIN4, opis w tekście)

wzrostu korzeni rzodkiewnika towarzyszy reorientacja w komórkowej lokalizacji AtPIN3. Autorzy ci sugerują, że towarzysząca stymulacji grawitacyjnej zmiana wewnątrzkomórkowego rozmieszczenia statolitów (ryc. 3B) powoduje przeorientowanie kierunku przebiegu włókien aktynowych, wzdłuż których odbywa się transport pęcherzyków błonowych zawierających wbudowane w nie cząsteczki AtPIN3. W konsekwencji dochodzi do zmiany w rozmieszczeniu tego białka. Powoduje to asymetryczny przepływ auksyny z komórek kolumelli, skąd fitohormon ten transportowany bazypetalnie do strefy wydłużania wywołuje zróżnicowany wzrost korzenia, przywracając jego orientację w kierunku działania sił pola grawitacyjnego (ryc. 3B).

Poza białkami PIN również AUX1 wydają się być zaangażowane w odpowiedzi geotropiczne korzeni rzodkiewnika. Cząsteczki tego nośnika auksyny zlokalizowano w komórkach ryzodermy i bocznej części czapeczki korzeniowej [48]. Na tej podstawie można



przypuszczać, że za wrażliwość korzeni na pole grawitacyjne odpowiadają białka nośnikowe regulujące transport auksyny zarówno do, jak i z komórek wierzchołkowej części tych organów.

## LITERATURA

- [1] BENNETT MJ, MARCHANT A, GREEN HG, MAY ST, WARD SP, MILLNER PA, WALKER AR, SCHULZ B, FELDMANN KA. *Arabidopsis AUX1* gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* 1996; **273**: 948–950.
- [2] BENNING C. Evidence supporting a model of voltage-dependent uptake of auxin into *Cucurbita pepo* vesicles. *Planta* 1986; **169**: 228–237.
- [3] BERNASCONI P, BHAVESH PC, REAGAN JD, SUBRAMANIAN MV. The N-naphthylphthalamic acid-binding protein is an integral membrane protein. *Plant Physiol* 1996; **111**: 427–432.
- [4] BISHOP GJ, KONCZ C. Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling. *Plant Cell* 2002; **14**: 97–110.
- [5] BUTLER JH, HU S, BRADY SR, DIXON MW, MUDAY GK. *In vitro* and *in vivo* evidence for actin association of the naphthylphthalamic acid-binding protein from zucchini hypocotyls. *Plant J* 1998; **13**: 291–301.
- [6] CAMBRIDGE AP, MORRIS DA. Transfer of exogenous auxin from the phloem to the polar auxin transport pathway in pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* 1996; **199**: 583–588.
- [7] CHEN R, HILSON P, SEDBROOK J, ROSEN E, CASPAR T, MASSON PH. The *Arabidopsis thaliana AGRVITROPIC1* gene encodes a component of polar auxin-transport efflux carrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 15112–15117.
- [8] CHOLODNY N. Wuchshormone und Tropismen bei den Pflanzen. *Biologisches Zentralblatt* 1927; **47**: 604–626.
- [9] COX D N, MUDAY G K. NPA binding-activity is peripheral to the plasma membrane and is associated with the cytoskeleton. *Plant Cell* 1994; **6**: 1941–1953.
- [10] DARWIN C, DARWIN F. The power of movement in plants (Deutsche Übersetzung: Das Bewegungsvermögen der Planze). Darwins gesammelte Werke, Bd. 13, Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, Germany, 1881.
- [11] DELBARRE A, MULLER P, GUERN J. Short-lived and phosphorylated proteins contribute to carrier-mediated efflux, but not to influx, of auxin in suspension-cultured tobacco cells. *Plant Physiol* 1998; **116**: 833–844.
- [12] EPEL BL, WARMBRODT RP, BANDURSKI RS. The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* 1992; **268**: 667–675.
- [13] FRIML J, BENKOVÁ E, BLILOU I, WIŚNIEWSKA J, HAMANN T, LJUNG K, WOODY S, SANDBERG G, SCHERES B, JÜRGENS G, PALME K. AtPIN4 mediates sink driven auxin gradients and patterning in *Arabidopsis* roots. *Cell* 2002; **108**: 661–673.
- [14] FRIML J, PALME K. Polar auxin transport – old concepts and new questions. *Plant Mol Biol* 2002; **49**: 273–284.
- [15] FRIML J, WIŚNIEWSKA J, BENKOVÁ E, MENDGER K, PALME K. Lateral relocation of auxin efflux regulator AtPIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 2002; **415**: 806–809.
- [16] GÁLWEILER L, GUAN C, MÜLLER A, WISMAN E, MENDGEN K, YEPHREMOV A, PALME K. Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* 1998; **282**: 2226–2230.
- [17] GARBERS C, DELONG A, DERUERE J, BERNASCONI P, SOLL D. A mutation in protein phosphatase 2A regulatory subunit A affects auxin transport in *Arabidopsis*. *EMBO J* 1996; **15**: 2115–2124.
- [18] GELDNER N, FRIML J, STIERHOF YD, JURGENS G, PALME K. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 2001; **413**: 425–428.
- [19] GOLDSMITH MHM. The polar transport of auxin. *Annu Rev Plant Physiol* 1977; **28**: 439–478.
- [20] HERTEL R. The mechanism of auxin transport as a model for auxin action. *Z Pflanzenphysiol* 1983; **112**: 53–67.



- [21] IMHOFF V, MULLER P, GUERN J, DELBARRE A. Inhibitors of the carrier-mediated influx of auxin in suspension-cultured tobacco cells. *Planta* 2000; **210**: 580–588.
- [22] KENDE H, ZEEVAART J. The five “classical” plant hormones. *Plant Cell* 1997; **9**: 1197–1210.
- [23] KNUTSON VP. Cellular trafficking and processing of the insulin receptor. *FASEB J* 1991; **5**: 2130–2138.
- [24] LALONDE S, BOLES E, HELLMANN H, BARKER L, PATRICK JW, FROMMER WB, WARD J. The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. *Plant Cell* 1999; **11**: 707–726.
- [25] 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.
- [26] LEYSER O. Plant hormones: ins and outs of auxin transport. *Curr Biol* 1999; **9**: 8–10.
- [27] LI Y, HAGEN G, GUILFOYLE T J. An auxin-responsive promoter is differentially induced by auxin gradients during tropisms. *Plant Cell* 1991; **3**: 116–1176.
- [28] LJUNG K, OSTIN A, LIOUSSANNE L, SANDBERG G. Developmental regulation of indole-3-acetic acid turnover in scots pine seedlings. *Plant Physiol* 2001; **125**: 464–475.
- [29] LOMAX TL, MEHLHORN RJ, BRIGGS WR. Active auxin uptake by zucchini membrane vesicles: quantitation using ESR volume and ÄpH determinations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 6541–6545.
- [30] LOMAX TL, MUDAY GK, RUBERY PH. Auxin transport. [w] Davies PJ [red.] Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology, Kluwer, Dordrecht, Netherlands, 1995: 509–530.
- [31] LUSCHING C. Auxin transport: why plants like to think BIG. *Curr Biol* 2001; **11**: 831–833.
- [32] LUSCHNIG C, GAXIOLA R, GRISAFI P, FINK G. EIR1 a root specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 1998; **12**: 2175–2187.
- [33] MARCHANT A, KARGUL J, MAY ST, MULLER P, DELBARRE A, PERROT-RECHENMANN C, BENNETT MJ. AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating uptake within root apical tissue. *EMBO J* 1999; **18**: 2066–2073.
- [34] MORRIS DA, THOMAS A. A microautoradiographic study of auxin transport in the stem of intact pea seedlings (*Pisum sativum* L.). *J Exp Bot* 1978; **29**: 147–157.
- [35] MUDAY G, DELONG A. Polar auxin transport: controlling where and how much. *Trends Plant Sci* 2001; **6**: 535–542.
- [36] MUDAY G. Maintenance of asymmetric cellular localisation of auxine transport protein through interaction with the actin cytoskeleton. *J Plant Growth Regul* 2000; **19**: 385–396.
- [37] MÜLLER A, GUAN C, GÄLWEILER L, TÄNZLER P, HUIJSER P, MARCHANT A, PARRY G, BENNETT M, WISMAN E, PALME K. *AtPIN2* defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J* 1998; **17**: 6903–6911.
- [38] NORMANLY J, COHEN JD, FINK GR. *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **90**: 10355–10359.
- [39] NOWACKI J, BANDURSKI RS. Myo-inositol esters of indole-3-acetic acid as seed auxin precursors of *Zea mays* L. *Plant Physiol* 1980; **65**: 422–427.
- [40] OKADA K, UEDA J, KOMAKI MK, BELL CJ, SHIMURA Y. Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. *Plant Cell* 1991; **3**: 677–684.
- [41] PALME K, GÄLWEILER L. PIN-pointing the molecular basis of auxin transport. *Curr Opin Plant Biol* 1999; **2**: 375–381.
- [42] PARRY G, DELBARRE A, MARCHANT A, SWARUP R, NAPIER R, PERROT-RECHENMANN C, BENNETT MJ. Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier mutation *aux1*. *Plant J* 2001; **25**: 399–406.
- [43] RASHOTTE AM, BRADY S, REED R, ANTE S, MUDAY GK. Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2000; **122**: 481–490.
- [44] RASHOTTE AM, DELONG A, MUDAY GK. Genetic and chemical reductions in protein phosphatase activity alter auxin transport, gravity response, and lateral root growth. *Plant Cell* 2001; **13**: 1683–1697.
- [45] RAVEN JA. Transport of indolacetic acid in plant cells in relation to pH and electrical potential gradients and its significance for polar IAA transport. *New Phytol* 1975; **74**: 163–172.
- [46] RUBERY PH, SHELDRAKE AR. Carrier-mediated auxin transport. *Planta* 1974; **118**: 101–121.
- [47] SABATINI S, BEIS D, WOLKENFELT H, MURFETT J, GUILFOYLE T, MALAMY J, BENFEY P, LEYSER O, BECHTOLD N, WEISBEEK P, SCHERES B. An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* 1999; **99**: 463–472.
- [48] SWARUP R, FRIML J, MARCHANT A, LJUNG K, SANDBERG G, PALME K, BENNETT M. Localisation of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes Dev* 2001; **15**: 2648–2653.

- [49] ULMASOV T, MURFETT J, HAGEN G, GUILFOYLE T J. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 1997; **9**: 1963–1971.
- [50] UTSUNO K, SHIKANAI T, YAMADA Y, HASHIMOTO T. *AGR*, an agravitropic locus of *Arabidopsis thaliana*, encodes a novel membrane protein family member. *Plant Cell Physiol* 1998; **39**: 1111–1118.
- [51] WENT FW. Die Bedeutung des Wuchsstoffes (auxin) für Wachstum, photo- und geotropische Krümmung. *Naturwissenschaften* 1933; **21**: 1–7.
- [52] WENT FW. Reflections and speculations. *Annu Rev Plant Physiol* 1974; **25**: 1–26.
- [53] YAMAMOTO M, YAMAMOTO KT. Effects of natural and synthetic auxins on the gravitropic growth habit of roots in two auxin-resistant mutants of *Arabidopsis*, *axr1* and *axr4*: evidence for defects in the auxin influx mechanism of *axr4*. *J Plant Res* 1999; **112**: 391–396.
- [54] ZIELIŃSKA E, KOWALCZYK S. Percepcja i transdukcja sygnału auksynowego. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 155–183.

*Redaktor prowadzący – M. Olszewska*

*Otrzymano: 24.03.2003 r.*

*Przyjęto: 06.05.2003 r.*

*ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń*

*e-mail: jwisniew@biol.uni.torun.pl*

1. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	1
2. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	2
3. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	3
4. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	4
5. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	5
6. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	6
7. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	7
8. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	8
9. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	9
10. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	10
11. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	11
12. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	12
13. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	13
14. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	14
15. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	15
16. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	16
17. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	17
18. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	18
19. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	19
20. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	20
21. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	21
22. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	22
23. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	23
24. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	24
25. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	25
26. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	26
27. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	27
28. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	28
29. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	29
30. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	30
31. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	31
32. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	32
33. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	33
34. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	34
35. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	35
36. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	36
37. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	37
38. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	38
39. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	39
40. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	40
41. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	41
42. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	42
43. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	43
44. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	44
45. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	45
46. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	46
47. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	47
48. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	48
49. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	49
50. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	50
51. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	51
52. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	52
53. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	53
54. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	54
55. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	55
56. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	56
57. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	57
58. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	58
59. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	59
60. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	60
61. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	61
62. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	62
63. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	63
64. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	64
65. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	65
66. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	66
67. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	67
68. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	68
69. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	69
70. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	70
71. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	71
72. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	72
73. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	73
74. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	74
75. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	75
76. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	76
77. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	77
78. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	78
79. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	79
80. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	80
81. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	81
82. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	82
83. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	83
84. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	84
85. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	85
86. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	86
87. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	87
88. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	88
89. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	89
90. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	90
91. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	91
92. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	92
93. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	93
94. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	94
95. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	95
96. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	96
97. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	97
98. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	98
99. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	99
100. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	100



## BEACON – AKTYWNY BIOLOGICZNIE PEPTYD ZWIĄZANY Z WYSTĘPOWANIEM OTYŁOŚCI

BEACON – BIOACTIVE PEPTIDE RELATED TO OBESITY

Agnieszka ZIÓŁKOWSKA, Marcin RUCIŃSKI, Katarzyna BUDZYŃSKA

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii,  
Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego, Poznań

**Streszczenie:** Beacon (BC) jest nowo odkrytym peptydem, wyizolowanym z podwzgórza piaskówki (*Psammomys obesus*), któremu przypisuje się rolę w regulacji bilansu energetycznego. Znany jest także pod nazwami *ubiquitin-like protein 5* (UBL5) i *homologous to ubiquitin* (Hub 1). Jego obecność obserwuje się w niemalże wszystkich badanych tkankach. Gen *beacon* charakteryzuje się wysoką konserwatywnością międzygatunkową. Jego ekspresja w podwzgorzu jest proporcjonalna do poziomu glukozy i insuliny oraz do procentowej zawartości tłuszczu i do masy ciała u zwierząt gatunku *Psammomys obesus*. Dokomorowa infuzja peptydu beacon powoduje zwiększenie ilości pobieranego pokarmu, wzrost masy ciała oraz zwiększenie ekspresji neuropeptydu Y (NPY) w podwzgorzu w sposób zależny od dawki. Jednoczesna infuzja BC i NPY powoduje zwiększenie ilości pobieranego pokarmu i wzrost masy ciała w większym stopniu niż podawanie tych peptydów osobno. Podanie beaconu tą drogą nie ma wpływu na wydatkowanie energii, aktywność fizyczną ani na metabolizm substratów energetycznych, zwiększa natomiast ilość pokarmu pobieranego przez zwierzęta. Przyrost masy ciała zwierząt, którym podawano BC, spowodowany jest powiększeniem masy tkanki tłuszczowej. W badaniach wpływu tego peptydu na rozwój postnatalny piaskówki wykazano, iż różnice w poziomie ekspresji tego genu oraz poziomu insuliny i glikemii są znaczne już w 4. tygodniu, zanim jeszcze ujawni się nadwaga. Różnice masy ciała są widoczne od 8. tygodnia od narodzin. Beacon ma ponadto zdolność specyficznego silnego wiązania z trzema białkami należącymi do podrodziny kinaz, nazywanej *cdc2/cdc28-like kinases* (CLKs). Beacon nie jest jednak substratem dla tych enzymów. Mechanizm działania i funkcja tego peptydu pozostają niewyjaśnione.

**Słowa kluczowe:** beacon, *Psammomys obesus*, regulacja bilansu energetycznego, otyłość, cukrzyca typu II.

**Summary:** Beacon is a small protein composed of 73 amino acids, product of a recently discovered gene expressed in the hypothalamus and many others tissues. Beacon is known also as ubiquitin-like protein 5 (UBL5) and homologous to ubiquitin 1 (Hub1). Expression of beacon mRNA in the hypothalamus is positively correlated with percentage of body fat in *Psammomys obesus* (unique polygenic animal model of obesity and type 2 diabetes). *P. obesus* have elevated expression of beacon gene in hypothalamus at an early age. Hypothalamic overexpression of beacon leads to development of obesity and insulin resistance in these animals. Intracerebroventricular administration of beacon to *Psammo-*

*mys obesus* results in a dose dependent increase in food intake, body weight and in neuropeptide Y gene expression in hypothalamus. Simultaneous treatment with beacon and NPY causes greater effect on increase of body weight than that observed after NPY only administration. Beacon-related increase in body weight is due to increased food intake, without effect on nutrient partitioning, physical activity or energy expenditure. Individuals of *Psammomys obesus* species with genetic predisposition for the development of obesity and type 2 diabetes have elevated hypothalamic gene expression, glucose and insulin level at 4. week after birth. The increase of body weight is observed from 8. week of postnatal development. Beacon interacts with three members of subfamily of kinases (CLKs) of *cdc2/cdc28*-like kinase family. This peptide binds to CLKs but it is not a substrate for phosphorylation. Mechanism of beacon action and its role remain unclear.

**Key words:** beacon, ubiquitin-like protein 5, homologous to ubiquitin 1, *Psammomys obesus*, energy balance, *cdc2/cdc28*-like kinases, obesity, type 2 diabetes.

## I. WSTĘP

Regulacja homeostazy energetycznej organizmu jest obecnie szeroko badanym zagadnieniem, a ze względu na złożoność jest ona wyjątkowo ciekawym przedmiotem badań. Są one tym bardziej istotne, iż w krajach rozwiniętych zaburzenia regulacji homeostazy energetycznej – powiązane zwykle z otyłością – stanowią poważny problem zdrowotny.

Biologicznie czynne peptydy, w tym neuropeptydy, ogrywiają znaczącą rolę w regulacji homeostazy energetycznej organizmu. Spośród nich najlepiej poznane są leptyna, neuropeptyd Y (NPY), oreksyna, kortykoliberyna (CRF), melanokortyna, neuromedyna U czy też grelina. Natomiast beacon to ostatnio zidentyfikowany peptyd, któremu przypisuje się znaczącą rolę w regulacji bilansu energetycznego. Został on odkryty w 2000 roku w podwzgórzu piaskówki (*Psammomys obesus*) przez Colliera i współpracowników [5]. Zwierzęta tego gatunku wykazują bardzo ciekawą cechę – w środowisku naturalnym (pustynnym), odżywiając się dietą roślinną (głównie kaktusy) i sporadycznie owadami, są szczupłe i mają prawidłowe poziomy glukozy i insuliny. Jednak po przeniesieniu do laboratorium i zastosowaniu standardowej diety laboratoryjnej (przeniesiono je z Izraela do Australii) u większości z nich rozwija się hyperglikemia i/lub insulinooporność oraz otyłość, natomiast pozostałe (ok. 30%) nie zmieniają swojego fenotypu. Stanowią dzięki temu idealny model do badań cukrzycy typu II i otyłości [1, 9, 10]. Po zbadaniu ekspresji poszczególnych genów w podwzgórzu tych zwierząt okazało się, że w grupie z hyperglikemią i insulinoopornością pewien gen wykazuje szczególne nasilenie ekspresji. Nadano mu nazwę „beacon”. Nazwa ta, chociaż kojarzy się bardzo z polskim bekonem, nie ma z nim nic wspólnego. Nazwa „beacon” wywodzi się od nazwy plaży, w której poblizu odkrywca genu namiętnie surfuje.



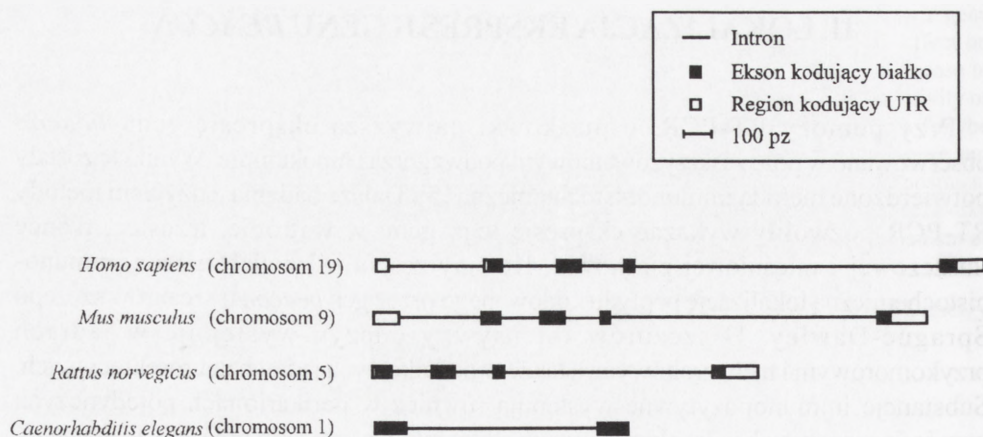
## II. LOKALIZACJA EKSPRESJI GENU *BEACON*

Przy pomocy RT-PCR, u piaskówki najwyższą ekspresję genu *beacon* obserwowano w polu zaskrzyżowaniowym podwzgórza i hipokampie. Wyniki te zostały potwierdzone metodą immunohistochemiczną [5]. Dalsze badania z użyciem metody RT-PCR pozwoliły wykazać ekspresję tego genu w wątrobie, trzustce, tkance tłuszczowej i mięśniowej piaskówki. Kolejny zespół [4] badał metodą immunohistochemiczną lokalizację peptydu kodowanego przez gen *beacon* u szczurów szczepu Sprague-Dawley. U szczurów intensywny odczyn występuje w jądrach przykomorowym i nadwzrokowym, a także w dodatkowych jądrach neurosekrecyjnych. Substancje immunopoztywne występują również w perikarionach pojedynczych komórek nerwowych jądra skrzyżowania, jądra łukowatego oraz pola zawzrokowego, pola przedwzrokowego przyśrodkowego i bocznego. Należy podkreślić, iż dodatni odczyn uzyskano nie tylko w ciałach komórek nerwowych, ale także we włóknach biegnących z bocznej części jądra przykomorowego przez pole zaskrzyżowaniowe boczne do wyniosłości pośrodkowej, we włóknach obecnych w wewnętrznej i zewnętrznej warstwie wyniosłości pośrodkowej i w szypule lejka (część tych włókien biegnie pionowo w stosunku do powierzchni wyniosłości, równoległe do pętli włóknisk krążenia wrotnego). Ponadto substancje immunoreaktywne występują we włóknach obecnych w polu przedwzrokowym przyśrodkowym i bocznym, polu podwzgórza przednim i bocznym, jądrze łukowatym, wokół trzeciej komory (w tym ostatnim przypadku rozproszone włókna o dodatnim odczynie). Lista tkanek, w których wykazano ekspresję genu *beacon*, stale się wydłuża i obejmuje tkanki fizjologiczne w różnych okresach rozwoju ontogenetycznego, komórki zmienione nowotworowo, a nawet hodowlane linie komórkowe [3].

## III. GEN *BEACON*

Gen *beacon* człowieka składa się z 5 eksonów, obejmuje 2194 par zasad i jest zlokalizowany na 19. chromosomie [5, 12]. Dowiedziono wysoką zgodność sekwencji odcinków kodujących u osobników z gatunków *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Psammomys obesus* i *Homo sapiens*, a także wysoką homologię tej sekwencji z tą charakterystyczną dla *Caenorhabditis elegans* (a więc nicienia) i *Arabidopsis thaliana* (rzodkiewnika, a więc rośliny). Geny *beacon* *Mus musculus* i *Rattus norvegicus* składają się z 5 eksonów, a tenże gen *Psammomys obesus* – z 4 eksonów. W genie piaskówki – w porównaniu z genami *Homo sapiens*, *Mus musculus* i *Rattus norvegicus* – brakuje pierwszego eksonu i intronu. Jednak brakujący ekson odpowiada odcinkowi niekodującemu genu. Pozostałe eksony u wszystkich czterech gatunków znajdują się w analogicznych pozycjach. Natomiast w przypadku *Caenorhabditis elegans* gen ten zawiera tylko jeden intron, którego pozycja nie odpowiada żadnemu





RYCINA 1. Układ eksonów kodujących gen białka beacon u gatunków: *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Caenorhabditis elegans*

z intronów występujących u wyżej wymienionych gatunków. Introny rozpoczynają się od sekwencji GT, a kończą AG.

Gen *beacon* został zsekwencjonowany u 35 niespokrewnionych osobników gatunku *Homo sapiens*: 10 otyłych i 15 szczupłych Nauruańczyków oraz 5 otyłych i 5 szczupłych Australijczyków rasy Kaukaskiej [5]. Nie wykryto mutacji, która byłaby w tych przypadkach związana z otyłością. W tych przypadkach elektroforeza produktu PCR genomowego DNA wykazała obecność dwóch prążków. Jeden z nich odpowiada długością produktowi uzyskanemu metodą PCR przy użyciu jako matrycy cDNA. Sekwencjonowanie drugiego wykazało, iż istnieje 9 mutacji punktowych w porównaniu z cDNA, m.in. substytucja C→T w pozycji 100 nukleotydu, czego konsekwencją jest przedwczesny kodon stop w pozycji odpowiadającej 34. aminokwasowi. Zsekwencjonowanie cDNA, pochodzącego od 43 osobników gatunku *Psammomys obesus* o zróżnicowanym fenotypie, wykazało natomiast obecność wariantu genu charakteryzującego się substytucją G→T w pozycji odpowiadającej 69. aminokwasowi, czego konsekwencją jest przedwczesny kodon stop. Produkt tego genu jest o 5 aminokwasów krótszy od produktu genu bez mutacji. Nie wykazano jednak związku między występowaniem tej mutacji a fenotypem zwierząt.

Sekwencja nukleotydów odpowiadająca białku beacon znana jest także pod dwoma innymi nazwami: białko 5 podobne do ubikwityny (*ubiquitin-like protein 5*) oraz Hub 1 (białko 1 homologiczne do ubikwityny – *homologous to ubiquitin*). Zarówno sekwencja nukleotydów, jak i lokalizacja na chromosomie opisywanych genów oraz sekwencja aminokwasów kodowanych białek jest identyczna. Jako UBL5 (*ubiquitin like*) gen ten został wyizolowany z tęczówki człowieka [6]. Ekspresję UBL5 wykazano we wszystkich badanych tkankach, przy czym najwyższy poziom jego mRNA zarejestrowano w mięśniu sercowym, mięśniach szkieletowych, nerce, wątrobie, tęczówce i limfoblastach. Transkrypt genu UBL5 ma rozmiar 0,6 kb. Znalezione

<i>Homo sapiens</i> 73 aa	atg atc gag gtt gtt tgc aac gac cgt ctg ggg aag aag gtc cgc gtt aaa tgc aac acg gat gat acc atc ggg gac ctt aag M I E V V C N D R L G K V R V K C N T D D T I G D L K	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>Homo sapiens</i> 33 aa	atg atc gag gtt gtt tgc aac gac cgt ctg ggg aag aag gtc cgc gtt aaa tgc aac acg gat gat acc atc ggg gac ctt aag M I E V V C N D R L G K V R V K C N T D D T I G D L K	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>Psammomyys obesus</i> 73 aa	atg att gag gtg gtt tgc aac gac cgt cta gga aag aaa gtc cgc gtt aag tgc aac acc gat gac acc atc ggg gac ttg aag M I E V V C N D R L G K V R V K C N T D D T I G D L K	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>Psammomyys obesus</i> 68 aa	atg att gag gtg gtt tgc aac gac cgt cta gga aag aaa gtc cgc gtt aag tgc aac acc gat gac acc atc ggg gac ttg aag M I E V V C N D R L G K V R V K C N T D D T I G D L K	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>Homo sapiens</i> 73 aa	aag ctg att gca gcc caa act ggt acc cgt tgg aac aag att gtc ctg aag aag tgg tac acg att ttt aag gac cac gtg tct K L I A A Q T G T R W N K I V L K K W Y T I F K D H V S	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>Homo sapiens</i> 33 aa	aag ctg att gca gcc <b>T</b> aaa act ggt acc cgt tgg aac aag att gtc ctg aag aag tgg tac acg att ttt aag gac cac gtg tct K L I A A *	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>Psammomyys obesus</i> 73 aa	aaa ctg ata gcg gcc caa act ggc act cgt tgg aat aag atc gtt ctt aaa aag tgg tac acg att ttt aag gac cat gta tct K L I A A Q T G T R W N K I V L K K W Y T I F K D H V S	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>Psammomyys obesus</i> 68 aa	aaa ctg ata gcg gcc caa act ggc act cgt tgg aat aag atc gtt ctt aaa aag tgg tac acg att ttt aag gac cat gta tct K L I A A Q T G T R W N K I V L K K W Y T I F K D H V S	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>Homo sapiens</i> 73 aa	ctg ggg gac tat gaa atc cac gat ggg atg aac ctg gag ctt tat caa tag ... ..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>Homo sapiens</i> 33 aa	ctg ggg gac tat gaa atc cac gat ggg atg aac ctg gag ctt tat caa tag ... ..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>Psammomyys obesus</i> 73 aa	ctg gga gat tat gaa atc cac gat ggg atg aac ctg gag ctt tat tac cag tag ... ..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>Psammomyys obesus</i> 68 aa	ctg gga gat tat gaa atc cac gat ggg atg aac ctg <b>T</b> ag ctt tat tac cag tag ... ..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

RYCINA 2. Sekwencja nukleotydów cDNA oraz odpowiadająca jej sekwencja aminokwasów prawidłowego oraz zmutowanego białka beacon. \* – kodon stop, czarne pole oznacza miejsce wystąpienia mutacji związanych z pojawieniem się wcześniejszego kodonu stop



także pseudogen UBL5 zlokalizowany na chromosomie 17. (17p11.2) oraz analogi tego genu u osobników gatunku *Caenorhabditis elegans* (80,8% homologii), *Saccharomyces cerevisiae* (64,4% homologii), *Schizosaccharomyces pombe* i *Arabidopsis thaliana*. Przy pomocy programu BIOINBGU służącego do przewidywania struktury produktów białkowych genów (dostępne na stronie internetowej) ustalono, iż homologia struktury trzeciorzędowej UBL5 i jej analogów ze strukturą ubikwityny wynosi 50,3–58,2%, dużo powyżej progu 12% uznanego jako punkt odcięcia. Jednak pomimo tak wysokiej homologii UBL5 zdaje się spełniać inną funkcję. Analiza danych dotyczących UBL5 i innych UBL przy użyciu programu PROTDIST przemawia za tym, iż UBL5 i jej analogi stanowią oddzielną rodzinę w nadrodzinie UBL.

#### IV. PEPTYD BEACON

Produkt białkowy genu beacon składa się z 73 aminokwasów. Sekwencja aminokwasów u osobników gatunków *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Psammomys obesus* i *Homo sapiens* jest identyczna. Wysoka homologia sekwencji aminokwasów między wyżej wymienionymi gatunkami a *Arabidopsis thaliana* (79,4%) i *Caenorhabditis elegans* (80,8%) wskazuje na to, iż jest to peptyd stary filogenetycznie.

Beacon, jako peptyd UBL5, opisywany jest jako białko o lokalizacji cytoplazmatycznej [6]. Nie ma on regionu przezbłonowego, nie jest także poprzedzony sygnałem na końcu  $\text{NH}_2$  [5]. Brak jest danych co do zdolności łączenia się cząsteczek beaconu w polimery. W doświadczeniu z użyciem metody dwuhybrydowej wykazano zdolność wiązania białka becon z trzema białkami należącymi do podrodziny kinaz, określanej jako kinazy podobne do *cdc2/cdc28* (*cdc2/cdc28-like kinases* – CLKs) [8]. Wiązanie to jest silne i specyficzne. Beacon nie jest jednak substratem dla tych enzymów. Sekwencja dla fosforylacji przez CLK jest natomiast obecna w PTP1B – białkowa fosfataza tyrozynowa-1B (*Protein-tyrosine phosphatase 1B*), która jest negatywnym regulatorem drogi sygnalizacji insuliny i leptyny. Udział dwóch ostatnich hormonów w regulacji bilansu energetycznego nie podlega dyskusji. Związek PTP1B z otyłością i cukrzycą jest obecnie przedmiotem szeroko zakrojonych badań. Myszy pozbawione genu PTP1B są szczupłe i wykazują wysoką wrażliwość na insulinę i leptynę.

Beacon, jako peptyd określanej nazwą Hub 1 zaliczany jest do modyfikatorów podobnych do ubikwityny – UBLs (*ubiquitin-like modifiers*), pomimo braku sekwencji dwóch reszt glicyny na C-końcu charakterystycznych dla peptydów tej grupy [7]. Chociaż droga aktywacji UBLs jest analogiczna do drogi aktywacji ubikwityny, to UBLs zdają się nie mieć zdolności do tworzenia polimerów. W przypadku Hub 1 nie jest poznana ani funkcja, ani mechanizm aktywacji. Zgodność sekwencji aminokwasów Hub1 i ubikwityny wynosi 22%. Ciekawy wydaje się fakt, iż beacon wykazuje większe podobieństwo do ubikwityny niż do któregośkolwiek znanego peptydu kontrolującego bilans energetyczny. Nie można jednak wykluczyć, iż podobieństwo to jest przypadkowe. Brak sekwencji dwóch reszt glicyny na C-końcu, typowych dla UBLs i samej ubikwityny



	10	20	30	40
<i>Homo sapiens</i>	MIEVVCNDRL	GKKVRVKCNT	DDTIGDLKKL	IAAQTGTRWN
<i>Psammomys obesus</i>	MIEVVCNDRL	GKKVRVKCNT	DDTIGDLKKL	IAAQTGTRWN
<i>Rattus norvegicus</i>	MIEVVCNDRL	GKKVRVKCNT	DDTIGDLKKL	IAAQTGTRWN
<i>Mus musculus</i>	MIEVVCNDRL	GKKVRVKCNT	DDTIGDLKKL	IAAQTGTRWN
<i>Caenorhabditis elegans</i>	MIE <b>ITV</b> NDRL	GKKVR <b>IKCN</b> P	<b>S</b> DTIGDLKKL	IAAQTGTRW <b>E</b>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	MIEV <b>L</b> NDRL	GKKVRVKCN <b>D</b>	DDTIGDLKKL	<b>V</b> AAQTGTR <b>A</b> E

	50	60	70	80
<i>Homo sapiens</i>	KIVLKKWYTI	FKDHVSLGDY	EIHDGMNLEL	YYQ.....
<i>Psammomys obesus</i>	KIVLKKWYTI	FKDHVSLGDY	EIHDGMNLEL	YYQ.....
<i>Rattus norvegicus</i>	KIVLKKWYTI	FKDHVSLGDY	EIHDGMNLEL	YYQ.....
<i>Mus musculus</i>	KIVLKKWYTI	FKDHVSLGDY	EIHDGMNLEL	YYQ.....
<i>Caenorhabditis elegans</i>	KIVLKKWYTI	<b>Y</b> KDH <b>ITL</b> MDY	EI <b>H</b> E <b>G</b> F <b>N</b> FEL	YYQ.....
<i>Arabidopsis thaliana</i>	KI <b>R</b> I <b>Q</b> KWY <b>N</b> I	<b>Y</b> KDH <b>ITL</b> K <b>D</b> OY	EIHDGM <b>G</b> LEL	YY <b>N</b> .....

RYCINA 3. Porównanie sekwencji aminokwasów białka beacon między różnymi gatunkami (dane Genbank, nr dostępu: NP\_077268.1, AAG34704.1, NW\_043878, NM\_025401, AAK21382, NP\_199045)

wyklucza, według niektórych autorów, przynależność beaconu do UBLs [8]. Fakt ten rodzi wątpliwości, czy UBL5 ma zdolność tworzenia wiązań kowalencyjnych z innymi proteinami. Analiza metodą Western blot nie wykazała obecności wiązań kowalencyjnych między UBL5 a białkami. Należy wziąć jednak pod uwagę fakt, iż metoda ta, skuteczna w wykrywaniu wiązań ubikwityny z innymi proteinami, może nie być wystarczająco czuła w przypadku beaconu. Istnieje także możliwość wiązania przez UBL5 innych protein za pomocą wiązań niekonwalencyjnych lub tworzenie wiązań kowalencyjnych z innymi proteinami przy udziale innego niż C-końcowy fragment białka.

## V. FUNKCJA BIAŁKA BEACON

Stopień ekspresji mRNA genu beacon w podwzgórzu jest proporcjonalny do poziomu glukozy i insuliny, a także do procentowej zawartości tłuszczu i do masy ciała u zwierząt gatunku *Psammomys obesus* [5]. Zespół Colliera wykazał ponadto, iż dokomorowa infuzja białka beacon za pomocą minipompy osmotycznej w ciągu tygodnia powoduje zwiększenie ilości pobieranego pokarmu, wzrost masy ciała oraz zwiększenie ekspresji NPY w podwzgórzu w sposób zależny od dawki. Co więcej, jednoczesna infuzja BC i NPY powoduje zwiększenie ilości pobieranego pokarmu i wzrost masy ciała w większym stopniu niż podawanie tych peptydów osobno.

Kolejnym krokiem w wyjaśnieniu mechanizmu działania tego peptydu było wykazanie przez ten sam zespół [11], iż podanie beaconu drogą dokomorową nie ma wpływu na wydatkowanie energii, aktywność fizyczną ani na metabolizm substratów

energetycznych, a jedynie zwiększa ilość pokarmu pobieranego przez zwierzęta. Wzrost masy ciała zwierząt, którym podawano BC, spowodowany jest wzrostem masy tkanki tłuszczowej. Infuzja tego peptydu nie ma natomiast wpływu na masę innych dużych narządów ani też mięśni. Interesujące jest, iż w tych warunkach stosunek pobierania pokarmu do przyrostu masy ciała jest stały i ma tę samą wartość u zwierząt poddanych infuzji BC i zwierząt z grupy kontrolnej.

Zbadano także różnice w poziomie ekspresji genu *beacon* w czasie postnatalnych etapów rozwoju ontogenetycznego zwierząt z gatunku *Psammomys obesus* [13]. Jako punkty kontrolne ustalono 4., 8. i 16. tydzień po urodzeniu. Okazało się, że różnice zarówno w poziomie ekspresji tego genu, jak i w poziomie insuliny i glikemii są znaczne już w 4. tygodniu życia, zanim jeszcze ujawni się nadwaga, którą obserwuje się od 8. tygodnia życia.

## VI. PODSUMOWANIE

Ekspresja genu *beacon* zachodzi w niemal wszystkich badanych tkankach. Szczególną zaś uwagę przyciąga silna jego ekspresja w strukturach mózgu odpowiedzialnych za regulację bilansu energetycznego. Wysoka konserwatywność genu u odległych ewolucyjnie gatunków sugeruje, iż jego białkowy produkt pełni ważną funkcję w procesach fizjologicznych. Dowiedziono występowanie związku między wyższym poziomem ekspresji tego genu a otyłością, hyperglikemią i insulinoopornością u osobników gatunku *Psammomys obesus*. Fakt, iż nie wykryto mutacji genu *beacon* u osobników gatunku *Homo sapiens* ani *Psammomys obesus*, która byłaby odpowiedzialna za zmiany fenotypu (otyłość), dowodzi, że indukowanych *beaconem* mechanizmów prowadzących do otyłości należy poszukiwać na innym poziomie, być może transdukcji sygnału. Ustalenie receptora białka *beacon* w znacznym stopniu ułatwiłoby wyjaśnienie funkcji tego peptydu. Być może mutacja receptora jest odpowiedzialna za wyżej opisywane zmiany fenotypu indukowane omawianym peptydem. Poznany jest wpływ dokomorowego podawania białka *beacon* na regulację bilansu energetycznego, jednak ta droga wprowadzania peptydu jest daleka od fizjologicznej. Dalszych badań wymaga związek białka *beacon* z NPY. Nie wiadomo także, od jakiego momentu w rozwoju ontogenetycznym osobników, u których wystąpią zmiany fenotypu (otyłość), podwyższony jest poziom tego białka. Wiadomo natomiast, że w okresie postnatalnym, już od 4. tygodnia zaznaczony jest nie tylko wzrost ekspresji genu *beacon*, ale także wzrost poziomu glukozy i insuliny, a od 8. tygodnia obserwuje się wzrost masy ciała. Odkrycie silnego i specyficznego wiązania białka *beacon* z enzymami z podrodziny kinaz CLKs w połączeniu z faktem, iż substratem dla tych enzymów jest PTP1B – negatywny regulator drogi sygnałowej insuliny i leptyny, daje podstawy do przypuszczeń, iż być może wpływ białka *beacon* na regulację bilansu

energetycznego ma związek z opisaną interakcją. Mechanizm działania tego peptydu pozostaje nadal niewyjaśniony.

## LITERATURA

- [1] BARNETT M, COLLIER GR, COLLIER FM, ZIMMET P, O'DEA K. A crosssectional and short-term longitudinal characterization of NIDDM in *Psammomys obesus*. *Diabetologia* 1994; **37**: 671–676.
- [2] BIOINBGU (<http://www.cs.bgu.il/~bioinbgu/>).
- [3] BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>).
- [4] BRAILOIU GC, DUN SL, YNAG J, CHANG JK, CASTELLINO S, DUN NJ. Beacon-like immunoreactivity in the hypothalamus of Sprague-Dawley rats. *Neurosci Lett* 2002; **317**: 166–168.
- [5] COLLIER GR, MCMILLAN JS, WINDMILL K, WALDER K, TENNE-BROWN J, DE SILVA A, TREVASKIS J, JONES S, MORTON GJ, LEE S, AUGERT G, CIVITARESE A, ZIMMET PZ. Beacon: a novel gene involved in the regulation of energy balance. *Diabetes* 2000; **49**: 1766–1771.
- [6] FRIEDMAN JS, KOOP BF, RAYMOND V, WALTER MA. Isolation of a ubiquitin-like (UBL5) gene from a screen identifying highly expressed and conserved iris genes. *Genomics* 2001; **71**: 252–255.
- [7] JENTSCH S, PYROWOLAKIS G. Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends in Cell Biology* 2000; **10**: 335–342.
- [8] KANTHAM L, KERR-BAYLES L, GODDE N, QUICK M, WEBB R, SOUNDERLAND T, BOND J, WALDER K, AUGERT G, COLLIER G. Beacon interacts with cdc2/cdc28-like kinases. *Biochem Biophys Res Com* 2003; **304**: 125–129.
- [9] SHAFRIR E, GUTMAN A. *Psammomys obesus* of the Jerusalem colony: a model for nutritionally induced, non-insulin-dependent diabetes. *J Basic Clin Phys Pharm* 1993; **4**: 83–99.
- [10] WALDER K, FAHEY RP, MORTON GJ, ZIMMET PZ, COLLIER GR. Characterization of obesity phenotypes in *Psammomys obesus* (Israeli Sand Rats). *Int J Exp Diab Res* 2000; **1**: 177–184.
- [11] WALDER K, MCMILLAN JS, LEE S, CIVITARESE A, ZIMMET P, COLLIER GR. Effects of beacon administration on energy expenditure and substrate utilisation in *Psammomys obesus* (Israeli sand rats). *Int J Obes* 2001; **25**: 1281–1285.
- [12] WALDER K, SEGAL D, JOWETT J, BLANGERO J, COLLIER GR. Obesity and diabetes gene discovery approaches; *Curr Pharm Des* 2003; **9**: 1357–1372.
- [13] WALDER K, ZIV E, KALMAN R, WHITECROSS K, SHAFRIR E, ZIMMET P, COLLIER GR. Elevated hypothalamic beacon gene expression in *Psammomys obesus* prone to develop obesity and type 2 diabetes. *Int J Obes* 2002; **26**: 605–609.

Redaktor prowadzący – M. Zabel

Otrzymano: 30.07.2003 r.

Przyjęto: 13.08.2003 r.

Ades autora: Katedra i Zakład Histologii i Embriologii,

Akademia Medyczna, im. K. Marcinkowskiego

ul. Świącickiego 6, 60-781 Poznań

a\_z\_@poczta.onet.pl





## WYKORZYSTANIE MAŁYCH INTERFERUJĄCYCH RNA DO HAMOWANIA EKSPRESJI GENÓW W KOMÓRKACH SSAKÓW

siRNA APPLICATION FOR SILENCING OF GENE EXPRESSION  
IN MAMMALIAN CELLS

Aleksandra WESOŁOWSKA

Pracownia Regulacji Transkrypcji, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN,  
Warszawa

*Streszczenie* Możliwość zablokowania ekspresji wybranych genów wzbudza ogromne nadzieje w terapii nieuleczalnych jak dotąd schorzeń, takich jak: choroby neurodegeneracyjne, autoimmunologiczne i nowotworowe. Częsteczką RNA ze względu na swoje właściwości biochemiczne stanowi obiecujące narzędzie terapeutyczne. Odkrycie zjawiska interferencji RNA (RNAi) zapoczątkowało nowe badania dotyczące hamowania ekspresji wybranych genów przez małe interferujące RNA (siRNA) w komórkach ssaków. Technika ta wykorzystuje naturalny proces wyciszania ekspresji genów zależny od dwuniciowego RNA. Rybonukleaza o aktywności RNazy III, w komórkach ludzkich zwana Dicer, degradowuje dwuniciowe, liniowe fragmenty RNA do siRNA. Następnie dochodzi do powstania rybonukleino-proteinowego kompleksu zwanego RISC. Kompleks RISC wykazuje aktywność helikazy, jak również endo- i egz nukleazy. Antysensowna nić siRNA zlokalizowana w obrębie RISC rozpoznaje komplementarne sekwencje w obrębie mRNA. Następnie dochodzi do endonukleolitycznej degradacji mRNA w regionie komplementarnym do antysensownej nici siRNA. Blokowanie ekspresji wybranych genów przez interferencję RNA można osiągnąć wprowadzając do komórek ssaków syntetyzowane chemicznie lub uzyskane metodą transkrypcji *in vitro* odcinki RNA o sekwencji odpowiadające siRNA. Możliwa jest również synteza siRNA *in vivo* na matrycy wektora pod kontrolą promotora U6 lub H1 RNA polimerazy III (Pol III). Zaprojektowane sekwencje mogą mieć charakter palindromów rozdzielonych pętlą. Sekwencje te tworzą struktury typu spinki (shRNA), które rozpoznawane są przez enzym Dicer i degradowane do siRNA. Wiele cech opisanego zjawiska RNAi, a zwłaszcza selektywność substratowa wzbudza duże nadzieje na wykorzystanie go nie tylko do badań podstawowych. Aby zjawisko RNAi znalazło zastosowanie w medycynie, muszą zostać wyjaśnione jego podstawy biochemiczne, których zrozumienie pozwoli dokonywać jednoznacznego wyboru sekwencji docelowych dla siRNA.

*Słowa kluczowe:* kosupresja, interferencja RNA (RNAi), posttranskrypcyjne wyciszanie ekspresji genów (PTGS), transkrypcyjne wyciszanie ekspresji genów (TGS), małe interferujące RNA (siRNA), kompleks RISC (RISC), RNA o strukturze spinki (shRNA)

**Summary:** The ability to inhibit specific gene expression represents a promising idea of therapeutic strategies to control diseases such as neurodegeneration, autoimmunology disease and cancer. The concept of using RNA molecules as therapeutic agents is based on its crucial biochemical features. In fact, phenomena of RNAi, at first discovered in plants may be successfully employed to inhibit by siRNA expression of indicated gene in mammalian cells. Inhibition of gene expression by small interfering RNA (siRNA) is based on process of silencing gene expression that naturally occurs and is called RNA interference (RNAi). Although molecular mechanism of RNAi needs clarification, short dsRNA termed small interfering RNA seems to be essential for this pathway of gene silencing. siRNA is generated by cleavage of dsRNA (exogenous or endogenous) by RNase III like nuclease named in human cells, Dicer. In the second step siRNA is incorporated into a protein complex called RNA Induced Silencing Complex (RISC). It seems to be ribonucleoprotein complex with several enzyme activities. In the end, target mRNA is recognized by siRNA and degraded. There are some approaches to achieve RNAi-based target gene silencing in mammalian cells. One of the most effective method is DNA vector-based strategy for delivering siRNA complementary to target mRNA. However, siRNA is double stranded molecule with 3' termini overhangs, hairpin RNA (shRNA) are recognized by Dicer, degraded to siRNA and after that working in a common way. This is the reason to design of 19–21 nt hairpin RNA encoding oligonucleotides complementary to target mRNA. After cloning into vectors the hairpin RNA complementary to target mRNA will be transcribed under the control of RNA Pol III promotor. Many features of described phenomena such as substrate selectivity, is challenging to employ it as a molecular medicine instrument. At present, the major obstacle to use siRNA tools for therapies is selection of siRNA sequence because biochemical mechanism of specific gene silencing still remains unclear. Moreover, the delivery problem should be solved to introduce enough amount of siRNA into target cells *in vivo*.

**Key words** Co-suppression, RNA interference (RNAi), Posttranscriptional Gene Silencing (PTGS), Transcriptional Gene Silencing (TGS), small interfering RNA (siRNA), RNA Induced Silencing Complex (RISC), hairpin RNA (shRNA)

## WSTĘP

Patogeneza wielu nieuleczalnych chorób, takich jak choroby nowotworowe, neurodegeneracyjne czy autoimmunologiczne, związana jest z zaburzeniami ekspresji szeregu genów. Zaawansowane narzędzia biotechnologii, na przykład mikromacierze DNA pozwalają zidentyfikować profil ekspresji genów w stanie patologicznym. Nowe schematy leczenia wymagają jednak nie tylko wiedzy o molekularnych podstawach wymienionych chorób, ale także narzędzia terapeutycznego pozwalającego przywrócić utraconą funkcję genu lub też zablokować jego ekspresję.

Od wielu lat trwają badania związane z hamowaniem ekspresji genów czynników chorobotwórczych, jak również obniżeniem nadmiernej ekspresji genów w stanach patologicznych. Dotychczasowe podejścia polegały na blokowaniu biosyntezy białka na matrycy niepożądanych transkryptów. Strategie te wykorzystywały naturalne właściwości biochemiczne RNA. Oddziaływanie danego mRNA (nić sensowna) z odpowiadającym mu komplementarnym RNA (nić antysensowna) lub wiązanie krótkiego DNA (oligodeoksyrybonukleotydu antysensownego) uniemożliwia syntezę określonych białek. Odkrycie przez Cecha i wsp. [24] cząsteczek RNA o aktywności katalitycznej, zwanych rybozymami dało początek badaniom nad blokowaniem ekspresji genów przez enzymatyczną degradację mRNA.



Chociaż trwają badania kliniczne z wykorzystaniem rybozymów obejmujące pacjentów zakażonych wirusem HIV i chorych na białaczkę, a antysensowne oligodeoksynuklotydy skierowane przeciwko mRNA kodującego kluczowe białka cyklu życiowego CMV zostały dopuszczone już na rynek farmaceutyczny, najnowsze wyniki badań podstawowych zaskakująco zmieniają podejścia terapeutyczne [37, 41]. I tak na przykład badania Fire i wsp. [11] wykazały, że efektywne wyciszenie genu u *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) można uzyskać wprowadzając zarówno antysensowne, jak i sensowne RNA do danego mRNA, a także ich mieszaninę. Wyniki badań Jorgensena [34] wykonane na roślinach jeszcze w 1990 roku, polegające na wprowadzeniu dodatkowej kopii genu zwanej transgenem, także nasuwały przypuszczenie, że dwuniciowy odcinek RNA (dsRNA) o zdefiniowanej sekwencji może zablokować ekspresję danego genu. W efekcie wprowadzenia dodatkowej kopii genu odpowiedzialnego za barwę kwiatów petunii, otrzymano kwiaty bezbarwne zamiast kwiatów o intensywniejszym kolorze. Zaobserwowane zahamowanie ekspresji endogennej kopii genu przez wprowadzony transgen nazwano kosupresją [34]. Zjawiska podobne do kosupresji u roślin, odkryto także u żaby *Xenopus laevis* [49], muszki *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) [16], nicienia *C. elegans* [11], a także u ssaków [10]. Ich mechanizm przypomina odpowiedź antywirusową roślin, w ramach której również następuje degradacja RNA powstającego na matrycy RNA wirusowego [12]. Wkrótce okazało się, że mimo znacznych różnic międzygatunkowych zjawiska te mogą mieć takie samo podłoże molekularne [10, 12, 14, 15]. We wszystkich przypadkach dochodzi do syntezy dsRNA, który pełni kluczową rolę w procesie interferencji RNA [11].

Wyciszenie ekspresji genu nie wymaga integracji transgeny wprowadzonego do genomu. Może być spowodowane przez pojedynczą kopię genu lub obecność transpozonów w obrębie genomu, które stają się matrycą do syntezy dsRNA odpowiadających genowi, którego ekspresja zostanie zablokowana. U *C. elegans* zjawisko blokowania ekspresji genów można wywołać podając dwuniciowy RNA wraz z pożywieniem lub przez iniekcję bezpośrednio do gonad. Zablokowanie ekspresji genu w pojedynczej komórce roślinnej lub zwierzęcej (*C. elegans*) prowadzi do zmiany fenotypu innych komórek w obrębie tego samego organizmu, która jest dziedziczona przez jej potomstwo [11, 15].

## MOLEKULARNE POSTAWY PROCESU WYCISZANIA EKSPRESJI GENÓW W DRODZE INTERFERENCJI RNA W KOMÓRKACH SSAKÓW

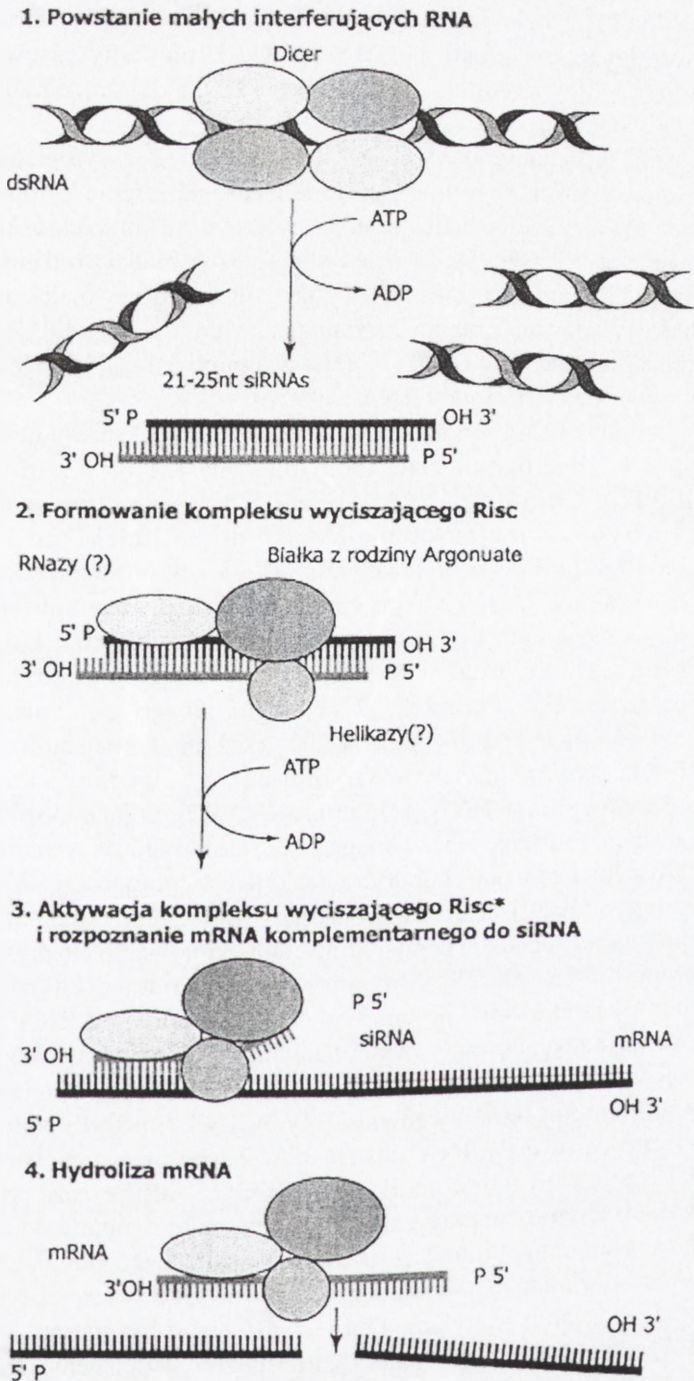
Zarówno biochemiczne, jak i genetyczne badania potwierdziły istnienie wspólnych elementów enzymatycznych interferencji RNA u wszystkich organizmów eukariotycznych. W szczególności jednak proces wyciszenia ekspresji genów u roślin i zwierząt przebiega inaczej. U roślin mamy do czynienia zarówno z hamowaniem ekspresji genów

zależnym od RNA na etapie transkrypcji (TGS, ang. *Transcriptional Gene Silencing*), jak również z posttranskrypcyjnym wyciszeniem ekspresji genów (PTGS, ang. *Post-Transcriptional Gene Silencing*). W istocie jednak obecność dwuniciowych, 25-nukleotydowych RNA o sekwencji odpowiadającej danemu mRNA roślinnemu, wykazana po raz pierwszy przez Hamiltona i Baulcomba, uruchamia szereg procesów prowadzących do zmiany ekspresji genu na obu poziomach. W przypadku zwierząt, gdzie proces hamowania ekspresji genów zależny od dsRNA jest mniej poznany, mówimy ogólnie o zjawisku RNAi (ang. *RNA interference*), czyli interferencji zależnej od RNA. Podobnie jak u roślin kluczowym elementem tego procesu są oligonukleotydy, określane jako małe interferujące RNA (siRNA ang. *small interfering RNA*), nieznacznie różniące się długością w zależności od gatunku [46].

Badanie prostych, modelowych organizmów zwierzęcych, takich jak nicien czy muszka owocowa, pozwoliły określić molekularne podstawy procesu interferencji RNA. Wyniki badań porównawczych, takich jak analiza homologii genów i badanie funkcji kodowanych przez nie białek, prowadzą do wyjaśnienia podstaw molekularnych procesu wyciszania ekspresji genów zachodzącego również w komórkach ssaków. W dalszej części artykułu zostanie przedstawiony przebieg procesu interferencji RNA zachodzący w komórkach organizmów modelowych z odniesieniami do komórek ludzkich, gdzie proces ten jest niewątpliwie mniej poznany.

Obecność ufosforylowanych na 5' końcu małych, dwuniciowych RNA w ekstraktach komórkowych *D. melanogaster*, w których doszło do inhibicji ekspresji genów zależnej od RNA, sugerowała udział w tym procesie enzymu o aktywności rybonukleazy z rodziny RNazy III [1]. Homologi genu RNazy III znaleziono u *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) i nazwano go czynnikiem Cappel (*CAF – carpel factory, DCL-1 dicer-like 1*), a także u *C. elegans* i *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), gdzie został opisany jako *dcr-1*. Enzym biorący udział w procesie RNAi, u muszki owocowej, myszy i ludzi zwany Dicer, stanowi odrębną klasę nukleaz charakteryzującą się określoną budową. Ma dwie domeny o aktywności RNazy III i dodatkowe domeny funkcjonalne: wiążącą dsRNA, helikazową i domenę PAZ odpowiedzialną za interakcję z innymi białkami. Jego kluczowa rola w procesie RNAi polega na degradacji dwuniciowych, liniowych fragmentów RNA do siRNA [46]. U ssaków reakcja ta nie wymaga obecności ATP, choć jego hydroliza warunkuje uwolnienie siRNA z miejsca katalicznego enzymu i umożliwia kolejną reakcję [48]. W przypadku ssaków enzym ten bierze również udział w dojrzewaniu RNA o strukturze typu spinki (shRNA, ang. *short hairpin RNA*) tnąc ich prekursorzy [8, 18, 25]. Mimo zachowanej w ewolucji domenowej budowy enzymu Dicer, różnice pomiędzy poszczególnymi podjednostkami prowadzą do specyficznej gatunkowo długości produktów degradacji dsRNA wahającej się od 21 do 25 par zasad [10, 11, 15]. Dalsze badania nad mechanizmem molekularnym procesu interferencji RNA wykazały kolokalizację małych interferujących RNA z kompleksem białek o złożonej aktywności enzymatycznej zwanym RISC (ang. *RNA Induced Silencing Complex*). Kompleks RISC wykazuje aktywność zarówno helikazy, jak i endo- oraz egz nukleazy. Aktywacja enzymu wymaga dysocjacji dwuniciowych siRNA w procesie zależnym od ATP. Jednoniciowy,





RYCINA 1. Poznane etapy wyciszania ekspresji genów w drodze interferencji RNA



antysensowny siRNA zlokalizowany w obrębie RISC rozpoznaje komplementarne sekwencje mRNA [31]. Dochodzi następnie do endonukleolitycznej hydrolizy mRNA w miejscu, które wyznacza ufosforylowany koniec 5' nici antysensownej siRNA. Cięcie następuje w połowie dupleksów mRNA/siRNA, a dalsza degradacja ma już charakter egz nukleolityczny [5, 6, 15, 30].

Udane próby oczyszczania aktywnego kompleksu RISC z cytoplazmatycznych ekstraktów komórek HeLa sugerują jego lokalizację na terenie cytoplazmy [31]. Zidentyfikowano również szereg białek wchodzących w skład kompleksu, którego masę *in vivo* oszacowano na kilkaset kDa. Ważne wydają się być białka z rodziny Argonuate (eIF2C1 oraz eIF2C2), białka wiążące dsRNA, jak również szereg białek o aktywności helikaz i nukleaz. Wiadomo że białka Argonuate zawierają domenę PAZ/Piwi, która bierze udział w wiązaniu RNazy Dicer [17]. Nie wiadomo jednak, jakie jest znaczenie tej interakcji w procesie interferencji RNA.

Jak już wspomniano, w komórkach ludzkich hamowanie ekspresji genów zależne od RNAi wydaje się być ograniczone do cytoplazmy [31, 47]. Zarówno enzym Dicer, jak ludzkie homologi białek z rodziny Argonuate są białkami cytoplazmatycznymi, chociaż elementy składowe ludzkiego kompleksu enzymatycznego RISC, takie jak białka Gemin3 i Gemin4, występują dodatkowo w jądrze komórkowym [33]. Nasuwa to przypuszczenie, że proces interferencji RNA może wpływać także na etap translacji. Jak się okazuje, białko eIF2C (białko z rodziny Argonuate) wchodzi również w skład złożonego kompleksu rybonukleinoproteinowego (kompleks RNP) regulującego metabolizm RNA w komórce [24]. W kompleksie tym odnajdywane są też małe przejściowe cząsteczki RNA (ang. *stRNA*, *small temporary RNA*), opisane u *C. elegans* jako *lin-4* i *let-7* należące do odrębnej klasy RNA, tzw. microRNA, regulujące ekspresję genów na poziomie translacji. Proces ten nie wymaga pełnej homologii sekwencji microRNA z mRNA docelowym i nie ma charakteru reakcji enzymatycznej. Wiadomo, że microRNA wraz z białkami Argonuate zaangażowane są w regulację procesów rozwoju i różnicowania, ale także w pośrednie etapy hamowania ekspresji genów w drodze interferencji RNA [18, 25]. Mutanty w genach kodujących *lin-4* i *let-7* są niezdolne do hamowania ekspresji genów w drodze zależnej od RNA i wykazują wady rozwojowe. Biorąc pod uwagę wspomniany już udział enzymu Dicer w obróbce substratu microRNA o strukturze spinki, można przypuszczać, że istnieje w komórce kompleks rybonukleinoproteinowy zawierający miRNA (miRNP) odpowiadający RISC zaangażowany zarówno w RNAi, jak i hamowanie ekspresji genów na poziomie translacji. Lokalizacja wewnątrzkomórkowa miRNP nie jest jeszcze poznana [18, 25]. Jak się wydaje, również w przypadku komórek ssaków, mamy do czynienia z przenikaniem się elementów transkrypcyjnego i posttranskrypcyjnego poziomu opisywanego procesu. Zmiany spowodowane przez siRNA dotyczą nie tylko danego mRNA, ale także poziomu metylacji DNA i struktury chromatyny w rejonach normalnie nieulegających ekspresji, takich jak transpozony i transgeny. Bezpośrednia metylacja genomowego DNA, zależna od sekwencji dsRNA wymaga tworzenia kompleksów RNA-DNA o określonej strukturze drugorzędowej, które oddziałują z

metylotransferazą DNA. Metylacja DNA odpowiadającego danemu dsRNA może być istotą nie tylko mechanizmu hamowania ekspresji elementów regulatorowych genów, ale także takich kluczowych zjawisk jak imprinting genomowy czy inaktywacja chromosomu X u ssaków [42].

## siRNA JAKO NARZĘDZIE DO BLOKOWANIA EKSPRESJI GENÓW W KOMÓRKACH SSAKÓW

Zjawisko RNAi odgrywa rolę w kluczowych dla komórki procesach, takich jak regulacja ekspresji genów oraz stabilizacja genomu przez wyciszanie transpozonów i uniemożliwianie ich rekombinacji. Jak się okazało, mutacje składników kompleksów enzymatycznych RNAi korelują z zaburzeniami embriogenezy i organogenezy organizmów roślinnych i zwierzęcych oraz rekombinacją zależną od transpozonów. Na przykład mutacja w genach kodujących białka z rodziny Argonate, takich jak: Piwi, dAgo1 czy Ago2, objawia się u *Drosophila* zaburzeniami funkcji gonad i rozwoju układu nerwowego. Mutacje w genach kodujących helikazy, niezbędne do rozdysocjowania podwójnej nici siRNA, prowadzą do wzmożonej rekombinacji, gdyż uniemożliwiają wyciszenie ekspresji transpozonów w drodze RNAi [42, 43]. Niezależnie od jego biologicznej funkcji, zjawisko interferencji RNA może być wykorzystane do zmiany ekspresji genów zarówno u roślin, jak i u zwierząt. Największe nadzieje wzbudza możliwość efektywnego hamowania ekspresji genów ludzkich. Teoretycznie można by to osiągnąć podając z zewnątrz dsRNA o sekwencji komplementarnej do mRNA będącego substratem kompleksu RISC [14]. Okazało się jednak, że u ssaków dsRNA dłuższy niż 30 nukleotydów wywołuje niespecyficzną degradację mRNA w ramach odpowiedzi antywirusowej zależnej od interferonu. Problem ten można rozwiązać wprowadzając do komórki syntetyzowane chemicznie lub uzyskane w reakcji transkrypcji *in vitro* krótkie RNA, odpowiadające siRNA [9, 10, 45]. Możliwa jest również synteza siRNA na matrycy wektora pod kontrolą promotora U6 lub H1 RNA polimerazy III (Pol III) [39, 42]. Tworzenie takiego konstruktów może opierać się na technice PCR lub tradycyjnym klonowaniu [4, 13]. Polimeraza III naturalnie występująca w komórce syntetyzuje małe, niekodujące RNA, niemodyfikowane na 3' i 5' końcu. Początek transkrypcji jest ściśle zdefiniowany, a koniec transkrypcji wyznacza ciąg tymidyn. Dzięki temu możliwe jest klonowanie sekwencji DNA kodującej RNA, której ekspresja prowadzi do syntezy odpowiedników siRNA powstających *in vivo*. Nić sensowna i antysensowna krótkich RNA może być klonowana w oddzielnych wektorach lub jako sekwencje tandemowe w tym samym wektorze [39, 40]. Zaprojektowane oligonukleotydy mogą mieć również charakter palindromów rozdzielonych pętlą. Sekwencje te tworzą struktury typu spinki (shRNA), które rozpoznawane są przez enzym Dicer i degradowane do siRNA [27, 34].

Klonowanie siRNA na matrycy o charakterze palindromu jest bardziej efektywne niż synteza każdej nici siRNA z dwóch odrębnych promotorów, ponieważ wymaga



ona dodatkowo hybrydyzacji pojedynczych nici *in vivo*. Wektory do klonowania siRNA oferowane przez firmy biotechnologiczne zawierają szereg modyfikacji, takich jak markery selekcyjne i regulowane promotory. Daje to możliwość stabilnej transfekcji danej linii komórkowej, jak również badanie efektu wyciszenia w układzie indukowalnym [28]. Blokowanie ekspresji określonych genów wymaga wyboru sekwencji docelowej dla małych interferujących RNA w obrębie mRNA, które ma ulec degradacji. Podstawowym warunkiem jest brak homologii wybranej sekwencji z sekwencją kodującą inne białka niż docelowe. Wciąż jeszcze niewiele wiadomo na temat szczegółów kluczowego etapu RNAi, dlatego projektowanie sekwencji siRNA ma charakter empiryczny. Na podstawie znajomości sekwencji funkcjonalnych siRNA próbuje się skorelować efektywność wyciszenia ekspresji danego genu z parametrami biochemicznymi i termodynamicznymi sekwencji mRNA komplementarnych do siRNA. Istotne dla tzw. „dostępności” danego rejonu mRNA dla siRNA wydaje się tworzenie lokalnych struktur II-rzędowych w obrębie wyciskanego mRNA, a także udział białek wiążących mRNA [22]. Mimo trwających analiz teoretycznych do wyboru optymalnych siRNA wciąż stosuje się testy przesiewowe polegające np. na klonowaniu małych interferencyjnych RNA metodą PCR. Reakcja ta przebiega dwuetapowo z wykorzystaniem czterech stosunkowo krótkich starterów, co ogranicza liczbę powstających mutacji. Powstały produkt nadaje się bezpośrednio do transfekcji, a sklonowanie wybranej sekwencji siRNA umożliwia wprowadzone uprzednio miejsce restrykcyjne [13, 34]. Dzięki sklonowaniu ludzkiego rekombinowanego białka Dicer możliwe jest także uzyskiwanie siRNA *in vitro* po dostarczeniu badanym komórkom oligorybonukleotydu komplementarnego do mRNA, które ma ulec degradacji. Przy takim podejściu nie ma konieczności wyboru ściśle określonej sekwencji docelowej dla siRNA. Nie daje ona jednak możliwości weryfikacji sekwencji powstających siRNA [21].

## MAŁE INTERFERENCYJNE RNA JAKO CZYNNIKI TERAPEUTYCZNE

Używając wektorów kodujących sekwencje siRNA lub shRNA zahamowano ekspresję genów kodujących zarówno białka strukturalne, takie jak: laminina A/C, beta-tubulina, białka wiążące aktywne, jak i regulatorowe cdk2, koreceptory CD4 i CD8, jak również na przykład białka wirusa HIV i HBV, niezbędne do ich replikacji [19, 20, 26, 36, 44]. Dostarczane przez firmy biotechnologiczne wektory umożliwiają indukcję genów kodujących zaprojektowaną sekwencję siRNA w ściśle określonych warunkach laboratoryjnych, jak i badanie efektu fenotypowego hamowania ekspresji danego genu w liniach komórkowych stabilnie transfekowanych [3, 28]. Dostępne systemy wprowadzania siRNA do komórek (transfekcja, elektroporacja, wektory pochodzenia wirusowego) umożliwiają badanie efektu hamowania ekspresji genów w komórkach o różnym pochodzeniu zarówno ustalonych liniach komórkowych fibroblastów i limfocytów T, jak również liniach pochodzących z komórek nowo-



TABELA 1 Sposoby syntezy małych interferencyjnych RNA. (na podstawie www.ambion.com)

	Synteza chemiczna	Transkrypcja <i>in vitro</i>	Cięcie dsRNA przez RNAazę III	Synteza siRNA pod kontrolą promotora polimerazy RNA	
				sklonowanych sekwencji siRNA	na podstawie kasety PCR kodującej siRNA
Wymagane	(2) 21 nt oligonukleotydy RNA	(2) 29 nt oligonukleotydy DNA	200-800 nt matryca DNA	(2) 55-60 nt oligonukleotydy DNA	(2) 50 nt oligonukleotydy DNA
Wybór sekwencji docelowej dla siRNA	konieczny	konieczny	niekonieczny	konieczny	konieczny
Czas syntezy	4 dni - 2 tygodnie	24 godz.	1 dzień + synteza oligonukleotydów	5 dni + synteza oligonukleotydów	6 godz + synteza oligonukleotydów
Możliwość znakowania i modyfikacji powstałych siRNA	tak	tak	tak	nie	nie
Wydajność transfekcji	dobra	dobra	dobra	wystarczająca	wystarczająca
Możliwość selekcji transfekowanych komórek	nie	nie	nie	tak	nie
Charakter badanego efektu	przejściowy	przejściowy	przejściowy	trwały (przy zastosowaniu selekcji)	przejściowy
Możliwość zmiany skali syntezy	istnieje	ograniczona	ograniczona	istnieje	ograniczona
Relatywne koszty	wysokie	średnie	niskie	średnie	średnie

tworowych oraz w pierwotnych neuronach [23, 36]. Wiele cech opisanego zjawiska RNAi, takich jak udział w szlakach biochemicznych naturalnie występujących w komórce czy też specyficzność substratowa, wzbudza duże nadzieje na wykorzystanie go nie tylko do badań podstawowych. Jednocześnie jednak właściwości te wyznaczają ograniczenia stosowania tej metody w terapii chorób. Badania specyficzności

substratowej małych interferujących RNA wykazały, że różnica pojedynczego nukleotydu w zaprojektowanej sekwencji skierowanej przeciw danemu mRNA może znosić zjawisko blokowania ekspresji danego genu oraz wpływać na poziom jego wyciszenia [28, 29, 35, 44]. Stwarza to nadzieje na użycie tej metody do leczenia chorób związanych z mutacją jednego allelu danego genu [29, 31]. Z drugiej strony utrudnia to wybór sekwencji siRNA skierowanych na transkrypty kodowane przez rejony DNA ulegające częstym mutacjom. Dla przykładu w terapii chorób wirusowych uzasadnione wydaje się stosowanie mieszaniny różnych siRNA. Jednocześnie wykazano, że selektywność procesu zależy od ilości użytego siRNA. Nadmiar małych interferencyjnych cząsteczek RNA powoduje indukcję szeregu genów związanych z odpowiedzią komórki na stres [7, 38]. Ostatnie badania za pomocą mikromacierzy DNA wykazały, że zahamowanie ekspresji danego genu w komórce przy użyciu zoptymalizowanej siRNA nie zmienia profilu ekspresji pozostałych genów [7, 13, 38]. Biorąc jednak pod uwagę naturalną rolę tego procesu w stabilizacji genomu i regulacji ekspresji genów trudno przewidzieć, jakie mogą być jego konsekwencje dla funkcjonowania poddawanych mu komórek. Ostatnie doniesienia poddają w wątpliwość wyniki wcześniejszych badań dotyczących niespecyficznego odpowiedzi komórki na małe interferujące RNA powstające na matrycy plazmidów [2]. Być może brak reakcji zależnej od interferonu po wprowadzeniu do komórek plazmidów kodujących siRNA wynikał z defektu tej drogi w liniach komórkowych poddawanych eksperymentom.

Przed wszystkim jednak, aby opisywane zjawisko znalazło zastosowanie w medycynie musi zostać do końca wyjaśniony mechanizm biochemiczny degradacji RNA zależnej od RNAi, którego zrozumienie pozwoli dokonywać jednoznacznego wyboru sekwencji docelowych dla siRNA. Kolejnym problemem, który wymaga rozwiązania, jest niedoskonałość dotychczas opracowanych metod dostarczenia siRNA do komórek w układzie *in vivo*.

## LITERATURA

- [1] BERNSTEIN E, CAUDY AA, HAMMOND SM, HANNON GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001; **409**: 363–366.
- [2] BRIDGE AJ, PEBERNARD S, DUCRAUX A, NICOU LAZ A-L, IGGO R. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Science* 2003; dostępny w sieci [www: doi:10.1038/ng1173](http://www.doi.org/10.1038/ng1173).
- [3] BRUMMELKAMP TJ, BERNARDS R, AGAMI R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002; **296**: 550–553.
- [4] CASTANOTTO D, Li H, ROSSI JJ. Functional siRNA expression from transfected PCR products. *RNA* 2002; **8** (11):1454–1460.
- [5] CERUTTI H. RNA interference: traveling in the cell and gaining functions. *Trends Genet* 2003; **19**: 39–45.
- [6] DENLI AM, HANNON GJ. RNAi : an ever-growing puzzle. *Trends Biochem Sci* 2003; **28**:196–201.
- [7] DILLIN A. The specifics of small interfering RNA specificity. *Proc Natl Acad Sci* 2003; **100**: 6289–6291.
- [8] DOENCH JG, PETERSEN CHP, SHARP PA. siRNA can function as miRNAs. *Genes Dev* 2003; **17**: 438–442.
- [9] DONZÉ O, PICARD D. RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 2002; **30**: (e46).



- [10] ELBASHIR SM, HARBORTH J, LENDECKEL W, YALCIN A, WEBER K, TUSCHL T. Duplex of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; **411**: 494–498.
- [11] FIRE A, XU S, MONTGOMERY MK, KOSTAS SA, DRIVER SE, MELLO CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; **391**: 806–811.
- [12] GITLIN L, KARELSKY S, ANDINO R. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature* 2002; **418**: 430–434.
- [13] GOU D, JIN N, LIU L. Gene silencing in mammalian cells by PCR-based short hairpin RNA. *FEBS Lett* 2003; **548**: 113–118.
- [14] GUO S, KEMPHUES KJ. par-1, a gene required establishing polarity in *C. elegans* embryos encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 1995; **81**: 611–620.
- [15] HAMILTON AJ, BULCOMBE DCA. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 1999; **286**: 950–952.
- [16] HAMMOND SM, BERNSTEIN E, BEACH D, HANNON GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000; **404**: 293–296.
- [17] HAMMOND SM, BOETTCHER S, CAUDY AA, KOAYASHI R, HANNON GJ. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 2001; **293**: 1147–1150.
- [18] HUTVAGNER G, ZAMORE PD. A microRNA is a multiple turnover RNAi enzyme complex. *Science* 2002; **297**: 2056–2060.
- [19] JEAN-MARC J, TRIQUES K, STEVENSON M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 2002; **418**: 435–438.
- [20] KAPADIA SB, BRIDEAU- ANDERSEN A, CHISARI FV. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci* 2003; **100**: 2014–2018.
- [21] KAWASAKI H, SUYAMA E, IYO M, TAIRA K. siRNAs generated by recombinant human Dicer induce specific and significant but target site-independent gene silencing in human cells. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**: 981–987.
- [22] KRETSCHMER-KAZEMI FAR R, SCZAKIEL G. The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**: 4417–4424.
- [23] KRICHEVSKY AM, KOSIK KS. RNAi functions in cultured mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci* 2002; **99**: 11926–11929.
- [24] KRUGER K, GRABOWSKI PJ, ZAUNG AJ, SAND J, GOTTSCHLING DE, CECH TR. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* 1987; **31**: 596–600.
- [25] LEE Y, JEON K, LEE JT, KIM S, KIM VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 2002; **21**: 4663–4670.
- [26] LIU X, ERIKSON RL. Activation of Cdc2/cyclin B and inhibition of centrosome amplification in cells depleted of Plk1 by siRNA. *Proc Natl Acad Sci* 2002; **99**: 8672–8676.
- [27] MCMANUS MT, PETERSEN CP, HAINES BB, CHEN J, SHARP PA. Gene silencing using micro-RNA designed hairpins. *RNA* 2002; **8**: 842–850.
- [28] MATSUKURA S, JONES PA, TAKAI D. Establishment of conditional vectors for hairpin siRNA knock-downs. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**: e77.
- [29] MATRINEZ LA, NAGUIBNEVA I, LEHRMAN H, VERVISH A, TCHÉNIO T, LOZANO G, HARELBELLAN A. Synthetic small inhibiting RNAs: efficient tools to inactivate oncogenic mutations and restore p53 pathways. *Proc Natl Acad Sci* 2002; **99**: 14849–14854.
- [30] MATZAKE M, MATZAKE A, KOOTER JM. RNAi: guiding gene silencing. *Science* 2002; **293**: 1080–1083.
- [31] MARTINEZ J, PATKANIOWSKA A, URLAUB H, LUHRMANN R, TUSCHL T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 2002; **110**: 563–574.
- [32] MILLER VM, MARRS GL, GOUVION CM, LEE G, DAVIDSON BL, PAULSON HL. Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proc Natl Acad Sci* 2003; **100**: 7195–7200.
- [33] MOURELATOS Z, DOSTIE J, PAUSHKIN S, SHARMA A, CHARROUX B, ABEL L, RAPPILBER J, MANN M, DREYFUSS G. MiRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev* 2002; **16**: 720–728.
- [34] NAPOLI C, LEMIEUX C, JORGENSEN R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 1990; **2**: 279–289.

- [35] PADDISON PJ, CAUDY AA, BERNSTEIN E, HANNON GJ, CONKLIN DS. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 2002; **16**: 948–958.
- [36] QIN X-F, AN DS, CHEN ISY, BALTIMORE D. Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small RNA against CCR5. *Proc Natl Acad Sci* 2003; **100**: 183–188.
- [37] ROLA M, KUŹMAK J. Zastosowanie rybozymów „hammerhead” jako czynników przeciwwirusowych. *Post Biochem* 2001; **4**: 282–291.
- [38] SEMIZAROV D, FROST L, SARTH Y A, KROGER P, HALBERT DN, FESIK SW. Specificity of short interfering RNA determined by through gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci* 2003; **100**: 6347–6352.
- [39] SHI Y. Mammalian RNA for masses. *Trends Genet* 2003; **19**: 9–12.
- [40] SUI G, SOOHOO CH, AFFAR EF, GAY F, SHI Y, FORRESTER WC, SHI Y. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci* 2002; **99**: 5515–5520.
- [41] SULLENGER BA, GILBOA E. Emerging clinical applications of RNA. *Nature* 2002; **418**: 252–257.
- [42] SZWEYKOWSKA-KULIŃSKA Z, JARMOŁOWSKI A, FIGLEROWICZ M. RNA interference and its role in regulation of eucaryotic gene expression. *Acta Bioch Pol* 2003; **50**: 217–229.
- [43] VOLPE TA, KIDNER C, HALL IM, TENG G, GREWAL SI, MARTIENSSEN RA. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 2002; **297**: 1833–1837.
- [44] WILSON JA, JAYASENA S, KHVOROVA A, SABATIONS S, RODRIGUE-GERVAIS IG, ARYA S, SARANGI F, HARRIS-BRANDTS M, BEAULIEU S, RICHARDSON CHD. RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proc Natl Acad Sci* 2003; **100**: 2783–2788.
- [45] YU J-H, DERUITER L, TURNER DL. RNA interference by expression of short interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci* 2003; **99**: 6047–6052.
- [46] ZAMORE PD. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 2000; **101**: 25–33.
- [47] ZENG Y, BRYAN RC. RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *RNA* 2002; **8**: 855–860.
- [48] ZHANG H, KOLB FA, BRONDANI V, BILLY E, FILIPOWICZ W. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J* 2002; **21**: 5875–5885.
- [49] ZHOU Y, CHING Y-P, KOK KH, KUNG H, JIN D-J. Post-transcriptional suppression of gene expression in *Xenopus* embryos by small interfering RNA. *Nucleic Acids Res* 2002; **30**: 1664–1669.

Redaktor prowadzący – B. Kamińska-Kaczmarek

Otrzymano: 04.07.2003 r.

Przyjęto: 22.09.2003 r.

Instytut Biologii Doświadczalnej PAN

Pracownia Regulacji Transkrypcji

ul. Pasteura 3, Warszawa

e-mail: [owesola@wp.pl](mailto:owesola@wp.pl)



# WIRUSOWE STRATEGIE W TERAPII GENOWEJ ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM WEKTORÓW KONSTRUOWANYCH Z WIRUSÓW ZWIĄZANYCH Z ADENOWIRUSAMI (AAV)

VIRAL DELIVERY SYSTEMS IN GENE THERAPY  
AND ADENO-ASSOCIATED VIRAL (AAV) VECTORS

Maciej MAŁECKI\*

Zakład Biologii Komórki, Centrum Onkologii-Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie,  
Warszawa

**Streszczenie:** Terapia genowa może być wykorzystana w leczeniu wielu chorób – nowotworów, AIDS czy zaburzeń sercowo-naczyniowych. Jej ograniczone aplikacje kliniczne wynikają przede wszystkim z trudności związanych z wprowadzaniem genów do tkanek i uzyskaniem w nich efektywnej ekspresji. Jak dotąd większość protokołów terapii genowej wykorzystuje system wirusowy. Coraz częściej rozpatruje się możliwość zastosowania wektorów konstruowanych z wirusów związanych z adenowirusami (*adeno-associated virus*, AAV). Wektory AAV wydajnie infekują komórki dzielące się, jak i niedzielące się, integrują do genomu gospodarza. Szereg prac eksperymentalnych wskazuje, iż wektory AAV mogą być pomocne w transferze terapeutycznych genów do komórek mięśni, wątroby, do neuronów czy guzów nowotworowych.

**Słowa kluczowe:** wektory wirusowe, terapia genowa.

**Summary:** Gene therapy has been proposed for the treatment of various diseases including cancer, AIDS, cardiovascular disfunctions. Nevertheless most of gene therapy approaches suffer from very weak efficiency of gene delivery and poor gene expression. To date, viral delivery methods are characterized by the highest transfection rates *in vivo*. Adeno-associated viral system is very promising new strategy in gene therapy applications for many reasons: AAV vectors seem to be safer than popular adenoviruses and retroviruses, they infect both dividing and non-dividing cells of broad host range and AAV vectors also permit stable and efficient integration of DNA into host genome. Many gene therapy experiments have used AAV delivery system with significant success. The promising outcomes have observed *in vitro* and *in vivo* studies. The results demonstrate that AAV vectors can efficiently transfer therapeutic genes to a number of different cell types – muscle, liver, neurons, cancer.

**Key words:** viral vectors, gene therapy.

\*Stypendysta Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej 2002 i 2003.

## TERAPIA GENOWA

Terapia genowa podobnie jak chemioterapia, chirurgia czy radioterapia służy leczeniu chorób. Choć jest to strategia nowa i nie w pełni udokumentowana klinicznie, to budzi olbrzymie zainteresowanie naukowców i klinicystów, choćby z tego względu, iż niesie pomoc pacjentom w sytuacjach, w których żadna z wymienionych standardowych metod leczenia nie jest już skuteczna [24, 26, 36]. Z założenia terapia genowa miała być metodą leczenia chorób bezpośrednio uwarunkowanych genetycznie, np. wrodzonych wad metabolicznych. Bardzo szybko jednak podjęto szereg badań nad jej wykorzystaniem w innych schorzeniach. W chwili obecnej zdecydowanie najwięcej badań dotyczy chorób nowotworowych i AIDS, w dalszej kolejności są choroby infekcyjne i naczyniowo-sercowe, wady metaboliczne i choroby neurologiczne [13,40]. Ciągłym ograniczeniem prób klinicznych są trudności z uzyskaniem wysokiej i regulowalnej ekspresji terapeutycznych genów oraz problemy związane z efektywnym wprowadzeniem genów w tkanki czy narządy docelowe. Jak dotąd liczba wszystkich, klinicznych protokołów terapii genowej na świecie przekracza już 500 [40]. Warunki, jakie musi spełniać protokół terapii genowej dopuszczony do kliniki, to między innymi:

- 1) standardowe metody leczenia są mało skuteczne lub nie przynoszą żadnego efektu terapeutycznego;
- 2) laboratoryjne badania *in vitro* i *in vivo* niezaprzeczalnie wskazują na celowość przeprowadzania prób terapii genowej;
- 3) wykorzystywany preparat genowy jest środkiem leczniczym o czystości farmakologicznej;
- 4) gen terapeutyczny może być skutecznie wprowadzony w oczekiwane miejsce ustroju;
- 5) potencjalne efekty uboczne są przewidywalne i akceptowalne;
- 6) brak racjonalnych przesłanek, iż wprowadzenie obcego DNA spowoduje niepożądane zmiany w ustroju;
- 7) skuteczność zastosowanej strategii można ocenić dostępnymi badaniami w sposób obiektywny;
- 8) korzystna jest możliwość regulacji ekspresji wprowadzanego genu;
- 9) koszt wytworzenia preparatu genowego nie jest wysoki.

## STRATEGIE TRANSFERU GENÓW

Jak podkreśla jeden z pionierów terapii genowej – Anderson [1], na obecnym poziomie rozwoju inżynierii genetycznej i medycyny możemy wyróżnić trzy zasadnicze systemy transferu genów:

1. **Metoda *ex vivo*** – pobrane od pacjenta komórki (najczęściej komórki krwi) poddaje się manipulacjom genetycznym w warunkach *in vitro*. Drogą bezpośredniej transfekcji wprowadzany jest do nich terapeutyczny gen. Transfekowane komórki są namnażane, sprawdzane w kierunku ekspresji wprowadzonego



geny, po czym wszczepiane są z powrotem do organizmu pacjenta [39].

**2. Metoda bezpośredniego wprowadzenia terapeutycznego genu do określonej tkanki, narządu pacjenta** np. do niedokrwionego mięśnia sercowego, do guza nowotworowego [20].

**3. Metoda systemowego podania preparatu genowego** – podany donaczyniowo terapeutyczny gen osiąga wybraną tkankę, narząd, w których ulega ekspresji [43].

We wszystkich wymienionych strategiach transferu genu niezbędne są nośniki genów. Generalnie wyróżnia się nośniki o charakterze fizyczno-chemicznym oraz biologicznym [11, 12]. Metody fizyczno-chemiczne wykorzystują głównie zjawisko, iż DNA jest substancją chemiczną o charakterze polarnym, którą można kompleksować z substancjami ułatwiającymi wnikanie genów do komórek np. z lipidami kationowymi czy polarnymi oligopeptydami. Do tych metod zalicza się również bezpośrednią iniekcję DNA, elektroporację DNA *in vivo* [11, 12] oraz wstrzeliwanie genów [16]. Większość jednak protokołów terapii genowej wykorzystuje transfer genów oparty na metodach biologicznych, tj. wykorzystaniu wirusów.

## NOŚNIKI WIRUSOWE

Na potrzeby terapii genowej wykorzystywane są zarówno wirusy DNA, jak i RNA. Badania prowadzone są przede wszystkim na wirusach z rodziny *Retroviridae* (ssRNA) oraz *Adenoviridae* (dsDNA), czyli na wektorach retrowirusowych i adenowirusowych [13, 40]. W tym miejscu warto podkreślić, iż z założenia wszystkie wektory wirusowe muszą być pozbawione własności patogennych. Wirulentność wirusowych wektorów sprowadza się tylko do jednorazowej infekcji komórek docelowych i prowadzi do przekazania przede wszystkim genów terapeutycznych, przy czym materiał genetyczny właściwy tylko wirusowi jest tak zmieniony i zredukowany, iż przy jego użyciu cząstka wirusowa nie może być powtórnie odtworzona i dalej amplifikowana.

**a) Wektory retrowirusowe.** Retrowirusy należą do rodziny *Retroviridae*, w której wyróżnia się trzy podrodziny: *Oncovirinae* (np. *human T-cell leukemia virus*, HTLV), *Lentivirinae* (np. *human immunodeficiency virus*, HIV) oraz *Spumavirinae* (np. wirus pienisty ludzi). Retrowirusy mają wielkość ok. 90 nm oraz zawierają otoczkę lipidową, a ich materiałem genetycznym jest dimer liniowego, jednoniciowego RNA. Przenoszone są głównie bezpośrednio przez krew oraz drogą płciową. Wywołują one chłoniaki, białaczki, AIDS. Charakteryzując wektory retrowirusowe należy pamiętać, iż miano otrzymywanego wirusa w tym systemie jest stosunkowo niskie, a cząstki wirusowe nie są zdolne do efektywnego infekowania komórek niedzielących. W zainfekowanych komórkach retrowirusy integrują z materiałem genetycznym gospodarza. Wykorzystanie kliniczne rekombinacyjnych retrowirusów (wielkość ligowanego insertu około 10 kbp) wiąże się z ryzykiem pojawienia się w infekowanych komórkach efektów niepożądanych głównie związanych z możliwością wystąpienia mutagenyzy insercyjnej, która może doprowadzić do transformacji nowotworowej [7, 25].

**b) Wektory adenowirusowe.** Adenowirusy (Ad) należą do rodziny *Adenoviridae*. Są to wirusy o symetrii ikozahedralnej, bez otoczki lipidowej, wielkości ok. 80 nm. Przenoszone są głównie drogą kropelkową i fekalno-oralną. U człowieka odpowiedzialne są głównie za zapalenia dróg oddechowych, spojówek, rogówki. Ich genom to podwójnoniciowy, liniowy DNA, wielkości ok. 36 kbp. Ad wiążą się z komórkami przez receptory CAR (ang. *Coxsackie and Ad receptor*) [15] oraz integryny [35]. W rozpoznawaniu receptorów komórkowych biorą udział głównie wirusowe białko płaszczowe p182 oraz motywy RGD na pentonach wirusa. Rekombinowane adenowirusy infekują zarówno komórki dzielące się, jak i nie dzielące się, przy czym nie integrują z materiałem genetycznym gospodarza. Z wektorami Ad wiąże się dość duże niebezpieczeństwo klinicznych powikłań głównie związane z ich wysoką immunogennością [22]. Główne cechy wektorów Ad zawarto w tabeli 1.

Oprócz adenowirusów i retrowirusów coraz większą uwagę zwraca się na wektory konstruowane z wirusów towarzyszących adenowirusom (tab. 1) (ang. *adeno-associated viruses*, AAV, *Parvoviridae*), jak również duże zainteresowanie budzą wektory lentiwirusowe (*Retroviridae*) oraz wektory konstruowane przy wykorzystaniu genomu wirusa opryszczki pospolitej (ang. *herpes simplex virus*, HSV, *Herpesviridae*) [8]. Wektory lentiwirusowe odznaczają się niską immunogennością, a wydajnie infekują zarówno komórki dzielące, jak i nie dzielące się [29]. Wysoki poziom transdukcji i replikacji cechuje również wektory wirusowe wywodzące się z wirusów SFV (ang. *Semliki Forest virus*). Wirusy te bardzo skutecznie transdukuje szeroki zakres komórek ssaczych, ptasich, płazich i owadzich [23].

Wirusowe strategie transferu genów to również hybrydowe wektory wirusowe. Wykorzystywane są np. hybrydy AAV i HSV [14] albo np. HSV/EBV [36] czy HSV/EBV/Retro [34]. Złączenie np. AAV z HSV-1 powoduje, iż powstała hybryda nie tylko może wprowadzać swój materiał genetyczny w określone miejsce DNA gospodarza (chromosom 19) oraz może warunkować stabilną ekspresję wprowadzanego genu (cechy oferowane przez AAV), ale również ma cechy wektora HSV, np. wielkość ligowanego fragmentu w hybrydzie jest znacznie większa niż dla AAV (tab. 1) [21].

## WIRUSY ZWIĄZANE Z ADENOWIRUSAMI (AAV)

Wirusy związane z adenowirusami (AAV) należą do rodziny *Parvoviridae*. Są to małe (średnica: 20–25 nm), pozbawione lipidowej otoczki cząstki o symetrii ikozahedralnej. Zaliczane są one do wirusów defektywnych – niezawierających kompletu genów niezbędnych do replikacji, stąd wymagają obecności wirusów pomocniczych, w tym przypadku adenowirusów. Wykazano, iż AAV są relatywnie odporne na wiele czynników natury fizycznej, włączając oporność na ciepło, niskie pH, niektóre detergenty i rozpuszczalniki [21, 30]. Przyjmuje się, iż około 70% populacji ludzkiej jest seropozytywna pod względem AAV i nie jest to zjawisko zależne od szerokości geograficznej. Przyjmuje się, iż do zakażenia dochodzi w okresie dzieciństwa, a po 30 roku życia często obserwuje się reaktywację wirusa [10]. Wskazuje się również, iż



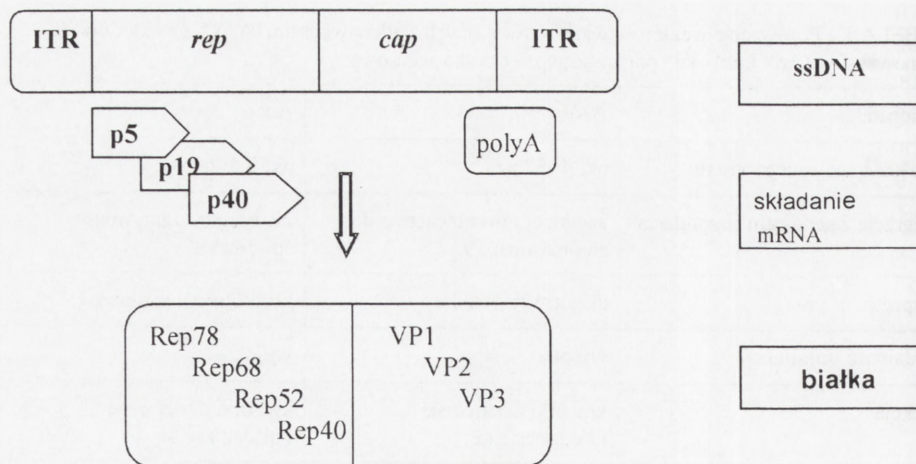
TABELA 1 . Porównanie wektorów wirusów związanych z adenowirusami (AAV) z wektorami adenowirusów (Ad): kpz – kilo par zasad; vp – cząstka wirusowa

Parametr	AAV	Ad
Wielkość ligowanego insertu	ok. 4–5 kpz	ok. 8,5 kpz
Integracja z genomem gospodarza	integruje, powinowactwo do chromosomu 19	nie integruje, aktywność episomalna
Ekspresja <i>in vivo</i>	długotrwała, stabilna	krótkotrwała, niestabilna
Wydajność transdukcji	wysoka	wysoka
Infekcja	komórki dzielące się i nie dzielące się;	komórki dzielące się i nie dzielące się
Bezpieczeństwo	nieimmunogenne, niepatogenne, niska toksyczność	wysoka immunogenność, niska patogenność
Otrzymywane miano wirusa	około $10^{11}$ – $10^{12}$ vp/ml	około $10^{13}$ vp/ml

wyższą seropozytywność na AAV wykazują bardzo często kobiety w ciąży [10]. U naczelnych zidentyfikowano 6 serotypów AAV różniących się przede wszystkim informacją genetyczną dotyczącą budowy kapsydu. Jak do tej pory nie wykazano swoistych i wyraźnych oznak patogenności AAV, choć istnieją doniesienia wskazujące, iż AAV mogą być związane z zaburzeniem płodności u mężczyzn [9, 31]. Badania np. Rohde et al. [31] wykazały, iż AAV występowały u 30% z badanych, nieplodnych mężczyzn, przy czym w grupie kontrolnej, zdrowych osób nie stwierdzono występowania AAV.

## GENOM AAV

Materiałem genetycznym wirusów związanych z adenowirusami jest pojedyncza, 4680 nt cząsteczka jednoniciowego DNA (ssDNA). Końce ssDNA ograniczają 145 nt sekwencje ITR (ang. *internal terminal repeats*). Każda z nich jest budowana przez dwie krótkie sekwencje palindromowe ograniczone przez długą sekwencję palindromową. Przestrzennie ITR mają strukturę spinki od włosów (ang. *T-shaped hairpin*), determinującą starterową aktywność replikacyjną. ITR są niezbędne do replikacji, pakowania oraz integracji AAV [21, 23]. W genomie AAV (ryc.1) wyróżnia się dwie otwarte ramki odczytu (ang. *open reading frames*, ORFs) związane z kodowaniem białek niestrukturalnych (Rep) i kapsydowych (Cap). Genom AAV to również trzy promotory: p5, p19 oraz p40. W wyniku procesu alternatywnego składania mRNA powstają funkcjonalne białka Rep (ryc.1): Rep 78, Rep 68, Rep 52, Rep 40 oraz Cap: VP1, VP2, VP3 [21].



RYCINA 1. Schemat struktury genomu i ekspresji genów AAV, opis w tekście – *Genom AAV* (Lai et al. [21], zmienione)

## CYKL ŻYCIOWY AAV

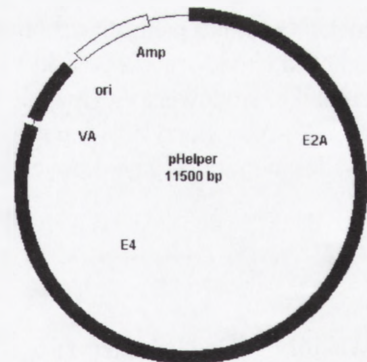
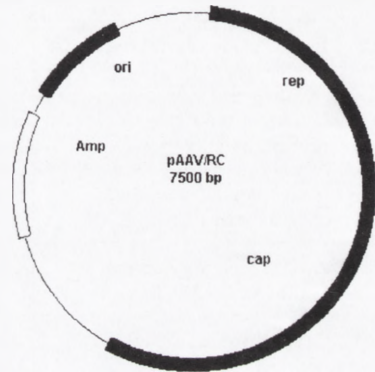
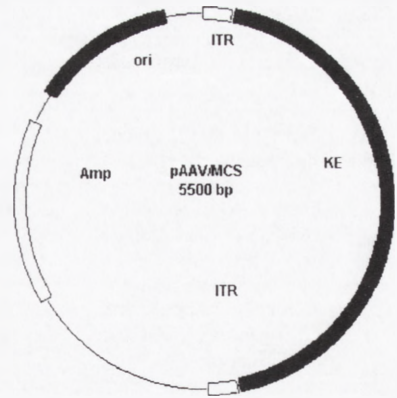
Cykl życiowy AAV rozpoczyna się przez adhezję wirusa do komórki gospodarza. Najprawdopodobniej wirus rozpoznaje miejsca receptorowe bogate w proteoglikany siarczanu heparanu (HSPG). Wskazuje się również, iż w wiązaniu AAV do komórki biorą udział inne białka receptorowe m.in. dla fibroblastycznego czynnika wzrostu (FGFR1) oraz podobnie jak dla adenowirusów – receptory integrynowe ( $\alpha_v\beta_5$ ) [21, 23, 35]. Związany z receptorem wirus internalizowany jest do cytoplazmy na zasadzie endocytozy [5]. Z kwaśnego środowiska endosomu cząstki wirusowe uwalniane są do cytoplazmy, w której wirus migruje do jądra komórkowego, osiągając przestrzeń perinuklearną. Dalej wirus wnika do jądra komórkowego, gdzie traci płaszcz białkowy. Jego materiał genetyczny zostaje podwojony do dsDNA i w nieobecności genów wirusów pomocniczych zintegrowany do genomu gospodarza [5]. Dalsze etapy cyklu życiowego AAV – replikacja prowirusa, pakowanie do otoczek białkowych, liza komórki i uwolnienie nowych cząstek wirusowych – zależą od obecności wirusów pomocniczych. Przejście AAV z formy latentnej w lityczną jest możliwe jedynie po koinfekcji komórki gospodarza adenowirusem bądź wirusem *herpes simplex* (HSV, typ1). Jak wykazano, do replikacji AAV niezbędne są adenowirusowe sekwencje E1, E2A, E4, VA RNA, a w przypadku koinfekcji HSV regiony – UL5, UL8, UL29 i UL52. Niekiedy obecność czynników genotoksycznych, np. światła UV, może również indukować przejście AAV w fazę lityczną, choć proces replikacji jest wówczas bardzo słaby [32, 44]. Jak już wspomniano, AAV integrują z genomem gospodarza. Unikalną cechą AAV jest ich powinowactwo do chromosomu 19. Wykazano, iż w przypadku nieobecności wirusów pomocniczych czy czynników genotoksycznych AAV w fazie latentnej integruje do



ludzkiego chromosomu 19–q13.3 [21]. Najnowsze prace donoszą, iż wektory AAV preferencyjnie integrują w regiony genomu bogate w aktywnie transkrybowane geny [28, 33]. Wskazuje się również, iż uszkodzenia komórkowego DNA, np. o charakterze delecji, mogą ułatwiać włączanie DNA wirusowego do genomu [28, 33]; informacja ta wydaje się być spójna z wcześniej poznanymi faktami, iż np. czynniki genotoksyczne zwiększają wydajność transdukcji komórek wektorami AAV [32, 44].

## UZYSKIWANIE WEKTORÓW AAV

Uzyskiwanie rekombinacyjnych AAV składa się z kilku elementów. Bardzo interesującą strategię przedstawia firma Stratagene. Metoda ta nie wykorzystuje pomocniczych adenowirusów, a system opiera się na kotransfekcji komórek pakujących (ang. *human embryonic kidney*, HEK293) wektorami, które niosą niezbędne dla produkcji AAV geny: pMCS, pRC i pAd. Schematyczne mapy wektorów przedstawiono na rycinie 2. Wektor pMCS zawiera sekwencje oskrzydłające ITR, między które w miejsce genów wirusowych *cap* i *rep* może być klonowana jednobądź wielocistronowa kasetka ekspresyjna. Oprócz genu (genów) terapeutycznego zawiera ona bardzo często swoiste markery selekcyjne, np. GFP, RFP, LacZ. Gen *cap* kodujący białka kapsydowe i gen *rep*, odpowiedzialny za procesy replikacji i integracji wirusa wprowadzane są do komórek pakujących w postaci wektora pomocniczego pRC. System AAV wymaga również szeregu innych adenowirusowych genów niezbędnych do replikacji AAV. Sekwencje E2A, E4, VA dostarczane są przez wektor pomocniczy – pAd. W starszych systemach AAV stosowano



RYCINA 2. Schematyczne mapy wektorów systemu AAV: a – pAAV/MCS – wektor z kasetą ekspresyjną (KE) oskrzydloną sekwencjami ITR; b – pAAV/RC – wektor pomocniczy niosący wirusowe geny *rep* i *cap*; c – pHelper – wektor pomocniczy niosący wirusowe geny E2A, E4, VA. ori – miejsce inicjatorowe replikacji; Amp – gen oporności na ampicylinę

TABELA 2. Przykłady wykorzystania w terapii genowej strategii wirusów związanych z adenowirusami.

Sys-tem	Cel terapii i wprowadzany gen	Miejsce wprowadzenia	Obserwowany efekt	Literatura
AAV	Hemofilia B; IX czynnik krzepnięcia	mięśnie szkieletowe	poprawa hemostazy	[18]
AAV	Guzy nowotworowe (wątroba); angiostatyna	systemowo – żyła wrotna	zahamowanie wzrostu nowotworów, wydłużenie czasu przeżycia	[41]
AAV	Indukcja terapeutycznej angiogenezy; VEGF165 i angiopoetyna-1	mięśnie szkieletowe	indukcja angiogenezy	[2]
Ad / AAV	Rak piersi; sekwencja antysensowna telomerazy	hodowla <i>in vitro</i> linia komórkowa MCF-7	wyciszenie własności inwazyjnych komórek, indukcja apoptozy	[42]
AAV	Uszkodzony rdzeń kręgowy; BDNF i NT-3	neurony rdzeniowe	regeneracja aksonów, poprawa funkcji hind-limb	[6]
AAV	Cukrzyca typu 1; geny reporterowe	wysepki trzustkowe	wydajna transdukcja komórek trzustkowych	[17]
AAV	Retinopatia cukrzycowa; endostatyna, PEDF, TIMP-3	systemowo	ograniczenie angiogenezy w siatkówce	[3]
AAV	Zwiększona angiogeneza w siatkówce; sFLT-1	gałka oczna	zahamowanie angiogenezy w siatkówce	[4]
AAV	Cystic fibrosis; CFTR	zatoka szczękowa	faza I badań klinicznych AAV/CFTR	[38]

koinfekcję komórek pakujących pomocniczym adenowirusem Ad5. Zainfekowane komórki uwalniały do środowiska cząsteczki rekombinowanego AAV zawierające geny terapeutyczne, jednak takie środowisko wymagało oczyszczenia z adenowirusów. Obecnie stosowane systemy AAV wykorzystujące potrójną transfekcję komórek wektorami pMCS, pRC, pAd w zasadzie eliminują ryzyko zanieczyszczenia preparatów adenowirusami.

## APLIKACJE

Wektory AAV charakteryzują się wysoką wydajnością transferu genu i ekspresją terapeutycznego genu w różnych typach komórek zarówno proliferujących, jak i nieproliferujących. Łączą w sobie zalety wektorów adenowirusowych i retrowirusowych. Przeprowadzone badania w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* wykazały, iż system AAV jest bezpieczny (niska immunogenność i toksyczność) i oferuje stabilną i długą ekspresję



genu [23]. Istnieją doniesienia o skuteczności AAV w transferze genów do układu nerwowego [4], mięśni szkieletowych [2, 19], układu oddechowego [38], wysepek trzustkowych [17]. Tabela 2 przedstawia przykłady wykorzystania strategii AAV w terapii genowej.

## PODSUMOWANIE

Terapia genowa jest nową strategią terapeutyczną. Opiera się ona na możliwości transferu i ekspresji terapeutycznych genów do komórek, tkanek, narządów, których funkcja jest nieprawidłowa lub zaburzona, albo nawet jak np. w chorobach nowotworowych wręcz niepożądana. Rozwój terapii genowej w znacznym stopniu wiąże się z trudnościami związanymi z wprowadzaniem genów i uzyskiwaniem ich efektywnej ekspresji. Wirusowa strategia transferu genów, jak do tej pory, zdominowała procedury terapii genowej. Stosowane wektory, głównie adenowirusowe i retrowirusowe, są korzystne, jednak nie są pozbawione wad. Jednym z nowszych rozwiązań jest strategia wykorzystująca rekombinowane wirusy związane z adenowirusami, AAV. Jak wskazują dane eksperymentalne i kliniczne, system AAV zapewnia wydajną infekcję komórek dzielących się i nie dzielących się o różnym pochodzeniu, jest bezpieczny, a ekspresja wprowadzonego przez wektor AAV genu terapeutycznego utrzymuje się w komórkach przez długi okres.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ANDERSON WF. Human gene therapy. *Nature* 1998; **392**: 25–30.
- [2] ARSIC N, ZENTILIN L, ZACCHIGNA S, SANTORO D, STANTA G, SALVI A, SINAGRA G, GIACCA M. Induction of functional neovascularization by combined vegf and angiopoietin-1 gene transfer using AAV vectors. *Mol Ther* 2003; **7**: 450–459.
- [3] AURICCHIO A, BEHLING KC, MAGUIRE AM, O'CONNOR EM, BENNETT J, WILSON JM, TOLENTINO MJ. Inhibition of retinal neovascularization by intraocular viral-mediated delivery of anti-angiogenic agents. *Mol Ther* 2002; **6**: 490–494.
- [4] BAINBRIDGE JW, MISTRY A, DE ALWIS M, PALEOLOG E, BAKER A, THRASHER AJ, ALI RR: Inhibition of retinal neovascularisation by gene transfer of soluble VEGF receptor sFlt-1. *Gene Ther* 2002; **9**: 320–326.
- [5] BARTLETT JS, WILCHER R, SAMULSKI RJ. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol* 2000; **74**: 2777–2785.
- [6] BLITS B, OUDEGA M, BOER GJ, BARTLETT BUNGE M, VERHAAGEN J. Adeno-associated viral vector-mediated neurotrophin gene transfer in the injured adult rat spinal cord improves hind-limb function. *Neuroscience* 2003; **118**: 271–281.
- [7] BONETTA L. Leukemia case triggers tighter gene-therapy controls. *Nature Med* 2002; **8**: 1189.
- [8] BURTON EA, FINK DJ, GLORIOSO JC. Gene delivery using herpes simplex virus vectors. *DNA Cell Biol* 2002; **21**: 915–936.
- [9] ERLER K, ROHDE V, THAELE M, ROTH S, EDLER L, SCHLEHOFER JR. DNA of adeno-associated virus (AAV) in testicular tissue and in abnormal semen samples. *Hum Reprod* 2001; **16**: 2333–2337.
- [10] ERLER K, SEBOKOWA P, SCHLEHOFER JR. Update on the prevalence of serum antibodies (IgG and IgM) to adeno-associated virus (AAV). *J Med Virol* 1999; **59**: 406–411.

- [11] GOŁĄB J, ZAGOŹDŻON R. Terapia genowa – wprowadzanie genów do komórek. *Post Biol Kom* 1995; **22**: 23–41.
- [12] GRECO O, SCOTT SD, MARPLES B, DACHS GU. Cancer gene therapy: «delivery, delivery, delivery». *Front Biosci* 2002; **7**: 1516–1524.
- [13] GROBHANS H. Gene therapy – when a simple concept meets a complex reality. *Funct Integr Genomics* 2000; **1**: 142–145.
- [14] HEISTER T, HEID I, ACKERMANN M, FRAEFEL C. Herpes simplex virus type 1/adeno-associated virus hybrid vectors mediate site-specific integration at the adeno-associated virus preintegration site, AAVS1, on human chromosome 19. *J Virol* 2002; **76**: 7163–7173.
- [15] HOWITT J, ANDERSON CW, FREIMUTH P. Adenovirus interaction with its cellular receptor CAR. *Curr Top Microbiol Immunol* 2003; **277**: 331–364.
- [16] JOHNSTON SA, TANG D. Gene gun transfection of animal cells and genetic immunization. *Methods Cell Biol* 1994; **43**: 353–365.
- [17] KAPTURCZAK M, ZOLOTUKIN S, CROSS J., PILEGGI A, MOLANO RD, JORGENSEN M, BYRNE B, FLOTTE TR, ELLIS T, INVERARDI L, RICORDI C, NICK H, ATKINSON M, AGARWAL A. Transduction of human and mouse pancreatic islet cells using a bicistronic recombinant adeno-associated viral vector. *Mol Ther* 2002; **5**: 154–160.
- [18] KAY MA, MANNO CS, RAGNI MV, LARSON PJ, COUTO LB, MCCLELLAND A, GLADER B, CHEW AJ, TAI SJ, HERZOG RW, ARRUDA V, JOHNSON F, SCALLAN C, SKARSGARD E, FLAKE AW, HIGH KA. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet* 2000; **24**: 257–261.
- [19] KESSLER PD, PODSAKOFF GM, CHEN X, MCQUISTON SA, COLOSI PC, MATELIS LA, KURTZMAN GJ, BYRNE BJ. Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **96**: 14082–14087.
- [20] KOŁSUT P, MAŁECKI M, TERESIŃSKA A, RELIGA Z, JANIK P. Gene therapy of coronary artery disease. *Ann Diagnost Paediatr Pathol* 2003; **7**: 19–23.
- [21] LAI CM, LAI YKY, RAKOCZY PE. Adenovirus and adeno-associated virus vectors. *DNA Cell Biol* 2002; **21**: 895–913.
- [22] LEHRMAN S. Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature* 1999; **401**: 517–518.
- [23] LUNDSTROM K, SCHWEITZER C, ROTMANN D, HERMANN D, SCHNEIDER EM, EHRENGRUBER MU. Semliki Forest virus vectors: efficient vehicles for *in vitro* and *in vivo* gene delivery. *FEBS Lett* 2001; **504**: 99–103.
- [24] MAŁECKI M, JANIK P. Terapia genowa – próby zastosowań klinicznych. Terapia angiogenna. *Ordynator Leków* 2002; **2**: 8–12.
- [25] MARSHALL E. Second child in French trial is found to have leukemia. *Science* 2003; **299**: 320.
- [26] MILLER AD. Human gene therapy comes of age. *Nature* 1992; **357**: 455–460.
- [27] MONAHAN PE, SAMULSKI RJ. AAV vectors: is clinical success on the horizon? *Gene Ther* 2000; **7**: 24–30.
- [28] NAKAI H, MONTINI E, FUESS S, STORM TA, GROMPE M, KAY MA. AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nat Genet* 2003; **34**: 297–302.
- [29] QUINONEZ R, SUTTON RE. Lentiviral vectors for gene delivery into cells. *DNA Cell Biol* 2002; **21**: 937–951.
- [30] RABINOWITZ JE, SAMULSKI RJ. Crystal-clear view. *Gene Ther* 2002; **9**: 1413–1414.
- [31] ROHDE V, ERLER K, SATTLER HP, DEROUET H, WULLICH B, SCHLEHOFER JR. Detection of adeno-associated virus in human semen: does viral infection play a role in the pathogenesis of male infertility? *Fertil Steril* 1999; **72**: 814–816.
- [32] RUSSELL DW, ALEXANDER IE, MILLER AD. DNA synthesis and topoisomerase inhibitors increase transduction by adeno-associated virus vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 5719–5723.
- [33] RUSSELL DW. AAV loves an active genome. *Nat Genet* 2003; **34**: 241–242.
- [34] SENA-ESTEVEZ M, CAMP SM, CHIOCCA EA, BREAKFIELD XO. Single-step conversion of cells to retrovirus vector producers with herpes simplex virus-Epstein-Barr virus hybrid amplicons. *J Virol* 1999; **73**: 10426–10439.
- [35] TRIANTAFILOU K, TAKADA Y, TRIANTAFILOU M. Mechanisms of integrin-mediated virus attachment and internalization process. *Crit Rev Immunol* 2001; **21**: 311–322.
- [36] VERMA IM, SOMIA N. Gene therapy – promises, problems and prospects. *Nature* 1997; **389**: 239–242.
- [37] WADE-MARTINS R, SMITH ER, TYMINSKI E, CHIOCCA EA, SAEKI Y. An infectious transfer and expression system for genomic DNA loci in human and mouse cells. *Nat Biotechnol* 2001; **19**: 1067–1070.



- [38] WAGNER JA, REYNOLDS T, MORAN ML, MOSS RB, WINE JJ, FLOTTE R, GARDNER P. Efficient and persistent gene transfer of AAV-CFTR in maxillary sinus. *The Lancet* 1998; **351**: 1702–1703.
- [39] WYSOCKI PJ, KARCZEWSKA A, MACKIEWICZ A. Gene modified tumor vaccines in therapy of malignant melanoma. *Otolaryngol Pol* 2002; **56**:147–153.
- [40] [www.wiley.co.uk/genmed/](http://www.wiley.co.uk/genmed/)
- [41] XU R, SUN X, TSE LY, LI H, CHAN PC, XU S, XIAO W, KUNG HF, KRISSENSSEN GW, FAN ST. Long-term expression of angiostatin suppresses metastatic liver cancer in mice. *Hepatology* 2003; **37**: 1451–1460.
- [42] ZHANG X, CHEN Z, CHEN Y, TONG T. Delivering antisense telomerase RNA by a hybrid adenovirus/ adeno-associated virus significantly suppresses the malignant phenotype and enhances cell apoptosis of human breast cancer cells. *Oncogene* 2003; **22**: 2405–2416.
- [43] ZHANG Y, CALON F, ZHU C, BOADO RJ, PARDRIDGE WM. Intravenous nonviral gene therapy causes normalization of striatal tyrosine hydroxylase and reversal of motor impairment in experimental parkinsonism. *Hum Gene Ther* 2003; **14**: 1–12.
- [44] ZHOU C, YANG Q, TREMPPE JP. Enhancement of UV-induced cytotoxicity by the adeno-associated virus replication proteins. *BiochimBiophysActa* 1999; **1444**: 371–383.

*Redaktor prowadzący – J. Kawiak*

*Otrzymano: 02.08.2003 r.*

*Przyjęto: 29.09.2003 r.*

*ul. Rentgena 5, 02-770 Warszawa*





## ZMIENNOŚĆ FERRYTYNY W STANACH PATOLOGICZNYCH\*

### FERRITIN VARIABILITY IN PATHOLOGICAL STATES

Joanna PERŁA, Tomasz TWARDOWSKI

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań

*Streszczenie:* Ferrytyna pełni istotną funkcję we wszystkich żywych organizmach, utrzymując żelazo w dostępnej i nieszkodliwej formie. Jej synteza jest ściśle regulowana zarówno na etapie transkrypcji, jak i translacji, a na jej ekspresję wpływa wiele czynników. Utrzymanie prawidłowego poziomu tego białka jest istotne dla funkcjonowania organizmu i stanowi swego rodzaju wskaźnik stanu zdrowia. Autorzy, omawiając wyniki prowadzonych w ostatnich latach badań nad zmiennością składu podjednostek tego białka u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów i chorobą Stilla o początku w wieku dorosłym, a także z zaburzeniami jego biosyntezy u chorych z zespołem dziedzicznej zaćmy związanej z hyperferrytynemią i nowotworami, odpowiadają na pytanie, czy istnieje prosta zależność między stanem zdrowia a zawartością ferrytyny w organizmie oraz czy zmiana kompozycji podjednostek tego białka lub ich modyfikacja może wskazywać na konkretną jednostkę chorobową.

*Słowa kluczowe:* ferrytyna, nowotwory, niedokrwistość, reumatoidalne zapalenie stawów, choroba Stilla o początku w wieku dorosłym, zespół dziedzicznej zaćmy związanej z hyperferrytynemią.

*Summary:* Ferritin plays very important role in all living species by storing iron in bioavailable and nontoxic form. Its synthesis is tightly regulated at transcriptional as well as translational level. Ferritin expression is influenced by several factors. Maintenance of right ferritin level is of key importance for an organism and serves as one of health indicators. Presenting latest results concerning ferritin subunits variability in case of rheumatoid arthritis and adult onset Still's disease patients and subjects with upregulated ferritin biosynthesis (hereditary hyperferritinemia cataract syndrome and cancers), authors are answering a question whether there is a simple correlation between health condition and ferritin amount and whether subunit composition changes or their modification indicate a specific pathological state.

*Key words:* ferritin, cancers, anemia, rheumatoid arthritis, adult onset Still's disease, hereditary hyperferritinemia cataract syndrome.

## 1. WŁAŚCIWOŚCI FERRYTYNY I JEJ BIOSYNTeza

Ferrytyna jest białkiem odpowiedzialnym za magazynowanie żelaza we wszystkich żywych organizmach. Jest ona zbudowana z 24 podjednostek, wśród których

wyróżniamy ciężkie H (ang. *heavy*) o masie ok. 21 kDa i lekkie L (ang. *light*) o masie 19 kDa [8]. Podjednostki te wykazują ok. 47% identyczności sekwencji aminokwasowej i są produktem translacji różnych mRNA ferrytynowych [15]. Łańcuchy H zawierają wysoce konserwatywne centrum ferroksoazydazowe, które nadaje im zdolność do szybkiego utleniania  $Fe^{2+}$ , niezbędną do pobierania żelaza przez cząsteczki ferrytyny, natomiast L ułatwiają formowanie rdzenia żelazowego wewnątrz muszli białkowej. Proporcja podjednostek H i L w cząsteczce ferrytyny jest tkankowo-specyficzna [8]. Ferrytyny bogate w podjednostkę L są charakterystyczne dla organów magazynujących żelazo (wątroba, śledziona) i wykazują wysoką zawartość tego metalu (ponad 1500 Fe/cząsteczkę). Natomiast ferrytyny bogate w podjednostkę H, występujące głównie w mięśniach, mózgu i sercu charakteryzują się niską zawartością żelaza (poniżej 1000 Fe/cząsteczkę) [15]. Akumulują i uwalniają one żelazo szybciej niż ferrytyny bogate w podjednostkę L i mogą przyczyniać się do zapobiegania stresowi oksydacyjnemu [15,26]. Natomiast ferrytyny bogate w łańcuchy L są przypuszczalnie zaangażowane w długoterminowe magazynowanie żelaza [15]. Struktura ferrytyny i molekularne mechanizmy regulatorowe jej biosyntezy zostały omówione w pracy [29].

W 2001 roku zidentyfikowano ferrytynę mitochondrialną (MtF). MtF syntetyzowana jest jako prekursor o masie 30 kDa z długą N-końcową sekwencją kierującą do mitochondrium. Po przetransportowaniu do macierzy mitochondrialnej polipeptyd ulega dojrzewaniu do formy o masie 22 kDa. Przewidywana sekwencja aminokwasowa dojrzałego białka wykazuje 77% identyczności z sekwencją podjednostki H i zawiera wszystkie reszty centrum ferroksoazydazowego [19]. MtF ulega ekspresji na niskich poziomach w większości tkanek z wyjątkiem jąder. Jej poziom znacznie wzrasta w erytroblastach pacjentów z anemią syderoblastyczną, która spowodowana jest zaburzeniem na jednym z etapów syntezy hemu. U chorych następuje stymulacja wchłaniania żelaza z jelita, które gromadzi się w nadmiernej ilości w erytrocytach tworząc ziarniste depozyty, tzw. syderoblasty [9].

Ferrytyna jest także obecna w surowicy krwi, gdzie jest częściowo glikozylowana i prawie wolna od żelaza [7]. Ferrytyna surowicy złożona jest z podjednostki L oraz jej glikozylowanej formy zwanej podjednostką G (23 kDa) [25]. Wartości referencyjne dla ferrytyny w surowicy wynoszą 20–120  $\mu\text{g/l}$  u kobiet i 30–300  $\mu\text{g/l}$  u mężczyzn [4]. U osób zdrowych poziom ferrytyny surowicy jest zależny od zawartości żelaza w organizmie niezależnie od typu komórek, w których jest ono magazynowane [7,37]. Ferrytyna jest jednym z białek ostrej fazy i na jej stężenie w surowicy wpływa wiele czynników [35].

Kontrola biosyntezy ferrytyny odbywa się na etapie transkrypcji i translacji. Transkrypcja genów podjednostki H ferrytyny jest aktywowana przez cytokiny, hormony, onkogeny i niektóre induktory różnicowania komórkowego. Preferencyjna zmiana syntezy tej podjednostki, a więc i proporcji podjednostek ferrytyny, w odpowiedzi na powyższe czynniki może być adaptacyjną odpowiedzią komórki na zmianę warunków otoczenia [37], np. stężenia żelaza. Wzrost liczby podjednostek L w cząsteczce ferrytyny jest związany z potrzebą zwiększenia magazynów żelaza. Natomiast zawartość podjednostek H wzrasta w warunkach, w których żelazo jest potrzebne dla metabolizmu komórkowego [3]. Zmiana składu podjednostek cząsteczki ferrytyny moduluje pojemność wiązania żelaza i pulę wolnego żelaza [36,40].



Zasadniczym czynnikiem odpowiadającym za stymulację ekspresji ferrytyny na etapie translacji jest żelazo, które moduluje syntezę ferrytyny dzięki konserwatywnym sekwencjom regulatorowym *cis* zwanym IRE (ang. *iron-responsive element*), obecnym w regionie 5' nieulegającym translacji mRNA ferrytynowych. Sekwencja IRE tworzy strukturę łożyga-pętla, która służy jako miejsce wiązania białek IPR 1 i IRP 2 (ang. *iron regulatory proteins*). Oddziaływanie IRP z IRE na końcu 5' mRNA blokuje translację [10,14,25,28], ponieważ uniemożliwia asocjację małej podjednostki rybosomalnej z czynnikiem inicjującym eIF4F i zgrupowanie preinicjującego kompleksu 43S [23]. Aktywność IRP jest kontrolowana nie tylko przez żelazo, ale także przez inne czynniki, takie jak: nadtlenek wodoru, niedotlenienie, fosforylacja i tlenek azotu (NO) [16].

Stężenie ferrytyny surowicy nie odzwierciedla ilości żelaza w ustroju w stanach patologicznych, takich jak: stany zapalne, choroby wątroby [4,7,11,35,37], nerek [11], infekcje [11,36], nowotwory [4,11,37]. Zawartość ferrytyny w surowicy powyżej 300 µg/l u mężczyzn i 200 µg/l u kobiet, u pozornie zdrowych osób, np. przy nieobecności stanu zapalnego i chorób wątroby, wskazuje na nadmierne magazynowanie żelaza [7]. Istotną zatem jest odpowiedź na pytanie, czy istnieje prosta zależność między stanem zdrowia a zawartością ferrytyny w organizmie i czy zmiana składu podjednostek tego białka lub ich modyfikacja może wskazywać na specyficzną jednostkę chorobową?

## 2. FERRYTYNA U PACJENTÓW Z CHOROBIAMI NOWOTWOROWYMI

Na podstawie podniesionego poziomu ferrytyny w surowicy pacjentów z chorobami proliferacyjnymi, takimi jak: choroba Hodgkina, rak piersi i ostre białaczki zaproponowano, że może być ona wykorzystana jako marker nowotworowy. Jest ona uważana za czynnik immunosupresyjny oraz regulatorową cytokinę. W 1985 roku oczyszczono i zidentyfikowano niezwykłą formę ferrytyny obecną w łożysku i nazwano ją ferrytiną łożyskową p43 (PLF, ang. *placental ferritin*) [21]. PLF wykazywała immunosupresyjną aktywność związaną z sekrecją cytokin przez komórki T pomocnicze typu II. Wysokie stężenie PLF odnotowano w surowicy i tkance łożyska podczas normalnej ciąży, natomiast niskie lub poniżej możliwości detekcji w przypadku ciąży zakończonej poronieniem. Stężenie PLF było też podwyższone u pacjentów z rakiem piersi i białaczką.

W 2002 roku sklonowano i scharakteryzowano cDNA innej, nowej podjednostki ferrytyny, nazwanej łożyskową ferrytiną immunomodulującą (PLIF, ang. *placental immunomodulatory ferritin*) [22]. Sekwencjonowanie cDNA PLIF wykazało obecność otwartej ramki odczytu kodującej białko zbudowane z 165 reszt aminokwasowych o przewidywanej masie cząsteczkowej 22 kDa. 117 reszt aminokwasowych od końca N (domena ferrytynopodobna) wykazuje 100% homologię do łańcucha ferrytyny H człowieka, podczas gdy 48 reszt aminokwasowych od końca C (C48, domena cytokinopodobna) reprezentuje nową sekwencję. Stwierdzono podniesiony poziom transkryptów PLIF w liniach komórek raka gruczołu piersiowego, w porównaniu z niskimi poziomami w komórkach nabłonka gruczołu piersiowego.



PLIF poddana nadekspresji w *E. coli* była rozpoznawana przez przeciwciała specyficzne względem PLF. PLIF zlokalizowano w syncytiotrofoblastie. PLIF i C48 wycięte z białek fuzyjnych testowano na aktywność immunomodulacyjną podobną do PLF. Oba znacznie zmniejszały wskaźnik proliferacji limfocytów. Stwierdzono, że PLIF tak jak PLF jest immunomodulatorem, a jej aktywną domeną jest C48. PLIF może funkcjonować jako białko immunosupresyjne umożliwiające komórkom raka gruczołu piersiowego unik immunologiczny. Podobieństwo reakcji PLIF do PLF z tymi samymi przeciwciałami, ekspresji łożyskowej i funkcji immunosupresyjnej wskazują, że PLF może być dimerem PLIF [22].

Proces nowotworzenia może być spowodowany wielorakimi zmianami genetycznymi, takimi jak: aktywacja protoonkogenów, inaktywacja genów supresji nowotworzenia i nadekspresja czynników wzrostowych. Zmiana ekspresji genów jest cechą wspólną komórek nowotworowych [39]. Na podstawie wyników wielu badań sugeruje się istnienie związku między ekspresją ferrytyny i nowotworami [36]. Synteza ferrytyny jest podwyższona w tkankach nowotworowych w porównaniu z tkankami zdrowymi. Przypuszcza się, że podjednostka ciężka może funkcjonować jako autokryny czynnik wzrostowy dla niektórych tkanek nowotworowych [37]. Niektóre komórki nowotworowe wykazują wyraźnie zmieniony skład podjednostek ferrytyny w porównaniu z ich zdrowymi odpowiednikami.

Aby określić, czy istnieje bezpośredni związek między transformacją nowotworową i syntezą ferrytyny, badano syntezę ferrytyny w komórkach transfekowanych onkogenem E1A. E1A modyfikuje program transkrypcji w komórkach docelowych przez stymulację i represję ekspresji poszczególnych genów. Produkty genu E1A bezpośrednio wiążą się do pewnych białek gospodarza zaangażowanych w kontrolę transkrypcji i modulują ich funkcję. Onkogen E1A specyficznie zmienia kompozycję podjednostek w cząsteczce ferrytyny przez preferencyjną represję syntezy podjednostki H, redukcję poziomów mRNA i białka H ferrytyny. E1A nie ma wpływu na syntezę podjednostki L. Ta odpowiedź przypomina wpływ hormonów, takich jak: czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$ , tyreotropina i insulina, które indukują ferrytynę H, ale nie mają wpływu na podjednostkę L. E1A inhibuje transkrypcję podjednostki H ferrytyny, a jego elementem docelowym jest promotor tego genu [36].

W regionie 5' flankującym gen podjednostki H ferrytyny zidentyfikowano element odpowiedzi na E1A, nazwany FER-1. Jest on odpowiedzialny za transkrypcyjną represję mysiego genu podjednostki H ferrytyny przez E1A. Mechanizm pośredniczonej przez E1A represji aktywności enhancerowej FER-1 polega na interakcji E1A z p300/CBP. E1A współzawodniczy z pCAF (ang. *p300/CBP-associated factor*) o interakcję z p300. E1A wiąże reszty aminokwasowe 1572–1818 p300, podczas gdy pCAF wiąże reszty 1801–1851 p300. FER-1 służący jako podstawowa sekwencja wzmacniająca mysiego genu podjednostki ciężkiej ferrytyny, złożony z 37 pz zlokalizowany jest 4,1 kb powyżej miejsca inicjacji transkrypcji [34]. Czynnikiem transkrypcyjnym bezpośrednio wiążącymi FER-1 są JunD, FosB i ATF1 (wiążące się do sekwencji AP-1/NF-E2-podobnej) oraz Sp1 i Sp3 (wiążące się do sekwencji bogatej w C [37]).

### 3. FERRYTYNA JAKO WSKAŹNIK ILOŚCI ŻELAZA W ORGANIZMIE

Niedokrwistość jest objawem różnych stanów chorobowych, których rozpoznanie wymaga identyfikacji mechanizmu i przyczyn deficytu erytrocytów [17]. Wybór strategii leczenia i ocena jego skuteczności zależy od metod laboratoryjnych, które specyficznie identyfikowałyby anemię z niedoboru żelaza (IDA, ang. *iron deficiency anemia*) i odróżniały ją od innych typów niedokrwistości [12]. Powszechnie stosowane pomiary stężenia żelaza w surowicy mają liczne ograniczenia z powodu niskiej czułości i specyficzności lub dlatego że na ich wynik mają wpływ inne schorzenia. Praktyka wykonywania kilku różnych testów analitycznych poprawia dokładność oceny zawartości żelaza w organizmie. Dodatkową trudność w diagnostyce łagodnych niedoborów żelaza oraz interpretacji wyników testów laboratoryjnych napotyka się u osób, u których występuje stan zapalny [24].

IDA jest często mylona z anemią chorób przewlekłych (ACD, ang. *anemia of chronic diseases*) [12], zwaną też anemią przewlekłego zapalenia [1]. ACD rozwija się u osób cierpiących na choroby zapalne, infekcje i nowotwory, u których następuje aktywacja komórkowej odpowiedzi immunologicznej [38]. U chorych ma miejsce defekt uwalniania żelaza z makrofagów i/lub wiązania żelaza z transferyną [1]. ACD prawdopodobnie rozwija się jako obrona przeciw patogenom, w której pośredniczą cytokiny [1,38] i która jednocześnie prowadzi do pozbawienia żelaza prekursorów erytrocytów. Łagodna anemia może być stosunkowo niską ceną za ograniczenie rozwoju infekcji. Jedynym efektywnym sposobem leczenia ACD jest leczenie schorzenia leżącego u jej podłoża.

Parametry laboratoryjne wskazujące na ACD to: niskie stężenie żelaza surowicy, podwyższony poziom ferrytyny surowicy [1] oraz zwykle obniżona liczba retikulocytów [38]. Choroby przewlekłe z lub bez niedoboru żelaza są powodem dużej liczby anemii [12].

Wiarygodnym markerem ilości żelaza w ustroju w przypadku osób z niedoborem żelaza związanym z zapaleniem, infekcją lub procesem nowotworzenia okazało się stężenie receptora transferynowego surowicy (TfR) [12,24,33], zwłaszcza w połączeniu z pomiarem ferrytyny osocza [12]. W przeciwieństwie do pacjentów z IDA, chorzy z ACD nie wykazują podwyższonego poziomu TfR w surowicy [1]. Stężenie TfR w surowicy, skróconej formy receptora transferynowego związanego z błoną komórkową, jest proporcjonalne do komórkowej ekspresji tkankowego receptora transferynowego [30]. W przypadku anemii z niedoboru żelaza stężenie TfR jest podwyższone [5,33], ponieważ zwiększone jest zapotrzebowanie komórek na żelazo [5,24], spada natomiast w stanach przeładowania żelazem [33]. Najważniejszymi determinantami stężenia TfR w surowicy są prekursorzy erytrocytów w szpiku kostnym. W przypadku zwiększonej masy erytroidalnej szpiku obserwuje się podwyższone stężenie TfR, podczas gdy u chorych z hipoplazją lub apoplazją stężenie surowiczego TfR spada [24]. Do wzrostu poziomów receptora transferyny doprowadza też wzrost stosunku podjednostek H do L ferrytyny spowodowany przez czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$  [36]. Wiadomo, że stężenie TfR wzrasta przed lub w tym samym czasie, w którym spada poziom ferrytyny surowicy (SF). Dlatego wzrost stosunku TfR/ferrytyna surowicy jest użytecznym wczesnym wskaźnikiem niedoboru żelaza. Oba te parametry



są w istotnym stopniu skorelowane z innymi laboratoryjnymi wskaźnikami poziomu żelaza i wykazują zmiany zależne od wieku. Zwiększone stężenie TfR u dzieci prawdopodobnie jest spowodowane wyższą aktywnością erytropoetyczną szpiku [24].

Ważne jest też zidentyfikowanie pacjentów z czynnościowym niedoborem żelaza (FID, ang. *functional iron deficiency*), u których mimo normalnego lub wysokiego poziomu żelaza w szpiku kostnym brakuje żelaza do erytropoezy. TfR i wskaźnika TfR/ferrytyna są użyteczne w wykryciu niedoboru żelaza (ID, ang. *iron deficiency*) i FID w przebiegu ACD [32].

#### 4. FERRYTYNA A REUMATOIDALNE ZAPALENIE STAWÓW

Reumatoidalne zapalenie stawów (RA, ang. *rheumatoid arthritis*) należące do układowych chorób tkanki łącznej jest jedną z najczęściej występujących chorób reumatycznych [13], któremu towarzyszą liczne powikłania [32]. Szacuje się, że 30–70% pacjentów z RA cierpi na niedokrwistość, która obniża jakość ich życia. Anemia chorób przewlekłych, anemia z braku żelaza i anemia megaloblastyczna po terapii metotreksatem są najważniejszymi przyczynami niedokrwistości w przypadku RA [30]. Ważne jest rozróżnienie anemii chorób przewlekłych od anemii z niedoboru żelaza ze względu na konieczność doboru odpowiedniej metody leczenia [5,30,32]. Podawanie żelaza pacjentom z wystarczającą ilością tego pierwiastka może pogarszać objawy oraz być nieskuteczne w leczeniu anemii. Należy zatem unikać nieracjonalnej terapii żelazem, a decyzja o sposobie leczenia powinna być starannie rozważona. Pomiary stężenia TfR pozwalają na efektywne odróżnienie niedokrwistości z niedoboru żelaza od nie-dokrwistości bez niedoboru tego pierwiastka, niezależnie od obecności ostrych lub przewlekłych reakcji zapalnych [30]. Za diagnostycznie istotne dla identyfikacji pacjentów z anemią w przebiegu RA uważa się poziom TfR > 2,50 mg/l w połączeniu z poziomem ferrytyny < 50 µg/l. Czulość diagnostyczną dla tego kryterium oceniono na 100%, a specyficzność na 97% [5].

Określano proporcje glikozylowanej ferrytyny i podjednostek tego białka w surowicy i płynach maziowych (SF, ang. *synovial fluids*) u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów. Stwierdzono, że stężenie ferrytyny w SF jest dużo wyższe niż w surowicy u pacjentów z RA oraz w SF u pacjentów chorych na zapalenie kości i stawów (OA, ang. *osteoarthritis*). Procent glikozylowanej ferrytyny w SF był niski w przypadku zarówno RA, jak i OA, natomiast w surowicy chorych na RA był znacznie wyższy [25].

Ferrytyna surowicy chorych na RA charakteryzuje się wysokim stopniem glikozylacji i złożona jest z podjednostek G i L, natomiast ferrytyna SF ma niski procent glikozylacji i składa się głównie z podjednostek L. Ta różnica w glikozylacji ferrytyny w SF i surowicy sugeruje, że większość ferrytyny w SF pochodzi nie z krwi, ale jest syntetyzowana lokalnie w zmienionym chorobowo stawie przez tkankę maziową. W RA mogło się jednak zdarzyć mieszanie ferrytyny surowicy z ferrytyną SF, bo w kilku przypadkach RA proporcja ferrytyny wiążącej Conavalinę-A (Con-A) w SF stanowiła ponad 20% i była wykryta podjednostka G. Te wyniki wskazują na możliwość występowania w RA wewnątrzstawowego krwawienia. Wynikiem sączenia się krwi z żył do jamy stawowej były złogi żelaza w tkance maziowej i duża liczba cząsteczek ferrytyny w komórkach maziowych, co obserwowano przy użyciu mikroskopu świetlnego i elektronowego. Innym możliwym wytłumaczeniem nieznacznego

podniesienia poziomu ferrytyny wiążącej Con-A w próbach RA SF jest zwiększona produkcja i uwalnianie glikozylowanej ferrytyny przez komórki maziowe.

Badano mechanizmy powodujące zwiększenie ilości nieglikozylowanej ferrytyny w SF u chorych na RA [25]. Stwierdzono, że kilka prozapalnych cytokin, szczególnie TNF- $\alpha$  bierze udział w zwiększeniu ilości mRNA dla podjednostki H ferrytyny, ale nie dla podjednostki L w ludzkich monocytach (linii U937). W przypadku RA poziomy prozapalnych cytokin w SF są podwyższone i mogą brać udział w podniesieniu poziomu ferrytyny SF. Z badań tych wynika, że w RA SF powinno być dużo ferrytyny bogatej w podjednostkę H, jednak obserwowano wzrost ilości ferrytyny bogatej w podjednostkę L. Tę rozbieżność można wytłumaczyć następująco: uważa się, że ferrytyna SF pochodzi z masowych nacieków makrofagów i komórek maziowych, które są rozpoznawane jako komórki makrofagopodobne. Ferrytyna w ludzkich monocytach jest bogata w podjednostkę H, ale pochodzące od nich makrofagi uzyskują przewagę podjednostki L podczas dojrzewania *in vitro*. To zjawisko jest związane głównie z utratą podjednostki H. Te wyniki wskazują, że żelazo z erytrocytów uwolnionych jako rezultat sączenia się krwi do jamy stawu dotkniętego chorobą może powodować powstawanie ferrytyny bogatej w podjednostkę L w mazi RA.

Nie wiadomo, jaka jest rola ferrytyny w patomechanizmie reumatoidalnego zapalenia stawów. Sformułowano hipotezę, że nadtlenek wodoru wydzielany z pobudzonych neutrofilów występujących w SF może powodować uwolnienie jonów żelaza z ferrytyny. Zgodnie z tą hipotezą jony żelaza katalizowałyby reakcje prowadzące do powstania rodnika hydroksylowego, który powoduje zapalne niszczenie tkanki [25]. U pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów stężenie ferrytyny surowicy jest skorelowane z MCV (ang. *mean corpuscular volume*), a także ze wskaźnikami ostrej fazy, jakimi są białko C-reaktywne i szybkość opadania erytrocytów, które świadczą o aktywności choroby. Widoczna jest natomiast odwrotna korelacja z TIBC (ang. *total iron binding capacity*) i TfR [30].

## 5. WARTOŚĆ DIAGNOSTYCZNA FERRYTYNY W PRZYPADKU CHOROBY STILLA O POCZĄTKU W WIEKU DOROSŁYM

Pod koniec lat 80. zaczęto sugerować, że podwyższony poziom ferrytyny surowicy może wskazywać na chorobę Stilla o początku w wieku dorosłym (AOSD, ang. *adult onset Still's disease*). Pierwszy przypadek choroby Stilla u dorosłych opisano w 1971 roku. Jest to jednostka chorobowa uważana za odpowiednik ustrojowego artretyzmu młodzieńczego opisanego przez Stilla. W wielu przypadkach AOSD jest trudna do zdiagnozowania, ponieważ niektóre jej formy mogą być podobne do infekcji, nowotworów i chorób reumatycznych. Pomyłka w diagnozie jest niebezpieczna, gdyż niektóre leki przeciwko AOSD, takie jak steroidy lub środki immunosupresyjne, mogą pogarszać przebieg tych chorób, szczególnie infekcyjnych.

U pacjentów z AOSD obserwuje się około 3-krotne podwyższenie poziomu ferrytyny surowicy w porównaniu z wartościami referencyjnymi. Natomiast średni poziom ferrytyny glikozylowanej wynosi  $15,9 \pm 11,9\%$  w porównaniu z  $31,5 \pm 18,7\%$  dla grupy kontrolnej [11]. Wzrost stężenia ferrytyny jest najprawdopodobniej



pochodzenia cytokininowego. U chorych na AOSD występuje silna reakcja ostrej fazy i dlatego poziom ferrytyny u tych pacjentów nie jest odzwierciedleniem ilości żelaza w ustroju. Średnie wysycenie ferrytyny żelazem wynosi 9,1%, podczas gdy wysycenie w grupie pacjentów kontrolnych około 17,8%. Wyniki pomiarów stężenia rozpuszczalnego receptora transferynowego pacjentów z AOSD wskazują na funkcjonalny niedobór żelaza. Przypuszcza się, że u chorych na AOSD ferrytyna traci zdolność magazynowania żelaza. Stwierdzono istnienie ujemnej korelacji między ferrytyną i wysyceniem ferrytyny żelazem ( $r = -0,71$ ,  $p = 0,02$ ) oraz między wysyceniem ferrytyny żelazem a stężeniem TfR ( $r = -0,62$ ,  $p = 0,1$ ) [29]. Najlepszym markerem diagnostycznym AOSD jest połączenie podwyższonego poziomu ferrytyny surowicy i obniżonej glikozylacji ferrytyny. Jednak oba te parametry z pominięciem innych objawów są niewystarczające do zdiagnozowania AOSD [11].

Ferrytyna razem z białkiem C-reaktywnym i białkiem amyloidowym surowicy krwi należy do dodatnich białek ostrej fazy, produkowanych prawdopodobnie przez wątrobę w odpowiedzi na czynniki prozapalne [33]. U pacjentów z AOSD bardzo wysoki poziom ferrytyny surowicy występuje w dysproporcji z niskim poziomem innych białek ostrej fazy. Zaobserwowano, że interferon- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ) spowodował hyperferrytynemię u trzech zdrowych osób, którym go podawano i na podstawie tej obserwacji postawiono hipotezę, że INF- $\alpha$  specyficznie stymuluje syntezę ferrytyny [2]. Indukcja syntezy ferrytyny przez INF- $\alpha$  związana jest ze znacznym spadkiem poziomu białka C-reaktywnego (CRP), co sugeruje specyficzną rolę INF- $\alpha$  w syntezie lub sekrecji ferrytyny. Ten mechanizm może być zaangażowany w powstanie hyperferrytynemii u chorych na AOSD. Cytokiny są uwalniane przez aktywowane monocyty i makrofagi. Wśród tych cytokin interleukina-6 (IL-6), czynnik martwicy nowotworu- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) i interleukina-1 (IL-1) są głównymi regulatorami produkcji białek ostrej fazy (APP, ang. *acute phase proteins*). U pacjentów leczonych TNF- $\alpha$  i IL-6 odnotowano znamienne współzależność między różnymi APP. Obserwowano wzrost stężeń białka C-reaktywnego i surowiczego amyloidu A, następnie wzrost poziomu ferrytyny surowicy, inhibitorów proteaz i składników układu dopełniacza. Sytuacja taka jest obserwowana w przypadku prawie wszystkich chorób reumatycznych z wyjątkiem AOSD. Na podstawie przedstawionych wyników badań można przypuszczać, że INF- $\alpha$  preferencyjnie stymuluje syntezę ferrytyny, jednak do tej pory nie przeprowadzono eksperymentów *in vitro*, które potwierdziłyby te wnioski. Możliwym czynnikiem, który wpływa na poziom APP, jest aktywność choroby, która może ulegać zmianie pod wpływem leczenia INF- $\alpha$ . Mechanizm prowadzący do wzrostu stężenia ferrytyny po podawaniu INF- $\alpha$  nie jest jasny. Ponieważ stężenia pozostałych APP nie wzrosły lub wzrosły tylko nieznacznie, udział ferrytyny w reakcji ostrej fazy nie jest prawdopodobny [31].

## 6. ZESPÓŁ DZIEDZICZNEJ ZAĆMY ZWIĄZANEJ Z HYPERFERRYTYNEMIA

Zaburzenie regulacji biosyntezy ferrytyny występuje również u osób z zespołem dziedzicznej zaćmy związanej z hyperferrytynemią (HHCS, ang. *hereditary*

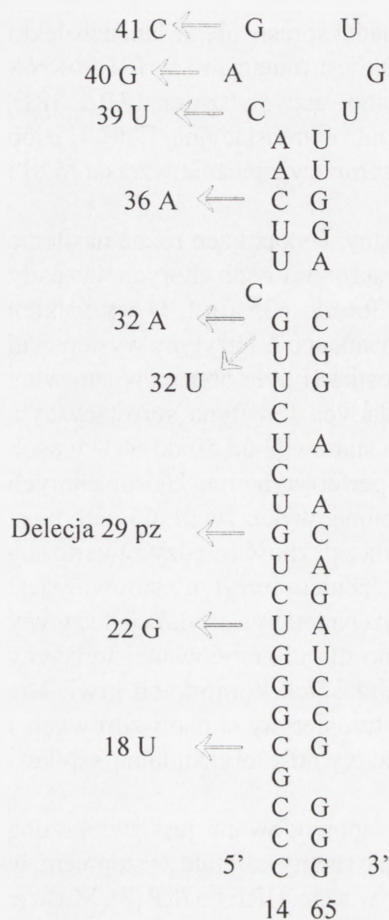
*hyperferritinemia cataract syndrome*), u których nadekspresji ulega łańcuch lekki ferrytyny [8]. Nadprodukcja ferrytyny spowodowana jest mutacjami w IRE mRNA podjednostki L [6,8,20,27] (ryc.), które redukują powinowactwo wiązania IRP do IRE, przez co uwalniają podjednostkę L ferrytyny spod kontroli translacyjnej [7,8]. U osób dotkniętych HHCS poziom podjednostki lekkiej w surowicy znacznie wzrasta [6,8] i wynosi 360–2264  $\mu\text{g/l}$  [27].

Cazzola M. i wsp. [7] poddał badaniu dwie rodziny, wykazujące różne nasilenie objawów HHCS. W rodzinie 1 poziomy ferrytyny w surowicy osób chorych wynosiły od 950 do 1890  $\mu\text{g/l}$ , natomiast w rodzinie 2 od 366 do 635  $\mu\text{g/l}$ . U wszystkich przebadanych osób zarówno zdrowych, jak i chorych łańcuch L ferrytyny występował w cząsteczkach tego białka w przewodzie (podjednostka H była obecna w surowicy krwi w ilości poniżej 30  $\mu\text{g/l}$ ). U wszystkich badanych ferrytyna surowicy była glikozylowana, przy czym glikozylowana ferrytyna stanowiła od 50 do 66% u osób zdrowych, natomiast od 31 do 55% u pacjentów z hyperferrytynemią. U osób chorych ilość ferrytyny typu H w komórkach była niezmienną, wykazywali oni natomiast podwyższoną zawartość ferrytyny typu L. Znamienna zależność między zawartością ferrytyny typu L w krwinkach jednojądrzastych i stężeniem ferrytyny surowicy jest dowodem na to, że za ferrytynemię jest odpowiedzialna nadmierna produkcja ferrytyny w tych komórkach. Podobna zależność odnotowano dla glikozylowanej ferrytyny surowicy i zawartości podjednostki L w jednojądrzastych komórkach krwi. Nie stwierdzono różnic w ilości krążącego receptora transferyny u osób zdrowych i dotkniętych HHCS. Wskazuje to na prawidłową aktywność erytroidalną szpiku i dostępność żelaza do erythropoezy u osób chorych.

Zaćma u pacjentów z HHCS prawdopodobnie spowodowana jest zwiększoną akumulacją ferrytyny w soczewkach oka [7]. Nasilenie zaćmy koreluje ze stopniem, w którym poszczególne mutacje obniżają powinowactwo wiązania IRE do IRP [8]. Mutacje górnej pętli lub wybruszenia związane są z wyższymi poziomami ferrytyny surowicy niż mutacje w niższej części struktury IRE [6]. Pomimo znacznie podwyższonych poziomów podjednostki L we krwi i tkankach, pacjenci nie mają znacznie zmienionego metabolizmu żelaza. Najprawdopodobniej dzieje się tak dlatego, że powstające homopolimery podjednostek L ferrytyny, są niefunkcjonalne i nie zawierają żelaza [27].

W związku z nasiloną biosyntezą ferrytyny u pacjentów z HHCS przeprowadzono badania ekspresji ferrytyny w soczewkach [8]. Dokonano dwóch interesujących odkryć. Pierwsze z nich to wysoki poziom mRNA L-ferrytyny wykryty w normalnych soczewkach człowieka, przy niskiej ekspresji ferrytyny wynoszącej tylko 0,01% białka całkowitego [18]. Możliwych jest kilka wyjaśnień tej dysproporcji, np. wysoki poziom translacji ferrytyny jest równoważony przez jej szybką degradację. Wydaje się to jednak bardzo nieprawdopodobne w soczewkach, które mają ekstremalnie długo żyjące białka i bardzo powolną degradację białek. Alternatywnym wyjaśnieniem jest fakt, że soczewki utrzymują dużą pulę mRNA L-ferrytynowego, który może ulec ekspresji w momencie pojawienia się żelaza. Wysokie poziomy tego mRNA w soczewkach mogą być związane z mechanizmem ochrony soczewek przed zniszczeniem oksydacyjnym [41]. Możliwe też, że mRNA L-ferrytyny nie służy tylko jako matryca do translacji tego białka, ale może mieć inną, jeszcze nie rozpoznaną funkcję w soczewkach.





RYCINA. Struktura IRE podjednostki L ferrytyny i mutacje wykryte u rodzin z HHCS, liczby 18, 22, 32, 36, 39, 40 i 41 wskazują na pozycję reszty nukleotydowej, która ulega mutacji (na podstawie [24])

Drugim interesującym faktem, który ujawniły badania ekspresji ferrytyny w soczewkach jest wzrost ilości mRNA L-ferrytyny w soczewkach świnek morskich z dziedziczną zaćmą. Dziedziczna zaćma u świnek morskich oraz ludzka zaćma starcza, jest związana ze stresem oksydacyjnym, a ferrytyna jest ważnym czynnikiem kontrolowania tego stresu.

Jedna z hipotez tłumaczących rolę ferrytyny w patologii HHCS mówi, że zwiększona ilość tego białka w soczewkach pacjentów destabilizuje inne białka, powodując uszkodzenie normalnej organizacji białek i prowadzi do zmętnienia soczewki. Inna możliwość to zaburzenie kontroli poziomów żelaza w soczewkach, które prowadzi do zniszczenia oksydacyjnego i ostatecznie do zaćmy. Wysokie poziomy mRNA L-ferrytyny w ludzkich soczewkach mogą wskazywać na konieczność szybszej regulacji poziomów żelaza w jej tkance w porównaniu z innymi tkankami [8].

## 7. PODSUMOWANIE

Utrzymanie homeostazy żelaza jest bardzo istotne dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Wynika to z faktu, że z jednej strony pierwiastek ten jest niezbędny do biologicznej aktywności wielu istotnych białek komórkowych, z drugiej natomiast jako metal przejściowy może katalizować reakcje prowadzące do powstania wolnych rodników. W celu zapewnienia biodostępności tego żelaza i

ograniczenia jego toksyczności organizmy wykształciły złożony aparat pobierania, transportowania, magazynowania, jak i regulacji stężenia wolnych jonów żelaza. Jednym z ważnych składników tego systemu jest ferrytyna, której ekspresja jest ściśle regulowana na etapie zarówno transkrypcji, jak i translacji.

Nieprawidłowe stężenie ferrytyny, stopień glikozylacji lub zawartość jonów żelaza wskazują na obecność różnych stanów chorobowych, takich jak: choroby proliferacyjne (nowotwory), stany niedoborowe (anemie), choroby reumatyczne (RA, AOSD). Wyłączenie spod kontroli translacyjnej podjednostki lekkiej ferrytyny może powodować zaćmę. Ferrytyna zapewne nie może służyć jako specyficzny marker przypisany jednej, konkretnej jednostce chorobowej. Jest natomiast cennym, dodatkowym wskaźnikiem

świadczącym, w zależności od obecności innych objawów, o ilości żelaza w organizmie oraz o aktywności lub zaawansowaniu różnych chorób.

## LITERATURA

- [1] ANDREWS NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med* 1999; **341**: 1986–1995.
- [2] BAYNES RD, BEZWODA WR, DAJEE D, LAMPARELLI RD, BOTHWELL TH. Effects of alpha-interferon on iron-related measurements in human subjects. *S Afr Med J* 1990; **78**: 627–628.
- [3] BEAUMONT C, SEYHAN A, YACHOU AK, GRANDCHAMP B, JONES R. Mouse ferritin H subunit gene. *J Biol Chem* 1994; **269**: 20281–20288.
- [4] BRZOZOWSKI R [red.] *Vademecum lekarza praktyka*. Warszawa, PZWL 2001: 1213–1214.
- [5] BULTNIK IEM, LEMS WF, VAN DE STADT RJ. Ferritin and serum transferrin receptor predict iron deficiency in anemic patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis rheum* 2001; **44**: 978–983.
- [6] CAMASCHELLA C, ZECCHINA G, LOCKITCH G, ROETTO A, CAMPANELLA A, AROSIO P, LEVI S. A new mutation (G51C) in the iron-responsive element (IRE) of L-ferritin associated with hyperferritinemia-cataract syndrome decreases the binding affinity of the mutated IRE for iron-regulatory proteins. *Br J Haematol* 2000; **108**: 480–482.
- [7] CAZZOLA M, BERGAMASHI G, TONON L, ARBUSTINI E, GRASSO M, VERCESI E, BAROSI G, BIANCHI PE, CAIRO G, AROSIO P. Hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome: relationship between phenotypes and specific mutations in the iron-responsive element of ferritin light-chain mRNA. *Blood* 1997; **90**: 814–82145.
- [8] CHENG Q, GONZALEZ P, ZIGLER JS. High level of ferritin light chain mRNA in lens. *Biochim Biophys Res Com* 2000; **270**: 349–355.
- [9] CORSI B, COZZI A, AROSIO P, DRYSDALE J, SANTAMBROGIO P, CAMPANELLA A, BIASIOTTO G, ALBERTINI A, LEVI S. Human mitochondrial ferritin expressed in HeLa cells incorporates iron and affects cellular iron metabolism. *J Biol Chem* 2002; **277**: 22430–22437.
- [10] EISENSTEIN RS, BARTON HA, PETTINGELL WH, BOMFORD AB. Isolation, characterization, and functional studies of rat liver iron regulatory protein 1. *Arch Biochem Biophys* 1997; **343**: 81–91.
- [11] FAUTREL B, LE MOEL G, SAINT-MARCOUX B, TAUPIN P, VIGNES S, ROZENBERG S, KOEGER AC, MAYER O, GUILLEVIN L, PIETTE JC, BOURGEOIS P. Diagnostic value of ferritin and glycosylated ferritin in adult onset Still's disease. *J Rheumatol* 2001; **28**: 322–329.
- [12] FLOWERS CH, COOK JD. Dried plasma spot measurements of ferritin and transferrin receptor for assessing iron status. *Clin Chem* 1999; **45**: 1826–1832.
- [13] GUMUŁKA WS, REWERSKI W. *Encyklopedia zdrowia*. Warszawa, PWN 1992: 849–863, 1315–1331.
- [14] GUO B, BROWN FM, PHILIPS JD, YU Y, LEIBOLD EA. Characterization and expression of iron regulatory protein 2 (IRP2). *J Biol Chem* 1995; **270**: 16529–16535.
- [15] HARRISON PM, AROSIO P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* 1996; **31**: 161–203.
- [16] KIM S, PONKA P. Nitrogen monoxide-mediated control of ferritin synthesis: implication for macrophage iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 12214–12219.
- [17] LEHMANN P. Anaemia: a major medical problem in the world. *Eur Clin Lab* 2001; **20**: 26–30.
- [18] 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* 1998; **91**: 4180–4187.
- [19] LEVI S, CORSI B, BOSISIO M, INVERNIZZI R, VOLZ A, SANFORD D, AROSIO P, DRYSDALE J. A human mitochondrial ferritin encoded by an intronless gene. *J Biol Chem* 2001; **270**: 24437–24440.
- [20] MARTIN ME, FARGION S, BRISSOT P, PELLAT B, BEAUMONT C. A point mutation in the bulge of the iron-responsive element of the L ferritin gene in two families with the hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome. *Blood* 1998; **91**: 319–323.
- [21] MOROZ C, KUPFER B, TWIG S, PARHAMI-SEREN B. Preparation and characterization of monoclonal antibodies specific to placenta ferritin. *Clin Chim Acta* 1985; **148**(2): 111–118.
- [22] MOROZ C, TRAUB L, MAYON R, ZAHALKA M. PLIF, a novel human ferritin subunits from placenta with immunosuppressive activity. *J Biol Chem* 2002; **277**: 12901–12905.



- [23] 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* 1998; **2**: 383–388.
- [24] OLIVARES M, WALTER T, COOK JD, HERTRAMPF E, PIZARRO F. Usefulness of serum transferrin receptor and serum ferritin in diagnosis of iron deficiency in infancy. *Am J Clin Nutr* 2000; **72**: 1191–1195.
- [25] OTA T, KATSUKI I. Ferritin subunits in sera and synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1998; **25**: 2315–2318.
- [26] PIETSCH EC, CHAN JY, TORTI FM, TORTY SV. Nrf2 mediates the induction of ferritin H in response to xenobiotics and cancer chemopreventive dithiolethiones. *J Biol Chem* 2003; **278**: 2361–2369.
- [27] ROSOCHOVA J, KAPETANIOS A, POURNARAS C, VADAS L, SAMII K, BERIS P. Hereditary hyperferritinemia cataract syndrome: does it exist in Switzerland. *Schweiz Med Wochenschr* 2000; **130**: 324–328.
- [28] SAMANIEGO F, CHIN J, IWAI K, ROUAULD TA, KLAUSNER RD. Molecular characterization of a second iron-responsive element binding protein, iron regulatory protein 2. *J Biol Chem* 1994; **269**: 30904–30910.
- [29] SMÓL J, ASTRIAB M, DUDZIŃSKA B, TWARDOWSKI T. Stress conditions applied to the interpretation of translation machinery. *Acta Biol Hungarica* 2001; **51**(1): 161–170.
- [30] SONG JS, PARK W, BAE SK, KIM SS, LEE YH, CHOI JW, KIM SK. The usefulness of serum transferrin receptor and ferritin for assessing anemia in rheumatoid arthritis: comparison with bone marrow iron study. *Rheumatol Int* 2001; **21**: 24–29.
- [31] STAM TC, SWAAK AJG, EGGERMONT AMM. Regulation of ferritin: a specific role for interferon-alpha (IFN- $\alpha$ )? The acute phase response in patients treated with IFN- $\alpha$ -2b. *Eur J Clin Invest* 2002; **32**: 79–83.
- [32] SUOMINEN P, MOTTONEN T, RAJAMAKI A, IRJALA K. Single values of serum transferrin receptor and transferrin receptor ferritin index can be used to detect true and functional iron deficiency in rheumatoid arthritis patients with anemia. *Arthritis Rheum* 2000; **43**: 1016–1020.
- [33] TEN KATE I, DRENTH JPH, KAHN MF, VAN DEURSEN C. Iron saturation of serum ferritin in patients with adult onset Still's disease. *J Rheumatol* 2001; **28**: 2213–2215.
- [34] TSUJI Y, AKEBI N., LAM TK, NAKABEPPU Y, TORTI SV, TORTI FM. FER-1, an enhancer of the ferritin H gene and a target of E1A-mediated transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 5152–5164.
- [35] TSUJI Y, AYAKI H, WHITMAN SP, MORROW CS, TORTI SV, TORTI FM. Coordinate transcriptional and translational regulation of ferritin in response to oxidative stress. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 5818–5827.
- [36] TSUJI Y, KWAK E, SAIKA T, TORTI SV, TORTI FM. Preferential repression of the H subunit of ferritin by adenovirus E1A in NIH-3T3 mouse fibroblasts. *J Biol Chem* 1993; **268**: 7270–7275.
- [37] TSUJI Y, MORAN E, TORTI SV, TORTI FM. Transcriptional regulation of the mouse ferritin H gene. *J Biol Chem* 1999; **274**: 7501–7507.
- [38] WALTER T, OLIVERES M, PIZARRO F, MUNOZ C. Clinical consequences of new insights in the pathophysiology of disorders of iron and heme metabolism. *Hematology* 2000; 39–50.
- [39] WU CG, GROENINK M, BOSMA A, REITSMA PH, VAN DEVENTER SJH, CHAMULEAU RAFM. Rat ferritin-H: cDNA cloning, differential expression and localization during hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 1997; **18**: 47–52.
- [40] WU KJ, POLACK A, DALLA-FAVERA R. Coordinated regulation of iron-controlling genes, H-ferritin and IRP2, by c-MYC. *Science* 1999; **283**: 676–679.
- [41] ZIGLER JS, JR., LUCAS VA, DU X. Rhesus monkey lens as an *in vitro* model for studying oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; **30**: 2195–2199.

Redaktor prowadzący – J. Żeromski

Otrzymano: 01.09.2003 r.

Przyjęto: 01.10.2003 r.

ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań

e-mail: jperla@ibch.pl

## RECEPTOR NKG2D I JEGO LIGANDY

### NKG2D RECEPTOR AND ITS LIGANDS

Piotr MRÓWKA, Jakub GOŁĄB

Zakład Immunologii, Centrum Biostruktury, AM w Warszawie

*Streszczenie:* Komórki efektorowe układu immunologicznego są w stanie rozpoznawać komórki zakażone, transformowane i jak się niedawno okazało, komórki poddane różnego rodzaju stresom. Jednym ze sposobów rozpoznawania tych ostatnich jest identyfikacja indukowanych stresem cząsteczek powierzchniowych. Najlepiej poznanym receptorem uczestniczącym w tego typu reakcjach jest receptor lektynowy typu C o nazwie NKG2D obecny na komórkach NK, limfocytach  $T\gamma\delta$ ,  $CD8^+$  limfocytach  $T\alpha\beta$  oraz makrofagach. Opisano 4 rodziny ligandów dla NKG2D. Są to ludzkie cząsteczki MIC A i B (niekiedy określane również jako MICA i MICB) oraz ULBP, a także mysie RAE-1 i H60. Cząsteczki te nie wykazują bliskiego pokrewieństwa, choć wszystkie można określić mianem nieklasycznych białek MHC klasy I. Wszystkie z wyjątkiem ULBP, którego regulacja ekspresji jest bardziej skomplikowana i niedostatecznie poznana, pojawiają się w dużych ilościach na komórkach uszkodzonych stresem (np. cieplnym lub oksydacyjnym), zakażonych i transformowanych. Rozpoznanie ich przez receptor NKG2D prowadzi do przekazania sygnału kostymulującego lub aktywacji komórek układu odpornościowego i reakcji cytotoksycznej. Zjawiska związane z funkcjonowaniem indukowanych ligandów receptorów aktywujących komórki układu immunologicznego stanowią potencjalnie podstawę dla nowych rozwiązań w immunoterapii nowotworów.

*Słowa kluczowe:* NKG2D, MIC, ULBP, komórki NK.

*Summary:* Effector cells of the immune system can recognize infected, transformed or as recently demonstrated, stressed cells. The recognition of the latter is based on the detection of cell surface molecules induced by cellular stress. The best known receptor for the recognition of these molecules is a C-type lectin – NKG2D expressed by NK cells,  $T\gamma\delta$ ,  $CD8^+$   $T\alpha\beta$  cells, and macrophages. There are 4 families of ligands for NKG2D. These are human MIC A and B molecules, ULBP and murine RAE-1 and H60. Although there is little homology between these molecules, they are all classified as nonclassical MHC class I molecules. All but ULBP, the regulation of which is unknown and seems to be the most complex, are expressed on the surface of stressed (e.g. heat or oxidative stress), infected and transformed cells. NKG2D-mediated recognition of these cells leads to co-stimulation or to the activation of the immune cells and the cytotoxic reaction towards target cells. Better understanding of the functions of stress-induced ligands for activating NKG2D receptors might potentially be exploited for new cancer immunotherapy strategies.

*Key words:* NKG2D, MIC, ULBP, NK cells.



W żywym organizmie często dochodzi do zabijania własnych komórek. Eliminowane są komórki zbędne, uszkodzone i zmienione – komórki, które uległy transformacji nowotworowej lub zakażeniu wirusowemu – stanowiące potencjalne zagrożenie. Nieprawidłowości w profilu lub budowie i ekspresji białek, a co za tym idzie w funkcjonowaniu komórki, prezentowane są w kontekście cząsteczek MHC I. Rozpoznanie obcych (wirusowych), zmutowanych lub ulegających ekspresji w nieodpowiedniej fazie rozwoju białek przez limfocyty T prowadzi do zniszczenia takich komórek. Wiele wirusów unika wykrycia przez hamowanie ekspresji cząsteczek MHC. Podobną strategię stosują niekiedy komórki nowotworowe. Metoda ta nie jest jednak całkowicie skuteczna, bowiem obniżona ilość MHC na powierzchni komórki jest sygnałem aktywującym cytotoksyczność komórek NK. Innym elementem kontroli prawidłowego funkcjonowania komórek organizmu jest stosunkowo niedawno odkryty system „znakowania” komórek, które uległy stresowi, transformacji lub zakażeniu wirusowemu. Na ich powierzchni u ludzi pojawiają się cząsteczki MIC A i B (*major histocompatibility complex (MHC) class-I related molecules*) oraz ULBP (*UL-16 binding proteins*) [1]. U myszy analogiczną rolę pełnią RAE-1 (*retinoic acid early inducible transcript 1*) i białko H60 (*minor histocompatibility antigen*). Konstytutywna obecność tych molekuł jest charakterystyczna dla znacznej liczby nowotworów. Cząsteczki te są ligandami dla NKG2D – aktywującego receptora limfocytów NK, limfocytów  $T\gamma\delta$ ,  $CD8^+$  limfocytów  $T\alpha\beta$  i makrofagów [2, 3]. W wyniku związania NKG2D z ligandami (NKG2DL) komórka NK jest aktywowana i uruchamia mechanizmy reakcji cytotoksycznej, w efekcie czego nieprawidłowa komórka ginie [4, 5].

## BUDOWA NKG2D

NKG2D jest lektynowym receptorem typu C, którego obecność opisano na komórkach NK, limfocytach  $T\gamma\delta$ ,  $CD8^+$ , limfocytach  $T\alpha\beta$  oraz makrofagach. Jest to jedyny aktywujący receptor komórek NK, dla którego udało się zidentyfikować konkretne ligandy. Wydaje się on mieć zasadnicze znaczenie w funkcjonowaniu tych komórek [3, 6, 7].

Gen kodujący NKG2D znajduje się u człowieka w chromosomie 12 w obrębie tzw. kompleksu NK [8], który u myszy znajduje się w chromosomie 6 [9]. Produkt tego genu znacznie różni się jednak od pozostałych genów rodziny *Nkg2*, wobec których wykazuje zaledwie 24,5% homologii w sekwencji aminokwasów. Krystalografia ukazała zadziwiające podobieństwo strukturalne NKG2D do budowy innych cząsteczek rodziny lektyn typu C, mimo znacznych rozbieżności w składzie aminokwasowym [10, 11]. W odróżnieniu od pozostałych przedstawicieli rodziny NKG2, receptor ten nie tworzy dimerów z cząsteczką CD94. Występuje w postaci homodimerów, w których monomeryczne podjednostki połączone są mostkami dwusiarczkowymi [3, 6]. Ponieważ nie ma on w części wewnątrzcytoplazmatycznej sekwencji warunkującej bezpośrednie przekazanie sygnału, musi tworzyć kompleks z dodatkową cząsteczką adaptorową. Za jej wiązanie odpowiedzialne są naładowane dodatnio reszty aminokwasowe domeny transbłonowej receptora [12].

Przekazywanie sygnału odbieranego przez receptor NKG2D wymaga obecności cząsteczki adaptorowej. Domena transbłonowa receptora łączy się z towarzyszącą molekułą dzięki oddziaływaniom zjonizowanych i polarnych reszt aminokwasowych obu białek [12]. Receptory aktywujące komórek układu immunologicznego wykorzystują w roli adaptorów polipeptydy zawierające tak zwaną sekwencję ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), takie jak: CD3 $\zeta$  przekazujące sygnały z TCR, łańcuchy Ig $\alpha$  (CD79a) i Ig $\beta$  (CD79b) uczestniczące w przekazywaniu sygnałów przez immunoglobuliny powierzchniowe, czy KARAP (*killer cell-activating receptor-associated polypeptide*, nazywany również DAP12), związany między innymi z NKG2D [6, 14]. Odebranie sygnału przez receptor wiąże się z aktywacją kinaz tyrozynowych z rodziny Src, które fosforylują reszty tyrozynowe cząsteczki adaptorowej w obrębie ITAM. Fosforylacja sekwencji ITAM stwarza miejsca wiązania dla kinaz z rodziny Syk (takich jak Syk, ZAP-70), powoduje ich aktywację i umożliwia dalsze przekazanie sygnału.

Pełna aktywacja komórki często wymaga sygnałów z receptora kostymulującego, takiego jak: CD19 (w wypadku limfocytów B) czy CD28 (w limfocytach T). Wśród cząsteczek łączących się z tego typu receptorami brak jest molekuł zawierających motywy ITAM. Charakterystyczna jest dla nich natomiast wewnątrzcytoplazmatyczna sekwencja YxxM, której fosforylacja prowadzi do ściągnięcia i aktywacji kinaz lipidowych z rodziny kinazy fosfatydyloinozytolowej 3 (PI3K) i Grb2 odpowiedzialnych za dalszą transmisję sygnału. Adaptorem mającym sekwencję YxxM związanym z receptorem NKG2D jest białko DAP10 [13].

W wyniku alternatywnego cięcia i składania pierwotnego transkrypty powstają dwie formy receptora NKG2D, które selektywnie łączą się z różnymi cząstkami adaptorowymi. Izoformy te różnią się N-końcem łańcucha polipeptydowego, stanowiącym domenę cytoplazmatyczną białka, na którym jedna z nich zawiera dodatkowy trzynastoaminokwasowy fragment (MALIRDRKSHHSE). Jest to wynikiem obecności dodatkowego kodonu AUG w mRNA dłuższej formy. Różnica ta wydaje się być przyczyną odmiennej preferencji izoform NKG2D w tworzeniu kompleksów z adaptorami [13]. Forma krótsza (określana jako NKG2D-S) wiąże się zarówno z DAP10, jak i KARAP, natomiast dłuższa (NKG2D-L) wysoce selektywnie łączy się z DAP10 [13, 15].

Soczynkowe komórki NK zawierają duże ilości dłuższej formy receptora i prawie niewykrywalne ilości formy krótszej. NKG2D-S indukowane są w momencie aktywacji komórek. Natomiast nieaktywowane limfocyty T CD8<sup>+</sup> i makrofagi nie wytwarzają żadnej z tych izoform. Pobudzenie TCR limfocytów indukuje ekspresję obu wariantów receptora. Makrofagi stymulowane na przykład lipopolisacharydem (LPS), wytwarzają głównie NKG2D-S i nieznaczne ilości NKG2D-L.

Wydaje się, że NKG2D działa jako receptor zdolny aktywować i indukować reakcję cytotoksyczną komórek NK i makrofagów, natomiast dla limfocytów T CD8<sup>+</sup> jest tylko receptorem kostymulującym. W pewnych warunkach może nastąpić wzrost ekspresji KARAP w limfocytach T CD8<sup>+</sup> i zachowują się one wtedy jak komórki NK eliminując transformowane i zakażone komórki mające ligandy NKG2D na swej powierzchni, mimo braku antygenów rozpoznawanych przez TCR [13].



Liczba cząsteczek NKG2D na powierzchni komórki jest regulowana przez bodźce wewnętrzne i zewnętrzne. Do wewnętrznych należy, prawdopodobnie genetycznie uwarunkowana, gęstość receptorów, która ustala się w pierwszym okresie rozwoju i pozostaje na niezmiennym poziomie do starości. Do czynników wewnętrznych zalicza się również wpływ na ekspresje receptora cząsteczek adaptorowych tworzących z nim kompleks przekazujący sygnały, których spadek zawartości w komórce obniża poziom NKG2D. Do czynników zewnętrznych zaliczymy sytuacje pobudzenia układu immunologicznego, w czasie którego następuje wzrost wytwarzania NKG2D. Ekspresja NKG2D zarówno u ludzi jak i u myszy jest konstytutywna w komórkach NK i jedynie w niewielkim stopniu wydaje się podlegać regulacji przez stymulacje cytokinami, takimi jak IL-12, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha/\beta$  czy IL-2 [16]. Ludzkie limfocyty T CD8<sup>+</sup> w przeciwieństwie do mysich wytwarzają stale NKG2D. Mysie muszą zostać aktywowane przez TCR [2, 17]. W wielu limfocytach T $\gamma\delta$  ekspresja NKG2D zachodzi konstytutywnie. U myszy jest ona jednak ograniczona do komórek CD44<sup>+</sup> [2, 10]. Makrofagi zdolne są do ekspresji NKG2D dopiero po stymulacji przez LPS, IFN- $\gamma$  lub IFN- $\alpha/\beta$  [16].

## LIGANDY MIC A/B

Cząsteczki MIC są glikoproteinowymi ligandami dla receptora NKG2D, których ekspresja jest indukowana stresem komórkowym [2]. Geny kodujące MIC A i B leżą w pobliżu HLA-B [10]. Wykazują one bardzo silny polimorfizm, co wydaje się wpływać na powinowactwo do receptora NKG2D [18]. Znane są 54 odmiany alleliczne genu MIC A i 16 odmian genu dla MIC B [19]. Allel MIC A 009 jest odpowiedzialny za chorobę Behçeta [18]. Odkryto w populacji ludzkiej obecność haplotypu charakteryzującego się rozległą delecją w obrębie genów MIC, powodującą brak ekspresji obu form. Interesujące jest, że homozygoty pod względem tej aberracji nie wykazują, jak się wydaje, żadnych nieprawidłowości w funkcjonowaniu układu odpornościowego [18]. Porównanie cDNA genów małpich leżących w loci odpowiadających położeniu genów MIC A i B ujawniło wyjątkowe podobieństwo sekwencji miejsca wiązania z receptorem [20].

Struktura cząsteczek MIC jest podobna do białek MHC klasy I. Składają się z N-końcowego fragmentu zewnątrzkomórkowego, krótkiego fragmentu hydrofobowego kotwiczącego w błonie i krótkiego fragmentu hydrofilnego, wewnątrzkomórkowego. W budowie części zewnątrzkomórkowej wyróżnia się trzy domeny:  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  tworzące strukturę rowka analogiczną do MHC I oraz domenę  $\alpha 3$ , leżącą najbliżej powierzchni błony. W przeciwieństwie do klasycznych MHC I, MIC A/B nie wiążą peptydów i nie biorą udziału w prezentacji antygenów komórkowych. Nie asocjują także z  $\beta_2$ -mikroglobuliną. Limfocyty T $\gamma\delta$  rozpoznają MIC także w tych komórkach, które nie mają funkcjonujących TAP i  $\beta_2$ -mikroglobuliny [18, 21].

Badania krystalograficzne kompleksu NKG2D/MIC A ujawniły ścisłą analogię tej struktury do obserwowanej podczas wiązania TCR i MHC I. Homodimer NKG2D łączy się z komplementarnymi dużymi powierzchniami  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  monomeru MIC. Ponadto w porównaniach struktury MIC A wolnego i związanego przez receptor widać znaczne różnice zarówno w ukształtowaniu miejsca wiązania, jak i orientacji poszczególnych domen. Uważa się, że MIC mają zdolność dopasowywania swej konformacji w znacznym stopniu do kształtu receptora. Wyjaśnia to w pewnym sensie możliwość istnienia znacznej liczby funkcjonujących odmian allelicznych tych białek [3, 22, 23]. Miejsce wiązania jest silnie zachowane ewolucyjnie w receptorze i wykazuje wysoką homologię do podobnej struktury (dwie  $\alpha$ -helisy) innych lektynowych receptorów [3]. Analizy kinetyczne interakcji receptor/ligand wykazały, że wiązanie między NKG2D i MIC A może być (zależnie od odmiany allelicznej MIC A) silniejsze i bardziej stabilne niż tworzone przez TCR i inne receptory komórek NK oraz limfocytów z ich ligandami [23].

## EKSPRESJA MIC

Zdrowe komórki nie wytwarzają MIC na swej powierzchni. Wyjątkiem jest nabłonek przewodu pokarmowego. Promotory genów MIC A i B zawierają elementy podobne do promotora białek szoku cieplnego HSP70. Tłumaczy się tym wzrost ilości mRNA białek MIC w komórkach HeLa poddanych działaniu podwyższonej temperatury [10, 24].

Transformacja nowotworowa jest jedną z obserwowanych przyczyn zwiększenia ekspresji cząsteczek MIC. Najczęściej zjawisko to występuje w nowotworach pochodzenia nabłonkowego w tym w rakach piersi, jajnika, okrężnicy, nerek i płuc [7, 25]. W badaniach ekspresji ligandów NKG2D u pacjentów z białaczką w 56% przebadanych przypadków komórki nowotworowe miały jeden lub więcej ligandów dla NKG2D. W żadnym z nich zdrowe komórki pacjenta nie wykazywały ekspresji ich [26]. Brak jest korelacji między ekspresją MHC I i ekspresją ligandów NKG2D [26].

Zaobserwowano, że zakażenie fibroblastów i komórek nabłonka ludzkim cytomegalowirusem (HCMV) skutkuje zwiększoną ekspresją MIC. Podobny wzrost obserwuje się badając próbki pobrane od chorych na zapalenie płuc wywołane tym wirusem [17].

## ANALOGI MIC

Znane są cztery grupy białek stanowiących ligandy dla receptora NKG2D. Poza cząsteczkami MIC A/B wyróżniamy grupy ULBP, RAE-1, H-60.

Na ludzkich komórkach występują białka ULBP (17, 25, 26). Ich budowa wykazuje podobieństwo do cząsteczek MHC klasy I. W odróżnieniu od nich ULBP mają jednak jedynie domeny  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$ . W błonie zakotwiczone są dzięki wiązaniu glikozylofosfatydyloinozytolu (GPI). Poszczególne odmiany ULBP są identyczne w 55-60% swych sekwencji aminokwasowych. Wykazują niską homologię względem



pozostałych cząsteczek rodziny MHC I. ULBP (*UL16 binding protein*) swą nazwę zawdzięcza powinowactwu do glikoproteiny kodowanej przez cytomegalowirusa (CMV). W efekcie związania cząsteczki wirusowej ULBP traci zdolność stymulacji receptora NKG2D. Podobną właściwość wykazują białka MIC B. Jest to prawdopodobnie sposób ochrony komórki zakażonej przez wirusa przed lizą. Białka MIC A i ULBP 3 nie wiążą się z UL16 [1, 28].

ULBP w odróżnieniu od MIC występują na komórkach wielu zdrowych tkanek. Stwierdzono obecność mRNA ULBP między innymi w komórkach serca, mózgu, płuc, wątroby, jąder, węzłów limfatycznych, grasicy, migdałków i szpiku, a także tkankach zarodków. Badania *in vitro* z użyciem przeciwciał monoklonalnych linii nowotworowych pokazują jednak, iż obecność mRNA nie jest równoznaczna z obecnością cząsteczek na powierzchni komórek [1]. Regulacja ekspresji ULBP nie jest jeszcze dostatecznie poznana i wymaga dalszych badań. Obserwowano wzrost ich gęstości w nowotworach żołądka i okrężnicy. Co ciekawe, w komórkach nowotworu nerki obserwowano spadek ich ekspresji [1].

U myszy, które nie mają homologów cząstek MIC, podobną rolę pełnią strukturalnie związane z ULBP rodziny białek RAE-1 i H-60. Ich ekspresja jest indukowana przez stres i karcynogeny. Ich obecność stymuluje aktywność limfocytów T $\gamma\delta$ , komórek NK oraz makrofagów [16]. Komórki transdukowane RAE-1 w doświadczeniach *in vivo* były eliminowane przez limfocyty T CD8<sup>+</sup> i komórki NK, a ich podanie wywoływało odporność przeciw linii macierzystej [18, 29]. Usytuowanie w genomie mysim genów *Rae-1* i *H-60* w chromosomie 10 odpowiada położeniu ludzkich ULBP (chromosom 6) co może być podstawą do wnioskowania o funkcjonalnej analogii tych białek i ich wspólnym pochodzeniu [1, 10].

Rodzina RAE-1 obejmuje 4 białka (RAE-1 $\alpha$ - $\delta$ ) kodowane przez oddzielne geny (*Rae-1* $\alpha$ - $\delta$ ). Podobnie jak ULBP kotwiczą w błonie przez wiązanie do GPI. Występują one na niskim poziomie ekspresji w czasie życia płodowego. Ich mRNA jest wykrywalne w embrionie myszy w dziewiątym dniu ciąży, a w dniach 10–14 utrzymuje się w części głowowej. Sugeruje to rolę RAE-1 w rozwoju zarodkowym [10]. U dorosłych osobników nie występują. Pojawiają się często na komórkach w wyniku transformacji nowotworowych.

Białko H-60 jest kodowane przez jeden gen. Początkowo sądzono, że jego jedyną rolą jest dostarczanie peptydu LYL8 znajdującego się na N-końcu cząsteczki, który może być załadowany do H-2K<sup>b</sup> i służyć jako słaby antygen zgodności tkankowej rozpoznawany przez specyficzne limfocyty T cytotoksyczne [18]. Później odkryto, że jest on również ligandem dla receptora NKG2D. Jego ekspresji nie wykryto w tkankach pochodzących od dorosłych osobników. Wyjątek stanowią tymocyty myszy BALB/c oraz limfoblasty stymulowane konkanawaliną A i LPS. Nie zaobserwowano wiązania H60 z GPI, co sugeruje, iż w odróżnieniu od RAE-1 może być to cząsteczka mająca transbłonową domenę kotwiczącą [10]. H-60 25 razy silniej wiąże się z NKG2D niż RAE-1 [30].

## ROZPUSZCZALNE LIGANDY DLA NKG2D – CZĄSTECZKI sMIC

Wiele nowotworów, szczególnie pochodzenia nabłonkowego spontanicznie uwalnia ze swojej powierzchni rozpuszczalne formy cząsteczek MIC (*soluble MIC*, sMIC). Tworzone są one przez odcięcie domeny transbłonowej i zbudowane są z trzech domen zewnątrzkomórkowych. Wykazano, że inhibitory metaloproteinaz blokują uwalnianie sMIC, prowadząc do kumulacji cząsteczek MIC na powierzchni komórek. Co ciekawe, brak jest korelacji między wielkością powierzchniowej puli MIC a uwalnianą ilością sMIC [26, 31]. Wynika z tego, że o stężeniu sMIC w organizmie decyduje zarówno ekspresja MIC, jak i aktywność metaloproteinaz.

Uwalnianie rozpuszczalnych form cząsteczek powierzchniowych ma wielokierunkowe działanie. Redukując liczbę ligandów na powierzchni komórki zmniejsza szansę na rozpoznanie jej jako nieprawidłowej [31]. Znajdujące się w przestrzeni międzykomórkowej rozpuszczalne formy MIC blokują receptory komórek efektorowych układu immunologicznego, dodatkowo powodując prawdopodobnie bezproduktywne wykorzystanie elementów związanych z mechanizmami cytotoksyczności, co może zmniejszać efektywność ich działania. Wysokie stężenie sMIC i wysycenie receptorów komórek efektorowych powoduje obniżenie liczby NKG2D na powierzchni limfocytów i makrofagów [32]. Jest to naturalna ochrona organizmu przed nadmierną, niekontrolowaną aktywnością ze strony układu odpornościowego. Mechanizm tej reakcji polega na endocytozie kompleksu receptor-ligand, który ulega degradacji w cytoplazmie. Brak jest dowodów na możliwość recyklingu NKG2D. Podobna regulacja przez rozpuszczalne ligandy ma miejsce w stosunku do innych receptorów aktywujących limfocytów. Wykazano, że sMIC przedostają się do krwioobiegu i są roznoszone po całym organizmie. Systemowe, przewlekłe obniżenie gęstości receptorów dla MIC na komórkach NK i limfocytach T $\gamma\delta$  może być jedną z przyczyn zmniejszonej odporności pacjentów z nowotworami na zakażenia wieloma patogenami [33].

Potencjalnie supresorowe względem NKG2D działanie sMIC może znaleźć zastosowanie terapeutyczne w niektórych chorobach autoimmunizacyjnych, w których ekspresja MIC jest podwyższona, a być może również takich, w których przebieg MIC nie są bezpośrednio zaangażowane. NKG2D może mieć bowiem niepoznane dotąd ligandy [27].

Znaczna liczba nowotworów uwalnia rozpuszczalne formy MIC. Nabycie tej zdolności przez komórki nowotworowe promuje rozwój choroby. Daje to potencjalną możliwość wykorzystania sMIC w diagnostyce chorób nowotworowych i w monitorowaniu pacjentów [27].



## REGULACJA AKTYWNOŚCI KOMÓREK UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO

**Komórki NK.** Aktywność komórek NK, jest regulowana przez sygnały pobudzające i hamujące. Aktywujący receptor NKG2D wydaje się pełnić nadrzędną rolę w komórkach NK w stosunku do receptorów hamujących [33]. Zwiększona ekspresja jego ligandów na komórce docelowej powoduje ignorowanie przez komórki NK hamującego sygnału z receptorów rozpoznających prawidłową ekspresję cząsteczek MHC I, takich jak KIR [1, 2]. Rozpoznanie na komórce obecności ligandów NKG2D uruchamia przeciw niej mechanizmy reakcji cytotoksycznej zależnej od granulosoimów. NKG2D-zależna stymulacja prowadzi do uwalniania z komórki NK IFN- $\gamma$  [16] oraz innych cytokin, takich jak: GM-CSF, TNF- $\beta$  i I-309 oraz chemokina CC [1, 10].

**Limfocyty T CD8<sup>+</sup>.** NKG2D występuje konstytutywnie na ludzkich limfocytach T CD8<sup>+</sup>, u myszy natomiast nie obserwuje się jego obecności na limfocytach spoczynkowych i pojawia się po stymulacji przeciwciałami anty-CD3 i anty-CD28 [16]. Dla limfocytów CD8<sup>+</sup> NKG2D działa jako receptor kostymulujący [13, 34]. Nie jest w stanie doprowadzić do rozpoczęcia reakcji cytotoksycznej przeciw komórce mającej jego ligandy samodzielnie. Wymagane jest rozpoznanie nieprawidłowej ekspresji białek prezentowanych w kontekście MHC I przez TCR. NKG2D wzmacnia sygnał płynący z TCR prowadzący do lizy komórki [17]. Wytwarzanie cytokin, np. IL-2, również wymaga synergistycznego współdziałania obu receptorów [17].

**Makrofagi.** Ekspresja NKG2D na makrofażach jest indukowana ich aktywacją, np. przez LPS. Stymulacja przez ligandy NKG2D prowadzi do wytwarzania tlenku azotu (NO) i TNF [16]. Ponieważ ligandy NKG2D znajdują się na powierzchni komórek makrofaż otrzymując sygnał aktywujący i rozpoczynając uwalnianie NO i TNF znajduje się w bezpośrednim sąsiedztwie komórki, przeciw której reaguje. Lokalne zagęszczenie mediatorów wydzielanych przez makrofaż wzmacnia efektywność oddziaływania.

### PODSUMOWANIE

Receptory aktywujące, takie jak NKG2D, są ważnym elementem układu odpornościowego, jednak ich biologia wciąż jest jeszcze mało poznana. Ostatnie badania przyniosły wiele odpowiedzi na pytania dotyczące ich funkcjonowania, ale konieczne są dalsze prace dla ich wystarczającego zrozumienia.

Najlepiej poznany i jedynym, dla którego ligandy (prawdopodobnie nadal nie wszystkie) udało się zidentyfikować, jest lektynowy receptor NKG2D. Jest on, jak się wydaje, bardzo ważnym narzędziem kontroli komórek organizmu przez układ odpornościowy. Stosunkowo duża wiedza dotycząca funkcjonowania tego receptora i jego ligandów stwarza warunki dla poszukiwania klinicznych implikacji odkryć.

Rozpatruje się możliwość stymulacji komórek układu immunologicznego drogą NKG2D w immunoterapii nowotworów [35]. Oznaczanie sMIC we krwi może w niedalekiej przyszłości być wykorzystywane w diagnostyce i monitorowaniu przebiegu chorób nowotworowych. Te same rozpuszczalne ligandy NKG2D mogą okazać się pomocne w leczeniu chorób autoimmunizacyjnych. Szerokie perspektywy zastosowań klinicznych i niezwykle dynamiczny postęp, jaki dokonuje się w tym dziale immunologii, sprawiają, że warto śledzić postępy nauki w odkrywaniu mechanizmów regulacji aktywności komórek układu immunologicznego.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] COSMAN D, MULLBERG J, SUTHERLAND CL, CHIN W, ARMITAGE R, FANSLAW W, KUBIN M, CHALUPNU NJ. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind CMV glikoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 2001; **14**: 123–133.
- [2] BAUER S, GROH V, WU J, STEINLE A, PHILLIPS JH, LANIER LL, SPIES T. Activation of NK cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MIC A. *Science* 1999; **285**: 727–729.
- [3] NATARAJAN K, DIMASI N, WANG J, MARIUZZA RA, MARGULIES DH. Structure and function of natural killer cell receptors: multiple molecular solutions to self, nonself discrimination. *Annu Rev Immunol* 2002; **20**: 853–885.
- [4] SMYTH MJ, GODFREY DI, TRAPANI JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nature* 2001; **2**: 293–299.
- [5] JAMIESON AM, DIEFENBACH A, McMAHON CW, XIONG N, CARLYLE JR, RAULET DH. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune activation and natural killing. *Immunity* 2002; **17**: 19–29.
- [6] WU J, SONR Y, BAKKER AB, BAUER S, SPIES T, LANIER LL, PHILLIPS JH. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 1999; **285**: 730–732.
- [7] MORETTA A, BOTTINO C, VITALE M, PENDE D, CANTONI C, MINGARI MC, BIASSON R, MORETTA L. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2001; **19**: 197–223.
- [8] BORREGO F, KABAT J, KIMDK, LIETO L, MAASHOK, PENA J, SOLANA R, COLIGAN JE. Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol Immunol* 2001; **38**: 637–660.
- [9] HO EL, HEUSEL JW, BROWN MG, MATSUMOTO K, SCALZO AA, YOKOYAMA WM. Murine NKG2d and Cd94 are clustered within the natural killer complex and are expressed independently in natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 6320–6325.
- [10] DIEFENBACH A, RAULET DH. Strategies for target cell recognition by natural killer cells. *Immunol Rev* 2001; **181**: 170–184.
- [11] WOLAN DW, TEYTON L, RUDOLPH MG, VILMOW B, BAUER S, BUSCH DH, WILSON IA. Crystal structure of the murine NK cell-activating receptor NKG2D at 1.95 Å. *Nat Immunol* 2001; **2**: 248–254.
- [12] VANCE RE, TANAMACHI DM, HANKE T, RAULET DH. Cloning of mouse homolog of CD94 extends the family of C-type lectins on murine natural killer cells. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 3236–3241.
- [13] DIEFENBACH A, TOMASELLO E, LUCAS M, JAMIESON AM, HSIA JK, VIVIER E, RAULET DH. Selective association with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D. *Nat Immunol* 2002; **3**: 1142–1149.
- [14] TOMASELLO E, DESMOULINS PO, CEMIN K, GUIA S, CREMER H, ORTALDO J, LOVE P, KASERLIAN D, VIVIER E. Combined natural killer cell and dendritic cell functional deficiency in KARAP/DAP12 loss-of-function mutant mice. *Immunity* 2000; **13**: 355–364.
- [15] GILFILLAN S, HO EL, CELLA M, YOKOYAMA WM, COLONNA M. NKG2D recruits two distinct adaptors to trigger NK cell activation and costimulation. *Nat Immunol* 2002; **3**: 1150–1155.



- [16] DIEFENBACH A, JAMIESON AM, LIU SD, SHASTRI N, RAULET DH. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol* 2000; **1**: 119–126.
- [17] GROH VE, RHINEHART RE, RANDOLPH-HABECKER JU, MAX S, TOPP, RIDELL SR, SPIES TH. Costimulation of CD8 $\alpha$  $\beta$ T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nature* 2001; **2**: 255–260.
- [18] CERWENKA A, LANIER LL. Ligands for natural killer cell receptors: redundancy or specificity. *Immunol Rev* 2001; **181**: 158–169.
- [19] BAHRAM S. MIC genes: from genetics to biology. *Adv Immunol* 2000; **76**: 1–60.
- [20] STEINLE A, GROH V, SPIES T. Diversification, expression, and  $\gamma\delta$  T cell recognition of evolutionary distant members of the MIC family of major histocompatibility complex class I-related molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 12510–12515.
- [21] LI P, WILLIE ST, BAUER S, MORRIS DL, SPIES T, STRONG RK. Crystal structure of MHC class I homolog MIC A, a  $\gamma\delta$  T cell ligand. *Immunity* 1999; **10**: 577–584.
- [22] STRONG RK. Class (I) will come to order – not. *Nat Struct Biol* 2000; **7**: 173–176.
- [23] LI P, MORRIS DL, WILLCOX BE, STEINLE A, SPIES T, STRONG RK. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MIC A. *Nat Immunol* 2001; **2**: 443–451.
- [24] GROH V, BAHRAM S, BAUER S, HERMAN A, BEAUCHAMP M, SPIES T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 12445–12450.
- [25] GROH VE, RHINEHART RE, SECRIST H, BAUER S, GRABSTEIN KH, SPIES T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived  $\gamma\delta$  T cells of MIC A and MIC B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 6879–6884.
- [26] SALIH HR, ANTROPIUS H, GIESEKE F, LUTZ SZ, KANZ L, RAMMENSEE HG, STEINLE A. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood* 2003.
- [27] YOKOYAMA WM. Catch us if you can. *Nature* 2002; **419**: 679–680.
- [28] SUTHERLAND CL, CHALUPNY NJ, SCHOOLEY K, VANDENBOS T, KUBIN M, COSMAN D. UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J Immunol* 2002; **168**: 671–679.
- [29] DIEFENBACH A, JENSEN ER, JAMIESON AM, RAULET DH. Rael and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 2001; **413**: 165–171.
- [30] O'CALLAGHAN CA, CERWENKA A, WILLCOX BE, LANIER LL, BJORKMAN PJ. Molecular competition for NKG2D; H-60 and RAE-1 compete unequally for NKG2D with dominance of H-60. *Immunity* 2001; **15**: 201–211.
- [31] SALIH HR, RAMMENSEE H-G, STEINLE A. Down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol* 2002; **169**: 4098–4102.
- [32] GROH V, WU J, YEE C, SPIES T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002; **419**: 734–738.
- [33] FARAG SS, FEHNIGER TA, RUGGERI, L, VELARDI A, CALIGIURI MA. Natural killer cell receptors; new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 2002; **100**: 1935–1947.
- [34] UGOLINI S, VIVIER E. Multifaceted roles of MHC class I and class I-like molecules in T cell activation. *Nat Immunol* 2001; **2**: 198–200.
- [35] CERWENKA AA, LANIER AA. NKG2D ligands: unconventional MHC class I-like molecules exploited by viruses and cancer. *Tissue Antigens* 2003; **61**: 335–343.

Redaktor prowadzący – Barbara Płytycz

Otrzymano: 13.08.2003 r.

Przyjęto: 02.10.2003 r.

Ul. Chalubińskiego 5, 02-004 Warszawa

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

## EKSPRESJA GENÓW DYSMUTAZY PONADTLLENKOWEJ W STANIE STRESU OKSYDACYJNEGO

EXPRESSION OF SUPEROXIDE DISMUTASE GENES  
IN STATE OF OXIDATIVE STRESS

Michał SKRZYCKI, Hanna CZECZOT

Katedra i Zakład Biochemii AM Warszawa

*Streszczenie:* W pracy opisano strukturę genów dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i przedstawiono najnowsze wiadomości na temat ich ekspresji, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów regulacji ekspresji genu MnSOD w stanie stresu oksydacyjnego.

*Słowa kluczowe:* dysmutaza ponadtlenkowa, stres oksydacyjny, ekspresja, czynniki transkrypcyjne.

*Summary:* The paper describes superoxide dismutase (SOD) genes structure and presents latest news about their expression, with special consideration of regulation MnSOD gene expression mechanisms in the state of oxidative stress.

*Key words:* superoxide dismutase, oxidative stress, expression, transcription factors.

*Wykaz skrótów:* **AP-1** – białko aktywujące 1; **AP-2** – białko aktywujące 2; **ATF-1** – czynnik aktywujący transkrypcję; **CAT** – katalaza; **C/EBP** – białko wiążące się z sekwencją CCAAT; **CREB** – białko wiążące się z elementem odpowiadającym na cAMP; **CuZnSOD** – cynkowo-miedziowa dysmutaza ponadtlenkowa; **DAG** – diacylglicerol; **ECSOD** – zewnątrzkomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa; **GPx** – peroksydaza glutationowa; **GSt** – transferaza glutationowa; **I-κβ** – inhibitor jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF-κβ; **IL-1** – interleukina 1; **IL-8** – interleukina 8; **kpz** – tysięcy par zasad; **LPS** – lipopolisacharydy; **MnSOD** – manganowa dysmutaza ponadtlenkowa; **MSTRE** – element genu MnSOD odpowiadający na TPA; **NAC** – N-acetylo-L-cysteina; **NF-1** – czynnik transkrypcyjny 1; **NF-κβ** – czynnik transkrypcyjny-κβ; **PKA** – kinaza białkowa A; **PKC** – kinaza białkowa C; **PLC** – fosfolipaza C; **PMA** – 13-octan 12-miristan forbolu; **pz** – par zasad; **R-TNF** – receptor TNF-α; **SOD** – dysmutaza ponadtlenkowa; **Sp-1** – białko specyficzności 1; **TNF-α** – czynnik martwicy nowotworu; **TPA** – 13-octan 12-O-tetradekanyloforbolu; **WRT** – wolne rodniki tlenowe.



## I. WSTĘP

Jednym z podstawowych elementów obrony komórek przed szkodliwym działaniem wolnych rodników tlenowych i ich pochodnych jest synteza specyficznych białek enzymatycznych o właściwościach przeciwutleniających, np. SOD, CAT, GPx i innych. Jednym z nich jest dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), która bierze udział w unieczynnianiu anionorodnika ponadtlenkowego. Jej zwiększoną syntezę obserwuje się w warunkach stresu tlenowego. Ma ona, podobnie jak inne enzymy antyoksydacyjne, charakter konstytutywny i jest syntetyzowana w prawidłowych komórkach. Jej aktywność zdecydowanie wzrasta w stanie stresu oksydacyjnego. Nadmiar powstającego w stresie anionorodnika ponadtlenkowego jest bodźcem indukującym ekspresję genów SOD [44].

SOD występuje we wszystkich tkankach metabolizujących tlen [11]. Jest metaloproteiną zawierającą w centrach aktywnych jony metali (Cu, Zn, Mn) [9]. W komórkach ludzkich występują trzy formy SOD (EC 1.15.1.1): cynkowo-miedziowa (CuZnSOD) obecna w cytosolu i przestrzeni międzybłonowej mitochondriów, manganowa (MnSOD) obecna prawie wyłącznie w mitochondriach oraz dysmutaza pozakomórkowa (ECSOD). CuZnSOD jest homodimerem o masie 32 kDa, MnSOD jest homotetramerem o masie pojedynczego monomeru 23 kDa, natomiast ECSOD jest homotetramerem o masie 135 kDa [46].

Wszystkie izoenzymy SOD u ludzi są kodowane przez geny jądrowe syntetyzowane w cytoplazmie i transportowane do odpowiednich kompartmentów komórkowych [9, 12, 32].

Mitochondria są strukturą komórki najbardziej podatną na oksydacyjny atak wolnych rodników. Generowane tu wolne rodniki uszkadzają słabo zabezpieczony DNA, co prowadzi do mutacji i powoduje powstawanie deficytu energetycznego komórek [13, 20, 38]. Zabezpieczenie genomu mitochondrialnego przed działaniem reaktywnych form tlenu zapewnia sprawnie działająca MnSOD, która chroni komórki organizmu przed poważnymi konsekwencjami metabolicznymi [11, 24].

## II. STRUKTURA GENÓW SOD

Ludzki gen MnSOD zlokalizowany jest w długim ramieniu chromosomu 6 (6q25). Składa się z pięciu egzonów przedzielonych czterema intronami, z typowymi połączeniami intron-egzon. Miejsce inicjacji transkrypcji znajduje się 74 pz powyżej miejsca startu translacji. Jest ono poprzedzone przez region promotorowy bogaty w pary GC (78%), który zawiera kasetę siedmiu lub ośmiu sekwencji wiążących czynnik transkrypcyjny Sp-1 i jednej lub trzech sekwencji wiążących czynnik transkrypcyjny AP-1, a także sekwencji wiążących czynnik transkrypcyjny AP-2. Region promotorowy znajduje się pomiędzy -34 i +38 nukleotydem oraz nie zawiera on TATA i CCAAT box [41, 47]. Przy końcu 5' między -1292 i -1202 nukleotydem znajduje się sekwencja

znana jako element odpowiedzi MnSOD na TPA (MSTRE), do której mogą się przyłączać czynniki transkrypcyjne z rodziny CREB/ATF. Sekwencja ta jest podobna do sekwencji elementu odpowiedzi na cAMP (CRE) [17]. Region końca 3' genu MnSOD zawiera jedną sekwencję wiążącą czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B. Miejsca wiązania czynników NF- $\kappa$ B i AP-1 ulokowane są w regionie wzmacniającym między -3340 a -1396 nukleotydem, natomiast regiony wzmacniające indukowane przez cytokiny zawierają miejsca wiązania dla czynników NF- $\kappa$ B, C/EBP i NF-1 [17, 46].

Ludzki gen MnSOD jest transkrybowany jako mRNA 4 kpz i mRNA 1 kpz. Obydwa transkrypty ulegają ekspresji w komórkach zarówno noworodków, jak i ludzi dorosłych. Transkrypt mRNA 1 kpz nie występuje w komórkach płodów [1].

Struktura ludzkiego białka MnSOD została określona na podstawie komplementarnego cDNA wyizolowanego z komórek guza jelita grubego (HT-29). Dojrzałe białko składa się ze 198 aminokwasów poprzedzonych 24-aminokwasową sekwencją sygnałową. Na podstawie analizy sekwencji DNA stwierdzono, że region genu MnSOD, który ulega translacji jest taki sam w zdrowych i nowotworowych komórkach, jednak wykazuje różnice w regionach 5' i 3' nieulegających translacji. Okres półtrwania mRNA MnSOD (ok. 10 h) jest taki sam w komórkach prawidłowych i zmienionych nowotworowo. Natomiast ilość białka MnSOD jest niższa w komórkach nowotworowych [38].

Ludzki gen CuZnSOD zlokalizowany jest w chromosomie 21 (21q22). Jest to gen o długości 11 kpz składający się z pięciu egzonów poprzedzielanych czterema intronami. Miejsca połączeń intron-egzon zawierają rzadko spotykane dinukleotydy G-C zamiast silnie konserwatywnych G-T. Na końcu 5' genu znajdują się sekwencje promotorowe TATA między +23 a +29 nukleotydem i sekwencja CCAAT między -69 i -128 nukleotydem, a także cztery kopie heksanukleotydu GGCGGG zaczynające się od nukleotydów -90, -135, -172, -243. W regionie tym obecne są dwie pary odwróconych powtórzeń: krótkie, siedmionukleotydowe między sekwencjami TATA i CCAAT i dłuższe, składające się z 13 nukleotydów poprzedzające sekwencję -69 CCAAT. Heksanukleotydy -90 i -135 znajdują się w regionie struktury szpilki do włosów, tworzonej przez trzynastonukleotydowe powtórzenia. Tego typu struktury mogą służyć jako miejsca wiązania białek regulatorowych, co wskazuje na możliwość ich udziału w regulacji ekspresji genu CuZnSOD. Dotyczyć to może czynników NF1, Sp1, AP-1, AP-2, GRE, HSF i NF- $\kappa$ B [46]. Niekodujący region 3' genu o długości 312 pz zawiera pięć otwartych ramek odczytu zaczynających się od sekwencji ATG i kończących się kodonami stop oraz cztery sekwencje sygnałowe poliadenylacji mRNA [18, 48].

CuZnSOD jest transkrybowany jako dwa rodzaje mRNA: 0,9 kpz i 0,7 kpz. Obydwa ulegają ekspresji u dorosłych, ale mRNA 0,7 kpz jest około 3 do 4 razy więcej. U noworodków i ludzi dorosłych w komórkach poziom ekspresji mRNA jest podobny, natomiast u płodów jest on znacznie niższy [1, 48].

Ludzki gen ECSOD jest zlokalizowany w chromosomie 4 (4p-q21). Składa się z trzech egzonów poprzedzielanych dwoma intronami. W regionie promotorowym znaleziono miejsce wiązania czynnika AP-1. Region 5' genu ECSOD ma kilka potencjalnych sekwencji regulatorowych, takich jak: elementy odpowiedzi (ang. *response element*) na glukokortykoidy, ksenobiotyki oraz antyoksydanty. Region



promotorowy tego genu nie zawiera sekwencji TATA lub CCAAT, ale ma sekwencje bogate w puryny [46].

Regulacja syntezy SOD w warunkach stresu oksydacyjnego zachodzi głównie na poziomie transkrypcji. Związanie czynników transkrypcyjnych z promotorem genu i regionem wzmacniającym inicjuje transkrypcję oraz prowadzi do nasilenia ekspresji produktu genu [19].

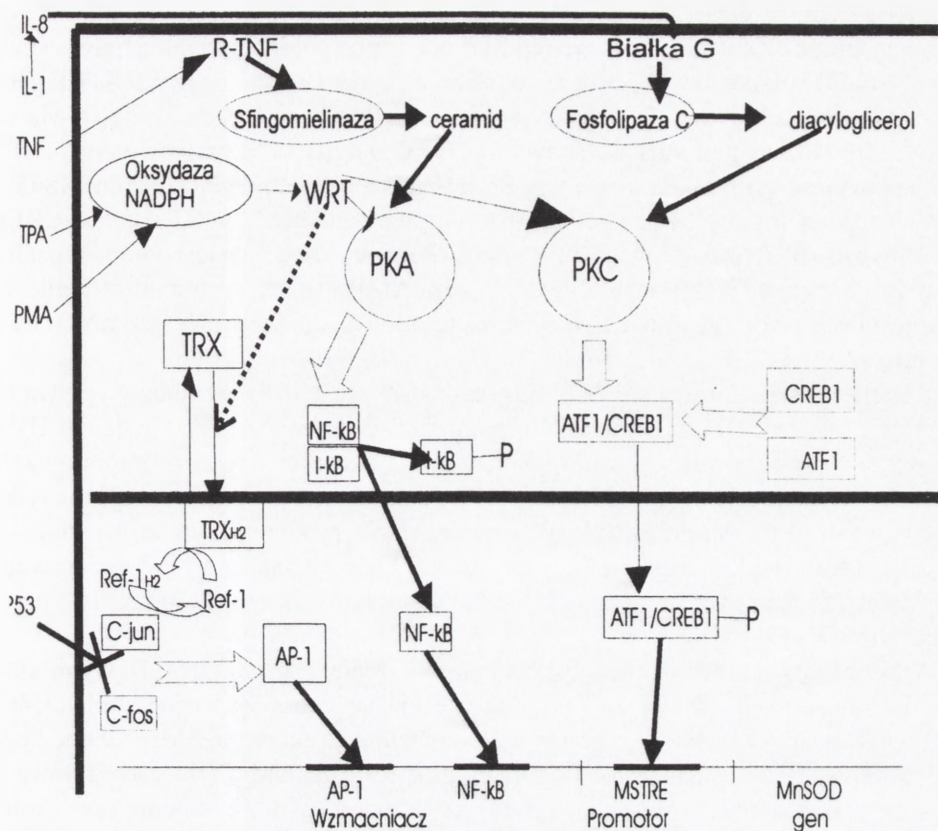
W dalszej części artykułu zostaną przedstawione molekularne mechanizmy indukcji i regulacji ekspresji genu MnSOD.

### III. MOLEKULARNY MECHANIZM INDUKCJI EKSPRESJI GENU MnSOD

Geny SOD ulegają ekspresji pod wpływem wielu czynników wywołujących stres oksydacyjny: TNF- $\alpha$ , interleukin, lipopolisacharydów (LPS), interferonu- $\gamma$ , estrów forbolu, etanolu, promieniowania  $\gamma$  i X, niektórych leków [11, 15, 17, 44]. Większość z tych związków wytwarza reaktywne formy tlenu i inne wolne rodniki, pod wpływem których następuje aktywacja czynników transkrypcyjnych NF- $\kappa$ B, AP-1 i 2, CREB/ATF, Sp1, biorących udział w aktywacji genów kodujących białka zaangażowane w obronę komórki przed czynnikami stresu oksydacyjnego (ryc. 1).

Dotychczas najlepiej poznany mechanizm indukcji ekspresji genu MnSOD w komórkach dotyczy działania czynnika martwicy nowotworu (TNF- $\alpha$ ) produkowanego przez makrofagi i limfocyty T. Pobudza on komórki do produkcji wolnych rodników tlenowych i tlenu azotu, przez co nasila stres oksydacyjny [37]. TNF- $\alpha$  indukuje również hydrolizę sfingolipidów do ceramidu, a także aktywację kaspazy-3, co prowadzi do apoptozy komórek [26]. Uważa się, że cytotoksyczne działanie TNF- $\alpha$  wiąże się z produkcją reaktywnych form tlenu w komórkach. Badania wpływu TNF- $\alpha$  na aktywność i ekspresję MnSOD w układach *in vitro* wykazały, że związek ten wyraźnie zwiększa poziom mRNA MnSOD i jej aktywność [43]. Sygnały przekazywane przez receptory TNF- $\alpha$  prowadzą do aktywacji kinaz białkowych w komórce (ang. *protein kinases A and C*) PKA i PKC, a dalej czynników NF- $\kappa$ B i AP-1. Jednym z najwcześniejszych sygnałów inicjowanych przez receptory dla TNF- $\alpha$  jest aktywacja sfingomielinazy, która rozkłada sfingomielinę błony komórkowej z wytworzeniem ceramidu, aktywującego z kolei odpowiednią kinazę białkową [5]. TNF- $\alpha$  aktywuje również fosfolipazę, której produktem jest diacyloglicerol (DAG), aktywator kinazy białkowej C (PKC) [3]. Aktywna kinaza fosforyluje I- $\kappa$ B – inhibitor NF- $\kappa$ B, który następnie ulega degradacji. Fosforylacja I- $\kappa$ B umożliwia NF- $\kappa$ B translokację do jądra i następnie przyłączenie się do intronowej sekwencji wzmacniającej i aktywację transkrypcji genu MnSOD [28, 42].

Podobny mechanizm indukcji ekspresji genu MnSOD dotyczy działania interleukiny-1 (IL-1) i interleukiny-8 (IL-8). IL-1 nasila wydzielanie przez makrofagi i monocyty IL-8, która łącząc się z odpowiednim receptorem działa przez aktywację



RYCINA 1. Mechanizmy przekazywania sygnału w ekspresji genu MnSOD

białek G, które z kolei indukują sygnały dla aktywacji PKC. Aktywacja odpowiednich czynników transkrypcyjnych przez kinazy białkowe prowadzi do indukcji ekspresji genu MnSOD [40].

Nadekspresja w komórkach MnSOD blokuje aktywację NF- $\kappa$ B, AP-1 i kaspazy-3 wywołaną przez TNF- $\alpha$  oraz aktywację NF- $\kappa$ B indukowaną przez estry forbolu, lipopolisacharydy i ceramidy. Aktywacja NF- $\kappa$ B i kinaz, jak również indukcja apoptozy przez TNF- $\alpha$  wymaga obecności różnych pośredników, w tym WRT [22, 26, 29]. Zwiększony poziom MnSOD prowadzi do obniżenia ilości anionorodnika nadadtlenkowego, natomiast zwiększa stężenie nadadtlenku wodoru i innych nadadtlenków [17]. Ponieważ ekspresja genu MnSOD jest regulowana przez NF- $\kappa$ B, hamowanie aktywacji NF- $\kappa$ B przez nadmiar MnSOD świadczy o negatywnym sprzężeniu zwrotnym [7, 26].

Inny mechanizm indukcji ekspresji genu MnSOD dotyczy działania estru forbolu (TPA) (ang. *TPA - tetradecanoylphorbol acetate*). Ekspresja genu MnSOD indukowana przez TPA dotyczy aktywacji oksydaz NADPH, które generują anionorodnik nadadtlenkowy [23]. Jest on sygnałem dla fosforylacji czynników



transkrypcyjnych CREB (ang. *cAMP response element-binding protein*) i ATF-1, które po przyłączeniu się do sekwencji MSTRE w promotorze indukują transkrypcję genu MnSOD. Badania wykazały, że to właśnie element promotorowy MSTRE genu MnSOD moduluje indukcję transkrypcji tego genu w komórkach [14, 17]. Ma on sekwencję bardzo podobną do sekwencji CRE (ang. *cAMP response element*) – miejsca wiążącego białka z rodziny CREB. Białko CREB przyłączone do MSTRE jest wcześniej fosforylowane przez PKC aktywowaną przez WRT. Białko CREB może być również fosforylowane przez PKA. Ponieważ kinaza ta jest odpowiedzialna za wszystkie znane efekty wywoływane przez cAMP, nasuwa się przypuszczenie, że ekspresja genu MnSOD może być również regulowana przez wewnątrzkomórkowy poziom cAMP [17].

Również promieniowanie UV – silny induktor stresu oksydacyjnego wpływa na ekspresję genów SOD w komórkach organizmu. Wykazano, że niskie dawki UVB zwiększają poziom mRNA MnSOD, natomiast wysokie dawki promieniowania zmniejszają ekspresję mRNA MnSOD [18]. Promieniowanie UV indukuje nie tylko powstawanie WRT w komórkach, ale również nasila produkcję cytokin (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ), które modułują ekspresję MnSOD. Uważa się jednak, że WRT generowane w wyniku działania promieniowania UV odgrywają decydującą rolę w indukcji ekspresji genu MnSOD [8, 18].

W wielu typach nowotworów obserwuje się obniżenie ekspresji MnSOD. Wynika to z metylacji niektórych sekwencji (CpG) w rejonie inicjacji transkrypcji genu MnSOD [46].

Wyniki licznych badań *in vitro* i *in vivo* wskazują, że aktywność MnSOD podlega skomplikowanym mechanizmom regulacji. Ekspresja genu MnSOD jest regulowana głównie przez czynniki wywołujące stres oksydacyjny i cytokiny (mediatory stresu), zdolne regulować zarówno jej ekspresję, jak i aktywność [8, 18, 22, 33].

Przedstawione mechanizmy aktywacji czynników transkrypcyjnych wskazują, że ekspresja genu MnSOD zależy od stanu redoks w komórce [6]. Wzrost stężenia WRT i ich pochodnych w komórce jest niezbędny do aktywacji czynników transkrypcyjnych kontrolujących ekspresję genu MnSOD. Gen MnSOD wydaje się mieć w promotorze i w sekwencjach wzmacniających wiele miejsc, do których mogą przyłączać się aktywne czynniki transkrypcyjne. Więcej niż jeden czynnik promujący aktywność MnSOD wskazuje na jej uniwersalność i szczególną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu komórki.

Ekspresja MnSOD jest regulowana nie tylko na poziomie transkrypcji, ale także na poziomie translacji przez białko wiążące RNA. W części mRNA MnSOD nieulegającej translacji na końcu 3' znajduje się region o długości 41 pz, z którym wiąże się niezidentyfikowane do tej pory, specyficzne białko zwiększające wydajność translacji. Wiadomo, że białko to jest fosforylowane przez kinazę tyrozynową [46].

Regulacja ekspresji genu MnSOD pozwala na niezwykle precyzyjne dostosowanie odpowiedzi komórki na czynniki wywołujące stres oksydacyjny.

#### IV. MECHANIZM REGULACJI EKSPRESJI GENU MnSOD

Stres oksydacyjny w komórce wskazuje na nadmierną produkcję reaktywnych form tlenu, zaburzone działanie mechanizmów antyoksydacyjnych, a także na postępujący proces zapalny (działanie cytokin). Stanowi to dla komórki bodziec zmuszający do szybkiej i różnorodnej odpowiedzi, w przeciwnym wypadku komórka ulegnie licznym uszkodzeniom lub nawet śmierci. Sensorami komórki reagującymi i przygotowującymi odpowiedź na stres są czynniki transkrypcyjne (np. NF- $\kappa$ B, AP-1, CREB1/ATF1) [6, 8, 14, 33].

Zależnie od działających czynników transkrypcyjnych można wyróżnić trzy podstawowe rodzaje odpowiedzi komórki na stres oksydacyjny:

NF- $\kappa$ B – bezpośrednia, szybka odpowiedź na krótko działający czynnik stresowy, np. wybuch tlenowy wywołany przez cytokiny, gdzie NF- $\kappa$ B przez negatywne sprzężenie zwrotne reguluje poziom MnSOD w komórce [7, 10, 50, 26];

AP-1 – odpowiedź przygotowująca komórkę na mający nastąpić stres oksydacyjny np. w wyniku reperfuzji. Podwyższony poziom MnSOD może utrzymywać się przez dłuższy czas. Odpowiedź ta jest powiązana z cyklem komórkowym przez działanie białka p53 hamującego syntezę AP-1 [10, 16, 49];

CREB1/ATF1 – odpowiedź niezwiązana bezpośrednio ze stanem stresu, ale raczej na czynniki wywołujące stres, szczególnie estry forbolu. Podwyższony poziom MnSOD utrzymuje się tak długo jak działa czynnik wywołujący stres oksydacyjny [16, 17, 35].

Wydaje się jednak, że czynniki transkrypcyjne nie działają osobno, ale łączą się z sekwencjami regulatorowymi danego genu w określonych kombinacjach, zależnie od działającego bodźca.

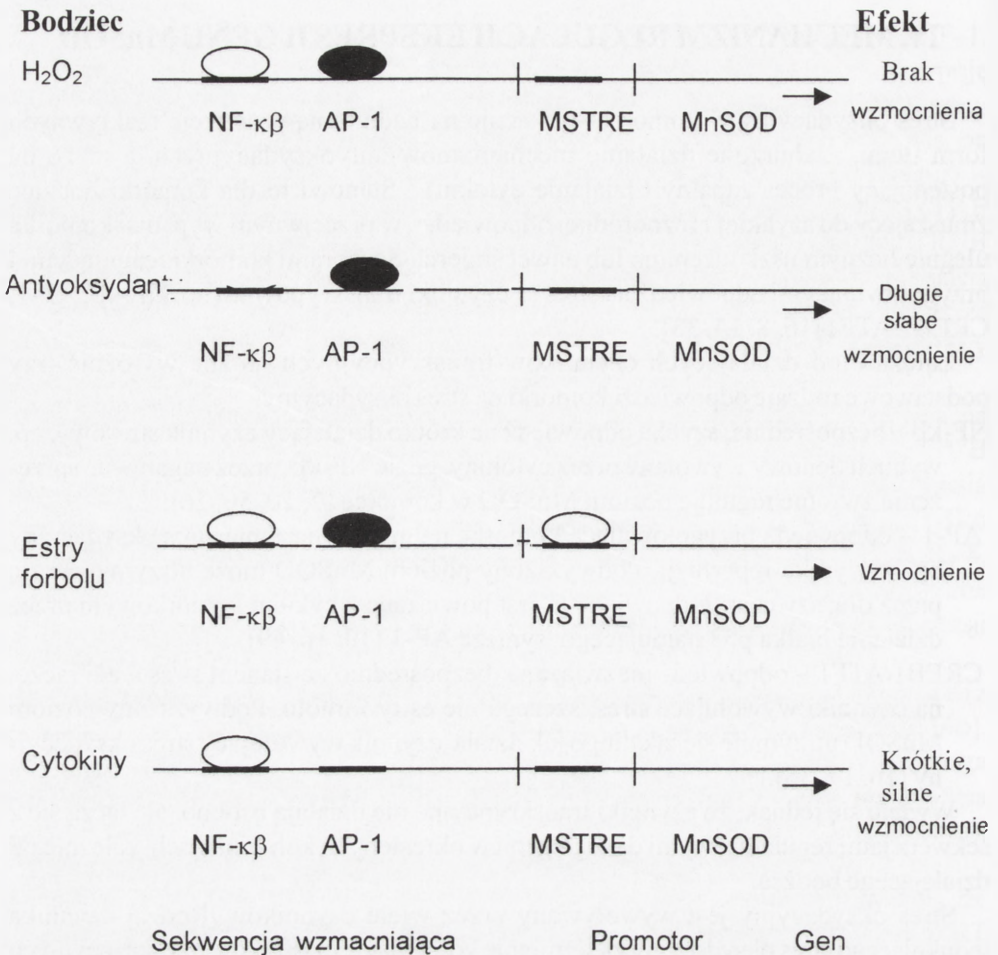
Stres oksydacyjny jest wywoływany przez wiele czynników. Rodzaj czynnika indukującego stres oksydacyjny, determinuje kombinację czynników transkrypcyjnych wiążących się z sekwencjami regulatorowymi, pozwalającą na ściśle określoną odpowiedź na dany czynnik [8] (ryc. 2).

Regulacja ekspresji genu MnSOD wiąże się z mechanizmami aktywacji czynników transkrypcyjnych przez:

**A) reaktywną formę tlenu –  $H_2O_2$**  – do sekwencji wzmacniającej genu MnSOD przyłącza się zarówno czynnik NF- $\kappa$ B, jak i AP-1 [4]. Nadtlenek wodoru aktywuje NF- $\kappa$ B prawdopodobnie przez utlenienie inhibitora I- $\kappa$ B, co umożliwia translokację NF- $\kappa$ B z cytoplazmy do jądra [2, 42]. Z kolei AP-1 jest aktywowany przez utlenienie podjednostki c-Fos. Tworzy się heterodimer c-Fos/c-Jun, który wiąże się z DNA [6, 36]. Jednoczesne przyłączenie NF- $\kappa$ B i AP-1 do sekwencji wzmacniającej genu MnSOD nie daje efektu wzmocnienia transkrypcji tego genu [4]. Jest to typowe negatywne sprzężenie zwrotne, gdzie nadmiar produktu ( $H_2O_2$ ) hamuje ekspresję genu enzymu katalizującego reakcję, w której powstaje ten produkt [26];

**B) antyoksydanty** – powodują zwiększenie puli zredukowanej tioredoksyny (TRX), która po translokacji do jądra staje się donorem protonów dla białka Ref-1,





RYCINA 2. Efekty oddziaływania czynników transkrypcyjnych na ekspresję genu MnSOD w zależności od działającego bodźca

które przekazuje dalej na podjednostkę c-Jun czynnika AP-1, co powoduje wzrost jej powinowactwa do DNA. Tworzy się homodimer c-Jun/c-Jun, który wiąże się z sekwencją wzmacniającą MnSOD [16].

Antyoksydanty, np. witamina C, witamina E i jej pochodne, kwas liponowy, N-acetylo-L-cysteina (NAC) unieczynnijając/wymiatając wolne rodniki blokują aktywację NF- $\kappa\beta$ , zarówno w drodze fosforylacji, jak również utlenienia podjednostki inhibitorowej I- $\kappa\beta$  [31, 34, 39, 50]. Przyłączenie tylko AP-1 do sekwencji wzmacniającej genu MnSOD powoduje słabe, ale długotrwałe wzmocnienie transkrypcji genu MnSOD. Umożliwia to komórce przygotowanie na ewentualnie nadchodzący stres oksydacyjny np. w wyniku reperfuzji po hipoksji [4];

**C) cytokiny** – przez wolne rodniki i ich pochodne generowane w mitochondriach oraz wtórne przekaźniki aktywują kinazy PKA i PKC. Następuje fosforylacja I- $\kappa\beta$  i

translokacja NF- $\kappa$ B do jądra, gdzie wiąże się z sekwencją wzmacniającą genu MnSOD [21, 42]. Jednak przyłączenie NF- $\kappa$ B do tej sekwencji nie wystarcza do uzyskania pełnego wzmocnienia ekspresji genu MnSOD [4]. Aktywacja kinazy PKC sugeruje przyłączenie się jeszcze innego czynnika transkrypcyjnego, ponieważ metabolizm komórki musi szybko i efektywnie odpowiedzieć na silny stres, jakim jest wybuch tlenowy wywołany przez cytokiny [25];

**D) estry forbolu** – aktywują oksydazy NADPH, które generują anionorodnik nadadtlenkowy odpowiedzialny w komórce za aktywację PKA i PKC [23]. PKA powoduje fosforylację I- $\kappa$ B umożliwiając translokację NF- $\kappa$ B do jądra i wiązanie z DNA. Natomiast PKC fosforyluje CREB1/ATF1, który ulega translokacji do jądra i wiąże się z sekwencją MSTRE w regionie promotorowym genu MnSOD [17, 30]. Stres oksydacyjny wywołany przez estry forbolu powoduje również translokację zredukowanej tioredoksyny do jądra, gdzie aktywuje AP-1, który w postaci homodimeru c-Jun/cJun wiąże się z sekwencją wzmacniającą MnSOD [27]. Przyłączenie do tych sekwencji NF- $\kappa$ B, AP-1 i CREB1/ATF1 powoduje wzmocnienie ekspresji genu MnSOD. Ponieważ przyłączenie NF- $\kappa$ B i AP-1 tylko do sekwencji wzmacniającej genu MnSOD nie powoduje wzmocnienia jego ekspresji, wydaje się, że to CREB1/ATF1 pełni w przypadku genu MnSOD funkcję włącznika/wyłącznika odpowiedzi na działanie estrów forbolu. Pozwalałoby to na włączanie i wyłączanie wzmocnienia ekspresji genu MnSOD w zależności od tego, czy komórki są ekspozowane na działanie estrów forbolu, czy nie.

Czynniki transkrypcyjne łączą się nie tylko z sekwencjami wzmacniającymi genu MnSOD, ale także z sekwencjami promotorowymi tego genu. Czynniki te są AP-2 i Sp-1, a także CREB/ATF1. Sp-1 jest niezbędny dla konstytutywnej ekspresji genu MnSOD, natomiast prawdopodobnie nie jest on czynnikiem wrażliwym na zmiany stanu redoks w komórce [35, 45]. Z kolei AP-2 jest wrażliwy na stan redoks w komórce [51]. Jednak w przeciwieństwie do czynników transkrypcyjnych, łączących się z sekwencjami wzmacniającymi genu MnSOD, powoduje on zmniejszenie poziomu ekspresji genu MnSOD [45, 51]. Ponieważ AP-2 jest czynnikiem transkrypcyjnym aktywowanym przez stres oksydacyjny, obniżenie poziomu ekspresji genu MnSOD przez ten czynnik wydaje się być sprzeczne i kontrowersyjne z pozostałymi wynikami badań.

Być może w stresie oksydacyjnym dochodzi do odłączenia AP-2 od promotora genu MnSOD. W świetle takiej koncepcji AP-2 staje się podstawowym sensorem stresu oksydacyjnego w komórce. Natomiast pozostałe czynniki transkrypcyjne łączące się z sekwencjami wzmacniającymi genu MnSOD są sensorami wyczuwającymi rodzaj stresu oksydacyjnego i powodującymi specyficzną odpowiedź w zależności od czynnika wywołującego stres. Można przypuszczać, że dopiero po odłączeniu AP-2 od sekwencji promotorowej genu MnSOD, czynniki transkrypcyjne zaktywowane przez stres oksydacyjny i przyłączone do sekwencji wzmacniających genu MnSOD zaczynają wywierać swój efekt [51].



## VI. PODSUMOWANIE

Regulacja ekspresji genu MnSOD w stanie stresu oksydacyjnego pozwala komórce na precyzyjną, zróżnicowaną w sile i czasie trwania odpowiedź na czynniki wywołujące stres. Wolne rodniki tlenowe i ich pochodne są wspólnym elementem integrującym różne sygnały indukujące ekspresję genu MnSOD. Ich pojawienie się w komórce stanowi sygnał dla czynników transkrypcyjnych, które następnie indukują odpowiedź komórki na stres oksydacyjny. Różnorodność czynników transkrypcyjnych biorących udział w tej indukcji daje komórce możliwość zróżnicowania odpowiedzi w zależności od działającego bodźca. Oznacza to, że każdy czynnik transkrypcyjny reaguje w inny sposób na sygnał.

W artykule przedstawiono możliwe mechanizmy indukcji ekspresji genu MnSOD w stresie oksydacyjnym. Biorąc pod uwagę wielość i różnorodność czynników wpływających na ekspresję genu MnSOD i ich roli w metabolizmie komórki pełne wyjaśnienie regulacji genu MnSOD wymaga dalszych intensywnych badań z wykorzystaniem najnowszych technik stosowanych w biologii molekularnej.

## LITERATURA

- [1] ASIKAINEN MT, KARI O R, SAKSELA M, KINNULA V L. Expression and developmental profile of antioxidant enzymes in human lung and liver. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; **19**(6): 942–949.
- [2] BERNARD D, QUATANNENS B, BEGUE A, VANDENBUNDER B, ABBADIE C. Antiproliferative and antiapoptotic effects of crel may occur within the same cells via the up-regulation of manganese superoxide dismutase. *Cancer Res* 2001; **61**(15): 2656–2664.
- [3] BEYAERT R, FIERS W. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. What we do understand and what we do not. *FEBS Lett* 1994; **340**: 9–16.
- [4] BORRELLO S, DEMPLE B. NF kappa B-independent transcriptional induction of the human manganese superoxide dismutase gene. *Arch Biochem Biophys* 1997; **348** (2): 289–294.
- [5] BOURBON NA, YUN J, KESTER M. Ceramide directly activates protein kinase C zeta to regulate a stress-activated protein kinase signaling complex. *J Biol Chem* 2000; **275**(45): 35617–35623.
- [6] CISOWSKI J. Wpływ stanu redoks komórki na aktywację czynników transkrypcyjnych i ekspresję genów. *Post Biol Kom* 2001; **28** suppl. 16: 43–59.
- [7] DAS KC, WHITE C W. Redox systems of the cell: Possible links and implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99** (15): 9617–9618.
- [8] DENT P, YACOUB A, CONTESSA J, CARON R, AMORINO G, VALERIE K, HAGAN MP, GRANT S, SCHMIDT-ULLRICH R. Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways. *Radiat Res* 2003; **59**(3): 283–300.
- [9] EMÉRIT I, FILIPE P, FREITAS J, FERNANDES A, GARBAN F, VASSY J. Assaying binding capacity of Cu,ZnSOD and MnSOD: demonstration of their localization in cells and tissues. *Methods Enzymol* 2002; **349**: 321–327.
- [10] FILOSTO M, TONIN P, VATTEMI G, SAVIO C, RIZZUTO N, TOMELLERI G. Transcription factors c-Jun/activator protein-1 and nuclear factor-kappa B in oxidative stress response in mitochondrial diseases. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2003; **29**(1): 52–59.
- [11] FRIDOVICH I. Superoxide anion radical ( $O_2^-$ ), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* 1997; **272**: 18515–18517.
- [12] FRIDOVICH I. Superoxide dismutases: studies of structure and mechanism. *Adv Exp Med Biol* 1976; **74**: 530–539.

- [13] FRIDOVICH I The biology of oxygen radicals. *Science* 1978; **201**(8): 875–880.
- [14] HERDEGEN T, LEAH JD. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Rev* 1998; **28**(3):370–490.
- [15] HILL DB, MCCLAIN CJ, ST CLAIR D, BARVE S. Use of transfected liver cells to evaluate potential mechanisms of alcohol-induced liver injury. *Alcohol Clin Exp Res* 1998; **22**(4):785–788.
- [16] HIROTA K, MATSUI M, IWATA S, NISHIYAMA A, MORI K, YODOI J. AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 3633–3638.
- [17] HYOUNG-PYO KIM, JUNG-HYE ROE P, BOON C, MOON B Y. Transcriptional activation of the human manganese superoxide dismutase gene mediated by tetradecanoylphorbol acetate. *J Biol Chem* 1999; **271**: 37455–37460.
- [18] ISOHERRANEN K, PELTOLA V, LAURIKAINEN L, PUNNONEN J, LAIHIA J, AHOTUPA M, PUNNONEN K. Regulation of copper/zinc and manganese superoxide dismutase by UVB irradiation, oxidative stress and cytokines. *J Photochem Photobiol B* 1997; **40**: 288–293.
- [19] JURGOWIAK M, BIAŁKOWSKI K, OLIŃSKI R. Reactive oxygen species and gene expression regulation. *Post Biochem* 1996; **42**(1): 6–13.
- [20] KANG D H. Oxidative stress, DNA damage, and breast cancer. *AACN Clin Issues* 2002; **13**(4): 540–549.
- [21] KARUBE-HARADA A, SUGINO N, KASHIDA S, TAKIGUCHI S, TAKAYAMA H, YAMAGATA Y, NAKAMURA Y, KATO H. Induction of manganese superoxide dismutase by tumour necrosis factor- $\alpha$  in human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 2001; **7**(11): 1065–1072.
- [22] KORSMEYER S J, XIAO-MING YIN, OLTVAI Z N, VEIS-NOVACK D J, LINETTE G P. Reactive oxygen species and the regulation of cell death by the Bcl-2 gene family. *Bioch Biophys Acta* 1995; **1271**: 63–66.
- [23] LACY P, ABDEL-LATIF D, STEWARD M, MUSAT-MARCU S, MAN SF, MOQBEL R. Divergence of mechanisms regulating respiratory burst in blood and sputum eosinophils and neutrophils from atopic subjects. *J Immunol* 2003; **170**(5): 2670–2679.
- [24] LAM E W, ZWACKA R, SEFTOR EA, NIEVA DR, DAVIDSON BL, ENGELHARDT J F, HENDRIX M J, OBERLEY L W. Effects of antioxidant enzyme overexpression on the invasive phenotype of hamster cheek pouch carcinoma cells. *Free Radic Biol Med* 1999; **27**(5–6): 572–579.
- [25] LO YY, CONQUER JA, GRINSTEIN S, CRUZ TF. Interleukin-1 beta induction of c-fos and collagenase expression in articular chondrocytes: involvement of reactive oxygen species. *J Cell Biochem* 1998; **69**(1):19–29.
- [26] MANNA SK, ZHANG H J, YAN T, OBERLEY LW, AGGARWAL BB. Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappaB and activated protein-1. *J Biol Chem* 1998; **273**(21): 13245–13254.
- [27] MASUTANI H, YODOI Y. Thioredoxin. Overview. *Methods Enzymol* 2002; **347**: 279–286.
- [28] MAY MJ, GHOSH S. Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today* 1998; **2**(19): 80–88.
- [29] MURLEY JS, KATAOKA Y, HALLAHAN DE, ROBERTS JC, GRDINA DJ. Activation of NFkappaB and MnSOD gene expression by free radical scavengers in human microvascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2001; **30**(12): 1426–1439.
- [30] MUTHUSAMY N, LEIDEN J M. A protein kinase C-, Ras-, and RSK2-dependent signal transduction pathway activates the cAMP-responsive element-binding protein transcription factor following T cell receptor engagement. *J Biol Chem* 1998; **273**: 22841–22850.
- [31] MÜLLER JM, RUPEC RA, BAEUERLE PA. Study of gene regulation by NF-kappa B and AP-1 in response to reactive oxygen intermediates. *Methods* 1997; **11**: 310–312.
- [32] OBERLEY TD, ZHONG W, SZWEDA LI, OBERLEY LW. Localization of antioxidant enzymes and oxidative damage products in normal and malignant prostate epithelium. *Prostate* 2000; **44**(2): 144–155.
- [33] PAHL HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999; **18**: 6853–6866.
- [34] PINEDA-MOLINA E, LAMAS S. S-glutathionylation of NF-kappa B subunit p50. *Methods Enzymol* 2002; **359**:2 68–279.
- [35] PORNTADAVITY S, XU Y, KININGHAM K, RANGNEKAR VM, PRACHAYASITIKUL V, STCLAIR DK. TPA-activated transcription of the human MnSOD gene: role of transcription factors Sp-1 and Egr-1. *DNA Cell Biol* 2001; **20**(8): 473–481.



- [36] RAMIREZ-CARROZZI V, KERPPOLA T. Asymmetric recognition of nonconsensus AP-1 sites by Fos-Jun and Jun-Jun influences transcriptional cooperativity with NFAT1. *Moll Cell Biol* 2003; **23**(5): 1737–1749.
- [37] SANCHEZ-ALCAZAR JA, SCHNEIDER E, HERNANDEZ-MUNOZ I, RUIZ-CABELLO J, SILES-RIVAS E, DE LA TORRE P, BORNSTEIN B, BREA G, ARENAS J, GARESSE R, SOLIS-HERRUZO JA, KNOX AJ, NAVAS P. Reactive oxygen species mediate the down-regulation of mitochondrial transcripts and proteins by tumour necrosis factor-alpha in L929 cells. *Biochem J* 2003; **370**(Pt 2): 609–619.
- [38] STCLAIR DK, HOLLAND JC. Complementary DNA encoding human colon cancer manganese superoxide dismutase and the expression of its gene in human cells. *Cancer Res* 1991; **51**(3): 939–943.
- [39] SUZUKI YJ, MIZUNO M, PACKER L. Signal transduction for nuclear factor-kappa B activation. Proposed location of antioxidant-inhibitable step. *J Immunol* 1994; **153**: 5008–5015.
- [40] TEWES F, BÖL G F, BRIGELIUS-FLOHÉ R. Thiol modulation inhibits the interleukin (IL)-1-mediated activation of an IL-1 receptor-associated protein kinase and NF-kappa B. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 3015–3021.
- [41] WAN XS, DEVALARAJA MN, ST CLAIR DK. Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol* 1994; **13**(11): 1127–1136.
- [42] WANG T, ZHANG X, LI JJ. The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses. *Int Immunopharmacol* 2002; **2**(11): 1509–1520.
- [43] VALENTINE JF, NICK H S. Acute-phase induction of manganese superoxide dismutase in intestinal epithelial cell lines. *Gastroent* 1992; **103**: 905–912.
- [44] VISNER G A, DOUGALL WC, WILSON J M, BURR I A, NICK H S. Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. Role in the acute inflammatory response. *J Biol Chem* 1990; **265**(5): 2856–2864.
- [45] XU Y, PORNTADAVITY S, STCLAIR DK. Transcriptional regulation of the human manganese superoxide dismutase gene: the role of specificity protein 1 (Sp1) and activating protein-2 (AP-2). *Biochem J* 2002; **1,362**(Pt 2): 401–412.
- [46] ZELKO IN, MARIANI TJ, FOLZ RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*. 2002; **33**(3): 337–349.
- [47] ZHANG N. Characterization of the 5' flanking region of the human MnSOD gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **220**(1): 171–180.
- [48] ZHANG Y, ZHAO W, ZHANG HJ, DOMANN FE, OBERLEY LW. Overexpression of copper zinc superoxide dismutase suppresses human glioma cell growth. *Cancer Res* 2002; **62** (15): 1205–1212.
- [49] ZHAO Y, XUE Y, OBERLEY TD, KININGHAM KK, SHU-MEI L, HSIU-CHUAN Y, MAJIMA H, HINES J, ST CLAIR D. Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor formation by modulation of activator protein-1 signaling in a multistage skin carcinogenesis model. *Cancer Res* 2001; **61**: 6082–6088.
- [50] ZHOU LZ, JOHNSON AP, RANDO TA. NF- $\kappa$ B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med* 2001; **31**(11): 1405–1416.
- [51] ZHU C, HUANG Y, WEYDERT CJ, OBERLEY LW, DOMANN FE. Constitutive activation of transcription factor AP-2 is associated with decreased MnSOD expression in transformed human lung fibroblasts. *Antioxid Redox Signal* 2001; **3**(3): 387–395.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 11.07. 2003 r.

Przyjęto: 10.10.2003 r.

Adres autora: Katedra i Zakład Biochemii AM

02-097 Warszawa, ul Banacha 1

## MOLEKULARNE MECHANIZMY DZIAŁANIA CYTOKININ

### MOLECULAR MECHANISMS OF CYTOKININ ACTION

Alicja PIOTROWSKA, Romuald CZERPAK

Instytut Biologii, Zakład Biochemii Roślin, Uniwersytet w Białymstoku

*Streszczenie:* Cytokininy są hormonami roślinnymi, które stymulują podziały oraz różnicowanie się komórek. W ostatniej dekadzie, genetyczna i molekularna analiza mutantów dostarczyła cenny wkład w poznanie molekularnego mechanizmu działania tej klasy hormonów. W prezentowanej pracy podsumowano rezultaty badań zmierzających do poznania składników oraz zasad percepcji i funkcjonowania szlaku transdukcji sygnału cytokininowego w komórce roślinnej. Do tej pory zidentyfikowano kilka białek wiążących cytokininy: CK11, CRE1, AHK2/3/4, które najprawdopodobniej pełnią rolę receptorów tych hormonów oraz poznano kodujące je geny. Wspólną cechą receptorów jest to, że białka te mają katalityczną aktywność kinazy histydynowej. Zaproponowany szlak transdukcji sygnału cytokininowego przypomina bakteryjny, dwuskładnikowy układ odpowiedzi i opiera się na przenoszeniu grupy fosforanowej pomiędzy białkowymi składnikami. Poznano budowę i funkcję białek AHP, które pośredniczą w przenoszeniu sygnału cytokininowego na teren jądra komórkowego. Stwierdzono, że geny kodujące białka ARR tzw. regulatory odpowiedzi pełnią funkcję genów wczesnej odpowiedzi, których indukcja generuje typowe reakcje komórek roślinnych na cytokininy. Ostatnie postępy w badaniach cyklu komórkowego wskazały, że fitohormony te pełnią kluczową rolę w regulacji cyklu komórkowego, a mechanizm ten opiera się na indukcji ekspresji genu kodującego cyklinę D3. Poznanie, w jaki sposób zachodzi percepcja i przekazywanie sygnału cytokininowego przez komórkę, pozwoli zrozumieć wpływ tych hormonów na procesy biochemiczno-fizjologiczne roślin.

*Słowa kluczowe:* cytokininy, receptory, szlak transdukcji sygnału cytokininowego, geny wczesnych odpowiedzi, kinaza histydynowa, regulatory odpowiedzi, cyklina D3.

*Summary:* Cytokinins are plant hormones promoting cell division and differentiation. In the last decade, genetic and molecular analysis of mutants has provided valuable insights into molecular mechanisms of the action of this class of plant hormones. This presented paper focuses on the recent research results in the detecting components and the rules of perception and the function of cytokinin signal transduction pathway in plant cell. Till now, some of cytokinins binding proteins: CK11, CRE1, AHK2/3/4 have been identified as cytokinins receptors and their genes were also described. The common feature of these receptors is the fact that proteins possess catalytic activity of histidine kinase. The proposed cytokinin signal transduction pathway is a phosphorelay pathway similar to bacterial two-component response



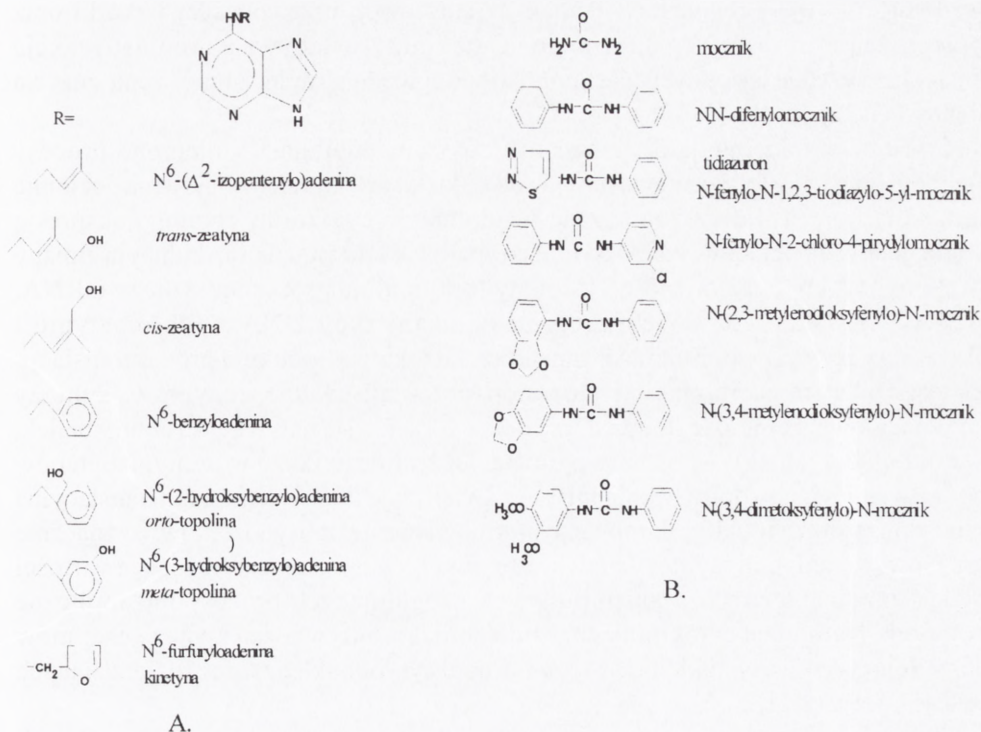
system. The structure and function of AHP proteins, which mediate in transferring of cytokinin signal to the nucleus, was found. It was described, that genes encoding of proteins ARR so-called response regulators, act as primary responses genes, which induction generates typical plant cells reactions to cytokinins. Recent advances in the study of cell cycle indicate, that cytokinins play a central role in the regulation of cell proliferation and this mechanism bases on the induction of gene expressions encoding cyclin D3. Discovering the way of perception and cytokinin signal transduction pathway, which occurs in the plant cell is required to understand the different effects of these phytohormones on plant biochemistry and physiology.

*Key words:* cytokinins, receptors, cytokinin signal transduction pathway, primary responses genes, histidine kinase, response regulators, cyclin D3.

## 1. WSTĘP

Pierwsza cytokinina, tj.  $N^6$ -furfuryloadenina, zwana potocznie kinetyną, została otrzymana przez Millera podczas preparatyki kwasów nukleinowych z komórek zwierzęcych i drożdży. Naturalną cytokininę po raz pierwszy wyizolował Letham w 1963 roku z zarodków kukurydzy (*Zea mays*) i nazwał ją zeatyną. Jest to  $N^6$ -( $\Delta^2$ -4-hydroksyizopentenylo) adenina, która powszechnie występuje w świecie roślin. Naturalnie spotykanymi w przyrodzie cytokininami są związki pochodne zasady purynowej adeniny, w której do grupy aminowej zlokalizowanej przy atomie węgla C-6 przyłączony jest najczęściej pięciowęglowy izoprenowy łańcuch alifatyczny, np. zeatyna, dihydrozeatyna,  $N^6$ - $\Delta^2$ -izopentenyloadenina lub rzadziej aromatyczny podstawnik benzyłowy w różnych modyfikacjach chemicznych, np.  $N^6$ -benzyloadenina i jej hydroksylowe pochodne:  $N^6$ -*orto*-hydroksybenzyloadenina i  $N^6$ -*meta*-hydroksybenzyloadenina, zwane potocznie *o*- i *m*-topolinami, gdyż po raz pierwszy zostały wykryte w topoli. Również znane są syntetyczne analogi chemiczne cytokinin adeninowych:  $N^6$ -famezyloadenina,  $N^6$ -geranyloadenina,  $N^6$ -cykloheksyloadenina oraz  $N^6$ -furfuryloadenina (kinetyna), jako jedna z najbardziej aktywnych biologicznie (ryc. 1). Aktywność cytokininową wykazują również niektóre związki syntetyczne, pochodne mocznika z podstawnikami fenyłowymi bądź nienasyconymi heterocyklicznymi, np. difenylomocznik, tidiazuron, *N*-fenylo- $N^7$ -2-chloro-4-pirydylomocznik, *N*-2,3- lub *N*-3,4-dimetoksyfenylo- $N^7$ -fenyłomocznik i *N*-2,3- lub *N*-3,4-metylenodioksyfenylo- $N^7$ -fenyłomocznik [12, 48, 49].

Cytokininy adeninowe i prawdopodobnie również mocznikowe w komórkach roślin mogą występować w formie wolnych zasad oraz w połączeniach *N*-glikozydowych, najczęściej z  $\beta$ -D-rybozą, rzadziej  $\beta$ -D-glukozą i sporadycznie  $\beta$ -D-ksylozą z azotem w pozycji  $N^9$  lub  $N^7$ . Przeważnie, łącząc się z rybozą, tworzą rybozyd, a po przyłączeniu do niego kwasu *orto*-fosforowego przekształcają się w mononukleotyd zwany rybotydem. Obecność takich nukleotydów stwierdzono w sąsiedztwie antykodonu i pętli bocznej tRNA, fragmencie poliadenylowym mRNA, a nawet w rRNA, gdzie spełniają one istotną rolę regulacyjną o charakterze stymulującym w procesie translacji. Najaktywniejsze biologicznie są cytokininy w formie wolnych zasad i połączeń rybozydowych [12, 21, 22, 25, 48, 49].



RYCINA 1. Chemiczna struktura bardziej znanych cytokinin: A – pochodnych adeniny i B – pochodnych moczniaka (wg [12, 49], zmienione)

Najbardziej charakterystycznym efektem biologicznym działania cytokinin jest stymulacja podziałów komórkowych w kulturach tkankowych roślin. W obrębie komórek cytokininy inicjują kario- i cytokinezę w podziale mitotycznym, głównie przez stymulację biosyntezy białek niezbędnych w tworzeniu się wrzeciona kariokinetycznego i kondensację chromosomów w chromatynę. Regulują one wiele różnorodnych procesów biochemiczno-fizjologicznych, przeważnie o charakterze anabolicznym, zachodzących w roślinach naczyniowych, takich jak: indukcja cyto-, histo-, morfo- i organogenezy, stymulacja intensywności przebiegu fotosyntezy, przyśpieszenie kwitnienia i rozwoju owoców oraz zarodków, stymulacja kiełkowania nasion fotoblastycznych, skracanie spoczynku pąków, oddziaływania symbiotyczne między bakteriami lub grzybami a roślinami wyższymi. Zwiększają także tolerancję roślin na stropy temperaturowe i odporność na infekcję patogenów. Ważną funkcją cytokinin jest opóźnianie, a nawet odwracanie starzenia się odciętych liści. Pod wpływem cytokinin następuje osłabienie dominacji wierzchołkowej w pędach głównych na rzecz bocznych. Stymulują one biosyntezę chlorofilu i rozwój chloroplastów, dzięki czemu komórki pozostają zielone nawet w ciemności. Fitohormony te niezbędne są do prawidłowego rozwoju woreczka zalążkowego i tworzenia się gamet roślinnych. Istotną cechą cytokinin jest stymulacja



wzrostu, rozwoju i regeneracji tkanek: mięksiszowej, przewodzącej i skórki oraz przedłużenie okresu wegetacyjnego. Cytokiny osłabiają natomiast reakcje kataboliczne, takie jak oddychanie komórkowe, powodując m.in. zmniejszenie zużycia tlenu [4, 5, 22, 25, 48, 49, 65].

Sposób, w jaki regulatory wzrostu i rozwoju regulują wymienione procesy fizjologiczne i morfologiczne roślin, już od kilku lat próbuje się wyjaśnić na poziomie molekularnym. Od dłuższego czasu wiadomo, że cytokiny regulują ekspresję wielu genów na poziomie zarówno transkrypcji, jak i translacji oraz indukują zmiany w aktywności wielu enzymów. Hormony te stymulują proces biosyntezy mRNA, rRNA i tRNA, przez zwiększenie dostępu matrycy DNA w chromatynie i aktywację enzymów polimeraz i transferaz. Cytokiny indukują proces translacji, zwłaszcza w fazie inicjacji i elongacji przez aktywację enzymów: syntazy aminoacylowej i aminoacylotransferaz oraz tworzenie się natywnej struktury białek, warunkującej ich aktywność biologiczną. Uczestniczą także w jednym z etapów potranskrypcyjnego dojrzewania mRNA. Zwiększają ilość i aktywność translacyjną rybosomów oraz indukują akumulację i formowanie się polirybosomów, co znacznie przyspiesza tempo biosyntezy białek. Efektem tych działań jest wzrost zawartości białek enzymatycznych, transportujących i regulujących procesy metaboliczne komórek. Natomiast cytokiny znacznie obniżają aktywność i syntezę enzymów degradujących kwasy nukleinowe (rybo- i deoksyrybonukleaz) oraz rozkładających białka [4, 5, 10, 12, 21, 22, 23, 45, 48, 49, 64, 65, 68, 79].

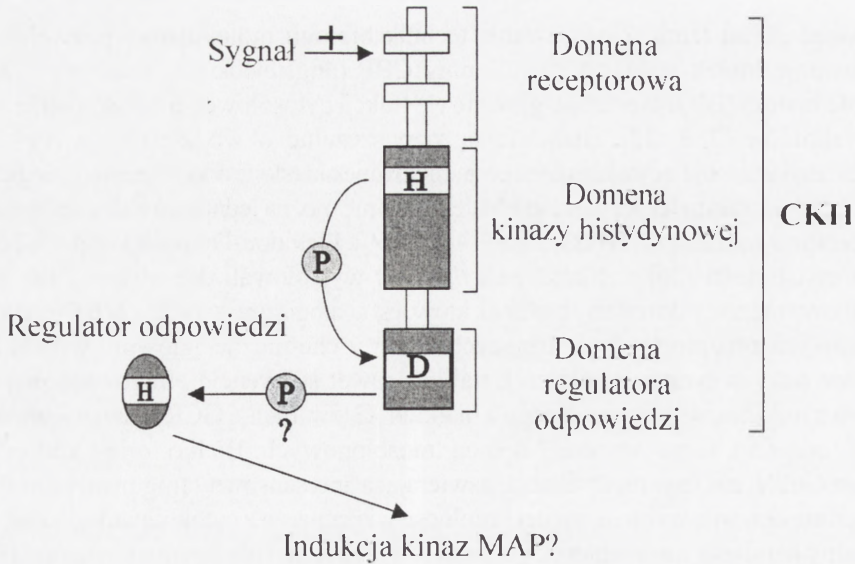
Interesującym aspektem hormonalnej regulacji ekspresji genów w komórkach roślinnych jest udział receptorów, które w sposób precyzyjny rozpoznają i odróżniają cytokiny od setek tysięcy innych substancji docierających do komórki. Powstanie kompleksu hormon-receptor, za pomocą nieodwracalnego wiązania niekowalencyjnego, indukuje kaskadę reakcji biochemicznych, w której uczestniczy cały zestaw składników wewnątrzkomórkowych, głównie o charakterze białkowym. Za pomocą szeregu przekaźników białkowych sygnał cytokinowy zostaje przeniesiony z receptora obecnego na powierzchni komórki do jej wnętrza oraz ulega amplifikacji i zamienieniu na formę molekularną. Białkowe przekaźniki mogą specyficznie oddziaływać z DNA, selektywnie indukując lub hamując transkrypcję określonych genów, regulując w ten sposób biosyntezę białka lub wpływając na szlaki metaboliczne, zmieniając aktywność wybranych enzymów. Skomplikowany proces percepcji, przekazywania i przekształcania sygnału cytokininowego w komórkach prowadzi do wytworzenia odpowiedzi fizjologiczno-metabolicznych roślin charakterystycznych dla tej klasy hormonów.

## 2. BADANIA NAD RECEPTORAMI CYTOKININ

Koncepcja cytokin jako hormonów roślinnych opiera się na obserwacji, że miejsca biosyntezy i działania hormonów są przestrzennie od siebie oddzielone. Stąd też poszukiwania receptorów rozpoczęły się od momentu odkrycia tych regulatorów wzrostu,

czyli ponad 30 lat temu. Zastosowanie technik biologii molekularnej pozwoliło na wyizolowanie białek wiążących cytokininę CBP (ang. *cytokinin binding protein*). Obecność białek CBP stwierdzono głównie we frakcji cytosolowej, mikrosomalnej oraz błon tylakoidów [7, 8, 32]. Białka te są rozpuszczalne w wodzie i mają zdolność specyficznego wiązania z cytokininami, co zainicjuje określone odpowiedzi fizjologiczne komórki. Jednak jak do tej pory żadne z białek CBP nie można jednoznacznie zdefiniować jako receptor cytokinin [17, 20, 23, 33, 39, 44, 46, 69]. Plakidou-Dymock i wsp. [54] oraz Humphrey i Botella [26] z *Arabidopsis thaliana* wyizolowali domniemany receptor cytokininowy należący do rodziny białek G, który jest analogiczny do znanych, bakteryjnych G-białkowych receptorów, rejestrujących zmiany chemiczne, głównie w składzie związków odżywczych w podłożu. Ustalono nawet sekwencję aminokwasową dla receptora cytokinin, współpracującego z białkiem G tzw. białka GCR1 (ang. *G-protein-coupled receptor*), które zawiera 7 domen transbłonowych. Białko to jest kodowane przez gen *GCR1*, zaś jego modyfikacja, zawierająca antysensowny fragment, powoduje szybką utratę aktywności biologicznej i zdolność wiązania się z cytokininami. Jednak ten ewentualny kandydat na receptora cytokinin również został niedawno odrzucony [34]. Dopiero odkrycie i wyizolowanie białka CK11 [32] pozwoliło na osiągnięcie znacznego postępu w zakresie poznania molekularnego mechanizmu działania cytokinin (ryc. 2). Określenie funkcji białek CK11 było możliwe dzięki uzyskaniu mutantów kalusów *Arabidopsis thaliana* o zmienionej odpowiedzi na cytokininę, oznaczonych jako *ckil* (ang. *cytokinin independent*). Transformowane rośliny *Arabidopsis* z nadekspresją genu *CK11*, pomimo niskiego endogennego poziomu tych fitohormonów w komórkach, ulegały szybkim podziałom komórkowym, wytwarzały kielki, były zielone i miały zahamowany wzrost korzenia, a więc wykazywały odpowiedzi fizjologiczne typowe dla cytokinin [8, 29, 32, 37]. Stąd też białko CK11 o masie cząsteczkowej 125 kDa i długości łańcucha polipeptydowego wynoszącym 1122 aminokwasów może pełnić rolę domniemanego receptora cytokinin. Sekwencja aminokwasowa CK11 bardzo przypomina bakteryjny, dwuskładnikowy układ transdukcji sygnału, składający się z dwóch białkowych elementów: receptora i regulatora odpowiedzi [1, 6, 9, 50]. Prawdopodobnie miejsce wiązania cytokinin, czyli domena receptorowa (domena N-końcowa) znajduje się w zewnątrzblonowej pętli białka CK11, pomiędzy dwiema domenami transbłonowymi. Jest to stosunkowo długi odcinek zawierający około 300 aminokwasów i 11 potencjalnych miejsc N-glikozytacji. Natomiast w wewnątrzkomórkowym fragmencie cząsteczki znajduje się domena pełniąca rolę enzymu kinazy histydynowo-asparaginianowej (fragment C-końcowy) i domena regulatora odpowiedzi. Przyłączenie cząsteczki cytokinin do domeny receptorowej indukuje dimeryzację i autofosforylację receptora. Wprowadzona grupa fosforanowa przenoszona jest na reszty histydynowe białka regulatorowego (miejsce fosforylacji His<sup>450</sup>), co powoduje jego aktywację. Następnie grupa fosforanowa przenoszona jest na reszty asparaginowe w domenie regulatora odpowiedzi (Asp<sup>1050</sup>), która po ufosforylowaniu aktywuje kolejne białka szlaku transdukcji sygnału (np. prawdopodobnie kaskadę kinaz MAP). Końcowym etapem szlaku, polegającego na przenoszeniu grupy fosforanowej, jest indukcja ekspresji specyficznych genów (ryc. 2) [7, 8, 9, 14, 23, 25, 27, 33, 37, 44, 49, 61, 66].



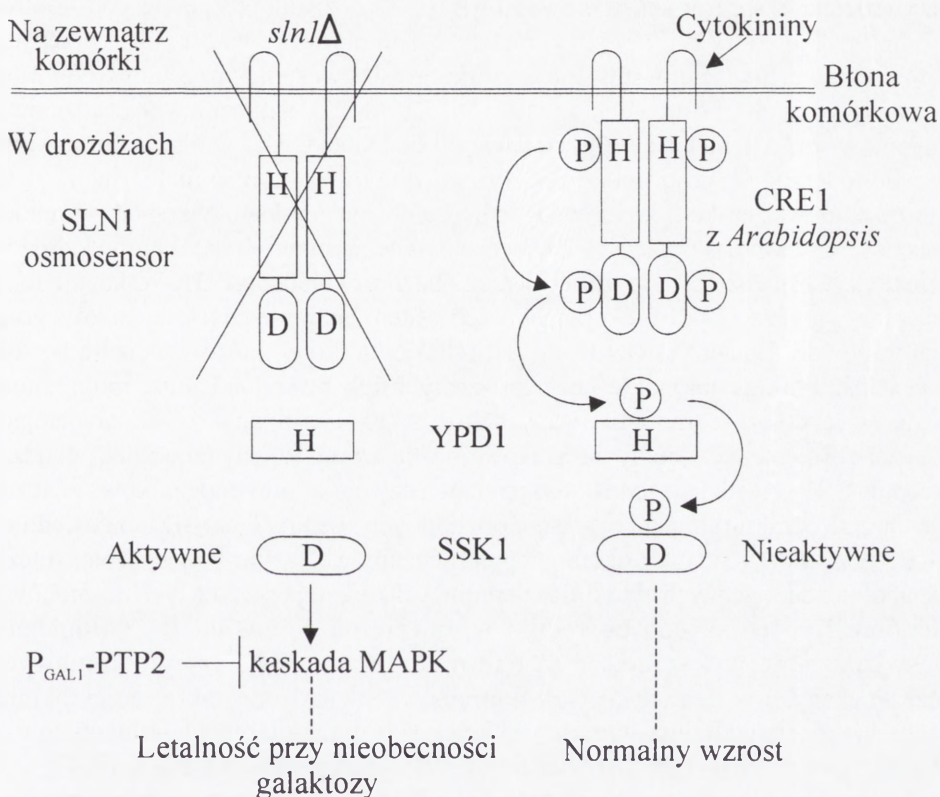


RYCINA 2. Kinaza histydynowa CKII jako receptor cytokinin. H oznaczają reszty histydynowe, D – reszty asparaginowe, a P – grupę fosforanową. Związanie się cytokininy z domeną receptorową indukuje autofosforylację domeny kinazy histydynowej, a następnie przeniesienie grupy fosforanowej z reszty histydynowej na resztę asparaginową w domenie regulatora odpowiedzi, co w następnym etapie powoduje fosforylację białek regulatorów odpowiedzi i prawdopodobnie aktywację kaskady kinaz MAP (wg [7, 8], zmienione)

Badania D'Agostino i wsp. [13] potwierdziły związek białka CKII z percepcją i przekazywaniem sygnału, gdyż CKII indukuje ekspresję genów należących do rodziny *ARR*, które są najprawdopodobniej genami wczesnych odpowiedzi na cytokininy. Efektem tego są fizjologiczne odpowiedzi komórek, np. formowanie się pędu i liści w kulturach tkankowych. Fenotypy *Arabidopsis* z nadekspresją genu *CKII* wskazują na istotną rolę białka CKII o charakterze kinazy histydynowej w szlaku transdukcji sygnału cytokininowego. Jednak dotychczas nie potwierdzono jego rzeczywistej roli u *Arabidopsis* oraz innych gatunków roślin *in vivo* [22, 27].

Kolejne hipotetyczne receptory cytokinin zostały odkryte przez dwie grupy badawcze: Inoue i wsp. [31] oraz Suzuki i wsp. [70]. Analizując liczne mutacje u *Arabidopsis* zidentyfikowali oni pojedynczą linię mutantów *cre1* (ang. *cytokinin resistant*), wykazującą zmniejszoną wrażliwość na obecność egzogennych cytokinin w teście na elongację korzenia. Jak się okazało, gen *CRE1* koduje nietypową hybrydową kinazę histydynową CRE1, która ma niewielkie podobieństwo do sekwencji aminokwasów białka CKII. Białko CRE1 ma dwie C-końcowe domeny regulatora odpowiedzi, dwie katalityczne domeny kinazy histydynowej i dwie transbłonowe domeny flankujące przypuszczalnie nową, zewnątrzkomórkową domenę N-końcową. Wszystkie zidentyfikowane mutacje dotyczą N-końcowego regionu receptora, a funkcja obu domen regulatora odpowiedzi na razie nie jest znana. Analiza fenotypu mutantów *cre1* oraz wysoka homologia z enzymem – kinazą histydynową nasuwa przypuszczenie, że białko

CRE1 może pełnić rolę receptora i generatora sygnału transdukcijnego, który pojawia się natychmiast w komórce po percepcji cytokinin [1, 41]. Jednak znaczących dowodów na to, że cytokiny rzeczywiście są ligandem dla CRE1 dostarczyły eleganckie eksperymenty z udziałem drożdży przeprowadzone przez Inoue i wsp. [31, 60]. Badania opierały się na prostym założeniu, że metaboliczne odpowiedzi komórek drożdży są wynikiem ekspresji genu *CRE1* w odpowiednim genetycznym tle heterologicznego układu i są zależne od cytokinin. Budowę oraz funkcjonowanie receptora cytokinin CRE1 u drożdży przedstawia rycina 3. Znaczenie genu *CRE1*, pochodzącego z *Arabidopsis*, poznano, gdy wprowadzono go do komórek zmodyfikowanych genetycznie drożdży, pozbawionych genu *SLN1*, i tam uzyskano jego ekspresję. Gen



RYCINA 3. Białko CRE1, pochodzące z *Arabidopsis thaliana*, jako receptor cytokinin. H – histydyna, A – asparagina, P – grupa fosforanowa, SLN1 – osmosensor, CRE1 – receptor cytokinin, YPD1 i SSK1 – białkowe składniki łańcucha transdukcji sygnału osmotycznego, P<sub>GAL1</sub>-PTP2 – gen fosfatazy znajdujący się pod kontrolą promotora *Gal*, MAPK – kinazy MAP, strzałki oznaczają aktywację, prosta zakończona linią poprzeczną oznacza wpływ hamujący. Mutanty drożdży  $\Delta sln1$  pozbawione białka SLN1 przy braku galaktozy w pożywce szybko tracą żywotność, ponieważ białka YPD1 i SSK1 ulegają defosforylacji, aktywując kinazy MAP. Obecność galaktozy indukuje ekspresję genu *PTP2*, a jego produkt hamuje kaskadę MAPK. Wprowadzenie do komórek drożdży białka CRE1 z *Arabidopsis* oraz dodanie do pożywki cytokinin stymuluje kolejno fosforylację białka SSK1 przez YPD1, które staje się nieaktywne, umożliwiając w ten sposób normalny wzrost (wg [31], zmienione)



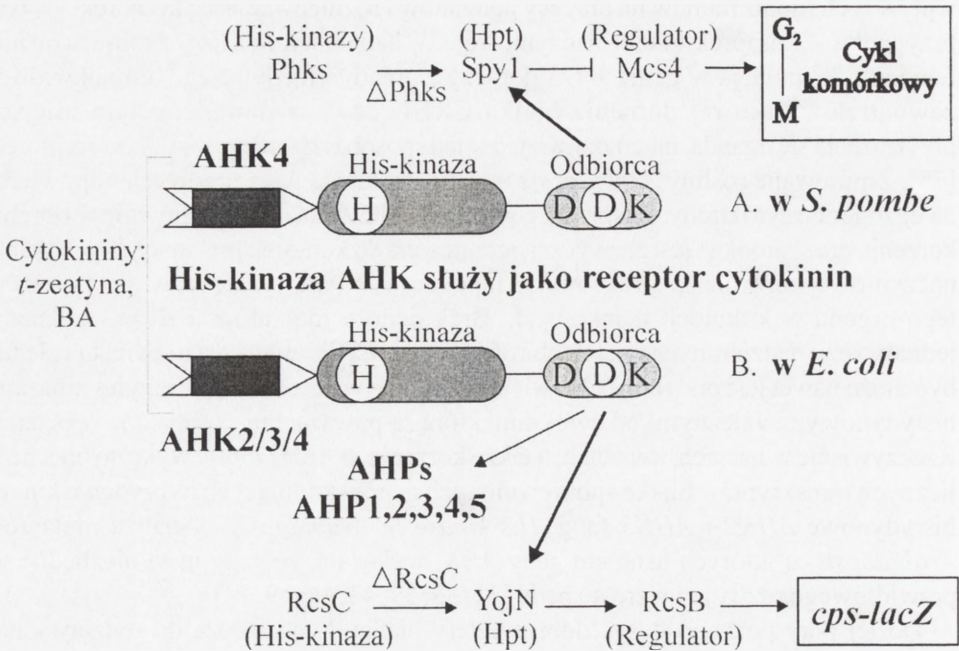
*SLN1* koduje drożdżową kinazę histydynową, pełniącą równocześnie funkcję osmosensora. W normalnych warunkach osmotycznych komórki zachodzi autofosforylacja reszty histydynowej białka *SLN1*. Następnie grupa fosforanowa przenoszona jest na resztę asparaginową w domenie odbiorcy tego białka, a przez kolejne białko pośredniczące *YPD1* trafia na białko *SSK1*, które pełni funkcję regulatora odpowiedzi. Fosforylacja białka *SSK1* hamuje jego zdolność do aktywowania kaskady kinaz *MAP* (ang. *mitogen-activated protein*). Mutanty drożdży *sln1Δ*, a więc pozbawione osmosensora *SLN1*, szybko tracą żywotność, ponieważ białko *SSK1* w tym przypadku ulega defosforylacji, co konstytutywnie aktywuje szlak kinaz *MAP*, kontrolujących ekspresję genów, odpowiedzialnych za adaptację komórek do wysokiego zasolenia [9, 38]. Żywotność komórek zmutowanych *sln1Δ* drożdży może być przywrócona ekspresją supresorowego genu *PTP2*, znajdującego się pod kontrolą promotora *Gal*, który koduje enzym fosfatazę, hamującą aktywność *SSK1* przez jego defosforylację. Stąd zdeformowane komórki drożdży z usuniętym genem *SLN1* mogą rosnąć tylko w obecności galaktozy [42, 56, 57, 58, 75]. Sztuczne wprowadzenie do mutantów *sln1Δ* genu *CRE1* oraz pojawienie się białka *CRE1* w błonie komórkowej znosiło tę letalność, gdyż białko *SSK1* ponownie mogło ulegać fosforylacji i w ten sposób hamować kaskadę kinaz *MAP*. Jednak efekt ten uzyskano tylko pod warunkiem obecności cytokinin w podłożu. Co więcej odwrócenie śmiertelności komórek drożdży dzięki ekspresji *CRE1* wymagało również obecności białka *YPD1*. Wskazuje to, że receptor cytokinin *CRE1* funkcjonuje przez system białkowych przekaźników grupy fosforanowej. Ponadto stwierdzono, że tylko cytokiny, które wykazują wysoką aktywność biologiczną, takie jak *trans*-zeatyna lub benzyloadenina, mogą znosić letalność genetycznie zmodyfikowanych drożdży, rosnących na pożywce zawierającej galaktozę. Również cytokiny mocznikowe, np. tidiazuron i difenylomocznik, pobudzają receptor *CRE1*. Rodzi się jednak tutaj pytanie, czy cytokiny mocznikowe znacznie różniące się strukturalnie od cytokinin pochodnych adeniny łączą się bezpośrednio z *CRE1*? Czy może jednak cytokiny fenylomocznikowe, mając wpływ na biosyntezę i metabolizm endogennych cytokinin adeninowych, regulują poziom tych hormonów w komórce i w ten sposób pośrednio wpływają na odpowiedzi fizjologiczne? Doświadczalnie wykazano, że są one inhibitorami oksydaz cytokininowych, uczestniczących w degradacji tych hormonów. Stwierdzono także, że cytokiny pochodne mocznika mogą stymulować konwersję cytokininowych nukleotydów do nukleozydów, czyli do form bardziej aktywnych biochemicznie [3, 6, 17, 48, 49].

Jaka jest więc biologiczna funkcja białka *CRE1* u roślin? Na to pytanie odpowiedź przyniosły badania kolejnych mutantów *Arabidopsis thaliana* określonych jako *wol* (ang. *wooden leg*). Wynikiem mutacji w genie *WOL* jest fenotyp z poważnym defektem w rozwoju tkanki naczyniowej korzenia i niższych partii hipokotyła, spowodowany zaburzeniami w podziałach oraz różnicowaniu się komórek prekursorowych floemu i ksylemu. Mutanty *wol* charakteryzują się brakiem nadziemnych części roślin zarówno u osobników dorosłych, jak i u kiełków. Jest to spowodowane tym, że rozwój pędu zależy od prawidłowego unaczynienia korzenia [43, 63]. Model fenotypu *wol* zgrabnie łączy rolę białka *CRE1/WOL* z funkcją receptora cytokinin oraz potwierdza stymulujący

wpływ tych fitohormonów na procesy podziałów i różnicowania się komórek – w tym przypadku – komórek tkanki naczyniowej. W badaniach *in vitro*, zaobserwowano bowiem, że mutacja w genie *WOL* dotyczy zamiany pojedynczego aminokwasu w zewnątrzkomórkowej domenie białka CRE1, czyli w domniemanym miejscu przyłączenia się liganda, uniemożliwiając w ten sposób wiązanie cytokinin z receptorem [75]. Zmutowane rośliny *Arabidopsis wol* nie wykazują więc typowych odpowiedzi na egzogenne cytokiny. Ekspresja genu *CRE1/WOL* ma miejsce głównie w obrębie korzenia oraz zarodka i jest zazwyczaj ograniczona do komórek prekursorowych tkanki naczyniowej korzenia np. prokambium hipokotyła, co warunkuje prawidłowy rozwój tego organu w kulturach tkankowych. Brak pędu u mutantów *wol/cre1* wskazuje jednak, że w nadziemnych częściach roślin białko CRE1 odgrywa niewielką rolę lub być może nawet jest ono tutaj całkowicie zbyteczne w porównaniu z innymi kinazami histydynowymi zależnymi od cytokinin, które są powszechnie spotykane w pędach. Rzeczywiście w liściach, kwiatach, a także korzeniach *Arabidopsis* wykryto obecność licznych transkryptów blisko spokrewnionych genów kodujących hybrydowe kinazy histydynowe *AHK2* i *AHK3* (ang. *His kinase in Arabidopsis*). Analiza mutantów *Arabidopsis*, u których usunięto geny *AHK*, wykazała, że geny te są niezbędne do prawidłowego rozwoju i wzrostu pędu [31, 33, 39, 43, 46, 49, 74].

Do tej pory poznano dosyć dobrze cztery białka, które należą do rodziny kinaz histydynowych *AHK*. Wiadomo, że białko *AHK1* pełni rolę osmosensora, co w swoich badaniach udowodnił Urao ze wsp. [75]. Dla pozostałych trzech kinaz histydynowych: *AHK2*, *AHK3* i *AHK4* sklonowano i ustalono sekwencję kodujących je odcinków cDNA. Jak się okazało, również sekwencja aminokwasów tych białek jest wysoce homologiczna z sekwencją białka CRE1, szczególnie w obrębie domniemanej domeny N-końcowej, wiążącej ligand. Podobnie jak CRE1 mają one również dwie domeny regulatora odpowiedzi w regionie C-końcowym. Białka *AHK2* i *AHK3* zawierają trzy domeny transbłonowe, a *AHK4* – tylko dwie. Trzy kinazy histydynowe: *AHK2*, *AHK3* i *AHK4* regulują aktywność promotorów genów *ARR*, które najprawdopodobniej są genami wczesnej odpowiedzi na cytokiny i indukują ich transkrypcję w protoplastach mezofilu [7, 8, 71]. Wyniki badań sugerują, że kinazy histydynowe *AHK2*, *AHK3* i *AHK4* prawdopodobnie mogą pełnić funkcje receptorów cytokinin u *Arabidopsis*. Aby dokładnie potwierdzić funkcję białek *AHK* jako receptorów cytokinin, w pracowni Suzuki i wsp. [71] przeprowadzono szereg doświadczeń z udziałem drożdży *S. pombe* i bakterii *E. coli* (ryc. 4). Drożdże w tym przypadku były wdziecznym obiektem badań, gdyż w ich komórkach szlak transdukcji sygnału składa się z trzech elementów, które najpierw same ulegają fosforylacji, a następnie przenoszą grupę fosforanową na pozostałe składniki białkowe. Grupa fosforanowa wędruje w podanej kolejności: Phk1/2/3 (trzy kinazy histydynowe w roli receptorów) → Spyl (Hpt) (białko transferowe zawierające histydyne, przenoszące grupę fosforanową) → Msc4 (regulator odpowiedzi, zawierający asparaginę). Jest to bardzo precyzyjnie funkcjonujący układ trzech białek, który kontroluje cykl komórkowy drożdży, umożliwiając przejście fazy G2 w fazę M. Mutanty  $\Delta phk1/2/3$  pozbawione genu kodującego kinazę histydynową Phk1/2/3 wykazują silne zaburzenia podziałów komórkowych. Po wprowadzeniu do komórek mutantów  $\Delta phk1/$





RYCINA 4. Model przedstawiający rolę kinaz histydynowych AHK2/3/4, pochodzących z *Arabidopsis* jako receptorów cytokinin w komórkach drożdży *S. pombe* (A) i bakterii *E. coli* (B). BA – benzyloadenina, H – histydyna, A – asparagina, K – lizyna, Phks – kinazy histydynowe u drożdży, Spyl1 (Hpt) – białko przenoszące grupę fosforanową, zawierające reszty histydynowe, Mcs4 – białkowy regulator odpowiedzi u drożdży. Mutanty drożdży pozbawione genów *Phks* wykazują zaburzenia mitozy podczas przejścia fazy G<sub>2</sub> w fazę M. Wprowadzenie do mutantów  $\Delta Phks$  kinazy histydynowej AHK4 i dodanie do pożywki cytokinin umożliwia normalny podział komórek. RcsC – bakteryjna kinaza histydynowa, YojN (Hpt) – białko bakteryjne, przenoszące grupę fosforanową, zawierające reszty histydynowe, RcsB – regulator odpowiedzi, *cps-lacZ* – operon *cps* sprzężony z genem *lacZ* odpowiedzialny za biosyntezę polisacharydów otoczki. Mutanty *E. coli* pozbawione genu *RcsC* nie produkują zewnątrzkomórkowych polisacharydów. Wprowadzenie do mutantów  $\Delta RcsC$  genów kodujących kinazy histydynowe AHK2/3/4 i dodanie do podłoża cytokinin przywraca tę właściwość. Strzałki oznaczają symulację, a prosta zakończona linią poprzeczną – inhibicję (wg [71], zmienione)

2/3 genu *AHK4*, kodującego w *Arabidopsis* kinazę histydynową AHK4, okazało się, że komórki drożdży zaczynały się normalnie dzielić i miały normalną wielkość. Stąd też skutki delecji genu  $\Delta phk1/2/3$  zostały zniesione ekspresją genu *AHK*. Jednak należy tutaj podkreślić, że efekt ten miał miejsce tylko wtedy, gdy w pożywce znajdowały się cytokiny adeninowe: *trans*-zeatyna lub benzyloadenina. Świadczy to o tym, że białko AHK4 istotnie pełni rolę receptora cytokinin, które mają stymulujący wpływ na podziały komórkowe. Duże podobieństwo strukturalne białek AHK, zwłaszcza w obrębie domeny N-końcowej, czyli miejsca przyłączenia się hormonu, pozwala przypuszczać, że również AHK2 i AHK3 są funkcjonalnymi receptorami cytokinin.

Kolejny dowód na funkcję AHK4 jako receptora cytokinin dostarczyły eksperymenty wykonane na *E. coli*. Na bakteryjny, białkowy układ przenoszenia grupy fosforanowej – analogiczny do opisanego systemu, występującego u drożdży – składają się następujące elementy: RcsC (hybrydowy receptor zbliżony strukturalnie i funkcjonalnie do kinazy AHK4) → YojN (Hpt) (białkowy czynnik, pośredniczący w przenoszeniu grupy fosforanowej, zawierający histydynę) → RcsB (regulator odpowiedzi zawierający asparaginę) [47, 71]. Ten szczególny szlak transdukcji sygnału, polegający na przenoszeniu grupy fosforanowej z histydyny na asparaginę, włączony jest w regulację pozakomórkowej biosyntezy polisacharydów wchodzących w skład otoczki bakteryjnej przez aktywację operonu *cps* (ang. *capsular polysaccharide synthesis*). Funkcjonowanie łańcucha RcsC → YojN → RcsB może być łatwo monitorowane pomiarem aktywności enzymu  $\beta$ -galaktozydazy. Jak się spodziewano, mutacja w genie *RcsC* u *E. coli* powoduje, że enzym ten traci aktywność. Sztuczne wprowadzenie do mutantów  $\Delta rcsC$ , pozbawionych receptorów RcsC, genów kodujących kinazy AHK2, AHK3 lub AHK4, które zostały wyizolowane z *Arabidopsis* oraz dodanie do agaru cytokinin indukowało ekspresję operonu *cps* sprzężonego z genem *lacZ*, który koduje enzym  $\beta$ -galaktozydazę. Widocznym efektem zamiany białka RcsC na AHK u bakterii oraz działania tych fitohormonów była synteza polisacharydów otoczki. Na podstawie tych dwóch prostych eksperymentów można wyciągnąć wnioski, że kinazy histydynowe należące do rodziny białek AHK rzeczywiście pełnią funkcje receptorów cytokinin i są pierwszym etapem w transdukcji sygnału hormonalnego, prowadzącego do zmian w ekspresji genów. Wyniki tych badań zwracają uwagę na to, że kinazy AHK, aby efektywnie uczestniczyć w odpowiedziach fizjologicznych komórek na cytokininy wymagają obecności białek przenoszących grupę fosforanową z histydyny białek YojN (*E. coli*) lub Spy1 (*S. pombe*) na asparaginę białek RcsB (*E. coli*) lub Msc4 (*S. pombe*). Nie jest jednak wiadomo, czy białka AHK mogą także wchodzić w interakcje z cytokininami mocznikowymi i w jaki sposób funkcjonują *in vivo* w komórkach *Arabidopsis* czy u innych gatunków roślin naczyniowych [21, 50, 70].

Odkrycie do tej pory kilku typów hybrydowych kinaz histydynowych (CRE1, AHK2, AHK3, AHK4) sprawia, że w szlaku transdukcji sygnału cytokininowego może najprawdopodobniej uczestniczyć wiele, nieznanych dotychczas elementów, uczestniczących w percepcji tych fitohormonów, które są najprawdopodobniej homologiczne z opisanymi wyżej, znanymi receptorami [2, 17, 23, 28, 31, 70, 74, 77].

### 3. SKŁADNIKI SZLAKU TRANSDUKCJI SYGNAŁU CYTOKININOWEGO – BIAŁKA AHP

W ostatnich kilku latach zidentyfikowano pozostałe składniki – poza receptorami – uczestniczące w przekazywaniu sygnału cytokininowego od miejsca percepcji cytokinin przez receptory umieszczone w błonie komórkowej do miejsca docelowego, czyli indukcji ekspresji określonych genów. Dzięki temu molekularny mechanizm działania cytokinin staje się coraz lepiej poznany. Badania Imamura i wsp. [30] oraz Suzuki i



wsp. [70, 71] potwierdziły obecność w *Arabidopsis* białek, zawierających reszty histydynowe, które uczestniczą w przenoszeniu grupy fosforanowej z receptora, a dokładniej z reszty histydynowej obecnej w domenie odbiorcy (domeny „*receiver*”) kinazy histydynowej, na reszty asparaginowe znajdujące się w domenie odbiorcy białka regulatora odpowiedzi. Białka te więc wchodzi w interakcje z poznanymi hipotetycznymi receptorami cytokinin (CKII, CRE1 czy rodziną białek AHK) i stanowią kolejne ogniwo szlaku przekazywania sygnału cytokininowego. Białka te określamy jako AHP – fosfotransferowe białka zawierające histydynę (ang. *His-containing phosphotransfer proteins of Arabidopsis*). Do tej pory zidentyfikowano, sklonowano i ustalono sekwencję cDNA dla 6 genów, kodujących domniemane białka AHP, które są odpowiedzialne za przenoszenie grupy fosforanowej przy udziale reszty histydynowej. Białka te zbudowane są z około 127–157 aminokwasów. Wysoka homologia sekwencji aminokwasów 6 poznanych dotychczas białek AHP potwierdza, że są one ze sobą blisko spokrewnione. Każde z białek AHP1–AHP5 zawiera charakterystyczną domenę, w której można wyróżnić wspólny, wysoce konserwatywny motyw: XHQXKGSSXS, zawierający domniemane miejsce fosforylacji w miejscu reszty histydynowej, która prawdopodobnie w pierwszym etapie ulega fosforylacji, a następnie uczestniczy w przekazaniu tej grupy fosforanowej na kolejne składniki szlaku transdukcji sygnału. Natomiast w białku AHP6 reszta histydynowa w tym motywie jest zamieniona na resztę asparaginową, która również może ulegać fosforylacji. Białka te funkcjonują więc jako most przenoszący grupę fosforanową między resztami histydynowymi obecnymi w domenie receptorowej (odbiorcy) hybrydowej kinazy a resztami asparaginowymi w domenie białka regulatora odpowiedzi. Ich zadaniem jest więc przekazanie sygnału od miejsca jego percepcji przez receptory umieszczone w błonie komórkowej na teren jądra komórkowego, gdzie zachodzi ekspresja określonych genów [28, 51, 76].

#### 4. GENY WCZESNYCH ODPOWIEDZI NA CYTOKININY

Związanie się cytokinin z receptorami indukuje w komórkach *Arabidopsis* biosyntezę i aktywację białek określanych jako regulatory odpowiedzi ARR (ang. *response regulators in Arabidopsis*). Wcześniejsze eksperymenty D’Agostino i wsp. [13, 14, 15] dowiodły, że podwyższona ekspresja genów *ARR* u *Arabidopsis*, podobnie jak u kukurydzy, tytoniu i ryżu ma miejsce pod wpływem cytokinin i jest odporna na inhibitory biosyntezy białek (np. cykloheksimid). Mutanty *Arabidopsis* z delecją genów *ARR* były częściowo niewrażliwe na podanie egzogennych cytokinin podczas próby regeneracji pędu i w teście na elongację korzenia. Natomiast rośliny z nadekspresją genów *ARR* wykazywały odpowiedzi charakterystyczne dla tych hormonów nawet przy ich braku w podłożu; były to: intensywne podziały komórkowe, opóźnianie procesu starzenia się, tworzenie się pędu i liści w kulturach tkankowych [60]. Ekspresja genów regulatorów odpowiedzi *ARR* ma miejsce głównie w obrębie merystemu korzenia i pędu, czyli w docelowych tkankach działania cytokinin. Ponad to sekwencja cDNA tych genów przypomina sekwencję genów, kodujących bakteryjne, dwuskładnikowe

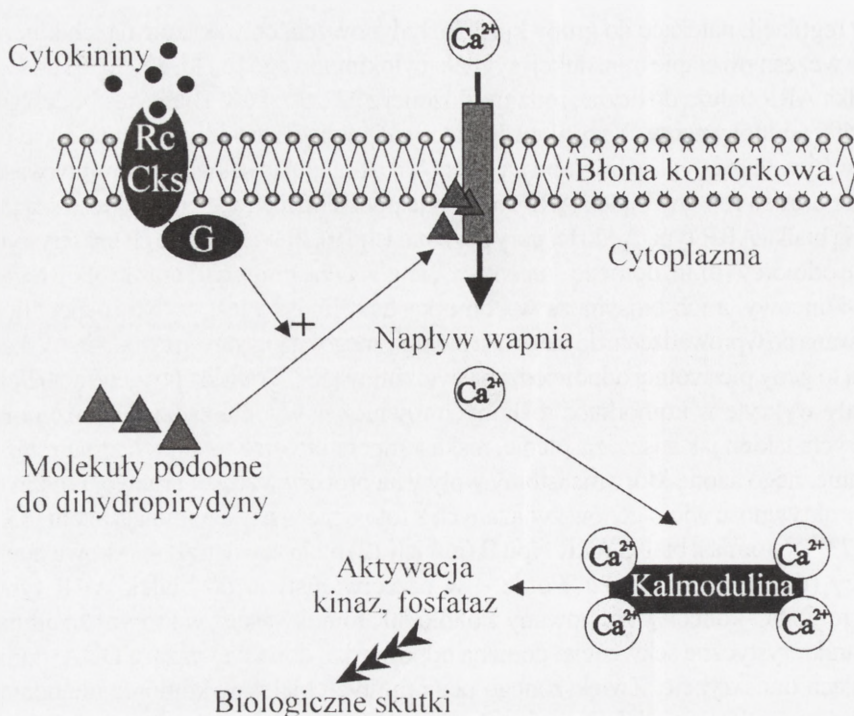
układy regulacji, należące do grupy kinaz histydynowych, co wskazuje na ich kluczową rolę we wczesnym etapie transdukcji sygnału cytokininowego [6, 30, 35, 50, 61].

Białka ARR należą do licznej rodziny złożonej z 22 członków. Białka te zbudowane są z 122–690 aminokwasów. Wszystkie regulatory odpowiedzi zawierają charakterystyczne, konserwatywne reszty: asparaginową i lizynową. Analizując sekwencję aminokwasów i strukturę domen rodziny białek ARR, można je podzielić na dwie grupy. Pierwszą grupę stanowią białka ARR typu A (do tej pory poznano ich 10). Zawierają one charakterystyczną domenę odbiorcy (m.in. domenę „*receiver*”, ang. *receiver domain*) oraz krótkie regiony: N- i C-końcowy, a ich biosynteza w komórkach roślinnych jest szybko i specyficznie indukowana po wprowadzeniu do materiału biologicznego egzogennych cytokinin. Wskazuje to, że są to geny pierwotnej odpowiedzi na cytokiny [53]. Transkrypty genów *ARR* typu A zostały wykryte w komórkach roślinnych również w wyniku zadziałania czynników stresowych, takich jak susza, zasolenie, niska temperatura oraz na skutek zmian stężenia nieorganicznego azotu, który ma istotny wpływ na procesy wzrostu i rozwoju roślin oraz reguluje aktywność wielu genów związanych z fotosyntezą czy asymilacją azotu [35, 61, 62, 72, 73]. Natomiast białka ARR typu B (jest ich 12) mają zewnątrzkomórkową domenę odbiorcy (domenę „*receiver*”) oraz – w przeciwieństwie do białek ARR typu A – długi region C-końcowy zbudowany z około 80 aminokwasów, w którym znajdują się trzy charakterystyczne sekwencje: domena odpowiedzi, domena wiążąca DNA, domena aktywująca transkrypcję. Zwiększonego poziomu tych białek w komórce nie udało się wykryć w ciągu 10 min od dodania hormonów, stąd też kodujących je genów nie można zaliczyć do genów wczesnych odpowiedzi cytokininowych. Różnicę między dwoma klasami białek ARR potwierdza niska homologia sekwencji aminokwasów w domenie odbiorcy (domenie „*receiver*”) od 24% do 60% w przeciwieństwie do wysokiej homologii pomiędzy członkami tego samego typu od 60% do 90%. Białka ARR typu B mają cechy czynników transkrypcyjnych dzięki obecności w regionie C-końcowym konserwatywnego motywu bogatego w glutaminę i prolinę, który przypomina domenę wiążącą DNA - c-Myb, lokalizacji jądrowej i zdolności aktywacji transkrypcji po przyłączeniu się do DNA w sposób specyficzny od sekwencji (np. GAL4). Pod wpływem cytokinin następuje aktywacja białek ARR typu B, które wiążą się z promotorem genów kodujących białka ARR typu A, co inicjuje ich transkrypcję, a następnie szybki wzrost poziomu tych białek na terenie jądra komórkowego. Dowodzi to, że między dwiema grupami białek ARR, które są istotnymi składnikami łańcucha transdukcji sygnału cytokininowego, istnieje ścisły związek biochemiczny, gdyż białka ARR typu B pełnią kluczową rolę w regulacji biosyntezy ARR typu A, zależnej od cytokinin [6, 29, 35, 40, 45, 48, 49, 51, 52].

## 5. MODEL TRANSDUKCJI SYGNAŁU CYTOKININOWEGO U *ARABIDOPSIS*

Zastosowanie w badaniach nad hormonami roślinnymi technik molekularnych i genetycznych przybliżyło nam znacznie wiedzę na temat mechanizmu działania cytokinin na poziomie pojedynczej komórki. Jedną z hipotez przekazywania sygnału





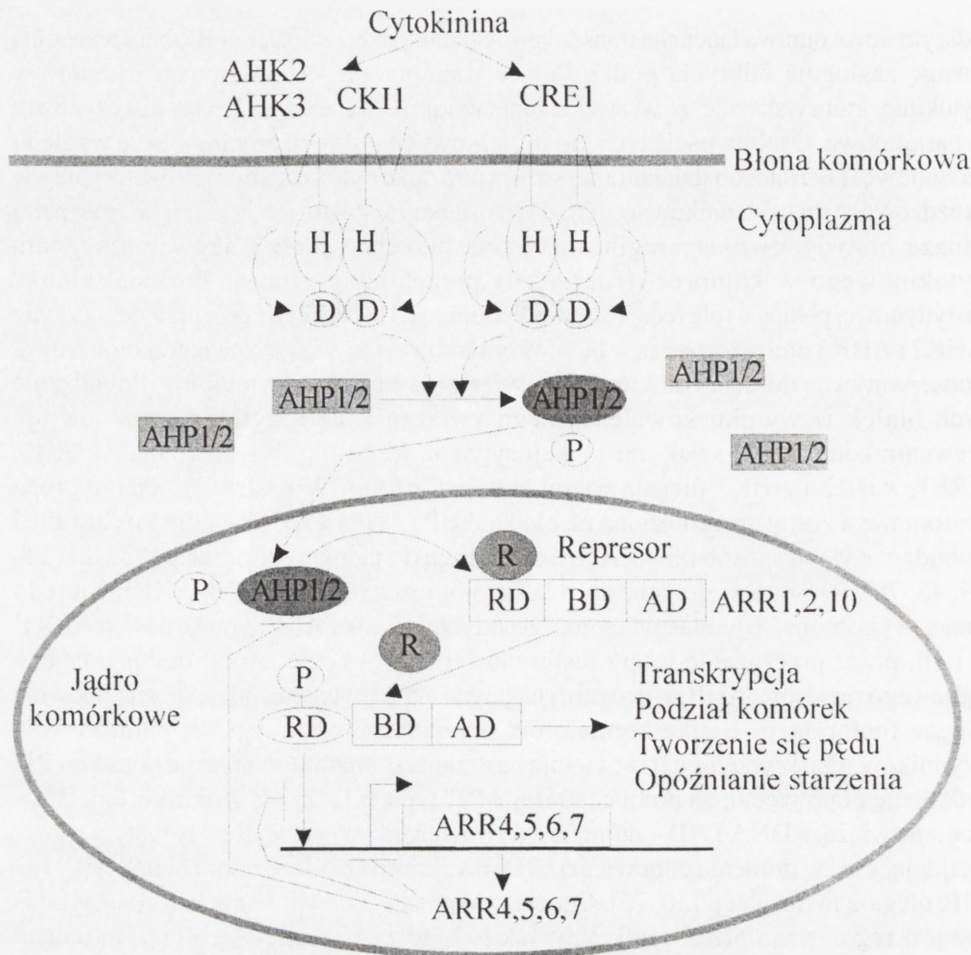
RYCINA 5. Udział białka G i kationów wapnia w szlaku transdukcji sygnału cytokininowego. RcCks – receptor cytokinin, G – białko G, + oznacza aktywację (wg [7, 8], zmienione)

wewnątrz komórki opiera się na istnieniu kaskady biochemicznych reakcji z udziałem białka G, które pośredniczy w odpowiedziach komórek na hormony. Model transdukcji sygnału cytokininowego przy udziale białka G przedstawia rycina 5. Związanie się cząsteczki cytokininy z receptorem aktywuje trimerowe białko G, które następnie pobudza enzym fosfolipazę C. Efektem tego jest powstanie wtórnych cząsteczek informacyjnych: trifosforanu inozytoli (IP<sub>3</sub>) i diacyloglicerolu. IP<sub>3</sub> wiąże się z kanałami Ca<sup>2+</sup> i otwiera je, powodując znaczny wzrost stężenia wapnia w cytozolu. Następnie kationy wapnia wiążą się z kalmoduliną, która dzięki temu zmienia swą stabilność konformacyjną i nabywa możliwość oddziaływania na szereg białek docelowych. Szczególnie ważną klasą białek docelowych są kinazy i fosfatazy, które także mogą wpływać na pozostałe procesy komórkowe przez fosforylację lub defosforylację wybranych białek, będących już właściwą odpowiedzią na działanie regulatorów wzrostu i rozwoju roślin [7, 8].

Natomiast Hwang i Sheen [29] zaproponowali inny model percepcji i przekazywania sygnału cytokininowego w komórkach *Arabidopsis*, który integruje dotychczasowe odkrycia w tej dziedzinie. Do tej pory zidentyfikowano około 40 genów uczestniczących w odpowiedziach na cytokininy, poznano kilka białek, np. CK11, CRE1, rodzinę kinaz AHK, które najprawdopodobniej pełnią rolę receptorów tych fitohormonów oraz

odkryto nowe ogniwa łańcucha transdukcji sygnału – rodzinę białek AHP. Na szczególną uwagę zasługują odkrycia podkreślające wspólną cechę białkowych receptorów cytokinin, która wskazuje, że wszystkie funkcjonują jako enzymy – kinazy histydynowo/asparaginowe. Osobliwością tych kinaz białkowych jest fakt, że zarówno ze względu na budowę, jak i sposób działania wykazują one duże podobieństwo do bakteryjnego i drożdżowego dwuskładnikowego układu transdukcji sygnału, gdzie kluczową rolę pełni kinaza histydynowo-asparaginowa. Szlak percepcji i przekazywania sygnału cytokinowego w komórce *Arabidopsis* prezentuje rycina 6. Poznane kinazy histydynowe, pełniące rolę receptorów cytokinin: CK11, CRE1, a także prawdopodobnie AHK2 i AHK3 umieszczone są w błonie komórkowej i zawierają zewnątrzkomórkową, konserwatywną domenę, do której przyłączają się ligandy – cytokininy. Pobudzenie tych białek w wyniku kowalencyjnego związania się z cytokininami inicjuje wewnątrzkomórkowy szlak transdukcji sygnału. Reszty histydynowe białek CK11, CRE1, AHK2 i AHK3 ulegają wtedy autofosforylacji. W następnym etapie grupa fosforanowa zostaje przeniesiona na białka AHP (AHP1 i AHP2). Ufosforylowane i pobudzone w ten sposób białka AHP1/2 wędrują do jądra komórkowego [22, 27, 28, 29, 48, 70]. Pomimo że dotychczas rola fizjologiczna rodziny białek AHP nie jest do końca wyjaśniona, to jednak wiadomo, że aktywują białka ARR typu B, a więc ARR1, 2 i 10, przez przekazanie grupy fosforanowej i uwolnienie ich od domniemanego jądrowego represora. AHP po defosforylacji wracają do cytozolu, gdzie mogą ponownie ulegać fosforylacji. Białka regulatorów odpowiedzi ARR typu B, pełniące rolę czynników transkrypcyjnych, zawierają następujące, charakterystyczne domeny: RD – domenę odpowiedzi, za pomocą której ARR typu B łączy się z represorem, BD – domenę wiążącą DNA i AD – domenę aktywującą transkrypcję. Reszty histydynowe, znajdujące się w domenie odpowiedzi (RD) uwolnionych od represora białek ARR1, 2 i 10, ulegają fosforylacji [50, 75]. Chociaż ekspresja genów kodujących ARR typu B nie jest regulowana przez cytokininy, jak to było zaznaczone wcześniej, to jednak obecność lub brak domniemanego receptora cytokinin wpływa na ich aktywność, a w konsekwencji na odpowiedzi indukowane przez tą grupę hormonów, np. tworzenie się pędów, stymulację podziałów komórkowych czy opóźnianie starzenia się liści. Stąd też białka ARR typu B są ważnym elementem sygnalizacji cytokininowej. Aktywowane w ten sposób białka ARR typu B w następnym etapie przyłączają się do promotora genów kodujących białka ARR typu A (ARR4, 5, 6, 7), czyli domniemanych genów wczesnej odpowiedzi na cytokininy. Zwiększenie tempa transkrypcji tych genów oraz pojawienie się znacznych ilości białek ARR typu A w komórce hamuje, na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego, ekspresję genów ARR typu A, a w konsekwencji ich własną biosyntezę. Indukcja transkrypcji genów ARR4, 5, 6 i 7 jest niezbędna do zajścia w komórce roślinnej procesów biochemiczno-fizjologicznych kontrolowanych przez tą klasę hormonów. Przykładem tego mogą być najnowsze badania Kimura i wsp. [36] przeprowadzone na hodowli komórkowej *Nicotiana tabacum*, które wykazały, że cytokininy indukują w chloroplastach ekspresję genów: *Cig1* związanego z syntezą chlorofilu i *Cig2* odpowiedzialnego za syntezę czynnika białkowego eIF2b, regulującego inicjację translacji. Również Chikano i wsp. [11] w badaniach na





RYCINA 6. Model przedstawiający szlak transdukcji sygnału cytokininowego w komórce rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*): H – histydyna, A – asparagina, P – grupa fosforanowa, AHK2/3, CK11, CRE1 – receptory cytokinin, AHP1/2 – białka przenoszące grupę fosforanową, ARR1,2,10 – białka regulatory odpowiedzi typu B, ARR4,5,6,7 – białka regulatory odpowiedzi typu A, symbol ARR4,5,6,7 wpisany w prostokąt oznacza geny kodujące odpowiednie białka ARR, RD – domena odpowiedzi, BD – domena wiążąca DNA, AD – domena aktywacji transkrypcji, R – przypuszczalny represor, symbole literowe białek wpisane w prostokąt oznaczają, że są one nieaktywne, a w elipsie – ufosforowane i aktywne, strzałki oznaczają aktywację składników łańcucha transdukcji sygnału cytokininowego, a prosta zakończona poprzeczną linią – wpływ hamujący (wg [29, 66], zmienione)

rzodkiewniku wykazali, że dwa geny *AtSR1* i *AtSR2*, związane z metabolizmem cukrów, z udziałem kinazy białkowej SNF1 ulegają ekspresji pod wpływem cytokinin. Między innymi stwierdzono, że benzyloadenina przez gen *AtSR2*, odpowiedzialny za specyficzną fosforylację, reguluje aktywność syntazy sacharazowej.

Jest jednak wielce interesujące, w jaki sposób zwiększenie się ilości białek ARR typu A w jądrze komórkowym pod wpływem cytokinin prowadzi do regulacji procesów zachodzących podczas cyklu komórkowego, aktywacji podziałów komórkowych,

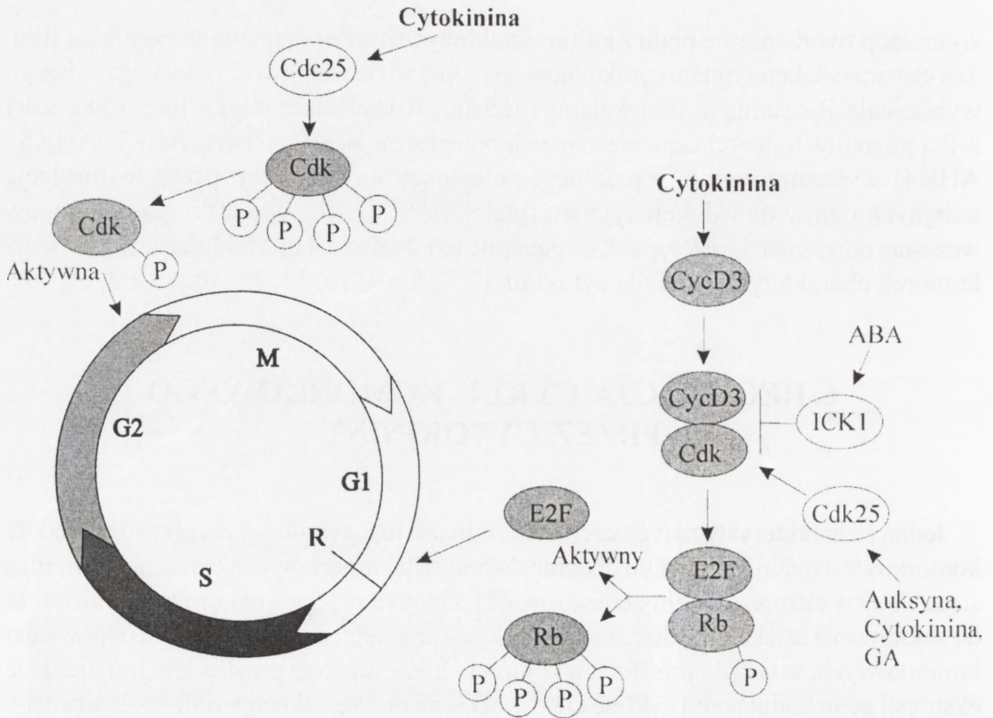
stymulacji tworzenia się pędu z kultur tkankowych oraz opóźnienia starzenia się liści. Ten etap transdukcji sygnału cytokininowego budzi wiele wątpliwości i wymaga dalszego wyjaśnienia. Reasumując, molekularny mechanizm działania cytokinin mimo obecności kilku poznanych dotychczas białkowych receptorów (CK11, CRE1, AHK2, AHK3 i AHK4) wykazuje podobny przebieg, polegający na aktywacji przez fosforylację kolejnych ogniw transdukcji sygnału (białek AHP i ARR typu B) i indukcji genów wczesnej odpowiedzi *ARR* typu A, co generuje fizjologiczne i morfologiczne odpowiedzi komórek charakterystyczne dla cytokinin [2, 7, 8, 14, 16, 24, 27, 40, 47, 62, 66, 77].

## 6. REGULACJA CYKLU KOMÓRKOWEGO PRZEZ CYTOKININY

Jedną z charakterystycznych cech cytokinin jest ich stymulujący wpływ na podziały komórkowe u roślin. W wyniku dodania do hodowli komórkowych cytokinin stwierdza się zmiany w ekspresji wielu genów [64, 65]. Geny te są więc znakomitymi obiektami do studiowania szlaku transdukcji sygnału, który prowadzi do indukcji wielu odpowiedzi komórkowych, w tym do proliferacji komórek. Interesującym przykładem jest indukcja ekspresji genu kodującego cyklinę D3 (*CycD3*) po dodaniu do materiału biologicznego egzogennych cytokinin np. *trans*-zeatyny lub benzyloadeniny [19, 55, 59]. Cyklina *CycD3* pełni ważną rolę w regulacji cyklu komórkowego podczas przejścia fazy G1 w fazę S. Ekspresja genu *CycD3* została stwierdzona głównie w dzielących się komórkach: merystemu pędu, zawiązkach liści, pąkach, prokambium, tkance naczyniowej rozwijających się liści [59]. Cytokiny wzmagają transkrypcję genu *CycD3* w tych tkankach. Natomiast nadekspresja genu *CycD3* u roślin w nieobecności cytokinin wzmagają tempo podziałów komórkowych, a same komórki stają się zielone. Wyniki tych badań wskazują na istniejące zależności między cytokininami, indukcją transkrypcji genu kodującego cyklinę D3, a regulacją cyklu komórkowego. Szlak transdukcji sygnału cytokininowego prowadzący do inicjacji podziałów komórkowych jest przykładem łańcucha odbierania i przekazywania sygnału hormonalnego, w którym nie uczestniczą opisane w poprzednich rozdziałach: kinazy histydynowe, białka AHP oraz białka ARR, czyli poznane elementy biorące udział w przenoszeniu grupy fosforanowej. Sposób oddziaływania cytokinin na podziały komórek roślinnych różni się od przedstawionego w poprzednim rozdziale modelu transdukcji sygnału hormonalnego, co przedstawia schemat na rycinie 7.

Poznanie molekularnego mechanizmu regulacji podziałów komórkowych przez te fitohormony było możliwe dzięki sklonowaniu z *Arabidopsis* genów kodujących białka z rodziny cyklin (*CycA*, *CycB* i *CycD*) oraz wyizolowaniu kinazy zależnej od cyklin Cdk (ang. *cyclin dependent kinase*) i białkowych inhibitorów kinaz zależnych od cyklin ICK (ang. *cyclin dependent protein kinases inhibitors*). Pierwsze trzy cykliny typu D, jakie zostały dokładnie poznane dzięki analizie mutantów drożdży to: *CycD1*,





RYCINA 7. Rola cytokinin w regulacji cyklu komórkowego roślin: Cdc25 – fosfataza regulująca podziały w cyklu komórkowym, Cdk oznacza kinazę zależną od cyklin, CycD3 – cyklina typu D, E2F – czynnik elongacji, ICK1 – inhibitor kinazy zależnej od cyklin, P – grupa fosforanowa, R – punkt restrykcji, Rb – antyproliferacyjny czynnik białkowy (supresor nowotworu siatkówki), ABA – kwas absycynowy, GA – giberelina. Strzałkami zaznaczono kierunki oddziaływania stymulującego, a prostą zakończoną linią poprzeczną – wpływ hamujący (wg [19], zmienione)

CycD2, CycD3. Są one bardzo podobne do cyklin typu D, występujących w komórkach ssaków [69]. Biosynteza CycD3 u *Arabidopsis* jest indukowana przez cytokiny, podczas gdy komórka znajduje się w fazie G1, na krótko przed fazą S. W jaki więc sposób obecność cykliny D3 sprawia, że komórka wchodzi w fazę S? U ssaków kompleks CycD3-Cdk działa przez hiperfosforylację białkowego antyproliferacyjnego czynnika supresora nowotworu siatkówczaka zarodkowego (Rb). Ufosorylowany Rb niezdolny jest do utworzenia kompleksu z czynnikiem elongacyjnym E2F. Dzięki temu wolny E2F jest zdolny do indukcji ekspresji genów niezbędnych do wejścia komórki w fazę S. Ciekawym spostrzeżeniem jest fakt, że cykliny typu D mają konserwatywny, wspólny dla roślin i zwierząt motyw Leu-x-Cys-x-Glx, wiążący Rb, gdzie x oznacza dowolny aminokwas. Nie znamy jednak mechanizmu i elementów, za pomocą których cytokiny indukują ekspresję genu *CycD3*.

Innym punktem w cyklu komórkowym, który kontrolują cytokiny, jest przejście komórki z fazy G2 w M. Z badań przeprowadzonych na komórkach tytoniu *Nicotiana*

*tabacum* okazało się, że cytokininy aktywują enzym Cdc2, należący do rodziny kinaz Cdk, które są zależne od cyklin [55, 78]. Cytokininy stymulują defosforylację kinazy Cdc2 przez specyficzną fosfatazę Cdc25. Kinaza Cdc2 staje się w ten sposób aktywna i umożliwia przejście fazy G2 w M. Wyniki eksperymentów potwierdzają w ten sposób hipotezę, że cytokininy bardzo precyzyjnie regulują przebieg cyklu komórkowego u roślin. Należy tutaj także podkreślić, że nie tylko cytokininy, które są głównymi aktywatorami podziałów komórkowych, ale także pozostałe hormony roślinne: auksyny, gibereliny i kwas abscysynowy uczestniczą w regulacji mitozy. Otóż auksyny, podobnie jak cytokininy, pobudzają aktywność kinaz Cdk, a pod wpływem giberelin znacznie wzrasta ich zawartość w określonych tkankach. Ostatnio stwierdzono także, że kwas abscysynowy indukuje ekspresję genu *ICK1*, którego białkowy produkt – inhibitor kinaz – prowadzi do znacznego zahamowania aktywności katalitycznej tych enzymów. Dowodzi to, że cytokininy i kwas abscysynowy działają względem siebie antagonistycznie, a prawidłowy przebieg cyklu komórkowego zależy od subtelnych wahań w stężeniach tych endogennych fitohormonów. Warto tutaj nadmienić, że nieprawidłowa transkrypcja genu *CycD3* prowadzi do zaburzeń w przejściu fazy G1/S i indukuje rozwój tumorów u roślin. Podobnie u zwierząt niewłaściwe funkcjonowanie genu *CycD3* jest przyczyną rozregulowania przebiegu cyklu komórkowego, czego skutkiem jest powstanie nowotworu. Ludzki gen kodujący cyklinę D3 jest domniemanym kandydatem na proto-onkogen. Przypuszcza się więc, że analogicznie u roślin gen *CycD3* kontrolowany przez cytokininy może pełnić funkcję onkogenu [18, 19, 24, 67].

## 7. PODSUMOWANIE

Ostatnie 5 lat przyniosło znaczny postęp w badaniach nad molekularnym mechanizmem działania cytokinin. Powoli zaczynamy rozumieć, w jaki sposób przebiega szlak przekazywania sygnału cytokininowego od jego rozpoznania przez komórkę, a następnie przetworzenia przy udziale szeregu przekaźników do zmiany aktywności określonych genów, czego ostatecznym efektem jest powstanie specyficznych odpowiedzi fizjologicznych i morfologicznych komórek, a w rezultacie także całych roślin. Zastosowanie narzędzi inżynierii genetycznej pozwoliło zidentyfikować homologiczne białkowe receptory cytokinin: CRE1, CKII oraz AHK (AHK2/3/4), które mają wspólną cechę – funkcjonują na zasadzie dwuskładnikowego układu kinazy histydynowej. Odkryto i wyizolowano rodzinę białek AHP, które są ogniwem w przenoszeniu grupy fosforanowej oraz rodzinę genów wczesnej odpowiedzi na cytokininy *ARR*, których indukcja warunkuje powstanie odpowiedzi komórkowych. Ostatnie lata dostarczyły także dowodów na to, że cytokininy regulują prawidłowy przebieg cyklu komórkowego. Jak się okazało, w szlaku prowadzącym do indukcji aktywności genów, regulujących podziały komórek głównymi składnikami są cykliny typu D, które umożliwiają komórce roślinnej przejście z fazy G3 w fazę S. Pomimo jednak znaczących osiągnięć badań nad rolą cytokinin na poziomie pojedynczej komórki



niewiele wiadomo, w jaki sposób te fitohormony funkcjonują *in vivo*. Być może nie znamy jeszcze nawet większości składników łańcucha odbierania i przekazywania sygnału cytokininowego oraz skomplikowanej sieci zależności między tymi elementami, hormonem a jego wpływem na metabolizm.

Kluczowym momentem w mechanizmie działania hormonu roślinnego jest precyzyjne dopasowanie się i związanie się cząsteczki z właściwym białkiem receptorowym. Jednak w przypadku cytokinin obserwujemy tutaj pewien paradoks, unikalny dla tej klasy fitohormonów. Rodzi się bowiem pytanie, czy znacznie różniące się strukturalnie cytokiny adeninowe i cytokiny mocznikowe (ryc. 1) wiążą się z tymi samymi receptorami odbierającymi sygnał cytokininowy, czy może jednak związki, będące pochodnymi fenylolewnicy mają udział pośredni w odpowiedziach komórek na cytokiny. W pierwszym przypadku receptor cytokinin powinien wykazywać duże powinowactwo do obu typów związków, co w odniesieniu do reguły, że aktywność fitohormonów ściśle zależy od ich struktury chemicznej, jest nieco zaskakujące. Istnieje hipoteza, że cytokiny adeninowe i fenylolewnicy pomimo dużych różnic w budowie chemicznej mają w konformacji cząsteczki taki sam fragment  $-N=CH-N=$ , bezpośrednio wiążący się z jednym, tym samym białkowym receptorem. Druga teoria wskazuje, że cytokiny mocznikowe pośrednio mają wpływ na biosyntezę i metabolizm, a więc na zmianę poziomu endogennych cytokin adeninowych, a dopiero ich percepcja przez receptory generuje określone, charakterystyczne odpowiedzi komórek jak i całego organizmu. Wzrost zainteresowania tematyką transdukcji sygnałów cytokininowych u roślin oraz znaczny postęp w dziedzinie inżynierii genetycznej, być może przyniosą odpowiedzi na te oraz pozostałe pytania już w najbliższej przyszłości.

## LITERATURA

- [1] ANANTHARAMAN V, ARAVIND L. The chase domain: a predicted ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors. *Trends Biochem Sci* 2001; **26**: 579–582.
- [2] AOYAMA T, OKA A. Cytokinin signal transduction in plant cells. *J Plant Res* 2003; **116**: 221–231.
- [3] BILYEU KD, COLE JL, LASKEY JG, RICKHOF WR, ESPARZA TJ. Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from *Zea mays*. *Plant Physiol* 2001; **125**: 378–386.
- [4] BINNS AN. Cytokinin accumulation and action: biochemical, genetic and molecular approaches. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1994; **45**: 173–196.
- [5] BORZOBOHATY B, MOORE I, PALME K. Cytokinin metabolism: implications for regulation of plant growth and developments. *Plant Mol Biol* 1994; **26**: 1483–1497.
- [6] BRANDSTATTER I, KIEBER JJ. Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1998; **10**: 1009–1019.
- [7] BRAULT M, MALDINEY R, MIGINIAC E. Cytokinin-binding proteins. *Physiol Plant* 1997; **100**: 520–527.
- [8] BRAULT M, MALDINEY R. Mechanism of cytokinin action. *Plant Physiol Biochem* 1999; **37**: 403–412.
- [9] CHANG C, STEWART RC. The two component system: regulation of diverse signaling pathways in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiol* 1998; **117**: 723–731.
- [10] CHEN CM, JIN G, ANDERSEN BR, ERTL JR. Modulation of plant gene expression by cytokinins. *Aust J Plant Physiol* 1993; **20**: 609–619.

- [11] CHIKANO H, OGAWA M, IKEDA Y, KOIZUMI N, KUSANO T, SANO H. Two novel genes encoding SNF1 – related protein kinases from *Arabidopsis thaliana*: differential accumulation of *AtSR1* and *AtSR2* transcripts in response to cytokinins and sugars, and phosphorylation of sucrose synthase by *AtSR2*. *Mol Gen Genet* 2001; **264**: 674–681.
- [12] CZERPAK R, PIOTROWSKA A. Cytokiny, ich struktura, metabolizm i aktywność biologiczna. *Kosmos* 2003; **52**: 203–215.
- [13] D'AGOSTINO IB, DERUERE J, KIEBER JJ. Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiol* 2000; **124**: 1706–1717.
- [14] D'AGOSTINO IB, KIEBER JJ. Molecular mechanisms of cytokinin action. *Curr Opin Plant Biol* 1999; **2**: 359–364.
- [15] D'AGOSTINO IB, KIEBER JJ. Phosphorelay signal transduction the emerging family of plant response regulators. *Trends Biochem Sci* 1999a; **24**: 452–456.
- [16] DERUERE J, KIEBER JJ. Molecular mechanisms of cytokinin signaling. *J Plant Growth Regul* 2002; **21**: 32–39.
- [17] ESTELLE M. Cytokinin action: two receptors better than one? *Curr Biol* 1998; **8**: 539–541.
- [18] FRANK M, RUPP HM, PRINSEN E, MOTYKA V, ONCKELEN H, SCHMÜLLING T. Hormone autotrophic growth and differentiation identifies mutant lines of *Arabidopsis* with altered cytokinin and auxin content. *Plant Physiol* 2000; **122**: 721–729.
- [19] FRANK M, SCHMÜLLING T. Cytokinin cycles cells. *Trends Plant Sci* 1999; **4**: 243–244.
- [20] FUJIMOTO Y, NAGATA R, FUKASAWA H, YANO K, AZUMA M. Purification and cDNA cloning of cytokinin specific binding protein from mung bean (*Vigna radiata*). *Eur J Biochem* 1998; **258**: 794–802.
- [21] GAUDINO RJ, PIKAARD CS. Cytokinin induction of RNA polymerase transcription in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 1997; **272**: 6799–6804.
- [22] HABERER G, KIEBER JJ. Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. *Plant Physiol* 2002; **128**: 354–362.
- [23] HOBBIIE I, TIMPTE C, ESTELLE M. Molecular genetics of auxin and cytokinin. *Plant Mol Biol* 1994; **26**: 1499–1519.
- [24] HORVARTH DP, CHAO WS, ANDERSON JV. Molecular analysis of signals controlling dormancy and growth in underground adventitious buds of leafy spurge. *Plant Physiol* 2002, **128**: 1439–1446.
- [25] HOYKAAS PJ, HALL MA, LIBBENGA RK (red.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*. Elsevier, Amsterdam 1999.
- [26] HUMPHREY TV, BOTELLA JR. Re-evaluation of the cytokinin receptor role of the *Arabidopsis* gene *GCR1*. *J Plant Physiol* 2001; **158**: 645–653.
- [27] HUTCHINSON C, KIEBER JJ. Cytokinin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2002; (suppl.): 47–59.
- [28] HWANG I, CHEN HC, SHEEN J. Two component signal transduction pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2002; **129**: 500–515.
- [29] HWANG I, SHEEN J. Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* 2001; **413**: 383–389.
- [30] IMAMURA A, HANAKI N, NAKAMURA A, SUZUKI T, TANIGUCHI M, KIBA T, UEGUCHI C, SUGIYAMA T, MIZUNO T. Compilation and characterization of *Arabidopsis thaliana* response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction. *Plant Cell Physiol* 1999; **40**: 733–742.
- [31] INOUE I, HIGUCHI M, HASHIMOTO Y, SEKI M, KOBAYASHI M, KATO T, TABATA S, SHINOZAKI K, KAKIMOTO T. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* 2001; **409**: 1060–1063.
- [32] KAKIMOTO T. CK1I, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science* 1996; **274**: 982–985.
- [33] KAMINEK M, TRCKOVA M, FOX JE, GAUDINOVA A. Comparison of cytokinin binding proteins from wheat and oat grains. *Physiol Plant* 2003; **117**: 453–458.
- [34] KANYUKA K, COUCH D, HOOLEY R. A higher plant seven-transmembrane receptor that influences sensitivity to cytokinins. *Curr Biol* 2001; **11**: 535.
- [35] KIBA T, TANIGUCHI M, IMAMURA A, UEGUCHI C, MIZUNO T, SUGIYAMA T. Differential expression of genes for response regulators in response to cytokinins and nitrate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 1999; **40**: 767–771.
- [36] KIMURA T, NAKANO T, TAKI N, ISHIKAWA M, ASAMI T, YOSHIDA S. Cytokinin-induced gene expression in cultured green cells of *Nicotiana tabacum* identified by fluorescent differential display. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001; **65**: 1275–1283.



- [37] KOWALCZYK S, JAKUBOWSKA A. Receptory etylenu, cytokinin i brassinosteroidów – transmembranowymi kinazami? *Post Biol Kom* 1999; **26**: 3–32.
- [38] KRYSAN PJ, JESTER PJ, GOTTWALD JR, SUSSMAN MR. An *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase gene family encodes essential positive regulators of cytokinesis. *Plant Cell* 2002; **14**: 1109–1120.
- [39] KULAEVA ON, ZAGRANICHNAYA TK, BROVKO FA, KARAVAİKO NN, SELIVANKINA SY. A new family of cytokinin receptors from *Cerealeales*. *FEBS Lett* 1998; **423**: 239–242.
- [40] LOHRMANN J, BUCHHOLZ G, KEITEL C, SWEERE C, KIRCHER S, BÄURLE I, KUDLA J, HARTER K. Differentially-expressed and nuclear-localised response regulator-like proteins from *Arabidopsis thaliana* with transcription factor properties. *J Plant Biol* 1999; **1**: 495–506.
- [41] LOHRMANN J, HARTER K. Plant two-component signaling systems and the role of response regulators. *Plant Physiol* 2002; **128**: 363–369.
- [42] MAEDA T, TAKEKAWA M, SAITO H. Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science* 1995; **269**: 554–558.
- [43] MÄHÖNEN AP, BONKE M, KAUPINEN L, RIIKONEN M, BENFEY PN, HELARIUTTA Y. A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes Dev* 2000; **14**: 2938–2943.
- [44] McCOURT P. Genetic analysis of hormone signaling. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1999; **50**: 219–243.
- [45] McDANIEL KL, LIGHTFOOT DA. Accumulation of a gene specific mRNA in response to cytokinin treatment of leaves in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol Biochem* 1997; **35**: 373–380.
- [46] MITSUI S, WAKASUGI T, SUGIURA M. A cytokinin-binding complex from tobacco leaves. *Plant Growth Regul* 1996; **18**: 39–43.
- [47] MIZUNO T. His-Asp phosphotransfer signal transduction. *J Biochem* 1998; **123**: 555–563.
- [48] MOK DWS, MOK MC. Cytokinin metabolism and action. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 2001; **52**: 89–118.
- [49] MOK MC, MARTIN RC, MOK DWS. Cytokinins: biosynthesis, metabolism and perception. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 2000; **36**: 102–107.
- [50] NAKAMURA A, KAKIMOTO T, IAMAMURA A, SUZUKI T, UEGUCHI C. Biochemical characterization of a putative cytokinin-responsive His-kinase, CK11, from *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem* 1999; **63**: 1627–1630.
- [51] OKA A, SAKAI H, IWAKOSHI S. His-Asp phosphorelay signal transduction in higher plants: receptors and response regulators for cytokinin signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Genet Syst* 2002; **77**: 383–391.
- [52] OSAKABE Y, MIYATA S, URAO T, SEKI M, SHINOZAKI K, YAMAGUCHI K. Overexpression of *Arabidopsis* response regulator *ARR4/ATRR1/IBC7* and *ARR8/ATRR3* alters cytokinin responses differentially in the shoot and callus formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **293**: 806–815.
- [53] PAPON N, OUDIN A, VANSIRI A, RIDEAU M, CHENIEUX JC, CRECHE J. Differential expression of two type-A response regulators in plant and cell cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *J Exp Bot* 2003; **388**: 1793–1795.
- [54] PLAKIDOU-DYMOCK S, DYMOCK D, HOOLEY R. A higher plant seven – membrane receptor that influences sensitivity to cytokinins. *Curr Biol* 1998; **8**: 315–324.
- [55] POLIT JT, MASZEWSKI J, KAZIMIERCZAK A. Effect of BA and IAA on the expression of G1 and G2 control points and G1-S and G2-M transitions in root meristem cells of *Vicia faba*. *Cell Biol Int* 2003; **27**: 559–566.
- [56] POSAS F, SAITO H. Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *EMBO J* 1998; **17**: 1385–1394.
- [57] POSAS F, WURGLER-MURPHY SM, MAEDA T, WITTEN EA, THAI TC, SAITO H. Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanisms in the SLN-YPD1-SSK1 ‘two-component’ osmosensor. *Cell* 1996; **86**: 865–875.
- [58] REISER V, RAITT DC, SAITO H. Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor CRE1 respond to changes in turgor pressure. *J Cell Biol* 2003; **161**: 1035–1040.
- [59] RIOU-KHAMLICH C, HUNTLEY R, JACQMARD A, MURRAY JAH. Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* 1999; **283**: 1541–1544.
- [60] SAKAI H, HONMA T, AOYAMA T, SATO S, KATO T, TABATA S, OKA A. ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science* 2001; **294**: 1519–1521.

- [61] SAKAKIBARA H, SUZUKI M, TAKAI K, DEJI A, TANIGUCHI M. A response regulator homologue possibly involved in nitrogen signal transduction mediated by cytokinin in maize. *Plant J* 1998; **14**: 337–344.
- [62] SAKAKIBARA H, TANIGUCHI M, SUGIYAMA T. His–Asp phosphorelay signaling: a communication avenue between plants and their environment. *Plant Mol Biol* 2000; **42**: 273–278.
- [63] SCHERES B, DiLAURENZIO L, WILLEMSEN V, HAUSER MT, JANMAAT K, WEISBEEK P, BENFEY PN. Mutations affecting the radial organization of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development* 1995; **121**: 53–62.
- [64] SCHMÜLLING T, SCHÄFFER S, ROMANOV G. Cytokinins as regulators of gene expression. *Physiol Plant* 1997; **100**: 505–519.
- [65] SCHMÜLLING T. New insights into the functions of cytokinins in plant developments. *J Plant Growth Regul* 2002; **21**: 40–49.
- [66] SHEEN J. Phosphorelay and transcription control in cytokinin signal transduction. *Science* 2002; **296**: 1650–1652.
- [67] SMALLE J, KUREPA J, YANG P, BABIYCHUK E, KUSHNIR S, DURSKI A, VIERSTRA RD. Cytokinin growth responses in *Arabidopsis* involve the 26S proteasome subunit RPN12. *Plant Cell* 2002; **14**: 17–32.
- [68] SMITH A.R. (red.). *Plant Hormone Signal Perception and Transduction*. Kluwer Acad. Publ., Netherlands 1996; 77–81.
- [69] SONI R, CARMICHAEL JP, SHAH ZH, MURRAY JAH. A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell* 1995; **7**: 85–103.
- [70] SUZUKI T, IMAMURA A, UEGUCHI C, MIZUNO T. Histidine-containing phosphotransfer (HPT) signal transducers implicated in His-to-Asp phosphorelay in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 1998; **39**: 1258–1268.
- [71] SUZUKI T, MIWA K, ISHIKAWA K, YAMADA H, AIBA H, MIZUNO T. The *Arabidopsis* sensor Histidine kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant Cell Physiol* 2001; **42**: 107–113.
- [72] TAKEI K, TAKAHASHI T, SUGIYAMA T, YAMAYA T, SAKAKIBARA H. Multiple routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: a signal transduction pathway mediated by cytokinin. *J Exp Bot* 2002; **370**: 971–977.
- [73] TANIGUCHI M, KIBA T, SAKAKIBARA H, UEGUCHI C, MIZUNO T. Expression of *Arabidopsis* response regulator homologues is induced by cytokinins and nitrate. *FEBS Lett* 1998; **429**: 259–262.
- [74] UEGUCHI C, SATO S, KATO T, TABATA S. The *AHK4* gene involved in the cytokinin-signaling pathway as a direct receptor molecule in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 2001; **42**: 751–755.
- [75] URAO T, YAKUBOV B, SATOH R, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SEKI M, HIRAYAMA T, SHIZONAKI K. A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as osmosensor. *Plant Cell* 1999; **11**: 1743–1754.
- [76] YAMADA H, HANAKI N, IMAMURA A, UEGUCHI C, MIZUNO T. An *Arabidopsis* protein that interacts with the cytokinin-inducible response regulator, ARR4, implicated in the His - Asp phosphorelay signal transduction. *FEBS Lett* 1998; **436**: 76–80.
- [77] YAMADA H, SUZUKI T, TERADA K, TAKEI K, ISHIKAWA K, MIWA K, YAMASHINO T, MIZUNO T. The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiol* 2001; **42**: 1017–1023.
- [78] YAMAGUCHI M, KATO H, YOSHIDA S, YAMAMURA S, UCHIMIYA H, UMEDA M. Control of *in vitro* organogenesis by cyclin-dependent kinase activities in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 8019–8023.
- [79] ZHANG K, LETHAM DS, JOHN P.C. Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of <sup>34</sup>P-like H1 histone kinase. *Planta* 1996; **200**: 2–12.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 22.07.2003 r.

Przyjęto: 28.10.2003 r.

ul. Świerkowa 20B, 15-950 Białystok

e-mail: alicjap@uwb.edu.pl





## SIĘCI PERINEURONALNE – ZAGADKOWE STRUKTURY W UKŁADZIE NERWOWYM\*

### PERINEURONAL NETS – ENIGMATIC STRUCTURES OF THE NERVOUS SYSTEM

Monika LIGUZ-LĘCZGAR

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego,  
Zakład Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej, PAN, Warszawa

*Streszczenie:* Macierz zewnątrzkomórkowa w układzie nerwowym jest złożoną siecią makrocząsteczek, która nie tylko tworzy zrąb dla elementów komórkowych, ale również bierze udział w regulacji wielu procesów fizjologicznych, takich jak: migracja, proliferacja, adhezja i różnicowanie się komórek. Jej szczególną postacią, powstałą na skutek agregacji pewnych elementów, są sieci perineuronalne. Są to siatkowate struktury, zbudowane z glikoprotein oraz proteoglikanów, otaczające perikariony i proksymalne dendryty niektórych neuronów, występujące w całym centralnym układzie nerwowym. Rola tych struktur nie jest jeszcze w pełni poznana, jednak wiadomo, że regulują one wzrost zakończeń nerwowych, biorą udział w procesach plastyczności neuronalnej oraz najprawdopodobniej działają ochronnie w procesach neurodegeneracyjnych i zapalnych.

*Słowa kluczowe:* sieci perineuronalne, macierz zewnątrzkomórkowa, proteoglikany.

*Summary:* The extracellular matrix of the nervous system is complex structural entity, that in addition to serving a structural function, also profoundly affects the cellular physiology of an organism like cell adhesion, migration, proliferation and differentiation. Perineuronal nets are aggregations of the extracellular matrix components around pericaria and proximal dendrites of some neurons. They form reticular structures consisted of glycoproteins and proteoglycans, which can be found in virtually all regions of CNS. The role of this structures still remain obscure, however it is known that they are involved in neurite growth and synaptic plasticity. They also can have neuroprotective effect in neurodegenerative diseases and inflammation processes.

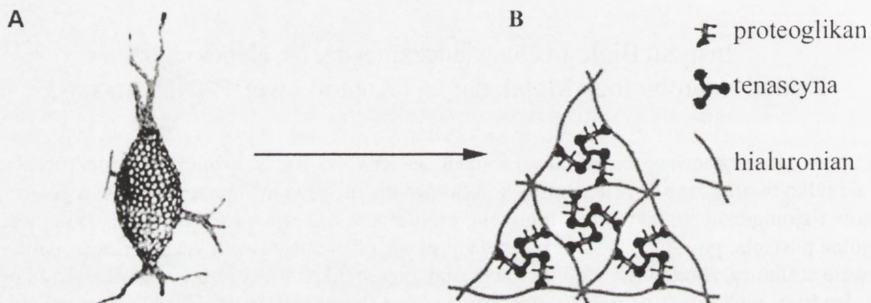
*Key words:* perineuronal nets, extracellular matrix, proteoglycans.

\*Dofinansowanie: Grant KBN No. 3P04C 008 22.



## 1. WSTĘP

Struktury zwane dzisiaj sieciami perineuronalnymi odkryte zostały już ponad sto lat temu. Po raz pierwszy szczegółowo opisał je w 1893 roku Bartolomeo Camillo Golgi, jako siatkowate twory otaczające ciała komórkowe oraz proksymalne dendryty niektórych neuronów, budową przypominające plaster miodu (ryc. 1A). Według niego miały one pełnić w stosunku do otaczanych neuronów funkcje podporowe i ochronne, zaś obecne w nich otwory miały umożliwiać wypustkom innych neuronów tworzenie kontaktów synaptycznych. Rozwój nowoczesnych metod neuroanatomicznych i molekularnych pozwolił stwierdzić, że sieci są wyspecjalizowaną częścią macierzy zewnątrzkomórkowej, ograniczoną zasadniczo do przestrzeni między wypustkami gleju a otaczanymi przez nie neuronami [12, 13]. Obecnie struktury te wzbudzają duże zainteresowanie, głównie ze względu na udział w procesach rozwoju i plastyczności układu nerwowego, a także możliwe działanie neuroprotektcyjne.



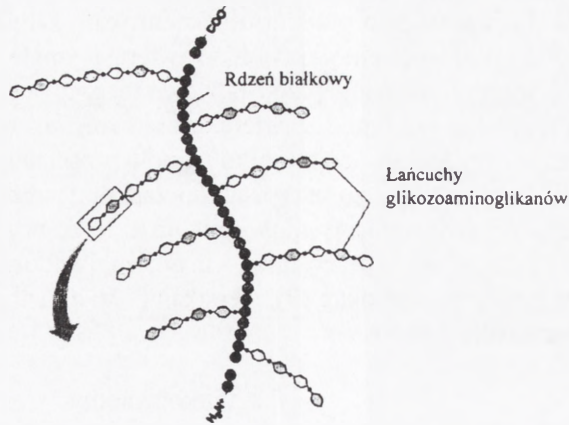
RYCINA 1. A: Rysunek neuronu otoczonego przez sieci perineuronalne, wykonany przez Ramon y Cajala. B: Model organizacji elementów macierzy zewnątrzkomórkowej w obrębie sieci [49, zmodyfikowane]

## 2. PODSTAWOWE GRUPY SKŁADNIKÓW TWORZĄCYCH SIECI WOKÓŁ KOMÓREK NERWOWYCH

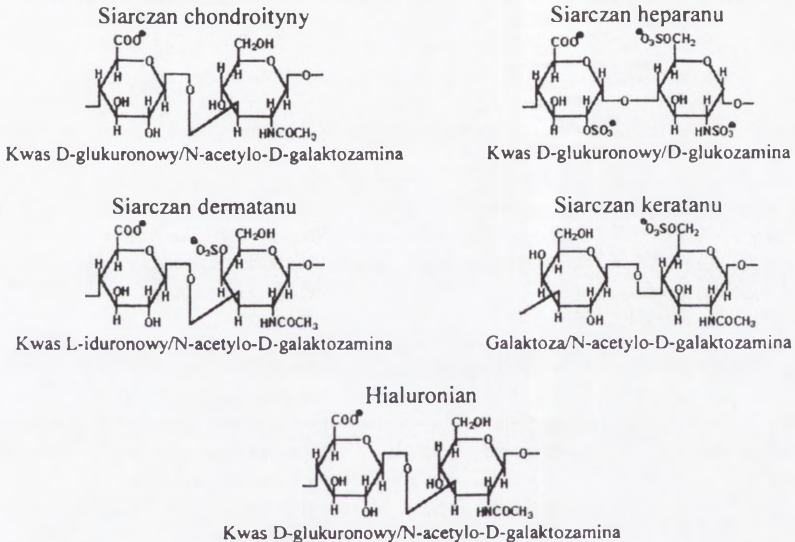
### 2.1. Proteoglikany

Jest to klasa glikozylowanych białek o zróżnicowanej strukturze i rozmiarach, zbudowanych z rdzenia białkowego, do którego kowalencyjnie dołączonych jest wiele łańcuchów cukrowych, tzw. glikozoaminoglikanów, czyli nierozgałęzionych łańcuchów polisacharydowych, utworzonych przez powtarzające się jednostki dwucukrowe, zawierające kwasy uronowe lub galaktozę oraz heksozaminy (N-acetyloglukozoamina, N-acetylogalaktozamina) (ryc. 2A). Zależnie od struktury dwucukrów wyróżnia się

## A. Budowa proteoglikanu



## B. Struktura glikozoaminoglikanów



RYCINA 2. A: Schemat budowy proteoglikanów. Prostokąt obejmuje podstawową jednostkę łańcucha glikozoaminoglikanowego, czyli parę cukrów. B: Struktura jednostek

kilka typów glikozoaminoglikanów: siarczan chondroityny/dermatanu, siarczan keratanu i siarczan heparanu/heparyny. Osobną klasę tworzy kwas hialuronowy, który jest nieusiarkowanym glikozoaminoglikanem i który jako jedyny tworzy wolne, niezwiązane z białkiem łańcuchy wielocukrowe (ryc. 2B).



Ze względu na strukturę białka rdzeniowego dzieli się proteoglikany na trzy grupy: **Hialektany** (lektykany) są to duże agregujące proteoglikany, zawierające domenę wiążącą hialuronian oraz domenę lektynową. Głównymi przedstawicielami tej grupy są: wersikan, agrekan, brewikan oraz neurokan. **Glipikany** są proteoglikanami związanymi z błonami komórkowymi i zawierającymi łańcuchy siarczanu heparanu. U ssaków zidentyfikowano 6 przedstawicieli tej grupy (glipikan 1–6). **Syndekey** są to białka transbłonowe typu I, zawierające głównie łańcuchy siarczanu heparanu. W tkance nerwowej ssaków zidentyfikowano 4 przedstawicieli tej grupy. Są jednak proteoglikany niedające się przypisać do żadnej z wyżej wymienionych grup, np. nieusiarkowane proteoglikany chondroitynowe. W tkance nerwowej znaleziono do tej pory ponad 20 różnych przedstawicieli proteoglikanów, z czego 7 (agrekan [28]; brewikan, neurokan, fosfakan [9]; wersikan [17]) zidentyfikowano w obszarze sieci perineuronalnych.

## 2.2. Glikoproteiny

Glikoproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej, których obecność stwierdzono w sieciach perineuronalnych, to tenascyna R i C oraz hialuronektyna. Tenascyny należą do białek o budowie domenowej, a funkcjonalne białko jest oligomerem, złożonym z sześciu promieniście ułożonych ramion połączonych mostkami dwusiarczkowymi. Jak

TABELA 1. Zestawienie przykładowych markerów sieci perineuronalnych

Marker sieci	Rozpoznawany antygen	Występowanie	Oдноśnik
Lektyna z wyki kosmatej ( <i>Vicia villosa</i> – VVA) Lektyna z soi (SBA) Aglutynina z glicynii kwiecistej ( <i>Wisteria floribunda</i> – WFA)	terminalna N-acetylogalaktozamina w glikoproteinach sieci	interneurony w korze mózgowej i hipokampie, komórki piramidowe pola CA2, istota czarna	12, 35, 12 9 1, 7, 45
Aglutynina z zarodków pszenicy	N-acetyloglukozoamina	komórki warstwy drobinowej mózdzku	12
Przeciwciało przeciwko tenascynie C i R	tenascyna C oraz R	interneurony w korze i hipokampie komórki piramidowe pola CA2 hipokampa	9, 17, 33, 45
Przeciwciało przeciwko hialuronektynie	hialuronektyna i wersi- kan o masie 365 kDa	interneurony kory, jądra mózdzku, motoneurony	14
Przeciwciało monoklonalne przeciwko epitopowi HNK-1	kwas glukuronowy usiarkowany na 3' końcu	interneurony kory, komórki siatkówki	40
Przeciwciało przeciwko antygenom Cat-301 i Cat-304	proteoglikany zawiera- jące siarczan hondroityny	komórki piramidalne i interneurony kory	22, 23, 35, 44

dotąd znaleziono 5 genów kodujących te białka (tenascyna -C, -R (restryktyna, janusina), -W, -X, -Y) [17, 26]. Z kolei hialuronektyna jest białkiem wiążącym hialuronian i ulega silnej ekspresji w centralnym układzie nerwowym ssaków, gdzie koncentruje się w okolicach związanych z transmisją GABA-ergiczną [14].

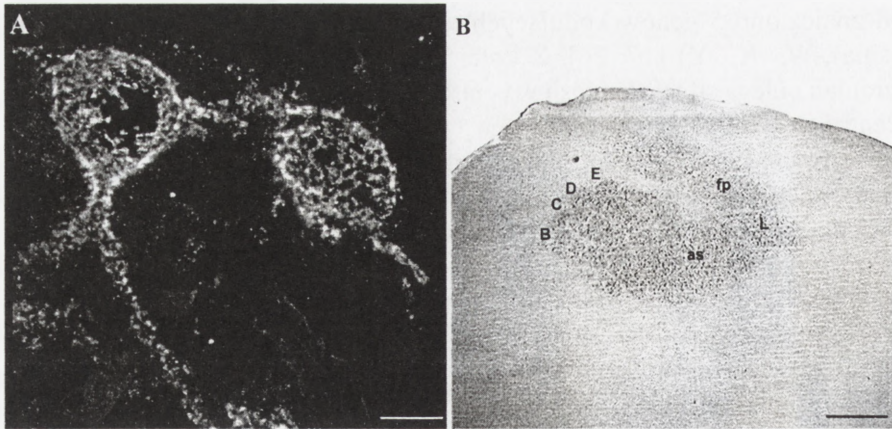
Narzędziami pozwalającymi uwidaczniać w tkance poszczególne markery sieci perineuronalnych są rozmaite lektyny (rozpoznające określone węglowodany na powierzchni komórki) oraz mniej lub bardziej specyficzne przeciwciała (tab. 1). Można również, w celu pokazania agregacji składników macierzy zewnątrzkomórkowej wokół neuronów, stosować metody barwienia histologicznego pozwalające uwidocznić w tkance ujemnie naładowane substancje, takie jak: glikozaaminoglikany, siarczan chondroityny, kwas hialuronowy. Takimi metodami są m.in. impregnacja solami srebra, reakcja z błękitem pruskim lub reakcja PAS (*Periodic Acid Schiff*). Prawdopodobny sposób ułożenia poszczególnych składników sieci perineuronalnych, powodujący powstanie charakterystycznej, przypominającej plaster miodu struktury przedstawia rycina 1B.

### 3. WYSTĘPOWANIE I ROZMIESZCZENIE SIECI PERINEURONALNYCH W UKŁADZIE NERWOWYM

Sieci perineuronalne są strukturami powstającymi przy współdziałaniu neuronów oraz gleju. Tenascyna C oraz hialuronian i hialuronektyna syntetyzowane są przez komórki glejowe. Tenascyna R i proteoglikany mogą być produkowane przez komórki glejowe oraz neurony. Co ciekawe, sieci perineuronalne otaczają preferencyjnie pewne typy neuronów. Okazuje się, że nie jest to związane z uwalnianiem przez te neurony neurotransmiterem, czy typem znajdujących się na nich synaps, a raczej z dużym procentem powierzchni perikarionu zajmowanej przez synapsy. W korze nowej i hipokampie sieci występują najczęściej wokół komórek niepiramidowych (ryc. 3A), wykazujących ekspresję białek wiążących wapń, takich jak parwalbumina lub kalbindyna D-28k [25, 30, 46]. Wokół komórek piramidowych sieci występują rzadziej, głównie w okolicach kory ruchowej, słuchowej, a także w strukturach podkorowych oraz w rdzeniu kręgowym [7, 35]. Wzory ekspresji poszczególnych markerów sieci są bardzo zróżnicowane w zależności od gatunku badanego zwierzęcia. Natomiast wzory ekspresji różnych markerów sieci perineuronalnych u jednego gatunku w dużym stopniu się pokrywają, co wykazały badania z zastosowaniem aglutyniny z *Vicia villosa* oraz różnych przeciwciał [35]. Może to wynikać oczywiście z heterogenności składników sieci oraz z faktu, że poszczególne przeciwciała czy aglutyniny rozpoznają różne epitopy na tych samych cząsteczkach [45].

Szereg obserwacji wskazuje, że niektóre markery sieci perineuronalnych uwidaczniają zorganizowane topograficznie i warstwowo grupy neuronów, które mogą być podobne fizjologicznie i powiązane ze sobą funkcjonalnie [8, 42]. Tak jest w przypadku antygeny Cat-301, który wyznacza funkcjonalny szlak w układzie





RYCINA 3. A: Sieci perineuronalne wokół GABA-ergicznym neuronów kory mózgowej myszy, uwidocznione przy pomocy WFA. B: Charakterystyczna organizacja topograficzna obszaru pierwszorzędowej kory somatosensorycznej myszy uwidoczniiona immunocytochemicznie z użyciem przeciwciała skierowanego przeciwko synapsynie I, a rozpoznającego najprawdopodobniej, jak dotąd niezidentyfikowany, element sieci perineuronalnych. B–E – rzędy baryłek, fp – reprezentacja przedniej łapy, L – dolnej wargi, as – pyszczka; Skala: A – 20  $\mu$ m, B – 1 mm [34, zmodyfikowane]

wzrokowym ssaków. W korze wzrokowej oraz ciele kolankowatym bocznym, rozmieszczenie tego antygenu ujawnia organizację laminarną, a w jądrze VPM (*ventral posterior medial*) wzgórza pozwala ono wyodrębnić grupy złożone z neuronów o określonych polach recepcyjnych, tworzących projekcję do odpowiednich kolumn kory [22, 23]. W korze baryłkowej gryzoni neurony otoczone przez sieci perineuronalne uwidaczniają organizację cytoarchitektoniczną tego obszaru (ryc. 3B), co również może wskazywać, że są one częścią szlaku przetwarzania informacji czuciowych [34].

#### 4. ROLA SIECI PERINEURONALNYCH W UKŁADZIE NERWOWYM

Funkcje, jakie sieci perineuronalne pełnią w układzie nerwowym, nie zostały do końca poznane, choć są obecnie przedmiotem intensywnych badań. Jedną z postulowanych funkcji tych struktur jest zagęszczanie czynników wzrostowych wokół neuronów. Wykazano, że niektóre proteoglikany mogą być traktowane jako koreceptory pewnych czynników wzrostowych. Mogą one jednak w zależności od środowiska ułatwiać albo przeciwnie utrudniać tym czynnikom interakcje z receptorami swoistymi [24, 39].

Udział sieci perineuronalnych w regulacji wzrostu zakończeń nerwowych również nie jest jednoznaczny. Fakt, że występują one głównie wokół neuronów z dużą liczbą synaps rozmieszczonych na ciałach komórkowych, sprawia, że są uważane za struktury

fizycznie ograniczające liczbę połączeń synaptycznych. Obecność proteoglikanów z siarczanem chondroityny sugeruje, że mogą one stanowić barierę dla wydłużających się neurytów, przez hamowanie ich interakcji z cząsteczkami adhezji komórkowej [27, 36]. Jednak inne dane wskazują, że ekspresja siarczanu chondroityny może również promować wzrost wypustek [16, 29, 48]. Podobnie, glikoproteiny sieci mogą stymulować lub hamować stożki wzrostu neuronów [5, 38].

Sugeruje się, że sieci biorą udział w stabilizacji synaps i funkcjonalnym dojrzewaniu neuronów [3, 9, 31]. Znajduje to potwierdzenie w fakcie, iż poszczególne składniki sieci osiągają dojrzały wzór ekspresji w dość późnym okresie po urodzeniu, zbiegającym się często z zakończeniem okresu krytycznego dla wywołania zmian plastycznych zależnych od dopływu bodźców z zewnątrz [10, 15]. Pokazano np., że po deprivacji wzrokowej ekspresja markera sieci, antygeny Cat 301, spada wokół neuronów ciała kolankowatego bocznego. Analogicznie, po uszkodzeniu rdzenia zmniejsza się immunoreaktywność wobec Cat 301 w sieciach wokół motoneuronów. Powyższe zmiany można wywołać jedynie we wczesnym okresie życia zwierzęcia [32, 44]. Z kolei u zwierząt dorosłych, zniszczenie sieci perineuronalnych przez trawienie enzymatyczne umożliwia wywołanie takich zmian plastycznych, jakie normalnie można wywołać jedynie w czasie okresu krytycznego, np. przesunięcie kolumn dominacji ocznej w korze wzrokowej kotów po deprivacji wzrokowej [37]. Wyniki te świadczą o zaangażowaniu składników sieci w procesy plastyczne. Stwierdzono również, iż zmiany ekspresji proteoglikanów oraz glikoprotein wchodzących w ich skład modulują różnorodne formy plastyczności, takie jak długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (LTP) indukowane stymulacją theta, będące synaptycznym modelem uczenia się i pamięci oraz długotrwałe osłabienie synaptyczne (LTD) wywołane stymulacją o niskiej częstotliwości [11].

Cechą wspólną dla wielu otoczonych przez sieci perineuronalne komórek nerwowych jest obecność podjednostki Kv3.1b, wchodzącej w skład zależnych od napięcia kanałów potasowych. Ta obserwacja w połączeniu z faktem, że podjednostka Kv3.1b jest charakterystyczna dla neuronów o szybkich wyładowaniach, może sugerować rolę sieci jako szybkiego lokalnego buforu dla kationów, zapewniającego ich efektywny transport potrzebny neuronom o dużej aktywności. Jednocześnie sieci mogą służyć jako bariera zapobiegająca rozpraszaniu się jonów w drodze dyfuzji [18, 20, 30].

Obecnie coraz częściej mówi się o potencjalnym neuroprotektynym działaniu sieci perineuronalnych. Okazało się, że w neuronach otoczonych sieciami perineuronalnymi bardzo rzadko obserwuje się zwyrodnienie neurofibrylarne, blaszki starcze lub hiperfosforylowane białko Tau, a więc cechy charakterystyczne dla komórek ulegających zniszczeniu w chorobie Alzheimera [1, 8, 19]. W chorobie Creutzfeldta-Jakoba utrata sieci poprzedza śmierć otaczanych wcześniej przez nie interneuronów GABA-ergicznych, sugerując tym samym ich rolę ochronną [4]. W procesach zapalnych zaobserwowano zwiększoną przeżywalność neuronów otoczonych strukturami sieci. Tłumaczy się to antyadhezywnym oddziaływaniem tenascyny R oraz proteoglikanów z siarczanem chondroityny w stosunku do zaktywowanego mikrogleju [2, 43].



Podejmuje się również próby określenia funkcji poszczególnych białek sieci perineuronalnych przez „wyłączanie” kodujących je genów. Jak do tej pory, jeśli chodzi o białka związane z sieciami perineuronalnymi, zrobiono takie eksperymenty z genami kodującymi tenascynę, neurokan i brewikan [6, 21, 33, 41, 47, 50]. Jednak w przypadku sieci, badania z użyciem manipulacji genetycznych nie dają jednoznacznych odpowiedzi na pytania dotyczące funkcji tych struktur, ponieważ białka sieci perineuronalnych ulegają szerokiej ekspresji poza tymi tworami. A więc trudno wnioskować o tym, czy wywołane zaburzenie jest spowodowane zmianą w obrębie samej struktury sieci, czy też jest związane z upośledzeniem procesów fizjologicznych, w które dane białko jest normalnie zaangażowane.

Poznanie funkcji sieci perineuronalnych w układzie nerwowym jest bardzo utrudnione przez fakt, że ciągle jeszcze niewiele wiadomo o wzajemnych relacjach pomiędzy poszczególnymi składnikami tych struktur a otaczanymi przez nie neuronami czy zaangażowanymi w tworzenie sieci komórkami glejowymi. Dodatkowo sprawę komplikuje heterogenność tych tworów oraz różnorodność znajdujących w nich proteoglikanów, których działanie może być zupełnie odmienne w zależności od otoczenia, w jakim się znajdują.

## LITERATURA

- [1] ADAMS I, BRAUER K, ARELIN C, HARTIG W, FINE A, MADER M, ARENDT T, BRÜCKNER G. Perineuronal nets in the rhesus monkey and human basal forebrain including basal ganglia. *Neuroscience* 2001; **108**: 285–298.
- [2] ANGELOV DN, WALTHER M, STREPPLE M, GUNTINAS-LICHIUS O, NEISS WF, PROBSTMEIER R, PESHEVA P. Tenascin-R is antiadhesive for activated microglia that induce downregulation of the protein after peripheral nerve injury: a new role in neuronal protection. *J Neurosci* 1998; **18**: 6218–6229.
- [3] BANDTLOW CE, ZIMMERMANN DR. Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev* 2000; **80**: 1267–1290.
- [4] BELICHENKO PV, MIKLOSSY J, BELSER B, BUDKA H, CELIO MR. Early destruction of the extracellular matrix around parvalbumin-immunoreactive interneurons in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Dis* 1999; **6**: 269–279.
- [5] BOSMAN FT, STAMENKOVIC I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol* 2003; **200**: 423–428.
- [6] BRAKEBUSCH C, SEIDENBECHER CI, ASZTELY F, RAUCH U, MATTHIES H, MEYER H, KRUG M, BOCKERS TM, ZHOU X, KREUTZ MR, MONTAG D, GUNDEL FINGER ED, FASSLER R. Brevican-deficient mice display impaired hippocampal CA1 long-term potentiation but show no obvious deficits in learning and memory. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 7417–7427.
- [7] BRÜCKNER G, HARTIG W, SEEGER J, RUBSAMEN R, REIMER K, BRAUER K. Cortical perineuronal nets in the gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*): a distribution pattern contrasting with that shown in placental mammals. *Anat Embryol (Berl)* 1998; **197**: 249–262.
- [8] BRÜCKNER G, HAUSEN D, HÄRTIG W, DRLICEK M, ARENDT T, BRAUER K. Cortical areas abundant in extracellular matrix chondroitin sulphate proteoglycans are less affected by cytoskeletal changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 1999; **92**: 791–805.
- [9] BRÜCKNER G, GROSCHE J, SCHMIDT S, HÄRTIG W, MARGOLIS RU, DELPECH B, SEIDENBECHER CI, CZANIERA R, SCHACHNER M. Postnatal development of perineuronal nets in wild-type mice and in a mutant deficient in tenascin-R. *J Comp Neurol* 2000; **428**: 616–629.

- [10] BRÜCKNER G, GROSCHE J. Perineuronal nets show intrinsic patterns of extracellular matrix differentiation in organotypic slice cultures. *Exp Brain Res* 2001; **137**: 83–93.
- [11] BUKALO O, SCHACHNER M, DITYATEV A. Modification of extracellular matrix by enzymatic removal of chondroitin sulfate and by lack of tenascin-R differentially affects several forms of synaptic plasticity in the hippocampus. *Neuroscience* 2001; **104**: 359–369.
- [12] CELIO MR, BLÜMCKE I. Perineuronal nets – a specialized form of extracellular matrix in the adult nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 1994; **19**: 128–145.
- [13] CELIO MR, SPREAFICO R, DE BIASI S, VITELLARO-ZUCCARELLO L. Perineuronal nets: past and present. *Trends Neurosci* 1998; **21**: 510–515.
- [14] DELPECH B, DELPECH A, BRÜCKNER G, GIRARD N, MAINGONNAT C. Hyaluronan and hyaluronectin in the nervous system. *Ciba Found Symp* 1989; **143**: 208–220.
- [15] DITYATEV A, SCHACHNER M. Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 2003; **4**: 456–468.
- [16] GARWOOD J, HECK N, REICHARDT F, FAISSNER A. Phosphacan short isoform, a novel non-proteoglycan variant of phosphacan/receptor protein tyrosine phosphatase-beta, interacts with neuronal receptors and promotes neurite outgrowth. *J Biol Chem* 2003; **278**: 24164–24173.
- [17] HAGIHARA K, MIURA R, KOSAKI R, BERGLUNDE E, RANSCHT B, YAMAGUCHI Y. Immunohistochemical evidence for the brevicin-tenascin-R interaction: colocalization in perineuronal nets suggests a physiological role for the interaction in the adult rat brain. *J Comp Neurol* 1999; **410**: 256–264.
- [18] HÄRTIG W, DEROUICHE A, WELT K, BRAUER K, GROSCHE J, MADER M, REICHENBACH A, BRÜCKNER G. Cortical neurons immunoreactive for the potassium channel Kv3.1b subunit are predominantly surrounded by perineuronal nets presumed as a buffering system for cations. *Brain Res* 1999; **842**: 15–29.
- [19] HÄRTIG W, KLEIN C, BRAUER K, SCHUPPEL KF, ARENDT T, BIGL V, BRÜCKNER G. Hyperphosphorylated protein tau is restricted to neurons devoid of perineuronal nets in the cortex of aged bison. *Neurobiol Aging* 2001; **22**: 25–33.
- [20] HÄRTIG W, SINGER A, GROSCHE J, BRAUER K, OTTERSEN OP, BRÜCKNER G. Perineuronal nets in the rat medial nucleus of the trapezoid body surround neurons immunoreactive for various amino acids, calcium-binding proteins and the potassium channel subunit Kv3.1b. *Brain Res* 2001; **899**: 123–133.
- [21] HAUNSO A, IBRAHIM M, BARTSCH U, LETIEMBRE M, CELIO MR, MENOUD P. Morphology of perineuronal nets in tenascin-R and parvalbumin single and double knockout mice. *Brain Res* 2000; **864**: 142–145.
- [22] HENDRY SH, HOCKFIELD S, JONES EG, MCKAY R. Monoclonal antibody that identifies subsets of neurones in the central visual system of monkey and cat. *Nature* 1984; **307**: 267–269.
- [23] HENDRY SH, JONES EG, HOCKFIELD S, MCKAY RD. Neuronal populations stained with the monoclonal antibody Cat-301 in the mammalian cerebral cortex and thalamus. *J Neurosci* 1988; **8**: 518–542.
- [24] HERNDON ME, STIPP CS, LANDER AD. Interactions of neural glycosaminoglycans and proteoglycans with protein ligands: assessment of selectivity, heterogeneity and the participation of core proteins in binding. *Glycobiology* 1999; **9**: 143–155.
- [25] HORN AK, BRÜCKNER G, HARTIG W, MESSOUDI A. Saccadic omnipause and burst neurons in monkey and human are ensheathed by perineuronal nets but differ in their expression of calcium-binding proteins. *J Comp Neurol* 2003; **455**: 341–352.
- [26] JONES FS, JONES PL. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn* 2000; **218**: 235–259.
- [27] MACE K, SAXOD R, FEUERSTEIN C, SADOUL R, HEMMING FJ. Chondroitin and keratan sulfates have opposing effects on attachment and outgrowth of ventral mesencephalic explants in culture. *J Neurosci Res* 2002; **70**: 46–56.
- [28] MATTHEWS RT, KELLY GM, ZERILLO CA, GRAY G, TIEMEYER M, HOCKFIELD S. Aggrecan glycoforms contribute to the molecular heterogeneity of perineuronal nets. *J Neurosci* 2002; **22**: 7536–7547.
- [29] MILLER B, SHEPPARD AM, BICKNESE AR, PEARLMAN AL. Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing cerebral cortex: the distribution of neurocan distinguishes forming afferent and efferent axonal pathways. *J Comp Neurol* 1995; **355**: 615–628.
- [30] MORRIS NP, HENDERSON Z. Perineuronal nets ensheath fast spiking, parvalbumin-immunoreactive neurons in the medial septum/diagonal band complex. *Eur J Neurosci* 2000; **12**: 828–838.
- [31] MURAKAMI T, OHTSUKA A. Perisynaptic barrier of proteoglycans in the mature brain and spinal cord. *Arch Histol Cytol* 2003; **66**: 195–207.
- [32] NEVILLE H, BAVELIER D. Human brain plasticity: evidence from sensory deprivation and altered language experience. *Prog Brain Res* 2002; **138**: 177–188.



- [33] NIKONENKO A, SCHMIDT S, SKIBO G, BRÜCKNER G, SCHACHNER M. Tenascin-R-deficient mice show structural alterations of symmetric perisomatic synapses in the CA1 region of the hippocampus. *J Comp Neurol* 2003; **456**: 338–349.
- [34] NOWICKA D, LIGUZ-ŁĘCZNAR M, SKANGIEL-KRAMSKA J. A surface antigen delineating a subset of neurons in the primary somatosensory cortex of the mouse. *Acta Neurobiol Exp* 2003; **63**: 185–196.
- [35] OJIMA H, SAKAI M, OHYAMA J. Molecular heterogeneity of *Vicia villosa*-recognized perineuronal nets surrounding pyramidal and nonpyramidal neurons in the guinea pig cerebral cortex. *Brain Res* 1998; **786**: 274–280.
- [36] OOHIRA A, MATSUI F, TOKITA Y, YAMAUCHI S, AONO S. Molecular interactions of neural chondroitin sulfate proteoglycans in the brain development. *Arch Biochem Biophys* 2000; **374**: 24–34.
- [37] PIZZORUSSO T, MEDINI P, BERARDI N, CHIERZI S, FAWCETT JW, MAFFEI L. Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science* 2002; **298**: 1248–1251.
- [38] PROBSTMEIER R, STICHEL CC, MULLER HW, ASOU H, PESHEVA P. Chondroitin sulfates expressed on oligodendrocyte-derived tenascin-R are involved in neural cell recognition. Functional implications during CNS development and regeneration. *J Neurosci Res* 2000; **60**: 21–36.
- [39] QIAO D, MEYER K, MUNDHENKE C, DREW SA, FRIEDL A. Heparan sulfate proteoglycans as regulators of fibroblast growth factor-2 signaling in brain endothelial cells. Specific role for glypican-1 in glioma angiogenesis. *J Biol Chem* 2003; **278**: 16045–16053.
- [40] ROLLENHAGEN A, CZANIERA R, ALBERT M, WINTERGERST ES, SCHACHNER M. Immunocytochemical localization of the HNK-1 carbohydrate in murine cerebellum, hippocampus and spinal cord using monoclonal antibodies with different epitope specificities. *J Neurocytol* 2001; **30**: 337–335.
- [41] SAGHATELYAN AK, DITYATEV A, SCHMIDT S, SCHUSTER T, BARTSCH U, SCHACHNER M. Reduced perisomatic inhibition, increased excitatory transmission, and impaired long-term potentiation in mice deficient for the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R. *Mol Cell Neurosci* 2001; **17**: 226–240.
- [42] SAYED R, MUBARAK W, OHTSUKA A, TAGUCHI T, MURAKAMI T. Histochemical study of perineuronal nets in the retrosplenial cortex of adult rats. *Ann Anat* 2002; **184**: 333–339.
- [43] SCHUPPEL K, BRAUER K, HÄRTIG W, GROSCHE J, EARLEY B, LEONARD BE, BRÜCKNER G. Perineuronal nets of extracellular matrix around hippocampal interneurons resist destruction by activated microglia in trimethyltin-treated rats. *Brain Res* 2002; **958**: 448–453.
- [44] SUR M, FROST DO, HOCKFIELD S. Expression of a surface-associated antigen on Y-cells in the cat lateral geniculate nucleus is regulated by visual experience. *J Neurosci* 1988; **8**: 874–882.
- [45] VIGGIANO D. The two faces of perineuronal nets. *Neuroreport* 2000; **11**: 2087–2090.
- [46] VITELLARO-ZUCCARELLO L, MERONI A, AMADEO A, DE BIASI S. Chondroitin sulfate proteoglycans in the rat thalamus: expression during postnatal development and correlation with calcium-binding proteins in adults. *Cell Tissue Res* 2001; **306**: 15–26.
- [47] WEBER P, BARTSCH U, RASBAND MN, CZANIERA R, LANG Y, BLUETHMANN H, MARGOLIS RU, LEVINSON SR, SHRAGER P, MONTAG D, SCHACHNER M. Mice deficient for tenascin-R display alterations of the extracellular matrix and decreased axonal conduction velocities in the CNS. *J Neurosci* 1999; **19**: 4245–4262.
- [48] WILSON MT, SNOW DM. Chondroitin sulfate proteoglycan expression pattern in hippocampal development: potential regulation of axon tract formation. *J Comp Neurol* 2000; **424**: 532–546.
- [49] YAMAGUCHI Y. Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* 2000 Feb; **57**(2): 276–289.
- [50] ZHOU XH, BRAKEBUSCH C, MATTHIES H, OOHASHI T, HIRSCH E, MOSER M, KRUG M, SEIDENBECHER CI, BOECKERS TM, RAUCH U, BUETTNER R, GUNDELFINGER ED, FASSLER R. Neurocan is dispensable for brain development. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 5970–5978.

Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska-Kaczmarek

Otrzymano: 27.09.2003 r.

Przyjęto: 23.10.2003 r.

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

e-mail: monliguz@nencki.gov.pl

## ZABURZENIA ROZWOJOWE I DYSFUNKCJA GONAD SPOWODOWANE NIEPRAWIDŁOWYM DZIAŁANIEM HORMONÓW WARUNKUJĄCYCH ROZWÓJ MĘSKIEGO UKŁADU PŁCIOWEGO\*

DEVELOPMENTAL DISORDERS AND DYSFUNCTION OF GONADS  
AS A RESULT OF ABNORMAL ACTION OF HORMONES RESPONSIBLE  
FOR MALE REPRODUCTIVE SYSTEM DEVELOPMENT

Barbara WISZNIEWSKA, Mariola MARCHLEWICZ, Agnieszka KOLASA

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Pomorskiej Akademii Medycznej  
w Szczecinie

*Streszczenie:* Rozwój męskiego układu płciowego indukowany i kontrolowany jest przez hormony produkowane w różnicującej się gonadzie. Niewrażliwość na androgeny, spowodowana mutacją receptora AR, czy brak aktywności  $5\alpha$ -reduktazy konwertującej T do DHT, są powodem nieprawidłowości rozwojowych i często przyczyną męskiej niepłodności. Podobne w skutkach efekty wywołuje brak estrogenów, wynikający z mutacji genu aromatazy cytochromu P450 oraz zespół oporności na te hormony, spowodowany mutacją genu receptorów estrogenowych. Jak wykazują liczne badania doświadczalne, estrogeny oddziałujące na płody lub noworodki zwierząt płci męskiej, mogą być powodem nieprawidłowości rozwojowych, wynikających z zaburzenia równowagi w ilości androgenów w stosunku do estrogenów. Znaczna liczba doniesień dokumentujących dysfunkcję układu płciowego mężczyzn, wzrastającą liczbę przypadków występowania jego wad rozwojowych oraz fakt, że w ostatnich 50 latach liczba plemników w ejakulacie mężczyzn zmniejszyła się przynajmniej o połowę, potwierdza hipotezy, że również hormony środowiskowe mogą zaburzać rozwój męskiego układu płciowego i jego funkcję, ujawniającą się niekiedy dopiero po osiągnięciu dojrzałości płciowej.

*Słowa kluczowe:* rozwój męskiego układu płciowego, androgeny, estrogeny, hormony środowiskowe.

*Summary:* The male reproductive system development is induced and controlled by hormones produced in the fetal gonad. The androgen receptor mutation which results in androgen insensitivity or  $5\alpha$ -reductase deficiency, may cause developmental disorders and frequently male infertility. Similar

\*Praca naukowa finansowana ze środków Komitetu Badań Naukowych w latach 2003-2005 jako projekt zamawiany nr PBZ-KBN-084/P06/2002.



effects are produced in the congenital estrogen deficiency as a result of the mutation in cytochrome P450 aromatase gene or the estrogen resistance syndrome connected with the mutation in the estrogen-receptor gene. Exposure in fetal and neonatal life of male animals to exogenous estrogen can result in developmental abnormalities as a consequence of abnormal balance in action between androgens and estrogens. The increasing incidence of dysfunction and disorders of male reproductive system, and a decline of sperm counts by about half in the past 50 years, support the hypothesis that environmental hormones can induce disorders and dysfunction of the male reproductive system which can be manifested in adult life.

*Key words:* male reproductive system development, androgens, estrogens, environmental hormones.

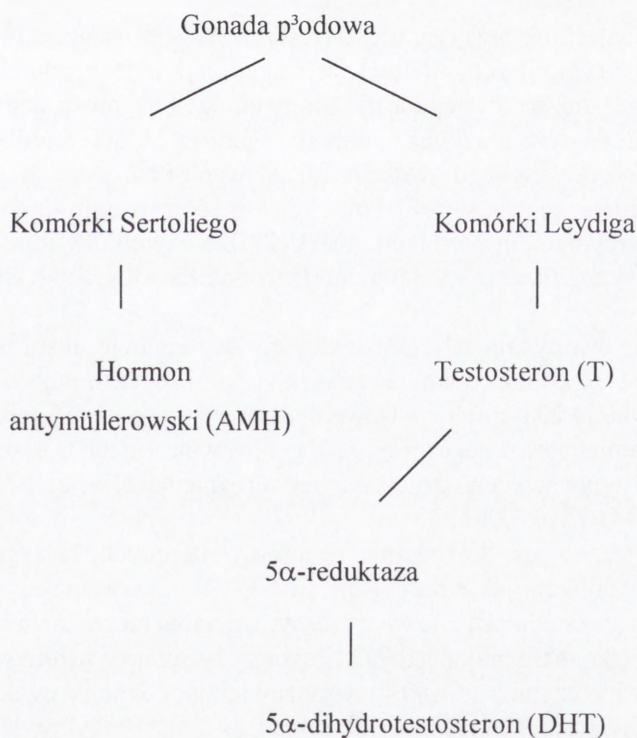
Rozwój męskiego układu płciowego jest indukowany i kontrolowany przez hormony syntetyzowane przez komórki różnicującej się gonady. Nie tylko rozwój jądra wymaga działania hormonów, ale również różnicowanie się przewodów wyprowadzających nasienie, gruczołów płciowych dodatkowych i zewnętrznych narządów płciowych zależne jest od prawidłowej produkcji hormonów, wydzielanych przez płodową gonadę w odpowiedniej ilości i o właściwym czasie. Dlatego też, określone poziomy lokalnie syntetyzowanych hormonów – hormonu antymüllerowskiego (AMH; *Anti-Müllerian Hormone*), testosteronu (T), dihydrotestosteronu (DHT) i estrogenów oraz ich parakryne działanie, warunkują prawidłowy rozwój wewnętrznych i zewnętrznych narządów płciowych. Wszelkie zachwiania w równowadze hormonów w okresie życia płodowego mogą być powodem nieprawidłowości rozwojowych czy dysfunkcji gonady, ujawniających się zarówno w dzieciństwie, jak i po osiągnięciu dojrzałości płciowej. Zaburzenia równowagi hormonalnej mogą być wynikiem mutacji genetycznych w obrębie genów kodujących białka czynników transkrypcyjnych, enzymów szlaku steroidogenezy, enzymów uczestniczących w konwersji testosteronu do dihydrotestosteronu, aromatyzowaniu androgenów, czy też ekspozycji płodu na oddziaływanie hormonów egzogennych. Ze względu na szeroki wachlarz zagadnień, w opracowaniu tym ograniczono się do nieprawidłowości w funkcjonowaniu gonady męskiej, których powodem są uwarunkowane genetycznie zespoły niewrażliwości na androgeny, estrogeny, brak estrogenów oraz oddziaływanie hormonów środowiskowych na rozwój męskiego układu płciowego.

## ROZWÓJ MĘSKIEGO UKŁADU PŁCIOWEGO

Płeć genetyczna zarodka człowieka i innych ssaków określana jest podczas zapłodnienia, w chwili wytworzenia kompletu chromosomów płciowych XX lub XY [52]. Gonadalna płeć męska określana jest natomiast przez działanie genu determinującego płeć, zlokalizowanego na chromosomie Y, identyfikowanego jako gen *SRY* (*Sex-determining Region Y chromosome*) [10,32]. Do 7. tygodnia życia płodowego zawiązek gonady zwany jest gonadą niezróżnicowaną, która jest strukturalnie identyczna dla obu płci. W tym też czasie, występują 2 pary przewodów płciowych: Müllera i Wolffa. Przewody Müllera stanowią zawiązek dróg płciowych żeńskich, przewody

Wolffa natomiast są zawiązkami przewodów wyprowadzających nasienie w męskim układzie płciowym. Jeżeli w wyposażeniu genetycznym znajduje się chromosom Y, to pod koniec 7 tygodnia rozwoju zarodkowego, gonada obojętna zaczyna różnicować się w jądro [52].

Zawiązki jąder powstają po przyśrodkowej stronie pranerczy i mają postać podłużnych fałdów, zwanych grzebieniami płciowymi [38]. Jest to pasmo mezenchymy pokrytej mezodermalnym nabłonkiem otrzewnej. Komórki, początkowo jednowarstwowego nabłonka, zaczynają się dzielić i wrastać w mezenchymę, tworząc sznury płciowe. Komórki sznurów płciowych tworzą przyszłe komórki podporowe Sertoliego. Komórki prapłciowe (gonocyty) powstają znacznie wcześniej, z endodermy ściany pęcherzyka żółtkowego [37]. Z chwilą wytworzenia fałdów poprzecznych zarodka, szczególnie fałdu ogonowego, ta część pęcherzyka żółtkowego, która zawiera komórki prapłciowe, zostaje włączona do zarodka i tworzy jelito tylne. Potem komórki prapłciowe migrują wzdłuż grzbietowej krezki do mezenchymy grzebieni płciowych, a następnie zasiedlają sznury płciowe [37]. Komórki te są prekursorami spermatogoniów. Proces migracji komórek prapłciowych, podobnie jak melanoblastów i hematopoetycznych komórek macierzystych, indukowany jest przez SCF, ligand receptora c-kit, zlokalizowanego w błonie komórkowej komórek germinalnych [37,49,54]. Podczas migracji do grzebieni płciowych ich adhezja do fibronektyny substancji międzykomórkowej ulega drastycznemu obniżeniu [38], co ułatwia ich wędrówkę.





Rozwój męskiego układu płciowego indukowany jest hormonami syntetyzowanymi przez płodową gonadę. Są to: AMH, T i DHT (patrz rycina).

AMH syntetyzowany jest przez płodowe komórki Sertoliego i zwany jest też substancją hamującą rozwój przewodów Müllera (MIS – *Müllerian Inhibiting Substance*) lub czynnikiem hamującym rozwój przewodów Müllera (MIF – *Müllerian Inhibiting Factor*) [2,38]. AMH jest 140 kD specyficzną gonadalną homodimerową glikoproteiną, należącą do nadrodziny transformującego czynnika wzrostu  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [51,52]. Ludzki AMH syntetyzowany jest jako 560-aminokwasowe białko prekursorowe, zawierające miejsce rozszczepienia zlokalizowane przy 109. aminokwasie C-końca białka. Dla pełnej aktywności białka niezbędne jest rozszczepienie łańcucha AMH. Hormon antymüllerowski kodowany jest przez krótki gen o długości 2,75 kb, zawierający pięć eksonów [52]. Pomimo że AMH uczestniczy w różnicowaniu płci męskiej, gen zlokalizowany jest na krótkim ramieniu 19. chromosomu autosomalnego. AMH syntetyzowany jest wyłącznie przez komórki Sertoliego jądra [53]. Komórki te ujawniają wysoką ekspresję AMH od wczesnego okresu życia płodowego. Jego produkcja wykrywana jest w rozwijającym się jądrze w czasie formowania sznurów płciowych, tj. w 7. tygodniu życia płodowego zarodka ludzkiego, 11,5. dniu rozwoju myszy [7] i 13,5. dniu rozwoju szczura [18]. Czas rozpoczęcia syntezy AMH jest bardzo istotny w różnicowaniu płci. W zarodkach męskich, ekspresja i synteza AMH musi rozpocząć się przed utratą wrażliwości komórek przewodów Müllera na ten hormon. W zarodkach ludzkich przewody Müllera tracą wrażliwość na działanie AMH przed końcem 8. tygodnia rozwoju [52].

W gonadzie regulacja ekspresji genu *AMH* jest złożona i pozostaje pod ścisłą kontrolą czynników transkrypcyjnych, ulegających ekspresji w komórkach Sertoliego [2,7,39,52]. Uważa się, że występują trzy fazy regulacji ekspresji genu *AMH*: faza inicjacji, faza utrzymywania i faza represji. Fazy te odzwierciedlają 3 okresy różnicowania komórek Sertoliego – wczesne różnicowanie i rozpoczęcie syntezy AMH, proliferacja utrzymująca ekspresję AMH oraz końcowe dojrzewanie komórek w okresie pokwitania, z zatrzymaniem produkcji AMH [7]. Do czynników transkrypcyjnych uczestniczących w regulacji ekspresji genu *AMH* należą: SRY, SF-1, SOX-9, WT-1 oraz DAX-1.

Za pierwszego kandydata odpowiedzialnego za regulację ekspresji AMH we wczesnym okresie rozwoju zarodkowego uznano czynnik determinujący rozwój jądra SRY. Gen *SRY* koduje 204-aminokwasowe białko. Sugeruje się, że specyficzna rola SRY w różnicowaniu jądra polega na supresji genów włączonych w różnicowanie się gonady żeńskiej i aktywacji genów niezbędnych w różnicującej się gonadzie męskiej – aktywacja genu *AMH* [10,32,52].

Gen *SF-1* zaliczany jest do rodziny receptorów sierocych, którego ligand jest nieznany. Jedną z funkcji, jakie przypisuje się SF-1, to aktywacja ekspresji AMH, przez co odgrywa on zasadniczą rolę we wczesnym rozwoju niezróżnicowanej gonady. Ponadto jest niezbędnym czynnikiem regulacji syntezy hormonów steroidowych [19,39].

Gen *WT-1* koduje czynnik transkrypcyjny zawierający 2 palce cynkowe. Uważa się, że działa zarówno jako aktywator, jak i represor transkrypcyjny. Jego obecność

jest niezbędna dla prawidłowego rozwoju grzebieni płciowych w stadium gonady nieodróżnicowanej [39].

Funkcję podobną do genu *WT-1* przypisuje się również produktowi genu *SOX-9*. Gen ten regulowany jest prawdopodobnie przez *SRY*, a przypuszczalny mechanizm jego działania polega na udziale w różnicowaniu i długotrwałym utrzymywaniu komórek Sertoliego. Ponadto, rolą *SOX-9* może być supresja różnicowania jajnika z nieodróżnicowanej gonady oraz interakcja z jądrowym receptorem *SF-1* w regulowaniu promotora genu *AMH* [32,39].

*DAX-1* jest nietypowym sierocym receptorem jądrowym, którego struktura nie zawiera palców cynkowych w domenie wiążącej się z DNA. *DAX-1* hamuje aktywację *SF-1*, a także antagonizuje synergistyczne działanie istniejące między *SF-1* i *WT-1*. Stąd też uważa się, że to białko działa jako antagonistą *SRY*.

Przypuszcza się, że sekrecja *AMH* może podlegać regulacji również przez estrogeny z uwagi na fakt, że 13-zasadowy, palindromowy odcinek DNA, prawie identyczny z odcinkiem DNA zwanym *ERE* (*Estrogen Response Element*) genów vitellogeniny, jest obecny w ludzkim genie *AMH* [25].

*AMH* działa poprzez receptory I i II typu (*AMHRI* i *AMHRII*). Obydwa typy receptorów są transbłonowymi kinazami seryno/treoninowymi. U człowieka, myszy i szczura sklonowano receptor *AMH* typu II, zlokalizowany w komórkach mezenchymatycznych, otaczających przewody Müllera. Po związaniu się z receptorem, *AMH* indukuje inwolucję przewodów Müllera. Jest też najwcześniejszym markerem komórek Sertoliego różnicującej się gonady męskiej [7,53]. Ekspresja *AMH* utrzymywana jest aż do osiągnięcia dojrzałości płciowej, a następnie ulega hamowaniu na skutek działania androgenów i rozpoczęcia podziałów mejotycznych komórek germinalnych [2,52]. Oprócz komórek mezenchymatycznych, receptory dla *AMH* zawierają również komórki Sertoliego oraz komórki Leydiga, przez co uważa się, że *AMH* włączony jest również w kontrolę różnicowania i aktywności komórek Leydiga [2,51]. Uwalnianie *AMH* przez komórki Sertoliego podlega regulacji przez *FSH* [53], dla której komórki te zawierają receptory [2].

Przed 8. tygodniem życia płodowego, w tkance interstycjalnej różnicującego się jądra pojawiają się komórki Leydiga [67], które szybko proliferują aż do 18. tygodnia, kiedy osiągają liczbę utrzymywaną do trzeciego trymestru życia płodowego [17,42]. Komórki te rozpoczynają syntezę androgenów, niezbędnych do dalszego rozwoju. U człowieka, w pierwszych dwu trymestrach ciąży, funkcja komórek Leydiga pozostaje pod wpływem *hCG*. Wynika to z faktu, że połączenia naczyniowe przysadkowo-podwzgórzowe ustalają się w 11,5. tygodniu, czyli 3 tygodnie po rozpoczęciu steroidogenezy w gonadzie [52]. Istnieją sugestie, że dopiero w ostatnich trzech miesiącach życia płodowego produkcja androgenów pozostaje pod kontrolą płodowej przysadki, a we wcześniejszych etapach rozwoju gonadotropiny przysadkowe nie są niezbędne [52]. Po związaniu się z receptorem błonowym *LH/hCG* wywierają podwójny efekt na komórki Leydiga. Krótkotrwały, odpowiedzialny za biosyntezę androgenów i długotrwały, warunkujący różnicowanie i proliferację komórek Leydiga [52]. Głównym androgenem syntetyzowanym przez te komórki jest testosteron. Jego wysokie stężenie



lokalnie indukuje rozwój przewodów Wolffa między 9.–13. tygodniem życia płodowego i ich różnicowanie w wewnętrzne narządy płciowe – najądrza, nasieniowody i pęcherzyki nasienne [52]. Badania Prince [50] wykazały, że u człowieka występuje trój etapowy przebieg produkcji testosteronu przez komórki Leydiga. Pierwszy szczyt wydzielania testosteronu występuje pod koniec pierwszego trymestru życia płodowego (14.–18. tydzień), drugi od 2. do 3. miesiąca po urodzeniu, trzeci natomiast rozpoczyna się z chwilą osiągnięcia dojrzałości płciowej [50]. Testosteron syntetyzowany przez komórki Leydiga działa poprzez swoiste receptory androgenowe (AR).

Do różnicowania zewnętrznych narządów płciowych wymagane jest natomiast działanie dihydrotestosteronu (DHT), powstającego drogą konwersji T przy udziale 5 $\alpha$ -reduktazy [29]. Podobnie jak T, DHT działa poprzez AR, do których ma znacznie wyższe powinowactwo niż T, wynikające z długotrwałej stabilizacji kompleksu AR-DHT. Rozwój zewnętrznych narządów płciowych rozpoczyna się ok. 9. tygodnia życia płodowego, a proces ten jest całkowicie ukończony w 14. tygodniu życia płodowego [52]. Do 16. tygodnia rozwoju rozmiar penisa nie odbiega od rozmiaru łechtaczki u płci żeńskiej, a jego dalszy wzrost następuje w 20. tygodniu rozwoju [52].

Pierwotne gonady rozwijają się w jamie brzusznej na wysokości nerek i już w 3. miesiącu życia płodowego zaczyna się ich zstępowanie. Rozwijające się jądro, jeszcze przed rozpoczęciem tego procesu połączone jest pasmem zągęszczonej mezenchymy zwanym jądrowodem, z okolicą pachwinową. W okresie, kiedy jądro zaczyna zstępować w kierunku pierścienia pachwinowego (brzuszna faza zstępowania jąder), powstaje pozabrzuszną część jądrovodu, która biegnie od okolicy pachwinowej ku guzkom mosznowym. Później z uchyłka otrzewnej powstaje wyrostek pochwoy, który różnicuje się w kanał pachwinowy. Do tak wykształconego kanału pachwinowego, przechodzącego w jamę worka mosznowego, zstępuje jądro wraz z najądrzem i początkowym odcinkiem nasieniowodu. Jednocześnie jądrowód łączący jądro z dnem wyrostka pochwowego ulega w miarę obniżania się jądra stopniowemu skracaniu. W końcu pozostaje z niego krótkie więzadło łączące dolny biegun jądra z dnem jamy worka mosznowego (faza pachwinowa zstępowania jąder) [52]. Obydwie fazy wymagają działania dihydrotestosteronu, ale również inne czynniki odgrywają rolę w tym procesie. Zalicza się do nich czynnik insulinopodobny 3 (*Insulin-like Factor-3; Insl3*), zwany także czynnikiem relaksynopodobnym (*relaxin-like factor*). Syntetyzowany jest przez płodowe komórki Leydiga i działa na jądrowód w fazie brzusznej [20,43]. U płodu ludzkiego, jądro osiąga wewnętrzny pierścień pachwinowy przed 24. tygodniem rozwoju. Faza pachwinowa zstępowania jąder ma miejsce w 2 ostatnich miesiącach życia płodowego. Odgrywa w niej rolę wiele różnych czynników, niemniej obecność androgenów jest niezbędna do prawidłowej migracji pachwinowo-mosznowej gonad. U noworodka obydwie jądra powinny znajdować się w mosznie, co ma miejsce u około 97% populacji.

## ZABURZENIA ROZWOJOWE ZWIĄZANE Z NIEPRAWIDŁOWYMI STĘŻENIAMI HORMONÓW PODCZAS ROZWOJU MĘSKIEGO UKŁADU PŁCIOWEGO

Rozwój wewnętrznych oraz zewnętrznych narządów męskiego układu płciowego regulowany jest hormonalnie, poprzez androgeny syntetyzowane przez komórki różnicującej się gonady. Dlatego też nieprawidłowe stężenia T czy DHT w okresie płodowym mogą prowadzić do powstania szeregu zaburzeń rozwojowych.

Nieprawidłowości w stężeniach androgenów odpowiedzialnych za rozwój mogą być wynikiem mutacji genu odpowiedzialnego za ekspresję receptorów androgenowych (AR), czy  $5\alpha$ -reduktazy ( $5\alpha$ -red), enzymu konwertującego testosteron do dihydrotestosteronu. Jak wykazały badania ostatnich lat, również estrogeny odgrywają ważną rolę w rozwoju męskiego układu płciowego. Stąd, mutacje dotyczące genów odpowiedzialnych za ekspresję receptorów estrogenowych  $\alpha$  i  $\beta$  ( $ER\alpha$  i  $ER\beta$ ) czy genu *CYP 19* aromatazy cytochromu P450 mogą być powodem nieprawidłowości rozwojowych. Badania prowadzone na modelach zwierzęcych wskazują, że również ekspozycja płodów męskich na działanie estrogenów środowiskowych może prowadzić do zachwiania równowagi hormonalnej.

### Zespół niewrażliwości na androgeny i wrodzony niedobór $5\alpha$ -reduktazy

Testosteron i dihydrotestosteron działają na komórki docelowe, regulując ekspresję genów, przez receptory androgenowe (AR). W gonadzie mężczyzn, AR zlokalizowane są w jądrach komórek Sertoliego, okołokanalikowych komórek mioidalnych oraz w jądrach komórek Leydiga. Receptory dla androgenów występują również w jądrach komórek nabłonkowych przewodu najądrza, pęcherzyków nasiennych i prostaty [47].

Receptor androgenowy należy do dużej rodziny białek wiążących się z DNA przy udziale palców cynkowych. Rodzina ta obejmuje też receptory innych hormonów steroidowych, receptory hormonów tarczycy, receptory retinoidowe oraz coraz liczniejszą grupę receptorów sierocych. Gen receptora androgenów zlokalizowany jest na chromosomie Xq11-12 i obejmuje ponad 90 kilobaz, podzielonych na 8 eksonów. Ekson 1 koduje N-koniec białka i odpowiedzialny jest za regulację transkrypcji genu [9,68]. Jest to duży ekson zawierający powtarzające się sekwencje aminokwasów. U płodnych mężczyzn rasy kaukaskiej oznaczono średnio 23 (od 13 do 30) powtórzeń glutaminy [27,28,70]. Eksony 2 i 3 kodują domenę wiążącą się z DNA i zawierają 2 palce cynkowe. Eksony 4, 5, 6, 7, 8 genu kodują tę część białka receptora, która odpowiedzialna jest za wiązanie liganda.

Nieprawidłowości molekularnej struktury receptora androgenów są powodem minimalnej, częściowej bądź całkowitej niewrażliwości na androgeny.

Do tej pory przedstawiono zaledwie kilka przypadków częściowej lub całkowitej delecji genu receptora androgenowego, co wskazuje, że przypadki takie nie są częste. Odnotowano natomiast ponad 300 różnych mutacji, z których większość polegała na



mutacji punktowej, prowadzącej do substytucji jednego aminokwasu [9,22]. Mutacje te dotyczyć mogą domeny wiążącej się z DNA (ekson 2 i 3), pierwszego bądź drugiego palca cynkowego lub delecji eksonu 3. Transkrypty zmutowanego genu nie są zdolne do zapoczątkowania transkrypcji, co może być powodem całkowitej niewrażliwości na androgeny. Mutacje dotyczące eksonów kodujących domenę wiążącą ligand - 4, 5, 6, 7, czy 8, warunkują występowanie u pacjentów z taką mutacją zespołu częściowej [24] bądź też całkowitej niewrażliwości na androgeny [23]. U niepłodnych mężczyzn z mutacją/ami genu AR stwierdzono znaczną oligozoospermie lub azoospermie. Mogą występować też inne anomalie, takie jak: wnętrostwo, spodziectwo, ginekomastia, niepełna wirylizacja. U pacjentów tych obserwuje się podwyższone poziomy LH, przy prawidłowym bądź nieco podwyższonym poziomie testosteronu w surowicy krwi. Częstotliwość mutacji punktowych w genie AR u niepłodnych pacjentów ze znaczną oligozoospermie lub azoospermie wg Foresta i wsp. [22] wynosi 2–3%.

Niedobór  $5\alpha$ -reduktazy ( $5\alpha$ -red), enzymu konwertującego testosteron do  $5\alpha$ -dihydrotestosteronu, może być powodem nieprawidłowości rozwojowych dotyczących zewnętrznych narządów płciowych. Jak wspomniano wyżej, ten właśnie hormon odpowiedzialny jest za prawidłowy przebieg tych procesów. Enzym ten występuje w dwóch izoformach  $5\alpha$ -red 1 i 2, które kodowane są przez 2 odrębne geny [29]. Mutacja punktowa w eksonie 2 czy 5 genu  $5\alpha$ -red-2, powoduje obojnactwo rzekome męskie, objawiające się występowaniem spodziectwa kroczo-mosznowego ze szczątkową pochwą (*pseudovaginal perineoscrotal hypospadias*) [11,22,29]. W gonadzie pacjentów z obojnactwem rzekomym zależnym od niedoboru  $5\alpha$ -reduktazy ujawniono atrofie kanalików krętych jądra oraz całkowite zatrzymanie spermatogenezy. W przestrzeniach interstycjalnych obserwowano liczne hyperplastyczne komórki Leydiga, zawierające duże krystaloidy Reinkego. W surowicy krwi natomiast notowano znacznie podwyższone stężenie LH, FSH oraz prolaktyny, testosteron w normie i nieznacznie podwyższony poziom estradiolu [45]. Przypuszcza się, że brak funkcjonalnej  $5\alpha$ -reduktazy może być powodem oligoastenoospermii [58], a także znacznej oligozoospermii lub azoospermii, niekiedy w połączeniu z wnętrostwem i spodziectwem [22].

### Wrodzony brak estrogenów i oporność na estrogeny

Wrodzony brak estrogenów związany jest z mutacją genu kodującego kompleks enzymu konwertującego androgeny do estrogenów – aromatazy cytochromu P450. Jak wykazały badania ostatnich lat, w gonadzie mężczyzn, zdolność do aromatyzacji androgenów mają komórki Leydiga, spermatocyty w stadium pachytenu, spermatydy oraz plemniki [4,14], a u niedojrzałych płciowo szczurów także komórki Sertoliego [13,14]. Gen aromatazy ulega również ekspresji w komórkach gonady chłopców przed osiągnięciem dojrzałości płciowej [57]. Ponadto, obecność aromatazy wykazano w komórkach nabłonkowych najądrza szczura [69]. Fakt uwalniania  $17\beta$ -estradiolu przez hodowane komórki nabłonkowe najądrza ludzkiego wskazuje, że również te komórki zawierają aktywną aromatazę cytochromu P450 (dane niepublikowane). Aromataza jest produktem genu *CYP 19*, który u człowieka zlokalizowany jest na chromosomie 15 (15q21.1) i zawiera przynajmniej 16 eksonów [21].

Oporność na estrogeny związana jest natomiast z brakiem bądź nieprawidłową strukturą receptorów estrogenowych. Receptor estrogenowy (ER) jest białkiem wewnątrzjądrowym wiążącym estrogeny i tak jak AR należy do rodziny receptorów steroidowych. Komplementarny DNA (cDNA) receptora estrogenowego sklonowano po raz pierwszy w 1986 roku zarówno w komórkach tkanek człowieka, jak i zwierząt. Pod koniec 1995 roku sklonowano, z komórek prostaty szczura, cDNA nowego receptora estrogenowego, określając go mianem receptor estrogenowy  $\beta$  (ER $\beta$ ) [33]. Białko ER $\beta$  wykazuje duże podobieństwo do znanego dotychczas białka receptora estrogenowego, któremu nadano nazwę receptora estrogenowego  $\alpha$  (ER $\alpha$ ). Podobieństwo dotyczy zarówno domeny wiążącej się z DNA, jak i domeny wiążącej ligand [34].

Receptor estrogenowy  $\alpha$  i receptor estrogenowy  $\beta$  są produktami dwóch odrębnych genów, zlokalizowanych na dwóch różnych chromosomach [46]. W gonadzie męczyzn, ER $\beta$  wykrywano immunohistochemicznie w jądrach komórek Sertoliego i Leydiga, podczas gdy ER $\alpha$  wykazano w komórkach Leydiga [48]. W jądrach komórek sieci jądra i kanalików odprowadzających oraz prostaty obecne były tylko ER $\beta$ . Przy użyciu tej techniki nie wykazano natomiast receptorów estrogenowych w jądrach komórek nabłonkowych najądrza [48]. Ponadto, obecność ER $\beta$  wykazano w komórkach germinalnych gonady i najądrza płodów ludzkich [65].

Do chwili obecnej opisano nieliczne przypadki (trzech pacjentów) mutacji genu aromatazy, dotyczącej pojedynczej zamiany w obrębie nukleotydu: G→A przy 1094 pz eksonu 9 [12], C→A w eksonie 6 [26], C→T w eksonie 9 [40]. Mutacje te prowadzą do substytucji jednego aminokwasu w obszarze białka, warunkującego aktywność enzymu. Opisano też pojedynczy przypadek pacjenta z wrodzoną niewrażliwością na estrogeny, spowodowaną mutacją receptora estrogenowego  $\alpha$  [61].

W przypadkach tych mutacji, opisywanych jest wiele objawów klinicznych, ale nie u wszystkich pacjentów stwierdzono niepłodność [21,30,56]. Do niedawna też trwało przekonanie, że oporność na estrogeny, spowodowana mutacją uszkadzającą gen receptora estrogenowego, jest letalna. Opisany przypadek pozwolił ustalić, że ten defekt genetyczny nie pociąga za sobą tak drastycznych konsekwencji.

Mężczyźni z opornością na estrogeny lub brakiem estrogenów, wynikającym z mutacji genu *CYP19* aromatazy cytochromu P450, zgłaszają się po poradę najczęściej z powodu postępującego wzrostu i bólów ze strony układu kostnego czy niepłodności małżeńskiej. Wzrost u tych mężczyzn postępuje jeszcze po osiągnięciu dojrzałości płciowej, podczas gdy do okresu pokwitania przebiega prawidłowo. Bóle natomiast dotyczą szczególnie kolan. Zdjęcia rentgenowskie ujawniają u tych pacjentów nieukończone kostnienie nasad, podczas gdy wiek mężczyzn około dwukrotnie przekracza ich wiek kostny. Wiek kostny 31-letniego pacjenta określa się na 15 lat [12], 26-letniego na 14 lat [40] czy 27-letniego na ok. 16 lat [26]. Ponadto, występuje obniżona gęstość mineralna kości.

Nie u wszystkich pacjentów opisywanych powyżej przypadków przeprowadzono analizę nasienia. Wykonana została u dwóch pacjentów z brakiem aktywnej aromatazy, wynikającej z mutacji punktowej w eksonie 9. [12] i w eksonie 6. [26]. Analiza nasienia



pierwszego pacjenta z brakiem estrogenów wykazała bardzo małą liczbę plemników w ejakulacie, 1 milion plemników/ml (przy normie WHO 120 milionów) oraz całkowity brak ich ruchliwości. Przy tych nieprawidłowościach w obrazie nasienia, stężenia testosteronu w surowicy były prawidłowe, estradiolu niewykrywalne, FHS wyraźnie podwyższone, a stężenia LH utrzymywały się w górnych granicach normy [12].

W drugim opisywanym przypadku, w ejakulacie pacjenta obecnych było mniej niż 1 milion/ml plemników, wszystkie pozbawione zdolności do ruchu [26]. Obydwaj pacjenci zostali poddani terapii estrogenowej, która przyniosła pozytywny efekt w stosunku do tkanki kostnej. Nie miała jednak wpływu na poprawę przebiegu spermatogenezy, a tym samym jakości nasienia. Przeprowadzona terapia estrogenowa u pacjenta, którego nasienie nie zostało poddane analizie, poprawiała również stan tkanki kostnej [21,55].

U pacjenta z wrodzoną niewrażliwością na estrogeny [61], profil hormonalny wykazywał prawidłowe stężenia testosteronu, natomiast estradiol, estron, FSH i LH występowały w bardzo dużych stężeniach. W ejakulacie natomiast wykazano prawidłową liczbę plemników (powyżej 25 milionów/ml), przy czym tylko 18% plemników było żywych. Biopsja jądra wykazała zwolnioną spermatogenezę, a w innych obszarach jej zatrzymanie najczęściej na etapie spermatocytów I-rzędu.

Prezentowane powyżej przypadki pacjentów wyraźnie wskazują, że estrogeny u mężczyzn, podobnie jak u kobiet, są niezbędne nie tylko dla prawidłowego rozwoju tkanki kostnej, ale również dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania męskiego układu płciowego.

### Oddziaływanie estrogenów środowiskowych na układ płciowy męski

Efekty oddziaływania estrogenów środowiskowych na układ płciowy męski są trudne do oceny, szczególnie gdy dotyczą zmian metabolizmu lub biodostępności endogennych estrogenów w czasie rozwoju płodowego. Założyć jednak należy, że zarówno kobiety ciężarne, jak i cała populacja jest ekspozycja na większe raczej niż mniejsze ilości estrogenów w środowisku, niż miało to miejsce 50 lat temu. Źródła i stężenia estrogenów środowiskowych, sposoby ich ekspozycji są prawdopodobnie różne w różnych krajach świata, a konsekwencje oddziaływania estrogenów mogą być zależne od cech indywidualnych poszczególnych osób. Wzrastająca liczba doniesień dokumentujących dysfunkcję układu płciowego męskiego mężczyzn, a także wzrastająca liczba przypadków nowotworów w obrębie narządów tego układu prowadzi do hipotez, że hormonalne składniki środowiskowe mogą oddziaływać na męski układ płciowy. Te bioaktywne, odporne na degradację hormony, mogą naśladować działanie endogennych estrogenów, wiązać się z ich receptorami i aktywować transkrypcję, czy też antagonizować działanie androgenów [3,15,31,44,62].

Nie ma jednak precyzyjnej odpowiedzi na pytanie, czy oddziaływanie estrogenów środowiskowych na człowieka mogłoby być odpowiedzialne za nieprawidłowości rozwojowe męskiego układu płciowego i zaburzenie jego funkcji. Większość hipotez usiłujących wyjaśnić mechanizmy powstawania nieprawidłowości, sformułowane były bowiem na podstawie doświadczeń prowadzonych na zwierzętach. Niemniej jednak,

jak wynika z licznych opracowań, nie można wykluczyć niekorzystnego oddziaływania ksenoestrogenów na rozwój i zdrowie męczyzny [3,16].

Dlaczego oddziaływanie estrogenów, nawet tych potencjalnie słabych, na rozwijający się płód płci męskiej niesie za sobą konsekwencje ujawniające się po osiągnięciu dojrzałości płciowej?

Rozwój męskiego układu płciowego, regresja przewodów Müllera, różnicowanie gonad i narządów dodatkowych oraz zstępowanie jąder do moszny ma miejsce podczas życia płodowego. Estrogeny w gonadzie płodowej syntetyzowane są przez komórki Sertoliego. Estrogeny te działają jako ujemny sygnał zwrotny dla płodowej przysadki mózgowej, regulując uwalnianie FSH. FSH natomiast reguluje syntezę estrogenów przez komórki Sertoliego, a także stymuluje proliferację tych komórek. Prawdopodobnie reguluje również sekrecję hormonu antymüllerowskiego (AMH). Przetrwaniu przewodów Müllera towarzyszy zazwyczaj zaburzenie procesu zstępowania jąder. Sugeruje się również, że AMH współodpowiedzialny jest za brzuszną fazę zstępowania gonad [52]. Zmiany w syntezie AMH mogłyby być odpowiedzialne za wady w tej fazie rozwoju męskiego układu płciowego. Hormon ten, podobnie jak wobec komórek przewodów Müllera, czy innych zawierających receptory AMH, mógłby hamować również proliferację pierwotnych komórek germinalnych [3,7].

U człowieka, podobnie jak u zwierząt, ekspozycja na estrogeny w wyższych stężeniach mogłaby zmieniać syntezę testosteronu w komórkach Leydiga. Konsekwencją nieprawidłowego stężenia testosteronu może być spodziewanie czy zaburzenie procesu zstępowania jąder do moszny. Przypuszcza się, że podwyższone stężenia estrogenów mogą wywoływać niedobór androgenów drogą hamowania ekspresji enzymów szlaku steroidogenezy [1,35,41] a także insulinopodobnego czynnika-3 syntetyzowanego przez płodowe komórki Leydiga [20,43]. Jak wykazano w badaniach doświadczalnych, ekspozycja płodów szczurzych na działanie estrogenów powoduje rzeczywiście supresję ekspresji *Insl3*, a w konsekwencji prowadzi do zaburzenia brzusznej fazy zstępowania jąder [20,43]. Przypuszcza się również, że estrogeny poprzez wytwarzanie nieprawidłowego środowiska w gonadzie mogą oddziaływać na gonocyty [6].

W jaki natomiast sposób, zbyt wysokie stężenia estrogenów mogą być powodem obniżonej liczby plemników w nasieniu, ujawniającej się dopiero po osiągnięciu dojrzałości płciowej?

Na to pytanie można odpowiedzieć nawiązując do badań eksperymentalnych na zwierzętach. Stwierdzono, że zjawisko to związane jest z hamowaniem podziałów komórek Sertoliego. Głównym hormonem regulującym proliferację oraz różnicowanie tych komórek w okresie płodowym, noworodkowym i przedpokwitaniowym jest FSH. Badania doświadczalne dowiodły, że podawanie antagonisty tej gonadotropiny powoduje zmniejszenie liczby komórek Sertoliego [59]. Podobny efekt obserwuje się w przypadku ekspozycji płodów [8] i noworodków szczurzych [5] na działanie dietylostilbestrolu (DES – *diethylstilbestrol*). U tych zwierząt obserwowano również redukcję liczby komórek podporowych, wielkości gonad oraz liczby plemników. Choć mechanizm powstawania tych nieprawidłowości nie jest w pełni poznany, to przypuszcza się, że działanie DES na komórki Sertoliego odbywa się poprzez ER $\beta$  i pośrednio przez supresję



uwalniania FSH [60]. Komórki Sertoliego dzielą się intensywnie w życiu płodowym. W okresie przedpokwitaniowym stają się komórkami w pełni zróżnicowanymi, co wiąże się z obniżeniem sekrecji estrogenów i AMH [2,53]. Zaburzenia w procesie „ustalania się” liczbę komórek Sertoliego w okresie płodowym i przedpokwitaniowym mają doniosłe konsekwencje w życiu dorosłym. Każda bowiem komórka podporowa może „obsługiwać” tylko określoną liczbę komórek plemnikotwórczych w procesie spermatogenezy. Liczba komórek Sertoliego determinuje zatem liczbę komórek plemnikotwórczych, a stąd liczbę uwalnianych plemników. Hipotezę tę potwierdza fakt, że u synów matek, którym w czasie ciąży podawano DES, stwierdzano nieprawidłowości podobne do tych, obserwowanych u zwierząt doświadczalnych. Należały do nich, takie jak: cysty w najądrzu, spodziectwo, wnetrostwo czy hypoplastyczne jądra [6,36,63,64,66]

## PODSUMOWANIE

Rozwój wewnętrznych i zewnętrznych narządów męskiego układu płciowego prowadzony jest i kontrolowany przez hormony syntetyzowane w płodowej gonadzie: hormon antymüllerowski, testosteron i dihydrotestosteron. Badania ostatnich lat wykazały ponadto, że w proces ten włączone są również estrogeny. Wszystkie te hormony wydzielane w odpowiednich stężeniach i w ściśle określonym czasie warunkują prawidłowy rozwój męskiego układu płciowego. Niewielkie nawet zachwiania równowagi w stężeniach każdego z nich czy brak możliwości odbioru sygnału niesionego przez nie mogą być powodem nieprawidłowości, mogących powstać na każdym etapie rozwoju.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] AKINGBEMI BT, YOUKER RT, SOTTAS CM, GE R, KATZ E, KLINEFELTER GR, ZIRKIN BR, HARDY MP. Modulation of rat Leydig cell steroidogenic function by di (2-ethylhexyl) phthalate. *Biol Reprod* 2001; **65**: 1252–1259.
- [2] AL-ATTAR L, NOËL K, DUTERTE M, BELVILLE C, FOREST MG, BURGOYNE PS, JOSSO N, REY R. Hormonal and cellular regulation of Sertoli cell anti-Müllerian hormone production in the postnatal mouse. *J Clin Invest* 1997; **100**: 1335–1343.
- [3] ANDERSSON A-M, SKAKKEBAEK NE. Exposure to exogenous estrogens in food: possible impact on human development and health. *Eur J Endocrinol* 1999; **140**: 477–485.
- [4] AQUILA S, SISCO D, GENTILE E, MIDDEA E, SICILIANO L, ANDO S. Human ejaculated spermatozoa contain active P450 aromatase. *Endocrinol Metab* 2002; **87**: 3385–3390.
- [5] 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.

- [6] ATANASSOVA N, MCKINNEL 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 relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. *Endocrinology* 2000; **141**: 3898–3907.
- [7] BEAU C, VIVIAN N, MÜNSTERBERG A, DRESSER DW, LOVELL-BADGE R, GUERRIER D. *In vivo* analysis of the regulation of the antimüllerian hormone, as a marker of Sertoli cell differentiation during testicular development, reveals a multi-step process. *Mol Reprod Develop* 2001; **59**: 256–264.
- [8] BEHRENS GHG, PETERSEN PM, GROTMOL T, SORENSEN DR, TORJESEN P, TRETLI S, HAUGEN TB. Reproductive function in male rats after brief in utero exposure to diethylstilbestrol. *Intern J Androl* 2000; **23**: 366–371.
- [9] BRINKMANN A, JENSTER G, RIS-STALPERS C, VAN DER KORPUT H, BRÜGGENWIRTH H, BOEHMER A, TRAPMAN J. Molecular basis of androgen insensitivity. *Steroids* 1996; **61**: 172–175.
- [10] BULLEJOS M, KOOPMAN P. Spatially dynamics expression of *Sry* in mouse genital ridges. *Develop Dynamics* 2001; **221**: 201–205.
- [11] CAI LQ, ZHU YS, KATZ MD, HERRERA C, BAEZ J, DEFILLO-RICART M, SHACKLETON CH, IMPERATO-MCGINLEY J.  $5\alpha$ -reductase-2-gene mutations in the Dominican Republic. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; **11**: 3160–3167.
- [12] CARANI C, QIN K, SIMONI M, FAUSTINI-FAUSTINI M, SERPENTE S, BOYD J, KORACH KS, SIMPSON ER. Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *N Eng J Med* 1997; **337**: 91–95.
- [13] CARREAU S, GENISSEL C, BILINSKA B, LEVALLET J. Topical review. Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. *Int J Androl* 1999; **22**: 211–223.
- [14] CARREAU S. Germ cells: a new source of estrogens in the male gonad. *Mol Cell Endocrinol* 2001; **178**: 65–72.
- [15] CASSIDY A. Potential tissue selectivity of dietary phytoestrogens and estrogens. *Curr Opin Lipidol* 1999; **10**: 47–52.
- [16] CHEEK AO, MCLACHLAN JA. Environmental hormones and the male reproductive system. *J Androl* 1998; **19**: 5–10.
- [17] CODESAL J, REGADERA J, NISTAL M, REGADERA-SEJAS J, PANIAGUA R. Involution of human fetal Leydig cells. An immunohistochemical, ultrastructural and quantitative study. *J Anat* 1990; **172**: 103–114.
- [18] CUPP AS, SKINNER MK. Actions of the endocrine disruption methoxychlor and its estrogenic metabolite on *in vitro* embryonic rat seminiferous cord formation and perinatal testis growth. *Reprod Toxicol* 2001; **15**: 317–326.
- [19] DE SANTA BARBARA P, MONIOT B, POULAT F, BOIZET B, BERTA P: Steroidogenic factor-1 regulates transcription of the anti-müllerian hormone receptor. *J Biol Chem* 1998; **273**: 29654–29660.
- [20] EMMEN JM, MCLUSKEY A, ADHAM IM, ENGEL W, VERHOEF-POST JM, THEM MEN AP, GROTEGOED JA, BRINKMANN AO. Involvement of insulin-like factor 3 (Insl3) in diethylstilbestrol-induced cryptorchidism. *Endocrinology* 2000; **141**: 846–849.
- [21] FAUSTINI-FAUSTINI M, ROCHIRA V, CARANIC. Oestrogen deficiency in men: where are we today? *Eur J Endocrinol* 1999; **140**: 111–129.
- [22] FORESTA C, FERLIN A, GIANAROLI L, DALLAPICCOLA B. Guidelines for the appropriate use of genetic tests in infertile couples. *Eur J Hum Genet* 2002; **10**: 303–312.
- [23] GAD YZ, MAZEN I, LUMBROSO S, TEMTAMY SA, SULTAN C A novel point mutation of the androgen receptor (F804L) in an Egyptian newborn with complete androgen insensitivity associated with congenital glaucoma and hypertrophic pyloric stenosis. *Clin Genet* 2003; **63**: 59–63.
- [24] GALLI-TSINOPOULOU A, HIORT O, SCHUSTER T, MESSER G, KUHNLE U. A novel point mutation in the hormone binding domain of the androgen receptor associated with partial and minimal androgen insensitivity syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2003; **16**: 149–154.
- [25] GUERRIER D, BOUSSIN L, MADER S, JOSSO N, KAHN A, PICARD JY. Expression of the gene for anti-Müllerian hormone. *J Reprod Fertil* 1990; **88**: 695–706.
- [26] HERRMANN BL, SALLER B, JANSSEN OE, GOCKE P, BOCKISCH A, SPERLING H, MANN K, BROECKER M. Impact of estrogen replacement therapy in a male with congenital aromatase deficiency caused by a novel mutation in the CYP19 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; **87**: 5476–5484.



- [27] HIORT O, HOLTERHUS PM, HORTER T, SCHULTZE W, KREMKE B, BALS-PRATSCH M, SINNECKER GHG, KRUSE K. Significance of mutations in the androgen receptor gene in males with idiopathic infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; **85**: 2810–2815.
- [28] HIORT O, HOLTERHUS P-M. Androgen insensitivity and male infertility. *Intern Androl* 2003; **26**: 15–20.
- [29] JIN Y, PENNING TM. Steroid 5 $\alpha$ -reductase and 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenases: key enzymes in androgen metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2001; **15**: 79–94.
- [30] JONES MEE, SIMPSON ER. Oestrogens in male reproduction. *Bailliere's Clin Endocrinol Metab* 2000; **14**: 505–516.
- [31] KAO Y-C, ZHOU C, SHERMAN M, LAUGHTON CA, CHEN S. Molecular basis of the inhibition of human aromatase (estrogen synthetase) by flavone and isoflavone phytoestrogens: a site-directed mutagenesis study. *Environ Health Perspect* 1998; **106**: 85–92.
- [32] KOPMANN P. Sry and SOX9: Mammalian testis-determining genes. *Mol Life Sci* 1999; **55**: 839–856.
- [33] KUIPER GGJM, ENMARK E, PELTI-HUIKKI M, NILSO S, GUSTAFSSON JA. Cloning of a novel oestrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 5925–5930.
- [34] KUIPER GGJM, CARLSSON B, GRANDIEN K, ENMARK E, HÄGGBLAD J, NILLSON S, GUSTAFSSON J-Å. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology* 1997; **138**: 863–870.
- [35] MAJDIC G, SHARPE RM, O'SHAUGHNESSY PJ, SAUNDERS PT. Expression of cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase/C17-20 lyase in the fetal rat testis is reduced by maternal exposure to exogenous estrogens. *Endocrinology* 1996; **137**: 1063–1070.
- [36] MCKINNELL C, ATANASSOVA N, WILLIAMS K, FISHER JS, WALKER M, TURNER KJ, SAUNDERS TK, SHARPE RM. Suppression of androgen action and the induction of gross abnormalities of the reproductive tract in male rats treated neonatally with diethylstilbestrol. *J Androl* 2001; **22**: 323–338.
- [37] MCLAREN A. Primordial germ cells in mammals. Organization of the Early Vertebrate Embryo. Ed. N. Zagris et al., Plenum Press, New York, 1995: 1–9.
- [38] MCLAREN A. Gonadal development: assembling the mammalian testis. *Current Biol* 1998; **8**: R175–R177.
- [39] MIGEON CJ, WISNIEWSKI AB. Human sex differentiation: from transcription factors to gender. *Horm Res* 2000; **53**: 111–119.
- [40] MORISHIMA A, GRUMBACH MM, SIMPSON ER, FISHER C, QIN K. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; **80**: 3689–3698.
- [41] MURONO EP, DERK RC, DE LEON JH. Octylphenol inhibits testosterone biosynthesis by cultured precursor and immature Leydig cells from rat testes. *Reprod Toxicol* 2000; **14**: 275–288.
- [42] MURRAY TJ, FOWLER PA, ABRAMOVICH DR, HAITES N, LEA RG. Human fetal testis: Second trimester proliferative and steroidogenic capacities. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; **85**: 4812–4817.
- [43] NEFF S, PARADA LF. Cryptorchidism in mice mutant for Ins13. *Nat Genet* 1999; **22**: 295–299.
- [44] NIKOV GN, HOPKINS NE, BOUE S, ALWORTH WL. Interactions of dietary estrogens with human estrogen receptors and the effect on estrogen receptor-estrogen response element complex formation. *Environ Health Perspect* 2000; **108**: 867–872.
- [45] OKON E, LIVNIN, ROSLER A, YORKINI S, SEGAL S, KOHN G, SCHNEKER JG. Male pseudohermaphroditism due to 5  $\alpha$ -reductase deficiency. Ultrastructure of the gonads. *Arch Pathol Lab Med* 1980; **104**: 363–367.
- [46] PAZIEWSKA A, BILIŃSKA B. Estrogeny i ich rola w regulacji spermatogenezy. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 461–481.
- [47] PELLETIER G. Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues. *Histol Histopathol* 2000; **15**: 11261–1270.
- [48] PELLETIER G, EL-ALFY M. Immunocytochemical localization of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the human reproductive organs. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; **85**: 4935–4840.
- [49] PEREZ-LOSODA J, SANCHEZ-MATRIN M, RODRIGUEZ-GARCIA A, SANCHEZ ML, ORFAO A, FLORES T, SANCHEZ-GARCIA I. Zinc-finger transcription factor Slug contributes to the function of the stem cell factor c-kit signaling pathway. *Blood* 2002; **100**: 1274–1286.
- [50] PRINCE FP. The triphasic nature of Leydig cell development in humans, and comment on nomenclature. *J Endocrinol* 2001; **168**: 213–216.
- [51] RACINE C, REY R, FOREST MG, LOUIS F, FERRE A, HUHTANIEMI I, JOSSO N, DI CLEMENTE A. Receptors for anti-Müllerian hormone on Leydig cells are responsible for its effects on steroidogenesis and cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **99**: 594–599.
- [52] REY R, PICARD J-Y. Embryology and endocrinology of genital development. *Bailliere's Clin Endocrinol Metab* 1998; **12**: 17–33.

- [53] REY R. Assessment of seminiferous tubule function (anti-müllerian hormone). *Bailliere's Clin Endocrinol Metab* 2000; **14**: 399–408.
- [54] ROBINSON LL, GASKELL TL, SAUNDERS PT, ANDERSON RA. Germ cell specific expression of c-kit in the human fetal gonad. *Mol Hum Reprod* 2001; **7**: 845–852.
- [55] ROCHIRA V, FAUSTINI-FAUSTINI M, BALESTRIERI A, CARANI C. Estrogen replacement therapy in a man with congenital aromatase deficiency; effects of different doses of transdermal estradiol on bone mineral density and hormonal parameters. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; **85**: 1841–1845.
- [56] ROCHIRA V, BALESTRIERI A, MADEO B, BARALDI E, FAUSTINI-FAUSTINI M, GRANATA RM, CARANI C. Congenital estrogen deficiency: in search of estrogen role in human male reproduction. *Mol Cell Endocrinol* 2001; **178**: 107–115.
- [57] SARACO N, BERENSZTEIN E, DARDIS A, RIVAROLA MA, BELGOROSKY A. Expression of the aromatase gene in the human prepubertal testis. *J Ped Endocrinol Metab* 2000; **13**: 483–488.
- [58] SCHRAMM P, BENES P. Lack of reductase as cause of andrological disturbance? *Andrologia* 1982; **14**: 177–181.
- [59] SHARPE RM, WALKER M, MILLAR MR, MORRIS K, MCKINNEL C, SAUNDERS PTK, FRASER HM. Effect of neonatal GnRH antagonist administration on Sertoli cell number and testicular development in the marmoset: comparison with the rat. *Biol Reprod* 2000; **62**: 1685–1693.
- [60] SHARPE RM. Hormones and testis development and the possible adverse effects of environmental chemicals. *Toxicol Letters* 2001; **120**: 221–232.
- [61] SMITH EP, BOYD J, FRANK CR, TAKAHASHI H, COHEN R, SPECKER B, WILLIAMS TC, LUBAHN DB, KORACH KS. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med* 1994; **331**: 1056–1061.
- [62] SOHONI P, SUMPTER JP. Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J Endocrinol* 1998; **158**: 327–339.
- [63] SONNENSCHNEIN C, SOTO AM. An update review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998; **65**: 143–150.
- [64] SULTAN C, BALAGUER P, TEROUANNE B, GEORGET V, PARIS F, JEANDEL C, LUMBROSO S, NICOLAS J. Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorders of male sexual differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 2001; **178**: 99–105.
- [65] TAKEYAMA J, SUZUKI T, INOUE S, KANEKO C, NAGURA H, HARADA N, SASANO H. Expression and cellular localization of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the human fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86**: 2258–2262.
- [66] TOPPARI J, LARSEN JC, CHRISTIANSEN P, GIWERCMAN A, GRANDJEAN P, GUILLETTE LJ, JR, JEGOU B, JENSEN TK, JOUANNET P, KEIDING N, LEFFERS H, MCLACHLAN JA, MEYER O, MULLER J, RAJPERT-DE MEYTS E, SCHEIKE T, SHARPE RM, SUMPTER JS, SKAKKEBAEK NE. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect* 1996; **104**: 741–803.
- [67] VOULTILAINEN R. Differentiation of the fetal gonad. *Horm Res* 1992; **38**: 66–71.
- [68] WENDA-RÓŻEWICKA L, WISZNIEWSKA B. Najądrze. W: Molekularne podstawy rozrodczości człowieka i innych ssaków. (red.) Kurpisz M., Poznań Termedia 2002: 183–190.
- [69] WISZNIEWSKA B. Primary culture of the rat epididymal epithelial cells as a source of oestrogen. *Andrologia* 2002; **34**: 180–187.
- [70] YONG EL, LOY CJ, SIM KS. Androgen receptor gene and male infertility. *Hum Reprod Update* 2003; **9**: 1–7.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 24.06.2003 r.

Przyjęto: 15.08.2003 r.

ul. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin

e-mail: barbwisz@sci.pam.szczecin.pl



1. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	1
2. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	2
3. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	3
4. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	4
5. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	5
6. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	6
7. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	7
8. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	8
9. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	9
10. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	10
11. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	11
12. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	12
13. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	13
14. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	14
15. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	15
16. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	16
17. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	17
18. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	18
19. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	19
20. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	20
21. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	21
22. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	22
23. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	23
24. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	24
25. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	25
26. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	26
27. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	27
28. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	28
29. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	29
30. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	30
31. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	31
32. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	32
33. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	33
34. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	34
35. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	35
36. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	36
37. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	37
38. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	38
39. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	39
40. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	40
41. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	41
42. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	42
43. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	43
44. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	44
45. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	45
46. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	46
47. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	47
48. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	48
49. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	49
50. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	50
51. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	51
52. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	52
53. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	53
54. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	54
55. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	55
56. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	56
57. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	57
58. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	58
59. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	59
60. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	60
61. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	61
62. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	62
63. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	63
64. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	64
65. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	65
66. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	66
67. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	67
68. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	68
69. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	69
70. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	70
71. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	71
72. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	72
73. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	73
74. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	74
75. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	75
76. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	76
77. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	77
78. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	78
79. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	79
80. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	80
81. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	81
82. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	82
83. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	83
84. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	84
85. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	85
86. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	86
87. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	87
88. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	88
89. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	89
90. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	90
91. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	91
92. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	92
93. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	93
94. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	94
95. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	95
96. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	96
97. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	97
98. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	98
99. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	99
100. WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI	100

## POLIAMINY W CHLOROPLASTACH

### POLYAMINES IN CHLOROPLASTS

Jolanta LEGOCKA, Ewa SOBIESZCZUK-NOWICKA

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

*Streszczenie:* Poliaminy wykryto w chloroplastach m.in. *Euglena gracilis*, *Helianthus tuberosus*, szpinaku i kukurydzy. Przy wykorzystaniu metody HPLC wykryto obecność trzech głównych poliamin putrescyny, spermidyny i sperminy w błonach tylakoidowych liści szpinaku. Poliaminy te były kowalently związane z centrum reakcji PSII i kompleksem chlorofil a/b białko stanowiącym główną antenę PSII - LHCII. Specyficzna lokalizacja chloroplastowych transglutaminaz, enzymu stymulowanego jonami wapnia i światłem i katalizującego wiązanie się poliamin do białek tylakoidów i stromy sugeruje rolę tych związków w procesie fotosyntezy. Substratami dla transglutaminaz z *Helianthus tuberosus* były głównie białka LHCII kompleksu chlorofil a/b-białko oraz białka CP24, CP26, CP29 – kompleksów chlorofilowo-białkowych przekazujących energię wzbudzenia i duża podjednostka karboksylazy/oksygenazy 1,5-bisfosforybulozy, enzymu występującego w stromie.

*Słowa kluczowe:* poliaminy, chloroplasty, transglutaminazy.

*Summary:* Polyamines have been found in chloroplasts of *Euglena gracilis*, *Helianthus tuberosus*, spinach and maize. By using a narrow-bore HPLC method the presence of the three main polyamines, i.e. putrescine, spermidine, spermine, in thylakoid membranes of spinach leaves was determined. These polyamines were found to be associated with the light-harvesting complex LHCII and the PSII-reaction centre of spinach. An important extension of that observation was finding that the activity of intraplastidic transglutaminase was stimulated by calcium ions and light. This enzyme catalyzed the incorporation of polyamines into thylakoid membranes and stromal proteins. For *Helianthus tuberosus* the apoproteins of the chlorophyll-a/b antenna complex (LHCII, CP24, CP26, CP29) and the large subunit of ribulose – 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase was identified as substrates for plastidic transglutaminase.

*Key words:* polyamines, chloroplasts, transglutaminases.



## 1. WPROWADZENIE

Poliaminy (PA) są związkami powszechnie występującymi w roślinach, w organizmach zwierzęcych oraz w mikroorganizmach. Najczęściej występującymi w roślinach wyższych poliaminami są putrescyna (Put), spermidyna (Spd) i spermina (Spm).



PUTRESCYNA



SPERMIDYNA



SPERMINA

Należą one do specyficznej grupy komórkowych regulatorów wzrostu i rozwoju, różniących się zasadniczo w swoim działaniu od typowych hormonów roślinnych [5,21]. Są one ściśle związane z przebiegiem wielu procesów fizjologicznych w roślinie, takich jak: podział komórki, morfogeneza, starzenie, odpowiedź na stresy [22, 42].

Poliaminom można przypisać dwojakiego rodzaju działanie. Po pierwsze są one obecne w strukturach komórkowych i za pomocą kationowych grup aminowych i iminowych w fizjologicznym pH wiążą się elektrostatycznie z ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi znajdującymi się w DNA i RNA [19], fosfoproteinach, fosfolipidach [12] lub karboksylowymi zlokalizowanymi głównie w peptydach, kwaśnych białkach i kwaśnych polisacharydach [3]. Powoduje to zmiany w konformacji makromolekuł i struktur cytomembran, a także w ich aktywności fizjologiczno-biochemicznej. Oddziaływanie poliamin z grupami fosforanowymi kwasów nukleinowych stanowią molekularną podstawę stabilizacji podwójnej helisy DNA, a także końców pętli w cząsteczkach rRNA, mRNA, tRNA [36, 45]. Wiązanie się grup aminowych i iminowych poliamin z resztami fosforanowymi obu nici DNA tworzy spolaryzowane wiązanie wodorowe, które stabilizuje strukturę podwójnej helisy, zabezpieczając DNA np. przed denaturacją przez temperaturę [36]. Zmiana struktury przestrzennej kwasów nukleinowych w wyniku przyłączania PA może być także czynnikiem aktywującym procesy transkrypcji i translacji [45]. Z kolei połączenie poliamin z ujemnie naładowanymi fosfolipidami błon usztywnia ich strukturę i stabilizuje ją. Pociąga to za sobą zmiany właściwości półprzepuszczalnych błon i chroni komórkę np. przed działaniem czynników stresowych, uszkadzających błony i przyspieszających starzenie roślin [41]. Oprócz elektrostatycznego możliwe jest również kowalentne wiązanie poliamin do białek [24]. Aktualnie wśród badaczy panuje pogląd, że interakcja poliamin ze składnikami subkomórkowymi stanowi główny mechanizm, poprzez który te polikationy wpływają na ich funkcję [38].

Druga funkcja poliamin polegałaby na bardziej specyficznej regulacji kluczowych dla rośliny procesów metabolicznych, takich jak np. fosforylacja białek, przemiany fosfatydylofosfoinozytoli, zapobieganie degradacji błon cytoplazmatycznych, zapobieganie zbyt wysokiemu stężeniu etylenu [9, 11, 18, 48].

W roślinach funkcje i mechanizm działania poliamin są badane przy wykorzystaniu metod biochemicznych, cytologicznych i molekularnych [36]. Liczne dane dotyczące roli poliamin w procesach fizjologicznych uzyskano w wyniku zastosowania specyficznych inhibitorów blokujących poszczególne etapy syntezy putrescyny, spermidyny czy sperminy [36, 41]. O udziale poliamin w regulacji wzrostu i rozwoju roślin wnioskuje się na podstawie zmian ich zawartości podczas przebiegu określonych procesów życiowych i modyfikującego wpływu egzogennie podanych PA na te procesy [36].

Rozwój genetyki i biologii molekularnej umożliwił identyfikację, izolację i sklonowanie genów kodujących enzymy uczestniczące w syntezie PA: dekarboksylazy argininowej (ADC), dekarboksylazy ornitynowej (ODC) i dekarboksylazy S-adenozylometioniny (SAMDC) [28,32]. Pozwoliło to na rozpoczęcie prac nad uzyskaniem roślin transgenicznych zawierających w swoim genomie dodatkowe kopie tych genów lub sekwencje antysensowne w stosunku do określonego genu. Rośliny tak modyfikowane wykazują zaburzenia ekspresji genów związanych z syntezą poliamin i liczne anomalie fenotypowe [32].

Ostateczne udowodnienie i wyjaśnienie istoty regulacyjnego działania poliamin w wielu zjawiskach wymaga dalszych badań, a zrozumienie roli poliamin w roślinach musi być oparte na wiedzy na temat ich tkankowej i komórkowej lokalizacji oraz enzymów włączonych w ich metabolizm.

Niniejsze opracowanie stanowi przybliżenie roli poliamin w czasie różnicowania się chloroplastów oraz funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego.

## 2. POLIAMINY W CHLOROPLASTACH

Chloroplasty są organellami, których główną, specyficzną funkcją jest fotosynteza, ale jest to również miejsce m.in. biosyntezy i metabolizmu poliamin [14,16,25,38].

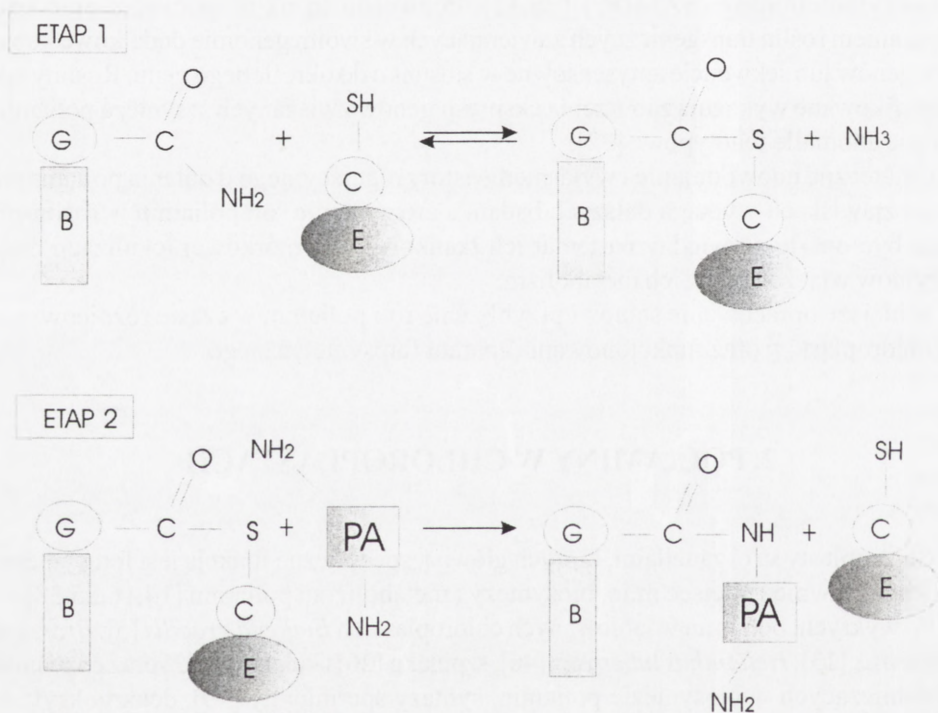
Po wykryciu poliamin w izolowanych chloroplastach *Euglena gracilis* [5], *Brassica pekinensis* [13], *Helianthus tuberosus* [46], szpinaku [26] i kukurydzy [2] oraz enzymów uczestniczących w biosyntezie poliamin, syntazy spermidyny [40], dekarboksylazy argininy [10,46] i dekarboksylazy ornityny [46] pojawiły się sugestie, że poliaminy mogą odgrywać rolę w formowaniu i funkcjonowaniu aparatu fotosyntetycznego [2,25].

W chloroplastach liści szpinaku, trzy główne poliaminy, putrescyna, spermidyna i spermina były obecne w tylakoidowych membranach [26]. Poliaminy te były związane z kompleksem chlorofil a/b-białko zbierającym energię świetlną (LHCII) i fotosystemem II (PSII), zaś subkompleksy PSII (PSII – kora, centrum reakcji PSII) zawierały tylko sperminę [26].



## 2.1. Chloroplastowe transglutaminazy i ich substraty

W chloroplastach *Brassica pekinensis*, w tylakoidach *Helianthus tuberosus*, szpinaku czy w chloroplastach glonu *Dunaliella salina* stwierdzono obecność transglutaminaz, enzymów katalizujących wiązanie poliamin do białek [38]. Transglutaminazy (TGazy) [EC 2.3.2.1.3] są to enzymy odpowiadające za posttranslacyjne modyfikacje białek. Ich działanie polega na formowaniu się wiązań krzyżowych [E-( $\gamma$ -glutamyl)lizyna i NN-bis ( $\gamma$ -glutamyl)amina]. Schemat ich działania przedstawiono na rycinie 1. Rezultatem aktywności transglutaminaz w komórce przy współdziałaniu PA jest zmiana ładunku białka, a także zmiana jego konformacji przez tworzenie połączeń krzyżowych w obrębie tego samego białka bądź między różnymi białkami, czego konsekwencją może być formowanie się koniugatów białkowych o wysokiej masie cząsteczkowej [38, 39].



RYCINA 1. Schemat reakcji katalizowanej przez transglutaminazy. Reakcja polega na przyłączeniu poliamin do cząsteczki białka. Przebiega w dwóch etapach. W pierwszym etapie do reszty glutaminy w łańcuchu białkowym jest przyłączany enzym, tworzy się kompleks enzym-białko, a z grupy  $\gamma$ -karboksamidowej reszty glutaminowej uwalniany jest amoniak. W etapie drugim w miejsce enzymu do cząsteczki białka przyłączona jest pierwszorzędowa grupa aminowa (poliaminy), a enzym jest uwalniany (na podstawie [38], zmodyfikowane i uzupełnione): B – białko, E – enzym, PA – poliaminy, G – glutamina, C – węgiel

Niektóre z tych enzymów katalizują syntezę wiązania izopeptydowego między  $\gamma$ -karboksylową grupą kwasu glutaminowego a pierwszorzędową grupą aminową poliaminy. Połączenie drugiej grupy aminowej z kolejną cząsteczką białka prowadzi do kowalencyjnego wiązania polipeptydów [36].

Aktywność TGaz jest stymulowana przez światło, jony  $\text{Ca}^{2+}$  oraz przez chloroplastowe proteazy [15,16]. Przy zastosowaniu metod immunodetekcji w chloroplastach kalusa kukurydzy, *H. tuberosus*, *Arabidopsis thaliana*, *Solanum tuberosum* i *Lycopersicum esculentum* wykryto transglutaminazy o masie cząsteczkowej ok. 58 kDa [8,38]. Immunologiczna lokalizacja TGaz *in situ* w chloroplastach kukurydzy wykrywała ten enzym głównie w tylakoidach gran [47].

Wzrost poziomu transglutaminaz w trakcie różnicowania się chloroplastów oraz ich lokalizacja w tylakoidach gran (białka antenowe LHCII) sugerują, że TGazy mogą współuczestniczyć w procesie formowania się gran przez wiązanie PA do białek antenowych [26,47].

Wydaje się możliwe, że TGazy modulują wydajność fotosyntezy oraz absorpcję nadmiaru światła przez koniugację poliamin do białek antenowych [27].

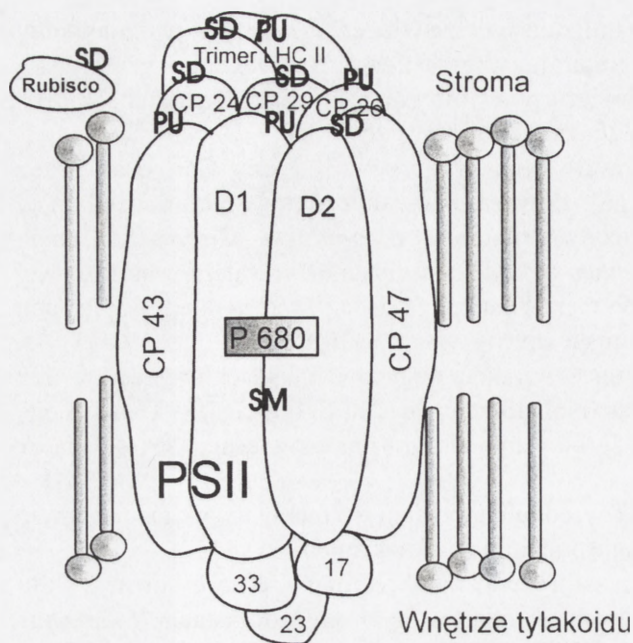
W 1994 r. w zespole Fracassini-Serafini określono niektóre substraty dla transglutaminaz chloroplastowych. W izolowanych chloroplastach *Helianthus tuberosus* znakowana putrescyna [ $^{14}\text{C}$ ]Put i [ $^{14}\text{C}$ ]Spd w warunkach aktywności TGazy wiązały się do białek antenowych kompleksu chlorofil a/b-białko zbierającego energię świetlną (LHCII) oraz do białek kompleksów chlorofilowo-białkowych przekazujących energię wzbudzenia: CP24, CP26, CP29 [14, 16]. Rycina 2 przedstawia możliwe miejsca wiązania się poszczególnych poliamin do białek w obrębie fotosystemu II. Autorzy cytowanych prac sugerują, że acylowe grupy w tych białkach są akceptorami substratów, czyli poliamin. Możliwe jest, że poliaminy wiążą się kowalentnie do N-końców białek LHCII od strony stromy, gdzie jest wysokie pH, ponieważ optimum pH dla aktywności TGazy wynosi 8,0–9,5 [34].

Formy oligomeryczne LHCII były znacznie silniej znakowane przez poliaminy aniżeli formy monomeryczne [14], co wg autorów wymienionych prac może wskazywać na udział poliamin w stabilizowaniu oligomerów przez formowanie wiązań krzyżowych. Dodanie ładunków dodatnich do tych białek może mieć odwrotne działanie do ich fosforylacji i tym samym może modyfikować transfer energii wzbudzenia w obrębie fotosystemów [1,35].

Innym substratem TGazy w chloroplastach *Medicago sativa* i *Helianthus tuberosus* była większa podjednostka Rubisco. Sugeruje się, że asocjacja podjednostek Rubisco może odbywać się przy udziale poliamin [14,16,33]. W chloroplastach kalusa kukurydzy innymi substratami TGazy były białka o m. cz. 18; 29; 55 i 68 kDa [8].

Na ważną rolę poliamin w aparacie fotosyntetycznym mogą wskazywać wyniki badań uzyskane w zespole Besforda, prowadzonych na poddanych osmotycznemu stresowi liściach owsa [9]. Liście roślin jednoliściennych w stresie osmotycznym akumulują duże ilości putrescyny, tracą chlorofil i starzeją się gwałtownie [20]. Egzogenne dodanie poliamin (Spd, Spm) lub inhibitorów syntezy putrescyny (difluorometyloargininy) do poddanych stresowi osmotycznemu liści owsa hamowało





RYCINA 2. Struktura centrum reakcji PSII. Skrót: **D1** i **D2** – polipeptydy centrum reakcji wiążące chlorofil P-680; **CP43** i **CP47** – kompleksy chlorofilowo-białkowe stanowiące bezpośrednie anteny centrum reakcji PSII; **LHCII** – kompleks chlorofil a/b-białko stanowiący główną antenę PSII; **CP24**, **CP26**, **CP29** – kompleksy chlorofilowo-białkowe przekazujące energię wzbudzenia z LHCII na CP43 i CP47; poliaminy wiążące się do białek kompleksów chlorofilowo-białkowych **PU** – putrescyna, **SP** – spermidyna, **SM** – spermina (na podstawie [43], zmodyfikowane i uzupełnione)

degradację białek i utratę chlorofilu oraz stabilizowało białka tylakoidów D1, D2, cyt f i dużą podjednostkę Rubisco [9]. Podobnie spermidyna, dodana do odciętych starzejących się w ciemności liści jęczmienia hamowała aktywność RNazy, degradację chlorofilu i białek tylakoidowych, w tym immunologicznie zlokalizowanego białka antenowego kompleksu chlorofil a/b-białko zbierającego światło (LHCP II) [29]. Proces różnicowania się chloroplastów w tkance kalusowej mutanta goździka, indukowany cytokininą był wspomagany przez PA. Poziom trzech głównych PA we frakcji błon tylakoidowych wyizolowanych z kalusa inkubowanego w obecności hormonu był znacznie wyższy w porównaniu z analogiczną frakcją kalusa kontrolnego [30].

## 2.2. Metabolizm poliamin podczas formowania się i fotoadaptacji chloroplastów

Nieliczne jak do tej pory badania wskazują, że podczas różnicowania się chloroplastów w roślinach zmienia się zawartość poliamin oraz aktywność enzymów bezpośrednio związanych z ich biosyntezą i rozkładem.

W izolowanych etioplastach liści kukurydzy stwierdzono wysoki poziom trzech głównych poliamin (Put, Spd, Spm) skorelowany z wysoką aktywnością głównych biosyntetycznych enzymów odpowiedzialnych za syntezę putrescyny, ornitynowej dekarboksylazy i argininowej dekarboksylazy oraz niską aktywność diaminowej oksydazy (DAO) [2]. W trakcie transformacji etioplastów w chloroplasty następowało dwukrotne obniżenie poziomu wewnątrzplastydowych poliamin. Pierwsze obniżenie, bardzo szybkie, było skorelowane z konwersją protochlorofilidu w chlorofilid i drugie,

znaczące obniżenie zawartości PA następowało po dłuższej ekspozycji liści na światło. W tym czasie aktywność diaminowej oksydazy prawie nieobecnej w etioplastach wzrastała gwałtownie i po 9 h ekspozycji na światło osiągała maksimum [2]. Autorzy pracy sugerują, że podczas rozwoju chloroplastów, poliaminy mogą służyć jako źródło azotu w biosyntezie białek chloroplastowych i chlorofilu. Po pierwsze, poliaminy mogą być donorami grup aminowych dla  $\alpha$ -ketokwasów, a w reakcji tej mogą pośredniczyć specyficzne transaminazy uczestniczące w biosyntezie aminokwasów [44]. Po drugie, TGazy przyłączając grupy aminowe putrescyny do kwasu  $\alpha$ -oksooglutarynowego mogą uczestniczyć w tworzeniu się kwasu glutaminowego, który z kolei jest prekursorem chlorofilu [4]. Potwierdzeniem powyższej sugestii są badania, w których poliaminy egzogennie dodane do liści kukurydzy przyspieszały konwersję protochlorofilidu w chlorofil oraz zwiększały wydajność fotosyntezy [7].

W liściach szpinaku poddanych chładowi ( $8/5^{\circ}\text{C}$ ) przez 6 dni wzrastała aktywność dekarboksylazy S-adenozylometioniny. Traktowanie tych organów inhibitorem syntezy Spd (MGBG) powodowało zahamowanie wzrostu liści i zaburzenia przebiegu procesu fotosyntezy. Rośliny traktowane MGBG wykazywały mniejszą fotochemiczną wydajność PSII i spowolniony transport elektronów w tylakoidach oraz niższą aktywność enzymów biorących udział w metabolizmie węgla w komórce [31].

Odpowiednim modelem doświadczalnym w badaniach nad mechanizmem sposobu działania poliamin jest jednokomórkowy glon *Scenedesmus obliquus* [25]. Glon ten ma niezależną i zależną od światła protochlorofilido-oksydoreduktazę (POR). Redukcja poziomu putrescyny po dodaniu do hodowli inhibitora putrescyny 1,4-diamino-2-butanu hamowała niezależną i zależną od światła konwersję protochlorofilidu w chlorofilid [17]. Niższe stężenie inhibitora powodowało przyhamowanie biosyntezy chlorofilu na świetle, czemu towarzyszył wzrost tempa oddychania i wzrost aktywności fotosyntetycznej. Tego typu zmiany towarzyszą adaptacji roślin do wysokich natężeń światła. Obniżenie poziomu Put prawdopodobnie destabilizuje LHCII, co może powodować tworzenie się małych fotosyntetycznych centrów reakcji [17]. Natomiast dodanie do hodowli cykloheksylaminy bądź 1,3-diaminopropanu, inhibitorów szlaku biosyntezy spermidyny i sperminy nie wywoływało zmian w syntezie chlorofilu zależnej od światła, jednak miało wpływ na niezależną od światła biosyntezę chlorofilu, czemu towarzyszyło obniżenie tempa zarówno oddychania, jak i aktywności fotosyntetycznej. Efekt ten jest dobrze znany jako adaptacja aparatu fotosyntetycznego do niskich natężeń światła [23]. U mutantu glonu C-6D, który w ciemności ma aktywność PSI i syntezuje prekursor karotenoidów i chlorofil a, po godzinie naświetlania obserwowano wzrost poziomu PSII i równolegle wzrost poziomu spermidyny [17]. Po 30 h naświetlania pojawiał się kolejny wzrost poziomu Spd i było to skorelowane z tworzeniem się form oligomerycznych LHCII, które u mutantu C6-D są skompletowane po 24 h naświetlania. Podobnie jak w przypadku liści kukurydzy, tak i u glonu *Scenedesmus obliquus* ilość poliamin związana z ciałem prolamelarnym czy protylakoidami była wyższa aniżeli ilość PA w uformowanych tylakoidach [6]. Wynikało to z wysokiej aktywności enzymów ADC i ODC, a niskiej DAO. Podczas różnicowania chloroplastów poziom plastydowych poliamin obniżał się równolegle z obniżającą się aktywnością ADC i



ODC, natomiast wzrastała aktywność DAO [17]. Spadek poziomu putrescyny związanej z tylakoidami, po krótkim czasie naświetlania hodowli i wzrost aktywności głównych enzymów katabolicznych (PAO) pozwala autorom wymienionej pracy spekulować, że w czasie ontogenezy chloroplastów poliaminy, a szczególnie putrescyna mogą służyć w biosyntezie białek i chlorofilu jako źródło azotu.

Wyniki badań dotyczące wpływu światła na poziom PA wskazują, że synteza poliamin jest kontrolowana przez światło białe o niskim i wysokim natężeniu oraz przez światło niebieskie i czerwone. W chloroplastach kalusa kukurydzy poziom poliamin wolnych uległ podwyższeniu w czasie fazy jasnej oraz w połowie fazy nocnej, co pośrednio wskazuje, że światło i rytm dobowy mają wpływ na poziom poliamin [8].

W badaniach nad fotoreceptorami odpowiedzialnymi za wewnątrzkomórkowy poziom poliamin wykazano, że protochlorofilidowy receptor może być odpowiedzialny za obniżenie poziomu Put i Spd w czasie rozwoju chloroplastów [27]. W syntezie poliamin prawdopodobnie pośredniczą również fotoreceptor światła niebieskiego oraz UV-fotoreceptor, a receptor światła czerwonego może być odpowiedzialny za wzrost poziomu PA [27]. Stosunek zawartości Spm/Put jest regulowany przez podobny jak procesy fotoadaptacji zakres światła. Wskazuje to, że fotoreceptory odpowiedzialne za modulację poziomu poliamin i fotoadaptację aparatu fotosyntetycznego do niskich natężeń światła są bardzo podobne [27].

Przedstawione w artykule wyniki nielicznych jak dotąd prac wskazują na ważną rolę poliamin w posttranslacyjnej modyfikacji białek tylakoidowych w trakcie różnicowania się chloroplastów, a także na ich udział w funkcjonowaniu aparatu fotosyntetycznego.

### 3. WNIOSKI

Wykrycie w chloroplastach trzech głównych poliamin: putrescyny, spermidyny i sperminy oraz enzymów uczestniczących w ich metabolizmie wskazuje, że mogą one odgrywać ważną rolę w chloroplastach zarówno podczas ich różnicowania, jak i funkcjonowania.

Poliaminy, głównie putrescyna i spermidyna mogą odgrywać ważną rolę w posttranslacyjnej modyfikacji specyficznych enzymów chloroplastowych i fotosyntetycznych kompleksów wpływając na strukturę i funkcję aparatu fotosyntetycznego.

Białka tylakoidowe, związane z poliaminami należą do białek antenowych kompleksów chlorofil a/b - białko zbierających światło, a w stromie jest to większa podjednostka Rubisco. Fakt, że oligomeryczne formy LHC II są silniej znakowane przez [<sup>14</sup>C] poliaminy aniżeli formy monomeryczne, sugeruje udział poliamin w stabilizacji oligomerów.

Specyficzna lokalizacja transglutaminazy, enzymu odpowiedzialnego za kowalentne wiązanie PA do białek w granach, potwierdza założenie o roli tych związków w procesie fotosyntezy. Może to być związane z fotosyntetyczną wydajnością, zaś przyłączanie

poliamin do białek LHCIi może służyć jako mechanizm ochronny regulujący absorpcję nadmiaru światła.

Immunodetekcja *in situ* TGazy głównie w tylakoidach gran i wzrost poziomu tego enzymu w trakcie różnicowania się chloroplastów dodatkowo wskazuje na ważny udział tego enzymu i poliamin w formowaniu się gran w trakcie ontogenezy chloroplastów.

Zmiany poziomu poliamin i aktywności enzymów uczestniczących w ich metabolizmie podczas różnicowania się chloroplastów mogą sugerować, że poliaminy, szczególnie putrescyna, służą jako źródło azotu w biosyntezie białek chloroplastowych i chlorofilu. Regulacja poziomu poliamin w chloroplastach przez światło i rytm dobowy pozwala sądzić, że mogą one odgrywać ważną rolę w mechanizmie fotoadaptacji aparatu fotosyntetycznego do niskich i wysokich intensywności światła.

Na podstawie dotychczasowych nielicznych jeszcze wyników badań rozważany jest udział poliamin w formowaniu się i funkcjonowaniu aparatu fotosyntetycznego.

## LITERATURA

- [1] ALLEN JF, BENNETT J, STEINBECK KE, ARNTZEN CJ. Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystem. *Nature* 1981; **291**: 25–29.
- [2] ANDREADAKIS A, KOTZABASIS K. Changes in the biosynthesis and catabolism of polyamines in isolated plastids during chloroplasts photodevelopment. *Photochem and Photobiol B: Biology* 1996; **33**: 163–170.
- [3] APELBAUM A, CANELLAKIS ZN, APPLEWHITE PB, KAUR-SAWHNEY R, GALSTON AW. Binding of spermidine to a unique protein in thin layer tobacco tissue culture. *Plant Physiol* 1988; **88**: 996–998.
- [4] ASKAR A, TREPTOW H. Biogene Amine in Lebensmitteln. Stuttgart, Verlag Eugen Ulmer, 1986.
- [5] BAGNI N, SERAFINI-FRACASSINI D. The role of polyamines as growth factors in higher plants and their mechanism of action. [w] *Plant Growth Subst.* Tokyo, Hirokawa Publ. Co., 1973: 1205–1217.
- [6] BEIGBEDER A, KOTZABASIS K. The influence of exogenously supplied spermine on protochlorophyllide and chlorophyll biosynthesis. *J Photochem Photobiol* 1994; **23**: 201–206.
- [7] BEIGBEDER A, VAVADAKIS M., NAVAKOUDIS E, KOTZABASIS K. Influence of polyamine inhibitors on light-independent and light-dependent chlorophyll biosynthesis and on the photosynthetic rate. *J Photochem Photobiol* 1995; **28**: 235–242.
- [8] BERNET E, CLAPAROS I, DONDINI L, SANTOS M, SERAFINI-FRACASSINI D, TORNE JM. Changes in polyamine content, arginine and ornithine decarboxylases, and transglutaminase activities during light/dark phases (of initial differentiation) in maize callus and their chloroplasts. *Plant Physiol Biochem* 1999; **37**: 1–11.
- [9] BESFORD RD, RICHARDSON CM, CAMPOS JL, TIBURCIO AF. Effect of polyamines on stabilization complexes in thylakoid membranes of osmotically stressed oat leaves. *Planta* 1993; **189**: 201–206.
- [10] BORRELL A, CULIAEZ-MACIA FA, ALTABELLA T, BESFORD RT, FLORES D, TIBURCIO AF. Arginine decarboxylase is localized in chloroplasts. *Plant Physiol* 1995; **109**: 771–776.
- [11] BORRELL A, CARBONELL L, FARRAS R, PUIG-PARELLADA P, TIBURCIO AF. Polyamines inhibit lipid peroxidation in senescing oat leaves. *Physiol Plant* 1997; **99**: 385–390.
- [12] CHAPEL M, TEISSIE J, ALIBERT G. Electrofusion of spermine treated plant protoplasts. *FEBS Lett* 1984; **173**: 331–336.
- [13] COHEN SS, MARCEU DE, BALINT RF. Light-dependent fixation of polyamines into chloroplasts of chinese cabbage, *FEBS Lett* 1982; **141**: 93–97.
- [14] DEL DUCA S, TIDU V, BASSI R, ESPOSITO C, SERAFINI-FRACASSINI D. Identification of chlorophyll-a/b proteins as substrates of transglutaminase activity in isolated chloroplasts of *Helianthus tuberosus* L. *Planta* 1994; **193**: 283–289.



- [15] DEL DUCA S, DONDINI L, DELLA MEA M, MUNOZ DE RUEDA P, SERAFINI-FRACASSINI D. Factors affecting transglutaminase activity catalysing polyamine conjugation to endogenous substrates in entire chloroplasts. *Plant Physiol Biochem* 2000; **38**(6): 429–439.
- [16] DONDINI L, DEL DUCA S, DALL'AGATA L, BASSI R, GASTALDELLI, DELLA MEA M., DI SANDRO A, CLAPAROLO I, SERAFINI-FRACASSINI D. Suborganelar localisation and effect of light on *Helianthus tuberosus* chloroplast transglutaminases and their substrates. *Planta* 2003; **217**: 84–95.
- [17] DÖRNEMAN D, NAVAPOUDIS E, KOTZABASIS K. Changes in the polyamine content of plastidal membranes in light- and dark-grown wildtype and pigment mutants of the unicellular green alga *Scenedesmus obliquus* and their possible role in chloroplast photodevelopment. *Photochem Photobiol B: Biol* 1996; **36**: 293–299.
- [18] DUREJA-MUNJAL I, ACHARYA M, GUHA-MUKHERJEE S. Effect of hormones and spermidine on the turnover of inositolphospholipids in *Brassica* seedlings. *Phytochemistry* 1992; **31**: 1161–1163.
- [19] FLINK L, PETTIJOHN DE. Polyamines stabilize DNA folds. *Nature* 1975; **253**: 62–63.
- [20] FLORES HE, GALSTON AW. Osmotic stress-induced polyamine accumulation in cereal leaves. I. Physiological parameters of the response. *Plant Physiol* 1984; **75**: 102–109.
- [21] GALSTON AW. Polyamines as modulators of plant development. *Biosci* 1983; **33**: 382–388.
- [22] GALSTON AW, KAUR-SHAWNEY R. Polyamines in Plant Physiology. *Plant Physiol* 1990; **94**: 406–410.
- [23] HOFFMAN B, SENGER H. Kinetics of photosynthetic apparatus adaptation in *Scenedesmus obliquus* to change in irradiance and light quality. *Photochem Photobiol* 1988; **47**: 737–739.
- [24] ICEKSON I, APELBAUM A. Evidence of transglutaminase activity in plant tissue. *Plant Physiol* 1987; **84**: 972–974.
- [25] K. KOTZABASIS. A role for Chloroplast-Associated Polyamines? *Bot Act* 1995; **109**: 5–7.
- [26] KOTZABASIS K, FOTINOUC, ROUBELAKIS-ANGELAKIS KA. GHANOTAKIS D. Polyamines in the photosynthetic apparatus. Photosystem II highly resolved subcomplexes are enriched in spermine. *Photosynth Res* 1993; **38**: 83–88.
- [27] KOTZABASIS K, STRASSER B, NAVAPOUDIS E, SENGER H, DÖRNEMANN D. Characterization of photoreceptor(s) responsible for the regulation of the intracellular polyamine level and the putative participation of heterotrimeric G-proteins in the signal transduction chain. *J Photochem Photobiol B: Biol* 1999; **50**: 45–52.
- [28] KUMAR A, TAYLOR MA, ARIF SAM, DAVIES HV. Potato plants expressing antisense and sense S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) transgens show altered levels of polyamine and ethylene: antisense plants display abnormal phenotypes. *Plant J* 1996; **9**: 147–158.
- [29] LEGOCKA J, ZAICHERT I. Role of spermidine in stabilization of the apoprotein of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex of photosystem II during leaf senescence process. *Acta Physiol Plant* 1999; **21**(2): 127–132.
- [30] LEGOCKA J, ŻARNOWSKA A. Role of polyamines in the cytokinin-dependent physiological processes. I. Effect of benzyladenine in the tissue culture of *Dianthus caryophyllus*. *Acta Physiol Plant* 1999; **21**(4): 349–354.
- [31] LIXIONG H, KAZUYOSHI N, YOSHIHISA K, SHOJI T. Enhanced susceptibility of photosynthesis to low-temperature photoinhibition due to interruption of chill-induced increase of S-adenosylmethionine decarboxylase activity in leaves of spinach. *Plant Cell Physiol* 2002; **43**(2): 196–206.
- [32] MALMBERG RL, WATSON MB, GALLOWAY GL, YU W. Molecular genetic analysis of plant polyamines. *Critical Reviews in Plant Sci* 1998; **17**(2): 199–224.
- [33] MARGOSIAK SA, DHARMA A, BRUCE-CAVER MR, GONZALES AP, LOUIE D, KOEHN GD. Identification of the large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase as a substrate for transglutaminase in *Medicago sativa* L. (alfalfa). *Plant Physiol* 1990; **92**: 88–96.
- [34] MORISHIGE DT, ANANDAN S, JAING JT, THORNER PJ. Amino-terminal sequence of the 21 kDa apoprotein of a minor light-harvesting pigment-protein complex of photosystem II antenna (LHCII/CP24). *FEBS Lett* 1990; **264**: 239–242.
- [35] MULLET JE. The aminoacid sequence of peptide segment which regulates membrane adhesion (grana stacking) in chloroplasts. *J Biol Chem* 1983; **258**: 9941–9948.
- [36] NIKLAS A, BUTOWIT R, JAŹDŹEWSKA E, MAJEWSKA-SAWKA A. Poliaininy w komórce roślinnej: synteza, mechanizm działania i funkcja. *Post Biol Kom* 1998; **25**: 33–49.
- [37] ROBERTS DR, DUMBROFF EB, THOMPSON JE. Exogenous polyamines alter membrane fluidity in bean leaves – a basis for potential misinterpretation of their true physiological role. *Planta* 1986; **167**: 395–401.

- [38] SERAFINI-FRACASSINI D, DEL DUCA S, BENINATI S. Plant Transglutaminases. *Phytochem* 1995; **40(2)**: 355–365.
- [39] SERAFINI-FRACASSINI D, DEL DUCA S. Biochemistry and function of plant transglutaminases. *Mine-  
rva Biotec* 2002; **14**: 135–141.
- [40] SINDHU RK, COHEN SS. Subcellular localization of speridine synthase in the protoplast of Chinese  
cabbage leaves. *Plant Physiol* 1984; **76**: 219–223.
- [41] SIŃSKA I. Poliамiny i aminy aromatyczne. [w] Jankiewicz LS [red.] Regulatory wzrostu i rozwoju roślin.  
Właściwości i działanie. Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN 1997: 150–166.
- [42] SLOCUM RD, KAUR-SHAWNEY R, GALSTON AW. The physiology and biochemistry of polyamines in  
plants. *Arch Biochem Biophys* 1984; **235**: 283–303.
- [43] STRZAŁKA K. Fotosynteza i chemosynteza. [w] KOPCEWICZ J, LEWAK S [red.] Podstawy fizjologii  
roślin. Warszawa, Wydawnictwo PWN 1998: 229–284.
- [44] TABOR H, TABOR CW. Biosynthesis and metabolism of 1,4-diaminobutane, spermidine, spermine and  
related amines. *Adv Enzymol* 1972; **36**: 20–23.
- [45] TIBURCIO AF, CAMPOS JL, FIGUERAS X, BESFORD RT. Recent advances in the understanding of  
polyamine functions during plant development. *Plant Growth Reg* 1993; **12**: 331–340.
- [46] TORRGINIANI P, SERAFINI-FRACASSINI D, BIONDI S, BAGNI N. Evidence for the subcellular loca-  
lization of polyamines and their biosynthetic enzymes in plant cells. *J Plant Physiol* 1986; **124**: 23–29.
- [47] VILLALOBOS JM, TORNE J, RIGAU I, OLLES I, CLAPAROS M, SANTOS V. Immunogold localization  
of transglutaminase related to grana development in different maize cell types. *Protoplasma* 2001; **216**:  
155–163.
- [48] YE XS, AVDIUSHKO SA, KUC J. Effects of polyamines on *in vitro* phosphorylation soluble and plasma  
membrane proteins in tobacco, cucumber and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 1994; **97**: 109–118.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 03.10.2003 r.

Przyjęto: 02.11.2003 r.

Al. Niepodległości 14, 61-713 Poznań

e-mail: legocka@amu.edu.pl





## SZLAKI SYGNAŁOWE AKTYWOWANE PRZEZ FITOCHROMY, ROŚLINNE RECEPTORY ŚWIATŁA CZERWONEGO I DALEKIEJ CZERWIENI\*

SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAYS ACTIVATED  
BY PHYTOCHROMES, THE PLANT PHOTORECEPTORS  
PERCEIVING RED AND FAR-RED LIGHT

Anna HETMANN, Stanisław KOWALCZYK

Zakład Biochemii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Streszczenie:** Fitochromy są roślinnymi, cytoplazmatycznymi fotoreceptorami światła czerwonego i dalekiej czerwieni, które w odpowiedzi na określony bodziec świetlny ulegają fotokonwersji do aktywnej formy Pfr i migrują do jądra. Wyniki najnowszych badań pokazują, że fitochromy mogą fosforylować szereg białek (PKS1, Aux/IAA, kryptochromy, NDPK2) bądź w wyniku bezpośrednich oddziaływań z odpowiednimi białkami jądrowymi (PIF3, HFR1/REP/RSF1, PIF4, ELF3, ARR4) uczestniczą w regulacji transkrypcji genów. Sklonowano też szereg genów kodujących białka funkcjonujące w szlakach aktywowanych przez PhyA lub PhyB, gdzie grają rolę pozytywnych lub negatywnych regulatorów fotomorfogenezy i zegara wewnętrznego. Stosunkowo duża liczba białek (COP1, sygnałosom COP9, COP10) uczestniczy w regulowanej przez światło ubikwitynacji oraz degradacji w proteasomach białek regulujących transkrypcję (HY5, HYH, LAF1).

**Słowa kluczowe:** fitochrom, szlaki sygnałowe, regulatory transkrypcji, mutanty *cop/det/fus*, sygnałosom COP9/CSN, ligazy E3.

**Summary:** The phytochromes are plant cytoplasmic photoreceptors sensitive to red and far-red light that in active Pfr form migrate to the nucleus in response to light. Results of the current studies demonstrate that the phytochromes have at least two different modes of action. On one hand, they function as light-regulated kinases phosphorylating some proteins (PKS1, Aux/IAA, cryptochromes, NDPK2), on the other, they directly interact with some nuclear proteins (PIF3, HFR1/REP/RSF1, PIF4, ELF3, ARR4) and act as transcriptional modulators. Besides, several genes involved in PhyA or PhyB downstream signal transduction pathways were identified. Encoded proteins are the both posi-

\*Praca finansowana w ramach grantu wewnętrznego UMK 473-B.



vely and negatively acting components that regulate photomorphogenesis and the circadian clock. The large subset of the encoded proteins (COP1, signalosome COP9, COP10) are components of a ubiquitin-proteasome pathway that functions in signaling by targeted degradation of transcription regulators (HY5, HYH, LAF1).

*Key words:* phytochromes, signal transduction pathways, transcription regulators, mutants *cop/det/fus*, signalosome COP9/CSN, E3 ligases.

## 1. WSTĘP

Fitochromy są roślinnymi fotoreceptorami absorbującymi światło czerwone i dalekiej czerwieni, funkcjonującymi w regulacji procesów fotomorfogenezy. Białka fitochromowe są rozpuszczalnymi, dimerycznymi chromopolipeptydami o masie cząsteczkowej 116–130 kDa, w których domena N-końcowa (74 kDa) za pośrednictwem wiązań kowalencyjnych wiąże otwartą grupę tetrapirolową – chromofor. Domena C-końcowa (55 kDa) jest odpowiedzialna za dimeryzację oraz oddziaływanie z białkowymi elementami łańcuchów transdukcji sygnałów. Fitochromy *Arabidopsis thaliana*, kodowane przez rodzinę pięciu genów *PHYA-PHYE*, monitorują w zasadzie te same sygnały lub różne ich parametry i regulują takie same bądź różne odpowiedzi fizjologiczne. Podstawowe różnice między poszczególnymi fitochromami dotyczą głównie ich stabilności.

W piśmiennictwie polskim opublikowano kilka artykułów przeglądowych prezentujących zagadnienia związane z budową i regulacją genów fitochromowych, strukturą i biochemicznymi właściwościami białek, a także niektórymi aspektami funkcji tych fotoreceptorów [79,83]. W ostatnich dwóch pracach [20,83] omówiono także wyniki ważniejszych badań z połowy lat dziewięćdziesiątych, w których przekazywanie sygnałów fitochromowych wiązano z aktywacją heterotrimerycznych białek G i zmianami stężenia jonów wapnia i cGMP w cytoplazmie. W drugiej połowie lat dziewięćdziesiątych poszukiwania w tym kierunku zostały niemal całkowicie zaniechane, a ostatnie doniesienia dotyczące doświadczeń prowadzonych na mutantach *gal* i *agb1* *A. thaliana* pozbawionych polipeptydów  $\alpha$  i  $\beta$  heterotrimerycznych białek G poddają w wątpliwość wyniki wcześniejszych badań [38]. Gwałtowny postęp w poznawaniu szlaków sygnałowych aktywowanych przez fitochromy w ostatnich latach zawdzięczamy przede wszystkim badaniom prowadzonym na wyselekcjonowanych mutantach *A. thaliana*, a głównie badaniom wykorzystującym zaawansowane techniki biologii molekularnej. Niniejsza praca jest próbą podsumowania osiągnięć, jakie odnotowano na tym polu w ostatnich latach. Zainteresowanemu Czytelnikowi polecamy także prace przeglądowe opublikowane w ostatnich trzech latach w czasopiśmie o zasięgu ogólnoświatowym [18,41,44,54,62,63,66,90].

## 2. REGULOWANY PRZEZ ŚWIATŁO DOJĄDROWY TRANSPORT FITOCHROMÓW – PODSTAWĄ MECHANIZMU SZYBKIEGO PRZEKAZYWANIA SYGNAŁU ŚWIETLNEGO

Przez wiele lat fitochromy uważano za białka wyłącznie cytoplazmatyczne, które ulegają w pewnych warunkach tzw. sekwestracji, która poprzedza ich proteolityczną degradację [41]. Przez ponad dwadzieścia lat ignorowano doniesienia sugerujące, że w siewkach owsa, które poddano dłuższemu naświetlaniu PhyA jest zlokalizowany w jądrze [54]. Dopiero Sakamoto i Nagatami [65] analizując sekwencję aminokwasową polipeptydów PHYB z kilku roślin zwrócili uwagę na sekwencje aminokwasowe położone w regionie C-końcowym, które mogą pełnić funkcję motywu NLS (*Nuclear Localization Signal*) skierowującego białko do jądra. Przypuszczenie dotyczące transportu PhyB z cytoplazmy do jądra zweryfikowano doświadczalnie śledząc w transgenicznej roślinie wewnątrzkomórkową lokalizację chimerycznego białka, produktu konstruktów zawierającego C-końcowy fragment *PHYB* i gen reporterowy *GUS*. Indukowaną przez światło migrację PhyB do jądra potwierdzono następnie w badaniach chimerycznego białka PhyB:GFP (*Green Fluorescent Protein*) w transgenicznym mutancie *phyB A. thaliana* [95]. Rezultatem tych badań było stwierdzenie, iż transport PhyB z cytoplazmy do jądra zachodzi w warunkach ciągłego światła czerwonego, a jego efektem są powstające w nukleoplazmie charakterystyczne ziarnistości. Zmian lokalizacji PhyB nie obserwowano w warunkach pojedynczego błysku światła czerwonego, dalekiej czerwieni i światła niebieskiego [22]. Podobne wyniki uzyskano w doświadczeniach przeprowadzonych na transgenicznym tytoniu, w których śledzono zmiany lokalizacji chimerycznego białka PhyB:GFP [47]. Okazało się, że wymuszany przez światło czerwone transport PhyB z cytoplazmy do jądra może zostać zahamowany przez pojedynczy impuls światła dalekiej czerwieni. Wyniki tych badań dowodzą, że PhyB jest transportowany do jądra w aktywnej formie Pfr, oraz że zmiana lokalizacji PhyB jest reakcją niskoenergetyczną typu LFR (*Low Fluence Response*). Transport PhyB z cytoplazmy do jądra jest więc swoistą odpowiedzią na bodziec świetlny, która gra kluczową rolę w mechanizmie transdukcji sygnału.

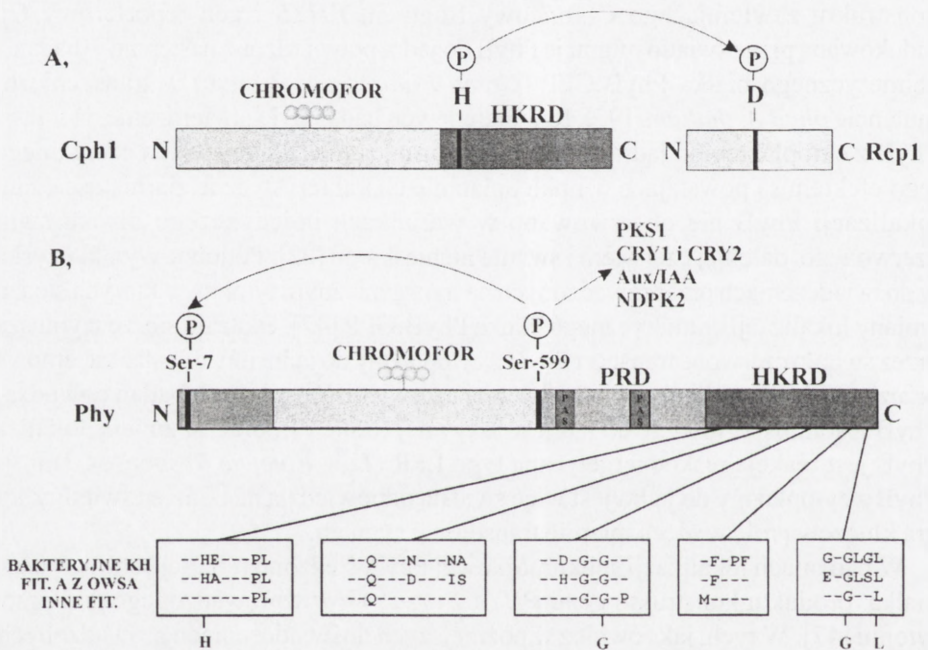
W badaniach lokalizacji subkomórkowej PhyA śledzono migrację chimerycznego białka, produktu konstruktów genu *PHYA* z ryżu i *GFP* wprowadzonego do komórek tytoniu [47]. W tych, jak również w późniejszych doświadczeniach prowadzonych na *A. thaliana* i grochu wykazano, że transport PhyA:GFP do jądra jest indukowany przez krótki impuls światła czerwonego i niebieskiego lub ciągłą daleką czerwień [26,43,47]. Tak więc, transport PhyA do jądra jest reakcją typu VLFR (*Very Low Fluence Response*) lub reakcją aktywowaną przez daleką czerwień typu HIR (*High Irradiance Response*).

W ostatnim czasie Kircher i wsp. [46] śledzili zmiany lokalizacji wewnątrzkomórkowej chimerycznych białek wszystkich pięciu fitochromów (PhyA do E) z GFP potwierdzając, iż transport poszczególnych fotoreceptorów do jądra oraz powstawanie w nukleoplazmie charakterystycznych ziarnistości podlega swoistej regulacji przez światło.



### 3. FITOCHROM A – KINAZĄ BIAŁKOWĄ REGULOWANĄ PRZEZ ŚWIATŁO

Struktura pierwszorzędowa fitochromów roślin wyższych jest podobna do struktury fotoreceptorów Cph1 i RcaE cyjanobakterii (*Synechocystis* sp., *Fremyella diplosiphon*) [17,84]. Bakteryjne fotoreceptory, podobnie jak fitochromy, mają w części N-końcowej domenę wiążącą chromofor, a w części C-końcowej domenę przekaźnika typową dla kinaz histydynowych (ryc. 1A). W przypadku Cph1 światło dalekiej czerwieni aktywuje autofosforylację reszty histydyny położonej w przekaźniku oraz transfer grupy fosforanowej na resztę kwasu asparaginowego położoną w oddzielnym białku określanym jako regulator odpowiedzi Rcp1. Światło czerwone powoduje hamowanie aktywności kinazowej Cph1 [84].



RYCINA 1. Schemat budowy bakteryjnego fotoreceptora Cph1 i roślinnych fitochromów: A – fotoreceptor Cph1 cyjanobakterii *Synechocystis* sp. jest kinazą histydynową aktywowaną przez światło dalekiej czerwieni. Fosforylowana w tych warunkach reszta histydyny w domenie przekaźnika jest donorem grupy fosforanowej, która jest przenoszona na resztę asparaginianu w regulatorze odpowiedzi Rcp1; B – białka fitochromowe roślin wyższych mają dwie charakterystyczne domeny. Domena N-końcowa wiąże chromofor, natomiast domena C-końcowa, obejmująca subdomeny PRD i HKRD, funkcjonuje w transdukcji sygnału. Na schemacie pokazano podobieństwo sekwencji aminokwasowej w motywach H, N, G1, F, G2 fitochromu A owsa oraz innych fitochromów z bakteryjnymi kinazami histydynowymi (na podstawie [7,18,84])

Białka fitochromowe roślin wyższych, obok domeny strukturalnej wiążącej chromofor, mają w części C-końcowej polipeptydu dwie subdomeny PRD i HKRD (ryc. 1B). Subdomena PRD (*PAS Repeat Domain*) uczestniczy w oddziaływaniach fitochromu z innymi białkami szlaku sygnałowego. Rola subdomeny HKRD (*Histidine Kinase-Related Domain*) podobnej do przekaźnika w bakteryjnych kinazach histydynowych (sekwencja aminokwasowa w obu tych fragmentach jest w 13–17% identyczna) nie jest jasna. Rośliny transformowane zmutowanym genem *phyA* owsa, kodującym polipeptyd pozbawiony konserwatywnych aminokwasów w motywach H,G1,G2, charakterystycznych dla domeny przekaźnika w bakteryjnych kinazach histydynowych, reagują na światło podobnie jak rośliny linii dzikich [7]. Wyników tych badań jednak nie potwierdzono w doświadczeniach prowadzonych na mutantach *A. thaliana*, w których PhyB miał zmienioną domenę HKRD [49]. Yeh i Lagarias [97] badając rekombinowany fitochrom A owsa i zielonego glonu *Mesotaenium caldariorum* wykazali, że białko fotoreceptora ulega regulowanej przez światło autofosforylacji, a ponadto może fosforylować histon H1 i regulator odpowiedzi Rcp1 z *Synechocystis* sp. W obu wypadkach nie jest jednak fosforylowana reszta asparagianinu, lecz reszta seryny/treoniny. Na podstawie wcześniejszych doświadczeń było już wiadomo, że PhyA owsa jest fosfoproteiną, w której reszta seryny w pozycji 7 jest konstytutywnie ufosforylowana, a fosforylacja reszty seryny-599 *in vivo* jest regulowana przez światło [17]. Reszta seryny w pozycji 599 PhyA gra istotną rolę zarówno w reakcji autofosforylacji, jak też w przenoszeniu reszty fosforanowej na cytoplazmatyczne białko PKS1 (*Phytochrome Kinase Substrate I*) [19]. PKS1 oddziałuje z subdomeną HKRD PhyA i PhyB i to niezależnie od tego, czy fotoreceptor występuje w formie Pr czy Pfr, chociaż fosforylacja reszty seryny w PKS1 jest aktywowana przez światło czerwone [19]. Nadekspresja genu *PKS1* w *A. thaliana* prowadzi do wystąpienia zmian fenotypowych przypominających fenotyp mutantów pozbawionych fitochromu B. Wyniki tych doświadczeń nasuwają przypuszczenie, że PKS1 może ograniczać transport fitochromu do jądra, działając w ten sposób jako negatywny regulator szlaku aktywowanego przez PhyA [19].

Białkami fosforylowanymi przez PhyA są także niektóre regulatory transkrypcji kodowane przez rodzinę tzw. wczesnych genów auksynowych *Aux/IAA* [11,40,100]. Białka *Aux/IAA* mogą tworzyć heterodimery z czynnikami transkrypcyjnymi z rodziny ARF (*Auxin Response Factor*) uczestnicząc w ten sposób w regulacji transkrypcji wtórnych genów auksynowych [100]. Regulowana przez światło fosforylacja szeregu białek z rodziny *Aux/IAA* przez PhyA może poprzedzać ich ubikwitynację katalizowaną przez ligazę E3 typu SCF<sup>TIR1</sup> (patrz podrozdział 5.1) i degradację w proteasomach [40]. Wydaje się więc, że fosforylacja *Aux/IAA* przez PhyA może być elementem mechanizmu integrującego szlaki sygnalizacji świetlnej i hormonalnej.

Doniesienia opublikowane przed kilku laty sugerują, że PhyA fosforyluje także kryptochromy (receptory światła niebieskiego i UV-A) oraz kinazę nukleozydodifosforanową (NDPK) [1,10]. Fosforylacja reszty seryny położonej w regionie C-końcowym kryptochromu 1 i 2 przez rekombinowany *phyA* nie zależy jednak od stanu konformacyjnego fotoreceptora [1]. Przypuszcza się także, że regulacja aktywności



jednej z izoform kinazy nukleozydodifosforanowej (NDPK2) przenoszącej fosforan z ATP na nukleozydy difosforanowe odbywa się przez fosforylację tego enzymu [10].

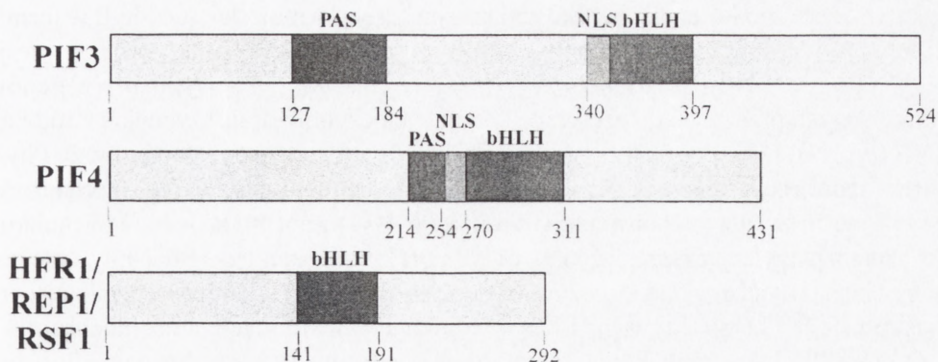
Tak więc, wyniki dotychczasowych badań dowodzą, że spośród pięciu fitochromów *A. thaliana* co najmniej PhyA jest kinazą białkową – paralogiem bakteryjnych kinaz histydynowych, który w toku zmian ewolucyjnych przejął funkcję serynowo/treoninowej kinazy białkowej [17].

#### 4. BIAŁKA JĄDROWE ODDZIAŁUJĄCE Z FITOCHROMAMI

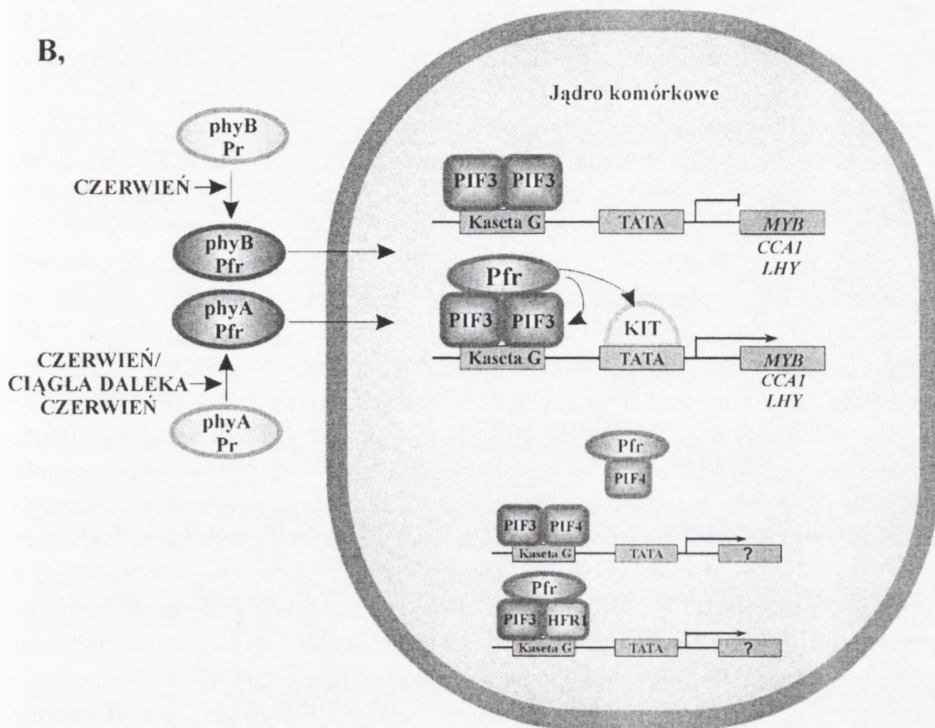
Możliwość migracji fitochromów z cytoplazmy do jądra, swoiście regulowanej przez światło, skierowała uwagę badaczy na białka jądrowe, które mogą bezpośrednio oddziaływać z fotoreceptorami. Przypuszczenia o możliwości takich oddziaływań potwierdzono po raz pierwszy w badaniach Ni i wsp. [56]. Metodą drożdżowego układu dwuhybrydowego, używając C-końcowego fragmentu *PhyB*, wyselekcjonowano gen *PIF3* (*Phytochrome Interacting Factor3*) kodujący białko jądrowe wiążące się z DNA. Białko PIF3 zawiera motyw bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*) utworzony przez około 17-aminokwasowy fragment bogaty w aminokwasy zasadowe (głównie argininę) oraz dwie helisy  $\alpha$  przedzielone pętlą uczestniczące w tworzeniu form dimerycznych. Fragment zasadowy motywu bHLH umożliwia wiązanie białka PIF3 do palindromowej kasety G (-CACGTG-), motywu obecnego w promotorach wielu genów regulowanych przez światło, a także niektórych genów regulowanych przez inne bodźce sygnałowe [64]. Do kasety G oprócz białek z motywem bHLH mogą się także wiązać białka zawierające motyw bZIP, np. białko HY5 (patrz podrozdział 5.2.). PIF3 obok motywu bHLH zawiera domenę PAS odpowiedzialną za oddziaływania typu białko-białko oraz dwuczęściową sekwencję NLS (ryc. 2A). Obecnie wiadomo, że *PIF3* jest jednym ze 147 genów *A. thaliana* kodujących białka z motywem bHLH, które funkcjonują w regulacji transkrypcji [80].

W badaniach oddziaływań między PIF3 a fitochromami używano, obok C-końcowego fragmentu *PhyB*, także kompletnych białek *PhyB* i *PhyA*. Wyniki tych doświadczeń potwierdziły, że PIF3 wiąże się w stosunku 1:1 jedynie do formy Pfr *PhyB*, a fotokonwersja fotoreceptora do formy Pr likwiduje wiązanie między obu białkami [55]. W oddziaływaniach między PIF3 i *PhyB* uczestniczy domena PAS położona w regionie N-końcowym PIF3 i obydwie domeny N- i C-końcowa *PhyB* [99]. Manipulowanie poziomem białka PIF3 metodami wykorzystującymi techniki antysensu zmienia wrażliwość rośliny transgenicznej na ciągłe światło czerwone i w mniejszym stopniu także na ciągłą daleką czerwień [56]. Zmiany zaobserwowane w przypadku dalekiej czerwieni są przypuszczalnie efektem oddziaływań PIF3 z *PhyA* w formie Pfr, bowiem, jak wykazano doświadczalnie, PIF3 wiąże również *PhyA*, chociaż powinowactwo do tego fotoreceptora jest 10-krotnie mniejsze niż do *PhyB* [99].

A,



B,



RYCINA 2. Schemat budowy białek jądrowych wiążących fitochromy, uczestniczących w tworzeniu kompleksów regulujących transkrypcję genów: A – białka PIF3, PIF4 i HFR1/REP1/RSF1 łączy obecność domeny bHLH, za pośrednictwem której białka wiązane są do kasety G w promotorach genów regulowanych przez światło; B – transport PhyB i PhyA z cytoplazmy do jądra, indukowany przez określony bodziec świetlny, umożliwia bezpośrednie oddziaływanie aktywnej formy Pfr fitochromów z białkami regulującymi transkrypcję. PhyB i PhyA wiązane przez kompleks PIF3-DNA aktywują transkrypcję genów *CCA1* i *LHY*. Białko PIF4, funkcjonujące jako negatywny regulator szlaku zależnego od PhyB, wiąże PhyB eliminując w ten sposób aktywną formę fitochromu wewnątrz jądra. Białko HFR1/REP1/RSF1 tworząc heterodimery z PIF3 współdziała w zależnej od fitochromów regulacji transkrypcji genów (na podstawie [16,35,53,55,56])



Udział PhyB w bezpośredniej regulacji ekspresji genów został potwierdzony doświadczalnie przez Martinez-Garcia i wsp. [53]. Wyniki uzyskane przez tych autorów wykazały, że homodimer białka PIF3 związany z kasetą G może wiązać PhyB w formie Pfr, oraz że wiązanie PhyB do kompleksu PIF3-kaseta G w DNA aktywuje ekspresję *CCA1* (*Circadian Clock Associated*) i *LHY* (*Late elongated Hypocotyl*), genów indukowanych przez światło czerwone kodujących czynniki transkrypcyjne z rodziny MYB (ryc. 2B) [53]. Wyniki powyższych doświadczeń ostatecznie dowiodły, że PhyB może w sposób bezpośredni uczestniczyć w regulacji genów, a podstawą tego mechanizmu jest zależna od światła fotokonwersja i transport PhyB w formie Pfr do jądra. Molekularny mechanizm aktywacji ekspresji genów *CCA1* i *LHY* przez kompleks PIF3-PhyB nie jest znany, chociaż można zakładać możliwość oddziaływań PhyB z kompleksem inicjującym transkrypcję (KIT) lub aktywację PIF3 w wyniku jego fosforylacji przez fitochrom.

Oprócz PIF3 poznano kilka innych białek jądrowych, które bezpośrednio lub pośrednio oddziałują z fitochromami wnikającymi do jądra. U mutantu *hfr1 A. thaliana* (*long hypocotyl in far-red*) sklonowano gen kodujący białko zawierające motyw bHLH z nietypowym regionem zasadowym (ryc. 2A) [16]. Gen *HFR1* okazał się identyczny z genem sklonowanym u mutantu *rep1* (*reduced phytochrome signaling 1*) *A. thaliana*, u którego nie obserwuje się szeregu odpowiedzi na światło dalekiej czerwieni [72], a także z genem poznany u mutantu *rsf1* (*reduced sensitivity to far-red light*), który wykazuje ograniczoną wrażliwość na światło dalekiej czerwieni [73]. Białko HFR1/REP1/RSF1 jest więc pozytywnym regulatorem w szlaku aktywowanym przy udziale PhyA i mimo że bezpośrednio nie wiąże żadnego z fitochromów, to może tworzyć heterodimery z PIF3 wiążące fitochromy A i B w formie Pfr [16]. Wydaje się więc, że HFR1/REP1/RSF1 może funkcjonować w regulacji transkrypcji współdziałając z PIF3 lub z innymi nieznanymi jeszcze białkami zawierającymi motyw bHLH (ryc. 2B).

Fitochrom B w formie Pfr wiąże także białko jądrowe PIF4 (*Phytochrome Interacting Factor 4*) homologiczne z PIF3 [35]. Gen *PIF4* sklonowano u mutantu *slr2* (*short under red light 2*) nadwrażliwego na światło czerwone. Fenotyp tego mutantu wskazuje, że PIF4 jest negatywnym regulatorem szlaku sygnałowego aktywowanego przez phyB. Białko PIF4, podobnie jak PIF3, ma motyw bHLH, domenę PAS oraz sekwencję NLS (ryc. 2A) i wiąże się do kasety G, lecz po utworzeniu kompleksu z DNA nie wiąże już phyB [35]. Wyniki tych obserwacji nasuwają przypuszczenie, że PIF4 może eliminować aktywną formę PhyB z jądra, a efektem takich oddziaływań będzie hamowanie szlaku sygnałowego aktywowanego przez ten fotoreceptor.

Z fragmentem N-końcowym PhyB oddziałuje białko ARR4 (*Arabidopsis Response Regulator4*) [78], jeden z 11 regulatorów odpowiedzi typu A, który w domenie „odbiornika” zawiera konserwatywną resztę asparaginianu fosforylowaną w wyniku transferu grupy fosforanowej z histydyny położonej w tzw. domenie przekaźnika kinaz histydynowych [48]. Wiązanie ARR4 przez PhyB stabilizuje aktywną formę Pfr hamując tzw. rewersję ciemniową PhyB. Wydaje się więc, że oddziaływanie ARR4 z PhyB może grać pewną rolę w mechanizmie integrującym szlaki fitochromowe ze szlakami sygnałowymi aktywowanymi przez receptorowe kinazy histydynowe (cytokininowe, etylenowe czy stresu osmotycznego) [48].

Białkiem enzymatycznym oddziałującym z PhyA i PhyB w formie Pfr jest kinaza nukleozydodifosforanowa 2 (NDPK2) katalizująca transfer reszty fosforanowej z ATP na nukleozydy difosforanowe zawierające zarówno rybozę, jak też deoksyrybozę [10]. Mimo że efektem oddziaływań między tymi białkami jest aktywacja katalityczna NDPK, to jednak, przez analogię do niezwykle zróżnicowanej funkcji tego enzymu w tkankach zwierzęcych, proponuje się, że NDPK2 w roślinach gra również rolę białka regulującego transkrypcję.

Wyselekcjonowanie mutantu *elf3* (*early flowering 3*) *A. thaliana* umożliwiło poznanie kolejnego białka jądrowego, które jest swoiście wiązane przez fragment C-końcowy PhyB [51]. Sekwencja aminokwasowa ELF3 nie jest podobna do żadnego z białek o znanej funkcji, chociaż obecność w części C-końcowej polipeptydu regionu bogatego w glutaminę i treoninę może sugerować, że ELF3 jest również białkiem regulującym transkrypcję. Autorzy zainteresowani poznawaniem mechanizmu zegara biologicznego próbują wiązać funkcję ELF3 z zerowaniem zegara w szlaku zależnym od sygnału świetlnego [76].

Białkowym elementem zegara biologicznego oddziałującym z C-końcowym fragmentem PhyB jest także białko ADO1/ZTL/LKP1, które zawiera tzw. kasetę F, sześć powtórzeń motywu KELCH tworzących tzw. strukturę „śmigła” oraz domenę LOV obecną m.in. w fototropinach, receptorach światła niebieskiego [37]. Obecność tej domeny sugeruje, że ADO1/ZTL/LKP1 może być kolejnym roślinnym fotoreceptorem lub że jest białkiem, które w sposób zależny od światła reguluje ubikwitynację białek tworzących centralny oscylator [76].

## 5. BIAŁKA COP/DET/FUS – ELEMENTAMI KOMPLEKSÓW REGULUJĄCYCH PROTEOLIZĘ, FUNKCJONUJĄCYCH W INTEGRACJI SZLAKÓW SYGNAŁOWYCH

Przed ponad 10 laty wyselekcjonowano rodzinę mutantów *A. thaliana*, które rosnąc w ciemności wykazują fenotyp roślin rozwijających się na świetle. Mutanty mają w ciemności krótki hypokotyl, otwarte i rozwinięte liście, częściowo wykształcone chloroplasty, syntetyzują antocyjany i mają zaktywowane niektóre geny regulowane przez światło. Ze względu na duże podobieństwo w fenotypach, mutacje te określa się wspólną nazwą *cop/det/fus* (*constitutive photomorphogenic/detioliated/fusca*) [23,94]. Zidentyfikowano 11 plejotropowych loci *cop/det/fus* i wykazano, że wszystkie są mutacjami recesywnymi, wszystkie są epistatyczne względem mutacji w fotoreceptorach oraz niemal wszystkie są letalne już na etapie rozwoju siewki. Plejotropowość zmian obserwowana w fenotypach tych mutantów wskazywała na to, że regulowany przez światło program fotomorfogenezy został poważnie naruszony, a produkty genów, które uległy mutacji, pełnią w roślinach funkcje represorów fotomorfogenezy, których działanie represyjne jest inaktywowane przez sygnały świetlne. Postępy w klonowaniu zmutowanych genów i poznawaniu ich produktów pozwoliły stwierdzić, iż u sześciu, spośród 11 mutantów, nie tworzą się



specjalne wielopodjednostkowe struktury białkowe – sygnałosomy COP9 [67,70]. Mutacje w pozostałych trzech genach (*COP1/FUS1*, *COP10/FUS9* i *DET1/FUS2*) nie wpływają na tworzenie sygnałosomu i w niektórych wypadkach nie są letalne.

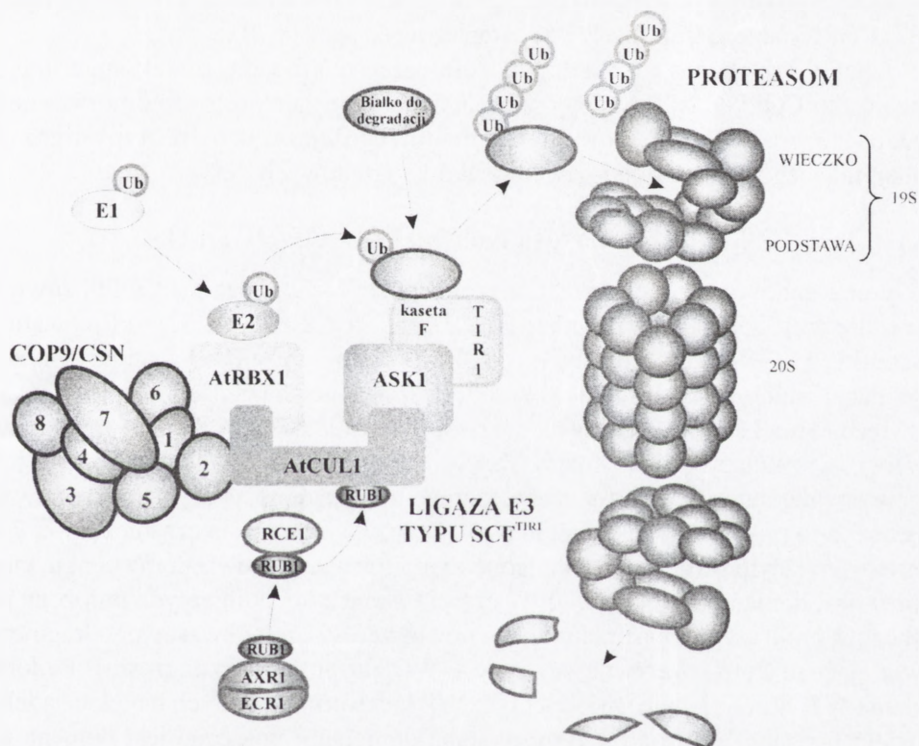
### 5.1. Budowa i funkcja sygnałosomu COP9

Sygnałosom COP9 zidentyfikowano przed 10 laty w komórkach *A. thaliana* jako wielopodjednostkowy kompleks białkowy o masie cząsteczkowej około 560 kDa [92], a dwa lata później kompleks taki został oczyszczony z kwiatostanu kalafiora [8]. Późniejsze badania biochemiczne wykazały, że zlokalizowany w jądrze kompleks COP9 zbudowany jest z ośmiu polipeptydów o masie cząsteczkowej od 22,6 do 51,2 kDa określanych obecnie akronimem AtCSN i kolejnymi liczbami od 1 do 8 [70]. W br. sklonowano gen *FUS12/COP12* kodujący podjednostkę AtCSN2, kończąc tym samym poznawanie wszystkich genów *A. thaliana* kodujących osiem podjednostek sygnałosomu COP9 [71]. Sygnałosom COP9, nazywany obecnie również kompleksem CSN, został w 1998 roku odkryty także w komórkach ludzkich, a później również komórkach *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans* i drożdży dzielących się (*Schizosaccharomyces pombe*) [5,42,93]. Brak tego kompleksu u mutantu *csn* drożdży *S. pombe* powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego, a podobna mutacja u muszki owocowej prowadzi do zahamowania wzrostu już we wczesnym etapie rozwoju [70,93].

Sześć spośród ośmiu polipeptydów sygnałosomu COP9/CSN zawiera charakterystyczną domenę PCI (*Proteasome, COP9, Initiation factor 3*) utworzoną przez około 200 aminokwasów. Domena PCI jest obecna również w sześciu polipeptydach budujących „wieczko” proteasomu, a także w polipeptydach tworzących dziesięciopodjednostkowy kompleks eIF3 inicjujący translację u eukariontów [42]. Pozostałe dwa polipeptydy COP9/CSN mają domenę MPN (*Mpr1p, Pad1p N-terminal*), która jest także obecna w dwóch polipeptydach „wieczka” oraz podjednostkach kompleksu eIF3. Obydwie wspomniane domeny uczestniczą, jak można przypuszczać, w prawidłowym składaniu funkcjonalnego sygnałosomu COP9, bowiem mutacja w genie chociażby jednej z podjednostek prowadzi zwykle do braku w komórce całego kompleksu. Wyjaśnienie tych zależności tłumaczy zatem zaskakujące podobieństwo fenotypowe większości mutantów *cop/det/fus*.

Podobna budowa sygnałosomu i „wieczka” proteasomu, obecność tych samych domen w tworzących je polipeptydach i podobieństwo struktury czwartorzędowej obu kompleksów nasuwały przypuszczenie, że COP9 może być alternatywnym „wieczkiem” dla proteasomu [21,67]. Dzisiaj już wiadomo, że „wieczko”, tworzące razem z „podstawą” część regulatorową proteasomu (19S), odszczepia łańcuch poliubikwitynowy od białka przeznaczonego do degradacji, które po rozfałdowaniu zostaje wprowadzone do wnętrza cylindrycznej części proteasomu (20S), gdzie ulega proteolizie (ryc. 3). Sugerowana zamiennosc „wieczka” i COP9 jest raczej mało prawdopodobna z uwagi na dość duże różnice w ich strukturze przestrzennej [39], a także ze względu na zasadniczo odmienną funkcję kompleksu COP9/CSN. Schwechheimer i wsp. [68,71] wykazali, że COP9 oddziałuje poprzez polipeptyd CSN2 z białkiem AtCUL1, a poprzez CSN1 i CSN6 z białkiem AtRBX1. Oba białka AtCUL1 i AtRBX1 są składnikami kompleksu ligazy ubikwitynowej E3 typu SCF (ryc. 3) [40,70,85,100]. Ligazę SCF

tworzą cztery białka: SKP1/w *A. thaliana* AtASK1, CDC34/AtCUL1, białko AtRBX1 z motywem RING i białko zawierające kasetę F, które decyduje o swoistym wiązaniu białka przeznaczonego do ubikwitynacji. Genom *A. thaliana* zawiera co najmniej sześć genów kodujących kuliny, 358 genów kodujących białka z motywem RING i 694 geny kodujące białka z motywem F [85]. W ostatnich latach udało się już sklonować kilka genów kodujących białka z motywem F (*TIR1*, *COI*, *UFO*, *EID*, *ADO1/ZTL/LKPI*), a w kilku wypadkach poznano także funkcję odpowiadających im produktów [40,70]. Na przykład w sygnalizacji auksynowej funkcjonuje kompleks ligazy SCF<sup>TIR1</sup> zawierający białko TIR1 z motywem F, które wiąże białka regulujące transkrypcję z rodziny Aux/IAA [40,85]. Aktywność kompleksu ligazy E3 typu SCF<sup>TIR1</sup> jest regulowana przez odwracalne przyłączanie do podjednostki AtCUL1 (kuliny) małego białka RUB1/NEDD8 (*Related to Ubiquitin/Neural precursor cell-Expressed Developmentally Downregulated gene 8*) podobnego do ubikwityny [100].



RYCINA 3. Schemat kompleksu ligazy E3 typu SCF<sup>TIR1</sup> funkcjonującej w ubikwitynacji białek przeznaczonych do degradacji w proteasomach. Aktywność ligazy SCF<sup>TIR1</sup> jest regulowana przez białko RUB1, które jest odwracalnie przyłączane do kuliny (AtCUL1). Na schemacie pokazano białka (AXR1/ECR1, RCE1 i AtRBX1) tworzące kaskadę enzymów uczestniczących w rubinytacji AtCUL1 oraz kompleks sygnałowy COP9/CSN zaangażowanego w usuwanie RUB1 z kompleksu ligazy. Derubinyłacja kuliny prowadzi do inaktywacji kompleksu ligazy SCF<sup>TIR1</sup>. Szczegóły opisano w tekście (na podstawie [14,40,52,68,70,71])



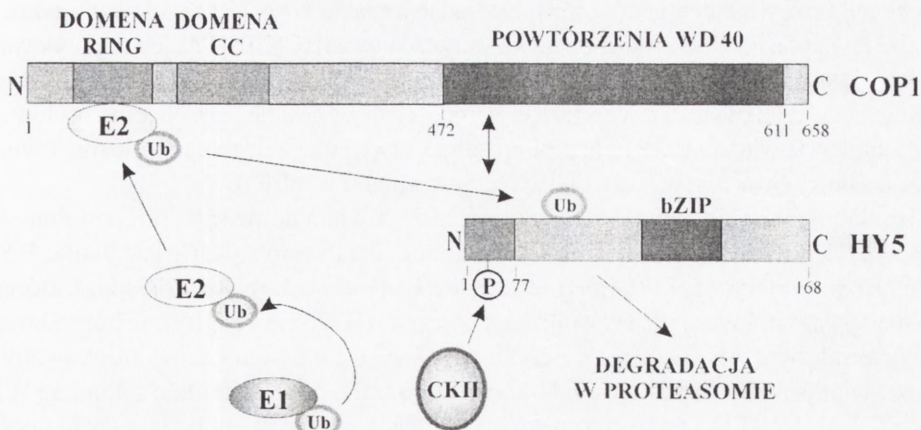
Rubinylacja/nedylacja kuliny umożliwia wiązanie enzymu E2 do białka AtRBX i aktywuje w ten sposób ligazę SCF<sup>TR1</sup>. W rubinylacji kuliny uczestniczą enzymy, które tworzą układ analogiczny do kaskady enzymów funkcjonujących w ubikwitynacji. Tak więc, odpowiednikiem enzymu E1 aktywującym RUB1 jest białko heterodimerskie AXR1/ECR1, a odpowiednikiem E2 jest białko RCE1, które oddziałuje z AtRBX pełniącym przypuszczalnie rolę ligazy E3 przenoszącej RUB1 na kulinę [14] (ryc. 3).

Wyniki ostatnich badań dowodzą, że kompleks COP9/CSN usuwa białko RUB1/NEDD8 z ligazy SCF (derubinylacja/denedylacja), podobnie jak „wieczko” proteasomu uczestniczy w deubikwitynacji białka przeznaczonego do degradacji w proteasomie [52]. Derubinylacja ligazy SCF przez sygnałom COP9 powinna zatem prowadzić do inaktywacji kompleksu SCF w wyniku oddysocjowania od niego enzymu E2, a tym samym do zahamowania ubikwitynacji białka substratowego. W derubinylacji kuliny uczestniczy prawdopodobnie podjednostka CSN5 sygnałsomu COP9/CSN [68]. Jak na razie, niejasna jest rola sygnałsomu COP9 w migracji niektórych białek wewnątrz komórki. Na przykład u mutantów *cop/det/fus* pozbawionych sygnałsomu COP9 nie obserwuje się transportu białka COP1 (patrz podrozdział 5.2.) z cytoplazmy do jądra [8,70].

Poznane dotychczas mechanizmy regulujące degradację białek sugerują, że sygnałsom COP9/CSN, uważany pierwotnie jedynie za represor fotomorfogenezy, wydaje się grać rolę kluczowego elementu regulującego różne typy ligaz E3 funkcjonującego w integracji różnych szlaków sygnałowych [85].

## 5.2. Funkcja pozostałych białek COP/DET/FUS

Oprócz genów kodujących osiem podjednostek sygnałsomu COP9, również pozostałe trzy geny (*COP1/FUS1*, *COP10/FUS9* i *DET1/FUS2*) sklonowane u mutantów *A. thaliana* kodują białka, które w różny sposób są zaangażowane w degradację białek w proteasomach. W dotychczasowych badaniach najczęściej uwagi poświęcono białku COP1 kodowanemu przez gen *COP1/FUS1*. Zmiany fenotypowe towarzyszące mutacji w tym genie wskazywały, że kodowane białko funkcjonuje jako negatywny regulator fotomorfogenezy, którego funkcja represyjna jest inaktywowana przez światło [94]. COP1 jest białkiem rozpuszczalnym o masie cząsteczkowej 74,5 kDa zawierającym w regionie N-końcowym motyw wiążący dwa atomy cynku, który tworzy tzw. domenę RING (ryc. 4). W części C-końcowej polipeptydu położona jest domena WD-40 utworzona przez siedem powtórzeń 40-aminokwasowego fragmentu zawierającego konserwatywną sekwencję WD (tryptofan-asparaginian). Podobna domena WD-40 występuje w polipeptydach  $\beta$  heterotrimerycznych białek G, a także w wielu ligazach E3. Między tymi dwiema domenami położona jest domena CC (*Coiled-Coil*), a dalej dwuczęściowa sekwencja NLS (ryc. 4) [12]. Badania lokalizacji subkomórkowej chimerycznego białka COP1: GUS w komórkach hypokotyli *A. thaliana* i komórkach epidermalnych cebuli wykazały, że w ciemności COP1 jest zlokalizowane w jądrze, natomiast na świetle występuje na terenie cytoplazmy [86,87]. W komórkach korzenia białko COP1 jest znajdowane wyłącznie w jądrze i to niezależnie od warunków świetlnych. Fitochromy A i B oraz kryptochrom I wpływają na zależną od światła zmianę lokalizacji subkomórkowej COP1 [57]. Wiadomo także, że transport



RYCINA 4. Schemat budowy białka COP1 funkcjonującego w ubikwitynacji białka HY5. W N-końcowej części polipeptydu COP1 jest położony motyw wiążący dwa atomy cynku, który tworzy domenę RING. Dalej w kierunku C-końca znajduje się fragment tworzący strukturę *coiled-coil* (domena CC), a za nim fragment zawierający siedem powtórzeń ok. 40-aminokwasowego fragmentu z charakterystyczną sekwencją WD (tryptofan-kwas asparaginowy). Białko HY5, zawierające motyw bZIP, oddziałuje za pośrednictwem fragmentu N-końcowego z domeną WD-40 w COP1. Wiązanie między obu białkami jest regulowane przez kinazę białkową CK II. Białko COP1, wykazujące aktywność ligazy E3, przenosi ubiquitynę z białka E2 na HY5 skierowując w ten sposób HY5 do degradacji w proteasomie (na podstawie [2,12,24,29,59])

COP1 z cytoplazmy do jądra zależy od sygnałosu COP9 [8,87], chociaż mechanizm tej zależności nie jest znany. Udało się zidentyfikować fragment polipeptydu COP1 zawierający sekwencje lokalizacji cytoplazmatycznej CLS, które są położone w obrębie domeny RING i obejmują częściowo domenę CC [74]. Jednak najważniejsze obserwacje związane z COP1 dotyczą jego aktywności, która, jak się okazało, ujawnia się jedynie wówczas, gdy COP1 znajduje się na terenie jądra [75].

Pierwsze sugestie dotyczące funkcji COP1 oparte były na wynikach badań prowadzonych na mutantach *cop1* i *hy5* (*long hypocotyl 5*) *A. thaliana* [3]. Zmiany fenotypowe towarzyszące mutacji *hy5* sugerowały, że dotyczy ona genu odpowiedzialnego za regulację podstawowych procesów rozwojowych (wzrost, podziały komórek, rozwój chloroplastów) [59]. Sklonowany gen *HY5* koduje małe białko jądrowe (18,5 kDa) zawierające w części C-końcowej motyw bZIP utworzony przez 24-aminokwasowy fragment bogaty w aminokwasy zasadowe oraz motyw zamka leucynowego, który jest odpowiedzialny za dimeryzację (ryc. 4) [59]. Za pośrednictwem domeny bZIP białko HY5 wiąże się do kasety G (-ACGT-) w promotorach niektórych genów indukowanych przez światło m.in. genów *RBCS-1A* (*Ribulose Bisphosphate Carboxylase small Subunit1A*) czy *CHS1* (*Chalcone Synthase1*) [2,9]. Poprzez fragment N-końcowy (od 1 do 77 aminokwasu) białko HY5 wiąże się także swoiście do domeny WD-40 w białku COP1 [2,29,81]. Widocznym efektem powstawania kompleksu COP1-HY5 są charakterystyczne ziarnistości pojawiające się na terenie jądra i degradacja białka HY5 w proteasomach [58]. HY5 jest degradowane jedynie w ciemności, bowiem tylko w ciemności COP1 występuje na terenie jądra. Zmiana lokalizacji COP1 z jądrowej na cytoplazmatyczną na świetle prowadzi do ponad 20-krotnego wzrostu poziomu HY5 i



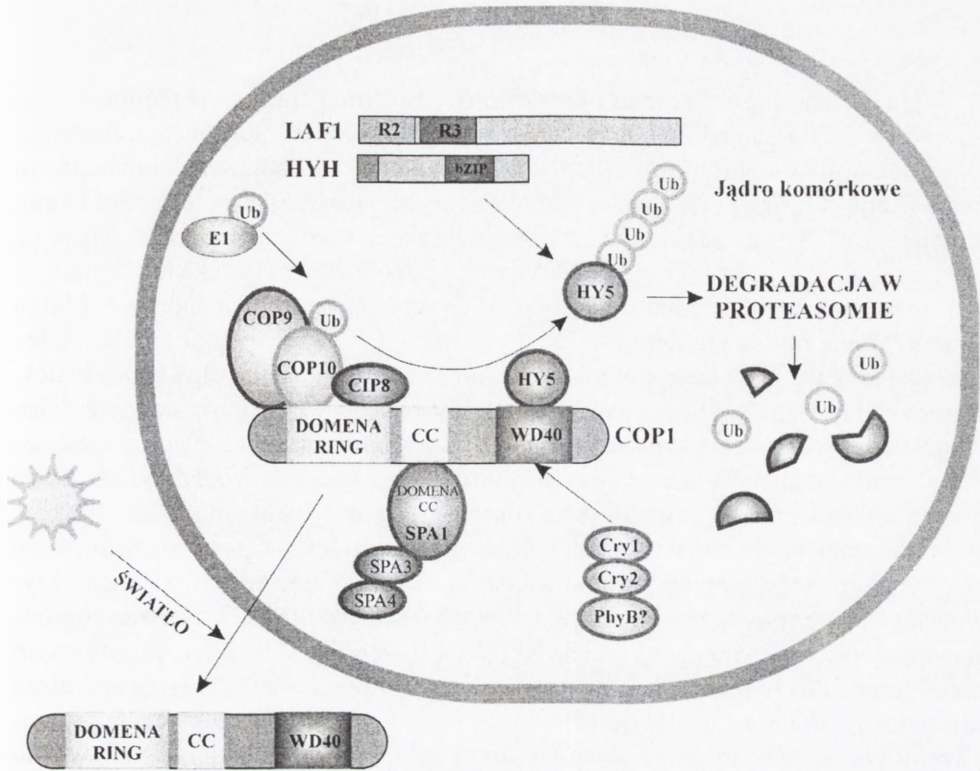
aktywacji odpowiednich genów [58]. Degradacja białka HY5 jest regulowana także w drodze fosforylacji, w której uczestniczy kinaza kazeinowa II (CKII). HY5 jest fosforylowane w części N-końcowej uczestniczącej w wiązaniu COP1 (ryc. 4). Aktywność CKII jest regulowana przez światło i jest wyższa w ciemności niż na świetle [24]. Nieufosforylowane HY5 silnie się wiąże z COP1 i przypuszczalnie łatwiej ulega degradacji, ale ma również większe powinowactwo względem sekwencji promotorowych [24].

Białkiem homologicznym z HY5, które także zawiera domenę bZIP i podobnie jak HY5 jest degradowane w ciemności w wyniku oddziaływań z COP1 jest białko HYH (*Hy5 Homolog*) (ryc. 5) [30]. HYH jest małym białkiem jądrowym (16,9 kDa), którego sekwencja aminokwasowa jest w 49% identyczna z HY5. HYH w formie homodimeru lub heterodimeru z HY5 wiąże się do kasety G w promotorach genów indukowanych przez światło, a za pośrednictwem N-końcowego fragmentu oddziałuje z domeną WD-40 w COP1. HYH jest więc pozytywnym regulatorem transkrypcji, zwłaszcza genów odpowiedzialnych za zmiany rozwojowe indukowane przez światło niebieskie [30].

Wyniki powyższych doświadczeń sugerowały, że COP1 jest zaangażowane w ubikwitynację białek regulujących transkrypcję. W br. sugestia ta została ostatecznie potwierdzona w doświadczeniach, w których wykazano, że COP1 uczestniczy w ubikwitynacji aktywatora transkrypcji LAF1 oraz w samoubikwitynacji, działając jako ligaza białkowa E3 (ryc. 5) [69]. Jądrowe białko LAF1, kodowane przez gen sklonowany u mutantu *laf1 A. thaliana (long after far-red light 1)*, zawiera w części N-końcowej dwie około 50-aminokwasowe domeny R, z resztami tryptofanu w kilku charakterystycznych pozycjach, pośredniczące w wiązaniu DNA [4]. LAF1 jest więc czynnikiem aktywującym transkrypcję z rodziny białek MYB-R2R3 pełniącym funkcję pozytywnego regulatora fotomorfogenezy w szlaku aktywowanym przez PhyA [69]. COP1 uczestniczy również w ubikwitynacji białka HFR1/REP1/RSF1 z motywem bHLH (patrz rozdz. 4), które tworząc heterodimery z PIF3 może funkcjonować w regulacji transkrypcji [16,45]. Ponieważ COP1 zmienia swoją lokalizację subkomórkową w zależności od warunków świetlnych, dlatego ubikwitynacja określonych białek jądrowych może zachodzić tylko w ciemności. Fenotyp mutantu *cop1* wynika więc z faktu, iż HY5, HYH, LAF1, HFR1/REP1/RSF1, a przypuszczalnie również inne pozytywne regulatory transkrypcji nie mogą być normalnie degradowane w ciemności.

Ubikwitynację LAF1 wspomaga białko jądrowe SPA1 (*Suppressor of PhyA-105*) aktywujące COP1 [69]. SPA1 zawiera domenę homologiczną z WD-40 w białku COP1 oraz motyw CC, za pośrednictwem którego wiąże się z podobnym motywem w COP1 (ryc. 5) [27,28,69]. Poprzez domenę CC w COP1 wiążą się również dwa inne białka SPA3 i SPA4 (*SPA related*) homologiczne z białkiem SPA1 [50]. Wszystkie trzy białka SPA są negatywnymi regulatorami fotomorfogenezy funkcjonującymi w szlaku sygnałowym aktywowanym przez PhyA.

Wyniki ostatnich doświadczeń wykazały, że aktywność COP1 jest regulowana w drodze bezpośredniego oddziaływania z kryptochromami, a przypuszczalnie także z PhyB [91,96]. Wiązanie C-końcowego fragmentu kryptochromów (Cry1 i Cry2) do domeny W-40 ligazy COP1 powoduje hamowanie jej aktywności, a w efekcie prowadzi do wzrostu poziomu HY5 i aktywacji transkrypcji szeregu genów (ryc. 5).



RYCINA 5. Schemat regulacji kompleksu ligazy COP1 uczestniczącej w ubikwitinacji białek aktywujących transkrypcję (HY5, HYH, LAF1). Ligaza COP1 współdziałała z białkiem CIP8 w przenoszeniu ubikwityny z enzymu E2, (białko COP10?) na HY5 lub na inne białka aktywujące transkrypcję (HYH, LAF1). Aktywność COP1 może być aktywowana przez białka SPA1, SPA3 lub SPA4 oddziałujące z domeną CC w COP1. Kryptochromy 1 i 2, a przypuszczalnie także PhyB hamują aktywność COP1. Na schemacie zaznaczono indukowany przez światło transport COP1 z jądra do cytoplazmy. Szczegółowy opis w tekście (na podstawie [2,4,25,27,30,50,58,69,77,87,91])

Z białkiem COP1 oddziałują także białka CIP1, CIP4, CIP7 i CIP8 (*COP1-Interactive Protein*) [25]. Wydaje się, że CIP1 uczestniczy w przemieszczaniu się COP1 między cytoplazmą a jądrem, natomiast CIP4 i CIP7 są przypuszczalnie białkami regulującymi tworzenie homodimerów HY5. Białko CIP8 zawiera w części N-końcowej zmodyfikowany motyw RING, przez który oddziałuje z domeną RING w COP1 i przypuszczalnie współuczestniczy z COP1 w ubikwitinacji HY5 (ryc. 5) [25,82].

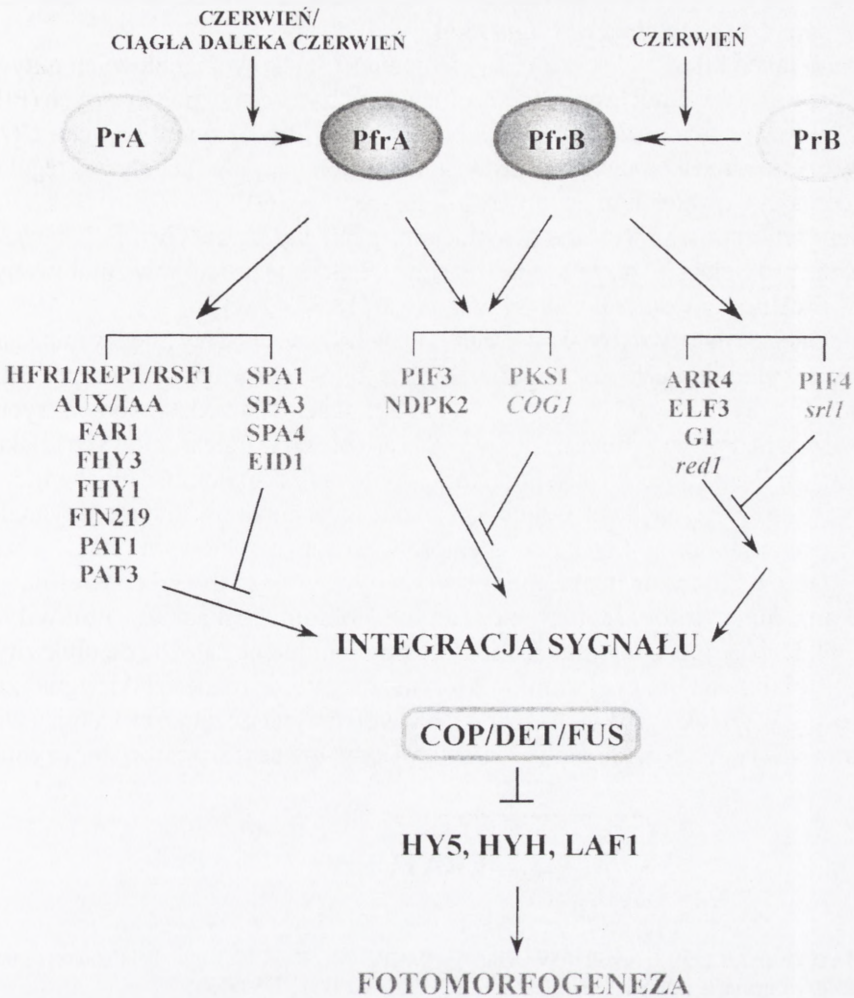
Wyniki nielicznych, jak na razie, badań poświęconych pozostałym dwóm genom *COP10* i *DET1* sugerują, że ich produkty są również zaangażowane w ubikwitinację i degradację białek w proteasomach. COP10 jest homologiczne z enzymem E2 i jak się obecnie przypuszcza jest składnikiem większego kompleksu białkowego oddziałującego z COP1, którego stabilność zależy od COP9 (ryc. 5) [77]. Gen *DET1* koduje białko jądrowe, które bezpośrednio nie wiąże DNA, natomiast wpływa na ekspresję genów poprzez oddziaływanie typu białko-białko z białkami wiążącymi DNA [61].



## 6. UWAGI KOŃCOWE

Sygnaly świetlne odbierane przez fitochromy uruchamiają co najmniej dwa niezależne szlaki sygnałowe. Pierwszy, stosunkowo szybki, polega na transporcie aktywnej formy fitochromów z cytoplazmy do jądra, gdzie z odpowiednimi białkami tworzą kontrolowane przez światło kompleksy regulujące transkrypcję genów. Drugi, wolniejszy szlak prowadzi do zmiany stężenia białek regulujących transkrypcję na drodze regulowanej przez światło ubiquitynacji odpowiednich białek i ich degradacji w proteasomach. Elementami szlaków sygnałowych są białka jądrowe, białka zlokalizowane na terenie cytoplazmy, a także, tak jak w przypadku COP1, białka zmieniające swoją lokalizację w zależności od warunków świetlnych. Oprócz białek, których budowa i funkcja była omawiana, mniej lub bardziej szczegółowo, w poprzednich rozdziałach, znany jest także szereg innych białek, których rola nie została jeszcze dostatecznie poznana. Schemat pokazany na rycinie 6 podsumowuje dotychczasowe osiągnięcia w poznawaniu białkowych elementów fitochromowych szlaków sygnałowych. Niektóre z wyszczególnionych tu białek są pozytywnymi, inne negatywnymi regulatorami fotomorfogenezy funkcjonującymi w szlakach aktywowanych przez PhyA, PhyB lub przez obydwa fotoreceptory [32]. Tak więc, oprócz wspomnianych już wcześniej białek HFR1/REP1/RSF1 i Aux/IAA, pozytywnym regulatorem PhyA jest białko FAR1 poznane u mutantu *far1* (*far-red-impaired response*) *A. thaliana*. FAR1 jest białkiem jądrowym, którego sekwencja aminokwasowa nie jest podobna do żadnego ze znanych białek [33]. Białkiem podobnym do FAR1 jest białko jądrowe FHY3 kodowane przez gen sklonowany u mutantu *shy3* (*far-red elongated hypocotyl 3*). Obydwa białka mogą tworzyć homo- lub heterodimery i jak sądzą autorzy, obydwa są białkami regulującymi transkrypcję genów w szlaku zależnym od PhyA [89]. U innego mutantu *A. thaliana* niewrażliwego na daleką czerwień sklonowano gen *FHY1*, kodujący białko zlokalizowane w cytoplazmie i jądrze, którego poziom rośnie w ciemności i drastycznie maleje w warunkach dalekiej czerwieni. Poziom transkryptu *FHY1* jest regulowany przez światło oraz przez białko FHY3 [13]. Z białkiem FHY1 oddziałuje białko kodowane przez gen sklonowany u mutantu *fin219* (*far-red insensitive 219*) [31]. FIN219 jest białkiem cytoplazmatycznym podobnym do białek GH3, kodowanych przez rodzinę tzw. genów wczesnych odpowiedzi auksynowych [100]. Ekspresja genu *FIN219*, podobnie jak genów *GH3*, jest aktywowana przez auksyny. W przekazywaniu sygnału z PhyA uczestniczą także białka PAT1 i PAT3, których geny sklonowano u mutantów *pat* (*phytochrome A signal transduction*) [6,98]. PAT1 jest białkiem cytoplazmatycznym homologicznym z białkami regulatorowymi z rodziny GRAS, natomiast PAT3 nie zawiera żadnej znanej sekwencji występującej w innych białkach.

Negatywnym regulatorem PhyA, obok wspomnianych wcześniej SPA1, SPA3 i SPA4, jest białko jądrowe kodowane przez gen sklonowany u mutantu *eid1* (*empfindlicher im dunkelroten licht 1*) [15]. EID1 zawiera domenę zamka leucynowego, a w regionie N-końcowym motyw kasety F, której obecność może świadczyć o tym, że EID1 jest składnikiem jakiegoś kompleksu ligazy E3 typu SCF.



RYCINA 6. Białka funkcjonujące w szlakach aktywowanych przez PhyA, PhyB lub przez obydwa fotoreceptory. Pozytywnymi regulatorami szlaku aktywowanego przez PhyA są białka: HFR1/REP1/RSF1, Aux/IAA, FAR1, FHY3, FHY1, FIN219, PAT1, PAT3. Represorami szlaku PhyA są: SPA1, SPA3, SPA4, EID1. Pozytywnymi regulatorami w szlaku PhyB są białka: ARR4, ELF3, GI, a negatywnym regulatorem białko PIF4. W szlakach aktywowanych przez obydwa fotoreceptory funkcjonują białka PIF3 i NDPK2 jako pozytywne i PKS1 jako negatywny regulator tych szlaków. Na schemacie zaznaczono też miejsce zmutowanych genów *red1* i *srl1*, których produkty uczestniczą w sygnalizacji zależnej od PhyB. Szczegółowy opis w tekście (na podstawie [18,32,62,63])

Sklonowano też kilka genów kodujących pozytywne i negatywne regulatory PhyB. Obok omawianych w poprzednich rozdziałach białek ELF3 i ARR4, pozytywnym regulatorem jest białko kodowane przez gen *GI* (*Gigantea*) [36]. Białko GI jest zlokalizowane w jądrze i funkcjonuje w szlaku PhyB jako regulator transkrypcji, szczególnie genów kontrolowanych przez zegar biologiczny. Pozytywnym regulatorem szlaku sygnałowego aktywowanego przez PhyB jest także produkt zmutowanego genu



*red1* (*red-light specific*) [88], a negatywnym regulatorem białko kodowane przez gen *srl1* (*short hypocotyl in red light*) [34].

Poznano także kilka białek, które są elementami szlaków sygnałowych aktywowanych przez obydwa fitochromy. Obok omawianych wcześniej pozytywnych (PIF3, NDPK2) i negatywnych (PKS1) regulatorów PhyA i PhyB, znany jest gen *COG1* kodujący czynnik transkrypcyjny z rodziny Dof funkcjonujący jako negatywny regulator w szlakach aktywowanych przez obydwa fotoreceptory [60].

Zmiany fenotypowe związane z mutacjami *pef1*, *pef2*, *pef3*, *psi2*, *vlf1*, *vlf2* *A. thaliana* nie pozwalają jeszcze na jednoznaczną lokalizację produktów zmutowanych genów w fitochromowych szlakach sygnałowych [18,32,62,63].

W tym miejscu należy zwrócić uwagę na fakt, iż badania epistazy między mutacjami w genach wymienionych białek napotykać na trudności z uwagi na charakter zmian fenotypowych towarzyszących mutacjom, dlatego schemat przedstawiony na rycinie 6 nie pokazuje faktycznego miejsca poszczególnych białek w fitochromowych szlakach sygnałowych. Brak takiej wiedzy, podobnie jak niewielka znajomość biochemicznej funkcji większości z tych białek utrudnia poznanie mechanizmów integracji sygnałów pochodzących z poszczególnych fotoreceptorów. Stosunkowo nowym i ciągle jeszcze bardzo słabo poznanym problemem związanym z sygnalizacją świetlną jest regulowana przez fotoreceptory na różnych poziomach kaskada ubikwityna/proteasom. Dzisiaj już wiadomo, że mechanizmy regulujące zależną od ubikwityny degradację białek są tymi miejscami, w którym zbiegają się różne szlaki sygnalizacji komórkowej. Poznanie tych mechanizmów pozwoli przypuszczalnie zrozumieć wiele współzależności między szlakami sygnałowymi aktywowanymi przez różne czynniki.

## 7. LITERATURA

- [1] AHMAD M, JARILLO JA, SMIRNOVA O, CASHMORE AR. The CRY1 blue light photoreceptor of *Arabidopsis* interacts with phytochrome A *in vitro*. *Mol Cell* 1998; **1**: 939–948.
- [2] ANG L-H, CHATTOPADHYAY S, WEI N, OYAMA T, OKADA K, BATSCHAUER A, DENG X-W. Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of *Arabidopsis* development. *Mol Cell* 1998; **1**: 213–222.
- [3] ANG L-H, DENG X-W. Regulatory hierarchy of photomorphogenic loci: allele-specific and light-dependent interaction between the *HY5* and *COP1* loci. *Plant Cell* 1994; **6**: 613–628.
- [4] BALLESTEROS ML, BOLLE C, LOIS LM, MOORE JM, VIELLE-CALZADA J-P, GROSSNIKLAUS U, CHUA N-H. LAF1, a MYB transcription activator for phytochrome A signaling. *Gen Dev* 2001; **15**: 2613–2625.
- [5] BECH-OTSCHIR D, SEEGER M, DUBIEL W. The COP9 signalosome: at the interface between signal transduction and ubiquitin-dependent proteolysis. *J Cell Sci* 2002; **115**: 467–473.
- [6] BOLLE C, KONCZ C, CHUA N-H. PAT1, a new member of the GRAS family, is involved in phytochrome A signal transduction. *Gen Dev* 2000; **14**: 1269–1278.
- [7] BOYLAN MT, QUAIL PH. Are the phytochromes protein kinases? *Protoplasma* 1996; **195**: 12–17.
- [8] CHAMOVITZ DA, WEI N, OSTERLUND MT, VON ARNIM AG, STAUB JM, MATSUI M, DENG X-W. The COP9 complex, a novel multisubunit nuclear regulator involved in light control of a plant developmental switch. *Cell* 1996; **86**: 115–121.

- [9] CHATTOPADHYAY S, ANG L-H, PUENTE P, DENG X-W, WEI N. *Arabidopsis* bZIP protein HY5 directly interacts with light-responsive promoters in mediating light control of gene expression. *Plant Cell* 1998; **10**: 673–683.
- [10] CHOI G, YI H, LEE J, KWON Y-K, SOH MS, SHIN B, LUKA Z, HAHN T-R, SONG P-S. Phytochrome signalling is mediated through nucleoside diphosphate kinase 2. *Nature* 1999; **401**: 610–613.
- [11] COLÓN-CARMONA A, CHEN DL, YEH K-C, ABEL S. Aux/IAA proteins are phosphorylated by phytochrome *in vitro*. *Plant Physiol* 2000; **124**: 1728–1738.
- [12] DENG X-W, MATSUI M, WEI N, WAGNER D, CHU AM, FELDMANN KA, QUAIL PH. *COP1*, an *Arabidopsis* regulatory gene, encodes a protein with both a zinc-binding motif and a Gβ homologous domain. *Cell* 1992; **71**: 791–801.
- [13] DESNOS T, PUENTE P, WHITELAM GC, HARBERD NP. FHY1: a phytochrome A-specific signal transducer. *Gen Dev* 2001; **15**: 2980–2990.
- [14] DHARMASIRI S, DHARMASIRI N, HELLMANN H, ESTELLE M. The RUB/Nedd8 conjugation pathway is required for early development in *Arabidopsis*. *EMBO J* 2003; **22**: 1762–1770.
- [15] DIETERLE M, ZHOU Y-C, SCHÄFER E, FUNK M, KRETSCH T. EID1, an F-box protein involved in phytochrome A-specific light signaling. *Gen Dev* 2001; **15**: 939–944.
- [16] FAIRCCHILD CD, SCHUMAKER MA, QUAIL PH. HFR1 encodes an atypical bHLH protein that acts in phytochrome A signal transduction. *Gen Dev* 2000; **14**: 2377–2391.
- [17] FANKHAUSER C. Phytochromes as light-modulated protein kinases. *Sem Cell Dev Biol* 2000; **11**: 467–473.
- [18] FANKHAUSER C. The phytochromes, a family of red/far-red absorbing photoreceptors. *J Biol Chem* 2001; **276**: 11453–11456.
- [19] FANKHAUSER C, YEH K-C, LAGARIAS JC, ZHANG H, ELICH TD, CHORY J. PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in *Arabidopsis*. *Science* 1999; **284**: 1539–1541.
- [20] FRANKOWSKI K, KĘSY J, KOPCEWICZ J. Fitochrom i transdukcja sygnału świetlnego. *Post Biochem* 2001; **47**: 184–191.
- [21] FU H, REIS N, LEE Y, GLICKMAN MH, VIERSTRA RD. Subunit interaction maps for the regulatory particle of the 26S proteasome and the COP9 signalosome. *EMBO J* 2001; **20**: 7096–7107.
- [22] GIL P, KIRCHER S, ADAM E, BURY E, KOZMA-BOGNAR L, SCHÄFER E, NAGY F. Photoccontrol of subcellular partitioning of phytochrome-B::GFP fusion protein in tobacco seedlings. *Plant J* 2000; **22**: 135–145.
- [23] HARDTKE CS, DENG X-W. The cell biology of the COP/DET/FUS proteins. Regulating proteolysis in photomorphogenesis and beyond? *Plant Physiol* 2000; **124**: 1548–1557.
- [24] HARDTKE CS, GOHDA K, OSTERLUND MT, OYAMA T, OKADA K, DENG X-W. HY5 stability and activity in *Arabidopsis* is regulated by a phosphorylation in its COP1 binding domain. *EMBO J* 2000; **19**: 4997–5006.
- [25] HARDTKE CS, OKAMOTO H, STOOP-MYER C, DENG XW. Biochemical evidence for ubiquitin ligase activity of the *Arabidopsis* COP1 interacting protein 8 (CIP8). *Plant J* 2002; **30**: 385–394.
- [26] HISADA A, HANZAWA H, WELLER JL, NAGATANI A, REID JB, FURUYA M. Light-induced nuclear translocation of endogenous Pea phytochrome A visualized by immunocytochemical procedures. *Plant Cell* 2000; **12**: 1063–1078.
- [27] HOECKER U, QUAIL PH. The phytochrome A-specific signaling intermediate SPA1 interacts directly with COP1, a constitutive repressor of light signaling in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 2001; **276**: 38173–38178.
- [28] HOECKER U, TEPPERMAN JM, QUAIL PH. SPA1, a WD-repeat protein specific to phytochrome A signal transduction. *Science* 1999; **284**: 496–499.
- [29] HOLM M, HARDTKE CS, GAUDET R, DENG X-W. Identification of a structural motif that confers specific interaction with the WD40 repeat domain of *Arabidopsis* COP1. *EMBO J* 2001; **20**: 118–127.
- [30] HOLM M, MA L-G, QU L-J, DENG X-W. Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in *Arabidopsis*. *Gen Dev* 2002; **16**: 1247–1259.
- [31] HSIEH H-L, OKAMOTO H, WANG M, ANG L-H, MATSUI M, GOODMAN H, DENG XW. *FIN219*, an auxin-regulated gene, defines a link between phytochrome A and the downstream regulator COP1 in light control of *Arabidopsis* development. *Gen Dev* 2000; **14**: 1958–1970.
- [32] HUDSON ME. The genetics of phytochrome signalling in *Arabidopsis*. *Sem Cell Dev Biol* 2000; **11**: 475–483.
- [33] HUDSON M, RINGLI C, BOYLAN MT, QUAIL PH. The *FAR1* locus encodes a novel nuclear protein specific to phytochrome A signaling. *Gen Dev* 1999; **13**: 2017–2027.
- [34] HUQE, KANG Y, HALLIDAY KJ, QIN M, QUAIL PH. *SRL1*: a new locus specific to the phyB-signaling pathway in *Arabidopsis*. *Plant J* 2000; **23**: 461–470.



- [35] HUQ E, QUAIL PH. PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J* 2002; **21**: 2441–2450.
- [36] HUQ E, TEPPERMAN JM, QUAIL PH. GIGANTEA is a nuclear protein involved in phytochrome signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 9789–9794.
- [37] JARILLO JA, CAPEL J, TANG R-H, YANG H-Q, ALONSO JM, ECKER JR, CASHMORE AR. An *Arabidopsis* circadian clock component interacts with both CRY1 and phyB. *Nature* 2001; **410**:487–490.
- [38] JONES AM, ECKER JR, CHEN J-G. A reevaluation of the role of the heterotrimeric G protein in coupling light responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2003; **131**: 1623–1627.
- [39] KAPELARI B, BECH-OTSCHIR D, HEGERL R, SCHADE R, DUMDEY R, DUBIEL W. Electron microscopy and subunit-subunit interaction studies reveal a first architecture of COP9 signalosome. *J Mol Biol* 2000; **300**: 1169–1178.
- [40] KEPINSKI S, LEYSER O. Ubiquitination and auxin signaling: a degrading story. *Plant Cell* 2002; Supplement: S81–S95.
- [41] KEVEI Č, NAGY F. Phytochrome controlled signalling cascades in higher plants. *Physiol Plant* 2003; **117**: 305–313.
- [42] KIM T-H, HOFMANN K, VON ARNIM AG, CHAMOVITZ DA. PCI complexes: pretty complex interactions in diverse signaling pathways. *Trends Plant Sci* 2001; **6**: 379–386.
- [43] KIM L, KIRCHER S, TOTH R, ADAM E, SCHÄFER E, NAGY F. Light-induced nuclear import of phytochrome-A: GFP fusion proteins is differentially regulated in transgenic tobacco and *Arabidopsis*. *Plant J* 2000; **22**: 125–133.
- [44] KIM J-I, KOZHUKH GV, SONG P-S. Phytochrome-mediated signal transduction pathways in plants. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **298**: 457–463.
- [45] KIM Y-M, WOO J-C, SONG P-S, SOH M-S. HFR1, a phytochrome A-signalling component, acts in a separate pathway from HY5, downstream of COP1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2002; **30**: 711–719.
- [46] KIRCHER S, GIL P, KOZMA-BOGNÁR L, FEJES E, SPETH V, HUSSELSTEIN-MULLER T, BAUER D, ADAM E, SCHÄFER E, NAGY F. Nucleocytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochrome A, B, C, D and E is regulated differentially by light and exhibits a diurnal rhythm. *Plant Cell* 2002; **14**: 1541–1555.
- [47] KIRCHER S, KOZMA-BOGNAR L, KIM L, ADAM E, HARTER K, SCHÄFER E, NAGY F. Light quality-dependent nuclear import of the plant photoreceptors phytochrome A and B. *Plant Cell* 1999; **11**: 1445–1456.
- [48] KOWALCZYK S, HETMANN A. Roślinne receptorowe kinazy histydynowe i wielostopniowy przepływ fosforanu do regulatorów odpowiedzi. *Post Biochem* 2003; w druku
- [49] KRALL L, REED JW. The histidine kinase-related domain participates in phytochrome B function but is dispensable. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 8169–8174.
- [50] LAUBINGER S, HOECKER U. The SPA1-like proteins SPA3 and SPA4 repress photomorphogenesis in the light. *Plant J* 2003; **35**: 373–385.
- [51] LIU XL, COVINGTON MF, FANKHAUSER C, CHORY J, WAGNER DRY. *ELF3* encodes a circadian clock-regulated nuclear protein that functions in an *Arabidopsis* PHYB signal transduction pathway. *Plant Cell* 2001; **13**: 1293–1304.
- [52] LYAPINA S, COPE G, SHEVCHENKO A, SERINO G, TSUGE T, ZHOU C, WOLF DA, WEI N, SHEVCHENKO A, DESHAIES RJ. Promotion of NEDD8-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. *Science* 2001; **292**: 1382–1385.
- [53] MARTINEZ-GARCIA JF, HUQ E, QUAIL PH. Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* 2000; **288**: 859–863.
- [54] NAGY F, SCHÄFER E. Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* 2002; **53**: 329–355.
- [55] NI M, TEPPERMAN JM, QUAIL PH. Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature* 1999; **400**: 781–784.
- [56] NI M, TEPPERMAN JM, QUAIL PH. PIF3, a phytochrome interacting factor necessary for normal photo-induced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell* 1998; **95**: 657–667.
- [57] OSTERLUND MT, DENG X-W. Multiple photoreceptors mediate the light-induced reduction of GUS-COP1 from *Arabidopsis* hypocotyl nuclei. *Plant J* 1998; **16**: 201–208.
- [58] OSTERLUND MT, HARDTKE CS, WEI N, DENG X-W. Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature* 2000; **405**: 462–466.
- [59] OYAMA T, SHIMURA Y, OKADA K. The *Arabidopsis* *HY5* gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Gen Dev* 1997; **11**: 2983–2995.

- [60] PARK DH, LIM PO, KIM JS, CHO DS., HONG SH, NAM HG. The *Arabidopsis* *COG1* gene encodes a Dof domain transcription factor and negatively regulates phytochrome signaling. *Plant J* 2003; **34**: 161–171.
- [61] PEPPER A, DELANEY T, WASHBURN T, POOLE D, CHORY J. DET1, a negative regulator of light-mediated development and gene expression in *Arabidopsis*, encodes a novel nuclear-localized protein. *Cell* 1994; **78**: 109–116.
- [62] QUAIL PH. Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Curr Opin Cell Biol* 2002; **14**: 180–188.
- [63] QUAIL PH. Phytochrome photosensory signalling networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; **3**: 85–93.
- [64] QUAIL PH. Phytochrome-interacting factors. *Sem Cell Dev Biol* 2000; **11**: 457–466.
- [65] SAKAMOTO K, NAGATANI A. Nuclear localization activity of phytochrome B. *Plant J* 1996; **10**: 859–868.
- [66] SCHÄFER E, BOWLER C. Phytochrome-mediated photoperception and signal transduction in higher plants. *EMBO Reports* 2002; **3**: 1042–1048.
- [67] SCHWECHHEIMER C, DENG X-W. COP9 signalosome revisited: a novel mediator of protein degradation. *Trends Cell Biol* 2001; **11**: 420–426.
- [68] SCHWECHHEIMER C, SERINO G, CALLIS J, CROSBY WL, LYAPINA S, DESHAIES RJ, GRAY WM, ESTELLE M, DENG X-W. Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCF<sup>TIR1</sup> in mediating auxin response. *Science* 2001; **292**: 1379–1382.
- [69] SEO HS, YANG J-Y, ISHIKAWA M, BOLLE C, BALLESTEROS ML, CHUA N-H. LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1. *Nature* 2003; **423**: 995–999.
- [70] SERINO G, DENG X-W. The COP9 signalosome: regulating plant development through the control of proteolysis. *Annu Rev Plant Biol* 2003; **54**: 165–182.
- [71] SERINO G, SU H, PENG Z, TSUGE T, WEI N, GU H, DENG X-W. Characterization of the last subunit of the *Arabidopsis* COP9 signalosome: Implications for the overall structure and origin of the complex. *Plant Cell* 2003; **15**: 719–731.
- [72] SOH M-S, KIM Y-M, HAN S-J, SONG P-S. REP1, a basic helix-loop-helix protein, is required for a branch pathway of phytochrome A signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2000; **12**: 2061–2073.
- [73] SPIEGELMAN JI, MINDRINOS MN, FANKHAUSER C, RICHARDS D, LUTES J, CHORY J, OEFNER PJ. Cloning of the *Arabidopsis* *RSF1* gene by using a mapping strategy based on high-density DNA arrays and denaturing high-performance liquid chromatography. *Plant Cell* 2000; **12**: 2485–2498.
- [74] STACEY MG, HICKS SN, VON ARNIM AG. Discrete domains mediate the light-responsive nuclear and cytoplasmic localization of *Arabidopsis* COP1. *Plant Cell* 1999; **11**: 349–363.
- [75] STACEY MG, KOPP OR, KIM T-H, VON ARNIM AG. Modular domain structure of *Arabidopsis* COP1. Reconstitution of activity by fragment complementation and mutational analysis of a nuclear localization signal in planta. *Plant Physiol* 2000; **124**: 979–989.
- [76] STAIGER D. Circadian rhythms in *Arabidopsis*: time for nuclear proteins. *Planta* 2002; **214**: 334–344.
- [77] SUZUKI G, YANAGAWA Y, KWOK SF, MATSUI M, DENG X-W. *Arabidopsis* COP10 is a ubiquitin-conjugating enzyme variant that acts together with COP1 and the COP9 signalosome in repressing photomorphogenesis. *Gen Dev* 2002; **16**: 554–559.
- [78] SWEERE U, EICHENBERG K, LOHRMANN J, MIRA-RODADO V, BÄURLE I, KUDLA J, NAGY F, SCHÄFER E, HARTER K. Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling. *Science* 2001; **294**: 1108–1111.
- [79] SZMIDT-JAWORSKA A, JAWORSKI K, KOPCEWICZ J. Genetyczne i molekularne podstawy funkcjonowania fitochromu u roślin. *Kosmos* 1999; **48**: 53–66.
- [80] TOLEDO-ORTIZ G, HUQ E, QUAIL PH. The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* 2003; **15**: 1749–1770.
- [81] TORII KU, MCNELLIS TW, DENG X-W. Functional dissection of *Arabidopsis* COP1 reveals specific roles of its three structural modules in light control of seedling development. *EMBO J* 1998; **17**: 5577–5587.
- [82] TORII KU, STOOP-MYER CD, OKAMOTO H, COLEMAN JE, MATSUI M, DENG X-W. The RING finger motif of photomorphogenic repressor COP1 specifically interacts with the RING-H2 motif of a novel *Arabidopsis* protein. *J Biol Chem* 1999; **274**: 27674–27681.
- [83] TRETYN A, WIŚNIEWSKA J, JAWORSKI K. Mechanizm działania fitochromu. *Post Biol Kom* 1998; **25**: 225–250.
- [84] VIERSTRA RD, DAVIS SJ. Bacteriophytochromes: new tools for understanding phytochrome signal transduction. *Sem Cell Dev Biol* 2000; **11**: 511–521.
- [85] VIERSTRA RD. The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci* 2003; **8**: 135–142.



- [86] VON ARNIM AG, DENG X-W. Light inactivation of *Arabidopsis* photomorphogenic repressor COP1 involves a cell-specific regulation of its nucleocytoplasmic partitioning. *Cell* 1994; **79**: 1035–1045.
- [87] VON ARNIM AG, OSTERLUND MT, KWOK SF, DENG X-W. Genetic and developmental control of nuclear accumulation of COP1, a repressor of photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 1997; **114**: 779–788.
- [88] WAGNER D, HOECKER U, QUAIL PH. *RED1* is necessary for phytochrome B-mediated red light-specific signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1997; **9**: 731–743.
- [89] WANG H, DENG XW. *Arabidopsis* FHY3 defines a key phytochrome A signaling component directly interacting with its homologous partner FAR1. *EMBO J* 2002; **21**: 1339–1349.
- [90] WANG H, DENG XW. Dissecting the phytochrome A-dependent signaling network in higher plants. *Trends Plant Sci* 2003; **8**: 172–178.
- [91] WANG H, MA L-G, LI J-M, ZHAO H-Y, DENG X-W. Direct interaction of *Arabidopsis* cryptochromes with COP1 in light control development. *Science* 2001; **294**: 154–158.
- [92] WEI N, CHAMOVITZ DA, DENG XW. *Arabidopsis* COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development. *Cell* 1994; **78**: 117–124.
- [93] WEI N, DENG X-W. Making sense of the COP9 signalosome: a regulatory protein complex conserved from *Arabidopsis* to human. *Trends Genet* 1999; **15**: 98–103.
- [94] WEI N, DENG X-W. The role of the *COP/DET/FUS* genes in light control of *Arabidopsis* seedling development. *Plant Physiol* 1996; **112**: 871–878.
- [95] YAMAGUCHI R, NAKAMURA M, MOCHIZUKI N, KAY SA, NAGATANI A. Light dependent translocation of a phytochrome B-GFP fusion protein to the nucleus in transgenic *Arabidopsis*. *J Cell Biol* 1999; **145**: 437–445.
- [96] YANG H-Q, TANG R-H, CASHMORE AR. The signaling mechanism of *Arabidopsis* CRY1 involves direct interaction with COP1. *Plant Cell* 2001; **13**: 2573–2587.
- [97] YEH K-C, LAGARIAS JC. Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 13976–13981.
- [98] ZEIDLER M, BOLLE C, CHUA N-H. The phytochrome A specific signaling component PAT3 is a positive regulator of *Arabidopsis* photomorphogenesis. *Plant Cell Physiol* 2001; **42**: 1193–1200.
- [99] ZHU Y, TEPPERMAN JM, FAIRCHILD CD, QUAIL PH. Phytochrome B binds with greater apparent affinity than phytochrome A to the basic helix-loop-helix factor PIF3 in a reaction requiring the PAS domain of PIF3. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 13419–13424.
- [100] ZIELIŃSKA E, KOWALCZYK S. Percepcja i transdukcja sygnału auksynowego. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 155–183.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 03.10.2003 r.

Przyjęto: 02. 11. 2003 r.

ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń  
aniastef@chem.uni.torun.pl

## MERLIN(A) – CZARODZIEJ WŚRÓD SUPRESORÓW NOWOTWORZENIA\*

MERLIN – THE WIZARD AMONG TUMOUR SUPPRESSOR PROTEIN

Mikołaj ŁANIEWSKI-WOŁŁK\*\*, Agnieszka SZPECHT-POTOCKA

Zakład Genetyki Medycznej Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie

*Streszczenie:* Merlina jest wyjątkowym białkiem. Uczestniczy zarówno w regulacji cyklu komórkowego jako supresor nowotworzenia, jak i w kształtowaniu struktur cytoszkieletu. W strukturze merliny wyróżnia się globularną domenę FERM, występującą w wielu rodzinach białek o różnej funkcji i helikalny fragment C-końcowy. Aktywność merliny jest regulowana przejściami między formą otwartą a zamkniętą, w której domena FERM oddziałuje z fragmentem C-końcowym. Merlina w formie otwartej bierze udział w oddziaływaniach z wieloma białkami adhezyjnymi, strukturalnymi i regulatorowymi, a w formie zamkniętej z białkiem CD44, co prawdopodobnie decyduje o jej właściwościach supresorowych. Mechanizm supresji z udziałem merliny pozostaje nadal niewyjaśniony. Zaproponowane modele wskazują na udział merliny w tworzeniu pętli zwrotnej szlaku sygnałowego małych GTPaz i udział w inhibicji kontaktowej.

*Słowa kluczowe:* neurofibromatosis typu 2, NF2, merlina, supresor nowotworowy.

*Summary:* Merlin is an extraordinary tumour suppressor protein. It takes part both in cell-cycle regulation as well as in the cytoskeleton formation. In the structure of merlin a FERM domain found in various protein and  $\alpha$ -helical C-terminal fragment can be distinguished. Merlin's activity is regulated by the transitions between the open and the closed form in which FERM domain interacts with the  $\alpha$ -helical C-terminal fragment. In the open form merlin associates with various adhesive, structural and regulatory proteins. In the closed form it associates with the CD44 protein, which probably determines its suppressory properties. The suppression mechanism involving merlin has not yet been explained. The proposed models indicate merlin's involvement both in the generation of the reversible loop of the small-GTPases's signal path as well as in the contact inhibition.

*Keywords:* neurofibromatosis type 2, NF2, tumour suppressor.

*Wykaz terminów i skrótów:* **Białka ERM** (ang. *ezrin/radixin/moesin*) – rodzina białek podbłonowych o wysokiej homologii. Białka ERM występują w różnego typu sfaldowaniach błon (m.in. mikrokosmkach) oraz złączach adhezyjnych; mają C-końcową domenę wiążącą aktyne. Stabilizują aktynowy cytoszkielet.

\*Częściowo finansowane z projektu KBN 3 PO5E 104 22.

\*\*Student Wydziału Biologii UW i I Wydziału Lekarskiego AM w Warszawie.



Ich podstawową funkcję jest łączenie białek błonowych z cytoszkieletem. **CD44** – klasa izoform (wspólny gen *CD44*) będących receptorami kw. hialuronowego. CD44 jest białkiem adhezyjnym – receptorem macierzy zewnątrzkomórkowej, koreceptorem towarzyszącym receptorom czynników wzrostu oraz regulatorem struktur macierzy podbłonowej. Najlepiej udokumentowany jest wpływ CD44 na ruchliwość komórek. **Domena FERM** – występuje w 163 białkach (baza Pfam <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>), które można podzielić na 21 klas. Są to w większości strukturalne i regulacyjne białka podoblonowe, w których domena FERM spełnia rolę uniwersalnego łącznika z innymi białkami i lipoproteinami w połączeniach cząsteczek cytoplazmatycznych i błonowych. W białkach tych na N-końcu położona domena FERM łączy się z różnymi domenami białkowymi: domeną PDZ/DHR/GLGF; **PTP** (ang. *Protein-tyrosine phosphatase*) – domeną enzymatyczną białkowych fosfataz tyrozyny, **RhoGEF** (ang. *Guanine nucleotide exchange factor for Rho/Rac/Cdc42-like GTPases*) – domeną enzymatyczną małych GTP-az, **TyrKc** (ang. *Tyrosine kinase, catalytic domain*) – domeną katalityczną kinaz tyrozynowych. **Domena PDZ/DHR/GLGF** – jedna z najbardziej rozpowszechnionych domen białkowych (około 1806 białek), głównie w białkach sygnałowych. Odnajdywana praktycznie we wszystkich organizmach. Prawdopodobnie spełnia rolę uniwersalnego łącznika pozwalającego na tworzenie dużych kompleksów zbudowanych z szeregu białek efektorowych i regulacyjnych, w których domena PDZ tworzy swoiste usieciowanie kompleksu. Bierze udział w tworzeniu złączy adhezyjnych, błonowych zgrupowań (*clustering*) białek enzymatycznych i kanałowych. Uczestniczy w przekazywaniu sygnałów międzykomórkowych. **E3KARP** (ang. *NHE3 kinase A regulatory protein*); **HRS** (ang. *hepatocyte growth factor (HGF)-regulated tyrosine kinase substrate*); **komórki Schwanna** – komórki neurogleju odpowiedzialne za tworzenie osłonek mielinowych nerwów obwodowych; **kw. hialuronowy** – heterogenna pod względem masy cząsteczkowej grupa liniowych polisacharydów będąca ważnym składnikiem macierzy zewnątrzkomórkowej; wiązany przez liczne receptory błonowe (CD44, HARE, LYVE1) odgrywa kluczową rolę w regulacji migracji komórek (rozwój zarodkowy, angiogeneza) i cyklu komórkowego. **Małe GTP-azy** – monomeryczne białka wiążące GTP. Aktywna GTP-aza ze związanym GTP ma zdolność do aktywowania efektorów, głównie kinaz białkowych (np. PAK, CPK i.in.), dzięki czemu może spełniać w komórce rolę uniwersalnego przełącznika w licznych szlakach sygnałowych. Związane GTP podlega powolnej hydrolizie, co prowadzi do dezaktywacji GTP-azy. Małe GTP-azy są regulowane przez liczne białka grup GAP i GDI. GTP-azy tworzą superrodzinę białek Ras, w której występują trzy rodziny: Rab, Ras (np. R-Ras, Rap) i Rho (np. izoformy Rho, cdc42, Rac). **NHE-RF/EBP50** – białko regulacyjne/adaptor dla wymiennika jonowego  $\text{Na}^+/\text{H}^+ 3$  (NHE3). Łączy NHE3 z innymi białkami, głównie ERM. Proces ten reguluje tworzenie zgrupowań NHE3 w obrębie błony. **PIP<sub>2</sub>** – fosfoinozytolo-2-fosforan.

## 1. WSTĘP

W dziedzicznych zespołach predyspozycji do nowotworzenia, związanych z mutacjami w genach supresorowych, dochodzi z reguły do rozwoju szybko rosnących, złośliwych nowotworów. Taki przebieg ma rozwój siatkówczaka zarodkowego, nowotworów w zespole Li-Fraumeni czy nowotworów związanych z mutacjami genu *p53*. Wśród genów supresorowych wyjątkiem jest gen *NF2*. Mutacje w tym genie prowadzą do rozwoju nowotworów łagodnych i wolno rosnących i są związane z zespołem predyspozycji do nowotworzenia – nerwiakowłókniakowatością typu 2 (ang. *Neurofibromatosis type 2*; NF2). Zasadniczą zmianą w tym zespole jest rozwój nerwiaków osłonkowych tworzonych przez ulegające transformacji komórki Schwanna. Nerwiakowłókniakowatość typu 2 występuje z częstością 1:40000 i rozwija się, gdy

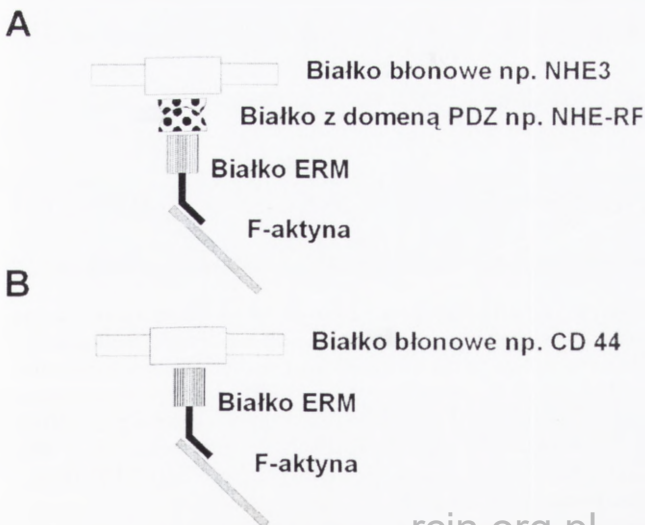
obydwa allele genu *NF2* w komórce są zmutowane. Chory dziedziczy jeden zmutowany allel od rodziców. Do mutacji w drugim allelu dochodzi w komórkach somatycznych.

Produkt genu *NF2*, białko merlina jest, w przeciwieństwie do innych supresorów, białkiem podbłonowym, oddziałującym z cytoszkieletem i białkami błonowymi. Merlina prawdopodobnie bezpośrednio bierze udział zarówno w regulacji cyklu komórkowego, jak i w kształtowaniu struktur cytoszkieletu.

Gen *NF2* zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 22 [37; 48]. Pełna sekwencja (*EMBL ID: HSAY18000*) o długości 126 kb obejmuje 17 eksonów. W wyniku alternatywnego składania pre-mRNA powstaje wiele izoform merliny, z których dwie – I i II wydają się mieć fizjologiczne znaczenie. Izoformy różnią się długością – izoforma I składa się z 595 aminokwasów, a izoforma II z 615. Obie mają wspólny fragment o długości 579 aminokwasów. Produkt genu *NF2* ze względu na wysoką homologię zalicza się do większej grupy białek tzw. ERM, uczestniczących w tworzeniu kompleksów łączących białka błonowe z cytoszkieletem (ryc. 1). W merlinie, podobnie jak w białkach ERM, wyróżnia się trzy domeny o różnej autonomii strukturalnej i funkcjonalnej [3]: N-końcową domenę FERM [4],  $\alpha$ -helikalny łącznik i krótką C-końcową domenę (C-ERMAD) (ryc. 2). Podobieństwo sekwencji aminokwasowej poszczególnych domen białek ERM i merliny jest różne – dla całego białka wynosi 42% i wzrasta dla domeny FERM do 62%. Spośród białek ERM merlina wyróżnia się tworzeniem izoform, posiadaniem dodatkowego 14-aminokwasowego fragmentu na N-końcu [3] i utratą wysoko konserwowanej w grupie ERM domeny wiążącej F-aktynę [49].

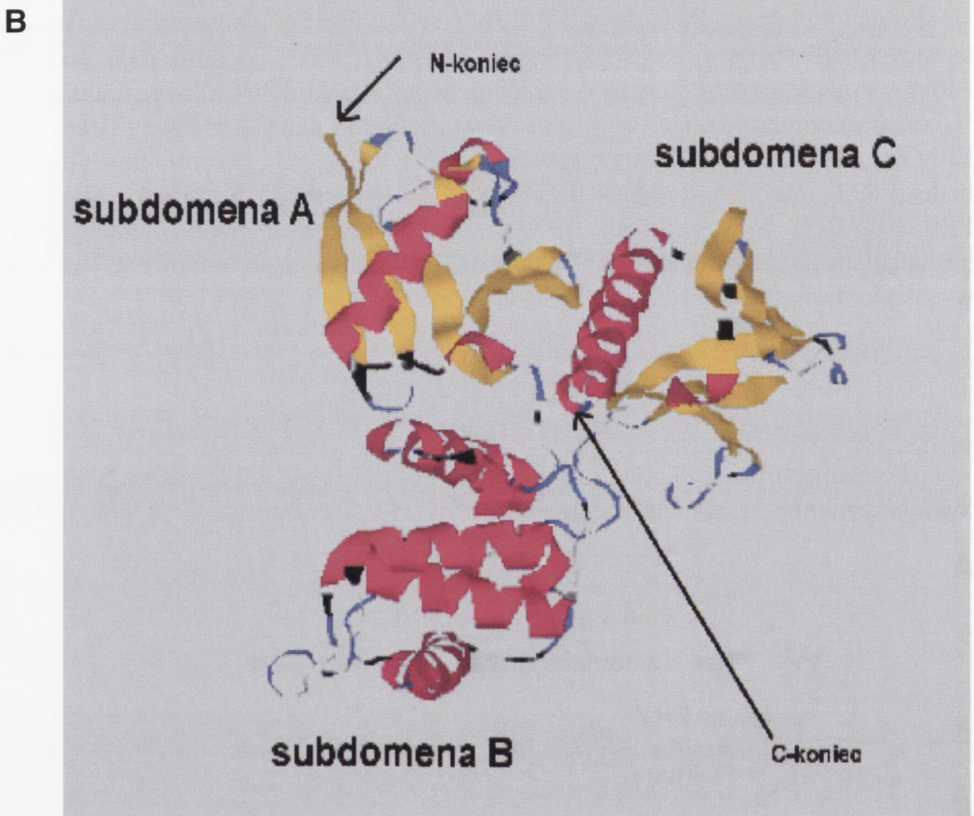
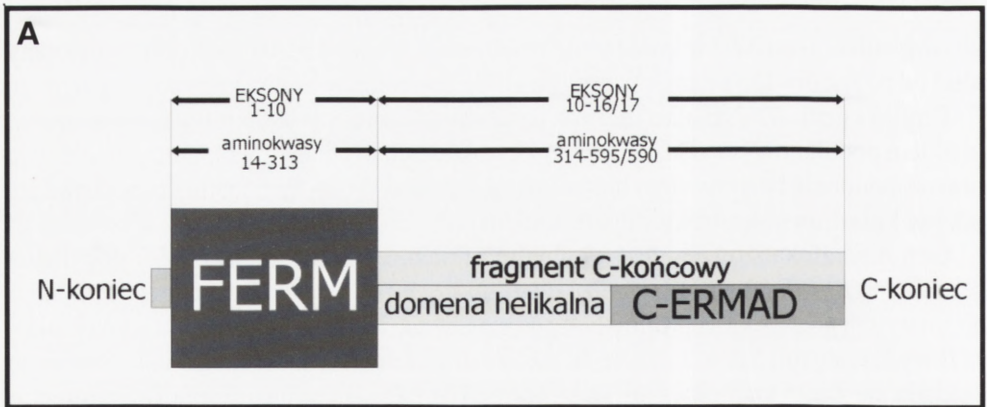
## 2. STRUKTURA MERLINY

Poznanie struktury krystalicznej białka moczyny [34], a później w 2002 roku również struktury krystalicznej domeny FERM (ryc. 2) w merlinie [45], umożliwiło

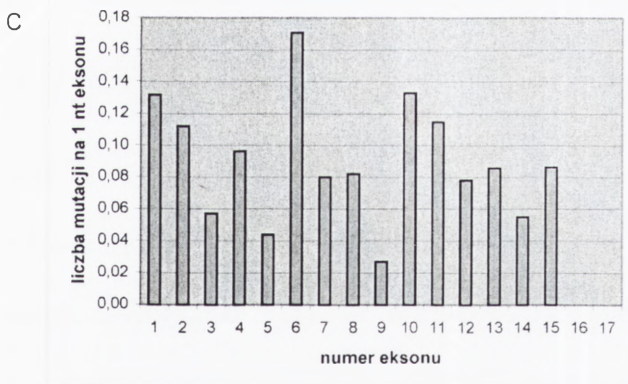
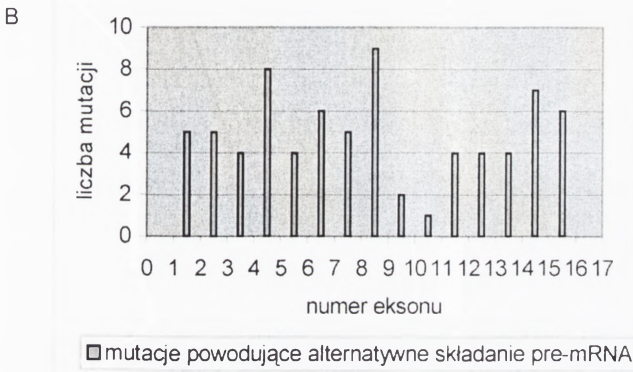
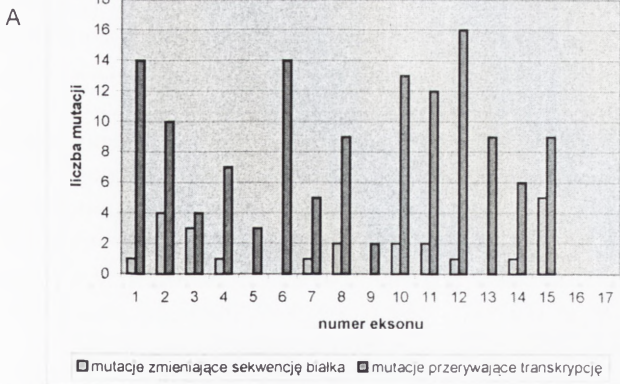


RYCINA 1. Schemat budowy wielocząsteczkowych kompleksów łączących białka błonowe z cytoszkieletem przy współudziale białek ERM: A – w przypadku łączenia pośredniego i B – w przypadku połączenia bezpośredniego





RYCINA 2. Schemat budowy merliny oraz struktura domeny FERM: A – zaznaczono domenę globularną FERM oraz fragment C-końcowy (314-595), w którego skład wchodzi domena helikalna i C-ERMAD. Izoforma I i II merliny powstają w wyniku alternatywnego składania ostatnich dwóch eksonów. Izoforma I zawiera ekson 16, a izoforma II ekson 17. B – globularna struktura FERM, wyraźnie podzielona na subdomeny A, B i C. Kolorami oznaczono struktury II-rzędowe: czerwonym –  $\alpha$ -helikalne, żółtym –  $\beta$ -kartki, kolorem niebieskim oznaczono struktury łączące. Obraz stworzony przy pomocy programu RasMol (<http://www.umass.edu/microbio/rasmol/>) na podstawie koordynatów z bazy PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>) dla struktury krystalicznej PDB ID: 1ISN



RYCINA 3. Zestawienie mutacji występujących u pacjentów spełniających kliniczne kryteria NIH (ang. *National Institute of Health*) dla nerwiakowłókniakowości typu 2. Zestawienie obejmuje 237 mutacji zarejestrowanych w bazie *Neurofibromatosis Research at Massachusetts General Hospital*

(<http://neurosurgery-mgh.harvard.edu/NFclinic/NF-re-search.htm>).

Mutacje zostały podzielone na 3 grupy: *mutacje zmieniające sekwencję aminokwasowe* – substytucje niewprowadzające kordonu stop, insercje i delecje niezmiennające ramki odczytu, *mutacje przerywające transkrypcję* – substytucje wprowadzające kodon stop, delecje i insercje zmieniające ramkę odczytu (wykres A); *mutacje powodujące alternatywne składanie pre-mRNA* – mutacje obejmujące styki ekson/intron, których efektem są zaburzenia redakcji pre-mRNA (wykres B). Wykres C przedstawia względną częstość występowania mutacji w poszczególnych eksonach



zrozumienie zarówno funkcjonowania tej domeny, jak i efektów mutacji w obrębie genu *NF2*. Ustalono bardzo wysoką homologię strukturalną między domeną FERM merliny i białek ERM wyższą, niż mogłoby to wynikać z homologii sekwencji nukleotydowej. Przykładem jest 7-aminokwasowy region *blue box* [23] merliny, który jest strukturalnie niemal identyczny z odpowiadającym mu fragmentem moezyny [45], natomiast nie wykazuje homologii na poziomie sekwencji nukleotydowej. W skład domeny FERM wchodzi 3 subdomeny. Porównanie struktury białek wskazuje na ich duże podobieństwo do popularnych jednostek strukturalnych – subdomeny A do podjednostki ubikwityny, często spotykanej w białkach o różnej funkcji, mających miejsce wiązania Ras; subdomeny B do białka wiążącego CoA; subdomeny C do domeny wiążącej fosfotyrozynę (PHB) lub domeny podobnej do plekstryny (PH) [16; 45]. Największe różnice w stosunku do białek ERM wykazuje subdomena A merliny (region b3A i b4A).

Dotychczasowe próby krystalizacji i określenia struktury C-końcowych domen merliny nie powiodły się. O cechach strukturalnych regionu możemy wnosić na podstawie struktury tego fragmentu w moezynie [34] (nie skryzalizowano całego fragmentu) oraz analizy obrazu mikroskopowego tego białka [17], a także na podstawie struktury krótkiego 33-aminokwasowego fragmentu następującego po domenie FERM [45], który udało się wykrystalizować wraz z tą domeną przy analizie merliny. Fragment C-końcowy jest zbudowany w przeważającej części ze struktur  $\alpha$ -helikalnych, tworzących labilny długi na ok. 22 nm filament [17]. Na C-końcu białka prawdopodobnie występuje mniejsza domena globularna odpowiedzialna za oddziaływanie z domeną FERM.

### 3. MUTACJE W GENIE *NF2*

Rozkład mutacji wzdłuż całego genu *NF2* jest dość równomierny (ryc. 3). Nie zarejestrowano dotąd mutacji w obrębie eksonu 16 i 17. U pacjentów z nerwiakowłókniakowatością typu 2 najczęstsze są mutacje punktowe (70%). Większość (68%) mutacji powoduje przerwanie transkrypcji w miejscu wystąpienia mutacji lub w jej pobliżu. Wyróżnienie w merlinie strukturalnych podjednostek pozwala na przewidywanie efektów mutacji w obrębie genu *NF2*. Efektem mutacji przerywających transkrypcję jest albo brak białka (mutacje w obrębie eksonu 1-10) albo występowanie białka nieprawidłowego, gdy mutacja zajdzie w obrębie któregoś z kolejnych eksonów. Tak zmienione białko będzie miało prawdopodobnie prawidłową domenę FERM i różnie zmieniony fragment C-końcowy [3]. Zwarta, globularna struktura domeny FERM powoduje, iż większość mutacji zmieniających sekwencję białka będzie dotyczyć aminokwasów znajdujących się w obrębie rdzenia tej domeny. Mutacje te zwykle zaburzają jego hydrofobową strukturę prowadząc do całkowitej dezintegracji domeny FERM (mutacje Leu64Pro, D118Phe [3]). Wyjątek stanowi mutacja Val219Met, która nie zaburza struktury FERM. Drugą grupę stanowią mutacje dotyczące aminokwasów powierzchniowych. Postuluje się ich udział w zaburzeniach oddziaływań wewnątrz-cząsteczkowych merliny (Glu106Gly [14]), jak i interakcji z innymi białkami (Met77Val) [32; 45; 46].

## 4. INTERAKCJE WEWNĄTRZCZĄSTECZKOWE MERLINY

Merlina jest zdolna do tworzenia homo- i heterodimerów, jak również do tworzenia trwałych monomerów o zamkniętej strukturze, w której domeny N- i C-końcowe oddziałują ze sobą [12; 33; 43]. Podobne właściwości wykazują białka ERM [17; 26]. Powyższe oddziaływania (głowa-ogon) mają charakter niekowalencyjnych wiązań między domeną FERM a fragmentem C-końcowym i są możliwe przy pełnym wykształceniu struktury obu domen. Kluczową rolę odgrywa tu ostatnie kilkanaście aminokwasów, dlatego też tylko domena C-ERMAD izoformy I merliny jest zdolna do tych oddziaływań [10; 29]. Sugerowana możliwość oddziaływania między fragmentem domeny FERM a domeną C-ERMAD [12], jak również możliwość wiązania się dwóch domen C-końcowych [29] wydają się w świetle badań strukturalnych [45] artefaktem wynikającym ze stosowanych metod badawczych.

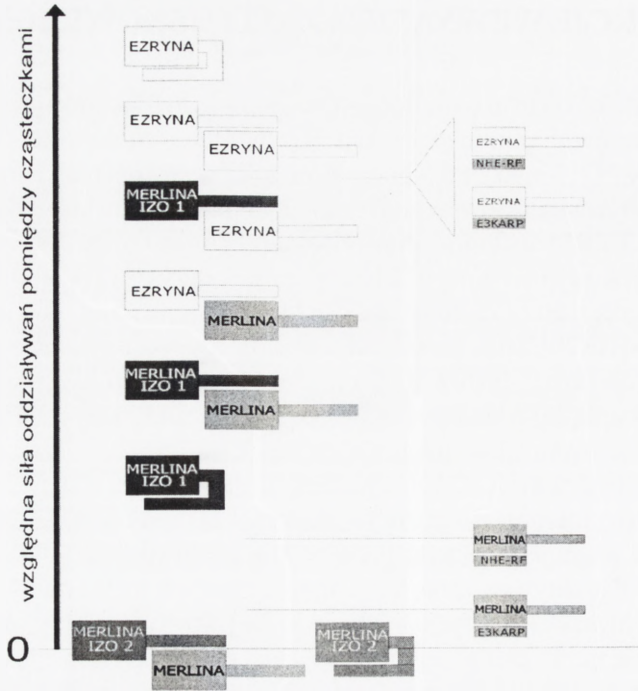
Zdolność do oddziaływań N- i C-końca merliny i białek ERM ma charakter regulacyjny. W formie zamkniętej merliny, związanie się domeny FERM z C-ERMAD prowadzi do zastąpienia miejsc wiązania dla innych białek w obrębie obu domen [10; 13; 40; 51]. W przytaczanym modelu aktywną formą białka merliny jest forma otwarta. Doświadczenia z białkiem adhezyjnym CD44 sugerują jednak, że nie jest to regułą [31] – merlina wiąże się z CD44 w formie zamkniętej. Przejście od struktury otwartej do zamkniętej i odwrotnie jest wyrazem zarówno oddziaływań wewnątrz-cząsteczkowych, jak i między-cząsteczkowych. Dostępność w komórce wolnych domen FERM i C-ERMAD dla różnych oddziaływań będzie zależna od dwóch czynników – stężeń poszczególnych białek w komórce i termodynamicznej stabilności oddziaływań między nimi [33] oraz mechanizmów regulujących oddziaływanie między domenami (ryc. 4).

Zdolność domen FERM i C-ERMAD do wzajemnego oddziaływania jest regulowana przez wiązanie fosfolipidów i fosforylację. W obecności  $PIP_2$  izoforma I merliny przyłącza NHE-RF podobnie jak izoforma II w formie natywnej [10]. Sugeruje to, że  $PIP_2$  łącząc się z domeną FERM tak zmienia jej konformację, że dochodzi do oddysocjowania C-ERMAD. Mechanizm ten dotyczy wszystkich białek ERM [1; 16]. Również fosforylacja seryny 518 [22] i treoniny 352 [41] prowadzi do przejścia w formę otwartą. Szczególnie istotna wydaje się fosforylacja seryny. Merlina jest fosforylowana przez kinazy PAK1-3, będące efektorami małych GTPaz [22]. Być może, tak jak w przypadku białek ERM, zaangażowane są w ten proces również inne kinazy [26].

## 5. MERLINA JAKO SKŁADNIK MACIERZY PODBŁONOWEJ

Badania immunocytochemiczne wskazują wyraźnie na podbłonową lokalizację białek ERM i merliny z preferencją do regionów bogatych w F-aktynę [5; 7; 11; 39; 52], w tym różnego rodzaju lokalnych sfaldowań błony. W białkach ERM zidentyfikowano specyficzną domenę wiążącą aktynę [49], której nie wykryto w merlinie. Merlina wiąże F-aktynę (ale nie G-aktynę) poprzez domenę FERM [2; 6; 18; 51]. Wcześniejsze





RYCINA 4. Schemat wzajemnych oddziaływań merliny, ezryny, NHE-RF i E3KARP. Układ wzdłuż osi pionowej odzwierciedla względną siłę oddziaływań między poszczególnymi białkami i ich domenami. Odległości pomiędzy kompleksami nie są znaczące. Największe powinowactwo wykazują domena FERM i C-ERMAD ezryny. Stosunkowo słabiej wiążą się te domeny między białkami ERM a merliwą. C-końcowa domena izoformy II merliny jest niezdolna do oddziaływań z domeną FERM

TABELA 1. Zestawienie białek, z którymi merlina wzajemnie oddziałuje

Wiązane białko	Wiązany fragment tego białka	Forma uczestnicząca w interakcji	Piśmiennictwo
CD44 β1-integryna	dotąd nie naładowany ogon cytoplazmatyczny bd	zamknięta bd	[31; 39] [54]
EBP50/NHE-RF syntenina paksylina	C-końcowa domena wiążąca ERM PDZ PDZ	otwarta bd bd	[32; 36] [19] [9]
F-aktyna mikrotubule βII-spektryna	- - -	obie konformacje otwarta bd	[18] [51] [55]
HRS białko p110 RhoGDI	bd bd bd	otwarta bd bd	[13] [40] [56]

bd – brak danych

badania wskazywały na istnienie dodatkowych miejsc wiążących aktywną w obrębie FERM białek ERM [38]. Ich rola fizjologiczna w oddziaływaniach ERM jest jednak kwestionowana [24; 25]. Wiele białek, z którymi merlina może się wiązać, wskazuje na to, że może ona spełniać rolę integracyjną zarówno dla oddziaływań cytoszkielet - błona komórkowa, jak i dla szlaków regulacyjnych adhezji komórkowej i proliferacji (tab. 1).

Merlina wykazuje zdolność do bezpośredniego wiązania się z białkami błonowymi. Uważa się, że nietypowe dla białek ERM [53] wiązanie CD44 w formie zamkniętej [31], odgrywa kluczową rolę w zdolności merliny do supresji nowotworzenia. Białka ERM wiążą również inne białka adhezyjne (ICAM, L-selektyna), a sama merlina oddziałuje z  $\beta$ 1-integriną.

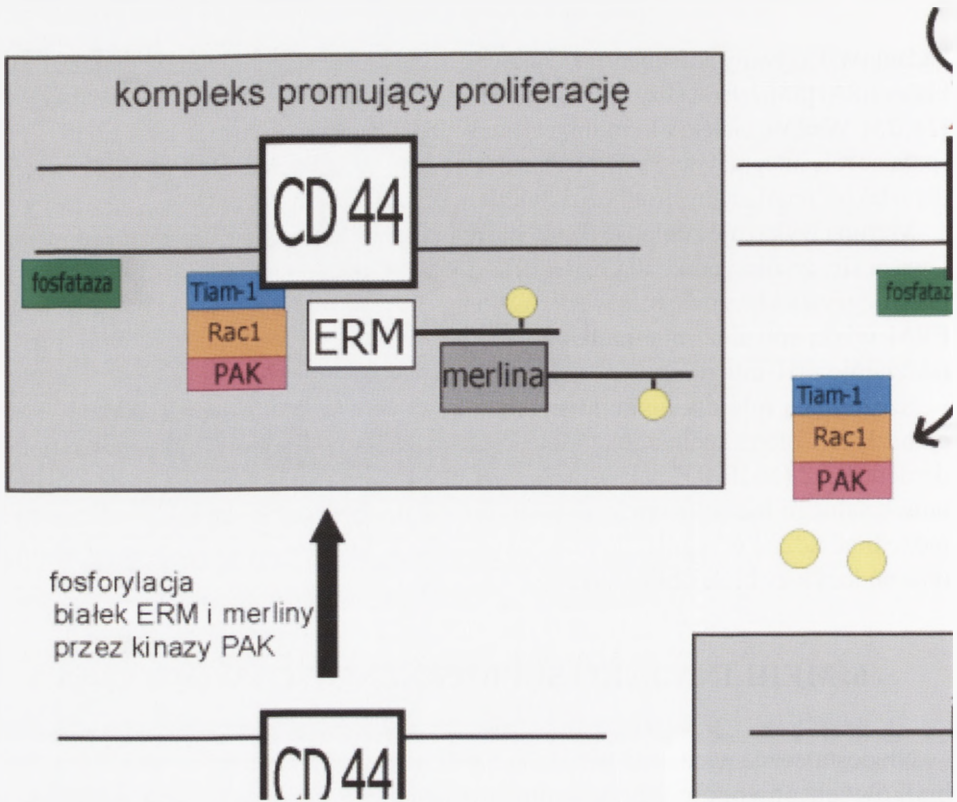
Szczególną rolę dla funkcji merliny jako czynnika integrującego oddziaływania cytoszkielet-błona spełnia jej zdolność do wiązania podbłonowych białek mających domenę PDZ (NHE-RF, paksylina, syntenina) [8; 19; 32; 36]. Białka te spełniają rolę uniwersalnego łącznika wielu składników macierzy. Merlina za ich pośrednictwem może brać udział w regulacji przepływu jonów w komórce przy udziale NHE-3 [50] oraz endocytozy białek błonowych.

## 6. MERLINA JAKO SUPRESOR NOWOTWORZENIA

Niedostateczna wiedza na temat roli merliny w tworzonych przez nią kompleksach białkowych powoduje, że stale nie jest jasne, co determinuje jej supresorowe właściwości. Mutacje w obu allelach genu *NF2* prowadzą do zmian nowotworowych prawdopodobnie we wszystkich tkankach. U chorych z nerwiakowłókniakowością typu 2 spotyka się głównie niezłośliwe nerwiaki osłonkowe, wyściółczaki, oponiaki, natomiast w modelu mysim występują głównie kostniaki mięsakowate, włóknia-komięsaki i gruczolaki hepatocytarne [28]. Wydaje się, że ograniczenie lokalizacji nowotworów u człowieka, związane jest z tkankowo- i miejscowo-specyficzną częstością występowania somatycznej mutacji w tym genie [9; 21]. Należy brać pod uwagę dwa mechanizmy wyjaśniające supresorowe właściwości merliny.

Pierwszy mechanizm opisuje model zakładający uczestnictwo merliny w tworzeniu pętli zwrotnej szlaków sygnałowych małych GTP-az. Merlina jest regulatorem aktywności GTP-az, które bezpośrednio biorą udział w regulacji cyklu komórkowego m.in białko Rac1 reguluje proces transkrypcji i translacji kluczowego dla cyklu komórkowego białka – cykliny D1 [20; 30]. Wyniki badań, w których podobny efekt przywrócenia prawidłowej budowy cytoszkieletu [2; 35] (prawidłowej ruchliwości i zdolności do rozprzestrzeniania [15]) uzyskano wprowadzając do komórek Schwanna merlinę lub znane inhibitory RhoA i Rac-1, sugerują, że merlina może być inhibitorem małych GTPaz. Merlina regulując aktywność małych GTPaz jednocześnie sama podlega regulacji przez te białka, gdyż fosforylacja fragmentu C-końcowego jest zależna od Rac1 [42]. Wiązanie HRS sugeruje, że merlina bierze udział także w innych szlakach sygnałowych. Prawdopodobne jest, że merlina wywiera na cytoszkielet również wpływ bezpośredni, stabilizując końce filamentów aktynowych [18].





RYCINA 5. Model mechanizmu regulacji proliferacji z udziałem merliny i CD44. W komórce mogą powstawać dwa kompleksy białkowe – jeden promujący proliferację i drugi nieaktywny podziałów komórkowych. Powstanie odpowiednich kompleksów jest uwarunkowane fosforylacją i defosforylacją merliny przez odpowiednie enzymy. Fosforylacja katalizowana jest przez kinazy PAK w kompleksie z białkami pomocniczymi/regulatorowymi Tiam1 i Rac1. Fosfataza biorąca udział w procesie przeciwnym jest nieznaną

Najlepiej poznany jest drugi mechanizm – udział merliny w inhibicji kontaktowej. Badania na liniach komórek Schwanna [31] wykazały, że w hodowlach o dużej gęstości dochodzi do defosforylacji merliny. Podobny efekt uzyskano w hodowlach komórkowych w pożywce o podwyższonym stężeniu kwasu hialuronowego. Te same warunki powodowały rozdyssocjowanie kompleksu CD44-ERM-merlina. Wyniki te stały się podstawą do zaproponowania modelu [31; 44], w którym istnieją dwa stany funkcjonalne kompleksów CD44-ERM-merlina (ryc. 5). Kompleks promujący proliferację powstaje, gdy domena receptorowa CD44 pozostaje niezwiązana z ligandem zewnątrzkomórkowym lub gdy przyłącza jakiś nieznaną czynnik aktywujący. Tak zaaktywowany receptor wiąże kompleks białek: Tiam-1, Rac1, i kinazy efektorowej PAK. Dochodzi do fosforylacji ERM oraz merliny i związania ich z CD44. Utworzony konglomerat aktywuje proliferację, prawdopodobnie za pośrednictwem małych GTP-az. Natomiast związanie CD44 z czynnikiem hamującym powoduje oddysocjowanie kompleksu fosforylującego,

związanie fosfatazy i defosforylację ERM i merliny. Merlina w formie zdefosforylowanej wiąże się bezpośrednio z CD44. Wydaje się, że ten kompleks nie jest ogniwem żadnego szlaku informacyjnego, gdyż nieznan jest żaden inny czynnik wiążący merlinę w formie zamkniętej.

Merlina może uczestniczyć w regulacji cyklu komórkowego na różnych poziomach, decydując o lokalizacji receptorów błonowych (także dla czynników wzrostu) przez wiązanie ich z cytoszkieletem, uczestnicząc w zależności od stanu komórki przebudowie cytoszkieletu [27; 47], przekazując sygnał inhibicji kontaktowej do wnętrza komórki, sprzęgając ten sygnał z szlakami małych GTP-az oraz cyklin. Dalsze badania z pewnością doprowadzą do stworzenia zintegrowanego modelu, łączącego opisane mechanizmy i wyjaśniającego udział merliny w tych procesach.

## 7. ZAKOŃCZENIE

Merlina jako produkt genu – supresora nowotworzenia, z pewnością zaangażowana jest w regulację cyklu komórkowego i proliferacji. Jednocześnie jej strukturalne podobieństwo do białek ERM, spełniających rolę łączników między błoną komórkową a cytoszkieletem, sugeruje podobną funkcję merliny. Ponieważ merlina występuje tylko w organizmach wielokomórkowych, można przypuszczać, że wykształcenie odmiennego mechanizmu supresji wiążącego się z integracją sygnałów ważnych dla cyklu komórkowego, dochodzących z zewnątrz i z wnętrza komórki, mogło być związane z przystosowaniem komórek do współistnienia w tkankach.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] BARRET C, OY C, MONTCOURRIER P, MANGEAT P, NIGGLI V. Mutagenesis of the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP(2)) binding site in the NH(2)-terminal domain of ezrin correlates with its altered cellular distribution. *J Cell Biol* 2000; **151**:1067–1080.
- [2] BASHOUR AM, MENG J J, IP W, MACCOLLIN M, RATNER N. The neurofibromatosis type 2 gene product, merlin, reverses the F-actin cytoskeletal defects in primary human Schwannoma cells. *Mol Cell Biol* 2002; **22**:1150–1157.
- [3] BRAULT E, GAUTREAU A, LAMARINE M, CALLEBAUT I, THOMAS G, GOUTEBROZE L. Normal membrane localization and actin association of the NF2 tumor suppressor protein are dependent on folding of its N-terminal domain. *J Cell Sci* 2001; **114**:1901–1912.
- [4] CHISHTI AH, KIM AC, MARFATIA SM, LUTCHMAN M, HANSPAL M, JINDAL H, LIU SC, LOW PS, ROULEAU GA, MOHANDAS N, CHASIS JA, CONBOY JG, GASCARD P, TAKAKUWA Y, HUANG SC, BENZEJ, JR, BRETSCHER A, FEHON RG, GUSELLA JF, RAMESH V, SOLOMON F, MARCHESI VT, TSUKITA S, TSUKITA S, HOOVER KB. The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem Sci* 1998; **23**:281–282.
- [5] DEN BAKKER MA, RIEGMAN PH, HEKMAN RA, BOERSMA W, JANSSEN PJ, VAN DER KWAST TH, ZWARTHOFF EC. The product of the NF2 tumour suppressor gene localizes near the plasma membrane and is highly expressed in muscle cells. *Oncogene* 1995; **10**: 757–763.
- [6] DEN BAKKER MA, RIEGMAN PH, SUURMEIJER AP, VISSERS CJ, SAINIO M, CARPEN O, ZWARTHOFF EC. Evidence for a cytoskeleton attachment domain at the N-terminus of the NF2 protein. *J Neurosci Res* 2000; **62**: 764–771.



- [7] DEN BAKKER MA, TASCILAR M, RIEGMAN PH, HEKMAN AC, BOERSMA W, JANSSEN PJ, DE JONG TA, HENDRIKS W, VAN DER KWAST TH, ZWARTHOF EC. Neurofibromatosis type 2 protein co-localizes with elements of the cytoskeleton. *Am J Pathol* 1995; **147**: 1339–1349.
- [8] FERNANDEZ-VALLE C, TANG Y, RICARD J, RODENAS-RUANO A, TAYLOR A, HACKLER E, BIGGERSTAFF J, IACOVELLI J. Paxillin binds schwannomin and regulates its density-dependent localization and effect on cell morphology. *Nat Genet* 2002; **31**: 354–362.
- [9] GIOVANNINI M, ROBANUS-MAANDAG E, NIWA-KAWAKITA M, VAN DER V, WOODRUFF JM, GOUTEBROZE L, MEREL P, BERNS A, THOMAS G. Schwann cell hyperplasia and tumors in transgenic mice expressing a naturally occurring mutant NF2 protein. *Genes Dev* 1999; **13**: 978–986.
- [10] GONZALEZ-AGOSTI C, WIEDERHOLD T, HERNDON ME, GUSELLA J, RAMESH V. Interdomain interaction of merlin isoforms and its influence on intermolecular binding to NHE-RF. *J Biol Chem* 1999; **274**: 34438–34442.
- [11] GONZALEZ-AGOSTI C, XU L, PINNEY D, BEAUCHAMP R, HOBBS W, GUSELLA J, RAMESH V. The merlin tumor suppressor localizes preferentially in membrane ruffles. *Oncogene* 1996; **13**: 1239–1247.
- [12] GRONHOLM M, SAINIO M, ZHAO F, HEISKA L, VAHERI A, CARPEN O. Homotypic and heterotypic interaction of the neurofibromatosis 2 tumor suppressor protein merlin and the ERM protein ezrin. *J Cell Sci* 1999; **112 ( Pt 6)**: 895–904.
- [13] GUTMANN DH, HAIPEK CA, BURKE SP, SUN CX, SCOLES DR, PULST SM. The NF2 interactor, hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (HRS), associates with merlin in the „open” conformation and suppresses cell growth and motility. *Hum Mol Genet* 2001; **10**: 825–834.
- [14] GUTMANN DH, HIRBE AC, HAIPEK CA. Functional analysis of neurofibromatosis 2 (NF2) missense mutations. *Hum Mol Genet* 2001; **10**: 1519–1529.
- [15] GUTMANN DH, SHERMAN L, SEFTOR L, HAIPEK C, HOANG LU K, HENDRIX M. Increased expression of the NF2 tumor suppressor gene product, merlin, impairs cell motility, adhesion and spreading. *Hum Mol Genet* 1999; **8**: 267–275.
- [16] HAMADA K, SHIMIZU T, MATSUI T, TSUKITA S, HAKOSHIMA T. Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain. *EMBO J* 2000; **19**: 4449–4462.
- [17] ISHIKAWA H, TAMURA A, MATSUI T, SASAKI H, HAKOSHIMA T, TSUKITA S, TSUKITA S. Structural conversion between open and closed forms of radixin: low-angle shadowing electron microscopy. *J Mol Biol* 2001; **310**: 973–978.
- [18] JAMES MF, MANCHANDA N, GONZALEZ-AGOSTI C, HARTWIG JH, RAMESH V. The neurofibromatosis 2 protein product merlin selectively binds F-actin but not G-actin, and stabilizes the filaments through a lateral association. *Biochem J* 2001; **356**: 377–386.
- [19] JANNATIPOUR M, DION P, KHAN S, JINDAL H, FAN X, LAGANIERE J, CHISHTI AH, ROULEAU G A. Schwannomin isoform-1 interacts with syntenin via PDZ domains. *J Biol Chem* 2001; **276**: 33093–33100.
- [20] JOYCE D, BOUZAHZAH B, FU M, ALBANESE C, D’AMICO M, STEER J, KLEIN JU, LEE RJ, SEGALL JE, WESTWICK JK, DER CJ, PESTELL RG. Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *J Biol Chem* 1999; **274**: 25245–25249.
- [21] KALAMARIDES M, NIWA-KAWAKITA M, LEBLOIS H, ABRAMOWSKI V, PERRICAUDET M, JANIN A, THOMAS G, GUTMANN DH, GIOVANNINI M. Nf2 gene inactivation in arachnoidal cells is rate-limiting for meningioma development in the mouse. *Genes Dev* 2002; **16**: 1060–1065.
- [22] KISSIL JL, JOHNSON KC, ECKMAN MS, JACKS T. Merlin phosphorylation by p21-activated kinase 2 and effects of phosphorylation on merlin localization. *J Biol Chem* 2002;
- [23] LAJEUNESSE DR, MCCARTNEY BM, FEHON RG. Structural analysis of *Drosophila* merlin reveals functional domains important for growth control and subcellular localization. *J Cell Biol* 1998; **141**: 1589–1599.
- [24] MANGEAT P, ROY C, MARTIN M. ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell Biol* 1999; **9**: 187–192.
- [25] MANGEAT P, ROY C, MARTIN M. ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics: Authors’ correction. *Trends Cell Biol* 1999; **9**: 289–
- [26] MATSUI T, MAEDA M, DOI Y, YONEMURA S, AMANO M, KAIBUCHI K, TSUKITA S, TSUKITA S. Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J Cell Biol* 1998; **140**: 647–657.

- [27] MAUDSLEY S, ZAMAH AM, RAHMAN N, BLITZER JT, LUTTRELL LM, LEFKOWITZ RJ, HALL RA. Platelet-derived growth factor receptor association with Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger regulatory factor potentiates receptor activity. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 8352–8363.
- [28] MCCLATCHEY AI, SAOTOME I, MERCER K, CROWLEY D, GUSELLA JF, BRONSON RT, JACKS T. Mice heterozygous for a mutation at the Nf2 tumor suppressor locus develop a range of highly metastatic tumors. *Genes Dev* 1998; **12**: 1121–1133.
- [29] MENG JJ, LOWRIE DJ, SUN H, DORSEY E, PELTON PD, BASHOUR AM, GRODEN J, RATNER N, IP W. Interaction between two isoforms of the NF2 tumor suppressor protein, merlin, and between merlin and ezrin, suggests modulation of ERM proteins by merlin. *J Neurosci Res* 2000; **62**: 491–502.
- [30] METTOUCHI A, KLEIN S, GUO W, LOPEZ-LAGO M, LEMICHEZ E, WESTWICK JK, GIANCOTTI FG. Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G(1) phase of the cell cycle. *Mol Cell* 2001; **8**: 115–127.
- [31] MORRISON H, SHERMAN LS, LEGG J, BANINE F, ISACKE C, HAIPEK CA, GUTMANN DH, PONTA H, HERRLICH P. The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44. *Genes Dev* 2001; **15**: 968–980.
- [32] MURTHY A, GONZALEZ-AGOSTI C, CORDERO E, PINNEY D, CANDIA C, SOLOMON F, GUSELLA J, RAMESH V. NHE-RF, a regulatory cofactor for Na<sup>(+)</sup>-H<sup>(+)</sup> exchange, is a common interactor for merlin and ERM (MERM) proteins. *J Biol Chem* 1998; **273**: 1273–1276.
- [33] NGUYEN R, RECZEK D, BRETSCHER A. Hierarchy of merlin and ezrin N- and C-terminal domain interactions in homo- and heterotypic associations and their relationship to binding of scaffolding proteins EBP50 and E3KARP. *J Biol Chem* 2001; **276**: 7621–7629.
- [34] PEARSON MA, RECZEK D, BRETSCHER A, KARPLUS PA. Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell* 2000; **101**: 259–270.
- [35] PELTON PD, SHERMAN LS, RIZVI TA, MARCHIONNI MA, WOOD P, FRIEDMAN RA, RATNER N. Ruffling membrane, stress fiber, cell spreading and proliferation abnormalities in human Schwannoma cells. *Oncogene* 1998; **17**: 2195–2209.
- [36] RECZEK D, BRETSCHER A. The carboxyl-terminal region of EBP50 binds to a site in the amino-terminal domain of ezrin that is masked in the dormant molecule. *J Biol Chem* 1998; **273**: 18452–18458.
- [37] ROULEAU G. A., MEREL P, LUTCHMAN M, SANSON M, ZUCMAN J, MARINEAU C, HOANG-XUAN, K., DEMCZUK S, DESMAZE C, PLOUGASTEL B. Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. *Nature* 1993; **363**: 515–521.
- [38] ROY C, MARTIN M, MANGEAT P. A dual involvement of the amino-terminal domain of ezrin in F- and G-actin binding. *J Biol Chem* 1997; **272**: 20088–20095.
- [39] SAINIO M, ZHAO F, HEISKA L, TURUNEN O, DEN BAKKER M, ZWARTHOF E, LUTCHMAN M, ROULEAU GA, JAASKELAINEN J, VAHERI A, CARPEN O. Neurofibromatosis 2 tumor suppressor protein colocalizes with ezrin and CD44 and associates with actin-containing cytoskeleton. *J Cell Sci* 1997; **110 (Pt 18)**: 2249–2260.
- [40] SCOLES DR, CHEN M, PULST SM. Effects of Nf2 missense mutations on schwannomin interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **290**: 366–374.
- [41] SHAW RJ, MCCLATCHEY AI, JACKS T. Regulation of the neurofibromatosis type 2 tumor suppressor protein, merlin, by adhesion and growth arrest stimuli. *J Biol Chem* 1998; **273**: 7757–7764.
- [42] SHAW RJ, PAEZ JG, CURTO M, YAKTINE A, PRUITT WM, SAOTOME I, O'BRYAN JP, GUPTA V, RATNER N, DER CJ, JACKS T, MCCLATCHEY AI. The Nf2 tumor suppressor, merlin, functions in Rac-dependent signaling. *Dev Cell* 2001; **1**: 63–72.
- [43] SHERMAN L, XU HM, GEIST RT, SAPORITO-IRWIN S, HOWELLS N, PONTA H, HERRLICH P, GUTMANN DH. Interdomain binding mediates tumor growth suppression by the NF2 gene product. *Oncogene* 1997; **15**: 2505–2509.
- [44] SHERMAN LS, GUTMANN DH. Merlin: hanging tumor suppression on the Rac. *Trends Cell Biol* 2001; **11**: 442–444.
- [45] SHIMIZU T, SETO A, MAITA N, HAMADA K, TSUKITA S, TSUKITA, S, HAKOSHIMA, T. Structural basis for neurofibromatosis type 2. Crystal structure of the merlin FERM domain. *J Biol Chem* 2002; **277**: 10332–10336.
- [46] STOKOWSKI RP, COX DR. Functional analysis of the neurofibromatosis type 2 protein by means of disease-causing point mutations. *Am J Hum Genet* 2000; **66**: 873–891.



- [47] TAKEDA T, MCQUISTAN T, ORLANDO RA, FARQUHAR MG. Loss of glomerular foot processes is associated with uncoupling of podocalyxin from the actin cytoskeleton. *J Clin Invest* 2001; **108**: 289–301.
- [48] TROFATTER JA, MACCOLLIN MM, RUTTER JL, MURRELL JR, DUYAO MP, PARRY DM, ELDRIDGE R, KLEY N, MENON AG, PULASKI K. A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell* 1993; **75**: 826–
- [49] TURUNEN O, WAHLSTROM T, VAHERI A. Ezrin has a COOH-terminal actin-binding site that is conserved in the ezrin protein family. *J Cell Biol* 1994; **126**: 1445–1453.
- [50] WEINMAN EJ, SHENOLIKAR S. The Na-H exchanger regulatory factor. *Exp Nephrol* 1997; **5**: 449–452.
- [51] XU HM, GUTMANN DH. Merlin differentially associates with the microtubule and actin cytoskeleton. *J Neurosci Res* 1998; **51**: 403–415.
- [52] XU L, GONZALEZ-AGOSTI C, BEAUCHAMP R, PINNEY D, STERNER C, RAMESH V. Analysis of molecular domains of epitope-tagged merlin isoforms in Cos-7 cells and primary rat Schwann cells. *Exp Cell Res* 1998; **238**: 231–240.
- [53] YONEMURA S, HIRAO M, DOI Y, TAKAHASHI N, KONDO T, TSUKITA S, TSUKITA S. Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J Cell Biol* 1998; **140**: 885–895.
- [54] OBREMSKI VJ, HALL AM, FERNANDEZ-VALLE C. Merlin, the neurofibromatosis type 2 gene product, and beta1 integrin associate in isolated and differentiating Schwann cells. *J Neurobiol* 1998; **37**: 487–501.
- [55] SCOLES DR, HUYNH DP, MORCOS PA, COULSELL ER, ROBINSON NG, TAMANOI F, PULST SM. Neurofibromatosis 2 tumour suppressor schwannomin interacts with betaII-spectrin. *Nat Genet* 1998; **18**: 354–359.
- [56] MAEDA M, MATSUI T, IMAMURA M, TSUKITA S, TSUKITA S. Expression level, subcellular distribution and rho-GDI binding affinity of merlin in comparison with Ezrin/Radixin/Moesin proteins. *Oncogene* 1999; **18**: 4788–4797.

Redaktor prowadzący – B. Kamińska-Kaczmarek

Otrzymano: 10.08.2003 r.

Przyjęto: 26.11.2003 r.

ul. Kasprzaka 17a, 01-211 Warszawa

email: [aspotocka@hotmail.com](mailto:aspotocka@hotmail.com)

## FIZJOLOGICZNA I MOLEKULARNA ODPOWIEDŹ ROŚLINY NA STRES DEHYDRATACYJNY

### PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR PLANT RESPONSE TO DEHYDRATION STRESS

Izabela PAWŁOWICZ

Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu

*Streszczenie:* Dehydratacja komórek jest następstwem występowania w środowisku takich czynników abiotycznych, jak: susza, wysokie zasolenie gleby oraz niska temperatura. W odpowiedzi w roślinie zachodzi szereg zmian na poziomie fizjologicznym oraz molekularnym. Następuje synteza różnego rodzaju związków organicznych, określanych jako substancje kompatybilne, które obniżając potencjał wody zapobiegają jej wypływowi z komórki, a także pełnią funkcje ochronne dla białek i błon. Należą do nich rozpuszczalne cukry, niektóre aminokwasy, kwasy organiczne oraz osmoprotektanty i białka protekcyjne. Dostosowanie metaboliczne do warunków stresu jest również związane ze zmianami w ekspresji wielu genów. Geny te kodują białka enzymatyczne należące do różnych szlaków metabolicznych (desaturazy, glukozylotransferazę, dysmutazę ponadtlenkową, MAP kinazy), białka hydrofilowe (dehydriny, osmotyny), a także czynniki transkrypcyjne oddziałujące ze specyficznymi sekwencjami regulatorowymi w promotorach genów transkrybowanych podczas stresu. Wyróżnia się cztery główne kaskady regulacji ekspresji genów: dwa szlaki ABA-zależne oraz dwa ABA-niezależne. Podczas suszy aktywowane są obydwie rodzaje, a pod wpływem niskiej temperatury uruchamiana jest tylko kaskada ABA-niezależna.

*Słowa kluczowe:* dehydratacja, substancje kompatybilne, białka hydrofilowe, szlak ABA-zależny i ABA-niezależny.

*Summary:* Cellular dehydration is caused by abiotic factors like drought, high salinity and low temperature. Plants respond to stress with many changes at physiological and molecular level. They accumulate compatible solutes, among them non-reducing sugars, some amino acids, organic acids, osmoprotectants and protective polypeptides. These substances prevent water efflux outside the cell by reducing its chemical potential. Metabolic adjustment to stress involves changes in number genes expression. They encode enzymatic polypeptides involved in different metabolic pathways (desaturases, glucosyl transferase, superoxide dismutase, MAP kinases), hydrophylic proteins (dehydrins, osmotins), and also regulatory elements which interact with transcriptional activators found in promoters of genes transcribed under stress conditions. It is proposed that four signal transduction pathways function under cell dehydration: two ABA-independent and two ABA-dependent. ABA-independent cascade is activated by cold whereas by drought both of them.



*Key words:* dehydration, compatible solutes, hydrophilic polypeptides, ABA-dependent and ABA-independent pathways.

## WPROWADZENIE

Reakcja rośliny na różnego rodzaju niekorzystne czynniki środowiska jest bardzo złożona. W początkowej fazie odpowiedzi na stres następuje ograniczenie lub zahamowanie wzrostu i rozwoju rośliny, po czym rozpoczyna się etap dostosowania metabolizmu komórkowego do warunków stresu i kontynuowanie wzrostu. Dostosowanie to jest związane z syntezą nowych makrocząsteczek, a także ze zmianami w ekspresji dużej liczby genów, których produkty białkowe pełnią funkcje ochronne dla struktur komórkowych, membran oraz białek [69]. Pewne polipeptydy są gromadzone w komórkach pod wpływem różnych stresów, inne natomiast wykazują specyficzność dla określonego bodźca zewnętrznego. Pomimo że liczne czynniki stresowe mogą wywoływać charakterystyczną dla siebie reakcję, mechanizmy obronne wykształcone przez rośliny mają wiele elementów wspólnych. Różne gatunki roślin mogą wykorzystywać te same mechanizmy percepcji sygnałów pochodzących ze środowiska zewnętrznego oraz ich przekazywania do komórek, ale końcowa odpowiedź rośliny może być odmienna w zależności od rodzaju czynnika zewnętrznego. Mówimy tu o tzw. „*cross-talk*”, czyli krzyżowaniu się dróg, którymi biegą szlaki sygnalizacyjne [39].

Stres dehydratacyjny może być spowodowany suszą, wysokim zasoleniem lub chłodem. Niezależnie, który rodzaj stresu wystąpi, w roślinie zachodzą podobne zmiany na poziomie fizjologicznym oraz molekularnym. Następstwem niedoboru wody jest redukcja wydajności fotosyntezy i zahamowanie wzrostu. Kurczenie się komórek prowadzi do zmiany oddziaływań pomiędzy ścianą komórkową a błoną komórkową (plazmalemą), czego wynikiem może być utrata selektywnych właściwości plazmalemy w stosunku do jonów i małych cząsteczek [41]. Zwiększenie stężenia soli i kwasów organicznych w protopląście jest przyczyną denaturacji białek i inaktywacji enzymów. W odpowiedzi rośliny gromadzą różnego rodzaju związki organiczne, określane jako substancje kompatybilne, które obniżając potencjał wody zapobiegają jej wypływowi z komórki, a także pełnią funkcje ochronne dla białek i błon. Należą do nich cukry rozpuszczalne, niektóre aminokwasy, kwasy organiczne oraz osmoprotektanty i białka protekcyjne [28,71].

Wiele zmian w metabolizmie komórkowym prowadzących do zachowania równowagi osmotycznej między komórką a środowiskiem zewnętrznym jest wynikiem zmian w ekspresji genów. Większość z wyizolowanych dotychczas genów, których poziom ekspresji wzrasta pod wpływem stresu, jest wspólnych dla wszystkich trzech wyżej wymienionych czynników powodujących dehydratację komórek [59]. Zidentyfikowane geny kodują między innymi różnego rodzaju białka hydrofilowe (dehidryny, osmotyny), białka enzymatyczne należące do różnych szlaków metabolicznych (desaturazy, glukozylotransferazę, dysmutazę ponadtlenkową, MAP kinazy) oraz czynniki transkrypcyjne oddziałujące ze specyficznymi sekwencjami regulatorowymi w promotorach genów transkrybowanych podczas stresu [11,24,25].

## 1. ZMIANY FIZJOLOGICZNE WYWOŁANE DEHYDRACJĄ KOMÓREK

Utrata wody jest dla rośliny procesem wysoce niekorzystnym. Stan silnego odwodnienia komórek utrzymujący się przez dłuższy czas prowadzi do śmierci rośliny. Stres dehydracyjny powstaje w wyniku działania na roślinę takich czynników abiotycznych, jak: susza, wysokie zasolenie gleby oraz niska temperatura. Wypływ wody z komórek jest następstwem zaburzeń równowagi osmotycznej między środowiskiem wewnątrzkomórkowym a zewnętrznym. Podczas suszy odwodnienie komórek jest spowodowane obniżoną dostępnością wody dla roślin na skutek jej niedoboru w środowisku, natomiast wysokie zasolenie gleby powoduje zwiększenie sił wiążących wodę w podłożu [41]. Ponieważ w warunkach suszy i zasolenia woda zawarta w tkankach charakteryzuje się wyższym potencjałem chemicznym, przemieszcza się zgodnie z prawami dyfuzji na zewnątrz komórki. W przypadku stresu wywołanego niską temperaturą odwodnienie jest procesem wtórnym, spowodowanym pozakomórkową krystalizacją wody w temperaturach zamarzania [72].

W następstwie dehydratacji roślina traci turgor, następuje zahamowanie podziałów mitotycznych komórek oraz zamknięcie aparatów szparkowych [6,9,43]. Uszkodzenia komórek są przede wszystkim wynikiem dezorganizacji protoplazmy. Wraz z utratą wody komórki zaczynają kurczyć się, co powoduje zmianę oddziaływań między ścianą komórkową a błoną komórkową (plazmalemą). Powstające naprężenia mogą prowadzić do uszkodzenia plazmalemy lub do zmian jej właściwości, np. do otwarcia kanałów jonowych zależnych od naprężenia [41]. Gdy zawartość wody w komórce spadnie do około 20% jej początkowej wartości, może nastąpić przejście dwuwarstwowej struktury lipidowej błony w fazę heksagonalną II [64,73]. Jej powstanie jest nieodwracalne i szczególnie niebezpieczne dla funkcjonowania komórek, gdyż modyfikacjom może ulec położenie lub konformacja białek błonowych. Obecność układów heksagonalnych powoduje tworzenie się w błonie kanałów, przez które woda swobodnie wypływa do środowiska pozakomórkowego. Następuje również utrata selektywnych właściwości plazmalemy w stosunku do jonów i małych cząsteczek [41]. Wynikające z dehydratacji zwiększenie stężenia soli i kwasów organicznych w protoplazmie może prowadzić do denaturacji białek i inaktywacji enzymów.

Zapobieganie utracie wody przez roślinę zachodzi na skutek procesów, które obejmują przebudowę struktur komórkowych oraz dostosowanie osmotyczne do warunków stresu. Następuje wzrost płynności membran przez zwiększenie udziału w ich składzie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, głównie dzięki wzmożonej ekspresji genów kodujących desaturazy kwasów tłuszczowych [68]. Zmiany w komponentach lipidowych błon powodują obniżenie temperatury, w której tworzą się układy heksagonalne. Ponadto, roślina akumuluje różnego rodzaju substancje, które wiążą wodę w komórkach. Ich obecność w cytoplazmie powoduje obniżenie potencjału wodnego, co umożliwia komórkom pobieranie wody z otoczenia. Do substancji tych należą niskocząsteczkowe związki organiczne, takie jak: cukry nieredukujące (sacharoza i trehaloza), oligo-



sacharydy, niektóre aminokwasy (prolina, seryna) oraz czwartorzędowe aminy (betainy) [53,58,71]. Pełnią one dodatkowo funkcję krioprotekcyjną, która polega na ochronie struktur komórkowych w warunkach niskich temperatur, a po nagromadzeniu w komórkach w wyższych stężeniach (rzędu milimoli) działają jako osmoregulanty. Do głównych osmotitów należy prolina i glicynobetaina, jak również poliole (glicerol, sorbitol, mannitol). Przykładowo, w ziemniakach prolina jest akumulowana zarówno w cytozolu, jak i w plastydach w stężeniu powyżej 100 mM [10]. Substancje osmotycznie czynne oraz białka stresowe stabilizują inne białka komórkowe oraz membrany podczas stresu. W odpowiedzi na stres dehydracyjny następuje w komórkach również synteza hormonów stresowych, takich jak: etylen [17], kwas abscysynowy (ABA) [44] oraz kwas jasmonowy [20,34]. Są one zaangażowane (zwłaszcza ABA) w regulację ekspresji genów indukowanych podczas odwodnienia komórek.

### 1.1. Stres suszy

Podczas suszy spowodowanej niedoborem wody w glebie następuje obniżenie potencjału wodnego oraz aktywności wody komórkowej, w wyniku czego wypływa ona z komórek do przestrzeni międzykomórkowych, a następnie na zewnątrz rośliny. Następuje zmniejszanie się objętości komórek, przez co w cytoplazmie wzrasta stężenie związków mało- i wielkocząsteczkowych oraz soli i jonów. Częstsze oddziaływania między cząsteczkami mogą prowadzić do denaturacji białek oraz fuzji błon. Wysokie stężenie jonów może również niekorzystnie wpływać na różne struktury komórkowe, głównie chloroplasty oraz na białka i membrany i prowadzić do zaburzeń w metabolizmie. Przetrawanie przez roślinę okresów silnego odwodnienia tkanek związane jest z syntezą znacznych ilości nieredukujących dwu- i oligosacharydów, substancji kompatybilnych, a także specyficznych białek, takich jak: LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) [13,31] i HSP [76].

Utrata przez roślinę ponad 50% zawartości wody nazywana jest desykcją [41]. Wiele gatunków ma zdolność pozostawania w stanie ożywionym nawet przy znacznie bardziej zaawansowanej dehydratacji tkanek. Przechodzą one wtedy w stan anhidrobiozy [14], który polega na niemalże całkowitym zahamowaniu metabolizmu oraz redukcji procesów oddechowych. Rośliny rezurekcyjne, takie jak *Craterostigma plantagineum*, przeżywają odwodnienie tkanek sięgające aż 98% [23]. Mechanizmy nadające roślinom tolerancję na suszę polegają na stabilizacji struktur komórkowych przez ich preferencyjne uwodnienie, natomiast tolerowanie desykcji wymaga zastąpienia cząsteczek wody przez inne cząsteczki, które również w odpowiednich warunkach tworzą wiązania wodorowe [28]. Związki, takie jak: prolina, glutaminian, glicynobetaina, kamityna, mannitol, sorbitol, fruktany, poliole, sacharoza i oligosacharydy, mogą zapobiegać interakcjom między makrocząsteczkami prowadzącym do utraty ich funkcji. Są one usuwane z powierzchni białek, przez co polipeptydy te pozostają uwodnione [3]. Gdy zawartość wody w komórkach spadnie poniżej współczynnika 0,3 (ilości wody przypadającej na gram suchej masy), większość substancji kompatybilnych traci zdolność stabilizacji białek i błon komórkowych. Funkcję tę zachowują

jedynie cukry, które podczas rehydratacji są ponownie zastępowane przez cząsteczki wody [28].

Białka hydrofilowe LEA, których główną frakcją stanowią dehidryny, są gromadzone w cytoplazmie, jądrze komórkowym i chloroplastach. Ich funkcją jest między innymi sekwestracja jonów (usuwanie nadmiaru jonów) oraz tworzenie wiązań wodorowych podczas braku cząsteczek wody [12,15]. Bardzo duża ilość reszt polarnych w ich strukturze pozwala niektórym białkom LEA otaczać makrocząsteczki kohezyjną warstwą wodną. Podczas postępującego odwodnienia tkanek reszty hydroksylowe białek LEA oddziałują zamiast wody z grupami powierzchniowymi innych białek, prowadząc do zachowania ich struktury i funkcji.

Niskocząsteczkowe białka HSP (rodzina HSP70 i HSP100) [76] mogą działać jako białka opiekuńcze podczas odwadniania nasion oraz w początkowej fazie rehydratacji. Białka szoku termicznego dostosowują stan zwinięcia białek (zwinięty bądź rozwinięty) do warunków stresu i ten sposób minimalizują agregację białek, które utraciły prawidłową strukturę lub kierują je do degradacji [21].

## 1.2. Stres solny

Główną przyczyną stresu solnego jest akumulowanie w glebie wysokich stężeń chlorku sodu. Nadmiar jonów  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  zaburza gospodarkę jonową w roślinie, gdyż hamuje pobieranie innych jonów, zwłaszcza  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{K}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  [50]. Nadmiar  $\text{Na}^+$  może zatem doprowadzić w roślinie do deficytu potasu lub wapnia. Podczas zbyt dużego zasolenia obserwowane są zakłócenia w transporcie nie tylko jonów, ale również niektórych metabolitów. Następuje gwałtowny wzrost w komórkach poziomu kwasu abscysynowego i zamykanie aparatów szparkowych, co ogranicza transpirację, ale jednocześnie obniża wydajność fotosyntezy i prowadzi do wzrostu ilości reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*) [27]. Obecność podwyższonego stężenia jonów w podłożu sprawia, iż roślina nie może swobodnie pobierać wody, ponieważ zwiększają się siły osmotyczne utrzymujące ją w glebie. Stresowi jonowemu towarzyszy stres osmotyczny, a często także hipoksja, czyli stres związany z niedoborem tlenu w podłożu [41]. Z powodu niedostatecznej ilości wody w roślinie następuje utrata turgoru i wstrzymanie elongacyjnego wzrostu komórek. Ustaje również wzrost korzeni, co jest dodatkową przyczyną ograniczonego pobierania wody. Zachodzą zmiany we właściwościach błon i ich dezorganizacja. Szczególnie wrażliwy na nadmiar soli w podłożu jest proces glikolizy oraz cykl kwasów trójkarboksylowych [41]. Ponadto, roślina przestaje asymilować azot, czego następstwem jest nieprawidłowy metabolizm białek. Jony nagromadzone w glebie w wysokim stężeniu oddziałując z cząsteczkami wody zmieniają jej stan fizyczny, jak również powodują zmianę oddziaływań wody ze strukturami komórkowymi, błonami i białkami. Są to oddziaływania dwojako typu, kosmotropowe i chaotropowe. Pierwsze z nich sprzyjają przejściu fazowemu błon w komórkach, które uległy dehydratacji, natomiast oddziaływania chaotropowe powodują destabilizację białek oraz preferencyjne tworzenie się w membranach struktury micelarnej zamiast warstwowej [41].



Tolerowaniu nadmiernego zasolenia towarzyszy osmoregulacja, która polega na obniżeniu potencjału osmotycznego soku wakuolarnego komórek na skutek akumulacji soli i małowcząsteczkowych substancji organicznych, takich jak: prolina, glicyna, betaina. Gromadzenie soli w wakuoli chroni cytoplazmę i organelle, głównie chloroplasty i mitochondria, przed negatywnymi skutkami stresu solnego. Substancje kompatybilne pozwalają utrzymać równowagę osmotyczną między cytoplazmą a wakuolą, w której akumulowane są sole [8]. Po kilku godzinach od zadziałania bodźca następuje synteza osmotyn [84], która jest zależna od stałej obecności kwasu abscysynowego w komórkach. ABA indukuje ekspresję określonych genów, które regulują procesy prowadzące do tolerowania nadmiernego zasolenia.

### 1.3. Stres niskich temperatur

Stres chłodu powstaje po obniżeniu się temperatury otoczenia do około zera stopni Celsjusza [48], natomiast przy spadku temperatury poniżej zera mówimy o stresie mrozu. W tych dwóch zakresach niskich temperatur rośliny podlegają odmiennym uszkodzeniom. Pierwotną reakcją rośliny na chłód, podobnie jak na stres wodny i solny jest zahamowanie wzrostu i rozwoju. Gdy temperatura osiągnie wartości ujemne, woda uwalniana z komórek zaczyna krystalizować w przestrzeniach międzykomórkowych i między ścianą komórkową a protoplastem tworząc lód. Po dalszym spadku temperatury następuje krystalizacja treści komórkowej i powstają trwałe uszkodzenia struktur komórkowych [63,72, 83].

Ze względu na stopień odporności na niskie temperatury rośliny można podzielić na trzy grupy: rośliny wrażliwe na chłód, rośliny odporne na chłód, ale wrażliwe na zamarzanie oraz rośliny tolerujące zamarzanie. Do pierwszej z nich należą te gatunki, których struktury komórkowe ulegają uszkodzeniom już pod wpływem chłodu. Temperaturą letalną dla roślin wrażliwych na chłód są niskie temperatury dodatnie w przedziale od 4 do 15°C. Do tej grupy należy większość gatunków roślin zielnych i drzewiastych klimatu gorącego oraz niektóre grzyby i glony zasiedlające ciepłe wody oceanów.

Gatunki wrażliwe na zamarzanie, ale tolerujące chłód wykształciły mechanizmy, które pozwalają im przetrwać okresowe obniżenie temperatury do punktu krystalizacji wody w komórkach. Są to glony rosnące w chłodnych wodach oceanów, niektóre glony wód słodkich, drzewa strefy tropikalnej i subtropikalnej oraz niektóre gatunki roślin klimatu umiarkowanego. Natomiast rośliny niewrażliwe na zamarzanie to takie, które znoszą temperatury zamarzania, a po ekspozycji na chłód (tj. w temperaturach nieco powyżej zera) ich odporność na zamarzanie wzrasta. Zdolność do zwiększania odporności na mróz podczas ekspozycji na chłód jest określana jako aklimatyzacja lub hartowanie. Po okresie aklimatyzacji rośliny mogą kontynuować wzrost. Do tej grupy można zaliczyć niektóre słodkowodne glony ze strefy pływów, glony żyjące na lądzie, mchy oraz dwu- i wieloletnie rośliny lądowe zasiedlające obszary, gdzie występują mroźne zimy.

Rodzaje uszkodzeń spowodowane działaniem niskiej temperatury zależą od wartości, jakie ona osiąga oraz tempa jej spadku. Szczególnie destrukcyjne działanie mają nagłe

spadki temperatury, gdyż wywołują one tzw. szok termiczny. Najbardziej wrażliwy na działanie niskich temperatur jest aparat fotosyntetyczny. Fotosystem II (PSII) przede wszystkim ulega uszkodzeniom, które pogłębiają się, gdy niskiej temperaturze towarzyszy silne naświetlenie. Następuje wówczas fotoinhibicja fotosyntezy [4] spowodowana nadmiarem ilości energii świetlnej wzbudzonej w LHCII w stosunku do zapotrzebowania na jej ilość w warunkach stresowych. Najdłużej prawidłową strukturę zachowują plazmalemma i tonoplast. Dodatkowe uszkodzenia pod wpływem niskiej temperatury może spowodować powstający stres oksydacyjny wywołany nadmiarem ilości energii świetlnej wzbudzonej w chloroplastach. Zapobieganie tworzeniu się w komórce wysokiego stężenia reaktywnych form tlenu jest ważnym elementem zwiększania tolerancji na stres. Następuje ono w wyniku wzrostu wydajności systemu antyoksydacyjnego, który obejmuje antyoksydanty komórkowe (kwas askorbinowy, glutation,  $\beta$ -karoten) i enzymy szlaku oksydacyjnego, do których należą dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT), reduktaza dehydroaskorbinianowa (Dha-Red), peroksydaza askorbinianowa (Asp-Px) i reduktaza glutationowa (GR) [40].

Wzrost odporności komórek na stres pod wpływem niskich temperatur następuje głównie w wyniku przebudowy membran komórkowych, tzn. zwiększenia udziału nienasyconych kwasów tłuszczowych (głównie kwasu linolowego) [28] w fosfo- i galaktolipidach oraz akumulacji takich lipidów, jak fosfatydyloetanolina lub fosfatydylocholina. Szczególnie istotnym elementem systemu ochrony chloroplastów przed uszkodzeniami fotooksydacyjnymi jest zwiększenie w nich udziału chinonów i  $\alpha$ -tokoferolu [22].

## 2. ZJAWISKO AKLIMATYZACJI (HARTOWANIA) DO NISKICH TEMPERATUR

Zwiększenie tolerancji roślin na niskie temperatury następuje podczas ich ekspozycji na działanie temperatur nieco powyżej zera [30,45,72]. W tym czasie zachodzą zmiany strukturalne w membranach i ścianie komórkowej, a także metaboliczne i osmotyczne dostosowanie wzrostu i rozwoju do warunków stresu. Rośliny stają się bardziej odporne na działanie temperatur zamarzania na skutek wytworzenia się tzw. indukowanej tolerancji [19], która polega na tym, iż krótkotrwałe działanie stresu o umiarkowanym natężeniu powoduje wzrost tolerancji na późniejszą, wyższą dawkę tego samego stresu. Bodziec o wyższej sile działający przed zahartowaniem byłby dla organizmu letalny. Co więcej, rośliny eksponowane na działanie łagodnego stresu jednego rodzaju, uzyskują tolerancję nie tylko na większą dawkę tego samego stresu, ale również na szok wywołany przez inny czynnik stresogenny. Roślina hartowana w chłodzie będzie tolerowała znacznie większe odwodnienie komórek niż roślina nieaklimatyzowana. Zwiększenie tolerancji rośliny poddanej działaniu jednego stresu środowiskowego na inne stresy jest wynikiem działania zjawiska, tzw. „*cross-protection*” [19].



Hartowanie w chłodzie wiąże się ze zmianami ekspresji wielu genów kodujących białka o różnych funkcjach, poczynając od cząsteczek sygnałowych, poprzez czynniki transkrypcyjne uruchamiające ekspresję kolejnych genów, których produkty ekspresji zabezpieczają struktury komórkowe podczas stresu [70]. Ekspresja dużej grupy genów podczas stresu jest regulowana przez hormony roślinne, głównie kwas abscysynowy (ABA) i etylen [41,80].

### 3. GENY COR

Jedną z zasadniczych zmian, jakie zachodzą w komórkach podczas dehydratacji, jest zwiększenie poziomu białek stresowych. Geny kodujące takie białka są określane jako COR/LTI/CAS/RD/ATP (ang. *cold-regulated genes, low-temperature induced, cold acclimation specific, responsive to desiccation, anti-freeze proteins*) [70,75,77]. Poziom ekspresji genów COR (ang. *cold regulated genes*) ulega wyraźnemu zwiększeniu w odpowiedzi na deficyt wody spowodowany zarówno przez chłód, suszę, jak i zasolenie. Większość z nich koduje białka hydrofilowe niemające aktywności enzymatycznej. Najliczniejszą grupę stanowią dehydryny, które najprawdopodobniej pełnią funkcje krioprotekcyjne. Jednym z białek dehydrynowych, którego rola została poznana, jest białko COR15a [46,61] zidentyfikowane u *Arabidopsis thaliana* w stromie chloroplastów. Jak wykazano, jego funkcja polega na obniżaniu temperatury przechodzenia dwuwarstwowej fazy lipidowej błon w fazę heksagonalną II [65]. Zwiększony poziom tego białka pod wpływem chłodu u *Arabidopsis thaliana* powoduje wzrost tolerancji na zamarzanie wewnętrznej błony chloroplastów i protoplastów w przedziale temperatur od  $-4$  do  $-6^{\circ}\text{C}$  [5,65]. Jak wynika z doniesień literaturowych, zwiększony udział w komórkach roślin transgenicznych produktów genów COR prowadzi do zwiększenia odporności na temperatury zamarzania roślin, które nie były wcześniej aklimatyzowane [32].

Geny COR można podzielić na trzy grupy w zależności od specyfiki ich ekspresji:

- 1 – geny indukowane pod wpływem suszy i niskiej temperatury (ang. *drought and cold-inducible genes*),
- 2 – geny specyficznie indukowane przez niską temperaturę (ang. *cold-specific inducible genes*),
- 3 – geny specyficznie indukowane przez suszę (ang. *drought-specific inducible genes*).

## 4. REGULACJA EKSPRESJI GENÓW INDUKOWANYCH POD WPLYWEM DEHYDRACJI – DROGI TRANSDUKCJI SYGNAŁU

Biorąc pod uwagę fakt, że duża liczba tych samych genów jest indukowana zarówno pod wpływem wysokiego zasolenia, suszy, jak i niskiej temperatury, inne natomiast są aktywowane specyficznie przez jeden z tych czynników, można przypuszczać, że istnieje kilka szlaków transdukcji sygnału dla stresu dehydracyjnego. Drogi te mogą się ze sobą krzyżować lub przebiegać niezależnie i uruchamiać odmienne mechanizmy obronne rośliny. Z danych wielu autorów wynika, że większość genów indukowanych chłodem jest także uruchamiana przez suszę. Istotną rolę w odpowiedzi na stresy dehydracyjne pełni ABA, stąd wyodrębnia się cztery główne kaskady regulacji ekspresji genów: dwa szlaki ABA-zależne oraz dwa ABA-niezależne [59]. Podczas suszy aktywowane są obydwa rodzaje, a pod wpływem niskiej temperatury uruchamiana jest tylko kaskada ABA-niezależna.

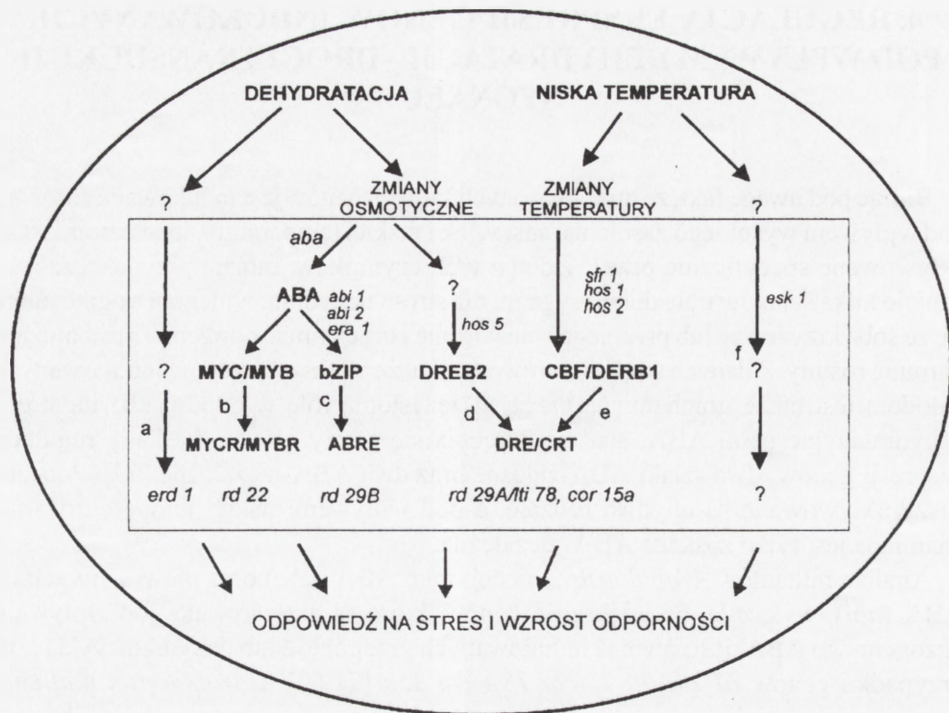
Analiza mutantów *Arabidopsis* z niedoborem ABA (*aba*) oraz niewrażliwych na ABA (*abi*), wykazała, że większość genów, które są aktywowane pod wpływem egzogenego ABA, jest również indukowanych przez chłód lub dehydrację [31]. W przypadku genów *rd 29A/lti 78/cor 78* i *cor 15a* [71,60] u *Arabidopsis thaliana*, których ekspresja w warunkach kontrolnych jest aktywowana pod wpływem egzogenego ABA, u mutantów była uruchamiana zarówno pod wpływem chłodu, jak i suszy. Wyniki te wskazują, że obecność kwasu abscysynowego nie jest niezbędna do zainicjowania transkrypcji tych genów, ale odpowiadają one na jego obecność w komórce, w wyniku której następuje akumulacja odpowiadających im transkryptów.

Duża liczba genów ulegających ekspresji podczas dehydracji komórek jest także aktywna w normalnych warunkach, lecz na znacznie niższym poziomie. Z chwilą zadziałania bodźca stresowego poziom transkryptów tych genów wzrasta przeciętnie kilkukrotnie w porównaniu ze stanem wyjściowym. Gromadzenie transkryptów może być krótkotrwałe lub utrzymywać się tak długo, jak długo działa czynnik stresowy. Wraz z jego ustąpieniem mRNA zaczyna być degradowane.

### 4.1. Szlak ABA-niezależny

Geny COR indukowane pod wpływem suszy i chłodu w sposób niezależny od ABA mają w swoich odcinkach promotorowych 9-nukleotydywy *cis*-element regulatorowy o sekwencji TACCGACAT, określane jako CRT/DRE (ang. *C-repeat/dehydration-responsive element*) [7,82]. W sekwencji tej występują tandemowe powtórzenia cytozyny. CRT/DRE jest miejscem wiązania czynników transkrypcyjnych typu trans, których synteza również zachodzi w warunkach niskiej temperatury i dehydracji. Ponieważ wiążą się z elementem CRT/DRE, nazywane są czynnikami CBF (ang. *CRT-binding factors*), [46,66,82] lub DREB (ang. *DRE-binding factors*) [35,47]. W swym składzie aminokwasowym czynniki CBF zawierają domenę AP2 (*APETALA2*/





RYCINA 1. Drogi transdukcji sygnału dla stresu suszy i chłodu w *Arabidopsis thaliana*: b i c – drogi zależne od ABA; a, d, e, f – drogi ABA-niezależne. Ekspresja genów *abi 1*, *abi 2* i *era 1* jest uruchamiana przez ABA. Gen *hos 1* jest transkrybowany podczas stresu suszy z udziałem białek DREB2, natomiast ekspresja genów *sfr 6*, *hos 1* i *hos 2* indukowana chłodem wymaga obecności białek DREB1/CBF. Chłodospecyficzny gen *esk 1* jest elementem szlaku DRE-niezależnego

*ETHYLENE RESPONSE ELEMENT BINDING PROTEIN*) [37,79] charakterystyczną dla wielu czynników oddziałujących z różnymi sekwencjami regulatorowymi w promotorach genów związanych ze wzrostem i rozwojem oraz reakcją na czynniki stresowe. Jak dotąd, obecność motywu AP2 stwierdzono wyłącznie u roślin. Jest on elementem regulatorowym dla takich czynników transkrypcyjnych, takich jak APETALA2 [33], AINTEGUMENTA [18,38], TINY [78], rodziny czynników EREBP (ang. *ethylene-responsive element binding protein*) oraz białka AP2, odgrywającego rolę w regulacji morfogenezy kwiatów [51,52]. Ponadto, domenę tę mają wszystkie czynniki typu DREB.

#### 4.2. Białka typu DREB

Ze względu na odmienny skład aminokwasowy czynników transkrypcyjnych typu DREB, wyłączając konserwatywną domenę AP2, można je podzielić na dwie duże rodziny: DREB1/CBF i DREB2 [24,47], które działają w dwóch oddzielnych szlakach transdukcji sygnałów. Ekspresja genów DREB1/CBF jest indukowana przez niską temperaturę, podczas gdy DREB2 jest prawdopodobnie aktywowana potranskrypcyjnie

w warunkach suszy [61]. U *Arabidopsis* znaleziono trzy białka typu DREB1/CBF, kodowane przez geny ułożone tandemowo na chromosomie 4 w następującym porządku liniowym: DREB1B(CBF1), DREB1A(CBF3) i DREB1C(CBF2) [49,62]. Rośliny modyfikowane genetycznie o podwyższonym poziomie białka DREB1A są bardziej odporne na suszę, zasolenie czy przemarzanie niż rośliny o genotypie dzikim. Rodzina DREB2 natomiast składa się z dwóch białek: DREB2A i DREB2B [47].

### 4.3. Czynniki transkrypcyjne DREB1

Transkrypty genów kodujących białka DREB1 pojawiają się w komórce już po 15 minutach od umieszczenia roślin w chłodzie, natomiast ekspresja genów COR następuje po upływie 1–2 godzin od zadziałania bodźca [24,62]. Liczne badania wykazały, że czynniki CBF pełnią kluczową rolę w procesie aklimatyzacji roślin do niskich temperatur. Konstytutywna ekspresja białek CBF1 i CBF3 w niestresowanych roślinach *Arabidopsis thaliana* powoduje wzrost ich odporności na temperatury zamarzania przed ekspozycją w chłodzie. Geny zawierające element regulatorowy CRT/DRE, których ekspresja jest indukowana za pomocą czynników transkrypcyjnych DREB1/CBF, tworzą tzw. „regulon CBF”.

Wielu autorów sugeruje, iż rośliny ze stałą ekspresją czynnika DREB1A(CBF3) charakteryzują się dużo wyższą tolerancją na temperatury zamarzania niż te z nadekspresją CBF1 [47]. Transkrypt dla DREB1A(CBF3) pozostawał na bardzo niskim poziomie w roślinach *Arabidopsis thaliana* typu dzikiego nawet po 7 dniach aklimatyzacji w chłodzie w temperaturze 5°C. Natomiast rośliny transformowane transgenem złożonym z promotora 35S i sekwencji DNA dla CBF3 wykazywały zarówno bardzo wysoki poziom transkryptu dla CBF3, jak również stałą ekspresję genów COR na poziomie 3 do 5 razy wyższym niż w aklimatyzowanych roślinach kontrolnych [25]. Trzy niezależne linie z nadekspresją genu DREB1A(CBF3) były odporne na temperaturę –8°C, bez wcześniejszego traktowania roślin chłodem. Po aklimatyzacji, przeżywały w temperaturze –11°C lub nawet niższej, a rośliny kontrolne jedynie w –6°C. Ponadto, rośliny te akumulowały dużo wyższe ilości proliny i cukrów rozpuszczalnych, takich jak: glukoza, fruktoza, sacharoza i rafinoza [25]. Zaobserwowano również, że wysoki poziom białka CBF3 w warunkach niestresowych sprawiał, że rośliny charakteryzowały się „karłowatym” fenotypem. Miały one mniejsze rozmiary, a ich wzrost i czas kwitnienia był znacznie opóźniony w porównaniu z roślinami dzikimi. Końcowa biomasa roślin oraz wydajność plonu były również znacznie obniżone [47].

W ostatnim czasie został wyizolowany z *Arabidopsis thaliana* kolejny czynnik transkrypcyjny z rodziny białek CBF/DREB1, DREB1D(CBF4) [26]. Odmienne, niż w przypadku genów CBF1, 2 i 3, ekspresja genu CBF4 jest indukowana nie przez niską temperaturę, lecz pod wpływem suszy oraz w odpowiedzi na egzogenny ABA. Ponadto, gen CBF4 jest położony nie na chromosomie 4 jak inne geny z rodziny CBF, lecz na chromosomie 5. Białko CBF4, którego gen transkrybowany jest konstytutywnie pod kontrolą promotora 35S wirusa mozaiki kalafiora, uruchamia geny charakterystyczne dla stresu chłodu i suszy, *cor 15a* i *cor 78a*, a więc te same, które są aktywowane przez pozostałe czynniki CBF. W związku z tym, rośliny modyfikowane



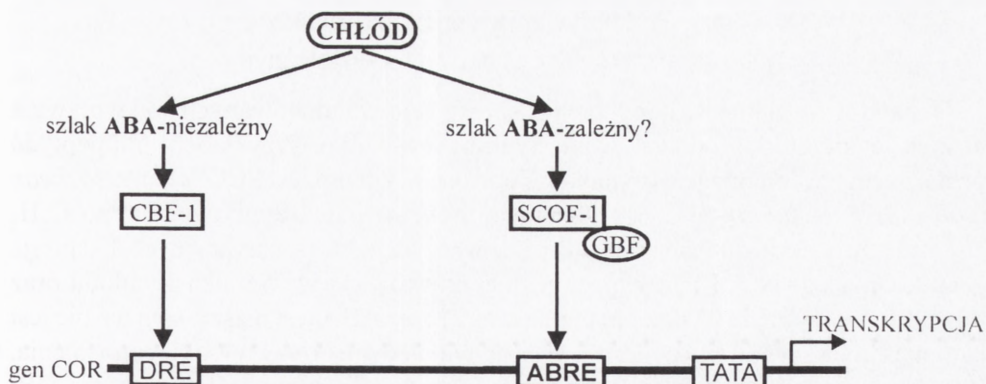
genetycznie czynnikiem CBF4 są bardziej odporne na temperatury zamarzania i dehydratację w warunkach niestresowych niż rośliny kontrolne. Rośliny nietransformowane tolerują przed hartowaniem spadek temperatury do  $-2,6^{\circ}\text{C}$ , natomiast różne linie transgeniczne wykazują odporność na temperatury w zakresie od  $-5,6$  do  $-13,3^{\circ}\text{C}$ , w zależności od stopnia nadekspresji genu CBF4. Hartowanie w chłodzie powoduje wzrost odporności roślin kontrolnych do temperatury  $-7,9^{\circ}\text{C}$ , natomiast transgenicznych do temperatury od  $-9,5$  do  $-18,7^{\circ}\text{C}$  w zależności od linii. Podobnie jak w przypadku nadekspresji czynnika CBF3, rośliny z nadekspresją CBF4 charakteryzują się opóźnionym wzrostem w porównaniu z roślinami dzikimi i wykazują „karłowaty” fenotyp.

Funkcja białka regulatorowego CBF4 wskazuje, iż element regulatorowy CRT/DRE i czynniki transkrypcyjne mające domenę AP2 są również elementem ABA-zależnego szlaku ekspresji genów w odpowiedzi na stres dehydracyjny.

#### 4.4. Mutant *eskimo1* – szlak ESK1

Wielu cennych informacji na temat szlaków transdukcji sygnału biorących udział w zjawisku aklimatyzacji roślin w chłodzie dostarczyła analiza mutantów *Arabidopsis thaliana*, które charakteryzują się dużą tolerancją na działanie temperatur poniżej zera, większą niż rośliny z dzikim genotypem, bez wcześniejszego poddawania ich procesowi hartowania. Jednym z nich jest szczegółowo scharakteryzowany mutant *eskimo1* [79]. Rośliny z mutacją punktową w locus *esk1* (*eskimo1*) akumulują duże ilości proliny, nie wykazują natomiast konstytutywnie podwyższonej ekspresji genów COR, biorących udział w procesie aklimatyzacji. Gromadzenie wolnej proliny, która ma silne właściwości osmoregulacyjne, powoduje wzrost odporności zmutowanych roślin na niskie temperatury i towarzyszący ich działaniu stres dehydracyjny. Tolerancja na niskie temperatury dzikich roślin *Arabidopsis thaliana* w czasie aklimatyzacji wzrasta od  $-5,5^{\circ}\text{C}$  do  $-12,6^{\circ}\text{C}$ , podczas gdy mutanty nietraktowane chłodem są odporne na temperatury w przedziale od  $-6,8^{\circ}\text{C}$  do  $-10,6^{\circ}\text{C}$ . Po hartowaniu ich odporność wzrasta w porównaniu z dzikim genotypem o  $9,3^{\circ}\text{C}$ , tzn. do  $-19,9^{\circ}\text{C}$ .

Stężenie proliny w komórkach roślin z mutacją *esk1* jest około 30-krotnie wyższe niż w nieaklimatyzowanych roślinach dzikich. Poziom innych aminokwasów pozostaje natomiast porównywalny. Nagromadzenie tak dużych ilości proliny następuje dzięki temu, iż mutacja w locus *esk1* wpływa na ekspresję genów zaangażowanych zarówno w jej biosyntezę, jak i degradację [16]. Uruchomienie procesu tolerancji na temperatury zamarzania nie zależy w tym przypadku od indukowanej chłodem transkrypcji genów COR. Wykazano doświadczalnie, że poziom ekspresji genów *cor 6.6*, *cor 15a*, *cor 47* oraz *cor 78* pozostawał na niezmiennym poziomie po obniżeniu temperatury. Jedynie gen *rab 18* wykazywał podwyższoną konstytutywną ekspresję. Pozostałe geny były transkrybowane na takim samym poziomie jak w roślinach kontrolnych, natomiast ich ekspresja po hartowaniu wzrastała (25–100-krotnie).



RYCINA 2. Proponowany model uruchamiania ekspresji genów COR przez białko SCOF-1 podczas stresu chłodu. Czynniki transkrypcyjne SCOF-1 indukowany przez chłód i ABA powoduje wzrost ekspresji genów COR poprzez wzmacnianie aktywności wiążącej białek GBF (czynniki wiążące się do sekwencji z motywem G-box, należące do podrodziny białek z motywem palca cynkowego) do sekwencji ABRE. SCOF1 nie oddziałuje natomiast z czynnikiem transkrypcyjnym CBF1, który przyłącza się do *cis*-sekwencji DRE i jest elementem ABA-niezależnego szlaku transdukcji sygnału

#### 4.5. Szlak ABA-zależny

U wielu roślin w warunkach suszy i wysokiego zasolenia znacznie wzrasta poziom endogennego ABA. Z danych literaturowych wynika, że duża część genów indukowanych pod wpływem suszy i chłodu jest również aktywowana w odpowiedzi na egzogenny ABA. Regulacja ekspresji tych genów zachodzi na etapie transkrypcji, przy obecności w ich promotorach sekwencji ABRE (*abscisic acid-responsive element*) [7]. Element ABRE o składzie nukleotydowym PyACGTGGC może występować w jednej lub w kilku kopiach w promotorach różnych genów. Z sekwencją ABRE oddziałują czynniki transkrypcyjne zawierające w swojej strukturze motyw palca cynkowego (bZIP) [1,2]. Natomiast dla ekspresji innych genów indukowanych przez kwas abscysynowy niezbędna jest dodatkowo synteza w komórce czynników białkowych MYC i MYB. Czynniki te wiążą się z sekwencjami MYC i MYB w promotorze genu *rd 22* aktywując go [74].

Ekspresja genu *rd 29B* (*lti 65*) jest indukowana pod wpływem suszy i wysokiego zasolenia, natomiast nie jest uruchamiana pod wpływem chłodu [81]. Gen ten nie zawiera w promotorze elementu CRT/DRE, natomiast ma dwa elementy ABRE [82]. Ponadto, jego transkrypcja nie zachodzi w mutantach *Arabidopsis abal* i *abi1*, co wskazuje, że endogenny ABA akumulowany w odpowiedzi na suszę indukuje jego ekspresję. Natomiast podczas stresu chłodu udział ABA jest niewystarczający dla indukcji genu *rd 29B*. Dowodzi to, że ekspresja genów chłodozależnych nie jest regulowana za pomocą kwasu abscysynowego.



#### 4.6. Oddziaływania typu białko-białko jako element regulacji genów chłodozależnych

Dodatkowym elementem regulacji ekspresji genów indukowanych pod wpływem niskich temperatur są oddziaływania typu białko-białko. Przykładem polipeptydu wchodzącego w interakcje z czynnikami transkrypcyjnymi jest SCOF1 (ang. *soybean cold-inducible factor 1*) [36]. Obecność motywu palca cynkowego typu  $C_2H_2$  wskazuje, że białko to również należy do rodziny czynników transkrypcyjnych. Ekspresja genu kodującego SCOF1 jest specyficznie aktywowana w warunkach chłodu oraz przez ABA, przy czym jej poziom indukowany przez ABA jest niższy. Gen ten nie jest natomiast transkrybowany podczas stresu dehydratacyjnego czy wysokiego zasolenia. Konstytutywna ekspresja SCOF1 u *Arabidopsis* indukuje ekspresję kilku genów COR, czego następstwem jest zwiększona tolerancja niehartowanych roślin transgenicznych na chłód. Białko SCOF1 nie wiąże się jednakże bezpośrednio z żadną z sekwencji regulatorowych obecnych w promotorach genów COR, w tym z elementem CRT/DRE ani z sekwencją ABRE [67]. Wchodzi natomiast w interakcje z czynnikami transkrypcyjnymi, zawierającymi w swojej sekwencji aminokwasowej domenę zamka leucynowego (bZIP), które oddziałują z elementami regulatorowymi typu G-box (*G-box binding factors*), takimi jak ABRE [42]. Fizyczne interakcje SCOF1 z innymi białkami powodują, że ich zdolność wiązania do DNA zostaje wzmocniona.

Czynnikiem transkrypcyjnym, którego ekspresja indukowana jest przez niską temperaturę oraz wzrost ABA w komórce, jest białko SGBF1 (ang. *soybean G-box binding bZIP transcription factor*) [29], wyizolowane z soi. Badania z wykorzystaniem dwuhybrydowego systemu drożdżowego wykazały, że SGBF1 wiązało się z sekwencją ABRE dużo silniej przez oddziaływanie ze SCOF1. SCOF1 zwiększa aktywność wiążącą SGBF1 do elementu ABRE obecnego w genie *cor 15a*, a także silnie indukuje ekspresję genu *rd 29B*, który ma ABRE, nie zawiera natomiast sekwencji CRT/DRE. SCOF1 działa zatem jako pozytywny regulator ekspresji genów COR w szlaku ABA-zależnym, prowadząc przez interakcje z innymi czynnikami transkrypcyjnymi do wzrostu tolerancji roślin na chłód.

#### 4.7. Indukcja genów w odpowiedzi na stres osmotyczny – Szlak HOG

Ekspresja większości genów indukowanych przez stres osmotyczny, spowodowany utratą wody cytoplazmatycznej, jest kontrolowana przez szlak HOG (ang. *high osmolarity glycerol response*) [54]. Szlak ten został po raz pierwszy opisany u drożdży. Elementem kaskady sygnalizacyjnej HOG jest MAP kinaza Hog1p [57], która reguluje akumulowanie glicerolu w komórce. Z danych wielu autorów wynika, że enzym ten wpływa na aktywność czynników transkrypcyjnych: Msn2p i Msn4p. Podczas stresu następuje gromadzenie w jądrze zarówno Hog1p, jak i Msn2/4p, które wiążąc się do sekwencji STRE (ang. *stress response element*) [56] indukują ekspresję wielu genów pod wpływem różnego rodzaju niekorzystnych warunków środowiskowych, w tym również stresu osmotycznego. Bezpośrednie oddziaływanie Msn2/4p z Hog1p pozwala utrzymać ją w stanie aktywnym. Podczas stresu osmotycznego

następuje również ekspresja dwóch innych czynników, takich jak: Hot1p i Msn1p [55]. Hot1p fizycznie oddziałuje z Hog1p i jest wymagany do ekspresji kilku genów indukowanych przez stres osmotyczny, jednakże jego wiązanie do DNA, jak dotąd nie zostało stwierdzone. Zarówno Hot1p, jak i Msn1p są odpowiedzialne za niezależną od Msn2/4p aktywację kilku genów w czasie stresu osmotycznego.

## PODSUMOWANIE

Pomimo nagromadzenia ogromnej ilości danych na temat fizjologicznej i molekularnej reakcji rośliny na stres dehydracyjny nadal wiele pytań pozostaje bez odpowiedzi. Najistotniejsze wydaje się poznanie funkcji genów COR w nabywaniu przez rośliny odporności na stres suszy i chłodu. Ponieważ tolerancja rośliny na odwodnienie i niskie temperatury jest uwarunkowana wielogenowo, określenie funkcji pojedynczego genu nie jest łatwym zadaniem. Nadekspresja w roślinie transgenicznej określonego genu często nie powoduje żadnych zmian w odporności na niedobór wody w komórce, mimo iż obserwowany jest wyraźny wzrost poziomu gromadzonego transkryptu tego genu. Błony plazmatyczne są pierwotnym miejscem uszkodzeń spowodowanych dehydracją komórki, można zatem przypuszczać, iż produkty białkowe genów, których transkrypcja ulega w tych warunkach silnemu wzmożeniu będą pełniły funkcje ochronne dla tych właśnie struktur.

Jak dotąd, wyizolowano z *Arabidopsis* sześć genów (*kin 1*, *cor 6.6/kin 2*, *cor 15a*, *cor 47/rd 17*, *cor 78/rd 29a*, *erd 10*) [5] zawierających w swoich promotorach element regulatorowy CRT/DRE, jednakże została poznana rola tylko jednego z nich kodującego białko COR15a. O białku kodowanym przez gen COR15a występującym w stromie chloroplastów było wiadomo, że zmniejsza ono tendencję membran komórkowych do przechodzenia w fazę heksagonalną II podczas odwodnienia spowodowanego zamarzaniem. Nadekspresja genu *cor15a* powoduje wzrost odporności chloroplastów na mróz w nieaklimatyzowanych roślinach *Arabidopsis* o 1–2°C. Być może zbadanie w przyszłości funkcji innych białek kodowanych przez geny COR pozwoli uzyskać w ramach modyfikacji genetycznych gatunki roślin użytkowych o zwiększonej tolerancji na stres dehydracyjny.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ABE H, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, URAO T, IWASAKI T, HOSOKAWA D, SHINOZAKI K. Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* 1997; 9: 1859–1868.
- [2] AGUAN K, SUGAWARA K, SUZUKI N, KUSANO T. Low-temperature-dependent expression of a rice gene encoding a protein with a leucine-zipper motif. *Mol Gen Genet* 1993; 24: 1–8.
- [3] ARAKAWA TW, KITA Y, CARPENTER JF. Protein-solvent interactions in pharmaceutical formulations. *Pharm Res* 1991; 8: 285–291.



- [4] ARO EM, VIRGIN I, ANDERSSON B. Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim Biophys Acta* 1993; **1143**: 113–134.
- [5] ARTUS NN, UEMURA M, STEPONKUS PL, GILMOUR SJ, LIN CT, THOMASHOW MF. Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* *COR15a* gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 13404–13409.
- [6] ASSMANN SM, SHINOZAKI K. The multisensory guard cell. Stomatal responses to blue light and abscisic acid. *Plant Physiol* 1999; **119**: 809–816.
- [7] BAKER SS, WILHELM KS, THOMASHOW MF. The 5'-region of *Arabidopsis thaliana* *cor15a* has cis-acting elements that confer cold-, drought-, and ABA-regulated gene expression. *Plant Mol Biol* 1994; **24**: 701–713.
- [8] BINZEL ML, HESS FD, BRESSAN RA, HASEGAWA PM. Intracellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells. *Plant Physiol* 1988; **86**: 607–614.
- [9] BLATT MR. Ca<sup>2+</sup> signaling and control of guard cell volume in stomatal movements. *Curr Opin Plant Biol* 2000; **3**: 196–204.
- [10] BÜSSIS D, HEINEKE D. Acclimation of potato plants to polyethylene glycol-induced water deficit. II. Contents and subcellular distribution of organic solutes. *J Exp Bot* 1998; **49**: 1361–1370.
- [11] CHUN JU, YU X-M, GRIFFITH M. Heritability of antifreeze proteins and their correlation with winter survival in wheat. *Euphytica* 1997; **102**: 219–226.
- [12] CLOSE TJ. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol Plant* 1996; **97**: 795–803.
- [13] CLOSE TJ. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol Plant* 1997; **100**: 291–296.
- [14] CROWE LM, CROWE JH. Anhydrobiosis: a strategy for survival. *Adv Space Res* 1992; **12**: 239–247.
- [15] CUMING AC. LEA proteins. [w] Shewry PR, Casey R [red.] *Seed Proteins* Kluwer Academic Publishers 1999: 753–780.
- [16] DELAUNEY AJ, VERMA DPS. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J* 1993; **4**: 215–223.
- [17] ECKER J, DAVIS RW. Plant defense genes are regulated by ethylene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 5202–5206.
- [18] ELLIOTT RC, BETZNER AS, HUTTNER E, OAKES MP, TUCKER WQJ, GERENTES D, PEREZ P, SMYTH DR. AINTEGUMENTA, an APETALA2-like gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *Plant Cell* 1996; **8**: 155–168.
- [19] ESTRUCH F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* 2000; **24**: 469–486.
- [20] FARMER EE, RYAN CA. Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 7713–7716.
- [21] FEDER ME, HOFMANN GE. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* 1999; **61**: 243–282.
- [22] FRYER MJ. The antioxidant effects of thylakoid vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol). *Plant Cell Environ* 1992; **15**: 381–392.
- [23] GAFF DF. Desiccation tolerant flowering plants in southern Africa. *Science* 1971; **174**: 1033–1034.
- [24] GILMOUR SJ, ZARKA DJ, STOCKINGER EJ, SALAZAR MP, HOUGHTON JM, THOMASHOW MF. Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant J* 1998; **16**: 433–442.
- [25] GILMOUR SJ, SEBOLT AM, SALAZAR MP, EVERARD JD, THOMASHOW MF. Overexpression of the *Arabidopsis* *CBF3* transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiol* 2000; **124**: 1854–1865.
- [26] HAAKE V, COOK D, RIECHMANN JL, PINEDA O, THOMASHOW MF, ZHANG JZ. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2002; **130**: 639–648.
- [27] HASEGAWA PM, BRESSAN RA, ZHU JK, BOHNERT HJ. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Mol Plant Physiol* 2000; **51**: 463–499.
- [28] HOEKSTRA FA, GOLOVINA EA, BUITINK J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Sci* 2001; **6**: 431–438.
- [29] HONG JC, CHEONG YH, NAGAO RT, BAHK JD, KEY JL, CHO MJ. Isolation of two soybean G-box binding factors which interact with a G-box sequence of an auxin-responsive gene. *Plant J* 1995; **8**: 199–211.

- [30] HUGHES MA, DUNN MA. The molecular biology of plant acclimation to low temperature. *J Exp Bot* 1996; **47**: 291–305.
- [31] INGRAM J, BARTELS D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1996; **47**: 377–403.
- [32] JAGLO-OTTOSEN KR, GILMOUR SJ, ZARKA DG, SCHABENBERGER O, THOMASHO MF. *Arabidopsis CBF1* overexpression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance. *Science* 1998; **280**: 104–106.
- [33] JOFUKU KD, DEN BOER BGW, VAN MONTAGU M, OKAMURO JK. Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell* 1994; **6**: 1211–1225
- [34] KACPERSKA A. Udział hormonów roślinnych w odpowiedzi roślin na stresowe czynniki środowiska. *Kosmos* 1995; **44** (3–4): 623–637.
- [35] KASUGA M, LIU Q, MIURA S, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat Biotechnol* 1999; **17**: 287–291.
- [36] KIM JCH, LEE SH, CHEONG YH, YOO CH-M, LEE SI, CHUN HJ, YUN D-HONG JCH, LEE SY, LIM CHO, CHO MJ, CHO MJ. A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, SCOF-1, enhances cold tolerance in transgenic plants. *Plant J* 2001; **25**(3): 247–259.
- [37] KITAKUNI E, KURODA Y, OOBATAKE M, TANAKA T, NAKAMURA H. The *AINTEGUMENTA* gene of *Arabidopsis* required for ovule and female gametophyte development is related to the floral homeotic gene *APETALA2*. *Protein Sci* 1994; **3**: 831–837.
- [38] KLUCHER KM, CHOW H, REISER L, FISHER RL. The *AINTEGUMENTA* gene of *Arabidopsis* required for ovule and female gametophyte development is related to the floral homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell* 1996; **8**: 137–153.
- [39] KNIGHT H, KNIGHT MR. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci* 2001; **6**: 262–267.
- [40] KOCSY G, GALIBA G, BRUNOLD C. Role of glutathione in adaptation and signalling during chilling and cold acclimation in plants. *Physiol Plant* 2001; **113**: 158–164.
- [41] KOPCEWICZ J, LEWAK S. Podstawy fizjologii roślin. PWN, Warszawa 1998: 575–633.
- [42] KUSANO T, BERBERICH T, HARADA M, SUZUKI N, SUGAWARA K. A maize DNA-binding factor with a bZIP motif is induced by low temperature. *Mol Gen Genet* 1995; **248**: 507–517.
- [43] LEUNG J, BOUVIER-DURAND M, MORRIS PC, GUERRIER D, CHEFDOR F, GIRAUDAT J. *Arabidopsis* ABA response gene *ABI1*: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* 1994; **264**: 1448–1452.
- [44] LEUNG J, MERLOT S, GIRAUDAT J. The *Arabidopsis* *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (ABI2)* and *ABI1* genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell* 1997; **9**: 759–771.
- [45] LEVITT J. Responses of plants to environmental stresses: chilling, freezing and high temperatures stresses. 1980; New York, USA: Academic Press.
- [46] LIN C, THOMASHO MF. DNA sequence analysis of a complementary DNA for cold-regulated *Arabidopsis* gene *cor15* and characterization of the *COR15* polypeptide. *Plant Physiol* 1992; **99**: 519–525.
- [47] LIU Q, KASUGA M, SAKUMA Y, ABE H, MIURA S, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. Two transcription factors, *DREB1* and *DREB2*, with an *EREBP/AP2* DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in rough- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1998; **10**: 1391–1406.
- [48] McKERSIE BD, LESHEM YY. Chilling stress. [w] *Stress and Stress Coping in Cultivated Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1994: 79–101.
- [49] MEDINA J, BARGUES M, TEROL J, PEREZ-ALONSO M, SALINAS J. The *Arabidopsis* *CBF* gene family is composed of three genes encoding *AP2* domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiol* 1999; **119**: 463–470.
- [50] NIU X, BRESSAN RA, HASEGAWA PM, PARDO JM. Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol* 1995; **109**: 735–742.
- [51] OHME-TAKAGI M, SHINSHI H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell* 1995; **7**: 173–182.



- [52] OKAMURO JK, CASTER B, VILLARROEL R, VAN MONTAGU M, JOFUKU KD. The AP2 domain of *APETALA2* defines a large new family of DNA binding domain in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 7076–7081.
- [53] PALVA ET. Gene expression under low temperature stress. [w] Basra AS, [red.] Stress Induced Gene Expression in Plants. 1994: 103–130. New York: Harwood Academic Publishers.
- [54] PROFT M, SERRANO R. Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated *ENA1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein SKO1p confers HOG-dependent osmotic regulation. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 537–546.
- [55] REP M, REISER V, GARTNER U, THEVELEIN JM, HOHMANN S, AMMERER G, RUIS H. Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. *Moll Cell Biol* 1999; **19**: 5474–5485.
- [56] RUIS H, SCHÜLLER C. Stress signaling in yeast. *BioEssays* 1995; **17**: 959–966.
- [57] SCHÜLLER C, BREWSTER JL, ALEXANDER MR, GUSTIN MC, RUIS H. The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* *CTT1* gene. *EMBO J* 1994; **13**: 4382–4389.
- [58] SERRANO R. Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int Rev Cytol* 1996; **165**: 1–52.
- [59] SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Gene expression and signal transduction in water stress response. *Plant Physiol* 1997; **115**: 327–334.
- [60] SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Molecular responses to drought stress. [w] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K [red.] *Molecular Responses to Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants*. Y. Austin, Texas: RG Landes; 1999: 11–28.
- [61] SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Molecular responses to dehydration and low temperature: Differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 2000; **3**: 217–223.
- [62] SHINWARI ZK, NAKASHIMA K, MIURA S, KASUGA M, SEKI M, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. An *Arabidopsis* gene family encoding DRE/CRT binding proteins involved in low-temperature-responsive gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998; **250**: 161–170.
- [63] STEPONKUS PL. Role of plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annu Rev Plant Physiol* 1984; **35**: 543–584.
- [64] STEPONKUS PL, UEMURA M, WEBB MS. A contrast of the cryostability of the plasma membrane of winter rye and spring oat-two species that widely differ in their freezing tolerance and plasma membrane lipid composition. [w] Steponkus PL [red.] *Advances in Low-Temperature Biology*. London: JAI Press 1993; **2**: 211–312.
- [65] STEPONKUS PL, UEMURA M, JOSEPH RA, GILMOUR SJ, THOMASHOW MF. Mode of action of the *COR15a* gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 14570–14575.
- [66] STOCKINGER EJ, GILMOUR SJ, THOMASHOW MF. *Arabidopsis thaliana* *CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 1035–1040.
- [67] TAKATSUJI H, MORI M, BENFEY PN, REN L, CHUA N-H. Characterization of a zinc finger DNA binding protein expressed specifically in *Petunia* petals and seedlings. *EMBO J* 1991; **11**: 241–249.
- [68] THIERINGER HA, JONES PG, INOUE M. Cold shock and adaptation. *Bioassays* 1998; **20**: 49–57.
- [69] THOMASHOW MF. *Arabidopsis thaliana* as a model for studying mechanisms of plant cold tolerance. [w] Meyerowitz EM, Somerville CR, Arabidopsis. Cold Spring Harbour, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1994: 807–834.
- [70] THOMASHOW MF. Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol* 1998; **118**: 1–7.
- [71] THOMASHOW MF. Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1999; **50**: 571–599.
- [72] THOMASHOW MF. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1999; **50**: 571–599.
- [73] UEMURA M, STEPONKUS PL. Effect of cold acclimation on the lipid composition of the inner and outer membrane of the chloroplast envelope isolated from rye leaves. *Plant Physiol* 1997; **114**(4): 1493–1500.

- [74] URAO T, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, URAO S, SHINOZAKI K. An *Arabidopsis myb* homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell* 1993; **5**: 1529–1539.
- [75] WANG H, GEORGES F, PELCHER LE, SALEEM M, CUTLER AJ. A 5.3-kilobase genomic fragment from *Arabidopsis thaliana* containing *kin1* and *cor6.6*. *Plant Physiol* 1994; **104**: 291–292.
- [76] WEHMEYER N, HERNANDEZ LD, FINKELSTEIN RR, VIERLING E. Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. *Plant Physiol* 1996; **112**: 747–757.
- [77] WELIN BV, OLSON A, PALVA ET. Structure and organization of two closely related low-temperature-induced *dhn/lea/rab*-like genes in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. *Plant Mol Biol* 1995; **29**: 391–395.
- [78] WILSON K, LONG D, SWINBURNE J, COUPLAND G. A dissociation insertion causes a semidominant mutation that increases expression of TINY, an *Arabidopsis* gene related to APETALA2. *Plant Cell* 1996; **8**: 659–671.
- [79] XIN Z, BROWSE J. *Eskimo 1* mutants of *Arabidopsis* are constitutively freezing-tolerant. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 7799–7804.
- [80] XIONG L, SCHUMAKER KS, ZHU J-K. Cell signaling during drought, and salt tress. *Plant Cell Supplement* 2002: S165–S183.
- [81] YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. Characterization of the expression of a desiccation-responsive *rd29A* gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its pomoter in transgenic plants. *Mol Gen Genet* 1993; **236**: 331–340.
- [82] YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* 1994; **6**: 251–264.
- [83] YU X-M, AND GRIFFITH M. Antifreeze proteins in winter rye leaves from oligomeric complexes. *Plant Physiol* 1999; **119**: 1361–1369.
- [84] ZHU B, CHEN THH, LI PH. Expression of an ABA-responsive osmotin-like gene during the induction of freezing tolerance in *Solanum commersoni*. *Plant Mol Biol* 1993; **21**: 729–735.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 15.04.2003 r.

Przyjęto: 28.07.2003 r.

ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

e-mail: IPAW@IGR.POZNAN.PL





## KOMUNIKAT

W imieniu Komitetu Organizacyjnego Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej nt.

### *„Metabolizm leków i antybiotyków”*

Mam zaszczyt i ogromną przyjemność powiadomić Państwa, że w pierwszej dekadzie września 2004 roku w Ustroniu pragniemy zorganizować kolejne nasze spotkanie naukowe.

Aby umożliwić Państwu szybki i bezpośredni kontakt z Komitetem Organizacyjnym, uruchamiamy na potrzeby Konferencji stronę internetową, na której będą umieszczane wszystkie ważne i aktualne dane dotyczące Zjazdu:

**[WWW.metabolizm.slam.katowice.pl](http://WWW.metabolizm.slam.katowice.pl)**

**e-mail: [metabolizm@slam.katowice.pl](mailto:metabolizm@slam.katowice.pl)**

Tą drogą będziemy chcieli przyjmować od Państwa między innymi dane o rejestracji uczestników, streszczenia referatów i inne informacje. Strona ta będzie sukcesywnie aktualizowana i uzupełniana i dlatego prosimy o częste jej odwied\zanie.

*Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego  
Dr Andrzej Plewka*



## Wskazówki przygotowania rysunków i streszczeń do publikacji w PBK

Dostarczane na dyskietkach teksty powinny być napisane w Wordzie, wersja 6,0 lub wcześniejsza. Jeśli w tekst zostały wstawione rysunki, powinny one zostać umieszczone osobno na dyskietce. Powinny to być albo mapy bitowe (TIF, .PCX), albo pliki z Corela, wersja 5,0 lub wcześniejsza. Każda wersja Worda lub Corela pozwala na zachowanie pracy w formacie wersji wcześniejszej. Rysunki, schematy zdjęcia i wykresy w podpisach i w powołaniach w tekście powinny nosić nazwę rycina (Ryc.) i być numerowane kolejno.

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

### Cennik dla Autorów w 2004 r.

	odbitki prac			barwne ryciny	str. druku (ponad 15)
Liczba odbitek	50	100	200	1 szt.	1 str.
Cena zł	100,00	120,00	150,00	400,00	50,00

Zamówienie na odbitki musi być złożone wraz z przesłaną korektą pracy

## Warunki prenumeraty kwartalnika PBK

### *Prenumerata na rok*

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 12401053-40006576-2700-401112-001.

Cena prenumeraty rocznika      na rok 2003      na rok 2004

dla instytucji (bibliotek) wynosi 150 zł,      150 zł

dla odbiorców indywidualnych 40 zł.      50 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 12401053-40006576-2700-401112-001.

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 koniecznie 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 przesyłać 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. 212) 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 korespondencję, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 1 str.) oraz słowa kluczowe 3 do 10 słów zgodnych z terminami w *Medical Subject Headings (Index Medicus)*, o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rycin, a jedynie zaznaczyć ołówkiem 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	<b>tak nie</b>	<b>tak nie</b>
Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę	Dołączono kopię pracy wraz z rycinami na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego	<b>tak nie</b>	<b>tak nie</b>
Jest zgoda osób, których informacje niepublikowane są zamieszczone w tekście	z komputera IBM	<b>tak nie</b>	<b>tak nie</b>

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

Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w „Postęпах Biologii Komórki” przechodzi w własność Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji.

*podpisy wszystkich autorów*



## TREŚĆ – CONTENT

W tym Zeszyście	1
Profesor Antoni Horst – Wybitna postać patofizjologii i genetyki człowieka – SŁOMSKI R.	3
WIŚNIEWSKA J., TYBURSKI J., TRETYN A. Polarny transport auksyny przełom w badaniach? – Polar auxine transport – Breakthrough in research	9
ZIÓŁKOWSKA A, RUCIŃSKI M., BUDZYŃSKA K BEACON – aktywny biologicznie peptyd związany z występowaniem otyłości BEACON – bioactive peptide related to obesity	25
WESOŁOWSKA A.: Wykorzystanie małych interferujących RNA do hamowania ekspresji genów w komórkach ssaków siRNA application for silencing of gene expression in mammalian cells	35
MAŁECKI M.: Wirusowe strategie w terapii genowej ze szczególnym uwzględnieniem wektorów konstruowanych z wirusów związanych z adenowirusami (AAV) Viral delivery systems in gene therapy and adeno-associated viral (AAV) vectors	47
PERŁA J., TWARDOWSKI T.: Zmienność ferrytyny w stanach patologicznych Ferritin variability in pathological states	59
MRÓWKA P., GOŁĄB J.: Receptor NKG2D i jego ligandy NKG2D Receptor and its ligands	71
SKRZYCKI M., CZECZOT H.: Ekspresja genów dysmutazy ponadtlenkowej w stanie stresu oksydacyjnego Expression of superoxide dismutase genes in state of oxidative stress	81
PIOTROWSKA A., CZERPAK R.: Molekularne mechanizmy działania cytokinin Molecular mechanisms of cytokinin action	93
LIGUZ-LĘCZNAK M.: Sieci perineuronalne – zagadkowe struktury w układzie nerwowym Perineuronal nets – enigmatic structures of the nervous system.	117
WISZNIEWSKA B., MARCHLEWICZ M., KOLASA A.: Zaburzenia rozwojowe i dysfunkcja gonad spowodowane nieprawidłowym działaniem hormonów warunkujących rozwój męskiego układu płciowego Developmental disorders and dysfunction of gonads as a result of abnormal action of hormones responsible for male reproductive system development	127
LEGOCKA J., SOBIESZCZUK-NOWICKA E.: Poliaminy w chloroplastach Polyamines in chloroplasts	143
HETMANN A., KOWALCZYK S.: Szlaki sygnałowe aktywowane przez fitochromy, roślinne receptory światła czerwonego i dalekiej czerwieni Signal transduction pathways activated by phytochromes, the plant photoreceptors perceiving red and far-red light	155
LANIEWSKI-WOŁŁK M.: Merlina – czarodziej wśród supresorów nowotworzenia Merlin – the wizard among tumour suppressor protein	177
PAWŁOWICZ I.: Fizjologiczna i molekularna odpowiedź rośliny na stres dehydracyjny Physiological and molecular plant response to dehydration stress	191
Komunikat oraz Dodatkowe wskazówki dla Autorów i warunki prenumeraty	211