

P. 2435

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
BIOLOGII  
KOMÓRKI

POLISH  
ANATOMICAL  
SOCIETY

POLISH SOCIETY  
FOR CELL  
BIOLOGY

VOL. 31, ISSUE 3/2004  
(397-628)

17.09.04

# 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:

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*

Janusz KUBRAKIEWICZ – biologia rozwoju, embriologia, różnicowanie komórek, cytoszkielet – developmental biology, embryology, cell differentiation, cytoskeleton – *Instytut Zoologiczny UW, 50-335 Wrocław, ul. Sienkiewicza 21*

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

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

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

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

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Szczepan BILIŃSKI, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŻNICKI, 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. 18,7. Ark. druk.14,5. Podpisano do druku w lipcu i druk ukończono w sierpniu 2004.

## W tym Zeszycie

Zielone białko fluorescencyjne GFP (*Green Fluorescent Protein*) ze słupbiopława *Aequorea victoria* znalazło liczne zastosowania w biologii komórki i biologii molekularnej. Na stronie 399 przedstawiono najważniejsze strukturalne i fotochemiczne właściwości białka, jak również omówiono mutacje przyspieszające proces fałdowania białka i dojrzewania chromoforu, a także zmieniające właściwości spektralne GFP. Najważniejsze sposoby wykorzystania GFP, takie jak: monitorowanie ekspresji genów, badanie dynamiki wewnątrzkomórkowej i oddziaływań międzycząsteczkowych białek oraz tzw. monitorowanie biologiczne opisano na stronie 421.

Krótkofalowa część widma słonecznego, a zwłaszcza światło niebieskie (390–500 nm) i bliski ultrafiolet (320–390 nm) wywierają istotny wpływ na wzrost i rozwój roślin. Badania z zakresu genetyki i biologii molekularnej, prowadzone głównie na modelowej roślinie *Arabidopsis thaliana*, umożliwiły poznanie trzech klas receptorów światła niebieskiego i UV-A – fototropin, kryptochromów i flawoprotein z rodziny Zeitlupe. Więcej na ten temat można znaleźć na stronie 441.

Syntaza tlenu azotu (eNOS) w komórkach śródbłonka jest jednym z trzech enzymów zdolnych do produkcji tlenu azotu (NO). Częśćeczka ta pełni kluczowe funkcje w układzie sercowo-naczyniowym. Gen eNOS składa się z 26 egzonów i zajmuje fragment chromosomu 7 o wielkości 22 kpz. Aktywność eNOS jest bezwzględnie zależna od obecności kompleksu  $Ca^{2+}$ /kalmodulina, który wiążąc się z enzymem znosi inhibicyjne działanie insertu zlokalizowanego w obszarze wiążącym FMN. Dodatkowe elementy regulacji to fosforylacja i depalmitylacja enzymu oraz asocjacja z białkiem szoku termicznego Hsp90. Informacje na ten temat czytelnik znajdzie na stronach 465 i 477.

Mitochondria plemników są strukturami unikalnymi i nieco odmiennymi od mitochondriów somatycznych. Przechodzą one szereg morfologicznych, biochemicznych i molekularnych zmian związanych z ekspresją specyficznych białek strukturalnych i enzymatycznych, będących markerami ich dojrzewania podczas spermatogenezy. Specyficzna molekularna budowa białek mitochondrialnych i wzajemne połączenie mitochondriów czyni osłonkę mitochondrialną oporną na działanie czynników fizyko-chemicznych i sprawia, że funkcjonuje ona jak jedno organellum, dostarczające ATP do ruchu plemników. Zaburzenia morfologiczno-funkcjonalne mitochondriów wstawki plemnika, które są coraz częściej przyczyną niepłodności męskiej (astenoteratozoospermii) można identyfikować stosując precyzyjną diagnostykę mitochondriów wstawki plemnika. Szczegółowe informacje znajdzie czytelnik na str. 489 i 517.

Receptory Toll należą do rodziny receptorów o znacznym konserwatyzmie ewolucyjnym. Odgrywają one ważną rolę w aktywacji odporności wrodzonej od owadów aż do ptaków. Po raz pierwszy zostały wykryte i scharakteryzowane u muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*), gdzie biorą udział w embriogenezie i w odporności przeciw patogenom. Wykryto też homologiczne receptory u ssaków, w tym u człowieka, które nazwano receptorami Toll-podobnymi (TLRs; *Toll-Like Receptors*). Więcej o tym można przeczytać na stronie 543.

## PODZIĘKOWANIE

Organizatorzy Konferencji „*Od cytochemii do biologii molekularnej*” zorganizowanej dla uhonorowania 55-lecia twórczej pracy naukowej Pani Profesor dr hab. Marii Joanny Olszewskiej uprzejmie informują, że Konferencja ta była współfinansowana przez Komitet Cytobiologii PAN. Artykuły przeglądowe z tej Konferencji zostały zamieszczone w suplemencie nr 22, tom 31 (2004) Postępów Biologii Komórki.



# ZIELONE BIAŁKO FLUORESCENCYJNE GFP – STRUKTURA I WŁAŚCIWOŚCI\*

GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP) –  
STRUCTURE AND PROPERTIES

Krzysztof BREWCZYŃSKI, Jan FRONK

Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Biochemii, Wydział Biologii  
Uniwersytetu Warszawskiego

*Streszczenie:* W ostatnich 10 latach zielone białko fluorescencyjne – GFP (*Green Fluorescent Protein*) ze stulbiopława *Aequorea victoria* znalazło liczne zastosowania w biologii komórki i biologii molekularnej. Jest szczególnie użyteczne ze względu na stabilność struktury trzeciorzędowej i fakt, że jego chromofor powstaje w wyniku autokatalitycznej cyklizacji aminokwasów, do czego nie jest wymagany udział żadnych kofaktorów z wyjątkiem cząsteczek tlenu. W pracy tej przedstawiono najważniejsze strukturalne i fotochemiczne właściwości białka, jak również omówiono mutacje przyspieszające proces fałdowania białka i dojrzewania chromoforu, a także zmieniające właściwości spektralne GFP.

*Słowa kluczowe:* GFP, *Aequorea victoria*, fluorescencja, chromofor białkowy, EGFP.

*Summary:* In the last decade Green Fluorescent Protein (GFP) from the jellyfish *Aequorea victoria* has become a commonly used tool in cell and molecular biology. Its advantages are high stability of its tertiary structure and the fact that its chromophore is formed by autocatalytic cyclization of amino acids that does not require any cofactors apart from oxygen. This work describes major structural and photochemical features of this protein and gives an overview of mutations which accelerate GFP folding and maturation of its chromophore as well as influence the spectral characteristics of the protein.

Key words: green fluorescent protein (GFP), *Aequorea victoria*, fluorescence, protein chromophore, enhanced green fluorescent protein (EGFP).

## 1. WSTĘP

Białko GFP (*Green Fluorescent Protein*) jest obecnie powszechnie wykorzystywanym narzędziem w biologii molekularnej i biologii komórki. GFP jest szczególnie

\*Artykuł ten i praca towarzysząca stanowią skróconą wersję pracy licencjackiej K.B.

użyteczne ze względu na swoją stabilność i fakt, że jego chromofor powstaje w wyniku autokatalitycznej cyklizacji aminokwasów, która nie wymaga żadnego kompleksu enzymatycznego ani innych kofaktorów z wyjątkiem tlenu. Te cechy umożliwiły wykorzystanie GFP w różnego typu eksperymentach, między innymi w badaniach dynamiki wewnątrzkomórkowej, oddziaływań międzycząsteczkowych białek, czy embriogenezy wielu organizmów (szczegółowy opis m.in. tych zagadnień czytelnik znajdzie w towarzyszącym artykule [4])

Zainteresowanie GFP stało się powszechne dopiero w ostatniej dekadzie. Do końca roku 1981 w bazie danych PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>) było zaledwie 20 publikacji z GFP (lub pełną wersją nazwy) w tytule lub streszczeniu; do końca 1989 roku jedynie 68, natomiast już 10 lat później aż 2271 publikacji. Ostatnie wyniki poszukiwania (stan na 1 stycznia 2004 roku) dają aż 9751 publikacji – ponad 4 razy więcej niż 4 lata temu.

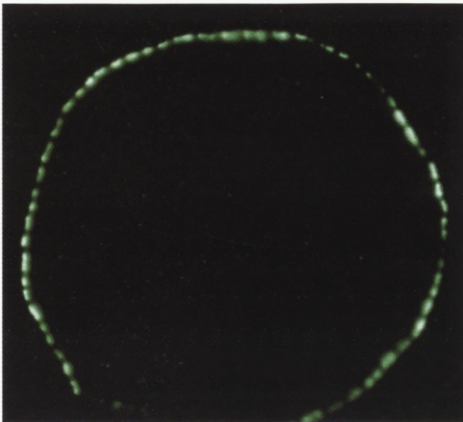
GFP było tematem kilku prac przeglądowych [5, 8, 10, 14, 25, 26, 30, 43, 51]. Wiele publikacji omawia także jego strukturę i właściwości spektralne (zob. dalej). Opublikowano także książkę o GFP [17]. Również całe tomy *Methods in Cell Biology* [15] i *Methods in Enzymology* [16] poświęcono temu białku. Ogromna ilość dostępnej literatury o GFP spowodowała, że niniejsza praca nie będzie szczegółowo poruszała wielu zagadnień związanych ze strukturą i właściwościami fizykochemicznymi białka.

## 2. KRÓTKA HISTORIA ODKRYCIA I BADAŃ NAD GFP

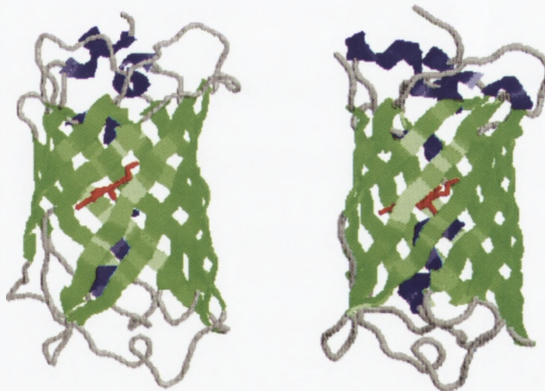
Już w pierwszym wieku n.e. rzymski pisarz Pliniusz Starszy jako pierwszy opisał zjawisko bioluminescencji [24]. Zauważył on mianowicie jasny błysk u bliżej nieokreślonego gatunku meduzy. Współczesne badania nad bioluminescencją kilku gatunków parzydełkowców (*Cnidaria*), obejmujące także biochemiczną charakterystykę GFP, rozpoczęło w połowie lat 50. XX wieku niezależnie kilka grup badawczych. Ważnym impulsem do podjęcia tych badań była potrzeba wyjaśnienia przyczyny częstego powstawania „ślądu światła” za poruszającymi się okrętami Marynarki Wojennej USA. Jest to jeden z wielu przypadków, w których motorem rozwoju nauki były zainteresowania wojska [3]. Za faktycznych odkrywców białka większość autorów uważa Shimomurę i współaut. (1962 rok) [39]. W 1979 roku Shimomura, po termicznej denaturacji GFP i cięciu enzymem papainą, wyizolował fragment białka zawierający chromofor i zaproponował jego prawdopodobną strukturę [37, 38]. Cody i współaut. [7] potwierdzili strukturę Shimomury, nieznacznie ją jednak modyfikując, i pokazali, że chromofor jest cykliczną formą heksapeptydu. Punktem kulminacyjnym badań nad GFP było sklonowanie i zsekwencjonowanie na początku lat 90 cDNA (*gfp10*) GFP z *Aequorea victoria* przez Prashera i współaut. [36]. Natomiast Chalfie i współaut. [6] w 1994 roku przyczynili się do zwiększenia zainteresowania tym białkiem udowadniając ostatecznie, że ekspresja sklonowanego genu powoduje fluorescencję białka w wielu różnych organizmach i typach komórek, co zaobserwowali także Inouye i Tsuji [23]. Udowodnili oni tym samym, że efekt fluorescencji białka jest powodowany jedynie przez autokatalityczną cyklizację aminokwasów prowadzącą do powstania



RYCINA 1. *Aequorea victoria* w całej okazałości. Zdjęcie nie przedstawia fluorescencji GFP, lecz odbicie światła lampy błyskowej od powłoki ciała meduzy [29]. Źródło – <http://www.mbari.org/~kraskoff/mbari/aequorea.htm> (autor: Kevin Raskoff, zdjęcie wykorzystano za zgodą autora)



RYCINA 2. Fluorescencja GFP u *A. victoria*. Źródło – <http://aesop.rutgers.edu/~crebb/ring.html> (autor: William W. Ward, zdjęcie wykorzystano za zgodą autora)

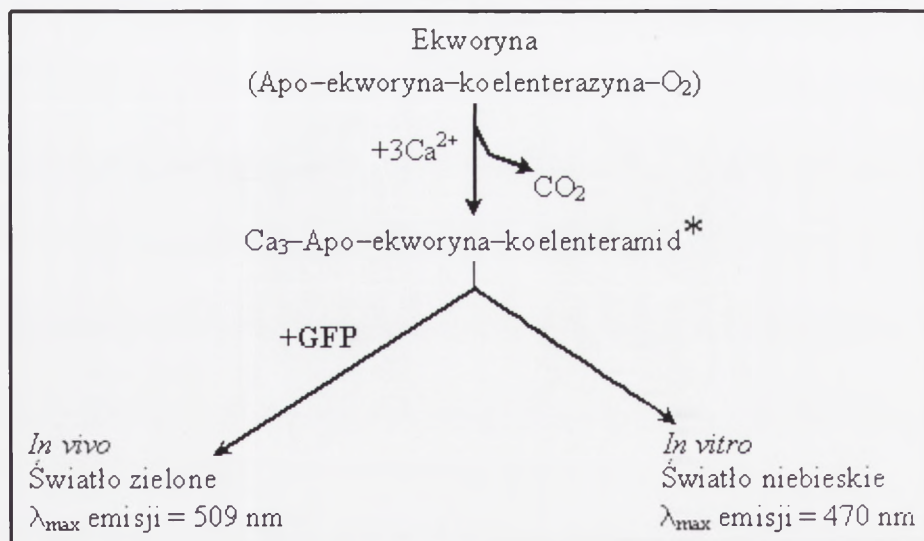


RYCINA 4. Struktura przestrzenna mutantu S65T (po lewej) i GFPwt (po prawej): na zielono zaznaczono  $\beta$ -wstążki; na niebiesko centralny  $\alpha$ -heliks i krótkie zewnętrzne segmenty helikalne; pętle na kolor szary, chromofor jest zaznaczony na czerwono. Źródło – <http://srs.ebi.ac.uk> – baza PDB, identyfikator: kolejno 1EMG i 1GFL, zmodyfikowano programem RasWin Molecular Graphics v. 2.6



TABELA 1. Sekwencja nukleotydomowa (cDNA) i aminokwasowa GFPwt z *A. victoria*. Pogrubioną czcionką zaznaczono heksapeptyd tworzący chromofor. Źródło – <http://srs.ebi.ac.uk> – baza EMBL, identyfikator: AVGFPA

Sekwencja nukleotydomowa (cDNA) GFPwt z <i>A. victoria</i> .					
atgagtaaag	gagaagaact	tttactgga	gttgtcccaa	ttcttgttga	50
attagatggt	gatgttaatg	ggcacaatt	ttctgtcagt	ggagaggggtg	100
aaggtgatgc	aacatacggg	aaacttacc	ttaaatttat	ttgcactact	150
ggaaaactac	ctgttccatg	gccaacactt	gtcactactt	tctcttatgg	200
tgttcaatgc	ttttcaagat	accagatca	atgaaacag	catgactttt	250
tcaagagtgc	catgcccga	ggttatgtac	aggaaagaac	tatatTTTTc	300
aaagatgacg	ggaactaca	gacacgtgct	gaagtcaagt	ttgaaggtga	350
tacccttgtt	aatagaatcg	agttaaaagg	tattgatttt	aaagaagatg	400
gaaacattct	tggacacaaa	ttggaataca	actataactc	acacaatgta	450
tacatcatgg	cagacaaaca	aaagaatgga	atcaaagtta	acttcaaaat	500
tagacacaac	attgaagatg	gaagcgttca	actagcagac	cattatcaac	550
aaaatactcc	aattggcgat	ggcctgtcc	ttttaccaga	caaccattac	600
ctgtccacac	aatctgccct	ttcgaaagt	cccaacgaaa	agagagacca	650
catggtcctt	cttgagtttg	taacagctgc	tgggattaca	catggcatgg	700
atgaactata	caaataa				717
Sekwencja aminokwasowa GFPwt z <i>A. victoria</i> .					
MSKGEELFTG	VVPILVELDG	DVNGHKFSVS	GEGEDATYG	KLTLKFICTT	50
GKLPVPWPTL	VTT <b>FSYGVQC</b>	FSRYPDHMKQ	HDFFKSAMPE	GYVQERTIFF	100
KDDGNYKTRA	EVKFEGDTLV	NRIELKGIDF	KEDGNILGHK	LEYNYNshNV	150
YIMADKQKNG	IKVNFKIRHN	IEDGSVQLAD	HYQQNTPIGD	GPVLLPDNHY	200
LSTQSALS KD	PNEKRDMVL	LEFVTAAGIT	HGMDELYK		238



RYCINA 3. Szlak odpowiedzialny za bioluminescencję u *A. victoria*. Wzbudzony (\*) koelenteramid emituje *in vitro* światło niebieskie, *in vivo* następuje transfer energii do GFP, co powoduje emisję światła zielonego (na podstawie [25], zmieniono)



chromoforu białkowego. W 1996 roku Yang i współaut. [48] rozwikłali krystaliczną strukturę GFP z *A. victoria*, co zostanie omówione w punkcie 5.

### 3. CHARAKTERYSTYKA MEDUZY *AEQUOREA VICTORIA*

Białka podobne do GFP znaleziono w licznych organizmach, jednak w tej pracy zostanie opisane jedynie to z *Aequorea victoria* (nazywana także *A. aequorea*, czasem *A. forskalea* [29]). GFP z *A. victoria* było pierwszym tego typu białkiem, którego gen został sklonowany [36] i poddany ekspresji [6] i to ono jest najczęściej wykorzystywane w badaniach laboratoryjnych.

*A. victoria* należy do gromady słuźbiopławów (*Hydrozoa*). Jest to gatunek dość powszechnie występujący w całej północno-zachodniej części Oceanu Spokojnego. Do niedawna bardzo duże zagęszczenie tej meduzy obserwowano w porcie Friday w stanie Waszyngton w USA, gdzie w większości dokonywano jej odłowów w celu badania bioluminescencji. Dorosły osobnik tego gatunku dorasta do 10 cm średnicy (ryc. 1) [29].

Fluorescencja GFP u *A. victoria* może pojawić się w odpowiedzi na dotknięcie lub potrząsanie meduzy. Jest to kilkusekundowy błysk zielonego światła, który dla meduzy jest rodzajem obrony przed drapieżnikiem, polegającej prawdopodobnie na oślepieniu napastnika [3]. Bioluminescencja u *A. victoria* pojawia się jedynie na obrzeżu dzwonu meduzy (ryc. 2), nigdy w całym jego obrębie. Stwierdzenie to jest częstym błędem pojawiającym się zarówno w literaturze fachowej, jak i popularnonaukowej [29].

Molekularny mechanizm bioluminescencji *in vivo* u *A. victoria* jest bardzo interesujący. Polega na współdziałaniu dwóch białek: ekworyny (ang. *aequorin*) i GFP, pomiędzy którymi zachodzi transfer energetyczny [25].

Ekworyna (lucyferaza) jest kompleksem składającym się z apoproteiny (około 22 kDa), do której przyłączona jest cząsteczka tlenu i koelenterazyna (ang. *coelenterazine*), związek imidazolowy o masie cząsteczkowej 423 Da. W warunkach stresowych poziom jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w cytoplazmie znacznie wzrasta. Kiedy ekworyna zostaje zaktywowana poprzez związanie 3 jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , katalizuje ona reakcję oksydacji koelenterazyny (lucyferyny) do koelenteramidu (z uwolnieniem  $\text{CO}_2$ ), co powoduje powstanie stanu wzbudzonego cząsteczki. Koelenteramid powraca do swojego stanu podstawowego, emitując fotony światła o długości fali ok. 470 nm, co odpowiada długości fali światła niebieskiego. Taki efekt daje ekworyna *in vitro*. Jednak światło emitowane przez *A. victoria* jest zielone, dlatego że *in vivo* wzbudzona ekworyna przekazuje energię bezpośrednio na GFP. Wzbudzona cząsteczka GFP podczas powrotu do swojego stanu podstawowego emituje zielone światło o długości fali ok. 509 nm (ryc. 3) [25].

### 4. SEKWENCJA NUKLEOTYDOWA I AMINOKWASOWA GFP Z *A. VICTORIA*

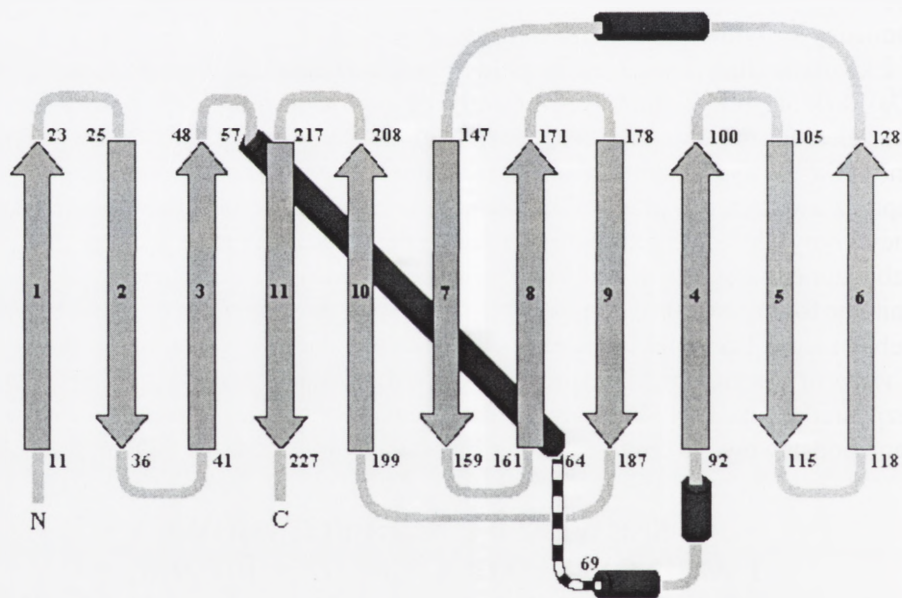
GFP jest białkiem o masie cząsteczkowej około 27 kDa złożonym z 238 aminokwasów, kodowanym przez 3 eksony rozmieszczone w genie o długości 2,6 kb [36]. Oryginalną sekwencję nukleotydową cDNA (*gfp10*) i odpowiadającą jej sekwencję amino-

kwasową przedstawiono w tabeli 1. Większość konstrukcji cDNA wywodzących się z pierwotnej sekwencji zawiera jednak jedną, niezmienną właściwości białka mutację Gln80Arg (Q80R) spowodowaną prawdopodobnie błędem podczas reakcji PCR [43].

## 5. CHARAKTERYSTYKA KRYSTALICZNEJ STRUKTURY GFP Z *A. VICTORIA*

Istnieje wiele wariantów białka GFP o bardzo różnych właściwościach fizykochemicznych i spektralnych (zob. dalej), ale ich struktura krystaliczna jest bardzo podobna. Wykorzystując krystalografię rentgenowską, najwcześniej rozszyfrowano struktury przestrzenne GFPwt [48] i mutantu S65T [33].

Cząsteczka GFP ma postać specyficznej  $\beta$ -baryłki. Yang i współaut. [48] porównali tę strukturę do puszek z zieloną farbą (chromoforem) w środku, stąd w języku angielskim określa się ją często mianem  $\beta$ -can. Składa się ona z 11 przeciwnoległych  $\beta$ -wstążek, które formują ściany zwartej cylindra o średnicy około 30 Å i wysokości około 40 Å. Przez środek tej  $\beta$ -struktury, równoległe do ścian baryłki, biegnie krótki fragment  $\alpha$ -heliksu, w środku którego znajduje się grupa chromoforowa białka. Na obu końcach baryłki mobilne pętle łączą poszczególne  $\beta$ -wstążki tworząc „pokrywki”. Biorą one



RYCINA 5. Topologia GFPwt. Symbolami strzałek zaznaczono 11 ponumerowanych  $\beta$ -wstążek; symbolami walców centralny  $\alpha$ -heliks i krótkie, zewnętrzne segmenty helikalne; heksapeptyd tworzący chromofor czarno-białą teksturą; pętle na kolor jasnoszary. Podano także numery reszt aminokwasowych na początku i na końcu każdej struktury drugorzędowej. N, N-koniec białka; C, C-koniec białka. Na podstawie <http://www.biochemtech.uni-halle.de/PPS2/projects/jonda/Structure.htm>, zmieniono

również udział w ochronie chromoforu przed środowiskiem zewnętrznym. Pętle na jednym z końców  $\beta$ -baryłki tworzą krótkie segmenty helikalne.

Rycina 4 przedstawia struktury przestrzenne GFPwt i najpopularniejszego mutantu S65T. Na rycinie 5 pokazano natomiast schemat topologii jednej z tych cząsteczek.

GFPwt i większość mutantów zostało skryształizowanych jako dimery, ale scharakteryzowano także monomeryczne formy GFP. Forma monomeryczna występuje w rozcieńczonych roztworach GFP, natomiast przy stężeniu białka powyżej 5 mg/ml tworzą się dimery [35]. Jak dotąd nie stwierdzono, czy dimeryczna forma GFP występuje *in vivo* [48].

## 6. STRUKTURALNE I FIZYKOCHEMICZNE WŁAŚCIWOŚCI GFP

Bardzo upakowana, jednodomenowa struktura przestrzenna z chromoforem ulokowanym centralnie wewnątrz cząsteczki i ochranianym przed działaniem środowiska komórkowego może wyjaśnić wiele właściwości GFP, a mianowicie:

- ◆ GFP wyrażane w układach heterologicznych jest w stanie autonomicznie i szybko fałdować. Natomiast formowanie się chromoforu, a tym samym fluorescencja białka jest możliwa dopiero po jego sfałdowaniu. Proces powstawania dojrzałej formy chromoforu jest możliwy tylko w obecności tlenu. Czas od prawidłowego sfałdowania do rozpoczęcia świecenia waha się od kilkudziesięciu minut, nawet do ponad 2 godzin. Jest to zależne zarówno od rodzaju mutantu GFP, jak i od rodzaju komórki i warunków hodowli [43].
- ◆ Dojrzałe GFP jest odporne na denaturację termiczną, utrzymując fluorescencję do temperatury około 65°C [8]. Jednak najefektywniejsze fałdowanie GFP, pochodzącego z żyjącej w zimnych wodach Oceanu Spokojnego *A. victoria*, zachodzi znacznie poniżej 37°C. Ta cecha ograniczała wykorzystanie białka i zmusiła do poszukiwań takich jego wariantów, które dojrzewają efektywniej i są stabilniejsze w zdecydowanie wyższych temperaturach.
- ◆ GFP jest bardzo odporne na denaturację chemiczną, do inaktywacji wymaga działania 6 M chlorowodoru guanidyny, 1% dodecylsulfanu sodowego (SDS), 8 M mocznika, czy pH poniżej 4 lub powyżej 12 [48]. W GFP nie ma mostków dwusiarczkowych, dwie cysteiny występujące w białku, Cys48 i Cys70, nie tworzą między sobą takiego wiązania [23].
- ◆ Działanie silnych związków denaturujących lub temperatury rzędu 90°C powoduje całkowitą denaturację i utratę fluorescencji białka. Jednak przeniesienie GFP do neutralnego środowiska powoduje spontaniczną renaturację białka i odzyskanie właściwości spektralnych [32, 46].
- ◆ GFP ze względu na swoją upakowaną strukturę nie ulega działaniu wielu enzymów proteolitycznych, m.in. trypsyny, chymotrypsyny, pronazy, subtylizyny, termolizyny, papainy aż do stężenia 1 mg/ml, pomimo obecności w białku miejsc cięcia dla tych enzymów [2, 51]. Kiedy Shimomura wycinał chromofor papainą, był w stanie przeprowadzić ten proces dopiero po denaturacji GFP [37, 38].

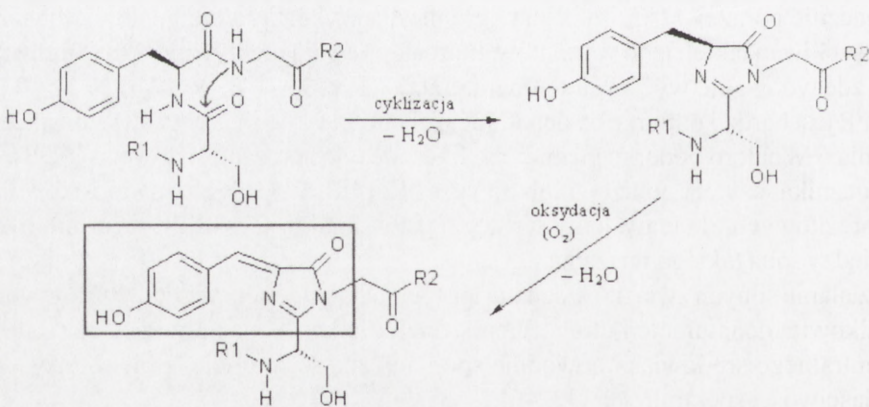


- ◆ Delecja więcej niż N-końcowej metioniny albo więcej niż 7 aminokwasów z C-końca GFP powoduje całkowitą utratę fluorescencji [48]. Prawdopodobnie  $\beta$ -baryłka nie jest w stanie prawidłowo się sfałdować, jeśli w obrębie sekwencji aminokwasowej białka nastąpi nawet niewielka delecja [51].
- ◆ W natywnej formie białka zarówno jego C-, jak i N-koniec wystają z górnej powierzchni baryłki (patrz ryc. 4). Umożliwia to, bez zakłócenia lub zniszczenia struktury GFP, dość łatwe otrzymanie białka fuzyjnego składającego się z GFP i innego białka [5].
- ◆ GFP poddane działaniu bardzo wysokiego ciśnienia, aż do 600 MPa (około 6 tysięcy atmosfer), utrzymuje stały poziom fluorescencji, co jednoznacznie wskazuje na ogromną stabilność struktury trzeciorzędowej białka [12].

## 7. CHARAKTERYSTYKA CHROMOFORU GFP Z *A. VICTORIA*

GFP jest unikatowe wśród innych fluorescencyjnych białek, dlatego że jego chromofor nie jest syntetyzowany oddzielnie jako grupa prostetyczna, ale powstaje ze zmodyfikowanych reszt aminokwasowych białka.

Sekwencja aminokwasowa heksapeptydu tworzącego chromofor GFPwt jest następująca: Phe64–Ser65–Tyr66–Gly67–Val68–Gln69 (FSYGVQ) [5]. Posttranslacyjna, autokatalityczna cyklizacja reszt aminokwasowych 65–67 (zaznaczone pogrubioną czcionką) zachodzi w kilku etapach (ryc. 6) i prowadzi do powstania związku o nazwie 4-(*p*-hydroksybenzylideno)-imidazolo-5-on, aktywnej formy chromoforu, zdolnego do pochłaniania i emisji fotonów światła [7].



RYCINA 6. Mechanizm biosyntezy chromoforu GFP [22]. R1 oznacza reszty aminokwasowe od 1 do 64, natomiast R2 reszty 68–238. Symbolem strzałki oznaczono nukleofilowy atak grupy aminowej Gly67 na grupę karbonylową Ser65, co, po eliminacji  $H_2O$ , powoduje formowanie się pierścienia imidazolowego. W prostokącie pokazano dojrzałą formę chromoforu. Na podstawie <http://www.biochemtech.uni-halle.de/PPS2/projects/jonda/Chromophore.htm>, zmieniono



Pierwszym etapem powstawania aktywnej formy chromoforu jest nukleofilowy atak grupy aminowej Gly67 na grupę karbonylową Ser65. Dalsza eliminacja cząsteczki  $H_2O$  powoduje formowanie się pierścienia imidazolowego. W drugim etapie wiązanie pomiędzy  $C_\alpha$  i  $C_\beta$  Tyr66 jest utleniane komórkowym tlenem cząsteczkowym, co powoduje powstanie podwójnego wiązania pomiędzy tymi atomami. Powstaje w ten sposób duży, zdelo-kalizowany system elektronów p, co umożliwia wystąpienie stanu wzbudzonego chromoforu. Proponowany powyżej schemat bazuje na następujących obserwacjach [22]:

- ◆ Ekspresja świecącego GFP jest możliwa w wielu różnych układach heterologicznych, co pozwala przypuszczać, że aktywny chromofor powstaje bez udziału enzymów.
- ◆ GFP wyrażone w *E. coli* w anaerobowych warunkach nie fluoryzuje, co potwierdza, że  $O_2$  jest konieczny do syntezy aktywnej formy chromoforu i że system elektronów  $\pi$  jest potrzebny do fluorescencji białka.
- ◆ Po przeniesieniu hodowli *E. coli* z warunków beztlenowych do tlenowych, fluorescencja GFP pojawia się dopiero po pewnym czasie. Wskazuje to, że oksydacja wiązania w Tyr66 nie jest katalizowana enzymatycznie.

Pierwszy etap powstawania chromoforu (cyklizacja) jest procesem zachodzącym w komórce dość szybko, reakcją ograniczającą jest oksydacja tyrozyny (etap drugi) [43], której szybkość zależy zarówno od warunków hodowli, jak i rodzaju mutanta GFP [9]. W GFPwt trwa to około 2 godzin, w mutancie S65T – ok. 30 minut.

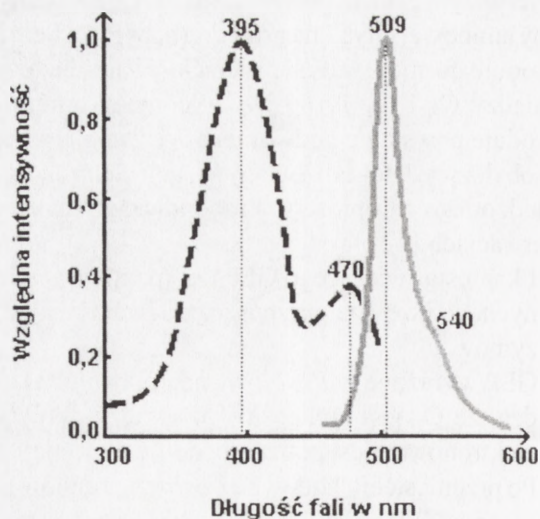
Pomimo tego że sekwencję aminokwasową Ser-Tyr-Gly (SYG) można znaleźć także w wielu innych białkach, nie ulega ona w nich cyklizacji, ani nie następuje oksydacja tyrozyny. W związku z tym białka te także nie fluoryzują. Oznacza to, że tendencja do formowania tego typu chromoforu nie jest cechą samego tripeptydu.

## 8. WIDMA ABSORBANCJI I EMISJI GFPwt

Zdenaturowana forma GFP nie jest zdolna do fluorescencji, a jej widmo absorbancji jest inne niż natywnej formy [7]. Wskazuje to wyraźnie, że niekowalencyjne oddziaływania chromoforu z otoczeniem mają bardzo duży wpływ na charakterystykę spektralną białka, a fluorescencja jest możliwa dzięki słabym wiązaniom z aminokwasami, znajdującymi się głównie w bliskim sąsiedztwie chromoforu. Dlatego jedynie białko sfałdowane w sposób prawidłowy wykazuje natywne właściwości spektralne [51].

Widmo absorbancji GFPwt z *A. victoria* ma dwa maksima – główne przy 395 nm i dodatkowe przy 470 nm. Natomiast widmo fluorescencyjnej emisji ma jedno maksimum przy 509 nm i niewielkie ramię przy 540 nm, co odpowiada długości fali światła zielonego (ryc. 7) [5].

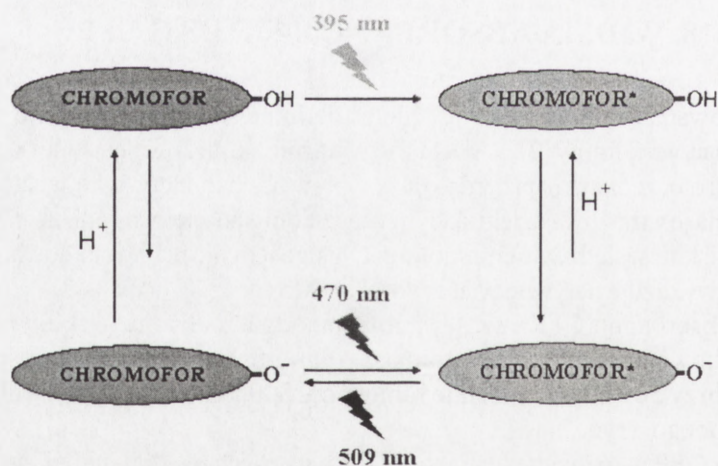
Ekspresja GFP w różnych układach heterologicznych nie powoduje żadnych zmian właściwości spektralnych białka [6]. Poddanie białka działaniu wysokiego pH (zbliżonego do warunków denaturujących przy pH 12) także nie ma znaczącego wpływu na właściwości spektralne GFP [22].



RYCINA 7. Widma absorbancji (linia przerywana) i fluorescencyjnej emisji (linia ciągła) dzikiego typu GFP z *A. victoria*. Na podstawie <http://www.biochemtech.uni-halle.de/PPS2/projects/jonda/Chromophore.htm>, zmieniono

## 9. DZIAŁANIE CHROMOFORU GFP JAKO PRZYKŁAD CYKLU FOERSTERA

GFP jest pierwszym poznany białkiem, w którego rdzeniu zachodzi cykl Foerстера [33, 48]. Dojrzały chromofor może występować zarówno w formie uprotonowanej, jak i nieuprotonowanej. W zależności od tego, czy Tyr66 chromoforu ma grupę hydroksylową czy formę anionową, chromofor pochłania światło o długości fali 395 nm lub 470 nm (ryc. 8). W związku z tym, że fenol wykazuje charakter bardziej kwasowy w stanie wzbudzonym



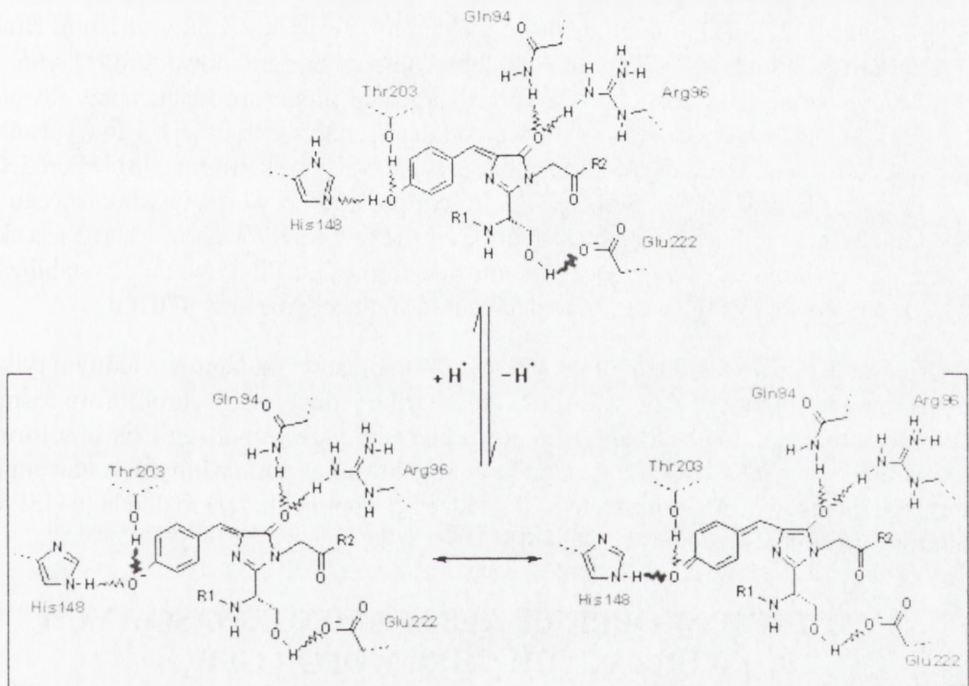
RYCINA 8. Cykl Foerстера zachodzący w chromoforze GFPwt z *A. victoria*: (\*) zaznaczono stan wzbudzony chromoforu; symbolami przypominającymi błyskawice – absorbancję i fluorescencję (emisję) chromoforu. Na podstawie <http://www.biochemtech.uni-halle.de/PPS2/projects/jonda/Chromophore.htm>, zmieniono



cząsteczki niż w stanie podstawowym, uważa się, że uprotonowany stan wzbudzony chromoforu ulega przekształceniu do nieuprotonowanego (anionowego) stanu wzbudzonego. Jest to jedyna forma chromoforu zdolna do emisji (fluorescencji) fotonów światła o długości fali 509 nm. W rezultacie cykl, w którym chromofor pochłania foton, następnie traci proton, emituje foton, a w końcu pobiera proton, zamyka się.

Dzięki znajomości struktury przestrzennej dzikiego typu GFP i mutantu S65T, można zrozumieć spektralny mechanizm działania kilku innych wariantów GFP, które mają tylko jedno maksimum absorpcji bez znaczącego przesunięcia w długości fali. Istotne są tu oddziaływania chromoforu z jego najbliższym otoczeniem. Jak już wcześniej wspomniano, chromofor znajdujący się w rdzeniu białka jest niedostępny dla środowiska komórkowego i oddziałuje z sąsiadującymi resztami aminokwasowymi głównie przez wiązania wodorowe [33, 48] (ryc. 9):

- ◆ Reszty His148, Gln94 i Arg96 stabilizują chromofor i prawdopodobnie umożliwiają delokalizację ładunku na chromoforze.
- ◆ Proton grupy hydroksylowej Thr203 jest donorem wiązania wodorowego dla Tyr66, co może stabilizować anionową formę chromoforu.
- ◆ Proton grupy -OH Ser65 może być donorem wiązania wodorowego dla Glu222, stabilizującego anionową formę glutaminianu. Z powodu elektrostatycznej zawady ładunek ten może uniemożliwiać jonizację Tyr66, faworyzując uprotonowaną formę chromoforu.



RYCINA 9. Niekowalencyjne oddziaływania His148, Thr203, Gln94, Arg96 i Glu222 z chromoforem GFPwt. Wiązania wodorowe zaznaczono zygzakowatymi liniami, natomiast te z nich, które przypuszczalnie stabilizują odpowiednie formy chromoforu, są dodatkowo pogrubione. W prostokątnych klamrach przedstawiono dwie formy przejściowe zdelokalizowanego systemu elektronów  $\pi$ . Na podstawie [http://www.biochemtech.uni-halle.de/PPS2/projects/jonda/flst9\\_1.gif](http://www.biochemtech.uni-halle.de/PPS2/projects/jonda/flst9_1.gif), zmieniono

## 10. GŁÓWNE MUTACJE WARUNKUJĄCE RÓŻNICE WE WŁAŚCIWOŚCIACH SPEKTRALNYCH GFP

Wybiórcza stabilizacja anionowej albo hydroksylowej formy Tyr66 przez specyficzne wiązania wodorowe może tłumaczyć, dlaczego zniszczenie tych wiązań prowadzi do zmian w widmach absorbancji różnych wariantów GFP (ryc. 9):

- ◆ Mutant T203I [11] ma tylko pojedyncze maksimum absorbancji przy 400 nm i takie samo widmo emisyjne jak GFPwt. Świadczy to o tym, że Thr203 rzeczywiście stabilizuje anionową formę Tyr66, która odpowiada za absorbancję przy 470 nm. Ponieważ izoleucyna nie jest w stanie utworzyć wiązania wodorowego, Tyr66 przeważnie występuje w formie uprotonowanej, pochłaniając światło przy 400 nm, ale nie przy 470 nm. Mimo tego nie ma zaburzenia fluorescencji, gdyż wzbudzona forma chromoforu wykazuje na tyle silny charakter kwasowy, by skutecznie oddysocjować proton.
- ◆ Mutanty S65G, S65A i S65V mają pojedyncze maksima absorbancji przy 470–490 nm [33]. W tych wariantach wiązania wodorowe pomiędzy resztą 65 a Glu222 nie mogą powstać, co prowadzi do uprotonowania Glu222, dlatego że zjonizowana forma glutamianu nie jest już stabilizowana. Prawdopodobnie sprzyja to jonizacji Tyr66 i w związku z tym anionowa forma chromoforu pochłania światło przy 470 nm, ale nie przy 395 nm.
- ◆ Wariant E222G [11] ma pojedyncze maksimum absorbancji przy 481 nm. Brak ujemnego ładunku Glu222 prawdopodobnie faworyzuje anionową formę Tyr66.
- ◆ Najpopularniejszy wariant S65T ma pojedyncze maksimum absorbancji przy 489 nm [33]. Jednak przyczyna tego w tym przypadku jest znacznie trudniejsza do wyjaśnienia. Autorzy podkreślają, że Thr65 może przyjmować inną konformację niż Ser65. O ile grupa hydroksylowa Ser65 jest donorem protonu do wiązania wodorowego z Glu222, co stabilizuje zjonizowaną formę Glu, to grupa hydroksylowa Thr65 jest akceptorem protonu, stabilizując uprotonowaną formę Glu222. Powoduje to stabilizację anionowej formy Tyr66, która pochłania światło jedynie przy 470 nm.

Nieprzypadkowo tak dużo miejsca poświęcono opisowi mutantów z jednym tylko maksimum absorbancji. Z powodu stabilności tylko jednej formy chromoforu rośnie amplituda maksimum absorbancji, co powoduje silniejsze wzbudzenie chromoforu i tym samym (w większości znanych przypadków i w połączeniu z innymi mutacjami) wzmacnia intensywność fluorescencji. W znacznym stopniu ułatwia to detekcję GFP w mikroskopie fluorescencyjnym [3, 21, 43].

## 11. MUTACJE W OBRĘBIE RESZT AMINOKWASOWYCH TWORZĄCYCH CHROMOFOR GFP

Omówione zostanie jedynie kilka przykładów zmian w obrębie trzech aminokwasów tworzących cykliczną, a następnie aktywną formę chromoforu białkowego:

- ◆ O mutacjach Ser65 wspomniano już wcześniej.



- ◆ Ponieważ aromatyczny pierścień Tyr66 jest częścią dużego, zdelokalizowanego systemu elektronów  $\pi$  chromoforu, nie można się spodziewać, aby wymiana Tyr66 na inny, niearomatyczny aminokwas umożliwiła fluorescencję. I tak rzeczywiście jest. Jedynymi aktywnymi fluorescencyjnie wariantami, które znaleziono, były mutanty Y66H, Y66W i Y66F [22]. W porównaniu z GFPwt, Y66H wykazuje przesunięcie maksimum absorpcji i fluorescencji w kierunku światła niebieskiego. Mutant Y66W wykazuje przesunięcie maksimum absorpcji w kierunku światła czerwonego, natomiast fluorescencji w kierunku światła niebieskiego. Fluorescencja obu mutantów jest jednak znacznie słabsza w porównaniu z dzikim typem GFP.
- ◆ Gly67 jest jedynym aminokwasem, który nie może zostać wymieniony na inny bez utraty fluorescencji. Prawdopodobnie grupy boczne innych aminokwasów stanowią zbyt dużą zawadę przestrzenną przeszkadzającą w cyklizacji chromoforu [50].

## 12. SPEKTRALNA KLASYFIKACJA WARIANTÓW GFP

Ze względu na mnogość i różnorodność istniejących mutantów GFP zwykle stosuje się wygodną ze względów praktycznych klasyfikację spektralną. Tsien [43] dokonał podziału wariantów GFP na 7 klas, bazując na odmiennej budowie i różnych właściwościach chromoforu:

- ◆ **Klasa 1**, obecne obie formy chromoforu – uprotonowana i nieuprotonowana.
- ◆ **Klasa 2**, stabilna forma anionowa chromoforu.
- ◆ **Klasa 3**, stabilna forma hydroksylowa chromoforu.
- ◆ **Klasa 4**, anionowa forma fenolu z dodatkowo nałożonym zdelokalizowanym systemem elektronów  $\pi$  (*Yellow Fluorescent Protein*).
- ◆ **Klasa 5**, grupa indolowa w chromoforze (*Cyan Fluorescent Protein*).
- ◆ **Klasa 6**, grupa imidazolowa w chromoforze (*Blue Fluorescent Protein*).
- ◆ **Klasa 7**, grupa fenylova w chromoforze.

### Klasa 1

Głównym reprezentantem tej klasy jest GFPwt i wariant z mutacją Q80R, o której była mowa wcześniej. Obecnie dziki typ GFP wykorzystuje się tylko w szczególnych okolicznościach, dlatego że ma wiele niepożądanych cech: niski poziom fluorescencji (wprawdzie naświetlanie falami o długości 395 nm (światło UV) pozwala osiągnąć wyższą intensywność fluorescencji, ale jest szkodliwe dla oczu i badanych komórek), długi czas formowania się aktywnej formy chromoforu, duża wrażliwość na temperaturę i nieefektywne sfałdowanie białka w wyższych temperaturach, tendencja do agregacji w wyższych stężeniach.

Potrójny mutant F99S, M153T, V163A (zwany potocznie *Cycle 3*) przyczynił się do rozwiązania dwóch ostatnich problemów. Nie poprawiło to jednak w sposób znaczący intensywności świecenia GFP, a wzrost fluorescencji jest w tym przypadku efektem zwiększenia liczby poprawnie sfałdowanych cząsteczek białka.

## Klasa 2

Mutanty takie są obecnie najczęściej wykorzystywane jako narzędzia w badaniach naukowych, gdyż były pierwszą grupą białek GFP, która łączyła dwie ważne cechy: poprawę poziomu fluorescencji z prostym sposobem wzbudzenia i detekcji w zakresie światła widzialnego. Najczęściej używaną mutacją powodującą stabilizację formy jonowej chromoforu jest S65T. Zamiana Thr na Gly, Ala, Cys czy Leu daje podobny efekt. Potrójny mutant F64M, S65G, Q69L, znany potocznie pod nazwą RSGFP4, jest bardzo popularny w tej klasie i został otrzymany przez przypadkową mutagenezę. Zarówno S65T, jak i RSGFP4 mają tylko pojedyncze maksima absorbancji o sześcio-krotnie większej amplitudzie w porównaniu z GFPwt i nieznacznie przesuniętej długości fali do 489–490 nm, a także normalne maksima emisji przy ok. 509 nm. Oksydacja Tyr66 jest 4-krotnie szybsza w wariantcie S65T niż w GFPwt, jednak jego fałdowanie, podobnie jak GFPwt, jest najefektywniejsze w temperaturach znacznie poniżej 37°C. Znaleziono jednak takie mutacje, które umożliwiały efektywne fałdowanie mutantów w wyższych temperaturach, co zaowocowało powstaniem wariantów o mieszanych właściwościach (zob. dalej).

## Klasa 3

Jonizacja chromoforu może także zostać zablokowana. Mutacja T203I praktycznie blokuje powstanie maksimum absorbancji przy 470 nm. Natomiast forma uprotonowana chromoforu jest faworyzowana, co przekłada się na jedno maksimum absorbancji przy 400 nm. Jednakże maksimum emisji ciągle pozostaje przy ok. 509 nm, dlatego że wzbudzony chromofor jest dostatecznie kwasowy, by oddysocjować proton. Mutant ten i jego pochodne o poprawionej efektywności fałdowania w wyższych temperaturach mogą być cenną alternatywą dla GFPwt. Z powodu braku maksimum absorbancji przy 470 nm mutanty te mogą być wykorzystywane razem z mutantami klasy 2 np. do podwójnego znakowania. Obrazy otrzymane przez wzbudzenie falami o długości ok. 400 nm i ok. 480 nm można ze sobą porównywać mierząc poziom fluorescencji przy ok. 509 nm.

## Klasa 4

Jest to szczególna klasa białek mająca najbardziej ze wszystkich klas przesunięte widma absorbancji i emisji w kierunku dłuższych fal. Jest to spowodowane nałożeniem na chromofor dodatkowego pierścienia aromatycznego. Jak dotąd pierścień ten zawsze pochodzi z zamiany Thr203 na His, Trp, Phe lub Tyr. Dodatkowo zwykle Ser65 jest zamieniana na Thr lub Gly, aby umożliwić jonizację chromoforu. Mutacja w pozycji 203 białka była zmianą przeprowadzoną przy wykorzystaniu mutagenazy ukierunkowanej. Z powodu przesunięcia maksimum emisji w kierunku dłuższych fal światła (ok. 527 nm) ta klasa białek fluoryzuje na kolor żółtawy z domieszką zielonego, a nie na kolor czysto zielony, dlatego nazywa się ją YFP (*Yellow Fluorescent Proteins*).

## Klasa 5

Zamiana Tyr66 na Trp (Y66W) powoduje powstanie chromoforu z grupą indolową zamiast fenolowej. Maksima absorbancji i emisji to odpowiednio 436 nm i 476 nm,



pośrednie pomiędzy klasą 2. i 3. Aby jednak fluorescencja tej klasy mutantów osiągnęła dobry poziom, potrzebne jest wprowadzenie wielu dodatkowych mutacji. Mutanty te zwane są CFP (*Cyan Fluorescent Proteins*) z powodu niebieskozielonego (turkusowego) koloru emisji. Zaskakującą i do dziś niewyjaśnioną cechą obu widm tej klasy mutantów jest dwugarbny kształt maksimów absorpcji i emisji.

### Klasa 6

Zamiana Tyr66 na His (Y66H) powoduje powstanie chromoforu z grupą imidazolową zamiast fenolowej. Maksima absorpcji i emisji są przesunięte w kierunku jeszcze krótszych fal światła niż w CFP i jest to odpowiednio ok. 383 nm i ok. 447 nm, dlatego też kolor fluorescencji tych mutantów jest niebieski. Jak zwykle poprawę efektywności fałdowania w wyższych temperaturach uzyskuje się poprzez dodatkowe mutacje, lecz pomimo tego poziom fluorescencji Y66H pozostaje dość niski. Z powodu niebieskiego koloru emisji tę klasę często nazywa się BFP (*Blue Fluorescent Proteins*), jednak w tym przypadku istnieje zamęt nomenklaturowy, gdyż tą samą nazwą czasami określa się świecący na niebiesko kompleks ekworyny ze wzbudzonym koelenteramidem, opisany w punkcie 3. BFP i białka klasy 3. także można używać do podwójnego znakowania np. struktur komórkowych, dlatego że obie klasy białek mogą ulec wzbudzeniu przy ok. 390 nm.

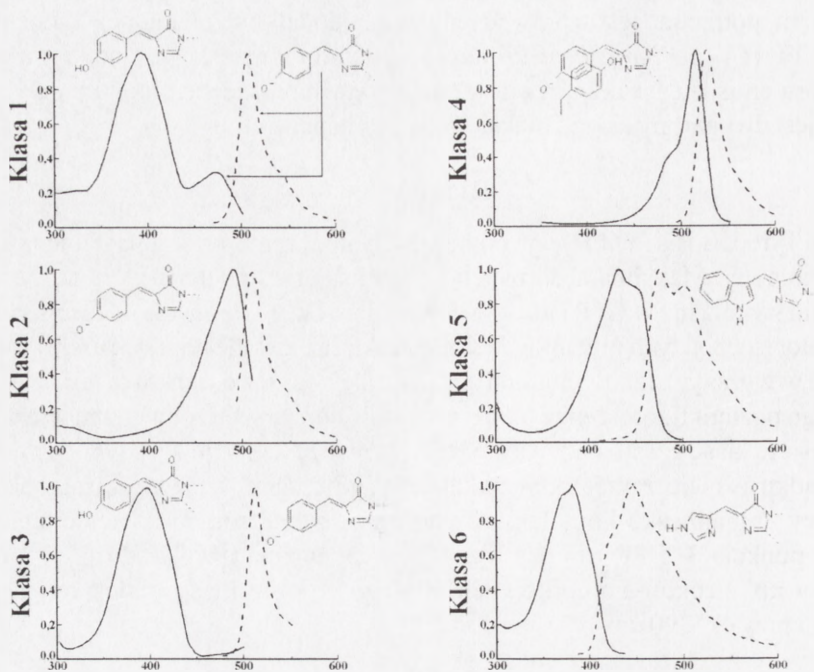
### Klasa 7

Zamiana Tyr66 na Phe (Y66F) powoduje powstanie chromoforu z grupą fenyłową zamiast fenolowej. Klasa ta ma maksima absorpcji i emisji przy bardzo małych długościach fal – 360 nm i 442 nm. Właśnie z tego powodu mutant ten ma małe zastosowanie praktyczne i w związku z tym jest słabo zbadany. Jednakże przypadek ten udowadnia, że każdy aminokwas aromatyczny wstawiony w pozycję 66 białka może stworzyć aktywną formę chromoforu.

Podsumowanie ilustrujące widma absorpcji i emisji dla 6 najczęściej wykorzystywanych klas mutantów GFP przedstawiono na rycinie 10.

## 13. MUTACJE POPRAWIAJĄCE INNE WŁAŚCIWOŚCI GFP

Jak już kilkakrotnie wspomiano, GFPwt z powodu swojego pochodzenia gatunkowego najefektywniej fałduje się w temperaturach znacznie niższych niż 37°C, utrudniając tym samym wykorzystanie tego białka w większości badań laboratoryjnych. Spowodowało to konieczność znalezienia takich mutacji, które poprawią warunki fałdowania w wyższych temperaturach. Znaleziono wiele takich mutacji, głównie wymieniając reszty aminokwasowe oddziałujące z rozpuszczalnikiem na mniejsze, co zwiększyło stabilność struktury trzeciorzędowej [40, 43]. Także zamiana kilku powierzchniowych aminokwasów hydrofobowych na hydrofilowe spowodowała dodatkowo wzrost szybkości fałdowania białka, zmniejszając tym samym prawdopodobieństwo jego agregacji [40, 51]. Przykładami takich mutacji są F99S, M153T,



RYCINA 10. Widma absorancji (linie ciągłe) i fluorescencji (linie przerywane) dla przedstawicieli 6 pierwszych klas mutantów GFP, razem ze strukturami chromoforu, które uważa się za odpowiadające za poszczególne maksima. Maksima zostały znormalizowane do amplitudy 1, dlatego też nie odzwierciedlają faktycznego poziomu fluorescencji [52]. Na podstawie [43], zmieniono

V163A, N149K, I167T [40, 43, 51]. W przeciwieństwie do mutantów spektralnych, które w większości otrzymywano mutując przypadkowe aminokwasy i obserwując właściwości białka po mutacji, ta klasa mutacji bazuje na przewidywaniach ich wpływu na proces fałdowania.

Inną klasą są mutacje skracające czas dojrzewania chromoforu, a tym samym przyspieszające otrzymanie świecącego GFP. Są to głównie mutacje reszt leżących w pobliżu chromoforu, np. S65T, A, G lub L; F64L; S72A. W przeciwieństwie jednak do mutacji powierzchniowych, te bazują raczej na przypadkowej mutageniezie i późniejszej charakterystyce białka [40, 43, 51].

Warto podkreślić, że mutacje poprawiające skuteczność fałdowania w wyższych temperaturach i przyspieszające syntezę i dojrzewanie chromoforu GFP są praktycznie zawsze obecne w mutantach wykorzystywanych jako rutynowe narzędzia badawcze. Można tworzyć wiele kombinacji tych mutacji, co w większości przypadków nie wpływa na własności spektralne poszczególnych klas mutantów [43].



## 14. BIAŁKA PODOBNE DO GFP *AEQUOREA VICTORIA*

Najbardziej znanym i najintensywniej wykorzystywanym i badanym białkiem fluorescencyjnym jest GFP pochodzące z *Aequorea victoria* (czasem dla odróżnienia zwane A-GFP). Białka podobne strukturalnie, a często także fizykochemicznie, można znaleźć także w wielu innych organizmach należących do typu parzydełkowców (*Cnidaria*). Wydaje się, że białka te są charakterystyczne jedynie dla *Cnidaria*, gdyż jak dotąd nie znaleziono ich u przedstawicieli innych spokrewnionych typów [28].

Najbardziej znanym przykładem jest GFP występujące u kilku przedstawicieli rodzaju *Renilla* należącego do gromady koralowców (*Anthozoa*). Czasami białko to, dla odróżnienia od GFP z *A. victoria*, określane jest skrótem R-GFP. Pomimo tego że R-GFP jest znane i badane od ponad 30 lat [31, 47], dopiero niedawno zostało zsekwencjonowane, dlatego też jak na razie rzadko jest wykorzystywane jako narzędzie w badaniach naukowych [51]. GFP z *Renilla* sp. wykazuje 25% homologii sekwencji aminokwasowej z A-GFP [34] i 39–48% homologii z innymi fluorescencyjnymi białkami pochodzącymi z innych gatunków *Anthozoa*. A-GFP i R-GFP mają podobną sekwencję aminokwasową chromoforów, jednak nie są to sekwencje identyczne (FSYGDR u R-GFP zamiast FSYGVQ u A-GFP) [5]. Jak widać, pierwsze 4 aminokwasy zaangażowane bezpośrednio w cyklizację są identyczne, natomiast dwa pozostałe są w tych białkach różne. Powoduje to, że białka te mają także odmienne właściwości spektralne. R-GFPwt, w przeciwieństwie do A-GFPwt, ma tylko jedno maksimum absorpcji przy ok. 498 nm, natomiast maksima emisji obu białek są zbliżone [5].

Białka podobne do GFP występują także u innych przedstawicieli koralowców żyjących w ciepłych oceanicznych wodach, np. *Ptilosarcus guernyi*. GFP pochodzące z *Renilla* sp. i z *P. guernyi* wykazują większą intensywność fluorescencji niż A-GFP, dlatego też są dobrymi kandydatami do wykorzystania jako wewnątrzkomórkowe geny reporterowe [34]. Porównanie właściwości fizykochemicznych obu powyższych białek z A-GFP sugeruje, że ich struktura przestrzenna nie odbiega znacząco od struktury krystalicznej A-GFP [34]. W 2003 roku odkryto także niefluoryzujące białko podobne do GFP pochodzące z *A. coerulea*, niebioluminescencyjnego słuźbiopława spokrewnionego z *A. victoria*. Jak dotychczas nie ustalono, jaką funkcję spełnia to białko w organizmie gospodarza [19].

Metody biologii molekularnej posłużyły do poszukiwań białek GFP o lepszych właściwościach spektralnych i intensywniejszej fluorescencji niż GFP z *A. victoria*. Analizując białka izolowane z wybranych przedstawicieli gromady koralowców natknięto się na 6 bardzo ciekawych molekuł o pożądanym cechach fizykochemicznych. Wszystkie pochodziły z przedstawicieli rodzaju *Discosoma* [27]. Pomimo tego że podobieństwo sekwencji aminokwasowych tych białek z A-GFP wynosi tylko od 26% do 30%, ich struktury przestrzenne okazały się bardzo do siebie zbliżone [42]. Kolor fluorescencyjnej emisji jednego z powyższych białek okazał się czerwony, stąd potocznie nazywa się je DsRed (drFP583 według oryginalnej nomenklatury Matza [27]). Maksimum emisji dzikiego typu tego białka przypada na ok. 583 nm i może być przesunięte jeszcze

bardziej w kierunku dłuższych fal światła. Poddając cDNA DsRed przypadkowej mutagenzie otrzymano mutantą o najdalej jak dotąd położonym maksimum fluorescencji, przypadającym na 616 nm [13]. Mechanizm formowania się chromoforu w początkowych fazach okazuje się zaskakująco podobny do tego z A-GFP. Jednak w kolejnym etapie następuje dodatkowa dehydrogenacja w obrębie Gln66, co powoduje powstanie dojrzałego chromoforu, którego fluorescencja ma barwę czerwoną [18]. Kilka lat temu dwie grupy badawcze oddzielnie rozwikłały i opublikowały strukturę krystaliczną DsRed [45, 49]. Jak podejrzewano wcześniej [1, 20], białko to występuje praktycznie zawsze w formie tetrameru i składa się z 11 przeciwrównoległych  $\beta$ -wstążek tworzących ściany  $\beta$ -baryłki. Większość różnic pomiędzy strukturą A-GFP a DsRed dotyczy pętli tworzących „pokrywkę” cylindra.

Dzięki swoim właściwościom spektralnym DsRed jest obecnie głównie wykorzystywane wraz z wariantami GFP do śledzenia losu kilku białek jednocześnie. Jest także idealnym partnerem dla YFP w technice FRET [51] (zobacz także towarzyszący artykuł [4]). Te zalety są głównym powodem tak znaczącego zainteresowania DsRed w ostatnich latach. Poznanie struktury przestrzennej dało także możliwość konstrukcji nowych mutantów tego białka [42, 49], także takich, które zmieniają swój kolor w czasie [41]. W przyszłości takie działania powinny zaowocować szerszym wykorzystaniem DsRed w różnego rodzaju eksperymentach biologicznych.

Od czasu odkrycia pierwszych białek podobnych do GFP udało się sklonować około 100 przedstawicieli tej rodziny z wielu różnych gatunków gromady koralowców [27, 44]. Pomimo dużej różnorodności w budowie chromoforu i właściwościach spektralnych tych białek, większość wykazuje podobne cechy strukturalne i fizykochemiczne. Duża liczba komercyjnie dostępnych białek z tej rodziny i bogactwo kolorów ich fluorescencyjnej emisji pozwoliło na zwiększenie możliwości znanych już metod badawczych, w których wykorzystywane jest GFP i jego mutanty [28, 44], a w przyszłości daje także szanse na stworzenie nowych, zaawansowanych technik.

## 15. PODSUMOWANIE

Już od ponad dekady GFP jest szeroko wykorzystywane jako narzędzie w różnego typu badaniach biologicznych. Pomimo wielu eksperymentów, które przeprowadzono w celu zbadania jego struktury i właściwości fizykochemicznych, wiele zagadnień dotyczących formowania się chromoforu, warunków fałdowania się białka i jego fotochemii pozostaje nadal nierozwiązanych. Wyjaśnienie tych zagadnień nie tylko umożliwi zgłębienie niepoznanych jak dotąd właściwości GFP, ale także pozwoli na stworzenie nowych, bardziej zaawansowanych technik wykorzystujących to białko i doprowadzi zapewne do udoskonalenia już istniejących.

Poznanie innych białek podobnych do GFP jest pomocne w odtwarzaniu ewolucji fluorescencyjnych białek [28], może też doprowadzić do znalezienia narzędzi badawczych dogodniejszych niż GFP z *A. victoria*. Białka podobne do GFP pochodzące z koralowców już obecnie zyskują przychylność badaczy i są coraz częściej wykorzystywane. Ich odkrycie pokazało również, że możemy się spodziewać znalezienia



innych tego typu białek o cennych właściwościach spektralnych, jednocześnie cechujących się dużą stabilnością, zdolnością do szybkiego łańdowania i dojrzewania w temperaturach zbliżonych do fizjologicznych dla ssaków.

Najważniejsze zastosowania GFP w różnego typu badaniach biologicznych omawia towarzyszący artykuł [4].

## PODZIĘKOWANIA

Autorzy serdecznie dziękują Sylwii Cichosz za korektę stylistyczną niniejszej pracy.

## 16. LITERATURA

- [1] BAIRD GS, ZACHARIAS DA, TSIEN RY. Biochemistry, mutagenesis and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 11984–11989.
- [2] BOKMAN SH, WARD WW. Renaturation of *Aequorea* green fluorescent protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1981; **101**: 1372–1380.
- [3] BOXER SG. Another green revolution. *Nature* 1996; **383**: 484–485.
- [4] BREWCZYNSKI K, FRONK J. Wykorzystanie zielonego białka fluorescencyjnego GFP w badaniach biologicznych. *Post Biol Kom* 2004; **31,3**:421–440.
- [5] CHALFIE M. Green fluorescent protein. *Photochem Photobiol* 1995; **62**: 651–656.
- [6] CHALFIE M, TU Y, EUSKIRCHEN G, WARD WW, PRASHER DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 1994; **263**: 802–805.
- [7] CODY CW, PRASHER DC, WESTLER WM, PENDERGAST WM, WARD WW. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green fluorescent protein. *Biochemistry* 1993; **32**: 1212–1218.
- [8] CUBITT AB, HIEM R, ADAMS SR, BOYD AE, GROSS LA, TSIEN RY. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* 1995; **20**: 448–455.
- [9] CUBITT AB, WOOLLENWEBER LA, HEIM R. Understanding structure-function relationships in the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Methods Cell Biol* 1999; **58**: 19–30.
- [10] EHRHARDT D. GFP technology for live cell imaging. *Curr Opin Plant Biol* 2003; **6**: 622–628.
- [11] EHRIG T, O’KANE DJ, PRENDERGAST FG. Green fluorescent protein mutants with altered fluorescence excitation spectra. *FEBS Lett* 1995; **367**: 163–166.
- [12] EHRMANN MA, SCHEYHING CH, VOGEL RF. *In vitro* stability and expression of green fluorescent protein under high pressure conditions. *Lett Appl Microbiol* 2001; **32**: 230–234.
- [13] FRADKOV AF, CHEN Y, DING L, BARSOVA, EV, MATZ MV, LUKYANOV SA. Novel fluorescent protein from *Discosoma* coral and its mutants possesses a unique far-red fluorescence. *FEBS Lett* 2000; **479**: 127–130.
- [14] GERDES HH, KAETHER C. Green fluorescent protein: applications in cell biology. *FEBS Lett* 1996; **389**: 44–47.
- [15] Green Fluorescent Protein: Methods in Cell Biology. SULIVAN KF, KAY SA [red.] San Diego: Academic Press 1998;**58**.
- [16] Green Fluorescent Protein: Methods in Enzymology. CONN PM [red.] San Diego: Academic Press 1999; **302**.
- [17] Green Fluorescent Protein: Properties, Applications and Protocols. CHALFIE M, KAIN S [red.] New York: Wiley-Liss 1998.
- [18] GROSS LA, BAIRD GS, HOFFMAN RC, BALDRIDGE KK, TSIEN RY. The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 11990–11995.
- [19] GURSKAYA NG, FRADKOV AF, POUNKOVA NI, STAROVEROV DB, BULINA ME, YANUSHEVICH YG, LABAS YA, LUKYANOV S, LUKYANOV KA. A colourless green fluorescent protein homologue from the non-fluorescent hydromedusa *Aequorea coerulescens* and its fluorescent mutants. *Biochem J* 2003; **373**: 403–408.
- [20] HEIKAL AA, HESS ST, BAIRD GS, TSIEN RY, WEBB WW. Molecular spectroscopy and dynamics of intrinsically fluorescent proteins: coral red (dsRed) and yellow (Citrine). *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 11996–12001.
- [21] HEIM R, CUBITT AB, TSIEN RY. Improved green fluorescence. *Nature* 1995; **373**: 663–664.



- [22] HEIM R, PRASHER DC, TSIEN RY. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 12501–12504.
- [23] INOUE S, TSUJI FI. *Aequorea* green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett* 1994; **341**: 277–280.
- [24] JOHNSON FH, SHIMOMURA O. Bioluminescence and chemiluminescence. *Methods Enzymol* 1978; **57**: 271–291.
- [25] KENDALL JM, BADMINTON MN. *Aequorea victoria* bioluminescence moves into an exciting new era. *Trends Biotechnol* 1998; **16**: 216–224.
- [26] MARCH JC, RAO G, BENTLEY WE. Biotechnological applications of green fluorescent protein. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003; **62**: 303–315.
- [27] MATZ MV, FRADKOV AF, LABAS YA, SAVITSKY AP, ZARAISKY AG, MARKELOV ML, LUKYANOV SA. Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. *Nature Biotechnol* 1999; **17**: 969–973.
- [28] MATZ MV, LUKYANOV KA, LUKYANOV SA. Family of green fluorescent protein: journey to the end of the rainbow. *BioEssays* 2002; **24**: 953–959.
- [29] MILL CE. 1999–2004. Bioluminescence of *Aequorea*, a hydromedusa. Dokument internetowy dostępny na <http://faculty.washington.edu/cemills/Aequorea.html>. Opublikowany przez autora; strona została stworzona w czerwcu 1999 roku, ostatnio modyfikowana 22 kwietnia 2004.
- [30] MISTELI T, SPECTOR DL. Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nature Biotech* 1997; **15**: 961–964.
- [31] MORIN JG, HASTINGS JW. Energy transfer in a bioluminescent system. *J Cell Physiol* 1971; **77**: 313–318.
- [32] NISHIUCHI YI, INUI T, NISHIO H, BODI J, KIMURA T, TSUJI FI, SAKAKIBARA S. Chemical synthesis of the precursor molecule of the *Aequorea* green fluorescent protein, subsequent folding, and development of fluorescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 13549–13554.
- [33] ORMOE M, CUBITT AB, KALLIO K, GROSS LA, TSIEN RY, REMINGTON SJ. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 1996; **273**: 1392–1395.
- [34] PEELE B, GURURAJA TL, PAYAN DG, ANDERSON DC. Characterization and use of green fluorescent proteins from *Renilla mulleri* and *Ptilosarcus guernei* for the human cell display of functional peptides. *J Protein Chem* 2001; **20**: 507–519.
- [35] PHILIPS GN Jr. Structure and dynamics of green fluorescent protein. *Curr Opin Struct Biol* 1997; **7**: 821–827.
- [36] PRASHER DC, ECKENRODE VK, WARD WW, PRENDERGAST FG, CORMIER MJ. Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Gene* 1992; **111**: 229–233.
- [37] SHIMOMURA O. Structure of the chromophore of *Aequorea* green fluorescent protein. *FEBS Lett* 1979; **104**: 220–222.
- [38] SHIMOMURA O. [w] CHALFIE M, KAIN S [red.] Green Fluorescent Protein: Properties, Applications and Protocols. New York: Wiley-Liss 1998.
- [39] SHIMOMURA O, JOHNSON FH, SAIGA Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 1962; **59**: 223–239.
- [40] SIEMERING KR, GOLBIK R, SEVER R, HESELOFF J. Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Curr Biol* 1996; **6**: 1653–1663.
- [41] TERSKIKH A, FRADKOV A, ERMAKOVA G, ZARAISKY A, TAN P, KAJAVA AV, ZHAO X, LUKYANOV S, MATZ M, KIM S, WEISSMAN I, SIEBERT P. „Fluorescent timer”: protein that changes color with time. *Science* 2000; **290**: 1585–1588.
- [42] TSIEN RY. Rosy dawn for fluorescent proteins. *Nature Biotechnol* 1999; **17**: 956–957.
- [43] TSIEN RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 1998; **67**: 509–544.
- [44] VERKHUSHA VV, LUKYANOV KA. The molecular properties and applications of *Anthozoa* fluorescent proteins and chromoproteins. *Nat Biotechnol* 2004; **22**: 289–296.
- [45] WALL MA, SOCOLICH M, RANGANATHAN R. The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed. *Nature Struct Biol* 2000; **7**: 1133–1138.
- [46] WARD WW, BOKMAN SH. Reversible denaturation of *Aequorea* green fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein. *Biochemistry* 1982; **21**: 4535–4540.
- [47] WARD WW, CORMIER MJ. An energy transfer protein in coelenterate bioluminescence. Characterization of the *Renilla* green-fluorescent protein. *J Biol Chem* 1979; **254**: 781–788.
- [48] YANG F, MOSS LG, PHILLIPS GN Jr. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnol* 1996; **14**: 1246–1251.

- [49] YARBROUGH D, WACHTER RM, KALLIO K, MATZ MV, REMINGTON SJ. Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 462–467.
- [50] YOUNG DC, MICHEL-BEYERLE ME. Structure and fluorescence mechanism of GFP. *Nature Biotechnol* 1996; **14**: 1219–1220.
- [51] ZIMMER M. Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem Rev* 2002; **102**: 759–781.

*Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak*

*Otrzymano: 04.02.2004 r.*

*Przyjęto: 05.05.2004 r.*

*02-096 Warszawa, ul. Miecznikowa 1*

*fronk@biol.uw.edu.pl*

Journal of  
Clinical  
Research  
Volume 1, Number 1  
2010

Journal of  
Clinical  
Research  
Volume 1, Number 1  
2010



## WYKORZYSTANIE ZIEŁONEGO BIAŁKA FLUORESCENCYJNEGO GFP W BADANIACH BIOLOGICZNYCH\*

APPLICATION OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP)  
IN BIOLOGICAL RESEARCH

Krzysztof BREWCZYŃSKI, Jan FRONK

Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Biochemii, Wydział Biologii  
Uniwersytetu Warszawskiego

*Streszczenie:* Unikatowe właściwości zielonego białka fluorescencyjnego GFP (*Green Fluorescent Protein*) są głównym powodem powszechnego wykorzystania tego białka w biologii komórki i biologii molekularnej. W pracy tej zostaną zaprezentowane najważniejsze sposoby wykorzystania GFP, takie jak monitorowanie ekspresji genów, badanie dynamiki wewnątrzkomórkowej i oddziaływań międzycząsteczkowych białek oraz tzw. monitorowanie biologiczne. Niedawne odkrycie białek podobnych do GFP rozszerza możliwości znanych technik badawczych, w których wykorzystywane jest to białko, a także daje nadzieje na powstanie nowych, które w najbliższej przyszłości znajdą zastosowanie w kompleksowych eksperymentach cytologicznych i proteomicznych.

*Słowa kluczowe:* GFP, *Aequorea victoria*, znacznik fuzyjny, gen reporterowy, FRAP, FRET, wskaźnik pH, czujnik wapniowy, monitorowanie biologiczne.

*Summary:* The unique properties of Green Fluorescent Protein (GFP) are the main reason of its common use as a tool in cell and molecular biology. This work gives an overview of some of the major applications of GFP such as protein tagging, monitoring of gene expression and protein interactions as well as use in biological screening. The recent discoveries of fluorescent proteins from many *Anthozoa* species expand the applicabilities of already know techniques and enable creation of new ones, which will be useful in high-throughput cytological and proteomic experiments.

*Key words:* green fluorescent protein (GFP), *Aequorea victoria*, fusion tag, reporter gene, FRAP, FRET, pH indicator, calcium indicator, biological screening.

\*Artykuł ten i praca towarzysząca stanowią skróconą wersję pracy licencjackiej K.B.

## 1. WSTĘP

Białko GFP (*Green Fluorescent Protein*), którego budowę i właściwości szczegółowo opisano w towarzyszącym artykule [10], jest obecnie powszechnie wykorzystywanym narzędziem w badaniach biologicznych. Z powodu niezwykle szybko rosnącego zainteresowania tym białkiem w ostatniej dekadzie i bardzo dużej liczby doniesień o nowych i coraz bardziej szczegółowych zastosowaniach GFP w różnych dziedzinach biologii, w pracy tej zostaną przedstawione tylko te najważniejsze i najczęściej wykorzystywane.

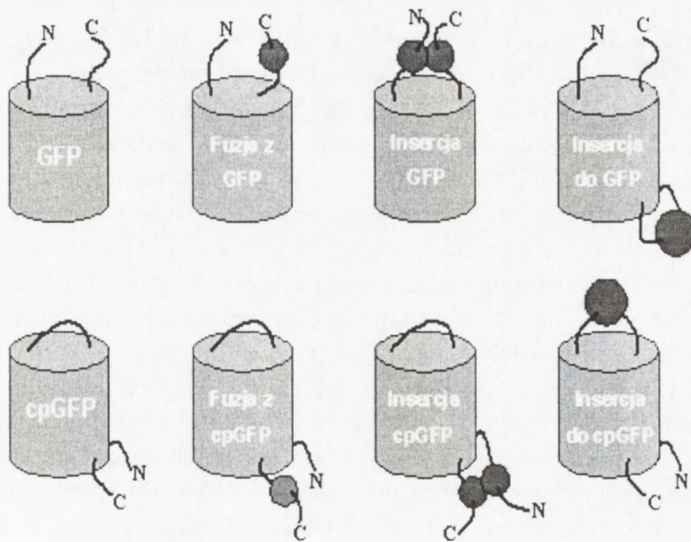
## 2. GFP JAKO ZNACZNIK (TAG) W FUZJI Z BADANYM BIAŁKIEM

Najpowszechniejszą dziś formą wykorzystania GFP jest badanie lokalizacji i losu białek w różnych rodzajach komórek i organizmów [24, 57]. Dodatkowe usprawnienia tej metody dają także możliwość wizualizacji dynamiki procesów wewnątrzkomórkowych [5, 24, 53]. Fuzja pomiędzy genem kodującym badane białko i cDNA GFP może zostać przeprowadzona przy wykorzystaniu standardowych technik subklonowania. Takie białko fuzyjne może być następnie z powodzeniem poddane ekspresji w wielu rodzajach komórek lub tkanek. Stworzono wiele rodzajów wektorów ekspresyjnych zawierających cDNA GFP, do których w MCS (*Multi-cloning Site*) wstawia się gen lub cDNA badanego białka. Wektory takie zawierają zwykle warianty GFP o poprawionych właściwościach spektralnych, w których także dokonano optymalizacji kodonów na potrzeby ekspresji w komórkach różnych organizmów. Aby zwiększyć poziom ekspresji białka fuzyjnego, konstrukcje takie zwykle są pod kontrolą silnych promotorów, np. z wirusa cytomegalii [115].

Poziom ekspresji GFP zależy od wielu czynników. U roślin na przykład bardzo istotną rzeczą jest zmiana kilku nukleotydów, aby wyeliminować ukryte miejsce splicingowe [35]. Optymalizacja kodonów została dokonana dla bardzo wielu systemów ssaczych [109, 115]. Niektórzy autorzy otrzymali dzięki temu znaczny wzrost poziomu ekspresji [109, 115], niektórzy jednak tak znacznej progresji nie uzyskali [76]. Dokonano także optymalizacji kodonów dla drożdży [15] i innych grzybów [55]. Ekspresję w komórkach ssaczych poprawiono wprowadzając do mRNA GFP (rzecz jasna na poziomie cDNA) specyficzną sekwencję wiążącą rybosomy (sekwencję Kozak) [48]. GFP nie jest w większości przypadków toksyczne dla komórki. Było kilka doniesień o toksyczności wysokich stężeń GFP, jednak informacje te nie zostały ostatecznie potwierdzone [114].

Większość chimer GFP zostało stworzonych poprzez fuzję badanego białka z N- lub C-końcem GFP. Nie jest to jednak regułą – w niektórych przypadkach, kiedy dodanie znacznika do końca białka nie jest przez nie zbyt dobrze tolerowane, możliwa jest insercja GFP w obręb sekwencji kodującej badane białko. W niektórych przypadkach taka insercja umożliwia prawidłowe fałdowanie i działanie zarówno GFP, jak i badanego białka, co wykorzystano np. do stworzenia fuzji GFP z białkiem jednego z kanałów potasowych [91].





RYCINA 1. Możliwe topologie GFP, cpGFP i ich chimer z badanymi białkami (na podstawie [4], zmieniono)

Jak wynika ze struktury krystalicznej GFP [75, 108] N- i C-koniec tego białka znajdują się blisko siebie. Z tego powodu mogą one być połączone na poziomie DNA sekwencją kodującą peptyd linkerowy z jednoczesnym stworzeniem nowych końców. Po translacji powstaje w ten sposób cząsteczka cpGFP (*circular-permuted GFP*). Nowe N- i C-końce GFP, do których można przyłączać badane białko, otrzymuje się poprzez cięcie w 10 różnych pozycjach DNA (ryc. 1) [4].

Pomimo tego że przyłączenie GFP zwiększa masę badanego białka o 27 kDa, w większości przypadków nie dochodzi do upośledzenia fałdowania ani prawidłowej lokalizacji białka fuzyjnego w komórce [17, 99, 114]. Stwierdzono także, że prawdopodobieństwo udanej fuzji rośnie w miarę dodawania coraz to dłuższego peptydu linkerowego do jednego z końców GFP, co tłumaczy się zmniejszeniem sterycznej zawady pomiędzy GFP a badanym białkiem [81]. Wiadomo także, że nie wszystkie fuzje GFP są udane, jednak niepowodzenia bardzo rzadko są publikowane, co utrudnia tym samym właściwe oszacowanie częstości udanych eksperymentów [99].

Do lokalizacji wewnątrzkomórkowej białek można użyć także znaczników immunocytochemicznych, m.in. epitopów myc i HA. Jednak pomimo bardzo dużej różnicy wielkości pomiędzy GFP (238 aminokwasów) a tymi znacznikami (zwykle ok. 10 aminokwasów), znakowanie GFP jest znacznie lepszą metodą. Znakowanie immunocytochemiczne wymaga utrwalenia komórek przed lokalizacją badanego białka, co niesie za sobą duże prawdopodobieństwo wystąpienia artefaktów, uniemożliwia też śledzenie przemieszczania się badanych białek w obrębie komórki. Wad tych pozbawione jest znakowanie GFP – uwidocznienie tego znacznika jest możliwe w czasie rzeczywistym w żywych komórkach [17, 63].



GFP jako znacznik został wykorzystany do badań w obrębie praktycznie każdej organelli i przedziału komórkowego: błony komórkowej [32, 67, 110], jądra komórkowego [20, 29, 32, 52, 86], retikulum endoplazmatycznego [66, 82, 94], aparatu Golgiego [82], pęcherzyków sekrecyjnych [42, 49], mitochondriów [20, 69, 86], peroksysomów [106], wakuol [16] i fagosomów [56]. Bardzo różne pH i potencjały oksydoredukcyjne panujące w każdej z tej organelli nie stanowiły znaczącej bariery dla prawidłowego dojrzewania GFP [99]. Prowadzono też kompleksowe badania wewnątrzkomórkowych szlaków sekrecyjnych [26, 103] i obserwacje zdarzeń zachodzących w cytoszkielecie podczas cyklu komórkowego [74] i podczas cytokinezy [25]. Wykorzystując różne kolorowe mutanty GFP badano lokalizację i przemieszczanie się kilku białek komórkowych jednocześnie [63, 100].

Dzięki GFP można nie tylko wyznakować białka, ale także, pośrednio, specyficzne sekwencje nukleotydowe DNA. Przykładem takiego eksperymentu jest lokalizacja konkretnych loci w chromosomach przez insercję w ich obręb operatorów operonu laktozowego (*lacO*) i wprowadzenie do komórki DNA kodującego represor operonu Lac z dołączonym znacznikiem GFP (*lacI-GFP*) [63, 93].

Ponieważ GFP jest doskonałym narzędziem do przyżyciowego śledzenia dynamiki białek wewnątrz komórki, stało się możliwe przedstawianie ruchomych obrazów na wideo, co jest oczywistym urozmaiceniem podczas prezentacji np. wyników badań eksperymentalnych. Przykłady zapisu filmowego, gdzie GFP służy jako znacznik, można znaleźć pod adresami: <http://www.automatedcell.com/movies/> i <http://www.cooperlab.wustl.edu/>, a także na płycie CD dołączonej do czwartego wydania *Molecular Biology of the Cell*.

### 3. WYKORZYSTANIE GFP W TECHNIKACH FRAP I FLIP

Udoskonalonymi metodami badania wewnątrzkomórkowej dynamiki białek są techniki FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) i FLIP (*Fluorescence Loss In Photobleaching*). W technikach tych wykorzystuje się m.in. różne fuzje mutantów GFP z badanymi białkami komórkowymi. Poprzez naświetlenie silnym impulsem światła lasera wybranego obszaru komórki powoduje się zanik fluorescencji (ang. *bleaching*) chimery GFP. Dzięki monitorowaniu szybkości powrotu utraconej fluorescencji chimery GFP w naświetlonym miejscu (technika FRAP) można określić względną ruchliwość badanego białka [30]. Techniką komplementarną do wyżej opisanej jest technika FLIP. W tym przypadku powtarzające się impulsy światła oświetlają określony obszar komórki, powodując ciągłą utratę fluorescencji przez białka fuzyjne, które dyfundują w ten obszar. Umożliwia to monitorowanie utraty fluorescencji przez sąsiadujące z obszarem badanym inne miejsca w komórce, pokazując tym samym te rejon, z których nastąpiła dyfuzja badanego białka [30].

Techniki FRAP i FLIP wykorzystujące fuzje z GFP znalazły szerokie zastosowanie w badaniach biologicznych. Obie techniki wykorzystuje się w monitorowaniu dyfuzji białek błonowych rozmieszczonych w różny sposób w poprzek błony komórkowej. Kombinacje obu powyższych technik znalazły także zastosowanie w badaniach

stabilności wiązania różnych białek z DNA, m.in. histonów [11, 62] i białek HMG [11], w monitorowaniu transportu białek pomiędzy różnymi organellami, a także w poznaniu komórkowych dróg wydzielniczych [83, 105]. W ten sposób np. dowiedziono, że wiele enzymów z aparatu Golgiego powraca przy pomocy pęcherzyków transportowych do retikulum endoplazmatycznego [1].

## 4. GFP JAKO GEN REPORTEROWY

Historycznie pierwszym zaproponowanym zastosowaniem GFP było wykrycie ekspresji genu *in vivo* u *Caenorhabditis elegans*, którego oskórek uniemożliwia dostęp substratom potrzebnym do detekcji innych genów reporterowych. W tym przypadku dzięki GFP potwierdzono wzór ekspresji z promotora *mec-7*, który kontroluje syntezę  $\beta$ -tubuliny w neuronach pewnych mechanoreceptorów nicienia [80]. Między innymi ten eksperyment przyczynił się do wzrostu popularności GFP jako narzędzia w badaniach biologicznych.

Dziś GFP jest szeroko wykorzystywane jako gen reporterowy w monitorowaniu wzoru ekspresji, a także poziomu ekspresji genów [18, 47, 113]. GFP jest też użyteczne w przestrzennym obrazowaniu ekspresji genów w obrębie komórki, tkanki lub organizmu [38, 41]. W większości przypadków GFP może znajdować się pod kontrolą dowolnego promotora. Dzięki tak stworzonej konstrukcji można bezpośrednio badać ekspresję praktycznie każdego genu w pojedynczych komórkach lub tkankach [63]. Proces ten oprócz oczywistej konieczności wprowadzenia odpowiedniej konstrukcji do gospodarza nie wymaga żadnej dodatkowej ingerencji lub specjalnego traktowania ze strony eksperymentatora. Z tego powodu GFP góruje nad innymi popularnymi genami reporterowymi, takimi jak np. acetylotransferaza chloramfenikolowa czy  $\beta$ -galaktozydaza. W obu tych przypadkach należy dodatkowo wprowadzić do komórki związek chemiczny lub umożliwić jego pobranie z pożywki hodowlanej. Dopiero wtedy związek taki da reakcję barwną i umożliwi lokalizację powyższych reporterów w komórce [95].

Pomimo niezaprzeczalnych zalet stosowania GFP do analizy poziomu ekspresji genów, w czasie tego typu eksperymentów napotkano na kilka poważnych utrudnień:

- ◆ GFP nie jest systemem enzymatycznym, w którym jedna cząsteczka enzymu produkuje tysiące cząsteczek barwnych produktów. W tym przypadku jedna molekula GFP zawiera jedną cząsteczkę chromoforu. Powoduje to, że często poziom ekspresji genu z naturalnych promotorów komórkowych jest zbyt niski, aby umożliwić skuteczną detekcję, odróżnialną od fluorescencji tła. Jak dowiedziono, aby sygnał był dobrze wykrywalny, w większości przypadków w komórce musi znajdować się około  $10^6$  cząsteczek GFP, co może być osiągnięte jedynie w przypadku dość wysokiego poziomu ekspresji [87]. Jest to szczególnie niekorzystne dla komórek ssaczych, gdzie większość udanych wizualizacji z wykorzystaniem GFPwt przeprowadzono pod kontrolą bardzo silnych promotorów np. z wirusa cytomegalii czy SV40 [79, 87]. Problem niskiego poziomu fluorescencji GFP może być rozwiązany przy wykorzystaniu bardzo czułych instrumentów pomiarowych wykrywających nawet bardzo słabą emisję fotonów. Są one jednak zbyt drogie, aby wykorzystywać je w rutynowych eksperymentach [63].



- ◆ Ekspresja GFP w niższych temperaturach daje częściową poprawę wykrywalności ekspresji m.in. u roślin [34], drożdży [92], *Drosophila melanogaster* [9, 104] i w komórkach ssaczy [79]. Jest to spowodowane prawdopodobnie tym, że obniżenie temperatury powoduje wzrost ilości poprawnie sfałdowanych cząsteczek GFP [52].
- ◆ Powolne posttranslacyjne formowanie się aktywnej formy chromoforu nawet w wariantach białka z poprawioną szybkością fałdowania bardzo utrudnia wykorzystanie GFP do monitorowania obecności badanego białka w początkowych etapach po zakończeniu translacji [63].
- ◆ Intensywność fluorescencji GFP nie wykazuje liniowej zależności od ilości białka, co wymusza ustalenie dla każdego nowego zastosowania GFP innej krzywej kalibracyjnej. Jest to chyba najpoważniejszy problem przy określaniu poziomu ekspresji badanego białka w komórce [114].

Warto dodać, że stworzono także specjalne niestabilne warianty GFP do monitorowania szybko zachodzących procesów wewnątrzkomórkowych, m.in. do badania poziomu ekspresji białek szybko ulegających degradacji w komórce [3, 50].

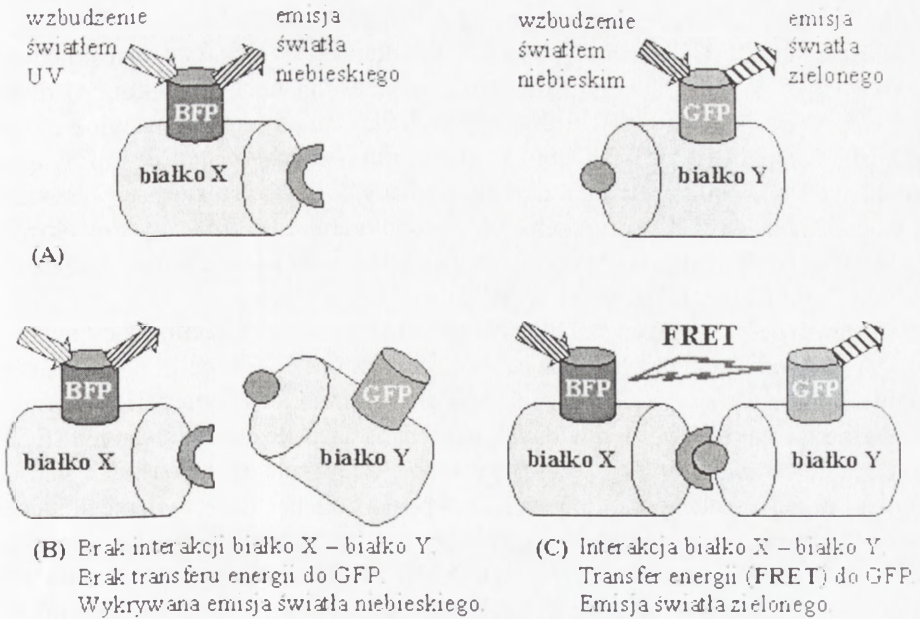
## 5. WYKORZYSTANIE RÓŻNYCH WARIANTÓW GFP W TECHNICIE FRET

Technika FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) jest spektroskopową metodą umożliwiającą monitorowanie dynamiki oddziaływań międzycząsteczkowych białek zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [5, 40, 90, 99].

Stosując klasyczne metody wytwarzania białek fuzyjnych dwa interesujące nas białka znakuje się różnymi mutantami GFP. Dobór pary wariantów nie może być jednak przypadkowy – maksimum emisyjne donorowego GFP musi znacząco (choć nie musi idealnie) pokrywać się z maksimum absorpcji akceptorowego mutantu GFP. Dodatkowo, maksima emisyjne obu wariantów muszą być możliwie od siebie odległe w długości fali światła, aby móc odróżnić wystąpienie lub brak interakcji [17]. Kiedy pomiędzy dwoma badanymi białkami wystąpi oddziaływanie, które spowoduje, że chromofory GFP znajdą się bardzo blisko siebie (odległość od około 10 do 100 Å), energia pochłaniana przez chromofor donorowego wariantu GFP jest przekazywana bezpośrednio na chromofor akceptorowego GFP. Powoduje to, że będziemy obserwować jedynie fluorescencję tego drugiego (ryc. 2). Z powodu zachodzącego transferu energetycznego emisja tego pierwszego nie ujawni się [114]. Jak łatwo zauważyć, podobna sytuacja panuje *in vivo* w *A. victoria* (zobacz punkt 3 w towarzyszącym artykule [10]).

Donorem w technice FRET może być np. mutant Y66H (BFP) (maksimum absorpcji i emisji ok. 383 nm i 447 nm), natomiast mutant S65T (GFP) może być akceptorem (maksimum odpowiednio ok. 489 nm i 509 nm). Tak jak założono, w tym przypadku maksimum emisji donora jest zbliżone do maksimum absorpcji akceptora. Jeżeli po naświetleniu światłem o długości fali ok. 383 nm nastąpi emisja światła zielonego o długości fali ok. 509 nm, to z dużym prawdopodobieństwem można wnioskować, że mamy do czynienia ze swoistą interakcją białko-białko. W przeciwnym przypadku





RYCINA 2. Wykorzystanie techniki FRET do badania oddziaływań między białkami (na podstawie Alberts, B. i współaut. *Molecular Biology of the Cell*, wydanie 4., s. 519, zmieniono)

naświetlanie światłem o długości 383 nm spowoduje emisję światła niebieskiego pochodzącego z emisji BFP [17, 99].

Wykorzystanie GFPwt jako akceptora nie jest tu możliwe. Naświetlanie światłem UV o długości 383 nm spowoduje nie tylko wzbudzenie BFP, ale także częściowe wzbudzenie GFPwt bez udziału transferu energetycznego, jako że GFPwt ma jeszcze drugie, zbliżone do BFP maksimum absorpcji przy długości fali 395 nm.

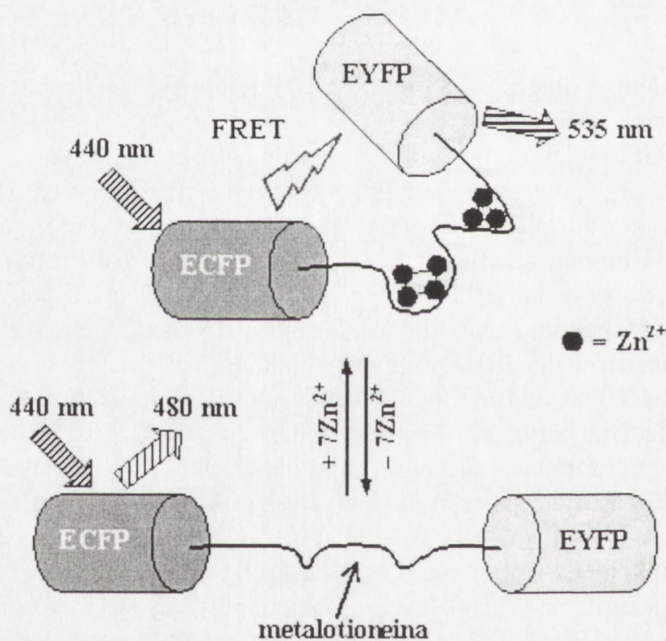
Ogromne możliwości techniki FRET były główną motywacją do poszukiwania większości mutantów spektralnych GFP [99]. Dzięki tym poszukiwaniom znaleziono wiele idealnych partnerów dla FRET, m.in. wspomniane [10] mutanty klasy 6 (BFP) jako donory i mutanty klasy 2 (np. S65T i S65C) jako akceptory. Jeszcze lepszymi partnerami ze względu na bardziej znaczące podobieństwo między maksimum emisji donora a maksimum absorpcji akceptora są mutanty klasy 5 (CFP) jako donory i mutanty klasy 4 (YFP) jako akceptory. Wartość obu tych maksimum oscyluje w okolicach 500 nm [44, 99].

Za pomocą techniki FRET stosunkowo łatwo badać oddziaływania pomiędzy dwoma różnymi białkami (heterodimeryzacja). Badanie homodimeryzacji jest również możliwe, choć znacznie trudniejsze [99, 114]. Na przykład homodimeryzację czynnika transkrypcyjnego Pit-1 wykryto analizując białka fuzyjne BFP-Pit-1 i GFP-Pit-1 w komórkach HeLa [78]. Homodimeryzacja jest trudniejsza do wykazania, dlatego że statystycznie tylko około 50% interakcji nastąpi pomiędzy białkami znakowanymi BFP

i GFP. Pozostałe interakcje następują pomiędzy GFP-GFP i BFP-BFP, co częściowo uniemożliwia odróżnienie homodimeru od monomeru.

Dzięki technice FRET można nie tylko badać interakcje białek. Znakując pojedyncze białko w dwóch różnych jego miejscach (najczęściej na N- i C-końcu) dwoma kolorowymi wariantami GFP, można obserwować zmiany konformacyjne różnego rodzaju białek, podjednostek lub domen po dodaniu różnych cząsteczek lub związków chemicznych, np. jonów metali. Zmiany konformacyjne będą objawiały się wzrastaniem lub maleniem odległości liniowej pomiędzy chromoforami, co będzie powodowało różnie intensywne transfer energetyczny pomiędzy mutantami GFP i będzie miało przełożenie na intensywność i kolor fluorescencyjnej emisji [17, 114].

Pierwszym przykładem użycia FRET w celu wykrycia zmian konformacyjnych było wykazanie, że ludzka metalotioneina po związaniu jonów  $Zn^{2+}$  lub  $Cd^{2+}$  ulega znaczącej zmianie konformacyjnej (ryc. 3). Okazało się, że transfer energetyczny pomiędzy wariantami CFP i YFP o poprawionych właściwościach fizykochemicznych (ECFP i EYFP, E – od *enhanced*) był możliwy tylko wtedy, kiedy metalotioneina była związana z którymś z wyżej wymienionych jonów. Jednak po dodaniu tlenu azotu II, metalotioneina uwalnia jon metalu, co powoduje tak znaczącą zmianę konformacyjną cząsteczki, że FRET praktycznie przestaje zachodzić [77]. Podobna koncepcja została także wykorzystana do pomiarów stężenia jonów wapnia w komórce (zob. dalej), a także do monitorowania aktywności różnego rodzaju proteaz [36, 107] i kinaz białkowych [71].



RYCINA 3. Wykorzystanie techniki FRET do badania zmian konformacji metalotioneiny (na podstawie [77], zmieniono)



Jak każda technika czy metoda badawcza, także FRET ma zarówno wady, jak i zalety. Zaletą tej techniki jest jej powtarzalność i możliwość wizualizacji białek praktycznie w każdym przedziale komórkowym. Góruje ona pod tym względem nad inną techniką badania interakcji białko-białko, a mianowicie nad metodą dwuhybrydową. Ta ostatnia technika wykrywa tylko oddziaływania pomiędzy białkami lub ich fragmentami w jądrze komórkowym. Największą wadą techniki FRET jest fakt, że pomimo wyraźnego braku interakcji między badanymi białkami, czasami podczas naświetlania mamy do czynienia z nieswoistymi sygnałami fluorescencji. Dlatego też FRET nie jest zapewne najlepszą metodą do „śledzenia” lub „wyłapywania” nieznanymi oddziaływań. Umożliwia jednak szczegółową analizę tych interakcji, które zostały wstępnie potwierdzone [99].

## 6. MUTANTY GFP JAKO CZUJNIKI STĘŻENIA JONÓW $\text{Ca}^{2+}$ W KOMÓRCIE

Wiele biochemicznych czujników stężenia jonów wapnia bazuje na mutantach GFP [2, 39, 44, 45]. Stworzono wiele różnych wariantów tego typu czujników czterech odmiennych typów.

### A. Cameleony (*cameleons*)

Były pierwszymi czujnikami wykorzystującymi warianty GFP [65, 66, 88]. Bazują one głównie na wykorzystaniu techniki FRET.

Miyawaki i współaut. [65, 66] przyłączyli BFP lub CFP do N-końca kalmoduliny (CaM) i przedstawiciela klasy 2 GFP albo YFP do C-końca peptydu wiążącego kalmodulinę pochodzącego z kinazy lekkiego łańcucha miozyny mięśnia szkieletowego (zwanego M13). Stworzyli w ten sposób czterodomenową chimerę: B(C)FP-CaM-M13-G(Y)FP. W przypadku braku lub bardzo małego stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  oba mutanty GFP były na tyle oddalone od siebie, że transfer energetyczny praktycznie nie zachodził. Wzrost stężenia jonów wapnia powodował, że kalmodulina wiązała peptyd M13 i odległość między dwoma wariantami GFP malała (ryc. 4a). Stwarzało to dogodne warunki przestrzenne do wzrostu intensywności transferu energii, co przekładało się na zmianę koloru i wzrost natężenia fluorescencji po naświetleniu światłem o odpowiedniej długości fali. Pomiar zmian intensywności fluorescencji umożliwiał obliczenie stężenia wolnych jonów wapnia w komórce.

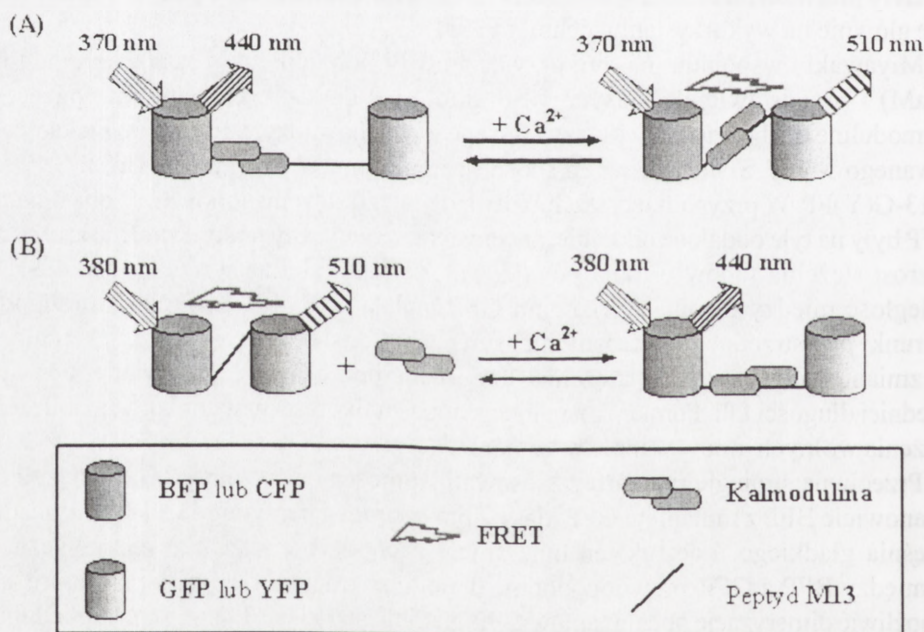
Przeciwną strategię pomiaru zastosowali Romoser i współaut. [88]. Połączyli oni mianowicie BFP z mutantem GFP klasy 2 przy pomocy peptydu M13 pochodzącego z mięśnia gładkiego. Łącznik ten umożliwiał zachodzenie transferu energetycznego pomiędzy BFP a GFP, prawdopodobnie dlatego że miał na tyle giętką strukturę, aby umożliwić dimeryzację obu mutantów GFP. Natomiast dodanie kompleksu kalmodulina- $\text{Ca}^{2+}$  powodowało zahamowanie lub znaczące zmniejszenie transferu energii, dlatego że wiązanie kalmoduliny- $\text{Ca}^{2+}$  z peptydem M13 uniemożliwiło bliski kontakt obu mutantów GFP ze sobą (ryc. 4b). Powodowało to zauważalną zmianę koloru fluores-



cencji. Analogicznie jak w poprzedniej metodzie pomiar zmian intensywności świecenia umożliwił obliczenie stężenia wolnego wapnia w komórce.

Po skonstruowaniu wariantów GFP z mutacjami optymalizującymi ekspresję w różnych organizmach, w tym u ssaków, oba typy czujników przedstawionych powyżej dawały na tyle intensywną fluorescencję, że można było transfekować ich DNA do komórek, unikając tym samym bezpośredniego wstrzykiwania białek [99]. Ponieważ można było poddawać powyższe czujniki ekspresji heterologicznej, zaistniała możliwość bardzo prostej ich lokalizacji w różnych przedziałach komórkowych (np. w jądrze [99] czy retikulum endoplazmatycznym [44]) po dodaniu specyficznej sekwencji adresowej. Poprzez różnego typu mutacje w obrębie sekwencji kodującej kalmodulinę uzyskano także warianty tego białka różniące się powinowactwem do  $\text{Ca}^{2+}$ , mieszczącym się w przedziale od 10 nM do 10 mM [44]. Wszystkie powyższe zmiany umożliwiły np. pomiar stężenia wolnych jonów wapnia w ER, które wynosi w stanie spoczynkowym komórki od 60 do 400 nM. Stężenie to spada gwałtownie do 1–50 nM w komórkach stymulowanych przez agonistów wapniowych [66].

Tę grupę czujników nazwano cameleonami (od parafrazy angielskiego słowa *chameleons* i CaM określającego kalmodulinę), dlatego że „zmieniają kolor” pod wpływem zmiany stężenia jonów wapnia, a także mają „długi język” M13, który może być wyjmowany lub chowany z „ust” tworzonych przez kalmodulinę [84].



RYCINA 4. Zasady wykorzystania techniki FRET do pomiaru stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . Konstrukcje zastosowane przez Miyawaki'ego i współaut. [65, 66] (A) i Romosera i współaut. [88] (B). Dla (A) podano długości fali jedynie dla pary BFP-GFP. Szczegóły w tekście (na podstawie [44], zmieniono)

## B. Czujniki GFP-ekworyna

Czujniki opisane w poprzednim podpunkcie muszą być obecne w wystarczająco dużym stężeniu w komórce, aby poziom ich fluorescencji był odróżnialny od fluorescencji tła [7]. Przez fuzję GFP z ekworyną stworzono układ o większej czułości do pomiarów stężenia jonów wapnia w cytoplazmie pojedynczej komórki. Jego zasadniczym mankamentem jest konieczność wprowadzania do komórki trzeciego, drobnocząsteczkowego, składnika – koelenterazyny (zob. [10]). Opisana metoda wykorzystuje zdolność ekworyny do wiązania  $\text{Ca}^{2+}$  i zdolność GFP do fluorescencji [6]. Praktycznie na identycznej zasadzie opiera się naturalna bioluminescencja *A. victoria* [10].

## C. Camgury (*camgaroos*)

Są to czujniki stworzone poprzez insercję kalmoduliny w pozycję numer 145 cpGFP, cpCFP lub cpYFP (patrz punkt 2). Jak się okazało, tak powstała chimera cpYFP jest najbardziej wrażliwa na zmiany stężenia jonów wapnia i stała się najczęściej wykorzystywanym tego typu czujnikiem do pomiaru stężenia wolnego  $\text{Ca}^{2+}$  w pojedynczych komórkach ssaczy. Wadą tych czujników jest fakt, że pomiar stężenia jest dokonywany poprzez analizę zmian fluorescencji GFP, co następuje po zmianie konformacji całej cząsteczki. Oczywiście największe zmiany w emisji odnotowuje się po dołączeniu lub odłączeniu  $\text{Ca}^{2+}$  od kalmoduliny, jednak różne wartości pH w poszczególnych przedziałach komórki także mają swój wpływ na zmiany fluorescencji chimery. Choć są to zmiany bardzo niewielkie, jednak czynią tego typu czujniki wrażliwe na pH, co należy brać pod uwagę obliczając dokładne stężenie jonów wapnia [4].

Ta grupa została nazwana camgurami (od parafrazy angielskiego słowa *camgaroos*), dlatego że zwykle są to czujniki, które „niosą w swoim wnętrzu mniejszego towarzysza” – kalmodulinę (CaM!), a ich sygnał emisji „skacze”, czyli znacznie zmienia intensywność w odpowiedzi na zmianę poziomu jonów wapnia w komórce [4].

## D. Pericamy (*pericams*)

Są to czujniki skonstruowane na bazie różnego rodzaju mutantów cpGFP, o których była mowa w punkcie 2. Peptyd wiążący kalmodulinę (M13) jest związany z nowo powstałym N-końcem białka, natomiast kalmodulina jest doczepiona do nowo powstałego C-końca cpGFP. Zasada zmiany poziomu fluorescencji jest podobna do tej przedstawionej w podpunkcie C. Czujniki te różnią się między sobą mutacjami w sekwencji aminokwasowej, znajdującymi się w bliskim sąsiedztwie chromoforu [70, 72].

## 7. MUTANTY GFP JAKO CZUJNIKI STĘŻENIA JONÓW METALI CIĘŻKICH W KOMÓRCE

GFPwt ma wysokie powinowactwo do jonu  $\text{Cu}^{2+}$ , mniejsze do  $\text{Ni}^{2+}$  i bardzo niewielkie do jonów  $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{Co}^{2+}$ . Cząsteczka GFP zawiera 10 reszt histydynowych – 5 z nich jest zaangażowanych w tworzenie struktur drugorzędowych białka i dlatego nie są one w stanie wiązać jonów metali. Analizując strukturę krystaliczną GFPwt zauważamy, że



His77, His81 i His231 znajdują się blisko siebie, w odległości ok. 7,5 Å. Dlatego też powyższe 3 reszty aminokwasowe zostały zaproponowane jako miejsce interakcji z różnymi jonami metali [51]. Dość silne naturalne powinowactwo GFPwt do jonów  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Ni}^{2+}$  zostało wykorzystane do oczyszczania i odzyskiwania GFP przy użyciu chromatografii powinowactwa z immobilizowanymi jonami wymienionych metali [51].

Kiedy stwierdzono, że koncentracja jonów metali ciężkich w pobliżu chromoforu GFP powoduje obniżenie intensywności fluorescencji białka, skonstruowano specjalne mutanty GFP przystosowane do ich wiązania jako potencjalne czujniki stężenia jonów metali ciężkich w komórkach *in vivo* [8, 85]. Mutanta 10C (T203Y, S54G, V68L i S72A) należącego do klasy 4 GFP (YFP) poddano mutagenезie ukierunkowanej i stworzono w ten sposób 2 nowe warianty. Jeden z nich zawiera dodatkowe miejsce wiązania jonów metali składające się z 2 reszt histydynowych (mutacje S147H i Q204H), drugi wariant natomiast ma trójaminokwasowe miejsce wiążące (mutacje S147H, S202D i Q204H). Dzięki dodatkowym miejscom wiązania metali ciężkich oba mutanty reagują z większą wrażliwością na zmiany stężenia jonów tych metali niż 10C YFP i GFPwt.

## 8. MUTANTY GFP JAKO WSKAŹNIKI pH W KOMÓRCIE

GFPwt i wiele jego mutantów wykazują nieznaczne zmiany fluorescencji w zależności od stężenia jonów  $\text{H}^+$  w komórce. Cecha ta znalazła zastosowanie w monitorowaniu pH *in vivo*, m.in. w cytosolu, mitochondriach i aparacie Golgiego [33, 68, 97, 102, 111]. Do pomiaru pH w cytosolu i aparacie Golgiego wykorzystuje się YFP, natomiast dla organelli, w których panuje niższe pH, używa się mutantów GFP klasy 2, dlatego że YFP jest nieaktywne fluorescencyjnie w niskim pH [54]. Wiele innych mutantów GFP wykorzystywanych jako wskaźniki pH w komórce otrzymano za pomocą mutagenезy ukierunkowanej, możliwej dzięki znajomości struktury białka. Potocznie wskaźniki tego rodzaju zwane są z ang. *pHluorins*. Istnieją dwa podstawowe ich typy [61, 111]:

- 1) Takie, w których podczas obniżania pH maksimum absorbancji ulega stopniowemu przesunięciu z ok. 395 nm do ok. 470 nm. Współczynnik intensywności fluorescencji przypadającej na oba maksima może zostać skalibrowany, a co za tym idzie daje możliwość monitorowania pH w dowolnej komórce. Taki typ wskaźników jest nazywany *radiometric pHluorins*.
- 2) Takie, w których maksimum absorbancji przy ok. 470 nm zanika w pH niższym od 6, co powoduje brak fluorescencji po naświetlaniu tą długością fali światła. Takie wskaźniki są zwane *ecliptic pHluorins*.

Oba typy wskaźników wykazują całkowicie odwracalną odpowiedź na pH. Powrót do „normalnych” właściwości spektralnych następuje w przeciągu 20 ms od przywrócenia neutralnego pH.



## 9. GFP JAKO NARZĘDZIE DO MONITOROWANIA BIOLOGICZNEGO

Ponieważ sygnał fluorescencji GFP może być łatwo i szybko wykrywany bez jakichkolwiek manipulacji badanym materiałem, atrakcyjnym sposobem wykorzystania GFP są doświadczenia z udziałem procedur selekcji komórek [13, 14, 37, 73, 96, 112]. Obiecująco zapowiadają się także badania umożliwiające monitorowanie genetyczne [21, 89] i analizy działania leków na organizmy i komórki [22, 27], jednak są jak na razie na dość wczesnym etapie rozwoju.

Monitorowanie żywych komórek za pomocą GFP jest bardzo dobrym sposobem selekcji komórek embrionalnych. Tak postąpili m.in. Takada i współaut. [96], a także Okabe i współaut. [73], wprowadzając do wczesnych zarodków myszy komórki zarodkowe transfekowane cDNA kodującym GFP. Wstępna selekcja komórek, w których transgen ulegał ekspresji, znacząco zwiększyła wydajność otrzymywania chimerowych, transgenicznych embrionów. Nie zaobserwowano przy tym żadnej toksyczności GFP dla komórek embrionalnych i nowo narodzonych zwierząt. Ponieważ nie można wykluczyć późniejszego ujawnienia się niekorzystnego działania GFP, konieczna jest długoterminowa kontrola rozwoju transgenicznych zwierząt, a także ich potomstwa. Pomimo faktu, że w powyższych eksperymentach wprowadzonym transgenem była sekwencja nukleotydowa kodująca jedynie samo GFP, istnieje możliwość otrzymania białka fuzyjnego składającego się z GFP oraz funkcjonalnego transgenu dającego pożądane cechy fenotypowe. Daje to szansę otrzymania z dużą wydajnością wielu organizmów transgenicznych [63]. Warto jednak pamiętać, że występowanie episomalnej ekspresji transgeny w komórkach embrionalnych utrudnia preimplantacyjną selekcję zarodków i jest główną barierą ograniczającą zastosowanie GFP jako markera.

GFP jest także popularnym markerem do śledzenia losu pojedynczych komórek w żywych organizmach. I tak Zernicka-Goetz i współaut. [112] wstrzyknęli mRNA GFP do pojedynczych komórek blastocysty myszy laboratoryjnej i w ten sposób otrzymali w nich produkt białkowy. Umożliwiło to śledzenie losu komórek potomnych w czasie rozwoju zarodkowego myszy.

Ogromnie szybko rozwija się wykorzystanie GFP w badaniach nad kancerogenezą. Wstrzyknięcie komórki nowotworowej wyznakowanej GFP do organizmu myszy nie tylko pozwala obserwować ogniska formowania się nowotworu, ale także umożliwia wykrycie przerzutów (metastazy) i mikroprzerzutów (mikrometastazy) nawet do miejsc organizmu odległych od ogniska [13, 14, 37]. Dzięki temu można zarówno obserwować rozwój nowotworu, jak i poszukiwać czynników powodujących i wpływających na proces przerzutowania. W tym miejscu warto nadmienić, że poddając fuzji histon H2B z GFP uwidoczniło tzw. *double minute chromosomes* (DMs) *in vivo* w komórkach nowotworowych [43]. DMs są sparowanymi, acentrycznymi ciałami chromatynowymi, które są zdolne do autonomicznej replikacji w czasie fazy S cyklu komórkowego i nierównej dystrybucji do komórek potomnych w czasie mitozy. Znalezione je w ponad 50% ludzkich nowotworów, jednak jak się okazało nie występują w zdrowych komórkach.

GFP jest także przydatnym narzędziem do przeprowadzania wysokowydajnych testów genetycznych. Dla przykładu Sawin i Nurse [89] wprowadzili cDNA GFP do przypadkowych loci w genomie drożdżowym i poszukiwali białek, które lokalizowały się w jądrze komórkowym. Dzięki takiemu podejściu jedna osoba jest w stanie w ciągu jednego dnia zanalizować nawet ok. 750 klonów drożdży w poszukiwaniu sygnału jądrowego, używając jedynie konwencjonalnego mikroskopu fluorescencyjnego. Podobna analiza przypadkowych insercji GFP czeka już na realizację w komórkach ssaczyc. W połączeniu z techniką sortowania komórek FACS (*Fluorescence-activated Cell Sorting*) [21] i retrowirusowym systemem ekspresji będzie to zapewne w niedalekiej przyszłości bardzo dobre narzędzie do wydajnego monitorowania ekspresji białek w komórkach ssaczyc [63].

GFP jest także użytecznym narzędziem w badaniu działania leków. Bardzo dobrym przykładem tego typu doświadczeń było stworzenie oddzielnie przez dwie grupy badawcze linii komórkowych zawierających cDNA GFP znajdujący się pod kontrolą długich terminalnych sekwencji powtórzonych (LTR – *Long Terminal Repeats*) pochodzących z wirusa HIV-1 [22, 27]. Infekcja komórki tym wirusem powodowała fluorescencję GFP na skutek aktywacji transkrypcji z LTR. Ten sposób postępowania pozwolił na monitorowanie zarówno infekcji wirusa [22, 27], jak i umożliwił szybką i dokładną obserwację wrażliwości HIV na leki antyretrowirusowe [27]. Badania tego typu dają nadzieję na znalezienie leku, który uniemożliwiłby namnażanie się wirusa HIV w limfocytach ludzkich.

## 10. POZALABORATORYJNE I „POZANAUKOWE” SPOSOBY WYKORZYSTANIA GFP

Najbardziej chyba znanym przykładem tzw. pozanaukowego wykorzystania GFP było stworzenie w Stanach Zjednoczonych ANDi – transgenicznej małpy niosącej cDNA GFP [12]. ANDi stała się atrakcją wielu programów telewizyjnych w USA. We Francji „produkcja” królika albinosa wyrażającego GFP jako części transgenicznego dzieła sztuki [23] wywołała głośny sprzeciw opinii publicznej, co spowodowało, że zabroniono twórcom wywożenia królika z kraju. Produkcja transgenicznych zwierząt, takich jak: myszy [73], króliki [23] i małpy [12], zainteresowała społeczeństwa krajów zachodnich, co spowodowało powstanie małych firm proponujących swoim klientom „produkcję” fluoryzujących zwierząt domowych, świątecznych choinek i kwiatów [60]. GFP znalazło także wiele zastosowań poza laboratoriami, np. białka tego użyto do monitorowania fermentacji prowadzonej przez *Lactobacillus sakei* w produktach mięsnych [28], a także do śledzenia rozprzestrzeniania się bakterii rozkładających produkty ropopochodne w glebach zanieczyszczonych olejem napędowym [19]. Występowanie chromoforu GFP w dwóch stanach przejściowych, a co za tym idzie zdolność do pochłaniania fotonów światła powoduje, że rozważa się wykorzystanie GFP w nośnikach danych w informatyce [46].



## 11. PODSUMOWANIE

Pomimo krótkiego okresu powszechnego wykorzystywania GFP w badaniach biologicznych, lista aplikacji tego białka jest bardzo długa i różnorodna. Lista dostępnych mutantów spektralnych GFP jest ograniczona zaledwie do kilku kolorów fluorescencji, co znacząco ogranicza jego wykorzystanie w wielu kompleksowych eksperymentach cytologicznych i molekularnych. W ostatnich latach sytuacja w tej dziedzinie zmieniła się zdecydowanie na korzyść. Powodem tego jest ciągle odkrywanie, u wielu niebioluminescencyjnych gatunków koralowców, białek podobnych do GFP o bardzo różnych właściwościach spektralnych [31, 58, 59, 64, 101] (zobacz także punkt 14 w towarzyszącym artykule [10]). Rozszerzyło to możliwości znanych technik badawczych, w których wykorzystywane są mutanty GFP (np. pojedyncze znakowanie, technika FRET [101]), a także spowodowało powstanie kilku nowych, m.in. wielokolorowe znakowanie [58, 59, 101] i monitorowanie procesów komórkowych w czasie z wykorzystaniem jednego z mutantów DsRed, potocznie nazywanego „Fluorescent Timer” [98].

Przyszłość związana z ciągle rosnącą liczbą dostępnych handlowo białek podobnych do GFP zapowiada się obiecująco. Umożliwi to zapewne w najbliższej przyszłości wykorzystanie tego typu białek w kompleksowych eksperymentach proteomicznych i cytologicznych, a także pozwoli na nieograniczone korzystanie z dużej liczby wariantów o szerokiej palecie kolorów fluorescencji.

## PODZIĘKOWANIA

Autorzy serdecznie dziękują anonimowemu recenzentowi za cenne uwagi dotyczące wykorzystania GFP do selekcji komórek embrionalnych. Ostatnie zdanie ustępu poświęconego temu zagadnieniu pochodzi z recenzji.

Autorzy dziękują także Sylwii Cichosz za korektę stylistyczną niniejszej pracy.

## 12. LITERATURA

- [1] ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. *Molecular Biology of the Cell*. Taylor and Francis Group. Wyd. czwarte: 715.
- [2] ALLEN GJ, KWAK JM, CHU SP, LLOPIS J, TSIEN RY, HARPER JF, SCHROEDER JI. Cameleon calcium indicator reports cytoplasmic calcium dynamics in *Arabidopsis* guard cells. *Plant J* 1999; **19**: 735–747.
- [3] ANDERSEN JB, STERNBERG C, POULSEN LK, BJORN SP, GIVSKOV M, MOLIN S. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1998; **64**: 2240–2246.
- [4] BAIRD GS, ZACHARIAS DA, TSIEN RY. Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 11241–11246.
- [5] BASTIAENS PI, PEPPERKOK R. Observing proteins in their natural habitat: the living cell. *Trends Biochem Sci* 2000; **25**: 631–637.
- [6] BAUBET V, Le MOUILLIC H, CAMPBELL AK, LUCAS-MEUNIER E, FOSSIER P, BRULET P. Chimeric green fluorescent protein-aequorin as bioluminescent  $Ca^{2+}$  reporters at the single-cell level. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 7260–7265.
- [7] BILLINTON N, KNIGHT AW. Seeing the wood through the trees: a review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence. *Anal Biochem* 2001; **291**: 175–197.
- [8] BOGDANOV A Jr, SIMONOVA M, WEISSLEDER R. Design of metal-binding green fluorescent protein variants. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1397**: 56–64.



- [9] BRAND A. GFP in *Drosophila*. *Trends Genet* 1995; **11**: 324–325.
- [10] BREWCZYŃSKI K, FRONK J. Zielone białko fluorescencyjne GFP – struktura i właściwości. *Post Biol Kom* 2004; **31**,3: 399–419.
- [11] CATEZ F, BROWN DT, MISTELI T, BUSTIN M. Competition between histone H1 and HMGN proteins for chromatin binding sites. *EMBO Rep* 2002; **3**: 760–766.
- [12] CHAN AW, CHONG KY, MARTINOVICH C, SIMERLY C, SCHATTEN G. Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. *Science* 2001; **291**: 309–312.
- [13] CHISHIMA T, MIYAGI Y, WANG X, BARANOV E, TAN Y, SHIMADA H, MOOSSA AR, HOFFMAN RM. Metastatic patterns of lung cancer visualized live and in process by green fluorescence protein expression. *Clin Exp Metastasis* 1997; **15**: 547–552.
- [14] CHISHIMA T, MIYAGI Y, WANG X, YAMAOKA H, SHIMADA H, MOOSSA AR, HOFFMAN RM. Cancer invasion and micrometastasis visualized in live tissue by green fluorescent protein expression. *Cancer Res* 1997; **57**: 2042–2047.
- [15] CORMACK BP, BERTRAM G, EGERTON M, GOW NA, FALCOW S. Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP) a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology* 1997; **143**: 303–311.
- [16] COWLES CR, ODORIZZI G, PAYNE GS, EMR SD. The AP-3 adaptor complex is essential for cargo-selective transport to the yeast vacuole. *Cell* 1997; **91**: 109–118.
- [17] CUBITT AB, HIEM R, ADAMS SR, BOYD AE, GROSS LA, TSIEN RY. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* 1995; **20**: 448–455.
- [18] DABROWSKI S, BRILLOWSKA-DABROWSKA A, KUR J. Fluorescent protein vector for directional selection of PCR clones. *Biotechniques* 2000; **29**: 800–806.
- [19] DANDIE CE, THOMAS SM, McCLURE NC. Comparison of a range of green fluorescent protein-tagging vectors for monitoring a microbial inoculant in soil. *Lett Appl Microbiol* 2001; **32**: 26–30.
- [20] DE GIORGI F, BRINI M, BASTIANUTTO C, MARSAULT R, MONTERO M, PIZZO P, ROSSI R, RIZZUTO R. Targeting aequorin and green fluorescent protein to intracellular organelles. *Gene* 1996; **173**: 113–117.
- [21] DELL'ARCIPRETE R, STELLA M, FORNARO M, CICCOCIOPPO R, CAPRI MG, NAGLIERI AM, ALBERTI S. High-efficiency expression gene cloning by flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 1996; **44**: 629–640.
- [22] DORSKY DI, WELLS M, HARRINGTON RD. Detection of HIV-1 infection with a green fluorescent protein reporter system. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996; **13**: 308–313.
- [23] Eduardo Kac: Telepresence, Biotelematics and Transgenic Art. GFP bunny. DOBRILA PT, KOSTIC A [red.] Kibla: Maribor, Slovenia, 2000.
- [24] EHRHARDT D. GFP technology for live cell imaging. *Curr Opin Plant Biol* 2003; **6**: 622–628.
- [25] FINGER FP, HUGHES TE, NOVICK P. Sec3p is a spatial landmark for polarized secretion in budding yeast. *Cell* 1998; **92**: 559–571.
- [26] GERDES HH, KAETHER C. Green fluorescent protein: applications in cell biology. *FEBS Lett* 1996; **389**: 44–47.
- [27] GERVAIX A, WEST D, LEONI LM, RICHMAN DD, WONG-STAAAL F, CORBEIL J. A new reporter cell line to monitor HIV infection and drug susceptibility *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 4653–4658.
- [28] GORY L, MONTEL MC, ZAGOREC M. Use of green fluorescent protein to monitor *Lactobacillus sakei* in fermented meat products. *FEMS Microbiol Lett* 2001; **194**: 127–133.
- [29] GREBENOK RJ, PIERSON E, LAMBERT GM, GONG FC, AFONSO CL, HALDEMAN-CAHILL R, CARRINGTON JC, GALBRAITH DW. Green-fluorescent protein fusions for efficient characterisation of nuclear targeting. *Plant J* 1997; **11**: 753–786.
- [30] Green Fluorescent Protein: Methods in Cell Biology. SULIVAN KF, KAY SA [red.] San Diego: Academic Press 1998; t. **58**.
- [31] GURSKAYA NG, FRADKOV AF, TERSKIKH A, MATZ MV, LABAS YA, MARTYNOVA VI, YANUSHEVICH YG, LUKYANOV KA, LUKYANOV SA. GFP-like chromoproteins as a source of far-red fluorescent proteins. *FEBS Lett* 2001; **507**: 16–20.
- [32] HANAKAM F, ALBRECHT R, ECKERSKORN C, MATZNER M, GERISH G. Myristoylated and non-myristoylated forms of the pH sensor protein hisactophilin II: intracellular shuttling to plasma membrane and nucleus monitored in real time by a fusion with green fluorescent protein. *EMBO J* 1996; **15**: 2935–2943.

- [33] HANSON GT, MCANANEY TB, PARK ES, RENDELL ME, YARBROUGH DK, CHU S, XI L, BOXER SG, MONTROSE MH, REMINGTON SJ. Green fluorescent protein variants as ratiometric dual emission pH sensors. I. Structural characterization and preliminary application. *Biochemistry* 2002; **41**: 15477–15488.
- [34] HASELOFF J, AMOS B. GFP in plants. *Trends Genet* 1995; **11**: 328–329.
- [35] HASELOFF J, SIEMERING KR, PRASHER DC, HODGE S. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 2122–2127.
- [36] HEIM R, TSIEN R. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol* 1996; **6**: 178–182.
- [37] HOFFMAN RM. Visualization of GFP-expressing tumors and metastasis *in vivo*. *Biotechniques* 2001; **30**: 1016–1026.
- [38] JACOBI CA, ROGGENKAMP A, RAKIN A, ZUMBIHL R, LEITRITZ L, HEESEMANN J. *In vitro* and *in vivo* expression studies of yopE from *Yersinia enterocolitica* using the gfp reporter gene. *Mol Microbiol* 1998; **30**: 865–882.
- [39] JACONI M, BONY C, RICHARDS SM, TERZIC A, ARNAUDEAU S, VASSORT G, PUCEAT M. Inositol 1,4,5-trisphosphate directs  $Ca^{2+}$  flow between mitochondria and the Endoplasmic/Sarcoplasmic reticulum: a role in regulating cardiac autonomic  $Ca^{2+}$  spiking. *Mol Biol Cell* 2000; **11**: 1845–1858.
- [40] JARES-ERIJMAN EA, JOVIN TM. FRET imaging. *Nat Biotechnol* 2003; **21**: 1387–1395.
- [41] JUNG S, ALIBERTI J, GRAEMMEL P, SUNSHINE MJ, KREUTZBERG GW, SHER A, LITTMAN DR. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 4106–4114.
- [42] KAETHER C, GERDES HH. Visualisation of protein transport along the secretory pathway using green fluorescent protein. *FEBS Lett* 1995; **369**: 267–271.
- [43] KANDA T, SULLIVAN KF, WAHL GM. Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosomal dynamics in living mammalian cells. *Curr Biol* 1998; **8**: 377–385.
- [44] KENDALL JM, BADMINTON MN. *Aequorea victoria* bioluminescence moves into an exciting new era. *Trends Biotechnol* 1998; **16**: 216–224.
- [45] KERR R, LEV-RAM V, BAIRD G, VINCENT P, TSIEN RY, SCHAFFER WR. Optical imaging of calcium transients in neurons and pharyngeal muscle of *C. elegans*. *Neuron* 2000; **26**: 583–594.
- [46] KIRKPATRICK SM, NAIK RR, STONE MO. Nonlinear saturation and determination of the two-photon absorption cross section of Green Fluorescent Protein. *J Phys Chem B* 2001; **105**: 2867–2873.
- [47] KOTARSKY K, OWMAN C, OLDE B. A chimeric reporter gene allowing for clone selection and high-throughput screening of reporter cell lines expressing G-protein-coupled receptors. *Anal Biochem* 2001; **288**: 209–215.
- [48] KOZAK M. The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol* 1989; **108**: 229–241.
- [49] LANG T, WACKER I, STEYER J, KAETHER C, WUNDERLICH I, SOLDATI T, GERDES HH, ALMERS W.  $Ca^{2+}$ -triggered peptide secretion in single cells imaged with green fluorescent protein and evanescent-wave microscopy. *Neuron* 1997; **18**: 857–863.
- [50] LI X, ZHAO X, FANG Y, JIANG X, DUONG T, FAN C, HUANG CC, KAIN SR. Generation of destabilised green fluorescent protein as a transcription reporter. *J Biol Chem* 1998; **273**: 34970–34975.
- [51] LI Y, AGRAWAL A, SAKON J, BEITL RR. Characterization of metal affinity of green fluorescent protein and its purification through salt promoted, immobilized metal affinity chromatography. *J Chromatogr A* 2001; **909**: 183–190.
- [52] LIM CR, KIMATA Y, OKA M, NOMAGUCHI K, KOHNO K. Thermosensitivity of green fluorescent protein fluorescence utilized to reveal novel nuclear-like compartments in a mutant nucleoporin NSP1. *J Biochem (Tokyo)* 1995; **118**: 13–17.
- [53] LIPPINCOTT-SCHWARTZ J, SNAPP E, KENWORTHY A. Studying protein dynamics in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; **2**: 444–456.
- [54] LLOPIS J, McCAFFERY JM, MIYAWAKI A, FARQUHAR MG, TSIEN RY. Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 6803–6808.
- [55] LORANG JM, TUORI RP, MARTINEZ JP, SAWYER TL, REDMAN RS, ROLLINS JA, WOLPERT TJ, JOHNSON KB, RODRIGUEZ RJ, DICKMAN MB, CIUFFETTI LM. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. *Appl Environ Microbiol* 2001; **67**: 1987–1994.



- [56] MANIAK M, RAUCHENBERGER R, ALBRECHT R, MURPHY J, GERISCH G. Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualised by a green fluorescent protein Tag. *Cell* 1995; **83**: 915–924.
- [57] MARCH JC, RAO G, BENTLEY WE. Biotechnological applications of green fluorescent protein. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003; **62**: 303–315.
- [58] MATZ MV, FRADKOV AF, LABAS YA, SAVITSKY AP, ZARAIISKY AG, MARKELOV ML, LUKYANOV SA. Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. *Nature Biotechnol* 1999; **17**: 969–973.
- [59] MATZ MV, LUKYANOV KA, LUKYANOV SA. Family of green fluorescent protein: journey to the end of the rainbow. *BioEssays* 2002; **24**: 953–959.
- [60] MERCURI A, SACCHETTI A, DE BENEDETTI L, SCHIVA T, ALERTI S. Green fluorescent flowers. *Plant Sci* 2001; **161**: 961–968.
- [61] MIESENBOCK G, DE ANGELIS DA, ROTHMAN JE. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 1998; **394**: 192–195.
- [62] MISTELI T, GUNJAN A, HOCK R, BUSTIN M, BROWN DT. Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature* 2000; **408**: 877–881.
- [63] MISTELI T, SPECTOR DL. Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nature Biotech* 1997; **15**: 961–964.
- [64] MIYAWAKI A. Green Fluorescent Protein-like proteins in reef *Anthozoa* animals. *Cell Str Func* 2002; **27**: 343–347.
- [65] MIYAWAKI A, GRIESBECK O, HEIM R, TSIEN RY. Dynamic and quantitative  $\text{Ca}^{2+}$  measurements using improved cameleons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 2135–2140.
- [66] MIYAWAKI A, LLOPIS J, HEIM R, McCAFFERY JM, ADAMS JA, IKURA M, TSIEN RY. Fluorescent indicators for  $\text{Ca}^{2+}$  based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 1997; **388**: 882–887.
- [67] MORIYOSHI K, RICHARDS LJ, AKAZAWA C, O'LEARY DD, NAKANISHI S. Labelling neural cells using adenoviral gene transfer of membrane-targeted GFP. *Neuron* 1996; **16**: 225–260.
- [68] MOSEYKON, FELDMAN LJ. Expression of pH-sensitive green fluorescent protein in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* 2001; **24**: 557–563.
- [69] MURRAY AW, KIRSCHNER MW. Dominoes and clocks: the union of two views of the cell cycle. *Science* 1989; **246**: 614–621.
- [70] NAGAI T, SAWANO A, PARK ES, MIYAWAKI A. Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense  $\text{Ca}^{2+}$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 3197–3202.
- [71] NAGAI Y, MIYAZAKI M, AOKI R, ZAMA T, INOUE S, HIROSE K, IINO M, HAGIWARA M. A fluorescent indicator for visualizing cAMP-induced phosphorylation *in vivo*. *Nature Biotechnol* 2000; **18**: 313–316.
- [72] NAKAI J, OHKURA M, IMOTO K. A high signal-to-noise  $\text{Ca}^{(2+)}$  probe composed of a single green fluorescent protein. *Nature Biotechnol* 2001; **19**: 137–141.
- [73] OKABE M, IKAWA M, KOMINAMI K, NAKANISHI T, NISHIMUNE Y. «Green mice» as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 1997; **407**: 313–319.
- [74] OLSON KR, McINTOSH JR, OLMSTED JB. Analysis of MAP4 function in living cells using green fluorescent protein (GFP) chimeras. *J Cell Biol* 1995; **130**: 639–650.
- [75] ORMOE M, CUBITT AB, KALLIO K, GROSS LA, TSIEN RY, REMINGTON SJ. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 1996; **273**: 1392–1395.
- [76] PATTERSON GH, KNOBEL SM, SHARIF WD, KAIN SR, PISTON DW. Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J* 1997; **73**: 2782–2790.
- [77] PEARCE LL, GANDLEY RE, HAN W, WASSERLOOS K, STITT M, KANAI AJ, McLAUGHLIN MK, PITT BR, LEVITAN ES. Role of metallothionein in nitric oxide signalling as revealed by a green fluorescent fusion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 477–482.
- [78] PERIASAMY A, KAY SA, DAY RN. [w] FRANKS DL, TROMBERG DJ [red.] Functional Imaging and Optical Manipulation of Living Cell. Proc. SPIE 2983. Bellingham, WA: SPIE.
- [79] PINES J. GFP in mammalian cells. *Trends Genet* 1995; **11**: 326–327.
- [80] PRASHER DC, ECKENRODE VK, WARD WW, PRENDERGAST FG, CORMIER MJ. Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Gene* 1992; **111**: 229–233.
- [81] PRESCOTT M, NOWAKOWSKI S, NAGLEY P, DEVENDISH RJ. The length of polypeptide linker affects the stability of green fluorescent protein fusion proteins. *Anal Biochem* 1999; **273**: 305–307.



- [82] PRESLEY JF, COLE NB, SCHROER TA, HIRSCHBERG K, ZAAL KJ, LIPPINCOTT-SCHWARTZ J. ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* 1997; **389**: 81–85.
- [83] REITS EA, NEEFJES JJ. From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. *Nature Cell Biol* 2001; **3**: E145–E147.
- [84] REMINGTON SJ. [w] Bioluminescence and Chemiluminescence: Methods in Enzymology, Pt C. San Diego: Academic Press Inc. 2000; t. **305**.
- [85] RICHMOND TA, TAKAHASHI TT, SHIMKHADA R, BERNSDORF J. Engineered metal binding sites on green fluorescence protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **268**: 462–465.
- [86] RIZZUTO R, BRINI M, DE GIORGI F, ROSSI R, HEIM R, TSIEN RY, POZZAN T. Double labelling of subcellular structures with organelle-targeted GFP mutants *in vivo*. *Curr Biol* 1996; **6**: 183–188.
- [87] RIZZUTO R, BRINI M, PIZZO P, MURGIA M, POZZAN T. Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells. *Curr Biol* 1995; **5**: 635–642.
- [88] ROMOSER VA, HINKLE PM, PERSECHINI A. Detection in living cells of Ca<sup>2+</sup>-dependent changes in the fluorescence emission of an indicator composed of two green fluorescent protein variants linked by a calmodulin-binding sequence. A new class of fluorescent indicators. *J Biol Chem* 1997; **272**: 13270–13274.
- [89] SAWIN KE, NURSE P. Identification of fission yeast nuclear markers using random polypeptide fusions with green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 15146–15151.
- [90] SEKAR RB, PERIASAMY A. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *J Cell Biol* 2003; **160**: 629–633.
- [91] SIEGEL MS, ISACOFF EY. A genetically encoded optical probe of membrane voltage. *Neuron* 1997; **19**: 735–741.
- [92] STEARNS, T. Green fluorescent protein. The green revolution. *Curr Biol* 1995; **5**: 262–264.
- [93] STRAIGHT AF, MARSHALL WF, SEDAT JW, MURRAY AW. Mitosis in living budding yeast: anaphase A but no metaphase plate. *Science* 1997; **277**: 574–758.
- [94] SUBRAMANIAN K, MEYER T. Calcium-induced restructuring of nuclear envelope and endoplasmic reticulum calcium stores. *Cell* 1997; **89**: 963–971.
- [95] SUBRAMANIAN S, SRIENC F. Quantitative analysis of transient gene expression in mammalian cells using the green fluorescent protein. *J Biotechnol* 1996; **49**: 137–151.
- [96] TAKADA T, IIDA K, AWAJI T, ITOH K, TAKAHASHI R, SHIBUI A, YOSHIDA K, SUGANO S, TSUJIMOTO G. Selective production of transgenic mice using green fluorescent protein as a marker. *Nature Biotechnol* 1997; **15**: 458–461.
- [97] TAKAHASHI A, ZHANG Y, CENTONZE E, HERMAN B. Measurement of mitochondrial pH *in situ*. *Biotechniques* 2001; **30**: 804–812.
- [98] TERSIKH A, FRADKOV A, ERMAKOVA G, ZARAIISKY A, TAN P, KAJAVA AV, ZHAO X, LUKYANOV S, MATZ M, KIM S, WEISSMAN I, SIEBERT P. „Fluorescent timer”: protein that changes color with time. *Science* 2000; **290**: 1585–1588.
- [99] TSIEN RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 1998; **67**: 509–544.
- [100] TSIEN RY, MIYAWAKI A. Seeing the machinery of live cells. *Science* 1998; **280**: 1954–1955.
- [101] VERKHUSHA VV, LUKYANOV KA. The molecular properties and applications of *Anthozoa* fluorescent proteins and chromoproteins. *Nat Biotechnol* 2004; **22**: 289–296.
- [102] WACHTER RM, KING BA, HEIM R, KALLIO K, TSIEN RY, BOXER SG, REMINGTON SJ. Crystal structure and photodynamic behaviour of the blue emission variant Y66H/Y145F of green fluorescent protein. *Biochemistry* 1997; **36**: 9759–9765.
- [103] WACKER I, KAETHER C, KROMER A, MIGALA A, ALMERS W, GERDES HH. Mikrotubule-dependent transport of secretory vesicles visualised in real time with a GFP-tagged secretory protein. *J Cell Sci* 1997; **110**: 1453–1463.
- [104] WANG S, HAZELRIGG T. Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature* 1994; **369**: 400–403.
- [105] WHITE J, STELZER E. Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside live cells. *Trends Cell Biol* 1999; **9**: 61–65.
- [106] WIEMER EA, WENZEL T, DEERINCK TJ, ELLISMAN MH, SUBRAMANI S. Visualisation of the peroxisomal compartment in living mammalian cells: dynamic behaviour and association with microtubules. *J Cell Biol* 1997; **136**: 71–80.
- [107] XU X, GERARD AL, HUANG BC, ANDERSON DC, PAYAN DG, LUO Y. Detection of programmed cell death using fluorescence energy transfer. *Nucleic Acids Res* 1998; **26**: 2034–2035.
- [108] YANG F, MOSS LG, PHILLIPS GN Jr. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnol* 1996; **14**: 1246–1251.

- [109] YANG TT, CHENG L, KAIN SR. Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Res* 1996; **24**: 4592–4593.
- [110] YOKOE H, MEYER T. Spatial dynamics of GFP-tagged proteins investigated by local fluorescence enhancement. *Nature Biotech* 1996; **14**: 1252–1256.
- [111] YUSTE R, MILLER RB, HOLTHOFF K, ZHANG S, MIESENBOCK G. Synapto-pHluorins: chimeras between pH-sensitive mutants of green fluorescent protein and synaptic vesicle membrane proteins as reporters of neurotransmitter release. *Methods Enzymol* 2000; **327**: 522–546.
- [112] ZERNICKA-GOETZ M, PINES J, McLEAN HUNTER S, DIXON JP, SIEMERING KR, HASELOFF J, EVANS MJ. Following cell fate in the living mouse embryo. *Development* 1997; **124**: 1133–1137.
- [113] ZHAO H, IVIC L, OTAKI JM, HASHIMOTO M, MIKOSHIBA K, FIRESTEIN S. Functional expression of a mammalian odorant receptor. *Science* 1998; **279**: 237–242.
- [114] ZIMMER M. Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem Rev* 2002; **102**: 759–781.
- [115] ZOLOTKIN S, POTTER M, HAUSWIRTH WW, GUY J, MUZYCZKA N. A „humanized” green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells. *J Virol* 1996; **70**: 4646–4654.

*Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak*

*Otrzymano: 04.02.2004 r.*

*Przyjęto: 05.05.2004 r.*

*02-096 Warszawa, ul. Miecznikowa 1*

*fronk@biol.uw.edu.pl*

## ROŚLINNE RECEPTORY ŚWIATŁA NIEBIESKIEGO I UV-A POŚREDNICZĄCE W REAKCJACH FOTOTROPICZNYCH, FOTOMORFOGENEZIE I NASTAWIANIU ZEGARA BIOLOGICZNEGO

PLANT BLUE – UV A LIGHT RECEPTORS MEDIATING  
IN PHOTOTROPIC REACTIONS, PHOTOMORPHOGENESIS  
AND CIRCADIAN CLOCK ENTRAINMENT

Anna HETMANN, Stanisław KOWALCZYK

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

**Streszczenie:** Krótkofalowa część widma słonecznego, a zwłaszcza światło niebieskie (390–500 nm) i bliski ultrafiolet (320–390 nm) wywierają istotny wpływ na wzrost i rozwój roślin. Badania z zakresu genetyki i biologii molekularnej, prowadzone głównie na modelowej roślinie *Arabidopsis thaliana*, umożliwiły poznanie trzech klas receptorów światła niebieskiego i UV-A – fototropin, kryptochromów i flawoprotein z rodziny Zeitlupe. Fototropiny (phot1 i phot2) są serynowo/treoninowymi kinazami białkowymi aktywowanymi przez światło, pośredniczącymi w reakcjach fototropicznych, migracji chloroplastów, otwieraniu aparatu szparkowego i krótkotrwałym hamowaniu wzrostu wydłużeniowego pędu. Kryptochromy (Cry1, Cry2 i Cry3) są fotoreceptorami zawierającymi FAD oraz pterynę pośredniczącymi w regulacji wzrostu pędu, rozwoju liści, fotoperiodycznej indukcji kwitnienia i nastawianiu zegara biologicznego. Ztl, Fkfl i Lkp2 są flawoproteinami tworzącymi nową rodzinę receptorów światła niebieskiego, które łączy obecność domeny PAS/LOV wiążącej FMN, kasety F i sześciokrotnie powtórzonego motywu KELCH. Wyniki najnowszych badań sugerują, że flawoproteiny z rodziny Ztl funkcjonują w nastawianiu zegara biologicznego uczestnicząc w regulowanym przez światło degradowaniu białkowych elementów oscylatora komórkowego.

**Słowa kluczowe:** fototropiny, kryptochromy, flawoproteiny z rodziny Zeitlupe, zegar biologiczny.

**Summary:** Many important aspects of plant growth and development are regulated by specific blue (390–500 nm) and UV-A (320–390 nm) light. Molecular genetic and cell biological studies using *Arabidopsis thaliana* as a model system have identified three classes of blue-light/UV-A photoreceptors – phototropins, cryptochromes and flavoproteins of Zeitlupe family. Phototropins (phot1 and phot2) are the light-activated, FMN-binding serine/threonine protein kinases that mediate in phototropism, chloroplasts migration, stomatal opening and rapid inhibition of stem growth. Cryptochromes (Cry1,



Cry2 and Cry3) are the blue light receptors containing FAD and a pterine as chromophore that mediate light control of stem elongation, leaf expansion, photoperiodic flowering, and circadian clock. Ztl, Fkl1 and Lkp2 are members of new blue-light photoreceptors family. All three proteins contain PAS/LOV domain that binds FMN, F-box domain and six KELCH repeats. Last results suggest that flavoproteins of Ztl family mediate in resetting of the circadian clock by targeting oscillator components for degradation in a light-dependent manner.

*Key words:* phototropins, cryptochromes, flavoproteins of Zeitlupe family, circadian clock.

## 1. WSTĘP

Światło niebieskie (390–500 nm) i UV-A (320–390 nm) indukują w roślinach szereg reakcji fotomorfo-genetycznych, określanych wspólnym mianem deetioloacji, obejmujących m.in. hamowanie wzrostu wydłużeniowego hypokotyła, otwieranie liści, rozrost liści, rozwój chloroplastów, biosyntezę antocyjanów. Obok reakcji fotomorfo-genetycznych, kontrolowanych także przez światło czerwone i daleką czerwień, światło niebieskie indukuje reakcje fototropiczne, wpływa na migrację chloroplastów i otwieranie aparatu szparkowego, a także gra kluczową rolę w nastawianiu zegara biologicznego i uczestniczy w fotoperiodycznej kontroli kwitnienia. W ciągu ostatnich kilku lat dokonał się wyraźny postęp w poznawaniu roślinnych receptorów światła niebieskiego. Dzisiaj już wiemy, że obok odkrytego przed 10 laty kryptochromu, fotoreceptorami światła niebieskiego i UV-A są również fototropiny [16,39,60,63] oraz białka z rodziny Zeitlupe uczestniczące w nastawianiu zegara biologicznego [47]. Ponadto, pojedyncze doniesienia sugerują, że obok wymienionych wyżej fotoreceptorów flawoproteinowych, rośliny mają jeszcze inne receptory światła niebieskiego, w których rolę chromoforu grają związki karotenoidowe [27].

## 2. FOTOTROPINY – SERYNOWO/TREONINOWYMI KINAZAMI BIAŁKOWYMI REGULOWANYMI PRZEZ ŚWIATŁO NIEBIESKIE

Na początku lat dziewięćdziesiątych zidentyfikowano ponad trzydzieści mutantów *A. thaliana* wykazujących brak reakcji haczykowatego wygięcia hypokotyła w kierunku światła, a korzenia od źródła oświetlenia [11]. Ta prosta reakcja fototropiczna umożliwiła zidentyfikowanie w genomie *A. thaliana* czterech loci *nph1-4* (*non-phototropic hypocotyl*) [62] i doprowadziła do sklonowania genu *NPH1* [46]. Polipeptyd *NPH1* (112 kDa) zawiera w regionie N-końcowym dwa 107-aminokwasowe fragmenty tworzące domeny PAS, natomiast w części C-końcowej ma 11 charakterystycznych subdomen występujących w serynowo/treoninowych kinazach białkowych (ryc. 1A) [46]. Obie domeny PAS w *NPH1* (identyczne w 43%) są obecnie nazywane domenami LOV (*Light, Oxygen, Voltage*) ze względu na podobieństwo do analogicznych domen

PAS w niektórych białkach regulowanych przez światło, tlen lub zmiany napięcia [22,46]. Późniejsze szczegółowe badania reakcji fototropicznych potwierdziły brak reakcji wygięcia hypokotyli u mutantu *nph1* w warunkach małego natężenia światła niebieskiego ( $<1 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), a jednocześnie wykazały, że światło o większym natężeniu ( $1-100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) indukuje normalne reakcje fototropiczne [73,74]. Rodzące się w związku z tym wątpliwości zostały wyjaśnione w badaniach poświęconych migracji chloroplastów pod wpływem światła o zróżnicowanej intensywności. Na podstawie wcześniejszych obserwacji wiadomo było, że w warunkach niewielkiego natężenia światła, chloroplasty gromadzą się antyklinalnie w stosunku do kierunku padania światła (ryc. 2). Takie rozmieszczenie chloroplastów sprzyja maksymalnemu wykorzystaniu w fotosyntezie światła o małej intensywności. W warunkach dużego natężenia światła chloroplasty dążą do samozacienienia grupując się w pobliżu błony, peryklinalnie do kierunku padania światła, przeciwdziałając w ten sposób fotouszkodzeniom aparatu fotosyntetycznego (ryc. 2) [93]. Reakcja „ucieczki chloroplastów” od światła umożliwiła wyselekcjonowanie mutantu *cav1* (*defective in chloroplast avoidance movements*) *A. thaliana* z upośledzoną reakcją unikania światła o dużej intensywności, ale niezmienną reakcją na światło o małym natężeniu [52]. Po sklonowaniu zmutowanego genu okazało się, że jest on identyczny z genem *NPL1* (*NPH1-Like*) [50]. Sekwencja aminokwasowa *NPL1* jest w 58% identyczna z *NPH1* i podobnie jak *NPH1* ma dwie domeny LOV i domenę kinazy serynowo/treoninowej w regionie C-końcowym (ryc. 1A). Przed trzema laty, zespół badaczy zajmujących się fototropizmem zaproponował nowe akronimy dla obu polipeptydów i *NPH1* jest obecnie nazywany fototropiną 1 (PHOT1), a *NPL1* fototropiną 2 (PHOT2). W nazewnictwie holoreceptorów (polipeptyd z grupą chromoforową) zalecane są akronimy *phot1* i *phot2* [9,10].

Rekombinowane białka obu fototropin, uzyskane z komórek owadzych, zawierają niekowalencyjnie związany FMN oraz ulegają autofosforylacji po naświetleniu światłem niebieskim [17,73]. Rola mononukleotydu flawinowego była szczegółowo badana w doświadczeniach prowadzonych na rekombinowanych fragmentach polipeptydu PHOT1 uzyskanych z *E. coli* transformowanych odpowiednim fragmentem genu *PHOT1* owsa lub *A. thaliana* bądź fragmentem genu *PHY3* z paproci *Adiantum capillus-veneris* kodujących pojedynczą domenę LOV1 lub LOV2 bądź polipeptyd obejmujący obie domeny [18]. Szczegółowe analizy rekombinowanych polipeptydów potwierdziły wcześniejsze wyniki, dowodząc jednocześnie, że obie domeny LOV wiążą w stosunku 1:1 niekowalencyjnie FMN, który pod wpływem światła niebieskiego tworzy nietrwałe kowalencyjne połączenie z zresztą konserwatywnej cysteiny w LOV2 (ryc. 1B) [76,77,89]. Dzięki wykorzystaniu odpowiednich mutacji w domenie LOV oraz szczegółowym badaniom fizykochemicznym rekombinowanych polipeptydów zawierających LOV2 z *A. capillus-veneris* i owsa udało się poznać zmiany w strukturze białek, jakie towarzyszą powstawaniu kowalencyjnego połączenia między resztą cysteiny a węglem 4a w pierścieniu izoalloksazyny [20,21,42]. W wyniku tych szczegółowych analiz zaczyna się obecnie przyjmować pogląd, iż powstające na świetle kowalencyjne połączenie między FMN a LOV wymusza zmiany konformacyjne w fotoreceptorze, które aktywują domenę kinazową w regionie C-końcowym fototropiny. Biorąc pod



uwagę fakt, iż w ciemności nietrwałe połączenie między FMN a białkiem ulega likwidacji, należy przyjąć, że aktywność kinazowa fototropin w ciemności pozostaje zablokowana.

Wyniki ostatnich badań prowadzonych na transgenicznym osobniku *A. thaliana* transformowanym genem *PHOT1* z pojedynczą domeną LOV2 lub LOV1 dowodzą, że w percepcji sygnału i związanej z nią autofosforylacji phot1 dominującą rolę gra domena LOV2 [19]. Normalna reakcja fototropiczna hypokotyla występuje tylko w roślinach, które w phot1 mają obie domeny lub przynajmniej domenę LOV2 [19]. Ponadto wykazano *in vivo*, iż szereg reszt serynowych w części N-końcowej oraz w regionie położonym między LOV1 i LOV2 w phot1 owsa ulega na świetle autofosforylacji, przy czym niektóre reszty są fosforylowane w warunkach małego, a inne dopiero pod wpływem dużego natężenia światła [78].

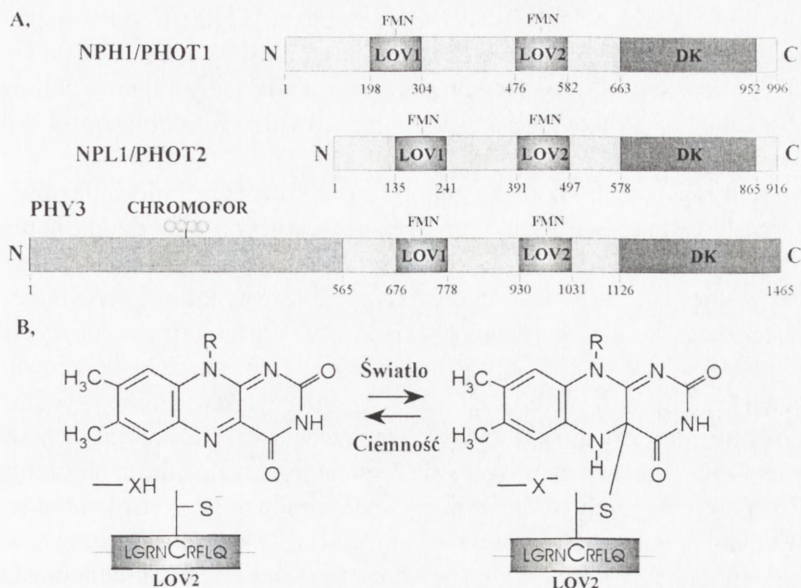
Analiza sekwencji aminokwasowej fototropin wskazuje, iż obydwa białka nie mają hydrofobowego fragmentu mogącego dokować fotoreceptor w błonie, a pomimo to chimeryczne białko, produkt konstruktu *PHOT1:GFP* wprowadzonego do *A. thaliana*, jest rozmieszczone na cytoplazmatycznej powierzchni plazmalemy [75]. Tylko pod wpływem światła niebieskiego niewielka pula phot1:GFP zostaje uwolniona do cytoplazmy, gdzie, jak się zakłada, fotoreceptor ulega degradacji.

W ostatnich latach, geny kodujące fototropiny sklonowano również w ryżu, kukurydzy, owsie, grochu, szpinaku [9], a ponadto, jak już wcześniej wspomniano, w paproci *Adiantum capillus-veneris* zidentyfikowano gen *PHY3* kodujący wyjątkowy fotoreceptor, który w części N-końcowej jest podobny do fitochromu, a w części środkowej i C-końcowej ma wszystkie charakterystyczne domeny występujące w fototropinach (ryc. 1A) [10,11].

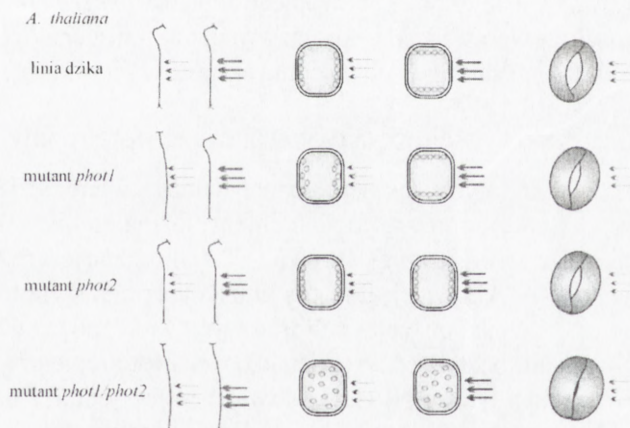
## 2.1. Reakcje fizjologiczne aktywowane przez światło niebieskie za pośrednictwem fototropin

Mutant *nph1* (*phot1*) wykazuje upośledzenie w reakcji wygięcia hypokotyla i korzenia w warunkach niewielkiego natężenia światła, chociaż światło o większym natężeniu indukuje normalną reakcję fototropiczną (ryc. 2) [73,74]. Brak reakcji wygięcia hypokotyla u podwójnego mutantu *phot1/phot2*, niezależnie od natężenia światła, sugeruje, że fotoreceptory te różnią się wrażliwością na światło oraz dowodzi, że phot1 i phot2 są jedynymi fotoreceptorami pośredniczącymi w reakcji fototropicznej [73]. Ostatnie stwierdzenie pozostaje jednak w konflikcie z wynikami wcześniejszych badań wskazujących, iż fotoreceptorami uczestniczącymi w reakcjach fototropicznych są także kryptochromy i fitochromy. Opinia odnośnie roli tych fotoreceptorów w reakcjach fototropicznych ulega obecnie pewnym modyfikacjom w związku z doniesieniami wskazującymi, iż kryptochromy i fitochromy wpływają jedynie modulująco na szlaki sygnałowe aktywowane przez fototropiny [88,95].

Badania dotyczące regulowanej przez światło niebieskie migracji chloroplastów potwierdzają wnioski płynące z badań nad fototropizmem hypokotyla dowodząc, że fototropiny 1 i 2 są aktywowane przez światło niebieskie o różnym natężeniu. Mutant *cav1* (*phot2*) nie różni się od rośliny linii dzikiej w warunkach małej intensywności światła niebieskiego ( $4 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), natomiast wykazuje upośledzenie w reakcji



RYCINA 1. Schemat budowy fototropin *A. thaliana* i fotoreceptora Phy3 paproci *Adiantum capillus-veneris* zawierających domeny LOV wiążące mononukleotydy flawinowe (FMN): A – polipeptydy PHOT1 i PHOT2 mają po dwie domeny LOV wiążące FMN, a w części C-końcowej domenę serynowo/treoninowej kinazy białkowej; fotoreceptor Phy3 oprócz typowych domen występujących w fototropinach, w części N-końcowej ma domenę podobną do fitochromowej domeny wiążącej chromofor; B – w wyniku indukowanych przez światło zmian fotochemicznych powstaje przejściowe, nietrwałe połączenie między resztą cysteiny w domenie LOV2, a węglem 4a w pierścieniu izoalloksazyny mononukleotydu flawinowego (na podstawie [10,18,21,22,46,50,52, 76,77,89])



RYCINA 2. Udział receptorów fototropinowych (*phot1* i *phot2*) o różnej wrażliwości na światło w indukowaniu charakterystycznych reakcji na światło niebieskie. Na schemacie pokazano reakcję fototropiczną hypocotyli, migrację chloroplastów oraz otwieranie aparatu szparkowego u osobników linii dzikiej oraz mutantów fototropinowych w warunkach zróżnicowanego oświetlenia. Światło niebieskie o małym ( $\leftarrow$ ) lub dużym ( $\rightleftharpoons$ ) natężeniu aktywuje receptory fototropinowe, które pośredniczą w indukowaniu właściwych odpowiedzi na światło niebieskie o różnej intensywności. Szczegóły opisano w tekście (na podstawie [10,25,50,52,53,73]).



unikania światła o natężeniu  $20\text{--}80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  [50,52]. Tylko u podwójnego mutantu *phot1/phot2* nie rejestruje się żadnych ruchów chloroplastów, niezależnie od natężenia światła niebieskiego (ryc. 2) [73]. Regulowane przez fototropiny migracje chloroplastów, podobnie jak reakcje fototropiczne, podlegają również modulującemu wpływowi fitochromów [23].

Oprócz reakcji fototropicznej hypokotyla oraz migracji chloroplastów, światło niebieskie wpływa także na ruchy komórek szparkowych oraz działa hamująco na wzrost hypokotyla. Wyniki wcześniejszych badań poświęconych regulacji otwierania i zamykaniu szparek przez światło sugerowały, że fotoreceptorami uczestniczącymi w tych reakcjach mogą być flawoproteiny lub białka zawierające karotenoidowy chromofor – cis-zeaksantynę lub cis-retinal [27]. Jednak wyniki najnowszych badań prowadzonych na mutantach fototropinowych wykazały, że światło o natężeniu mniejszym niż  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  nie powoduje otwierania szparek u mutantu *phot1*, podczas gdy u podwójnego mutantu *phot1/phot2* reakcja ta w ogóle nie występuje, niezależnie od natężenia światła (ryc. 2) [53]. Wyniki tych obserwacji pozostają jednak w konflikcie z wynikami opublikowanymi przez innych autorów dowodzącymi, że komórki szparkowe w liściach podwójnego mutantu *phot1/phot2* mogą jednak reagować na światło niebieskie [90].

W hamowaniu wzrostu hypokotyla przez światło niebieskie wyróżnia się dwie fazy, z których każda kontrolowana jest przez inne fotoreceptory. Hamowanie krótkotrwałe, rozpoczynające się natychmiast po zadziałaniu światła niebieskiego i trwające przez kilka minut, nie występuje u mutantu *phot1* [31]. Oprócz „szybkiego hamowania wzrostu”, wyróżnia się fazę wolniejszego, ale długotrwałego hamującego działania światła, w którym, jak wykazują liczne badania, pośredniczą kryptochromy [33].

Wyniki najnowszych badań opublikowane w br. potwierdzają brak wszystkich, opisanych wyżej reakcji na światło niebieskie u podwójnego mutantu *phot1/phot2 A. thaliana*, a jednocześnie dowodzą, że wprowadzenie do takiego mutantu transgenu *PHOT1* przywraca wszystkie reakcje w stopniu zależnym od poziomu ekspresji *PHOT1* [25].

## 2.2. Szlaki sygnałowe aktywowane przez fototropiny

Podsumowując wyniki dotychczasowych badań należy stwierdzić, iż fototropiny są związanymi z wewnątrzkomórkową powierzchnią plazmalemy serynowo/treoninowymi kinazami białkowymi, których aktywność katalityczna jest regulowana przez światło niebieskie i UV-A. Aktywacja domeny kinazowej przez światło kieruje uwagę badaczy na szukanie potencjalnych białek substratowych, które mogą być fosforylowane przez fototropiny lub białek bezpośrednio oddziałujących z fototropinami. Do roli takiego białka substratowego kandyduje NPH3 kodowane przez jeden z czterech genów zidentyfikowanych u mutantów *A. thaliana* z upośledzoną reakcją fototropiczną hypokotyla [62,71]. NPH3 należy do rodziny białek występujących tylko w roślinach, które łączy obecność dwóch domen odpowiedzialnych za oddziaływanie typu białko-białko. W części N-końcowej białka te mają domenę BTB/POZ (**B**road **c**omplex, **T**ramtrack, **t**ric a **B**rac1 **P**Ox **v**irus **Z**inc **f**inger), a w części C-końcowej domenę CC (**C**oiled-**C**oil) (ryc. 3A). Oprócz charakterystycznych dwóch domen NPH3 ma kilka motywów z resztami seryny i treoniny oraz resztą tyrozyny w pozycjach wskazujących

na możliwość tworzenia wiązań fosfoestrowych [71]. Technika drożdżowego systemu dwyhybridowego wykazano, że NPH3 oddziałuje za pośrednictwem domeny CC z N-końcowym fragmentem phot1, a metodą immunochemiczną potwierdzono występowanie na powierzchni plazmalemmy kompleksów białkowych utworzonych przez NPH3 i phot1 [71]. Białka NPH3 i phot1 pośredniczą w indukowanej przez światło niebieskie destabilizacji jądrowego transkryptyu *Lhcb* (*Light-harvesting, chlorophyll-binding*) i chloroplastowego *rbcL* [30].

Genem homologicznym z *NPH3* zidentyfikowanym u mutantu *A. thaliana* pozbawionego reakcji fototropicznej korzenia jest *RPT2* (*Root PhotoTropism2*) [74]. Polipeptyd RPT2 (65,8 kDa) ma również domeny BTB/POZ i CC oraz konserwatywne motywy z potencjalnymi miejscami fosforylacji, a ponadto zawiera sekwencję kierującą do jądra (NLS) (ryc.3A). Struktura pierwszorzędowa obu białek oraz możliwość tworzenia funkcjonalnych kompleksów z fototropinami sugerują, że NPH3 i RPT2 są białkami adaptorowymi, które są fosforylowane przez fototropiny na cytoplazmatycznej powierzchni plazmalemmy, a następnie migrują do jądra, gdzie przypuszczalnie oddziałują z białkami regulującymi transkrypcję (ryc. 3B).

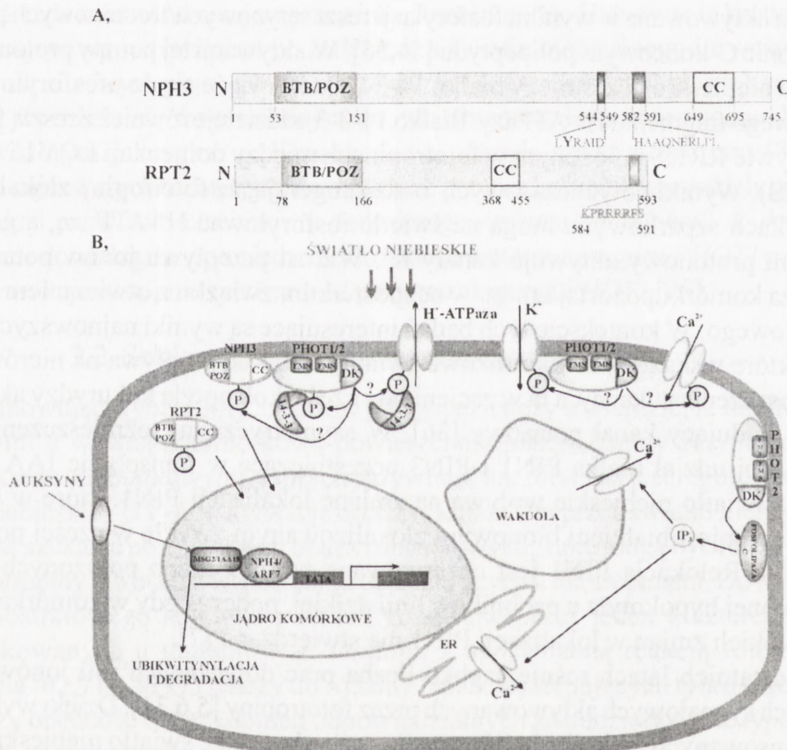
Odrębnymi ogniwami w szlakach sygnałowych aktywowanych przez fototropiny są białka zlokalizowane w plazmalemmy. Największe zainteresowanie wzbudza H<sup>+</sup>-ATPaza aktywowana w wyniku fosforylacji reszt serynowych/treoninowych położonych w regionie C-końcowym polipeptydu [54,55]. W aktywacji tej pompy protonowej przez światło niebieskie uczestniczy białko 14-3-3, które wiąże się do ufosforylowanego C-końcowego fragmentu H<sup>+</sup>-ATPazy. Białko 14-3-3 oddziałuje również z resztą fosfoseryny w motywie RRKS położonym w fototropinach między domenami LOV1 i LOV2 [54] (ryc. 3B). Wyniki dotychczasowych badań sugerują, że fototropiny zlokalizowane w komórkach szparkowych mogą na świetle fosforylować H<sup>+</sup>-ATPazę, a generowany gradient protonowy aktywuje kanały K<sup>+</sup>. Wzrost przepływu jonów potasowych do wnętrza komórki pozostaje m.in. w bezpośrednim związku z otwieraniem się aparatu szparkowego. W kontekście tych badań interesujące są wyniki najnowszych doświadczeń, które wskazują, że kierunkowe światło niebieskie wpływa na nierównomierne rozmieszczenie auksyny, a ta w zacienionej części koleoptyla kukurydzy aktywuje gen *ZMK1* kodujący kanał potasowy [36]. W asymetrycznym rozmieszczeniu auksyny mają swój udział białka PIN1 i PIN3 uczestniczące w transporcie IAA z komórki [7,34]. Światło niebieskie wpływa na zmianę lokalizacji PIN1, które w komórkach hypokotyli jest białkiem błonowym zlokalizowanym zwykle w części podstawowej komórki. Relokacja PIN1 jest obserwowana w komórkach położonych po stronie zacienionej hypokotyli u osobników linii dzikiej, podczas gdy w komórkach mutantu *phot1* takich zmian w lokalizacji PIN1 nie stwierdzano [7].

W ostatnich latach rośnie szybko liczba prac dotyczących roli jonów wapnia w szlakach sygnałowych aktywowanych przez fototropiny [5,6,31]. Dzięki wykorzystaniu zaawansowanych technik analitycznych stwierdzono, że światło niebieskie aktywuje transport jonów wapnia do wnętrza komórki. Zmiany takie są łatwo zauważalne u osobników linii dzikiej i u mutantów kryptochromowych, natomiast nie występują u mutantu *nph1* (*phot1*) [87]. Wydaje się, że aktywacja kanałów wapniowych

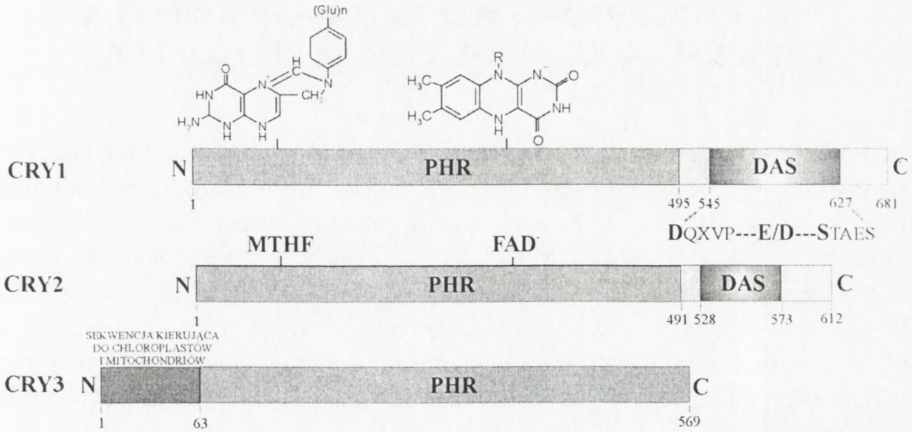


zlokalizowanych w plazmalemie może być efektem ich fosforylacji przez fototropiny (ryc. 3B) [87]. Harada i wsp. [40] badając mutanty *phot1* i *phot2* wykazali, że *phot1* pośredniczy w indukowanym przez światło transporcie jonów wapnia do cytoplazmy przy natężeniu  $0,1-50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , podczas gdy *phot2* jest aktywna dopiero przy natężeniu światła od 1 do  $250 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Prezentowane przez autorów wyniki dowodzą, że szlak sygnałowy aktywowany przez *phot2* obejmuje również fosfolipazę C i uwalniany w wyniku jej aktywacji 1,4,5-trisfosforan inozytoli, który uruchamia wewnątrzkomórkowe magazyny wapnia (ryc. 3B) [40].

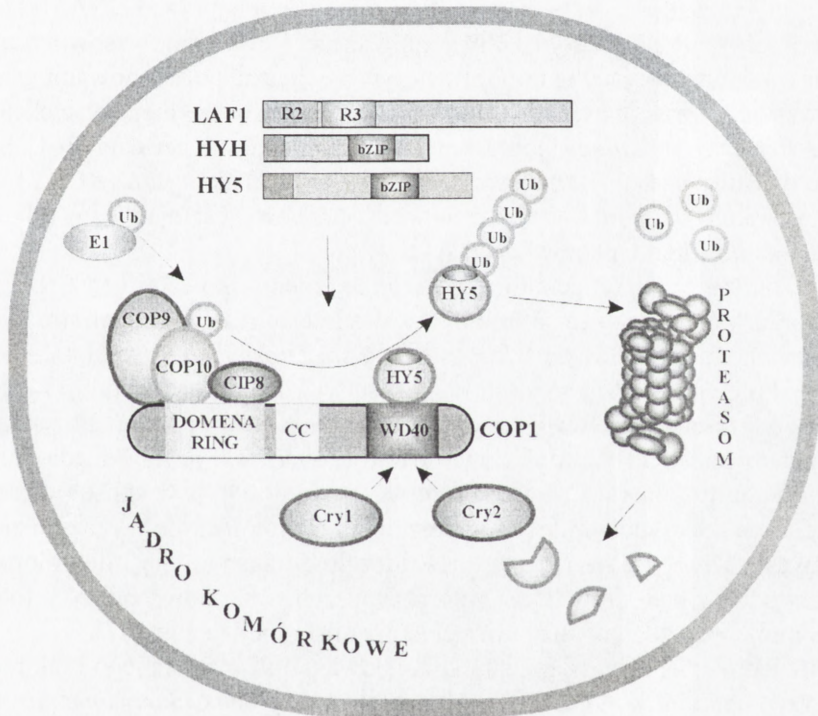
Jednym z końcowych ogniw w łańcuchach sygnałowych aktywowanych przez fototropiny jest białko NPH4 kodowane przez jeden z genów *A. thaliana* zidentyfikowanych u mutantów fototropicznych. Mutacja w *NPH4* prowadzi do braku reakcji hypokotyla na auksynę, która, jak już wyżej wspomniano, pośredniczy w nierównomiernym wzroście siewki. Mutant *nph4* ma zmieniony gen *ARF7*, jeden z 23 genów *ARF* (*Auxin Response Factor*) kodujących białka regulujące transkrypcję genów tzw. wtórnych odpowiedzi auksynowych [43,100]. Białko NPH4/ARF7 oddziałuje z białkiem MSG2/IAA19 z rodziny białek represorowych Aux/IAA, których poziom jest regulowany przez auksyny [91].



RYCINA 3. Białkowe elementy szlaków sygnałowych aktywowanych przez fototropiny: A – schemat budowy polipeptydów NPH3 i RPT2 tworzących kompleksy z fototropinami; B – enzymy, kanały jonowe i białka jądrowe regulowane przez światło niebieskie za pośrednictwem fototropin. Szczegóły opisano w tekście (na podstawie [5,6,36,40,43,54,55, 71,74,87,91])



RYCINA 4. Schemat budowy polipeptydów CRY1, CRY2 i CRY3 *A. thaliana*. Wszystkie trzy fotoreceptory mają domenę PHR wiążącą chromofory, homologiczną z odpowiednią domeną w fotoliazach – enzymach naprawiających DNA. Fragmenty C-końcowe polipeptydów CRY1 i CRY2 mają domeny DAS. CRY3 w części N-końcowej ma fragment zawierający sekwencje kierujące białko do chloroplastów i mitochondriów (na podstawie [12,57,61])



RYCINA 5. Udział kryptochromów w regulowanej przez światło degradacji czynników transkrypcyjnych. Aktywność ligazy ubikwitynowej COP1 jest aktywowana przez Cry1 i Cry2, które oddziałują z domeną WD-40 w COP1. Na schemacie zaznaczono białka tworzące kaskadę enzymów uczestniczących w ubikwitynacji (E1, COP10) oraz kompleks regulatorowy COP9. Szczegóły opisano w tekście (na podstawie [45,94,97])



### 3. KRYPTOCHROMY – RECEPTORAMI ŚWIATŁA NIEBIESKIEGO PODOBNYMI DO FOTOLIAZ

Kryптоchromy są receptorami światła niebieskiego i UV-A współdziałającymi z fitochromami w regulacji procesów fotomorfogenezy. Kryптоchromy pośredniczą w hamowaniu wzrostu wydłużeniowego pędu, stymulują rozrost liści, uczestniczą w nastawianiu zegara komórkowego i funkcjonują w fotoperiodycznej indukcji kwitnienia. W pracy przeglądowej opublikowanej przed pięcioma laty w *Postęпах Biologii Komórki* [92] prezentowano budowę, właściwości oraz proponowane wówczas mechanizmy działania kryптоchromów. Zainteresowanemu Czytelnikowi polecamy także prace przeglądowe opublikowane w ostatnim czasie w czasopiśmie o zasięgu ogólnosiwiatowym [60,61,79,80].

Indukowane przez światło niebieskie długotrwałe hamowanie wzrostu hypokotyli umożliwiło wyselekcjonowanie mutantu *hy4* (*hypocotyl 4*) *A. thaliana*, u którego następnie zidentyfikowano i sklonowano gen *CRY1* [61,92]. Polipeptyd *CRY1* (75,8 kDa) zawiera w części N-końcowej domenę określaną akronimem *PHR* (*PHotolyase Related*), której sekwencja aminokwasowa jest w 70% identyczna z sekwencją bakteryjnych fotoliaz – enzymów funkcjonujących w naprawie DNA [60,61,79,80]. Za domeną *PHR* polipeptyd *CRY1* ma jeszcze 186-aminokwasowy fragment C-końcowy niewystępujący w fotoliazach (ryc. 4). Pięć lat po sklonowaniu genu *CRY1*, Lin i wsp., używając jego fragmentu jako sondy hybrydyzacyjnej, wyselekcjonowali z biblioteki cDNA *A. thaliana* klon, a następnie zidentyfikowali gen *CRY2* [61]. Sekwencja aminokwasowa części N-końcowej *CRY2* jest w 58% identyczna z *CRY1*, lecz jego krótszy o około 70 aminokwasów fragment C-końcowy jest identyczny tylko w 14% z odpowiednim fragmentem w *CRY1* (ryc. 4).

W ostatnim czasie w genomie *A. thaliana* zidentyfikowano gen *CRY3* kodujący polipeptyd, którego sekwencja aminokwasowa jest najbardziej zbliżona do fotoliaz oraz do kryптоchromów poznanych u *Synechocystis sp.*, *Drosophila melanogaster* i człowieka [12,57]. Polipeptyd *CRY3* różni się od pozostałych dwóch kryптоchromów *A. thaliana* tym, że w części N-końcowej ma około 70-aminokwasowy fragment z sekwencjami kierującymi białko do chloroplastów i do mitochondriów (ryc. 4). Ponadto fotoreceptor *Cry3* nie ma fragmentu C-końcowego, wiąże się do DNA w sposób niezależny od sekwencji nukleotydowej, lecz w odróżnieniu od fotoliaz nie wykazuje aktywności naprawczej DNA. Potwierdzony doświadczalnie transport *Cry3* do chloroplastów i mitochondriów stał się podstawą do przypuszczeń, że nowo odkryty fotoreceptor funkcjonuje w tych organellach w regulacji transkrypcji genów [57].

Różnice w wielkości fragmentu C-końcowego lub w ogóle jego brak nie dotyczą tylko kryптоchromów *A. thaliana*. W kryптоchromie glonu *Chlamydomonas reinhardtii* część C-końcową polipeptydu tworzy około 380 reszt aminokwasowych, podczas gdy kryптоchrom gorczycy (*Sinapis alba*), czy jeden z kryптоchromów *Adiantum capillus-veneris* (*CRY5*) w ogóle nie mają fragmentu C-końcowego [60,61].

Wiedza na temat budowy holoreceptorów wszystkich trzech kryptochromów pochodzi, jak dotychczas, jedynie z badań prowadzonych na rekombinowanych białkach. Dzięki tym badaniom wiemy, że rekombinowany Cry1 z komórek owadzych ma dwa chromofory – niekowalencyjnie związany FADH i chromofor pterynowy MTHF (5,10-metenilo-tetrahydrofolan) (ryc. 4) [60,61,79,80]. Niektóre roślinne kryptochromy w części C-końcowej mają trzy charakterystyczne motywy określane jako domena DAS. Motyw pierwszy tworzy sekwencja **DQXVP**, drugi zawiera aminokwasy kwaśne (*Acidic*), a trzeci stanowi sekwencja **STAES** (ryc. 4) [60,61]. Uważa się, że domena DAS gra ważną rolę w funkcjonowaniu kryptochromów, ponieważ 7 allelicznych mutacji w *CRY1* dotyczy tego właśnie regionu [61]. Potwierdzają to także wyniki doświadczeń, w których badano zmiany fenotypowe w roślinach transgenicznych, do których wprowadzono konstrukty *GUS:CCT1* lub *GUS:CCT2* utworzone z genu *GUS* i małego fragmentu *CRY1* lub *CRY2* kodującego C-końcowy odcinek polipeptydu [98]. Okazało się, że syntetyzowane chimeryczne białka indukują w warunkach ciemności zmiany fenotypowe (krótki hypokotyl, otwarte liścienie, podwyższone stężenie antocyjanów, rozwijające się chloroplasty) charakterystyczne dla warunków świetlnych lub występujące w ciemności u mutantów *cop/det/fus* [45]. Zmiany fenotypowe towarzyszące ekspresji konstruktu *GUS:CCT1* obserwowano również u mutantów pozbawionych Cry1, PhyA i PhyB, natomiast białka *GUS:CCT1* z mutacjami w części C-końcowej (*CCT1*) w pozycjach odpowiadających kilku allelicznym mutantom *hy4/cry1* nie indukują podobnych zmian [98].

Konstrukty *GUS:CRY2*, *GFP:CRY2*, a także *GUS:CRY2C* kodujący chimeryczne białko zawierające 130-aminokwasowy C-końcowy fragment *CRY2* wykorzystano w badaniach lokalizacji subkomórkowej fotoreceptora. Uzyskane wyniki dowodzą, że *Cry2* jest zlokalizowany w jądrze niezależnie od tego, czy roślina znajduje się na świetle, czy pozostaje w ciemności [37,58,98]. Dwuczęściowa sekwencja skierowująca *Cry2* do jądra położona jest w regionie C-końcowym (pozycja 541 do 558). Podobnej sekwencji nie ma *Cry1*, który na świetle występuje na terenie cytoplazmy, a po przeniesieniu rośliny do ciemności zmienia lokalizację na jądrową [94,98]. W tym miejscu warto zwrócić uwagę na fakt, iż warunki migracji *Cry1* między cytoplazmą a jądrem są takie same jak w przypadku białka *COPI*, którego aktywność ligazy ubikwitynowej jest regulowana m. in. przez kryptochromy [45] (patrz podrozdział 3.1.).

Mimo że w strukturze pierwszorzędowej kryptochromów *A. thaliana* nie ma typowej sekwencji wiążącej nukleotydy trifosforanowe, to jednak, jak się ostatnio okazało, obydwa fotoreceptory wiążą ATP, a po naświetleniu światłem niebieskim ulegają autofosforylacji [8,83,84]. Autofosforylacja rekombinowanego *Cry1* uzyskanego z komórek owadzych zachodzi na świetle, ale tylko wówczas, gdy fotoreceptor zawiera FAD. Inaczej jest w przypadku białka chimerycznego *GUS:CCT2*, które jest fosforylowane *in vivo* zarówno na świetle, jak również w ciemności [83]. Bez odpowiedzi pozostaje pytanie, czy kryptochromy, podobnie jak *PhyA*, są nietypowymi kinazami białkowymi. Na razie wiemy tylko, że reszta fosforanowa z *Cry1* nie jest przenoszona na klasyczne substraty (kazeina, histon, zasadowe białko mieliny) używane w badaniach kinaz białkowych [8]. Badacze zajmujący się kryptochromami sugerują, że auto-



fosforylacja Cry2 poprzedza jego szybką degradację na świetle, za którą odpowiedzialne są zarówno domena PHR, jak też fragment C-końcowy [1,37,83]. Inaczej jest jednak w przypadku Cry1, którego poziom w tkance wystawionej na działanie światła nie ulega istotnym wahaniom. Warto w tym miejscu zwrócić uwagę na fakt, że szybka degradacja Cry2 na świetle przypomina labilny PhyA, a względna stabilność w takich warunkach Cry1 upodabnia go do PhyB.

W kontekście wyników badań wiążących autofosforylację kryptochromów z reakcjami aktywowanymi przez te fotoreceptory pojawia się pytanie o to, jak fragment C-końcowy pozbawiony domeny PHR aktywuje w ciemności szlaki sygnałowe indukujące reakcje deetiolacji [98]. Szukając odpowiedzi na to pytanie można założyć, że domena PHR wiążąca chromofory blokuje w ciemności aktywność fragmentu C-końcowego zapobiegając jego autofosforylacji. Indukowane przez światło reakcje fotochemiczne w domenie PHR oraz towarzyszące im zmiany konformacyjne białka powodują „uwolnienie” domeny C-końcowej zaangażowanej w autofosforylację reszt serynowych (m.in. w motywie STAES). W ten sposób fragment C-końcowy w białku GUS:CCT1 jest aktywny również w ciemności, ponieważ nie jest blokowany przez domenę PHR i może w tych warunkach ulegać autofosforylacji. Proponowana sugestia jest jednak oparta na mało prawdopodobnym założeniu, które lokuje niezidentyfikowany motyw wiążący ATP oraz domenę odpowiedzialną za autofosforylację w regionie C-końcowym kryptochromów. Na podstawie podobieństwa domeny PHR do fotoliaz można przypuszczać, że to raczej ta domena jest odpowiedzialna za wiązanie ATP i auto-fosforylację na świetle fragmentu C-końcowego. Przyjmując taką możliwość należałoby sądzić, iż w przypadku białka GUS:CCT1 pozbawionego domeny PHR, reakcja kryptochromowa jest indukowana w ciemności dlatego, że „odsłonięty” fragment C-końcowy ulega nieswoistej fosforylacji przez jedną z wielu roślinnych kinaz białkowych. W przeprowadzonych wcześniej doświadczeniach wykorzystujących technikę drożdżowego systemu dwuhybrydowego oraz metody immunoprecypitacji wykazano, że fragmenty C-końcowe CRY1 i PHYA oraz CRY2 i PHYB oddziałują ze sobą fizycznie [2,67]. Ponadto stwierdzono, że rekombinowane białka Cry1 i Cry2 *A. thaliana* uzyskane z komórek owadzych są fosforylowane przez fitochrom A owsa oczyszczony z drożdży transformowanych genem *PHYA*. Dzisiaj już wiemy, że fitochrom A owsa wykazuje aktywność serynowo/treoninowej kinazy białkowej regulowanej przez światło czerwone i daleką czerwień [45]. Fosforylacja Cry1 w obecności PhyA *in vitro* zachodzi niezależnie od rodzaju światła, ale *in vivo* Cry1 jest fosforylowany w regionie C-końcowym jedynie na świetle czerwonym [1].

### 3.1. Szlaki sygnałowe aktywowane przez kryptochromy

Nowe techniki badawcze, a szczególnie technika mikromacierzy DNA, umożliwiają prowadzenie systematycznych analiz aktywności transkrypcyjnej, dając tym samym pewne wyobrażenie o skali zmian, jakie towarzyszą aktywacji poszczególnych szlaków sygnałowych oraz pozwalają częściowo ocenić zakres wzajemnych powiązań między szlakami sygnałowymi aktywowanymi przez poszczególne fotoreceptory. Dzięki wykorzystaniu techniki mikromacierzy DNA wykazano, że spośród 6126 analizowanych

genów *A. thaliana* światło niebieskie reguluje około 28% (1712 genów). U podwójnych mutantów *cry1/cry2* i w osobnikach transgenicznym z nadekspresją genu *CRY1* stwierdzono zmiany w ekspresji około 634 genów (37% z 1712 genów regulowanych przez światło niebieskie) [64]. W podobnych badaniach prowadzonych na siewkach *A. thaliana* stwierdzono, że światło niebieskie wpływa na transkrypcję około 26% spośród 1370 genów kodujących czynniki transkrypcyjne. Ekspresja około dwóch trzecich genów (249) była aktywowana, a jednej trzeciej (115) była hamowana przez światło. Spośród tych 364 genów, aż 133 geny są regulowane przez kryptochromy, natomiast regulacja pozostałych (231) genów odbywa się za pośrednictwem innych receptorów światła niebieskiego, a przypuszczalnie również fitochromów [51].

Odkrywanie molekularnych mechanizmów funkcjonowania fitochromów, które były już prezentowane na łamach Postępów Biologii Komórki [45], kieruje uwagę badaczy na poszukiwanie podobnych mechanizmów opartych na bezpośrednich oddziaływaniach kryptochromów z kompleksami białkowymi regulującymi transkrypcję. Faktycznie, doniesienie opublikowane przed kilku laty zwraca uwagę na możliwość wiązania Cry2 do chromosomów, chociaż prezentowane wyniki nic nie mówią o tym, czy fotoreceptor wiąże się z DNA czy oddziałuje z białkami chromosomów [61]. Inaczej jest w przypadku badań wiążących rolę kryptochromów z regulacją aktywności białka COP1 funkcjonującego w kaskadzie ubikwityna/proteasom jako ligaza ubikwitynowa E3 [94,97]. Wiązanie fragmentu C-końcowego kryptochromów (Cry1 i Cry2) do domeny WD-40 w białku COP1 (ryc. 5) hamuje aktywność ligazową i ogranicza ubikwitynylację białek przeznaczonych do degradacji w proteasomach. W ten sposób kryptochromy mogą pośredniczyć w regulacji poziomu czynników transkrypcyjnych HY5, HYH, LAF1, a przypuszczalnie również innych białek uczestniczących w regulacji transkrypcji [45].

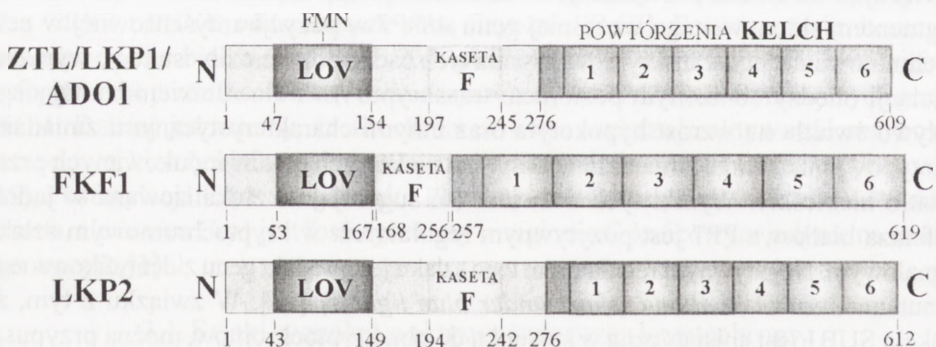
Kolejnym białkiem pośredniczącym w przekazywaniu sygnału kryptochromowego jest fosfataza serynowo/treoninowa PP7 (*Protein Phosphatase 7*) [70]. Autorzy pracy, nawiązując do badań prowadzonych na zwierzętach, transformowali *A. thaliana* fragmentem sklonowanego wcześniej genu *AtPP7* w pozycji antysensownej w celu wyeliminowania jego transkryptów. Wyniki tych badań potwierdziły istnienie wyraźnej korelacji między obniżonym poziomem transkryptu *AtPP7* a zanikiem hamującego wpływu światła na wzrost hypokotyli oraz innymi charakterystycznymi zmianami fenotypowymi, a także zmianami w ekspresji niektórych genów indukowanych przez światło niebieskie. Wyniki tych doświadczeń sugerują, że zlokalizowana w jądrze fosfataza białkowa PP7 jest pozytywnym regulatorem w kryptochromowym szlaku sygnałowym. Negatywnym regulatorem tego szlaku jest produkt genu zidentyfikowanego u mutantu *sub1 A. thaliana* (*short under blue light 1*) [38]. W związku z tym, że funkcja SUB1 jest epistatyczna w stosunku do obu kryptochromów, można przypuszczać, że obydwie fotoreceptory są supresorami SUB1 w reakcjach indukowanych przez światło niebieskie. Białko SUB1, zlokalizowane w cytoplazmie w pobliżu jądra, ma dwa motywy dłoni EF wiążące  $Ca^{2+}$ , co może sugerować, że w sygnalizacji kryptochromowej uczestniczą również jony wapnia. Faktycznie, wyniki prezentowane w niektórych doniesieniach wskazywały na jony wapnia jako ewentualne ogniwo w szlaku aktywowanym przez światło regulującym ekspresję genu syntazy chalkonowej



(*CHS*) [61]. Jednakże wyniki najnowszych badań dowodzą, że w komórkach mutantów *cry1* i *cry2* aktywowany przez światło niebieskie transport  $\text{Ca}^{2+}$  do cytoplazmy zachodzi normalnie, podczas gdy w komórkach mutantu *phot1* i podwójnego mutantu *phot1/phot2* podobnego wzrostu stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  w cytoplazmie się nie obserwuje [5]. Od wielu lat wiadomo również, że światło niebieskie powoduje depolaryzację błony, która według opinii niektórych badaczy pozostaje w ścisłym związku z aktywującym wpływem kryptochromów na kanały anionowe [32]. Jednak udział kryptochromów w aktywacji kanałów anionowych zaczyna budzić pewne wątpliwości nie tylko ze względu na brak wyraźnego postępu w tych badaniach, ale również ze względu na wyniki niektórych doświadczeń, które wyraźnie wskazują, że również *phot1* i fitochromy mogą wpływać na depolaryzację błony [32,33].

#### 4. FLAWOPROTEINY Z RODZINY ZEITLUPE FOTORECEPTORAMI FUNKCJONUJĄCYMI W UBIKWITYNYLACJI BIAŁEK

W badaniach poświęconych poznawaniu molekularnego mechanizmu zegara biologicznego wyselekcjonowano mutantu *ztl* (*zeitlupe*) *A. thaliana*, u którego okres cyklu w rytmicznie zmieniającej się ekspresji wybranych genów reporterowych oraz w cyklicznych ruchach liścieni uległ istotnemu wydłużeniu w warunkach ciągłego światła [85]. Zmiany te, jak się okazało, są spowodowane mutacją w genie kodującym polipeptyd, który w części N-końcowej ma typową domenę LOV identyczną w 38–40% z domenami LOV w *PHOT1* i *PHY3* (ryc. 6) [47,85]. W części środkowej *ZTL* położony jest motyw



RYCINA 6. Schemat budowy flawoprotein z rodziny Zeitlupe. Wszystkie trzy polipeptydy mają domenę LOV wiążącą FMN, kasetę F oraz sześciokrotnie powtórzony motyw KELCH. Obecność kasety F w fotoreceptorach świadczy o tym, że wszystkie trzy flawoproteiny mogą wchodzić w skład wielo-podjednostkowych kompleksów ligazy ubikwitynowej typu SCF uczestniczących w regulowanej przez światło niebieskie ubikwitynylacji określonych białek swoiście rozpoznawanych i wiązanych przez fotoreceptory (na podstawie [47,49,56,72, 81,85])

tw. kasety F, a C-końcówką połowę polipeptydu tworzy sześć powtórzeń tzw. motywu KELCH, który w innych białkach układa się w strukturę śmigła pośredniczącą w oddziaływaniach z innymi białkami.

W tym samym czasie w innych pracowniach sklonowano geny *LKP1* i *ADO1* [49,56], które okazały się identyczne z *ZTL*. Wyselekcjonowano też innego mutanta *A. thaliana* z przesuniętym czasem zakwitania, który ma zmieniony gen *FKF1* (*Flavin-binding, Kelch repeat, Fbox*) kodujący polipeptyd identyczny w 62% z *ZTL* (ryc. 6) [72]. Genem homologicznym z *ZTL* i *FKF1* jest także *LKP2* (*LOV Kelch Protein 2*) kodujący polipeptyd, którego sekwencja aminokwasowa poszczególnych domen jest w 66–80% identyczna z *ZTL* i w 62–67% identyczna z *FKF1* [81].

Obecność we wszystkich trzech białkach domeny LOV wiążącej FMN [47] oraz kasety F sugeruje, że są one receptorami flawoproteinowymi wchodzącymi w skład różnych kompleksów ligaz ubikwitynowych E3 typu SCF rozpoznającymi i wiążącymi białka przeznaczone do degradacji w proteasomach. Regulacja ubikwitynylacji białek substratowych przez światło niebieskie mogła by się odbywać już na etapie asocjacji fotoreceptora z pozostałymi podjednostkami kompleksu ligazy SCF lub mogła by polegać na indukowanych przez światło zmianach powinowactwa fotoreceptora tworzącego kompleks SCF do białka substratowego. Uwaga badaczy skupia się obecnie na poszukiwaniach białek, które są swoiście rozpoznawane i wiązane przez fotoreceptory z rodziny Ztl. W doniesieniu opublikowanym w ostatnim czasie prezentowane są wyniki świadczące o tym, że kompleks SCF<sup>ZTL</sup> pośredniczy w ubikwitynozależnej proteolizie białka TOC1/APRR1, jednego z elementów zegara komórkowego [68]. Ponadto w pracy opublikowanej przed trzema laty zwraca się uwagę na możliwość fizycznego oddziaływania fotoreceptora Ztl z Cry1 i PhyB [49].

## 5. RECEPTORY ŚWIATŁA NIEBIESKIEGO UCZESTNICZĄCE W NASTAWIANIU OSCYLATORA KOMÓRKOWEGO

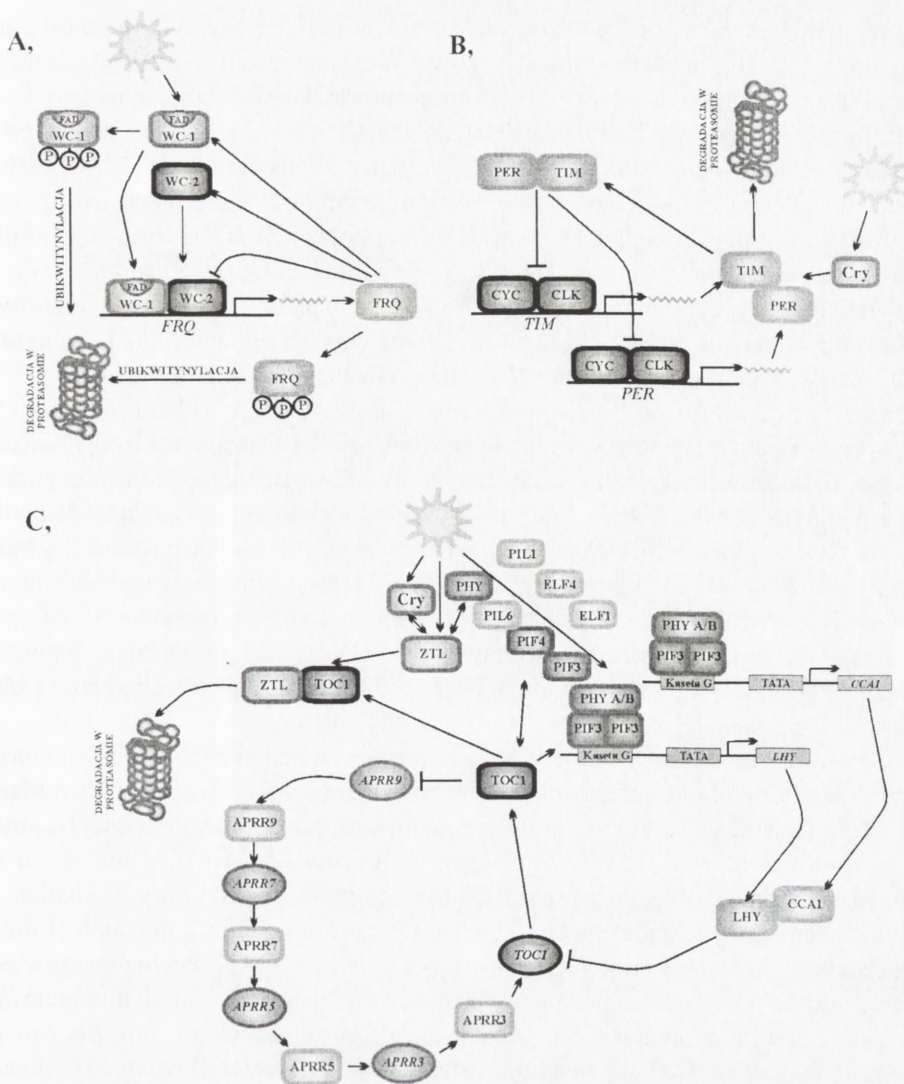
Ostatnie lata przyniosły serię odkryć, które znacząco poszerzyły naszą wiedzę na temat funkcjonowania zegara biologicznego. Dzięki tym badaniom zaczynamy rozumieć mechanizm oscylatora komórkowego, a także wiemy coraz więcej o sposobie dostrajania zegara komórkowego do zmieniającego się w cyklu rocznym fotoperiodu. Transkrypcyjno/translacyjny model oscylatora komórkowego oparty jest na mechanizmie sprzężenia zwrotnego, w którym ekspresja genu będącego elementem oscylatora jest hamowana przez białko kodowane przez ten gen. Autosupresja własnego genu, zwykle za pośrednictwem innego elementu oscylatora, zamyka pętlę transkrypcyjno/translacyjną tworzącą autonomiczny mechanizm zegara [26,41,79]. Funkcjonowanie oscylatora objawia się regularnymi, oscylacyjnymi zmianami poziomu mRNA, a z pewnym opóźnieniem również poziomu białka (białek) tworzącego negatywny element pętli oscylacyjnej. Szybkość dojrzewania transkryptów, potranslacyjne modyfikacje białka, szybkość jego przechodzenia z cytoplazmy do jądra, tempo degradacji, a także zdolność do wiązania



z innymi elementami zegara określają czas trwania jednego cyklu. Działanie zegara oparte na mechanizmie pętli transkrypcyjno/translacyjnej oscylatora sugeruje, iż nastawianie zegara do subiektywnego cyklu zmian dzień/noc powinno polegać na zmianie ekspresji co najmniej jednego z genów tworzących pętlę lub zmianie szybkości zaniku któregoś z białkowych elementów pętli. Faktycznie, wyniki dotychczasowych doświadczeń dowodzą, że w każdym z badanych dotychczas organizmów kluczowym lub jednym z głównych elementów układu „wejścia” pośredniczącym w nastawianiu oscylatora komórkowego jest flawoproteinowy receptor światła niebieskiego [14,79,80].

Najbardziej zaawansowane obecnie badania zegara komórkowego prowadzone na *Neurospora crassa* dostarczyły wielu dowodów świadczących o tym, że oscylator tworzą tutaj geny *WC-1* i *WC-2* (*WHITE COLLAR*) oraz gen *FRQ* (*FREQUENCY*) [15]. Białko WC-1 jest flawoproteinowym fotoreceptorem światła niebieskiego tworzącym z homologicznym białkiem WC-2 heterooligomeryczny kompleks, który aktywuje ekspresję genu *FRQ* kodującego negatywny składnik oscylatora. Wzrost poziomu białka FRQ hamuje wiązanie kompleksu WC-1/WC-2 (pozytywny element oscylatora) do promotora genu *FRQ*, blokując w ten sposób ekspresję własnego genu (ryc. 7A). Czas życia białka FRQ jest regulowany przez kinazy białkowe, bowiem fosforylacja FRQ prowadzi do jego ubikwitynylacji i degradacji w proteasomie. Obniżenie poziomu białka FRQ ogranicza jego oddziaływanie z kompleksem WC-1/WC-2, co w efekcie prowadzi do ponownej aktywacji genu *FRQ* i rozpoczęcia kolejnego cyklu. Białko FRQ gra, jak się okazuje, podwójną rolę, bowiem oprócz funkcji represyjnej w stosunku do własnego genu, aktywuje ekspresję genów *WC*. Białko WC-1 zawiera trzy domeny PAS, spośród których domena położona najbliżej N-końca jest typową domeną LOV wiążącą FAD [35,44]. W regionie C-końcowym WC-1 ma domenę z motywem palca cynkowego wiążącą DNA, sekwencję NLS, a dalej domenę uczestniczącą w aktywacji transkrypcji. Światło niebieskie reguluje wiązanie kompleksu WC-1/WC-2 do promotora *FRQ*, a ponadto aktywuje fosforylację obu czynników transkrypcyjnych, które są następnie kierowane do degradacji w proteasomach (ryc. 7A).

W komórkach *Drosophila melanogaster* oscylator komórkowy tworzą białka PER (*PERIOD*) i TIM (*TIMELESS*) oraz czynniki transkrypcyjne CLK (*CLOCK*) i CYC (*CYCLE*) aktywujące ekspresję genów *PER* i *TIM* (ryc. 7B) [26,82]. Wzrost poziomu białek PER i TIM w cytoplazmie sprzyja ich dimeryzacji, a powstające heterodimery PER/TIM wnikają do jądra, gdzie w wyniku oddziaływań z czynnikami transkrypcyjnymi CLK/CYC hamują transkrypcję genów *PER* i *TIM*. Tak więc, kompleks PER/TIM jest negatywnym elementem pętli sprzężenia zwrotnego hamującym ekspresję własnych genów, natomiast CLK i CYC są pozytywnymi składnikami oscylatora [82]. Technika drożdżowego systemu dwuhybrydowego wykazano, że kryptochrom *D. melanogaster* oddziałuje z TIM i PER, a przypuszczalnie również z dimerem PER/TIM, kontrolując ich degradację w proteasomach [82]. Wyniki publikowanych obecnie prac sugerują, że kryptochrom muszki owocowej podobny do Cry3 *A. thaliana* jest kluczowym fotoreceptorem pośredniczącym w nastawianiu zegara w komórkach peryferyjnych, natomiast w synchronizowaniu centralnego oscylatora obok Cry uczestniczy także rodopsyna. Nadal jednak nie wiadomo, w jaki sposób Cry reguluje



RYCINA 7. Fotoreceptory światła niebieskiego pośredniczące w nastawianiu zegara biologicznego w komórkach *Neurospora crassa* (A), *Drosophila melanogaster* (B) i *Arabidopsis thaliana* (C). Szczegóły opisano w tekście (na podstawie [14,15,24,26,28, 29,41,44,68,69,79,80,82])

fosforylację, ubikwitynylację i degradację TIM i PER, podobnie jak nie jest znany mechanizm kontrolujący degradowanie samego fotoreceptora [14,82].

Na podstawie dotychczasowych badań prowadzonych na kręgowcach zaproponowano model oscylatora, w którym trzy homologiczne białka PER razem z dwoma kryptochromami są negatywnymi regulatorami własnych genów [79,80]. Pozytywnymi elementami pętli są czynniki transkrypcyjne CLC/BMAL aktywujące ekspresję genów *PER* i *CRY*. Proponowany obecnie model oscylatora nie jest zapewne ostateczny i w



miarę rozwoju badań będzie jeszcze wielokrotnie modyfikowany, tym nie mniej, już dzisiaj można założyć, że udział kryptochromów w funkcjonowaniu zegara biologicznego w organizmach kręgowców, obok innych fotoreceptorów oka (melanopsyna), zostanie ostatecznie potwierdzony w najbliższych badaniach. Czytelników zainteresowanych tą tematyką odsyłamy do prac przeglądowych o zasięgu ogólnościowym [14,41,79,80].

Model oscylatora komórkowego w *A. thaliana* zaproponowany przed trzema laty przez Alabadi i wsp. [3] obejmuje geny *LHY* i *CCA1* oraz gen *TOC1* (ryc. 7C). Białka *LHY* (*Late elongated HYpocotyl*) i *CCA1* (*Circadian Clock Associated 1*) są czynnikami transkrypcyjnymi z rodziny MYB wiązanyymi przez sekwencje promotorowe EE (*Evening Element*) genów aktywowanych późnym popołudniem [13]. Jednym z takich genów jest *TOC1* (*Timing Of CAB1*) należący do rodziny genów *APRR* (*Arabidopsis Pseudo Response Regulator*) [45]. Białko *TOC1/APRR1* w części N-końcowej jest podobne do domeny regulatorowej (odbiornika) w regulatorach odpowiedzi, a w części C-końcowej ma charakterystyczny motyw C występujący m.in. w czynniku transkrypcyjnym *CONSTANS* [59]. Proponowany model oscylatora zakłada, że białka *LHY* i *CCA1* są negatywnymi elementami pętli hamującymi transkrypcję własnych genów poprzez hamowanie ekspresji genu *TOC1/APRR1*. Pozytywnym elementem oscylatora jest białko *TOC1/APRR1*, które zgodnie z założeniami mechanizmu powinno aktywować geny *LHY* i *CCA1* [3,4]. Obniżenie poziomu białek *LHY* i *CCA1* prowadzi do aktywacji ekspresji genu *TOC1*, wzrostu poziomu białka *TOC1/APRR1*, aktywacji genów *LHY* i *CCA1* i rozpoczęcia kolejnego cyklu (ryc. 7C) [13,24,86].

Proponowany model oscylatora w *A. thaliana* jest nadal akceptowany, chociaż z coraz poważniejszymi zastrzeżeniami, gdyż wyniki najnowszych badań nie potwierdzają w pełni roli, jaką przypisano każdemu z elementów proponowanej pętli oscylacyjnej. Na przykład, udział *TOC1/APRR1* w aktywacji genów *LHY* i *CCA1* nie został do dzisiaj jednoznacznie potwierdzony. Źródłem wątpliwości są także wyniki badań, w których stwierdzono, że nadekspresja *TOC1* powoduje obniżenie, a nie jak by można było oczekiwać, wzrost poziomu transkryptów *CCA1* i *LHY* [65]. Pewne wątpliwości rodzą się również w związku z badaniami prowadzonymi na podwójnym mutancie *lhy/ccal*, u którego, mimo mutacji w obu genach, nadal są obserwowane rytmiczne zmiany o mocno skróconym cyklu [4]. Ponadto, dzisiaj już wiemy, że w etiolowanych roślinach w aktywacji genów *CCA1* i *LHY* uczestniczą fitochromy B i A, które migrują na świetle z cytoplazmy do jądra, gdzie następnie oddziałują z czynnikami transkrypcyjnymi *PIF3* [45]. Wiadomo również, że ekspresja genów *CCA1*, *LHY* jest regulowana przez kilka innych białek (*PIF4*, *PIL1*, *PIL6*, *ELF4*), spośród których *PIF3*, *PIF4* i *PIL6* oddziałują fizycznie z *TOC1/APRR1* [28,65,66,69,96]. Wątpliwości rodzące się w związku z wynikami najnowszych badań kierują uwagę badaczy na inne białka z rodziny pseudo-regulatorów odpowiedzi jako potencjalne elementy oscylatora. Okazało się bowiem, że światło poprzez układ fitochromowy aktywuje ekspresję genu *APRR9*, a ta pociąga postępującą falę aktywacji kolejnych czterech genów *APRR* w kolejności: *APRR9* → *APRR7* → *APRR5* → *APRR3* → *APRR1/TOC1* (ryc. 7C). Pojawiające się na końcu tej fali białko *APRR1/TOC1* hamuje ekspresję genu *APRR9* [48,65].

Niezależnie od tego, który z mechanizmów oscylatora okaże się ostatecznie prawdziwy, kluczowym elementem „wejścia” do obu proponowanych pętli wydaje się być receptor światła niebieskiego z rodziny Zeitlupe. Technika drożdżowego systemu dwuhybrydowego ustalono, że Ztl oddziałuje fizycznie z TOC1/APRR1 poprzez domenę LOV i reguluje jego poziom w sposób zależny od warunków świetlnych [68]. Można zatem założyć, że APRR1/TOC1 jest wiązane przez kompleks ligazy E3 typu SCF<sup>ZTL</sup> i po ubikwitynylacji zostaje zdegradowane w proteasomie (ryc.7C). Z fotoreceptorem Ztl oddziałują także kryptochromy i fitochromy [49], fotoreceptory, których rola w funkcjonowaniu zegara biologicznego jest intensywnie badana [14,24,28,29,69,86,99]. Alternatywnym „wejściem” do oscylatora utworzonego z pseudoregulatorów odpowiedzi może być układ złożony z białek CCA1, LHY i TOC1 oraz białek regulatorowych pośredniczących w przekazywaniu sygnału od fitochromów [28,45,69,99]. Nie można również wykluczyć możliwości bezpośrednich oddziaływań fitochromów z białkami APRR, a zwłaszcza z białkiem APRR9 [48,65].

W konkluzji dotychczasowych wyników badań nasuwa się ogólny wniosek dotyczący układu „wejścia” uczestniczącego w nastawianiu zegara biologicznego w komórkach *A. thaliana*. Otóż niezależnie od rzeczywistego mechanizmu oscylatora, który w roślinach pozostaje nadal zagadką, układ „wejścia” monitorującego zmiany oświetlenia na granicy noc/dzień i dzień/noc obejmuje zarówno układ fitochromowy absorbujący światło czerwone i daleką czerwień, jak również receptory flawoproteinowe odbierające informację niesioną przez światło niebieskie i UV-A. Wyniki wielu dotychczasowych badań wydają się także dowodzić, że receptory światła czerwonego funkcjonują w synchronizowaniu wewnętrznego oscylatora z subiektywnymi zmianami oświetlenia na poziomie ekspresji genów tworzących pętlę oscylacyjną, podczas gdy receptory światła niebieskiego pośredniczą w regulowanej przez światło degradacji białkowych elementów oscylatora.

## LITERATURA

- [1] AHMAD M, JARILLO JA, CASHMORE AR. Chimeric proteins between cry1 and cry2 *Arabidopsis* blue light photoreceptors indicate overlapping functions and varying protein stability. *Plant Cell* 1998; **10**: 197–207.
- [2] 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.
- [3] ALABADI D, OYAMA T, YANOVSKY MJ, HARMON FG, MÁ S P, KAY SA. Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* 2001; **293**: 880–883.
- [4] ALABADI D, YANOVSKY MJ, MÁ S P, HARMER SL, KAY SA. Critical role for CCA1 and LHY in maintaining circadian rhythmicity in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 2002; **12**: 757–761.
- [5] BABOURINA O, NEWMAN I, SHABALA S. Blue light-induced kinetics of H<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> fluxes in etiolated wild-type and phototropin-mutant *Arabidopsis* seedlings. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 2433–2438.
- [6] BABOURINA OK, NEWMAN IA, SHABALA SN. Electrophysiological localization of blue light sensory sites in etiolated dicotyledon seedlings. *Plant Cell Environ* 2003; **26**: 1505–1514.
- [7] BLAKESLEE JJ, BANDYOPADHYAY A, PEER WA, MAKAM SN, MURPHY AS. Relocalization of the PIN1 auxin efflux facilitator plays a role in phototropic responses. *Plant Physiol* 2004; **134**: 28–31.



- [8] BOULY J-P, GIOVANI B, DJAMEI A, MUELLER M, ZEUGNER A, DUDKIN EA, BATSCHAUER A, AHMAD M. Novel ATP-binding and autophosphorylation activity associated with *Arabidopsis* and human cryptochrome-1. *Eur J Biochem* 2003; **270**: 2921–2928.
- [9] BRIGGS WR, BECK CF, CASHMORE AR, CHRISTIE JM, HUGHES J, JARILLO JA, KAGAWA T, KANEGAE H, LISCUM E, NAGATANI A, OKADA K, SALOMON M, RÜDIGER W, SAKAI T, TAKANOM, WADA M, WATSON JC. The phototropin family of photoreceptors. *Plant Cell* 2000; **13**: 993–997.
- [10] BRIGGS WR, CHRISTIE JM. Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci* 2002; **7**: 204–210.
- [11] BRIGGS WR, CHRISTIE JM, SALOMON M. Phototropins: A new family of flavin-binding blue light receptors in plants. *Antioxid Redox Signaling* 2001; **3**: 775–788.
- [12] BRUDLER R, HITOMI K, DAIYASU H, TOH H, KUCHO K-I, ISHIURA M, KANESHISA M, ROBERTS VA, GETZOFF ED. Identification of a new cryptochrome class: structure, function, and evolution. *Mol Cell* 2003; **11**: 59–67.
- [13] CARRÉ IA, KIM J-Y. MYB transcription factors in the *Arabidopsis* circadian clock. *J Exp Bot* 2002; **53**: 1551–1557.
- [14] CASHMORE AR. Cryptochromes: enabling plants and animals to determine circadian time. *Cell* 2003; **114**: 537–543.
- [15] CHENG P, YANG Y, WANG L, HE Q, LIU Y. WHITE COLLAR-1, a multifunctional *Neurospora* protein involved in the circadian feedback loops, light sensing, and transcription repression of *wc-2*. *J Biol Chem* 2003; **278**: 3801–3808.
- [16] CHRISTIE JM, BRIGGS WR. Blue light sensing in higher plants. *J Biol Chem* 2001; **276**: 11457–11460.
- [17] CHRISTIE JM, REYMOND P, POWELL GK, BERNASCONI P, RAIBEKAS AA, LISCUM E, BRIGGS WR. *Arabidopsis* NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* 1998; **282**: 1698–1701.
- [18] CHRISTIE JM, SALOMON M, NOZUE K, WADA M, BRIGGS WR. LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (*nph1*): Binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 8779–8783.
- [19] CHRISTIE JM, SWARTZ TE, BOGOMOLNI RA, BRIGGS WR. Phototropin LOV domains exhibit distinct roles in regulating photoreceptor function. *Plant J* 2002; **32**: 205–219.
- [20] CROSSON S, MOFFAT K. Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: insights into light-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 2995–3000.
- [21] CROSSON S, MOFFAT K. Photoexcited structure of a plant photoreceptor domain reveals a light-driven molecular switch. *Plant Cell* 2002; **14**: 1067–1075.
- [22] CROSSON S, RAJAGOPAL S, MOFFAT K. The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry* 2003; **42**: 2–10.
- [23] DEBLASIO SL, MULLEN JL, LUESSE DR, HANGARTER RP. Phytochrome modulation of blue light-induced chloroplast movements in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2003; **133**: 1471–1479.
- [24] DEVLIN PF. Signs of the time: environmental input to the circadian clock. *J Exp Bot* 2002; **53**: 1535–1550.
- [25] DOI M, SHIGENAGA A, EMI T, KINOSHITA T, SHIMAZAKI K-I. A transgene encoding a blue-light receptor, *phot1*, restores blue-light responses in the *Arabidopsis phot1 phot2* double mutant. *J Exp Bot* 2004; **55**: 517–523.
- [26] DUNLAP JC. Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 1999; **96**: 271–290.
- [27] EISINGER W, SWARTZ TE, BOGOMOLNI RA, TAIZ L. The ultraviolet action spectrum for stomatal opening in broad bean. *Plant Physiol* 2000; **122**: 99–105.
- [28] ERIKSSON ME, MILLAR AJ. The circadian clock. A plant's best friend in a spinning world. *Plant Physiol* 2003; **132**: 732–738.
- [29] FANKHAUSER C, STAIGER D. Photoreceptors in *Arabidopsis thaliana*: light perception, signal transduction and entrainment of the endogenous clock. *Planta* 2002; **216**: 1–16.
- [30] FOLTA KM, KAUFMAN LS. Phototropin 1 is required for high-fluence blue-light-mediated mRNA destabilization. *Plant Mol Biol* 2003; **51**: 609–618.
- [31] FOLTA KM, LIEG EJ, DURHAM T, SPALDING EP. Primary inhibition of hypocotyl growth and phototropism depend differently on phototropin-mediated increases in cytoplasmic calcium induced by blue light. *Plant Physiol* 2003; **133**: 1464–1470.
- [32] FOLTA KM, SPALDING EP. Opposing roles of phytochrome A and phytochrome B in early cryptochrome-mediated growth inhibition. *Plant J* 2001; **28**: 333–340.

- [33] FOLTA KM, SPALDING EP. Unexpected roles for cryptochrome 2 and phototropin revealed by high-resolution analysis of blue light-mediated hypocotyl growth inhibition. *Plant J* 2001; **26**: 471–478.
- [34] FRIML J, WIŚNIEWSKA J, BENKOWÁ E, MENDGEN K, PALME K. Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 2002; **415**: 806–809.
- [35] FROELICH AC, LIU Y, LOROS JJ, DUNLAP JC. White Collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the *frequency* promoter. *Science* 2002; **297**: 815–819.
- [36] FUCHS I, PHILIPPAR K, LJUNG K, SANDBERG G, HEDRICH R. Blue light regulates an auxin-induced  $K^+$ -channel gene in the maize coleoptile. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 11795–11800.
- [37] GUO H, DUONG H, MA N, LIN C. The *Arabidopsis* blue light receptor cryptochrome 2 is a nuclear protein regulated by a blue light-dependent post-transcriptional mechanism. *Plant J* 1999; **19**: 279–287.
- [38] GUO H, MOCKLER T, DUONG H, LIN C. SUB1, an *Arabidopsis*  $Ca^{2+}$ -binding protein involved in cryptochrome and phytochrome coaction. *Science* 2001; **291**: 487–490.
- [39] GYULA P, SCHÄFER E, NAGY F. Light perception and signalling in higher plants. *Curr Opin Plant Biol* 2003; **6**: 446–452.
- [40] HARADA A, SAKAI T, OKADA K. Phot1 and phot2 mediate blue light-induced transient increases in cytosolic  $Ca^{2+}$  differently in *Arabidopsis* leaves. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 8583–8588.
- [41] HARMER SL, PANDA S, KAY SA. Molecular bases of circadian rhythms. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; **17**: 215–253.
- [42] HARPER SM, NEIL LC, GARDNER KH. Structural basis of a phototropin light switch. *Science* 2003; **301**: 1541–1544.
- [43] HARPER RM, STOWE-EVANS EL, LUESSE DR, MUTO H, TATEMATSU K, WATAHIKI MK, YAMAMOTO K, LISCUM E. The *NPH4* locus encodes the auxin response factor ARF7, a conditional regulator of differential growth in aerial *Arabidopsis* tissue. *Plant Cell* 2000; **12**: 757–770.
- [44] HE Q, CHENG P, YANG Y, WANG L, GARDNER KH, LIU Y. White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science* 2002; **297**: 840–843.
- [45] HETMANN A, KOWALCZYK S. Szlaki sygnałowe aktywowane przez fitochromy, roślinne receptory światła czerwonego i dalekiej czerwieni. *Post Biol Kom* 2004; **31**: 155–176.
- [46] HUALA E, OELLER PW, LISCUM E, HANI-S, LARSEN E, BRIGGS WR. *Arabidopsis* NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* 1997; **278**: 2120–2123.
- [47] IMAIZUMI T, TRAN HG, SWARTZ TE, BRIGGS WR, KAY S.A. FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 2003; **426**: 302–306.
- [48] ITO S, MATSUSHIKA A, YAMADA H, SATO S, KATO T, TABATA S, YAMASHINO T, MIZUNO T. Characterization of the APRR9 pseudo-response regulator belonging to the APRR1/TOC1 quintet in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 2003; **44**: 1237–1245.
- [49] JARILLO JA, CAPEL J, TANG RH, YANG HQ, ALONSO JM, ECKER JR, CASHMORE AR. An *Arabidopsis* circadian clock component interacts with both CRY1 and phyB. *Nature* 2001; **410**: 487–490.
- [50] JARILLO JA, GABRYS H, CAPEL J, ALONSO JM, ECKER JR, CASHMORE AR. Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light. *Nature* 2001; **410**: 952–954.
- [51] JIAO Y, YANG H, MA L, SUN N, YU H, LIU T, GAO Y, GU H, CHEN Z, WADA M, GERSTEIN M, ZHAO H, QU L-J, DENG XW. A genome-wide analysis of blue-light regulation of *Arabidopsis* transcription factor gene expression during seedling development. *Plant Physiol* 2003; **133**: 1480–1493.
- [52] KAGAWA T, SAKAI T, SUETSUGU N, OIKAWA K, ISHIGURO S, KATO T, TABATA S, OKADA K, WADA M. *Arabidopsis* NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. *Science* 2001; **291**: 2138–2141.
- [53] KINOSHITA T, DOI M, SUETSUGU N, KAGAWA T, WADA M, SHIMAZAKI K-I. Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* 2001; **414**: 656–660.
- [54] KINOSHITA T, EMI T, TOMINAGA M, SAKAMOTO K, SHIGENAGA A, DOI M, SHIMAZAKI K-I. Blue-light- and phosphorylation-dependent binding of a 14-3-3 protein to phototropins in stomatal guard cells of broad bean. *Plant Physiol* 2003; **133**: 1453–1463.
- [55] KINOSHITA T, SHIMAZAKI K-I. Blue light activates the plasma membrane  $H^+$ -ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells. *EMBO J* 1999; **18**: 5548–5558.
- [56] KIYOSUE T, WADA M. LKPI (LOV Kelch protein 1): A factor involved in the regulation of flowering time in *Arabidopsis*. *Plant J* 2000; **23**: 807–815.
- [57] KLEINE T, LOCKHART P, BATSCHAUER A. An *Arabidopsis* protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles. *Plant J* 2003; **35**: 93–103.



- [58] KLEINER O, KIRCHER S, HARTER K, BATSCHAUER A. Nuclear localization of the *Arabidopsis* blue light receptor cryptochrome 2. *Plant J* 1999; **19**: 289–296.
- [59] KOWALCZYK S, HETMANN A. Roślinne receptorowe kinazy histydynowe i wielostopniowy przepływ fosforanu do regulatorów odpowiedzi. *Post Biochem* 2003; **49**: 298–318.
- [60] LIN C. Blue light receptors and signal transduction. *Plant Cell* 2002; **Suppl**: S207–S225.
- [61] LIN C, SHALITIN D. Cryptochrome structure and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 2003; **54**: 469–496.
- [62] LISCUM E, BRIGGS WR. Mutations of *Arabidopsis* in potential transduction and response components of the phototropic signaling pathway. *Plant Physiol* 1996; **112**: 291–296.
- [63] LISCUM E, HODGSON DW, CAMPBELL TJ. Blue light signaling through the cryptochromes and phototropins. So that's what the blues is all about. *Plant Physiol* 2003; **133**: 1429–1436.
- [64] MA L, LI J, QU L, HAGER J, CHEN Z, ZHAO H, DENG XW. Light control of *Arabidopsis* development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *Plant Cell* 2001; **13**: 2589–2607.
- [65] MAKINO S, MATSUSHIKA A, KOJIMA M, YAMASHINO T, MIZUNO T. The APRRI/TOC1 quintet implicated in circadian rhythms of *Arabidopsis thaliana*: I. Characterization with APRRI-overexpressing plants. *Plant Cell Physiol* 2002; **43**: 58–69.
- [66] MÁŠ P, ALABADI D, YANOVSKY MJ, OYAMA T, KAY S.A. Dual role of TOC1 in the control of circadian and photomorphogenic responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2003; **15**: 223–236.
- [67] MÁŠ P, DEVLIN PF, PANDA S, KAY SA. Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. *Nature* 2000; **408**: 207–211.
- [68] MÁŠ P, KIM W-Y, SOMERS DE, KAY SA. Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 2003; **426**: 567–570.
- [69] MILLAR AJ. Input signals to the plant circadian clock. *J Exp Bot* 2004; **55**: 277–283.
- [70] MŘLLER SG, KIM Y-S, KUNKEL T, CHUA N-H. PP7 is a positive regulator of blue light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2003; **15**: 1111–1119.
- [71] MOTCHOULSKI A, LISCUM E. *Arabidopsis* NPH3: a NPH1 photoreceptor-interacting protein essential for phototropism. *Science* 1999; **286**: 961–964.
- [72] NELSON DC, LASSWELL J, ROGG LE, COHEN MA, BARTEL B. *FKF1*, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Cell* 2000; **101**: 331–340.
- [73] SAKAI T, KAGAWA T, KASAHARA M, SWARTZ TE, CHRISTIE JM, BRIGGS WR, WADA M, OKADA K. *Arabidopsis* nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 6969–6974.
- [74] SAKAI T, WADA T, ISHIGURO S, OKADA K. RPT2: A signal transducer of the phototropic response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2000; **12**: 225–236.
- [75] SAKAMOTO K, BRIGGS WR. Cellular and subcellular localization of phototropin 1. *Plant Cell* 2002; **14**: 1723–1735.
- [76] SALOMON M, CHRISTIE JM, KNIEBE E, LEMPERT U, BRIGGS WR. Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin. *Biochemistry* 2000; **39**: 9401–9410.
- [77] SALOMON M, EISENREICH W, DÜRR H, SCHLEICHER E, KNIEBE E, MASSEY V, RÜDIGER W, MÜLLER F, BACHER A, RICHTER G. An optomechanical transducer in the blue light receptor phototropin from *Avena sativa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 12357–12361.
- [78] SALOMON M, KNIEBE E, VON ZEPPELIN T, RÜDIGER W. Mapping of low- and high-fluence autophosphorylation sites in phototropin 1. *Biochemistry* 2003; **42**: 4217–4225.
- [79] SANCAR A. Cryptochrome: the second photoactive pigment in the eye and its role in circadian photoreception. *Annu Rev Biochem* 2000; **69**: 31–67.
- [80] SANCAR A. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem Rev* 2003; **103**: 2203–2237.
- [81] SCHULTZ TF, KIYOSUE T, YANOVSKY M, WADA M, KAY SA. A role for LKP2 in the circadian clock of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2001; **13**: 2659–2670.
- [82] SCULLY AL, KAY SA. Time flies for *Drosophila*. *Cell* 2000; **100**: 297–300.
- [83] SHALITIN D, YANG H, MOCKLER TC, MAYMON M, GUO H, WHITELAM GC, LIN C. Regulation of *Arabidopsis* cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation. *Nature* 2002; **417**: 763–767.
- [84] SHALITIN D, YU X, MAYMON M, MOCKLER T, LIN C. Blue light-dependent *in vivo* and *in vitro* phosphorylation of *Arabidopsis* cryptochrome 1. *Plant Cell* 2003; **15**: 2421–2429.

- [85] SOMERS DE, SCHULTZ TF, MILNAMOV M, KAY S.A. *ZEITLUPE* encodes a novel clock-associated PAS protein from *Arabidopsis*. *Cell* 2000; **101**: 319–329.
- [86] STAIGER D. Circadian rhythms in *Arabidopsis*: time for nuclear proteins. *Planta* 2002; **214**: 334–344.
- [87] STOELZLE S, KAGAWA T, WADA M, HEDRICH R, DIETRICH P. Blue light activates calcium-permeable channels in *Arabidopsis* mesophyll cells via the phototropin signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 1456–1461.
- [88] STOWE-EVANS EL, LUESSE DR, LISCUM E. The enhancement of phototropin-induced phototropic curvature in *Arabidopsis* occurs via a photoreversible phytochrome A-dependent modulation of auxin responsiveness. *Plant Physiol* 2001; **126**: 826–834.
- [89] SWARTZ TE, CORCHNOY SB, CHRISTIE JM, LEWIS JW., SZUNDI I, BRIGGS WR, BOGOMOLNI RA. The photocycle of a flavin-binding domain of the blue light photoreceptor phototropin. *J Biol Chem* 2001; **276**: 36493–36500.
- [90] TALBOTT LD, SHMAYEVICH IJ, CHUNG Y, HAMMAD JW, ZEIGER E. Blue light and phytochrome-mediated stomatal opening in the *npq1* and *phot1 phot2* mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2003; **133**: 1522–1529.
- [91] TATEMATSU K, KUMAGAI S, MUTO H, SATO A, WATAHIKI MK, HARPER RM, LISCUM E, YAMAMOTO KT. *MASSUGU2* encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 2004; **16**: 379–393.
- [92] TRETYN A, WIŚNIEWSKA J. Budowa, właściwości i mechanizm działania kryptochromów – eukariotycznych fotoreceptorów światła niebieskiego. *Post Biol Kom* 1999; **26**: 343–358.
- [93] WADA M, KAGAWA T, SATO Y. Chloroplast movement. *Annu Rev Plant Biol* 2003; **54**: 455–468.
- [94] WANG H, MA L-G, LI J-M, ZHAO H-Y, DENG XW. Direct interaction of *Arabidopsis* cryptochromes with COP1 in light control development. *Science* 2001; **294**: 154–158.
- [95] WHIPPO CW, HANGARTER RP. Second positive phototropism results from coordinated co-action of the phototropins and cryptochromes. *Plant Physiol* 2003; **132**: 1499–1507.
- [96] YAMASHINO T, MATSUSHIKA A, FUJIMORI T, SATO S, KATO T, TABATA S, MIZUNO T. A link between circadian-controlled bHLH factors and the APRR1/TOC1 quintet in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 2003; **44**: 619–629.
- [97] 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.
- [98] YANG H-Q, WU Y-J, TANG R-H, LIU D, LIU Y, CASHMORE AR. The C termini of *Arabidopsis* cryptochromes mediate a constitutive light response. *Cell* 2000; **103**: 815–827.
- [99] YANOVSKY MJ, KAY SA. Living by the calendar: how plants know when to flower. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; **4**: 265–275.
- [100] ZIELIŃSKA E, KOWALCZYK S. Percepcja i transdukcja sygnału auksynowego. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 155–183.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 06.02.2004 r.

Przyjęto: 27.04.2004 r.

ul. Gagarina 9/7, 87-100 Toruń

aniastef@chem.uni.torun.pl





# ENDOTELIALNA SYNTAZA TLENKU AZOTU CZ. I. STRUKTURA GENU I PRODUKTU BIAŁKOWEGO

## ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE. PART. I. GENE STRUCTURE AND PROTEIN PRODUCT

Monika SEIDEL, Maciej KURPISZ

Instytut Genetyki Człowieka PAN, Poznań

*Streszczenie:* Endotelialna syntaza tlenku azotu (eNOS) jest jednym z trzech enzymów zdolnych do produkcji tlenku azotu (NO). Cząsteczka ta pełni kluczowe funkcje w układzie sercowo-naczyniowym. Gen *eNOS* składa się z 26 egzonów i zajmuje fragment chromosomu 7 o wielkości 22 kpb. Promotor genu nie zawiera podstawowej sekwencji rozpoznawanej przez kompleks preinicjacyjny polimerazy RNA II, tzw. *TATA box*. Analiza regionu 5' ujawniła obecność licznych potencjalnych miejsc wiązania szeregu dodatkowych czynników transkrypcyjnych, co sugeruje możliwość złożonej i dynamicznej regulacji ekspresji. Gen endotelialnej syntazy tlenku azotu charakteryzuje znaczny polimorfizm zarówno w rejonie promotora, jak i w intronach oraz w obrębie sekwencji kodujących. W celu wykazania statystycznie istotnej zależności pomiędzy konkretnymi wariantami allelicznymi a poszczególnymi zaburzeniami układu krążenia przeprowadzono liczne analizy populacyjne. Aktywną formą enzymu jest homodimer. W obrębie poszczególnych monomerów wyróżnia się następujące domeny: C-kończącą domenę reduktazy wykazującą znaczną homologię sekwencji aminokwasów z reduktazą cytochromu P-450, małą domenę odpowiedzialną za wiązanie kalmoduliny, domenę oksygenazy oraz N-końcowy fragment będący miejscem mirystylacji i palmitylacji. Enzym zawiera stosunkowo silnie związane kofaktory: FAD, FMN, tetrahydrobiopterynę ( $BH_4$ ) oraz ugrupowanie hemowe. FAD i FMN umożliwiają przepływ elektronów między NADPH a hemem, natomiast rola  $BH_4$  nie została ostatecznie sprecyzowana. Aktywność eNOS jest bezwzględnie zależna od obecności kompleksu  $Ca^{2+}$ /kalmodulina, który wiążąc się z enzymem znosi inhibicyjne działanie insertu zlokalizowanego w obszarze wiążącym FMN. Postuluje się, że bezpośrednim produktem dwuetapowej reakcji utleniania argininy jest tlenek azotu oraz cytrulina. Źródłem elektronów jest NADPH. Szczegółowy mechanizm reakcji jest nieznany. Pomimo zaawansowanych badań, niektóre z istotnych strukturalnych i funkcjonalnych cech eNOS wciąż pozostają zagadką.

*Słowa kluczowe:* tlenek azotu, endotelialna syntaza tlenku azotu, kalmodulina, jony wapnia.

*Summary:* Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) is one out of the three known enzymes capable of producing nitric oxide, a labile molecule that plays important biological role in cardiovascular system. The eNOS gene is composed of 26 exons and spans 22 kb fragment on chromosome 7. Characterization of the 5'-flanking genomic region revealed that eNOS promoter is lacking of TATA box and contains a great number of consensus sequences for the variety of transcription factors indicating the possibility of



dynamic and complex regulation of expression. The eNOS exhibits considerable polymorphism within introns, exons and promoter region. In some studies it was tried to link these allelic variation with the risk of coronary artery disease (CAD) and hypertension. Active endothelial nitric oxide synthase is composed of two identical subunits, each consisting the following distinct domains: C-terminal reductase domain exhibiting considerable aminoacid sequence homology with cytochrome P450 reductase, small calmoduline (CaM) binding domain, oxygenase domain and N-terminal fragment where acylation (mirystylation, palmitylation) takes place. The enzyme contains relatively tightly bound cofactors tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), FAD, FMN and haem. FAD and FMN transfer electrons from NADPH to the haem. The precise role of BH<sub>4</sub> remains unclear. Endothelial NOS activity strictly depends on the presence of Ca<sup>2+</sup>/calmoduline complex which upon binding to the enzyme relieves it from the negative influence of an inhibitory insert localized in the FMN binding domain. Nitric oxide is produced in the two-step reaction with arginine and O<sub>2</sub> serving as substrates, and NADPH as a source of electrons. The products of eNOS catalytic activity are claimed to be nitric oxide and citruline. Reaction mechanism is not fully understood and requires further investigation. Many important questions concerning the enzyme structure, function and inhibition still remain non-answered.

*Key words:* nitric oxide, endothelial nitric oxide synthase, calmoduline, calcium ions.

## WSTĘP

W 1980 roku Robert Furchgott udowodnił, że działanie acetylocholino na mięśnie gładkie naczyń krwionośnych wymaga obecności komórek śródbłonna [6]. Wyniki doświadczeń wskazywały na rolę małej cząsteczki wydzielanej z nich pod wpływem impulsacji o charakterze przywspółczulnym. Próby wyizolowania molekuly nie powiodły się. Nie znając natury chemicznej, nadano cząsteczce nazwę **EDRF** (ang. *endothelium-derived relaxing factor*). W 1986 roku, doświadczenie przeprowadzone przez Salvadora Moncadę i współpracowników dostarczyło jednoznacznego dowodu na to, że śródbłonkowym czynnikiem relaksującym (EDRF) jest tlenek azotu (NO) [15]. Powyższe odkrycie zrewolucjonizowało dotychczasowe poglądy na mechanizmy przekazywania informacji między komórkami i jednocześnie zapoczątkowało lawinowy rozwój badań zmierzających do identyfikacji oraz izolacji enzymów odpowiedzialnych za syntezę tego związku.

W latach 1991–1994 wyizolowano i sklonowano trzy geny odpowiedzialne za syntezę NO: nNOS (neuronalna syntaza tlenu azotu, inaczej NOS-I), iNOS (indukowana syntaza tlenu azotu, inaczej NOS-II) oraz eNOS (endotelialna syntaza tlenu azotu, inaczej NOS-III). Enzymy (EC 1.14.13.39; NOS) są produktami oddzielnych genów. W związku z tym, że geny te wykazują stosunkowo duże podobieństwo strukturalne, zakłada się, że mają one to samo pochodzenie. Wszystkie trzy izoformy (produkty genowe) przeprowadzają identyczną, dwuetapową reakcję utleniania argininy, w wyniku której powstaje NO oraz cytrulina. Mechanizm reakcji również wydaje się być wspólny dla trzech enzymów. Istotne różnice dotyczą natomiast lokalizacji tkankowej i komórkowej, regulacji oraz funkcji. Zależność aktywności katalitycznej od jonów wapnia jest podstawową cechą różniącą enzymy konstytutywne (eNOS, nNOS) i indukowany (iNOS). Zarówno neuronalna, jak i endotelialna syntaza tlenu azotu ulegają aktywacji w momencie związania kompleksu Ca<sup>2+</sup>/kalmodulina (CaM), które to wiązanie

poprzedzone jest wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia. Indukowana syntaza tlenku azotu zawiera nieodwracalnie związaną CaM i w związku z tym jest prawie całkowicie niezależna od Ca<sup>2+</sup> (tylko nieznacznie mniejsza aktywność enzymu występuje w obecności chelatora jonów dwuwartościowych EGTA) [2].

Początkowo dokonany podział opierający się na typie ekspresji (konstytutywna – eNOS oraz nNOS bądź indukowana – iNOS) wyżej wymienionych enzymów, obecnie wielu autorów uznaje za nieaktualny. W ciągu ostatnich kilku lat zgromadzono bowiem ogromną ilość dowodów na to, że zarówno eNOS, jak i nNOS podlegają dynamicznej regulacji ekspresji.

## CHARAKTERYSTYKA GENU *eNOS*

Gen *eNOS* zlokalizowany jest na chromosomie 7 (7q35–7q36), w którym zajmuje obszar 22 kbp [1, 5]. Pierwotny transkrypt składa się z 26 egzonów i koduje białko o szacunkowej masie 133 kDa (1203 aminokwasy) [1, 5]. Dwa miejsca startu transkrypcji określone zostały metodą *primer extension* [14]. Promotor genu eNOS nie zawiera podstawowej sekwencji rozpoznawanej przez kompleks preinicjacyjny polimerazy RNA II, tzw. „kasety TATA” [5]. Zidentyfikowano w nim jednak inne sekwencje promotorowe, charakterystyczne dla genów podlegających konstytutywnej ekspresji w komórkach śródbłonna, tj. motyw GATA (element rozpoznawany przez czynnik transkrypcyjny zidentyfikowany w komórkach erytroidalnych, wcześniej znany jako GF/NF-E) oraz sekwencje wiązania czynnika transkrypcyjnego Sp1 [5]. Tkankowo-specyficzną ekspresję genu warunkuje obecność licznych potencjalnych miejsc wiązania szeregu dodatkowych czynników transkrypcyjnych, wśród których należy wymienić: AP-1, AP-2, NF-1, NF-κB oraz PEA-3 [14]. W obrębie promotora zlokalizowano również sekwencje odpowiedzi na bodźce wywołane przez metale ciężkie, „siły ścinające” (siły wytwarzane przez strumień płynącej krwi, konsekwencją ich działania są naprężenia komórek śródbłonna), estrogeny (ERE; ang. *estrogen responsive element*), cAMP oraz INF-γ [5, 14]. To strukturalne zróżnicowanie sekwencji promotorowych wyraźnie wskazuje na możliwość regulacji podstawowej ekspresji genu. Do tej pory nie udało się zidentyfikować wariantów enzymu, które mogłyby być efektem alternatywnego składowania [1].

Gen endotelialnej syntazy tlenku azotu wykazuje znaczny polimorfizm. Alleliczne warianty *eNOS* można podzielić na trzy klasy w zależności od lokalizacji zmiennych sekwencji w intronach, rejonie promotora oraz w sekwencjach kodujących [19]. Zakłada się, że tak znaczny i zróżnicowany polimorfizm może wpływać nie tylko na aktywność transkrypcyjną genu, właściwości późniejszego mRNA, ale również na trójwymiarową strukturę białka, a więc jednocześnie na aktywność katalityczną samego enzymu [16]. W celu wykazania statystycznie istotnej zależności między obserwowanymi wariantami allelicznymi a określonymi zaburzeniami układu krążenia przeprowadzono liczne analizy populacyjne [17].



## Warianty alleliczne zlokalizowane w intronach

Warianty alleliczne zlokalizowane w intronach należą do najliczniej reprezentowanych [19]. Dwie jednonukleotydomowe substytucje zostały zlokalizowane w intronie 18 i 23. Nie zaobserwowano jakiegokolwiek związku między tym polimorfizmem a nadciśnieniem tętniczym [19]. Udało się natomiast wykazać pewną zależność między zmienną liczbą tandemowych powtórzeń (VNTR; ang. *variable number of tandem repeats*) w intronie 4 i 13 a zwiększonym ryzykiem wystąpienia choroby wieńcowej (CAD; ang. *coronary artery disease*) [19]. Wciąż nie wiadomo, w jaki sposób VNTR w obrębie intronów wpływa na eNOS, ponieważ pomimo różnic w pre-mRNA powstające białka są identyczne [19]. Powszechnie obserwowana zależność zmian w szybkości transkrypcji i obróbki mRNA od wystąpienia mutacji w sekwencjach intronowych obserwowane w innych genach, mogłaby tłumaczyć wpływ tego rodzaju polimorfizmu na poziom ekspresji eNOS [19].

## Polimorfizm w obrębie promotora

Polimorfizm sekwencji w obrębie promotora wydaje się być szczególnie istotny ze względu na bezpośredni wpływ na transkrypcję, której szybkość reguluje poziom **ekspresji** enzymu. Wśród trzech wykrytych mutacji w rejonie promotorowym tylko jedna okazała się mieć związek ze zwiększonym ryzykiem CAD [19]. Efektem mutacji był znaczny spadek ekspresji eNOS. Spadek ten oszacowano na podstawie ekspresji genu reporterowego (lucyferaza).

## Polimorfizm w obrębie egzonów

Jedyny przypadek polimorfizmu w obrębie części kodującej zlokalizowano w egzonie 7 (substytucja guaniny tyminą) [16]. Zmiana w pierwszorzędowej strukturze białka (Glu<sup>298</sup> Asp) mogłaby wskazywać, że tego rodzaju warianty alleliczne enzymu mają zmienione właściwości [19]. Z drugiej strony, kwasowy charakter obu aminokwasów raczej wyklucza możliwość zaistnienia znaczących zmian w strukturze trzeciorzędowej białka, a więc również w aktywności enzymu. Ponadto lokalizacja aminokwasów wskazuje na brak jakiegokolwiek wpływu na miejsce katalityczne czy region wiązania kofaktorów [19]. Jedyna zmiana, jaką zaobserwowano w powyższym białku, dotyczyła zwiększonej podatności na rozkład proteolityczny [19]. Niemniej jednak ten rodzaj polimorfizmu stał się tematem największej liczby publikacji, z których niestety nie wynika jasno, czy istnieje jakikolwiek związek pomiędzy wyżej wspomnianą mutacją a skłonnością do chorób układu krążenia. Badając dwie różne populacje japońskie wykazano istotną pozytywną zależność między <sup>298</sup> Asp eNOS a nadciśnieniem [10]. Analiza osobników rasy kaukaskiej doprowadziła do przeciwnych wniosków. Wykazano bowiem znacznie wyższą częstość występowania nadciśnienia u nosicieli allelu <sup>298</sup> Glu [10].

Niemożność wykazania jednoznacznego związku pomiędzy polimorfizmem eNOS a CAD czy nadciśnieniem tłumaczy się faktem udziału wielu genów w powstawaniu zaburzeń funkcji układu krążenia oraz wpływem czynników zewnętrznych (np. palenie papierosów) [19].

## CHARAKTERYSTYKA BIAŁKA

Podstawowy plan budowy białka jest wspólny dla trzech enzymów. W każdym monomerze można wyróżnić cztery oddzielne domeny. Zaczynając od końca C są to:

- 1) domena reduktazy wykazująca znaczną homologię sekwencji aminokwasów z reduktazą cytochromu P-450,
- 2) mała domena odpowiedzialna za wiązanie kalmoduliny,
- 3) domena oksygenazy wykazująca niektóre cechy cytochromu P-450, choć pozbawiona strukturalnej z nim homologii,
- 4) domena N-końcowa – inna dla każdej z trzech izoform. W przypadku eNOS domena ta jest miejscem mirystylacji i palmitylacji enzymu. Powyższe modyfikacje warunkują prawidłową lokalizację białka w przestrzeni wewnątrzkomórkowej [8].

## GRUPY PROSTETYCZNE I KOFAKTORY

Aktywną formą syntazy tlenu azotu jest homodimer zawierający stosunkowo silnie związane następujące kofaktory: FAD (dinukleotyd flawinoadeninowy), FMN (mononukleotyd flawinoadeninowy),  $BH_4$  (tetrahydrobiopteryna) oraz CaM (kalmodulina). Kluczową rolę w katalizie odgrywa hemowa grupa prostetyczna.

### Nukleotydy flawinowe

Miejsce wiązania nukleotydów flawinowych znajduje się w domenie reduktazy. Rola tych kofaktorów w transporcie elektronów wydaje się oczywista i ogólnie akceptowana. Uważa się, że FAD jest bezpośrednim akceptorem elektronów pochodzących z NADPH (fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego), podczas gdy FMN uczestniczy w ich transporcie do hemu znajdującego się w domenie oksygenazy [1]. Przepływ elektronów między flawinami [1] oraz między domenami reduktazy i oksygenazy [7] jest zależny od obecności kalmoduliny. Zdolność domeny zawierającej FAD i FMN do przenoszenia elektronów można wykazać poprzez wykorzystanie alternatywnych akceptorów elektronów, takich jak cytochrom c. Wszystkie trzy izoformy zdolne są do redukcji cytochromu c, ale aktywność nNOS i eNOS przy nieobecności kalmoduliny i jonów wapnia jest minimalna (iNOS zawiera nieodwracalnie związaną kalmodulinę). W momencie związania kalmoduliny aktywność obu konstytutywnych enzymów wzrasta, ale z różnym natężeniem. Podczas gdy aktywność nNOS jest porównywalna do iNOS, zdolność do redukcji cytochromu c przez eNOS jest dziesięciokrotnie mniejsza [12]. Należy zaznaczyć, że szybkość redukcji cytochromu c znacznie przewyższa szybkość syntezy NO przez poszczególne enzymy. Wydaje się więc, że zdolność reduktazy do przekazania elektronów hemowi jest głównym czynnikiem limitującym aktywność NOS [12].

Kwestią sporną pozostaje możliwość przepływu elektronów pomiędzy dwoma podjednostkami w obrębie dimeru. Postuluje się, że FMN przekazuje elektrony do hemu znajdującego się w domenie oksygenazy drugiego łańcucha polipeptydowego [1, 2]. W



celu weryfikacji tej hipotezy przeprowadzono doświadczenie, w którym wykorzystano heterodimer składający się z całej podjednostki NOS oraz z domeny oksygenazy z mutacją niepozwalającą na wiązanie substratu – L-argininy. Nie zaobserwowano produkcji NO. Aktywność katalityczna pojawiła się, gdy domena oksygenazy zawierająca mutację znajdowała się w tej samej podjednostce co domena reduktazy [2]. Przepływ elektronów pomiędzy dwoma podjednostkami wyjaśniałby, dlaczego aktywną formą enzymu jest dimer.

Jak wspomniano wcześniej, sekwencja domeny reduktazy wykazuje duże strukturalne podobieństwo do reduktazy cytochromu P450. Okazuje się, że z tej strukturalnej homologii wynika jeszcze jedna wspólna cecha. Reduktaza cytochromu P450 bierze udział w transporcie elektronów do białek hemowych związanych z błonami (rodzina cytochromów P450). Domena reduktazy w syntazie tlenu azotu przenosi elektrony do hemu znajdującego się w domenie oksygenazy.

### Hem

Domena oksygenazy związana z hemową grupą prostetyczną ma pewne wspólne cechy z cytochromem P450; zbliżony potencjał redoks, obecność cysteiny spełniającej rolę liganda dla hemu, podobny rodzaj reakcji (utlenianie substratu).

Organiczna część ugrupowania hemowego składa się z protoporfiryny zawierającej cztery pierścienie pirolowe połączone mostkami metinowymi w pierścień tetrapiolowy, do którego dołączone są łańcuchy boczne, tj. cztery grupy metylowe, dwie grupy winylowe oraz dwie reszty kwasu propionowego. Część nieorganiczną stanowi kation żelaza umieszczony w centrum pierścienia protoporfiryny. Cztery z sześciu możliwych pozycji koordynacyjnych żelaza zajmują atomy azotu, w pozycji piątej znajduje się atom siarki reszty cysteinowej [18]. Żelazo w hemowej grupie prostetycznej NOS występuje w postaci kationu na drugim bądź trzecim stopniu utlenienia.

Grupa hemowa leży w zagłębieniu domeny oksygenazy, w miejscu wiązania argininy i tlenu, co odpowiada miejscu zachodzenia reakcji [2]. Analiza krystalograficzna oraz doświadczenia z wykorzystaniem ukierunkowanej mutagenety [7] potwierdziły, że hem wiąże się przez siarkę reszty cysteinowej we wszystkich trzech izoformach. Ponieważ monomery konstytutywnych izoform nie zawierają hemu, sugeruje się, że tworzenie tego wiązania poprzedza powstanie aktywnych dimerów eNOS [2, 7]. Postulowaną strukturalną rolę hemu jest stabilizacja oddziaływań między powierzchnią domen oksygenazy i reduktazy dwóch różnych podjednostek w aktywnym enzymie [2]. Pomimo że monomery NOS przeprowadzają reakcję redukcji cytochromu c, nie wiążą ani  $BH_4$ , ani substratu, i w związku z powyższym nie katalizują reakcji charakterystycznej dla homodimeru [2].

Liczbę ligandów związanych z ugrupowaniem hemowym określa się przez analizę widma absorpcji. W enzymie nieaktywnym liczba koordynacyjna hemu przyjmuje wartość 6, co najprawdopodobniej związane jest z obecnością cząsteczki wody [7]. W momencie zwolnienia szóstej pozycji koordynacyjnej enzym staje się aktywny. Przejście z formy nieaktywnej do aktywnej indukowane jest przez wiązanie substratu,  $BH_4$  oraz niektórych analogów tych związków [2].

## Tetrahydrobiopteryna

Obecność tetrahydrobiopteryny w domenie oksygenazy eNOS wyraźnie odróżnia ją od cytochromu P450. Chociaż jednoznaczna rola  $BH_4$  pozostaje zagadką, wiadomo jednak, że kofaktor ten jest niezbędny dla katalitycznej aktywności enzymu.

$BH_4$  powstaje z dihydrobiopteryny w reakcji redukcji przeprowadzanej przez reduktazę dihydrofolianową. Klasyczna rola tetrahydrobiopteryny polega na przenoszeniu elektronów w reakcjach katalizowanych przez hydroksylazy aminokwasów aromatycznych.

Wykazano, że strukturalna funkcja tetrahydrobiopteryny w syntazie tlenku azotu polega na stabilizacji wcześniej powstałych dimerów eNOS [2].  $BH_4$  jest również pozytywnym allosterycznym regulatorem wiązania substratu [1], hamuje powstawanie ubocznych produktów reakcji (ponadtlenek) [1], ułatwia transport elektronów pomiędzy flawinami i hemem [12], powoduje zmianę liczby koordynacyjnej atomu żelaza [12] oraz chroni enzym przed dezaktywacją [1]. Większość z wyżej wymienionych efektów obserwuje się również w momencie związania przez enzym dihydrobiopteryny ( $BH_2$ ). Na uwagę zasługuje jednak fakt, że  $BH_2$  nie nadaje NOS właściwości aktywnego enzymu, co przemawia za hipotezą bezpośredniego udziału  $BH_4$  w katalizie [12]. Lokalizacja powyższego kofaktora w strategicznym dla zajścia reakcji miejscu, tzn. na powierzchni dimeru w pobliżu nukleotydów flawinowych oraz hemu (oddziaływanie z resztą kwasu propionowego) [1], sugeruje udział  $BH_4$  w transporcie elektronów [2]. Szczegółowa analiza widma absorpcji tetrahydrobiopteryny w aktywnym enzymie (doświadczenia przeprowadzone w niskich temperaturach) wskazują, że  $BH_4$  służy jako źródło elektronu niezbędnego do aktywacji kompleksu jonu żelaza II z  $O_2$ . Powstały w ten sposób rodnik tetrahydrobiopterynowy jest redukowany przez elektron pochodzący z nukleotydu flawinowego [12].

Większość danych doświadczalnych wskazuje na obecność tylko jednej cząsteczki  $BH_4$  na homodimer aktywnej NOS. Stosunek ten określono na podstawie wzrostu aktywności katalitycznej w obecności egzogennych dawek kofaktora i inhibicji tej stymulacji, ale nie podstawowej aktywności w momencie dodania antagonistów  $BH_4$  [7]. Obecnie postuluje się, że dimery NOS zawierają dwa identyczne, ale negatywnie kooperatywne miejsca wiązania  $BH_4$  i w związku z tym aktywny enzym zawiera dwie cząsteczki kofaktora tylko w wypadku jego wysokiego stężenia, w otaczającym środowisku [7].

W związku z faktem, że obecność tetrahydrobiopteryny jest niezbędna dla katalitycznej aktywności NOS, dostępność  $BH_4$  stanowi jeden z wielu elementów kontroli syntezy NO. Poziom ekspresji kluczowego enzymu szlaku syntezy  $BH_4$  (GTP cyklohydrolaza I) jest regulowany przez liczne cytokiny, wśród których IFN- $\gamma$ , LPS i IL-4 podwyższają ekspresję enzymu [3].

## Kalmodulina

Syntaza tlenku azotu jest jedynym znanym obecnie enzymem, w którym kalmodulina (CaM) spełnia funkcje czynnika regulującego przepływ elektronów. Aktywność wszystkich trzech izoform jest bezwzględnie zależna od jej obecności.

Kalmodulina (masa cząsteczkowa 17 kDa) należy do rodziny wewnątrzkomórkowych białek wiążących wapń i zawiera charakterystyczny dla tej rodziny motyw



dłoni EF (helisa-pętla-helisa), w którym znajduje się miejsce wiązania  $\text{Ca}^{2+}$ . Częsteczka kalmoduliny zbudowana jest z dwóch globularnych płatów (koniec C i koniec N) połączonych długą helisą alfa. W każdym płacie znajdują się dwa motywy dłoni EF, wiążące wapń poprzez siedem wiązań koordynacyjnych, w których uczestniczy sześć atomów tlenu **cząsteczki** białka i jeden atom tlenu cząsteczki wody. Pomimo dużego strukturalnego podobieństwa globularne końce kalmoduliny wykazują dość istotne różnice w powinowactwie względem  $\text{Ca}^{2+}$  (koniec C wykazuje dziesięciokrotnie większe powinowactwo) [11]. Kalmodulina zostaje zaktywowana przez związanie trzech lub czterech jonów wapnia w momencie, gdy stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  w cytoplazmie przekroczy wartość 500 nM. Aktywacji białka towarzyszą istotne zmiany konformacyjne prowadzące do ekspozycji reszt kwasowych i hydrofobowych odpowiedzialnych za oddziaływania z białkami docelowymi.

Jak już wcześniej wspomniano, zdolność eNOS do przeprowadzenia reakcji syntezy NO jest następstwem wiązania kompleksu  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  z enzymem. Ponieważ miejsce wiązania kalmoduliny we wszystkich trzech enzymach zbudowane jest zasadniczo w ten sam sposób [11], założono, że zależność bądź niezależność aktywności poszczególnych izoform od jonów wapnia, związana jest z subtelnymi różnicami w obrębie fragmentu wiążącego CaM (20–25 aminokwasów). W obliczu przyjętej hipotezy, dużym zaskoczeniem stały się wyniki badań, w których analizowano aktywność chimerowych enzymów. Okazało się bowiem, że zarówno eNOS, jak i nNOS, w których miejsca wiązania kalmoduliny zastąpiono sekwencją pochodzącą z iNOS, wykazują pełną aktywność tylko w obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$  [11]. Jasne stało się więc, że różnice między enzymami nie są tylko kwestią odmiennej budowy miejsca wiążącego CaM. Wnikliwa analiza sekwencji aminokwasowych wykazała obecność dodatkowego fragmentu (40–50 aminokwasów) w domenie wiążącej FMN w obu konstytutywnych enzymach. Zaobserwowane różnice w aktywności mutantów eNOS i nNOS pozbawionych tej dodatkowej sekwencji, sugerują, że fragment ten odpowiedzialny jest za destabilizację wiązania CaM przy niskich stężeniach wapnia [1]. Ze względu na dziesięciokrotną różnicę w powinowactwie względem jonów wapnia dwóch globularnych domen w cząsteczce kalmoduliny, postuluje się możliwość występowania kompleksów tego białka z jonami  $\text{Ca}^{2+}$  już przy ich podstawowym (spoczynkowym) poziomie w komórce. Sugeruje się, że taka postać kalmoduliny byłaby nieaktywna (zawierałaby nie więcej niż dwa jony wapnia związane z fragmentem białka o wyższym powinowactwie), ale mimo to mogłaby wiązać się z eNOS. Taki kompleks  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{eNOS}$  byłby jednak niezdolny do syntezy NO ze względu na obecność w enzymie destabilizującego fragmentu, uniemożliwiającego pełne oddziaływanie z kalmoduliną. Zgodnie z powyższą hipotezą, wzrost stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  powodowałby wysycenie CaM jonami wapnia, a w konsekwencji zmianę konformacji nadającą zdolność do efektywnego oddziaływania z enzymem pomimo obecności fragmentu destabilizującego. Ostatecznym wynikiem byłaby zmiana konformacyjna w samym enzymie prowadząca do jego aktywacji [11].

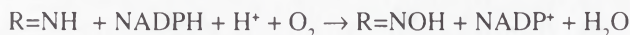
## Cynk

Obecność cynku udało się wykazać tylko dla iNOS. Motyw odpowiedzialny za wiązanie tego metalu (Cys-X<sub>4</sub>-Cys) jest silnie konserwatywny i występuje również w pozostałych dwóch enzymach. Pozwala to wnioskować, że cynk występuje także w eNOS. Sugeruje się, że obecność tego kationu zapewnia odpowiednie połączenie pomiędzy podjednostkami [11].

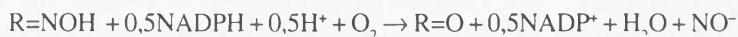
## SUBSTRATY I PRODUKTY

Trzy enzymy NOS przeprowadzają identyczną dwuetapową reakcję utleniania argininy. Postuluje się, że bezpośrednim produktem tej reakcji jest tlenek azotu oraz cytrulina. Szczegółowy mechanizm reakcji oraz produkt końcowy jest przedmiotem licznych kontrowersji. Większość badaczy pozostaje zgodna tylko w kwestii substratów (NADPH, O<sub>2</sub>, L-arginina) wykorzystywanych przez enzym oraz produktu pośredniego, którym jest N-hydroksy-L-arginina. Najbardziej prawdopodobna stechiometria tej dwuetapowej reakcji, przy założeniu, że jej bezpośrednim produktem jest tlenek azotu, przedstawia się następująco [1]:

I Etap:



II Etap:



gdzie: R=NH to arginina, R=NOH to N-hydroksy-L-arginina (NHA) i R=O to cytrulina.

Kontrowersje związane ze stechiometrią dotyczą przede wszystkim ilości zużywanego NADPH. Problem polega na tym, że głównej reakcji towarzyszą reakcje dodatkowe, w wyniku których wyczerpaniu ulega NADPH. W związku z tym określenie dokładnej stechiometrii nastęrcza wiele trudności. Te dodatkowe reakcje to, między innymi, produkcja anionorodnika ponadtlenkowego w warunkach deficytu substratu [9].

## Arginina

Arginina jest prekursorem w syntezie tlenku azotu, mocznika, poliamin i fosforanu kreatyny. Aminokwas ten syntetyzowany jest z cytruliny w wyniku kolejnego działania dwóch enzymów cyklu mocznikowego: syntetazy i liazy argininobursztynianowej (AS i AL). Głównym miejscem syntezy u zwierząt ureotelicznych jest wątroba (zachodzi tu rozkład argininy do ornityny i mocznika z udziałem arginazy) oraz nerki (wydzielanie argininy do krwi) [13]. W innych tkankach ekspresja AS i AL utrzymywana jest na stosunkowo niskim poziomie. Ponieważ wykazano koindukcję ekspresji AS i eNOS w komórkach endotelialnych, sugeruje się, że dostępność argininy w istotny sposób wpływa na poziom NO produkowanego w śródbłónku [3].



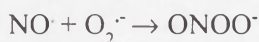
W większości komórek transport argininy do cytoplazmy odbywa się w sposób niezależny od pH i  $\text{Na}^+$  dzięki rodzinie kationowych transporterów aminokwasów (CAT1, CAT2A, CAT2B oraz CAT3) [3]. CAT1 jest transporterem obecnym zasadniczo we wszystkich tkankach, natomiast pozostałe izoformy charakteryzuje tkankowo-specyficzna ekspresja [13]. Wyniki badań wskazują na niezwykle silną zależność pomiędzy transportem zewnątrzkomórkowej argininy a produkcją tlenu azotu przez poszczególne enzymy [3].

### Produkty

Tlenek azotu jest małą i niezwykle reaktywną cząsteczką mającą jeden niesparowany elektron. Okres półtrwania tego związku wynosi zaledwie kilka sekund, po których, w wyniku reakcji z wodą i tlenem, powstają aniony azotynowe i azotanowe [4]:



Tlenek azotu reaguje z białkami zawierającymi centra żelazowo-siarkowe, jony metali przejściowych i grupy hemowe. W przypadku obecności anionorodnika ponadtlenkowego zachodzi reakcja prowadząca do powstania nadtlenuazotynu:



Anion nadtlenuazotynowy jest nietrwały w fizjologicznym zakresie pH. Długość jego okresu półtrwania (jedna sekunda) jest jednak wystarczająca, aby pozwolić na dyfuzję związku w komórce na znaczne odległości. Nadtlenuazotyn ma silne właściwości utleniające; reaguje z grupami tiolowymi białek i wielonienasyconymi resztami kwasów tłuszczowych w lipidach. Charakterystyczną reakcją nadtlenuazotynu jest nitrowanie reszt tyrozynowych w białkach, katalizowane przez jony metali przejściowych, a także metale związane z białkami.

Dość paradoksalnie, najbardziej problematycznym aspektem reakcji katalizowanej przez NOS jest jednoznaczna identyfikacja NO jako jej produktu. Fakt, że ekstrakty komórek i tkanek zawierających enzym wytwarzają NO, nie jest jednoznaczny z tym, że bezpośrednim produktem NOS jest właśnie ten rodnik. Metody wykorzystywane do identyfikacji NO opierają się najczęściej na pomiarze ilości produktów rozkładu tego związku w warunkach tlenowych ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) lub wykorzystują reakcję z białkami hemowymi (hemoglobina). Żadna z tych metod nie jest jednak specyficzna w stosunku do NO, a co ważniejsze nie rozróżnia NO od  $\text{ONOO}^-$  [7].

W przypadku bezpośredniego pomiaru produkcji NO przy użyciu metod elektrochemicznych, gaz ten jest wykrywalny tylko w obecności wysokich stężeń dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalizującej reakcję rozkładu anionorodnika ponadtlenkowego ( $\text{O}_2^-$ ) do nadtlenu wodoru ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i tlenu [7]. Biorąc pod uwagę fakt, że w pewnych okolicznościach (niskie stężenie  $\text{BH}_4$  lub argininy) syntaza tlenu azotu jest zdolna do produkcji  $\text{O}_2^-$ , rzeczywisty produkt reakcji może być niewykrywalny ze względu na spontaniczną reakcję NO z  $\text{O}_2^-$  prowadzącą do powstania  $\text{NOO}^-$  [2].

Wszystkie trzy izoformy są zdolne do syntezy anionorodnika ponadtlenkowego, choć w przypadku nNOS te zdolności są największe [1]. Wiadomo więc, że *in vitro* NOS zachowuje się, przynajmniej w pewnych okolicznościach, jak syntaza nadtlenuazotynu. Wątpliwym wydaje się jednak, że proces ten ma miejsce *in vivo*, ponieważ w komórce są obecne enzymy ochronne usuwające toksyczne pochodne tlenu (np. SOD) i przeciwutleniacze, takie jak glutation [2]. Niektórzy badacze wskazują jednak na możliwość zachodzenia reakcji prowadzącej do powstania ONOO<sup>-</sup> bezpośrednio w miejscu aktywnym enzymu [1].

Cytrulina, drugi produkt reakcji katalizowanej przez syntezę, wzbudza zdecydowanie mniej kontrowersji. Większość autorów twierdzi, że produktem jest L-cytrulina (poprzez analogię do substratu – L-argininy). Należy jednak zaznaczyć, że pewne enzymy szlaku metabolizmu aminokwasów zdolne są do produkcji mieszaniny enancjomerów, mimo że tylko jeden rodzaj izomeru jest ich substratem. Nie można wykluczyć więc możliwości, że produktem NOS jest mieszanina enancjomerów [1].

## UWAGI KOŃCOWE

Pomimo zaawansowanych badań, niektóre z istotnych strukturalnych i funkcjonalnych cech eNOS pozostają zagadką. Wciąż brakuje jednoznacznych dowodów na rolę tetrahydrobiopteryny w katalitycznym cyklu enzymu. Nieznany jest również szczegółowy mechanizm reakcji, a w szczególności drugi jej etap prowadzący od hydroksyargininy do ostatecznego produktu. Nie udało się także wykazać, że bezpośrednim i jedynym produktem katalitycznej aktywności eNOS jest tlenek azotu. Ma to szczególne znaczenie, bowiem należy zdawać sobie sprawę, że jeżeli NOS są w stanie produkować różnego rodzaju związki w zależności od izoformy i okoliczności, to zdobyta wiedza może okazać się kluczowa dla zrozumienia biologicznych efektów inhibicji poszczególnych izoenzymów.

## LITERATURA

- [1] ALDERTON WK, COOPER CE, KNOWLES RG. Nitric oxide synthase: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; **357**: 593–615.
- [2] ANDREW P.J., MAYER B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 1999; **43**: 521–531.
- [3] BOGDAN C. Nitric oxide and immune response. *Nat Immunol* 2001; **2**(10): 907–916.
- [4] BREDT DS. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Rad Res* 1999; **31**: 577–596.
- [5] FORSTENMANN U, BOISSE JP, KLEINERT H. Expressional control of the „constitutive“ isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* 1998; **12**: 773–790.
- [6] FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; **288**(5789): 373–376.
- [7] GORREN AC, MAYER B. The versatile and complex enzymology of nitric oxide synthase. *Biochemistry* 1998; **63**(7): 734–743.



- [8] GOVERS R, RABELINK TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; **280**: F193–F206.
- [9] GROVES J.T., WANG C. Nitric oxide synthase: models and mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* 2000; **4**: 687–695.
- [10] KATO N, SUGIYAMA T, MORITA H, NABIKA T, KURIHARA H, YAMORI Y, YAZAKI Y. Lack of evidence for association between the endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension. *Hypertension* 1999; **33**: 933–936.
- [11] LANE P., GROSS S. The autoinhibitory control element and calmoduline conspire to provide physiological modulation of endothelial and neuronal nitric oxide synthase activity. *Acta Physiol Scand* 2000; **168**: 53–63.
- [12] MONTELLANO PRO, NISHIDA C, GERBER N. Nitric oxide synthase structure and electron transfer. *Am Soc Pharmacol Exp Ther* 1998; **26(12)**: 1185–1189.
- [13] MORI M, GOTOH T. Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **275**: 715–719.
- [14] NADAUD S, BONNARDEAUX A, LATHROP M, SOUBRIER F. Gene structure, polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Biochem Res Commun* 1994; **198(3)**: 1027–1033.
- [15] PALMER RM, FERRIGE AG, MONCADA S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; **327(6122)**: 524–526.
- [16] SOMA M, NAKAYAMA T, KANMATSUSE K. Nitric oxide synthase gene polymorphism and its influence on cardiovascular disease. *Curr Opin Nephrol Hyperten* 1999; **8**: 83–87.
- [17] SOUBRIER F. Nitric oxide synthase genes, candidate genes among many others. *Hypertension* 1999; **33**: 924–926.
- [18] STRYER L. Hemoglobina: portret białka allosterycznego. W: Stryer L Biochemia; Wydaw. Naukowe PWN S.A. 1999: 153–160.
- [19] WATTANAPITAYAKUL SK, MIHM MJ, YOUNG AP, BAUER JA. Therapeutic implications of human endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *Trends Pharmacol Sci* 2001; **22(7)**: 361–368.

*Redaktor prowadzący – Maciej Zabel*

*Otrzymano: 25.02.2004 r.*

*Przyjęto: 12.05.2004 r.*

*ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań*

## ENDOTELIALNA SYNTAZA TLENKU AZOTU CZ. II. FUNKCJA BIOLOGICZNA

### ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE. PART II. FUNCTIONAL ASPECTS

Monika SEIDEL, Dorota FISZER, Maciej KURPISZ

Instytut Genetyki Człowieka PAN

*Streszczenie:* Zaburzenia ekspresji i aktywności eNOS łączą się z takimi jednostkami chorobowymi, jak: miażdżyca, choroba wieńcowa, hipercholesterolemia czy nadciśnienie tętnicze. Po raz pierwszy eNOS została zidentyfikowana w komórkach śródbłonna żył i tętnic; bardziej szczegółowe badania wykazały obecność tego enzymu w miocytach, płytkach krwi, neuronach oraz w komórkach Leydiga i Sertolego. Endotelialna syntaza tlenku azotu gromadzi się w specyficznych miejscach inwaginacji błony komórkowej. Postuluje się, że zagłębienia błony komórkowej stanowią centralne miejsca (tzw. mikrodomeny) w transdukcji sygnałów docierających do komórki z zewnątrz. Endotelialna syntaza tlenku azotu w formie nieaktywnej ściśle oddziałuje z kaweoliną-1, białkiem należącym do stosunkowo dużej rodziny białek transbłonowych. Głównym receptorem dla tlenku azotu, bez względu na źródło i charakter tkanki, w obrębie której powstaje, jest rozpuszczalna cyklaza guanylowa. Wynikiem aktywacji cyklazy jest wzrost poziomu cGMP koniecznego do aktywacji kinazy białkowej G (PKG). Ze względu na niezwykle szeroką gamę substratów PKG, aktywacja eNOS prowadzi do zróżnicowanej odpowiedzi, zależnej od rodzaju komórki. W obrębie śródbłonna, tlenek azotu pełni kluczową rolę w regulacji lokalnego ciśnienia krwi oraz hamuje agregację i adhezję płytek krwi, natomiast w mięśniu sercowym moduluje aktywność skurczową miocytów. Wykazano, że funkcjonalna eNOS jest niezbędna w procesie angiogenezy i przebudowy naczyń krwionośnych. Ze względu na wolnorodnikowy charakter NO, którego nadmierny poziom stanowi niebezpieczeństwo dla otaczających komórek, aktywność eNOS podlega ścisłej i skomplikowanej regulacji. Najbardziej podstawowym elementem tej kontroli jest aktywacja białka uwarunkowana związaniem kompleksu  $Ca^{2+}$ /kalmodulina. Dodatkowo elementy regulacji to fosforylacja i depalmitylacja enzymu oraz asocjacja z białkiem szoku termicznego Hsp90. Pomimo uznania eNOS za enzym konstytutywny, na przestrzeni ostatnich kilku lat udowodniono, że ekspresja genu podlega silnym wahaniom w odpowiedzi na czynniki wzrostu, hormony, cytokiny i czynniki fizyczne. Dotychczas przeprowadzone doświadczenia nie pozwalają na sformułowanie ostatecznych wniosków nad proponowaną rolą endotelialnej syntazy tlenku azotu w licznych schorzeniach układu krwionośnego.

*Słowa kluczowe:* tlenek azotu, endotelialna syntaza tlenku azotu, cykliczny GMP, kinaza białkowa G, angiogeneza, choroby sercowo-naczyniowe.



*Summary:* Some of the key functions of endothelium are dependent on the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity, thus suggesting a role of this enzyme in pathological conditions such as coronary artery disease (CAD), essential hypertension, hypercholesterolemia and atherosclerosis. To evaluate the proposed role of eNOS, its activity and expression has been widely analyzed. Endothelial NOS was first identified in endothelial cells of arteries and veins, further investigations demonstrated its presence in the other cell types including neurons, platelets, myocytes, Sertoli and Leydig cells. Enzyme has been shown to be targeted to plasmalemmal caveolae. These specialized invaginations of plasma membrane seem to play a major role in extracellular signal transduction as they contain a great variety of signal molecules. Endothelial NOS associates with caveolin-1, a member of transmembrane family proteins which renders enzyme inactive. NO generated by eNOS is a crucial activator of soluble cGMP cyclase. The activity of cGMP cyclase gives rise to the secondary messenger (cGMP) which activates protein kinase G (PKG). A great variety of proteins which are substrates for PKG phosphorylation determines the complex cell response observed after eNOS activation. Endothelium-derived NO is a physiologically important vasodilator, an inhibitor of platelet aggregation and adhesion, and a modulator of myocyte contractility. It has also been shown that functional eNOS is absolutely required for angiogenesis and vessel remodeling. Since NO overproduction might be harmful for adjacent tissues, enzyme activity is subjected to complex and subtle control mechanisms. The most basic control factor is  $Ca^{2+}$ /calmodulin complex which upon binding to the enzyme dissociates caveolin and renders eNOS full activity. Additional regulatory mechanisms include phosphorylation, depalmitoylation and Hsp90 association. Endothelial nitric oxide synthase, although previously regarded as a constitutive factor, turned out to be the enzyme which expression is dynamically regulated by growth factors, hormones, cytokines and physical stimuli. To determine the precise role for eNOS in pathogenesis of hypertension, CAD or atherosclerosis remains to be elucidated.

*Key words:* nitric oxide, endothelial nitric oxide synthase, cyclic GMP, protein kinase G, angiogenesis, cardiovascular disease.

## WSTĘP

Doniesienia ostatnich lat wskazują na znaczący udział tlenu azotu w szeregu istotnych procesów fizjologicznych. Jedną z pierwszych funkcji, jaką przypisano tej reaktywnej cząsteczce, była regulacja miejscowego przepływu krwi. W wypadku licznych chorób układu krwionośnego, których przyczyn nie udało się sprecyzować, endotelialna syntaza tlenu azotu będąca podstawowym źródłem NO w naczyniach krwionośnych, stała się obiektem intensywnych badań. Badania te zweryfikowały wcześniejszy pogląd o konstytutywnej ekspresji enzymu, wykazały bowiem dynamiczną regulację poziomu jego ekspresji. Założono, że analiza zmian aktywności i ekspresji enzymu pod wpływem różnorodnych bodźców stanowi drogę do wyjaśnienia roli NO w procesach fizjologicznych oraz może służyć zrozumieniu podstaw chorób, których podłoże upatruje się w dysfunkcji śródbłonna. Obecnie zaburzenia ekspresji i aktywności eNOS łączy się z takimi jednostkami chorobowymi, jak: miażdżycy, choroba wieńcowa czy nadciśnienie tętnicze. Pośredniego dowodu na udział eNOS w nadciśnieniu dostarczyły obserwacje, że brak ekspresji powyższego genu u myszy powodował znaczne podwyższenie ogólnoustrojowego ciśnienia krwi [32, 33].

## LOKALIZACJA TKANKOWA I SUBKOMÓRKOWA

Po raz pierwszy eNOS została zidentyfikowana w komórkach śródbłonna żył i tętnic. Wykorzystując specyficzne przeciwciała udało się wykazać obecność tego enzymu w komórkach Leydiga i Sertolego, płytkach krwi oraz komórkach nerwowych [11].

Wyniki wielu badań wyraźnie wskazują na ścisłą zależność pomiędzy wewnątrzkomórkową lokalizacją enzymu i jego aktywnością [17]. Endotelialna syntaza tlenku azotu skupiona jest w specyficznych miejscach inwaginacji błony zajmujących 30% całkowitej powierzchni komórek śródbłonna [17]. Postuluje się, że zagłębienia błony komórkowej stanowią centralne miejsca (tzw. mikrodomeny) w transdukcji sygnałów docierających do komórki z zewnątrz. Zlokalizowano tutaj szereg białek kluczowych dla procesu transdukcji; receptory dla EGF (czynnik wzrostu naskórka), PDGF (czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego), VEGF (czynnik naczyniowy wzrostu śródbłonna) [17] oraz dla bradykininy i estrogenów [17], kinazy tyrozynowe (src, MAP), białka G, kinazę białkową C (PKC), białka ras, kanały wapniowe zależne od  $IP_3$  (1,4,5-trifosforan inozytolu) [14]. Charakterystyczną cechą błony komórkowej w obrębie inwaginacji jest prawie zupełny brak fosfolipidów oraz obecność białek strukturalnych z rodziny kaweolin [17]. Kaweolina-1 podlega nieodwracalnej palmitylacji oraz tworzy oligomerowe kompleksy oddziałujące nie tylko z eNOS (miejsce oddziaływania zlokalizowane jest w domenie oksygenazy), ale również z innymi białkami (podjednostka  $\alpha$  białka G, białko ras, kinazy tyrozynowe z rodziny src) [10, 17]. Ponieważ oddziaływanie eNOS z kaweoliną-1 wymaga mirystylacji (nieodwracalna acylacja N-końcowej glicyny) i palmitylacji enzymu (odwracalna modyfikacja Cys<sup>15</sup> oraz Cys<sup>26</sup>) tylko w warunkach *in vivo*, uważa się, że ten rodzaj modyfikacji jest konieczny do oddziaływania z kaweoliną ze względu na zakotwiczenie białka w błonie komórkowej [17, 2]. W miocytach serca eNOS asocjuje z kaweoliną-3 [2].

Obecność eNOS oraz kaweoliny-1 wykazano także w aparacie Golgiego [17]. Postuluje się, że lokalizacja enzymu w sieci trans aparatu Golgiego jest następstwem recyrkulacji składników błon pomiędzy siecią trans, endosomami oraz błoną komórkową [14]. Konsekwencją mutacji uniemożliwiającej palmitylację eNOS jest kumulacja całej puli enzymu w aparacie Golgiego [14]. W obliczu tych wyników sugeruje się, że transport eNOS do sieci trans jest poprzedzony aktywacją i depalmitylacją enzymu w błonie komórkowej i służy ponownej palmitylacji enzymu [17]. Dotychczas nie udało się wyjaśnić, czy aparat Golgiego jest również miejscem produkcji NO [17].

### Komórki endotelialne

Komórki endotelialne (EC) jako główne miejsce ekspresji eNOS i podstawowy obiekt w badaniach funkcji tego enzymu wymagają bardziej szczegółowego omówienia. Znaczne możliwości wydzielnicze śródbłonna warunkują jego istotną funkcję regulatorową w organizmie człowieka [4]. Te funkcje są niejednokrotnie organospecyficzne i tłumaczą funkcjonalną i morfologiczną heterogenność EC [13]. Niejednokrotnie również w obrębie jednego organu występują znaczne różnice pomiędzy



komórkami pochodzenia żylnego i tętniczego oraz między śródbłonkiem dużych i małych naczyń krwionośnych [13, 20]. Jedne z najbardziej wyspecjalizowanych komórek zlokalizowane są w śródbłonku mózgu i szpiku kostnego [13].

Choć w warunkach prawidłowych EC są w stanie spoczynku, ich fenotyp ulega zmianie natychmiast po uszkodzeniu fragmentu tkanki; komórki migrują do miejsca zranienia i nabierają zdolności proliferacyjnych [4]. Ponieważ tempo podziałów EC *in vitro* znacznie przewyższa szybkość ich podziałów w warunkach *in vivo*, w hodowlach komórkowych, mimo że powszechnie stosowanych, mogą powstawać istotne zmiany ich fizjologii [4]. Dlatego też wszelkie wyniki doświadczeń powinny podlegać analizie z uwzględnieniem faktu odmiennych warunków w hodowlach *in vitro* [4]. Na funkcjonalne właściwości EC w kulturach *in vitro* ma również wpływ stopień zagęszczenia hodowli [13].

Komórki śródbłonka wykazują ekspresję specyficznych markerów, które umożliwiają ich identyfikację. Większość markerów wykorzystywanych w identyfikacji to białka konstytutywne obecne we wszystkich typach śródbłonka, np. CD 31, czynnik VIII, enzym konwertujący angiotensynę, receptor odpowiedzialny za internalizację acylo-wanych cząstek LDL (lipoproteiny o małej gęstości), ET-1 (endotelina-1), eNOS, prostacyklina [4].

Złożona rola, jaką pełni śródbłonek, i jego adekwatne reagowanie na bodźce wymagają obecności licznych receptorów i aktywności różnorodnych dróg transdukcji sygnału [4]. Na powierzchni EC zidentyfikowano receptory dla takich substancji, jak: acetylocholina, angiotensyna, adenozyina, histamina, serotonina, trombina, katecholoaminy, prostaglandyny, liczne aminokwasy, insulina, receptory dla HDL (lipoproteiny o dużej gęstości), LDL oraz czynniki wzrostowe [4].

Produkcja i metabolizm substancji aktywnych działających na komórki mięśni gładkich warunkują istotny udział śródbłonka w regulacji miejscowego i ogólnoustrojowego przepływu krwi (produkcja ET-1, NO, metabolizm angiotensyny I do aktywnego peptydu angiotensyny II) [4, 5]. Komórki śródbłonka są również bezpośrednio odpowiedzialne za modulację przepuszczalności śródbłonka, szczególnie w obrębie małych naczyń krwionośnych [4].

Jednym z ważniejszych procesów zachodzących z udziałem EC jest angiogeneza i przebudowa naczyń krwionośnych [4]. Angiogeneza wymaga migracji komórek śródbłonka, zdolności degradowania macierzy zewnątrzkomórkowej, proliferacji oraz ostatecznego zróżnicowania prowadzącego do powstania funkcjonalnych kapilar [4]. Proces ten pojawia się w warunkach fizjologicznych tylko w wyjątkowych sytuacjach (prolifерacja endometrium, gojenie większych zranień) [13]. W patologicznych przypadkach towarzyszy rozwojowi guzów (odpowieź EC na substancje wydzielane przez komórki guza) i w związku z tym może stanowić potencjalny cel działania nowych środków farmakologicznych wykorzystywanych w leczeniu nowotworów [4]. Przebudowie naczyń krwionośnych towarzyszy apoptoza EC [4].

EC biorą udział w procesach koagulacji i agregacji płytek krwi [18], działając często w przeciwstawny sposób w zależności od zaistniałych warunków [4]. Ścisła interakcja śródbłonka z komórkami mięśni gładkich hamuje proliferację tych drugich [4]. W

momencie zniszczenia śródbłonka (adhezja monocytów będąca następstwem akumulacji utlenionych LDL na powierzchni EC, wzmożona produkcja czynników wzrostowych), kontrola zostaje zniesiona i pojawia się wysokie prawdopodobieństwo powstania zmian miażdżycowych [4]. Złożona interakcja śródbłonka z leukocytami jest jednym z ważniejszych aspektów odpowiedzi immunologicznej i procesów zapalnych [4].

## FUNKCJA BIOLOGICZNA eNOS

Głównym receptorem dla tlenu azotu, bez względu na źródło i charakter tkanki, w obrębie której powstaje, jest rozpuszczalna cyklaza guanylowa [12]. Cyklaza guanylowa, ze względu na obecność ugrupowania hemowego, z którym wiąże się NO, ma zdolność reagowania na pojawiający się w otoczeniu tlenek azotu poprzez produkcję cyklicznego GMP. Cykliczny GMP jest przekaźnikiem drugiego rzędu, warunkującym aktywność kinazy białkowej G. Powyższy enzym charakteryzuje niezwykle szerokie spektrum działania, w związku z czym jego aktywność wyzwała zróżnicowaną odpowiedź zależną od rodzaju komórki.

Tlenek azotu, którego źródłem jest endotelialna syntaza tlenu azotu, pełni kluczową rolę w regulacji lokalnego ciśnienia krwi [10]. Substancje wywierające wpływ na wewnątrzkomórkowe stężenie wapnia w komórkach endotelialnych (acetylocholina, bradykinina, histamina) regulują aktywność eNOS [26]. Działanie rozkurczające NO jest wynikiem stymulacji rozpuszczalnej cyklazy guanylowej w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Ponieważ najsilniejszy efekt antagonistyczny do tlenu azotu wywiera endotelina-1 [30], już dawno zrodziło się pytanie, czy zachodzi jakakolwiek zależność między stężeniem NO a poziomem ET-1 oraz aktywnością ET-1 a ekspresją genu *eNOS*. Doświadczenia przeprowadzone przez Napolitano i współpracowników [27] wykazały funkcjonalny związek między ET-1 a poziomem mRNA dla eNOS (podwyższenie ekspresji enzymu pod wpływem ET-1) [28]. Ten sam rodzaj odpowiedzi uzyskano w innych badaniach przeprowadzonych w hodowlach *in vitro* [30]. Ponieważ endotelina-1 jest substancją najsilniej kurczącą naczynia krwionośne [30], wyniki powyższych doświadczeń sugerują istotną rolę eNOS w mechanizmie chroniącym nasz organizm przed nadmiernym skurczem naczyń wywołanym działaniem ET-1 [24]. Za tą hipotezą przemawia również zaobserwowany związek pomiędzy stężeniem peptydu a wywoływanym efektem. Ponieważ zmiany w ekspresji eNOS zaobserwowano tylko dla bardzo wysokich stężeń ET-1, wydaje się, że ten wyrafinowany mechanizm ulega aktywacji, gdy ilość peptydu osiąga poziom krytyczny. Postuluje się, że zaburzenia równowagi pomiędzy NO produkowanym przez eNOS a ET-1 mogą w istotny sposób przyczyniać się upośledzenia funkcji śródbłonka w takich stanach patologicznych, jak hipercholesterolemia oraz miażdżyca [35].

Adaptacja śródbłonka w odpowiedzi na ciągłe zmiany przepływu krwi oraz „siły ścinające” (siły wytwarzane przez strumień płynącej krwi, których następstwem są naprężenia komórek śródbłonka), jest niezbędna do utrzymania podstawowego ciśnienia [14]. Ponieważ wyżej wymienione bodźce nie wpływają na poziom wapnia, zaskakujące jest, że głównym enzymem odpowiedzialnym za tę regulację jest eNOS.



Inną istotną rolą tlenu azotu w obrębie śródbłonka jest hamowanie agregacji i adhezji płytek krwi [11, 21]. Wykazano również wpływ NO na zdolność adhezyjną leukocytów (obniżenie ekspresji kompleksu glikoprotein CD11/CD18) [11, 31].

Tworzenie nowych naczyń krwionośnych jest konsekwencją zwiększonego zapotrzebowania tkanek na dopływ krwi [15]. Proces angiogenezy rozpoczyna się w warunkach niedotlenienia. Do niedawna za najważniejsze czynniki proangiogenne uważano VEGF oraz ET-1, obecnie dołączył do nich NO [15]. Coraz więcej dowodów sugeruje, że NO jest absolutnie niezbędny w procesach migracji komórek śródbłonka, gojenia ran i angiogenezy (badania przeprowadzono na transfekowanych liniach komórkowych CHO oraz wykonano doświadczenia z wykorzystaniem antagonistów receptora ET-1<sub>B</sub> i analogów cGMP) [14]. Analiza ekspresji eNOS w komórkach poddawanych działaniu VEGF wykazała zależny od stężenia wzrost ekspresji enzymu [8], co potwierdza proponowaną rolę tlenu azotu w angiogenezie stymulowanej przez VEGF [15]. VEGF jest silnym czynnikiem proangiogenym produkowanym przez komórki naczyń krwionośnych i komórki guzów [8]. Wykazano, że inhibitory syntezy NO są w stanie całkowicie znieść proliferację komórek śródbłonkowych wywołaną przez VEGF w warunkach *in vitro* [8]. Prawdopodobnie wydaje się więc, że zwiększony poziom mRNA dla eNOS jest podstawą obserwowanego ochronnego działania, jakie wykazuje VEGF w obrębie śródbłonka [8]. Wykazano bowiem, że NO nie tylko przyspiesza wzrost uszkodzonego fragmentu śródbłonka, ale również przeciwdziała zmianom miażdżycowym poprzez utrzymywanie komórek mięśni gładkich w stanie spoczynku oraz obniża lokalne ciśnienie krwi (te same efekty zaobserwowano stosując VEGF) [8]. Badania Bouloumie i współpracowników [8] sugerują, że powyższy czynnik wzrostowy wywiera wpływ na stabilność mRNA dla enzymu.

Wspomniana endotelina-1 oprócz silnego działania kurczącego wykazuje również istotne działanie proangiogenne [15]. Wyniki opisanych badań wskazują, że zarówno VEGF, jak i ET-1 mogą zapewniać konieczny do procesu angiogenezy wzrost stężenia NO właśnie poprzez stymulację ekspresji eNOS. U podstaw obserwowanego podwyższenia poziomu mRNA dla eNOS może mieć miejsce stymulacja transkrypcji lub zwiększenie stabilności mRNA. Ponieważ wykazano upośledzenie produkcji ET-1 u osób ze zmianami miażdżycowymi, uważa się, że prawdopodobną przyczyną niedostatecznej angiogenezy w obrębie miejsc niedokrwienia jest fakt, że w warunkach obniżonego stężenia ET-1 poziom NO jest za niski [15].

Podsumowując, migracja i angiogeneza wymagają jednoczesnego działania co najmniej dwóch składowych: funkcjonalnej eNOS oraz sygnału kierunkowego (VEGF lub ET-1) [15]. Wykazano, że to właśnie funkcjonalna eNOS umożliwia komórkom śródbłonkowym nabycie fenotypu zdolnego do migracji w kierunku źródła czynników proangiogennych [14]. Fenotyp ten jest ściśle zależny od stężenia NO; w stanie spoczynku śródbłonek jest zwarty, a komórki niezdolne do migracji, aktywacja eNOS prowadzi do zmniejszenia oddziaływań adhezyjnych [15]. Sugeruje się, że tlenek azotu wpływa na poziom fosforylacji specyficznej kinazy tyrozynowej modulującej potencjał adhezyjny komórek [14].

Tlenek azotu jest przynajmniej sześć razy lepiej rozpuszczalny w dwuwarstwie lipidowej niż w fazie wodnej [14]. Chwilowe zaburzenie struktury lipidowej przez NO prowadzi do zwiększenia płynności błony [14]. Sugeruje się więc, że niedostateczna

produkcja NO powoduje nadmierną sztywność błon opóźniającą przepływ elementów morfotycznych krwi, zwiększa opór naczyniowy i przyczynia się do rozwoju nadciśnienia [14]. Dodatkowo wykazano, że aktywność eNOS reguluje przepuszczalność śródbłonka [14] oraz hamuje proliferację komórek mięśni gładkich [15]. Wyżej wymienione funkcje eNOS sugerują kluczową rolę enzymu w utrzymaniu homeostazy w obrębie naczyń krwionośnych. Sugeruje się również ścisły związek pomiędzy zapaleniem a dysfunkcją śródbłonka (ECD), będącą najprawdopodobniej efektem zaburzeń w aktywności eNOS. Dysfunkcja śródbłonka, która towarzyszy takim stanom patologicznym, jak: nadciśnienie, miażdżyca, zawał czy wylew, jest konsekwencją nadmiernej produkcji cytokin prozapalnych, np. TNF- $\alpha$  (czynnik martwicy guza) [15]. W celu wykazania proponowanej roli eNOS w powyższym zjawisku przeprowadzono doświadczenia, w których analizowano zmiany ekspresji eNOS pod wpływem cytokin prozapalnych. Badania przeprowadzone przez Agnoletti i współpracowników wykazały [1], że inkubacja komórek śródbłonka w obecności surowicy od pacjentów z niewydolnością serca, powodowała obniżenie ekspresji eNOS. Wysoka zawartość TNF- $\alpha$  w tej surowicy i wyniki doświadczeń z wykorzystaniem przeciwciał anti-TNF- $\alpha$  (częściowe przeciwdziałanie obserwowanemu wcześniej spadkowi ekspresji eNOS) są zgodne z hipotezą udziału NO w ECD wywołanej przez cytokiny prozapalne [1].

Endotelialna syntaza tlenku azotu zlokalizowana w miocytach bierze udział w regulacji skurczów mięśnia sercowego [19]. Od przeszło 100 lat organiczne azotany, których działanie warunkowane jest uwalnianiem NO, stosowane były jako środek leczniczy [22]. Tak jak w pozostałych tkankach, kluczową funkcją tlenku azotu w miocytach jest aktywacja rozpuszczalnej cyklazy guanylowej. Produkt enzymu – cykliczny GMP – wiąże się z białkami efektorowymi: kinazą białkową G (PKG) i cAMP-fosfodiesterazą hamowaną przez cGMP (PDE III) [22]. Wysokie stężenie cGMP aktywuje PKG, czego konsekwencją jest inhibicja kanałów wapniowych typu L [22]. Niższe stężenie cGMP zmniejsza aktywność PDE III i w konsekwencji prowadzi do wzrostu zawartości cAMP [22]. Cykliczny AMP stymuluje skurcz poprzez aktywację kanałów wapniowych typu L [19].

Tlenek azotu może również wpływać na funkcje mięśnia sercowego niezależnie od cGMP [22]. Wykazano, że wysokie stężenia NO powodują kowalencyjną modyfikację i, w konsekwencji, zahamowanie przepuszczalności kanałów wapniowych oraz hamują transport elektronów w łańcuchu oddechowym mitochondriów [22].

Podsumowując, działanie NO na funkcje mięśnia sercowego ma charakter dwukierunkowy; przy niskich stężeniach NO (produkcja endogenna) potęguje skurcz, natomiast wyższe stężenia (źródła egzogenne) wyraźnie przyspieszają relaksację mięśnia [22].

## REGULACJA AKTYWNOŚCI I EKSPRESJI eNOS

Ze względu na wolnorodnikowy charakter NO, którego nadmierny poziom stanowi niebezpieczeństwo dla otaczających komórek [34], aktywność eNOS podlega ścisłej i skomplikowanej regulacji. Enzym, choć początkowo uznany za konstytutywny, okazał się być kontrolowany na poziomie ekspresji. Wykazano bowiem, że liczne bodźce o charakterze nie tylko chemicznym, ale również fizycznym zmieniają poziom mRNA dla tego białka.



## Regulacja aktywności

W komórkach spoczynkowych oddziaływania eNOS z kaweoliną są na tyle silne, że powodują całkowitą inhibicję enzymu [25]. Mobilizacja wapnia będąca następstwem działania niektórych substancji biologicznie czynnych (acetylocholina, bradykinina, VEGF, histamina) [29] umożliwia powstanie kompleksu  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , który wiąże się z eNOS. Jednoczesne oddysocjowanie kaweoliny znosi inhibicję i przywraca syntazie aktywność [17].

Aktywność eNOS zależy również od czynników fizycznych działających w obrębie śródbłonna. Wykazano, że naprężenia komórek śródbłonna, których źródłem jest płynąca krew, aktywują eNOS w sposób niezależny od wapnia [17]. Choć mechanizm tego typu aktywacji nie został do końca poznany, wyniki doświadczeń wskazują na udział procesu fosforylacji. Sugeruje się, że konsekwencją fosforylacji enzymu jest zmiana konformacyjna podobnie jak w wypadku wiązania kalmoduliny [23]. Wykazano, że następstwem zmian naprężenia EC jest fosforylacja  $\text{Ser}^{1179}$  przez kinazę białkową Akt [2]. Uważa się, że funkcje sensoryczne w tym typie aktywacji pełni cytoszkielet, który odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu prawidłowego kształtu komórki zapewniającego względną szczelność śródbłonna [17]. Ponieważ w obecności inhibitorów kinaz tyrozynowych „siły ścinające” nie mają wpływu na aktywację enzymu, postuluje się występowanie tego typu fosforylacji prawdopodobnie na etapie przed działaniem kinazy Akt [17].

Aktywność eNOS zależy od jej dystrybucji wewnątrzkomórkowej ściśle powiązanej z palmitylacją enzymu [17]. Ten rodzaj potranslacyjnej modyfikacji jest odwracalny, wymaga wcześniejszej mirystylacji i zapewnia właściwą lokalizację eNOS w obrębie zagłębień błony komórkowej [17]. Należy podkreślić, że żadna z tych modyfikacji nie wpływa na aktywność enzymu w warunkach *in vitro*, co oznacza, że przyczyną znacznego obniżenia aktywności eNOS w wyniku depalmitylacji jest tylko i wyłącznie zmiana dystrybucji komórkowej częściowo zdeacylowanego enzymu [17]. Zauważono, że następstwem przedłużonego działania niektórych przekaźników komórkowych (bradykinina), jest nie tylko depalmitylacja i jednoczesna redystrybucja eNOS do sieci trans aparatu Golgiego, ale również fosforylacja enzymu [25]. Do tej pory nie udało się jednoznacznie zidentyfikować kinazy białkowej odpowiedzialnej za ten proces [23]. Wiadomo jednak, że fosforylacji podlega któraś z licznie obecnych w enzymie reszt serynowych i konsekwencją tej modyfikacji jest znaczne obniżenie aktywności eNOS [16, 17]. Ponieważ receptory dla wielu substancji biologicznie aktywnych, odpowiedzialnych za aktywację enzymu w wyniku mobilizacji wapnia, są sprzężone z systemem białek G będących aktywatorami kinazy białkowej C (PKC), udział tej kinazy wydaje się wysoce prawdopodobny [17]. Podsumowując, odwracalna translokacja eNOS jest następstwem przedłużonego działania przekaźników komórkowych, których podstawową funkcją jest mobilizacja wapnia i stanowi najprawdopodobniej wyszukany mechanizm chroniący organizm przed nadmierną aktywnością enzymu [25].

Jak wspomniano wcześniej, błonę komórkową w miejscach inwaginacji charakteryzuje prawie zupełny brak fosfolipidów. Okazało się, że charakterystyczny skład lipidowy ma również znaczenie dla aktywności eNOS [3]. Wykazano, że fosfolipidy o ujemnym ładunku elektrostatycznym obniżają aktywność katalityczną białka [3]. W obliczu tych wyników zrozumiiałe wydają się obserwowane zaburzenia aktywności eNOS związane

ze zmianami w składzie lipidowym błon podczas hipercholesterolemii [3]. Ponieważ podwyższony poziom cholesterolu dotyczy frakcji lipoprotein LDL, które w formie utlenionej negatywnie regulują aktywność enzymu, upośledzona funkcja eNOS jest uznawana za jeden z ważniejszych czynników przyczyniających się do rozwoju zmian miażdżycowych [7].

Dodatkowym czynnikiem wpływającym na produkcję NO w komórkach śródbłonna jest powszechnie występujące białko Hsp90 (białko szoku termicznego) [2]. Konsekwencją działania VEGF, histaminy czy naprężeń EC jest wzrost oddziaływań pomiędzy eNOS a Hsp90, prowadzący do trzykrotnego wzrostu aktywności enzymu [2].

### Regulacja ekspresji

Podstawowy poziom ekspresji eNOS jest w dużej mierze zależny od rodzaju tkanki. Najsilniejsza ekspresja białka ma miejsce w komórkach wyściełających duże i średnie naczynia krwionośne [17]. Różnorodność potencjalnych miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych w obrębie promotora endotelialnej syntazy tlenku azotu wskazuje na ogromne możliwości regulacji poziomu ekspresji enzymu poprzez zmienne tempo inicjacji procesu transkrypcji.

Pomimo uznania eNOS za enzym konstytutywny, na przestrzeni ostatnich kilku lat udowodniono, że ekspresja genu podlega silnym wahaniom [17]. Wykazano, że naprężenia EC wpływają nie tylko na aktywność enzymu, ale również na jego transkrypcję [17]. Analiza sekwencji w obrębie promotora potwierdziła możliwość regulacji ekspresji eNOS w odpowiedzi na bodźce fizyczne [26].

Endotelialna synteza tlenku azotu pełni istotną rolę w regulacji płucnego przepływu krwi [9]. W komórkach śródbłonkowych naczyń płucnych zaobserwowano znaczny spadek ekspresji eNOS pod wpływem niedotlenienia [11]. Dla śródbłonna pozostałych tkanek nie uzyskano jednoznacznych wyników.

Poziom mRNA dla enzymu podlega silnym wahaniom w obecności cytokin i lipopolisacharydów. Spośród tej grupy jedynie TNF- $\alpha$  wyraźnie obniża ekspresję eNOS niezależnie od podtypu śródbłonna [17]. W przypadku pozostałych czynników efekt końcowy warunkowany jest źródłem pochodzenia komórek oraz kombinacją cytokin użytych w doświadczeniu [11]. Inkubacja komórek śródbłonkowych z takimi czynnikami wzrostu, jak: VEGF, FGF (czynnik wzrostu fibroblastów), EGF (czynnik wzrostu naskórka) czy TGF- $\beta$  (czynnik transformujący  $\beta$ ) zwiększa poziom ekspresji eNOS [17]. Wyniki niektórych doświadczeń sugerują również możliwość wpływu estrogenów i innych hormonów płciowych na poziom mRNA tego enzymu [11].

W obliczu proponowanej roli eNOS w powstawaniu zmian miażdżycowych interesujący jest fakt regulacji ekspresji eNOS przez LDL [11]. Wykazano, że niskie stężenia utlenionej formy LDL podwyższają poziom mRNA dla enzymu, natomiast wyższe stężenia wyraźnie ten poziom obniżają [17]. Sugeruje to obronną odpowiedź śródbłonna w początkowych etapach rozwoju miażdżycy [17].

Ponieważ badania ekspresji genów opierają się głównie na ilościowym oznaczaniu mRNA, należy wziąć pod uwagę, że wyniki takich badań nie informują bezpośrednio o zmianach w transkrypcji genu, lecz dają ogólny obraz poziomu mRNA w komórce.



Dodatkowym i nie mniej istotnym czynnikiem wpływającym na poziom mRNA jest stabilność transkryptu (okres półtrwania), warunkowana sekwencją nukleotydową zlokalizowaną w regionie 3' UTR (region niepodlegający translacji) lub w części kodującej mRNA [17, 6]. Elementy *cis* zmieniają stabilność mRNA w sposób zróżnicowany (mogą na przykład wywierać wpływ na długość końca poli(A), który warunkuje odporność na działanie egzonukleaz przez wiązanie specyficznych białek powodujących degradację endonukleolityczną) [6].

W obrębie końca 3' mRNA dla endotelialnej syntazy azotu zlokalizowano dwa motywy, które są powszechnie uznawane za sekwencje destabilizujące [17]. Wykazano, że TNF- $\alpha$  obniża 10-krotnie poziom mRNA przez destabilizację transkryptu [6]. Mediatorem tego procesu jest prawdopodobnie cytoplazmatyczne białko wiążące się z regionem bogatym w nukleotydy UC w obrębie 3' UTR [6]. Innymi czynnikami wpływającymi na stabilność mRNA enzymu są: faza wzrostu komórek (destabilizacja w komórkach aktywnie dzielących się), utlenione LDL i hipoksja [11].

## UWAGI KOŃCOWE

Przeprowadzone dotychczas doświadczenia nie pozwalają na sformułowanie ostatecznych wniosków co do proponowanej roli endotelialnej syntazy tlenu azotu, w licznych schorzeniach układu krwionośnego. W celu weryfikacji postawionych hipotez niezbędne są dodatkowe badania, które powinny zmierzać przede wszystkim do wyjaśnienia mechanizmów regulacji i fizjologicznych funkcji eNOS. Szczególnie mało wiemy o zmianach w aktywności enzymu pod wpływem czynników innych niż jony wapnia, a niewiele więcej o mechanizmach regulacji jego ekspresji. Należy również pamiętać, że zjawiska obserwowane w warunkach *in vitro* nie mogą być traktowane jako idealne odzwierciedlenie dla sytuacji mających miejsce *in vivo*. Co więcej, coraz częściej wskazuje się, że mechanizmy kontrolujące ekspresję i aktywność eNOS są tkankowo specyficzne, a więc zależą od źródła, z którego komórki śródbłonkowe pobrano [17]. Określenie roli eNOS w szeroko rozumianej dysfunkcji układu krążenia, a więc miażdżycy, chorobie wieńcowej czy nadciśnieniu tętniczym jest celem niezwykle ambitnym, nie tylko ze względu na niepełny stan naszej wiedzy, ale również ze względu na wieloczynnikowe tło powyższych chorób.

## LITERATURA

- [1] AGNOLETTI L, CURELLO S, BACHETTI T, MALACARNE F, GAIA G, COMINI L, VOLTERRANI M, BONETTI P, PARRINELLO G, CADEI M, GRIGOLATO PG, FERRARI R. Serum from patients with severe heart failure downregulates eNOS and is proapoptotic. *Circulation* 1999; **100**: 1983–1991.
- [2] ALDERTON WK, COOPER CE, KNOWLES RG. Nitric oxide synthase: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; **357**: 593–615.
- [3] ANDREW P.J., MAYER B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 1999; **43**: 521–531.
- [4] BACHETTI T, MORBIDELLI L. Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions. *Pharmacol Res* 2000; **42**(1).

- [5] BENERJEE D, RODRIGUEZ M, NAG M, ADAMSON JM. Exposure of endothelial cells to recombinant human erythropoietin induces nitric oxide synthase activity. *Kidney Int* 2000; **57**: 1895–1904.
- [6] BLOCH KD. Regulation of endothelial NO synthase mRNA stability. RNA-binding proteins crowd on the 3'-untranslated region. *Circ Res* 1999; **85**: 653–655.
- [7] BOGDAN C. Nitric oxide and immune response. *Nat Immunol* 2001; **2(10)**: 907–916.
- [8] BOULOUMIE A, SCHINI-KERTH VB, BUSSE R. Vascular endothelial growth factor up-regulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Cardiovasc Res* 1999; **41**: 773–780.
- [9] FAGAN KA, MORRISSEY B, FOUTY BW, SATO K, HARRAL JW, MORRIS KG, HOEDT-MILLER M, VIDMAR S, MCMURTY IF, RODMAN DM. Upregulation of nitric oxide synthase in mice with severe hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Respir Res* 2001; **2**: 306–313.
- [10] FLEMING I, BUSSE R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res* 1999; **43**: 532–541.
- [11] FORSTENMANN U, BOISSE JP, KLEINERT H. Expressional control of the „constitutive“ isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* 1998; **12**: 773–790.
- [12] GALLIGAN JJ. Focus on: “G protein-dependent activation of smooth muscle eNOS via natriuretic peptide clearance receptor. *Am J Physiol*. 1998; **275**: C1407–C1408.
- [13] GARLANDA C, DEJANA E. Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; **17**: 1193–1202.
- [14] GOLIGORSKY MS, LI H, BRODSKY S, CHEIN J. Relationships between caveolae and eNOS: everything in proximity and the proximity of everything. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; **283**: F1–F10.
- [15] GOLIGORSKY MS, NOIRI E, TSUKAHARA H, BUDZIKOWSKI AS, LI H. A pivotal role of nitric oxide in endothelial cell dysfunction. *Acta Physiol Scand* 1999; **168**: 33–40.
- [16] GORREN AC, MAYER B. The versatile and complex enzymology of nitric oxide synthase. *Biochemistry* 1998; **63(7)**: 734–743.
- [17] GOVERS R, RABELINK TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; **280**: F193–F206.
- [18] GRAFE M, GRAF K, AUCH-SCHWELK W, TERBEEK D, HERTE H. Cultivation and characterization of micro- and macrovascular endothelial cells. *Eur Heart J* 1993; **14**: 74–81.
- [19] HARE JM, STAMLER JS. NOS: modulator, not mediator of cardiac performance. *Nature Med* 1999; **5(3)**: 331–334.
- [20] KARASEK MA. Microvascular endothelial cell culture. *J Invest Dermatol* 1989; **93(2)**: 33S–38S.
- [21] KISS H, SCHNEEBERGER CH, TSCHUGGUEL W, LASS H, HUBER JC, HUSSLEIN P, KNOFLER M. Expression of endothelial (type III) nitric oxide synthase in cytotrophoblastic cell lines: regulation by hypoxia and inflammatory cytokines. *Placenta* 1998; **19**: 603–611.
- [22] KOJDA G, KOTTENBERG K. Regulation of basal myocardial function by NO. *Cardiovasc Res* 1999; **41**: 514–523.
- [23] LANE P, GROSS S. The autoinhibitory control element and calmoduline conspire to provide physiological modulation of endothelial and neuronal nitric oxide synthase activity. *Acta Physiol Scand* 2000; **168**: 53–63.
- [24] MARKEWITZ BA, MICHAEL JR, KOHAN DE. Endothelin-1 inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase. *Am J Physiol* 1997; **272**: L1078–L1083.
- [25] MICHEL T. Targeting and translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Braz J Med Biol Res* 1999; **32**: 1361–1366.
- [26] NADAUD S, BONNARDEAUX A, LATHROP M, SOUBRIER F. Gene structure, polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Biochem Res Commun* 1994; **198(3)**: 1027–1033.
- [27] NAPOLITANO M, MICELLI F, CALCE A, VACCA A, GULINO A, APA R, LANZONE A. Expression and relationship between endothelin-1 messenger ribonucleic acid (mRNA) and inducible/endothelial nitric oxide synthase mRNA isoforms from normal and preeclamptic placentas. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; **85**: 2318–2323.
- [28] PRASANNA G, KRISHNAMOORTHY R, HULET C, ZHANG X, YORIO T. Endothelin-1 induces nitric oxide synthase-2 expression in human non-pigmented ciliary epithelial cells. *Exp Eye Res* 2000; **71**: 535–539.
- [29] SCHENA M, MULATERO P, SCHIAVONE D, MENGOZZI G, TESIO L, CHIANDUSSI L, VEGILO F. Vasoactive hormones induce nitric oxide synthase mRNA expression and nitric oxide production in human endothelial cells and monocyte. *Am J Hyperten* 1999; **12**: 388–397.
- [30] SIMINIAK T, WYSOCKI H. Endoteliny. Część I. Synteza, receptory, efekty narządowe. *Przegl Lek* 1994; **51(12)**: 492–494.



- [31] SIMINIAK T, WYSOCKI H. Endoteliny. Część II. Udział endotelin w patogenezie choroby. *Przeegl Lek* 1994; **51(12)**: 527–529.
- [32] SOMA M, NAKAYAMA T, KANMATSUSE K. Nitric oxide synthase gene polymorphism and its influence on cardiovascular disease. *Curr Opin Nephrol Hyperten* 1999; **8**: 83–87.
- [33] SOUBRIER F. Nitric oxide synthase genes, candidate genes among many others. *Hypertension* 1999; **33**: 924–926.
- [34] STOCLET JC, MULLER B, ANDRIANTSITOHAINA R, KLESCHYOV A. Overproduction of nitric oxide in pathophysiology of blood vessels. *Biochemistry* 1998; **63(7)**: 826–832.
- [35] TANER CB, SEVERSON SS, BEST PJM, LERMAN A, MILLER VM. Treatment with endotelin-receptor antagonists increases NOS activity in hypercholesterolaemia. *J Appl Physiol* 2001; **90**: 816–820.

*Redaktor prowadzący – Maciej Zabel*

*Otrzymano: 25.02.2004 r.*

*Przyjęto: 12.05.2004 r.*

*ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań*

# MORFOLOGIA I FUNKCJA MITOCHONDRIÓW PLEMNIKA A MĘSKA PŁODNOŚĆ. CZĘŚĆ I. PRAWIDŁOWA MORFOLOGIA I FUNKCJA WSTAWKI PLEMNIKA\*

MORPHOLOGY AND FUNCTION OF SPERM MITOCHONDRIA  
AND MALE FERTILITY. PART I. NORMAL MORPHOLOGY  
AND FUNCTION OF SPERM MIDPIECE

Małgorzata PIASECKA

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Pomorskiej Akademii Medycznej  
Szczecin

*Streszczenie:* Mitochondria plemników są strukturami unikalnymi i nieco odmiennymi od mitochondriów somatycznych. Przechodzą one szereg morfologicznych, biochemicznych i molekularnych zmian związanych z ekspresją specyficznych białek strukturalnych i enzymatycznych, będących markerami ich dojrzewania podczas spermatogenezy. Należą do nich między innymi gonadalny cytochrom  $c_1$ , LDH-C<sub>4</sub>, oksydaza siarkowodorowa, proteaza LON i hsp60. Aktywina A wydzielana przez komórki Sertoliego, podczas spermiogenezy indukuje morfologiczne przemiany mitochondriów spermatyd, prowadzące do powstania skondensowanej struktury tych organelli. Natomiast białko *spergen-1* wydaje się odpowiedzialne za agregację i adhezję mitochondriów wokół formującej się witki wydłużającej się spermatydy. Dojrzałe mitochondria mają kształt wydłużony i zakrzywiony (półksiężycowaty), wykazują strukturę skondensowaną, z dużą ilością ciasno upakowanych grzebieni i charakterystycznymi przestrzeniami w ich obrębie. Każde mitochondrium otoczone jest unikalną białkową torebką, zawierającą strukturalne białka siarczkowe i selenowe (SMCP) oraz enzymatyczne (PHGPx) o charakterze antyoksydacyjnym. Powierzchnia mitochondriów plemników wykazuje zróżnicowanie strukturalne – specyficzne strukturalne specjalizacje (domeny) – zaangażowane w łączenie się przylegających do siebie mitochondriów. Umożliwiają one stabilne i helikalne połączenie się tych organelli swoimi końcami, jak i powierzchniami bocznymi. Połączone ze sobą mitochondria tworzą osłonkę mitochondrialną, która od strony wewnętrznej przytwierdzona jest do obwodowych włókien gęstych za pomocą siateczki należącej do cytoszkieletu wstawki plemnika. Specyficzna molekularna budowa białek mitochondrialnych i wzajemne połączenie mitochondriów czyni osłonkę mitochondrialną oporną na działanie czynników fizyko-chemicznych i sprawia, że funkcjonuje ona jak jedno organellum, dostarczające ATP do ruchu plemników.

\*Wszystkie prezentowane wyniki pochodzą z badań własnych przeprowadzonych w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii oraz w Zakładzie Patomorfologii Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie.



*Słowa kluczowe:* plemniki, mitochondria, białka mitochondrialne, spermiogeneza.

*Summary:* The sperm mitochondria are the unique organelles somewhat different from the somatic mitochondria. They undergo morphological, biochemical and molecular changes connected with the expression of the structural and enzymatic specific proteins which may be recognized as markers of their maturation during spermatogenesis. The markers among others include testicular cytochrome – cyt  $c_{IT}$ , LDH-C<sub>4</sub>, sulphhydryl oxidase, LON protease and hsp60. Aktivin A – product of Sertoli cells – influences the morphological changes of spermatyd mitochondria during spermiogenesis, causing the appearance of a condensed type mitochondria. In turn, spergen-1 protein might be responsible for assembly and adhesion of sperm mitochondria around the appearing flagellum of elongating spermatyd. The mature mitochondria are elongated and crescentic and display condensed type structure with many tightly packed mitochondrial cristae and characteristic intracristal spaces. Each mitochondrion is surrounded by a unique protein capsule containing structural selenoproteins, sulphoproteins (SMPC) and enzymatic protein (PHGPx) displaying antyoxidative ability. The surface of sperm mitochondria reveals domain specific structural specializations involved in connecting of adjacent mitochondria. The structural specializations of terminal as well as lateral surfaces of adjacent mitochondria enable the stable and helical connection of mitochondria. The joined mitochondria are assembled into an organized sheath. The mitochondrial sheath surface facing the outer dense fibers is joined to them by submitochondrial network of midpiece cytoskelcton complex. The molecular structure of specific mitochondrial proteins and connections of adjacent mitochondria result in mitochondrial sheath resistant to the action of physical and chemical factors. It makes the mitochondrial sheath act as the organellum providing ATP for sperm movement.

*Key words:* spermatozoa, mitochondria, mitochondrial proteins, spermiogenesis.

*Prace tę dedykuję  
mojemu nieżyjącemu już nauczycielowi  
Profesorowi dr hab. Janowi Michejdzie,  
który nauczył mnie poznawać fascynującą  
organelle – mitochondria*

Mitochondria plemnika, dzięki zdolności do produkcji energii, powstałej w procesie fosforylacji oksydacyjnej, umożliwiają ruch postępowy plemników, który pozwala na aktywną penetrację śluzu szyjkowego macicy i przedostanie się plemników dalej do jajowodu. Ponadto, energia produkowana przez mitochondria wykorzystywana jest do aktywnego transportu substratów przez błony, hyperaktywacji plemników i reakcji akrosomalnej, procesów niezbędnych podczas zapłodnienia [21,33,43,118]. Organella te, stają się przez to strukturami określającymi potencjał plemników do zapłodnienia komórki jajowej.

Hyperaktywacja plemników odbywa się w bańce jajowodu i jest częścią procesu uzdatniania plemników do zapłodnienia – kapacytacji. Wiąże się ona z bardzo intensywnym i specyficznym ruchem witki plemnika charakteryzującym się wysoką amplitudą i asymetrią odchylenia witki. Ruch ten generalnie nie jest postępowy, ale odbywa się w miejscu, ma na celu wzmocnienie zdolności plemników do oderwania się od ściany jajowodu i dalej przedostania się przez śluzową wydzielinę komórek nabłonkowych oraz pokonania przez nie skomplikowanego labiryntu błony śluzowej bańki jajowodu, aby w końcu dotrzeć do komórki jajowej otoczonej wieńcem promienistym (*corona radiata*) i osłonką przejrzystą (*zona pellucida*). Duży udział w

omawianej wędrowce plemników mają również skurcze miocytów gładkich jajowodu, wywołane prostaglandynami wydzielanymi między innymi przez pęcherzyki nasienne [19] oraz zjawisko chemotaksji plemników pod wpływem atraktantów występujących w płynie pęcherzykowym [27, 116]. Z kolei penetracja *corona radiata* i *zona pellucida* możliwa jest dzięki reakcji akrosomalnej (odbycie jej zależne jest od transportu jonów wapnia przez błonę otaczającą część akrosomalną główki plemnika), oraz dzięki ponownym intensywnym ruchom plemnika, umożliwiającym ostatecznie osiągnięcie przestrzeni okołozótkowej (*periviteline space*) i dalej przedostanie się plemnika do cytoplazmy komórki jajowej. Możliwe jest to wskutek fuzji ekwatorialnej części akrosomu i postakrosomalnej błony komórkowej plemnika z błoną komórki jajowej [19, 33, 43].

Energia niezbędna do zaistnienia opisywanych procesów musi być dostarczana przez mitochondria nieprzerwanie, bez zakłóceń, przy kooperacji wszystkich, mało „odpoczywających” mitochondriów wstawki plemnika. Możliwe jest to tylko dzięki morfologicznie i funkcjonalnie dojrzałym mitochondriom, które podczas spermatogenezy i dalej w najądrzu muszą przechodzić szereg morfologicznych, biochemicznych i molekularnych zmian czyniących je organellami unikalnymi, nieco odmiennymi od mitochondriów występujących w komórkach somatycznych [40, 42, 50, 84, 86, 92, 98, 102, 103]. Morfologiczno-funkcjonalne przemiany tych organelli – jak donoszą Meinhardt i wsp. [84] – są wyrazem zmieniającego się mikrośrodowiska podczas przechodzenia komórek germinalnych z części przypodstawnej kanalika krętego do jego części adluminalnej. Ma miejsce wtedy ekspresja specyficznych mitochondrialnych białek komórek plemnikotwórczych [21, 113]. Zakłócenie tych procesów prowadzi do dysfunkcji mitochondriów, której wyrazem jest najczęściej astenoteratozoospermia [87, 101, 108, 109].

## MITOCHONDRIA PLEMNIKA TWORZĄ OSŁONKĘ MITOCHONDRIALNĄ

### Różnicowanie się mitochondriów komórek plemnikotwórczych

Morfologiczna odmienność mitochondriów plemnika (*sperm type mitochondria*) dotyczy ich wielkości, kształtu, ultrastruktury i specyficznego rozmieszczenia w gamecie. Mają kształt wyraźnie zakrzywiony i liczne lamellarne grzebienie ciasno upakowane w obrębie macierzy mitochondrialnej. W obrazach mikroskopowo-elektronowych przypominają stopy ściśniętych lamelli. Obserwacje ultrastrukturalne ujawniają w mitochondriach dojrzałych plemników obecność niedużej ilości charakterystycznych jamek (ryc. 4B;6), które są poszerzonymi przestrzeniami w obrębie grzebieni, gdzie kontynuuje się przestrzeń międzybłonowa. Taka morfologia mitochondriów plemnika jest charakterystyczna dla organelli sprzężonych (skondensowanych) i jest efektem licznych morfologicznych i molekularnych przemian mitochondriów podczas różnicowania się okrągłej spermatydy w wydłużającą, co ma miejsce w spermiogenezie [21, 50, 52, 98, 113].

W plemnikach ssaków stwierdza się niewielkie ilości mitochondriów (50–100 w zależności od gatunku), zawierające jedną kopię mitochondrialnego DNA (mtDNA), w porównaniu z ich ilością w oocyocie (100000), czy też w komórkach somatycznych



(kilka tysięcy). Porównując jednak wielkość plemnika (60–250  $\mu\text{m}$  zależnie od różnic gatunkowych) z ilością mitochondriów w nim występujących, liczba tych organelli jest imponująca, gdyż stanowią one 80% jego objętości [3,21].

W spermatogoniach A rozrzucone w cytoplazmie mitochondria mają tendencję do skupiania się w oddzielne grupy zawierające 2–4 mitochondriów. Przylegające do siebie organelle połączone są cienką warstwą elektronowo-gęstego materiału (substancja cementująca) (ryc. 1A). W komórkach prekursorowych spermatyd – spermatocytach – mitochondria nadal gromadzą się w oddzielne grupy zawierające 3–6 mitochondriów [85], pomiędzy którymi widoczne są większe ilości elektronowo-gęstej substancji (ryc. 1B;2A,B) [52]. Natomiast w spermatocytach II-rzędowych organelle te występują już pojedynczo pomiędzy błonami cytoplazmatycznymi, a w okrągłych spermatydach zlokalizowane są obwodowo, blisko błony komórkowej (ryc. 2C,D). Ogólna liczba mitochondriów w spermatocytach i okrągłych spermatydach jest większa niż w dojrzewających, wydłużających się spermatydach i plemnikach uwalnianych z gonady. Podczas spermiogenezy, gdy następuje reorganizacja mitochondriów prowadząca do wytworzenia osłonki mitochondrialnej (*mitochondrial sheath*) (faza akrosomu spermiogenezy) mitochondria podlegają eliminacji wskutek ubiquitynacji [117,118] i wraz ze zbędną, odrzucaną cytoplazmą spermatydy stają się składnikiem ciał resztkowych fagocytowanych przez komórki Sertoliego (faza dojrzewania spermiogenezy) [50]. Ubikwityna wiąże się z białkami mitochondrialnymi, najprawdopodobniej z integralnym białkiem – prohibitiną (*prohibitin*) (30 kD), w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Ubikwitynowany epitop jest maskowany za pomocą wiązań dwusiarczkowych tworzonych podczas pasażu plemników przez najądrze. Uniemożliwia to dalszą degradację mitochondriów plemnika aż do momentu podziałów zapłodnionej komórki jajowej [117,118,119].

Początkowo, w spermatogoniach mitochondria mają jasną macierz („*orthodox type*”), w spermatocytach leptotenowych i zygotenowych wykazują morfologię pośrednią („*intermediate type*”), widoczne są wyraźne grzebienie mitochondrialne i poszerzona przestrzeń pomiędzy nimi (wakuolizacja mitochondriów, ryc. 1B;2A,B). Natomiast w spermatocytach pachytenowych macierz mitochondrialna wykazuje już większą gęstość elektronową – rozpoczyna się proces kondensacji tych organelli („*condensed type*”), który dalej kontynuuje się podczas różnicowania okrągłej spermatydy w wydłużającą (ryc. 1C;2C,D). W spermiogenezie wraz z procesem kondensacji mitochondriów równocześnie zmienia się wielkość i kształt mitochondriów. Organelle zmniejszają się i stają się bardziej wydłużone i zakrzywione (półksiężycowate), co związane jest ze spiralnym ich przebiegiem wokół obwodowych włókien gęstych i dopasowaniem się do wydłużającego się kształtu komórki. Grzebienie mitochondrialne są bardziej ściśnięte i upakowane, stąd brak już dużych przestrzeni pomiędzy nimi charakterystycznych dla mitochondriów spermatocytów (ryc. 1D,E;4;6) [50,52,113].

Dojrzewanie mitochondriów wymaga licznych czynników wyzwalających i regulujących morfologiczno-biochemiczne ich przemiany (*paracrine mitochondrial maturation factor*). Niektóre z nich wydzielane są przez komórki Sertoliego, które wchodzi w ścisłe interakcje z komórkami plemnikotwórczymi [21,85,113]. Meinhardt i wsp. [85] wykazali, że w warunkach *in vitro* białko aktywina A (*activin A*) – produkt

komórek Sertoliego – ma wyraźne działanie parakrynnie na różnicowanie się męskich komórek germinalnych. Aktywina A indukując morfologiczną transformację mitochondriów, wydaje się być odpowiedzialna za kondensację mitochondriów w spermatocytach pachytenowych i dalej w okrągłych spermatydach.

Nagromadzenie mitochondriów w proksymalnej części formującej się wstawki plemnika spermatydy odbywa się najprawdopodobniej dzięki białku *spergen-1* [24,25], kodowanemu przez gen należący do genów regulujących proces spermiogenezy (*spermatogenic cell-specific gene-1*) [24]. Badania immunocytochemiczne w mikroskopie elektronowym ujawniły obecność tego białka na powierzchni mitochondriów formującej się wstawki wydłużających się spermatyd szczura, jak i plemników izolowanych z jądra. Białko to (154 aminokwasów) na N-końcu zawiera mitochondrialną sekwencję (*mitochondria targeting signal*), która decyduje o przeznaczeniu tego białka do mitochondriów. *Spergen-1* spełnia rolę cząsteczki adhezyjnej decydującej o specyficznej agregacji mitochondriów, ich wzajemnym przyciąganiu i przyleganiu, prowadzącym do wytworzenia osłonki mitochondrialnej. Mitochondria z peryferycznych części spermatydy muszą być przetransportowane do jej środka – miejsca formującej się witki plemnika. Nagromadzenie mitochondriów wokół aksonemy i obwodowych włókien gęstych odbywa się w momencie przesunięcia pierścienia (*annulus*) i pierścieniowego ciała chromatoidalnego (*annular chromatoid body*) z części proksymalnej tworzącej się wstawki w jej kierunku dystalnym (ryc. 3) [21,52]. Przesunięcie tych struktur wyznacza nie tylko miejsce, ale i kierunek dla agregujących tam mitochondriów. Początkowo ilość mitochondriów nagromadzonych wokół obwodowych włókien gęstych i aksonemy jest niewielka, a ich rozmieszczenie nieuporządkowane.

Proces formowania się osłonki mitochondrialnej (faza akrosomu spermiogenezy) i jej dojrzewania (faza dojrzewania spermiogenezy) polega na nagromadzeniu odpowiedniej ilości mitochondriów, ich specyficznym helikalnym ułożeniu i utrzymaniu pozycji poszczególnych mitochondriów w jej obrębie, dzięki molekularnym zmianom mitochondrialnych białek błonowych, prowadzącym do wytworzenia specyficznych połączeń pomiędzy mitochondriami. Skupione ze sobą mitochondria łączą się nawzajem swoimi końcami, a następnie okręcają się wokół obwodowych włókien gęstych i aksonemy przebiegających wzdłuż tworzącej się wstawki i dalej witki plemnika [49,52,96,97,98]. U człowieka obserwuje się 11–15 skrętów mitochondriów [22]. W ten sposób powstaje uporządkowana spirala mitochondrialna. Może być ona pojedyncza, podwójna, potrójna i jeszcze bardziej skomplikowana, w zależności od gatunku [102]. Spiralnie połączone mitochondria łączą się ze sobą również swoimi powierzchniami bocznymi, tworząc w ten sposób osłonkę mitochondrialną, której wewnętrzna powierzchnia przytwierdzona jest do przylegających do niej obwodowych włókien gęstych (faza dojrzewania spermiogenezy) (ryc.4,5,6) [96,97,98].

Zakłócenie morfogenezy osłonki mitochondrialnej prowadzi do występowania zmniejszonej lub zwiększonej liczby mitochondriów rozmieszczonych w sposób nieuporządkowany w obrębie wstawki plemnika lub w drastycznych przypadkach do całkowitego lub częściowego braku osłonki mitochondrialnej (hypoplazja lub aplazja) i do uwolnienia z gonady niedojrzałych morfologicznie form plemników nie zdolnych, nawet po dojrzewaniu w najądrzu, do postępowego ruchu. Takie zaburzenia morfologiczne



występują w niektórych przypadkach astenoteratozoospermii (zmiany te są szeroko opisane w części II artykułu) i przeważnie powiązane są ze zmianami główki i akrosomu plemnika. Struktury te wykazują niejednokrotnie cechy morfologicznej niedojrzałości [9,87,88,95,101,108,109], co potwierdziły również wyniki badań własnych [104,105]. Ponadto zaburzenia te mogą być efektem zmian genetycznych [7], bowiem proces formowania się wstawki i witki plemnika, jak wykazano u myszy, jest kontrolowany genetycznie [106]. Zaburzenia te mogą być również związane z apoptozą różnicujących się spermatyd [34,91,105] oraz z zylakami powrózka nasiennego [6].

W plemnikach uwalnianych z gonady mitochondria mogą być otoczone jeszcze resztkową cytoplazmą spermatydy, która tworzy kroplę cytoplazmatyczną. Może ona zawierać, obok elementów ziarnistych, włóknistych i błoniastych, nadliczbowe zbyteczne mitochondria, które w takiej sytuacji są „ronione” do cytoplazmy [104,105]. Nie powinny one jednak wraz z cytoplazmą być obecne w ejakulowanych plemnikach. Odrzucenie kropli cytoplazmatycznej jest elementem dojrzewania plemników w najądrzu [20,120]. Obecność kropli w ejakulowanych plemnikach upośledza ich ruch, a występowanie jej w dużej liczbie plemników może być przyczyną astenoteratozoospermii [66,104,105,133].

#### Mitochondria osłonki mitochondrialnej funkcjonują jako jedno organellum

Rozmieszczenie i połączenie mitochondriów nie jest przypadkowe i związane jest z ruchem plemnika. Wydaje się, że helikalny układ mitochondriów umożliwia upakowanie dużej liczby zakrzywionych mitochondriów na stosunkowo małej przestrzeni wydłużonej struktury, jaką jest wstawka (ryc. 4B;5;6A,B). Długość plemników ludzkich wynosi 55–66  $\mu\text{m}$ , natomiast długość ich wstawki 3,5–5,0  $\mu\text{m}$ .

Joshi i wsp. [62], stosując mikroskop sił atomowych (*atomic force microscopy*), ustalili, że długość mitochondriów ludzkich wynosi 214,61 nm. Natomiast inni autorzy, za pomocą mikroskopu wykorzystującego promienie X (*X-ray microscopy*) wykazali, że ich średnica wynosi 0,15  $\mu\text{m}$  [127]. Wzajemne połączenie mitochondriów i ich przytwierdzenie do obwodowych włókien gęstych [96,97,98] stabilizuje pozycję poszczególnych mitochondriów w obrębie wstawki plemnika, uniemożliwia ich przemieszczanie się i powoduje, że osłonka mitochondrialna staje się oporna na mechaniczne uszkodzenia podczas intensywnego ruchu witki plemnika. Ponadto taka morfologia osłonki sprzyja wzajemnej kooperacji mitochondriów, które wszystkie razem funkcjonują jako jedno organellum i tworzą integralną całość. Umożliwia to z kolei stały i nieprzerwany dopływ energii dla ruchu plemnika, który ma decydujące znaczenie dla zapłodnienia komórki jajowej.

#### Powierzchnia mitochondriów wykazuje strukturę domenową

Unikalne rozmieszczenie i połączenie mitochondriów w dojrzałych plemnikach możliwe jest dzięki zróżnicowanym strukturalnie powierzchniom (domenom) tych organelli. W badaniach przeprowadzonych na plemnikach izolowanych z ogona najądrza dojrzałych płciowo chomików, Olson i wsp. [96,97,98] wykazali trzy morfologicznie i funkcjonalnie różne powierzchnie mitochondriów plemnika (*domain specific structural specialization*): 1) powierzchnia od strony błony komórkowej, bardzo wąska warstwa

cytoplazmy oddziela mitochondria od błony komórkowej; 2) powierzchnia styku końców sąsiednich mitochondriów, odległość pomiędzy nimi wynosi 5–6 nm i powierzchnie boczne przylegających do siebie mitochondriów; 3) powierzchnia od strony obwodowych włókien gęstych (ryc. 4,5,6). Poddając plemniki sonikacji lub stosując azot o odpowiednim ciśnieniu, w obrazach mikroskopowo-elektronowych Olson i wsp. [96] nie stwierdzili rozerwania osłonki mitochondrialnej ani uszkodzenia substruktury mitochondriów, natomiast ujawnili unikalne połączenia mitochondriów. Końce i powierzchnie boczne przylegających do siebie mitochondriów są ze sobą połączone za pomocą sieci elektronowo-gęstych mostków, występujących co 20 nm, które niekiedy można zaobserwować na preparatach przygotowanych w sposób konwencjonalny (ryc. 5). Brak takich połączeń pomiędzy błoną komórkową a przylegającą do niej powierzchnią mitochondriów sugeruje, że ten typ połączenia związany jest tylko z określoną domeną mitochondriów. Z kolei dodatkowe jeszcze traktowanie plemników związkami redukującymi (np. DDT – dithiothreitol) i podwyższenie pH medium inkubacyjnego pozwoliło autorom [96] w pełni zaobserwować substrukturę połączenia mitochondriów z obwodowymi włóknami gęstymi. Powierzchnia mitochondriów od strony obwodowych włókien gęstych jest do nich przytwierdzona za pomocą sieci należącej do cytoszkieletu wstawki plemnika (*submitochondrial reticulum, midpiece specific cytoskeletal complex*). To wyspecjalizowane połączenie ma strukturę parakrystaliczną i zbudowane jest z równoległych ułożonych prążków, występujących co 30–32 nm.

Zróznicowane strukturalnie domeny powierzchniowe mitochondriów są najprawdopodobniej wynikiem występowania różnych białek w odmiennych obszarach zewnętrznej błony mitochondrialnej. Nie wszystkie białka zostały zidentyfikowane. Pełnią one jednak istotną rolę w utrzymaniu odpowiedniej morfologii i dalej, funkcji osłonki mitochondrialnej, która między innymi określa zdolność plemników do zapłodnienia.

### Białka zewnętrznej błony mitochondrialnej tworzą unikalną torebkę mitochondrialną

Zewnętrzna błona mitochondriów plemnika różni się właściwościami fizykochemicznymi od błony mitochondriów komórek somatycznych. Oporna jest na działanie detergentów i trypsyny [55,102], a także nie pęcznieje w roztworach hypotonicznych [103]. Ta ostatnia cecha umożliwia badanie oddychania mitochondriów w roztworach hypotonicznych, w których dochodzi do przerwania błony komórkowej plemnika i odsłonięcia nienaruszonej osłonki mitochondrialnej. Podobny efekt można uzyskać stosując antybiotyk polienowy – filipin, uwalniający białka z błony komórkowej [56]. Zabiegi te są niezbędne, aby udostępnić mitochondria dla substratów egzogennych, dla których błona komórkowa stanowi istotną barierę [58,103].

Siarko- i selenoproteiny – białka zawierające grupy sulfhydrylowe (tiolowe, SH) i selenowe (SeH) – występują licznie w zewnętrznej błonie mitochondrialnej [1,5,17,18,-123]. Związki te podlegają molekularnym przemianom, częściowo już podczas spermatogenezy, ale przede wszystkim podczas dojrzewania plemników w najądrzu. Procesy te prowadzą do utleniania grup tiolowych i selenowych i wytworzenia wiązań kowalencyjnych pomiędzy atomami siarki lub selenu, co powoduje powstanie licznych



mostków siarczkowych, selenowych i mieszanych (S-S, Se-Se, S-Se) [10]. Obecność takich wiązań właśnie czyni błonę oporną na działanie różnych czynników fizykochemicznych, na które plemnik może być narażony podczas swojej długiej wędrówki przez męskie drogi płciowe i żeńskie drogi rodne. Taka oporność zewnętrznej błony mitochondrialnej spełnia również funkcję protekcyjną w stosunku do wewnętrznej błony, która w takim przypadku jest skutecznie chroniona. W warunkach fizjologicznych, zmiany w obrębie błon mitochondrialnych występują jedynie w starych, degenerujących plemnikach i są przyczyną zaburzeń energetycznych tych organelli, prowadzących do dyskinezy plemników [55,102].

Białka występujące w zewnętrznej błonie mitochondrialnej tworzą unikalną, indywidualną dla każdego mitochondrium, białkową torebkę mitochondrialną (*keratinous capsule of sperm mitochondria*). Pallini i wsp.[99] wykazali w niej, w przypadku mitochondriów buhaja, trzy polipeptydy o ciężarze 31, 29 i 20 kD. Białko 20 kD, które również identyfikowane jest jako białko 17 kD [17], bogate jest w cysteinę (17,9%) i prolinę (26,5%). Znane jest ono pod nazwą SMCP (*Sperm Mitochondria-associated Cysteine-rich Protein*) [2,49,92] lub MCP (*Mitochondrial Capsule Protein*), MCS (*Mitochondrial Capsule Selenoprotein*) [1] i spełnia istotną rolę strukturalną. Zgodnie z sugestią Herr i wsp. [49] białko to odpowiedzialne jest za pogrubienie zewnętrznej błony mitochondrialnej, utrzymanie kształtu i pozycji mitochondriów w osłonce mitochondrialnej. Ponadto, SMCP identyfikowane jest jako auto- i izoantigen plemnika [49].

W latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku sklonowano i ustalono sekwencję genu dla SMCP (gen *Smcp*) myszy, szczura i człowieka [1,2,68]. Stosując *Southern blotting* wykazano, że gen ten występuje w pojedynczej kopii w komórkach haploidalnych linii spermatogenicznej. U myszy zlokalizowany jest w chromosomie 3, u szczura w 2, a u człowieka w 1. Zawiera on dwa eksony i jeden intron. Wykazuje swoją ekspresję w mejozie i dalej we wczesnych okrągłych spermatydach, jeszcze przed ekspresją genu dla protaminy 1 [1,68]. Na podstawie wyników *Northern blotting* i hybrydyzacji *in situ* stwierdzono obecność transkryptu genu *Smcp* w spermatocytach i w okrągłych spermatydach [1]. Karimpour i wsp. [63] donoszą, że białko tego genu zawiera 197 aminokwasów, a jego ciężar wynosi 21 kD. Adham i wsp. [1] natomiast ustalili, że cDNA genu *Smcp* szczura koduje 145 aminokwasów (15,8 kD), co zgodne jest z wcześniejszymi wynikami Kleene i wsp. [68], którzy wykazali 143 aminokwasy.

SMCP przez wiele lat rozważane było jako białko zawierające selen [1,17,68]. Zawartość selenu w tym białku wydaje się jednak problematyczna. Stwierdzono bowiem brak kodonu UGA dla selenocysteiny w ramce odczytu dla genu *Smcp* [1,18], co może sugerować postranslacyjne włączanie selenu do polipeptydu [68]. Badania z wykorzystaniem izotopu <sup>75</sup>Se ujawniły niewielką inkorporację selenu do MCS mitochondriów spermatocytów pachytenowych i okrągłych spermatyd szczura, natomiast intensywne włączanie tego pierwiastka do MCS w wydłużających się, dojrzewających spermatydach [17].

Białkiem zawierającym selen, pełniącym funkcję enzymatyczną i strukturalną, współuczestniczącym w tworzeniu mitochondrialnej torebki, identyfikowanym często jako SMCP, jest enzym należący do grupy peroksydaz glutationowych – PHGP<sub>x</sub> (*selenoprotein Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase*, 20 kD). Białko to redukuje nadtlenki fosfolipidów powstałe podczas ich peroksydacji oraz ma zdolność

redukcji nadtlenu wodoru, co chroni błonę przed agresywnym działaniem wolnych rodników powstałych między innymi w łańcuchu oddechowym mitochondriów lub podczas stresu tlenowego [39,57,74,79,107,110,121,123]. Ze względu na swoją antyoksydacyjną funkcję PHGP<sub>x</sub> może być traktowana jako czynnik zapobiegający apoptozie spermatocytów i spermatyd [89,93]. Ponadto enzym ten wykazuje aktywność peroksydazy białek tiolowych. Utleniając, w obecności nadtlenu wodoru, grupy SH w białkach plemnika, w tym budujących torebkę mitochondrialną, przyczynia się do powstania kowalencyjnych wiązań S-S, co decyduje o molekularnej strukturze torebki mitochondrialnej i związane jest z ostatecznym dojrzewaniem białek plemnika, niezbędnym dla prawidłowej ich funkcji [79,110,123]. W dojrzałych plemnikach PHGP<sub>x</sub> występuje z reguły w formie związanej z błoną, gdyż zakotwicza się w zewnętrznej błonie mitochondrialnej i stanowi 50% białek indywidualnej torebki mitochondrialnej [123]. Z powodu swojej lokalizacji i strukturalnej funkcji PHGP<sub>x</sub> jest czynnikiem określającym fizjologię plemników, decydującym o ich ruchu [30,57,89,123].

W gamecie męskiej wyróżnia się formę enzymu cytozolową (cPHGPx), mitochondrialną (mPHGPx) i jądrową (nPHGPx). Dwie pierwsze z nich powstają wskutek alternatywnego splicingu pre-mRNA, natomiast forma jądrowa najprawdopodobniej jest efektem alternatywnej transkrypcji, gdyż stwierdza się dwa osobne odcinki promotorowe w obrębie genu peroksydazy glutationowej [80,107].

Transkrypt dla mPHGPx to mitochondrialny typ mRNA, który zawiera sekwencję (*mitochondrial transfer leader sequence*) przeznaczającą białko do kompartmentu mitochondrialnego [86]. Stosując RT-PCR, *Northern blotting*, hybrydyzację *in situ*, *Western blotting*, analizę immocytochemiczną i immunofluorescencyjną, transkrypt i białko genu PHGP<sub>x</sub> wykryto w gonadzie szczurów, w spermatocytach pachytenowych, okrągłych i wydłużających się spermatydach oraz plemnikach najądrzowych, a także w ejakulowanych plemnikach ludzkich [39,47,57,86,90,107,117,121]. Sugeruje się, że zawartość mRNA dla PHGP<sub>x</sub> może mieć decydujące znaczenie dla funkcji mitochondriów plemników [86]. Trudno jednak zrozumieć obecność i rolę mRNA w plemnikach, w których nie stwierdza się translacji.

W komórkach plemnikotwórczych, PHGPx występuje na terenie ich jądra komórkowego, szczególnie związane jest z elektronowo-jasną nukleoplazmą i otoczką jądrową, w obrębie ich mitochondriów, agregatów mitochondrialnych, substancji spajającej mitochondria (*intermitochondrial cement*) i akrosomu. [47,107,121]. Ponadto PHGP<sub>x</sub> stwierdza się w ciałach chromatoidalnych, ciałach resztkowych, ziarnistościach i wakuolach komórek linii spermatogenicznej [47,121]. Pojawienie się PHGP<sub>x</sub> na terenie gonady szczura i jego dystrybucja w określonych kompartmentach komórek plemnikotwórczych i plemnika zależna jest od stadiów cyklu nabłonka plemnikotwórczego, szczególnie od stopnia różnicowania się spermatyd podczas spermiogenezy [47]. Może być regulowana hormonalnie i zależna jest od wieku zwierzęcia [121], co wskazuje na istotną funkcjonalną i strukturalną rolę tego enzymu podczas spermatogenezy [80,107].

Jako aktywny enzym, PHGPx funkcjonuje w spermatocytach i spermatydach [79,107,123], natomiast staje się enzymatycznie nieaktywne w dojrzałych plemnikach [110,123], w których odgrywa jedynie rolę strukturalną, niemniej jednak dla ruchu



plemników bardzo ważną [30,57,89,123]. Wydaje się, że ta biologiczna transformacja białka ma miejsce podczas dojrzewania wydłużających się spermatyd i dalej w trakcie dojrzewania plemników w najądrzu. Związana jest z wytworzeniem się poprzecznych wiązań pomiędzy grupami tiolowymi aminokwasów [12,79,110].

Czas i miejsce aktywności PHGP<sub>x</sub> pozostaje jednak kwestią otwartą. Niektórzy autorzy stwierdzili aktywność omawianej peroksydazy w mitochondriach plemników najądrzowych szczura [39,121], jak również w ejakulowanych plemnikach ludzkich [30]. Ponadto, wykazano aktywność PHGP<sub>x</sub> w akrosomie i chromatynie plemnika [39,107,121]. W tym ostatnim przypadku enzym ten utlenia zredukowane grupy siarczkowe (SH) protamin chromatyny i poprzez wytworzenie wiązań S-S przyczynia się do silnego jej upakowania [39]. Zmniejszenie ekspresji i aktywności PHGP<sub>x</sub> w plemnikach ma swój wyraz kliniczny i prowadzi do niepłodności [30,57,89,123], co jest dyskutowane w części II artykułu.

### Dojrzałe mitochondria plemnika wykazują odmienne stany morfologiczne

Stan morfologiczny mitochondriów i ich wzajemne połączenie może podlegać fizjologicznym zmianom, jakie mają miejsce podczas procesu kapacytacji odbywającego się w jajowodach, tuż przed zapłodnieniem. Kapacytacja – jak wspomniano wcześniej – związana jest z przygotowaniem plemnika do zapłodnienia [33]. Obejmuje zmiany w ruchu plemnika prowadzące do jego hyperaktywacji [43]. Ponadto dotyczy szeregu molekularnych zmian błony komórkowej plemnika, zwłaszcza w obrębie główki, które związane są z wpływem cholesterolu, pojawieniem się lektyn czy też odstonięciem receptorów błonowych plemnika odpowiedzialnych za połączenie się obu gamet. Innymi procesami, jakie mają miejsce podczas kapacytacji, są również zmiany stężenia jonów wewnątrzkomórkowego wapnia, wymagane do odbycia reakcji akrosomalnej [33]. Procesy te związane są z dostarczeniem ATP przez mitochondria plemnika. Można przypuszczać, że wraz z transformacją morfologiczną mitochondriów zmienia się ich stan energetyczny niezbędny podczas kapacytacji. Vorup-Jensen i wsp. [127] stosując mikroskop wykorzystujący promienie X wykazali dwa odmienne morfologicznie stany osłonki mitochondrialnej ludzkich ejakulowanych plemników, poddanych kapacytacji w warunkach *in vitro*. Mitochondria plemników kapacytowanych są luźno ze sobą połączone, mogą pomiędzy nimi występować przerwy, są obrzmiałe i większe w porównaniu ze ściśle upakowanymi i mniejszymi mitochondriami plemników ejakulowanych. Wynika z tego, że rozmiary osłonki mitochondrialnej zmieniają się w zależności od warunków fizjologicznych, w jakich znajdują się plemniki. Mniejsza objętościowo osłonka mitochondrialna jest typowa dla plemników ejakulowanych, natomiast poszerzona, bardziej wypukła dla kapacytowanych. Niemniej jednak, oba stany morfologiczne można zaobserwować w ejakulowanych plemnikach. Odsetek plemników ejakulowanych z luźno upakowanymi mitochondriami jest niewielki (około 13%) [127] i jak wydaje się może zmieniać się w zależności od rutynowych parametrów nasienia. Pojawienie się dużej ilości takich plemników w ejakulacie nie jest zjawiskiem dobrze rokującym i może być powodem braku koncepcji. Zdolność mitochondriów do transformacji morfologicznej można przyrównać do zdolności

plemników do odbycia reakcji akrosomalnej. Obecność w ejakulacie dużego odsetka plemników, które spontanicznie odbyły reakcję akrosomalną, może być przyczyną niepłodności [130]. Z obserwacji własnych, wykonanych w mikroskopie elektronowym skaningowym wynika, że ejakulat ludzki zawiera plemniki z mniej lub bardziej wyraźną wstawką, która w niektórych przypadkach wydaje się większa, jakby bardziej widoczna, ale niezdeformowana (część II ryc.2B), w porównaniu z tymi objętościowo mniejszymi wstawkami (część II ryc. 2A) i tymi, które zawierają ewidentne defekty morfologiczne (część II ryc. 2C,D ).

## BIĄŁKA MITOCHONDRIOW PLEMNIKA

Odmienność mitochondriów plemnika dotyczy nie tylko ich morfologii, ale także obecności w nich specyficznych białek strukturalnych i enzymatycznych, innej często kompozycji substratów energetycznych niezbędnych dla ich oddychania i nieco innej wrażliwości mitochondriów na inhibitory łańcucha oddechowego [40,42,50,86,-92,98,103]. Z białek strukturalnych występujących w mitochondriach plemnika wyróżnia się SMCP tworzące keratynową kapsułę/torebkę w obrębie zewnętrznej błony mitochondrialnej [92] szczegółowo dyskutowaną powyżej. Ponadto błona ta zawiera między innymi białka tworzące kanał VDAC2 [51]. Innymi charakterystycznymi białkami zaangażowanymi w sygnalizację wewnątrzkomórkową lub białkami enzymatycznymi zasługującymi na uwagę, czy też białkami będącymi markerem dojrzewania mitochondriów plemników są: S-AKAP 84, LDH-C<sub>4</sub> (LDH<sub>x</sub>), cytochrom c, oksydaza sulfhydrylowa, proteaza zależna od ATP i hsp 60 [32,42,50,69,83,89,113].

### VDAC

VDAC (*voltage-dependent anion channel*) w mitochondriach komórek somatycznych, oprócz w transport ADP/ATP, kreatyny i innych małych molekuł do mitochondriów, jest zaangażowany w uwalnianie cytochromu c wyzwalającego aktywację kaspaz podczas apoptozy. W homogenatach jąder buhaja stwierdza się obecność mRNA dla VDAC2 (*porin-2*) [51], co wskazuje na ekspresję genu VDAC2. Na skrawkach histologicznych jąder, metodą immunocytochemiczną, w późnych spermatocytach, okrągłych i wydłużających się spermatydach oraz w izolowanych z najądrza buhaja plemnikach, wykazano ekspresję białka VDAC2. Natomiast ekspresję VDAC1 stwierdzono w komórkach somatycznych nabłonka plemnikotwórczego – komórkach Sertoliego [51]. Hinsch i wsp. [51] sugerują, że VDAC2 zaangażowany jest raczej w bioenergetykę komórek plemnikotwórczych i plemników niż w proces apoptozy, gdyż ekspresja tego białka ma miejsce głównie podczas mejozy, a nie podczas proliferacji spermatogonii, które w warunkach prawidłowych w 50% podlegają programowanej śmierci [81,111,115]. Wydaje się jednak, że nie można wykluczyć udziału VDAC2 w apoptozie komórek germinalnych. Cechy komórek apoptotycznych mogą wykazywać zarówno spermatocyty, jak i spermatydy na różnym stopniu ich różnicowania, a także ejakulowane plemniki [34,71,111,112,114].



## S-AKAP84

Innymi czynnikami mitochondrialnymi odgrywającymi rolę w procesie spermatogenezy i najprawdopodobniej zaangażowanymi w proces apoptozy komórek plemnikotwórczych są białka AMY-1 (*associate of myc-1*, białko stymulujące transkrypcję *c-myc*) i S-AKAP84 (*cAMP-dependent protein kinase anchor protein* – wariant splicingu AKAP149). Białko AKAP jest białkiem kotwiczącym kinazy A (PKA, *cAMP-dependent protein kinase*) [32,75,122]. Furusawa i wsp. [32] wykazali ekspresję kompleksu AMY-1/ AKAP149 w mitochondriach ludzkich komórkach HeLa, natomiast AMY-1/S-AKAP84 w spermatocytach i w plemnikach. AKAP149 występuje w mitochondriach komórek somatycznych, natomiast S-AKAP84 wykazuje swoją ekspresję na terenie gonady męskiej [75,122]. Sugeruje się, że rola AMY-1 podczas spermatogenezy jest niezależna od ekspresji *c-myc* i do końca nie jest jeszcze wyjaśniona. Białko AKAP transportuje PKA do miejsc, w których kinazy te dokonują fosforylacji białek docelowych. Jednym z tych białek jest BAD – białko proapoptotyczne. Mitochondrialna fosforylacja BAD powoduje jego inaktywację. Transportowana do cytoplazmy nieaktywna forma BAD wiążąc się z innymi białkami powoduje powstanie aktywnej formy białka Bcl-XL, czynnika z kolei antyapoptotycznego [46]. Furusawa i wsp. [32] podają, że nadekspresja *Myc-1* u transgenicznych myszy powoduje niepłodność, najprawdopodobniej poprzez upośledzenie apoptozy uszkodzonych komórek plemnikotwórczych, z powodu nadmiernej fosforylacji BAD przez PKA.

## Gonadalny cytochrom c

Cyt  $c_T$  (*testicular cytochrome* – cyt  $c_T$ ) jest specyficznym składnikiem łańcucha oddechowego mitochondriów komórek plemnikotwórczych. Podobnie jak cytochrom c występujący w komórkach somatycznych (cyt  $c_s$ ) zlokalizowany jest w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów i uczestniczy on w przekazywaniu elektronów z kompleksu III na IV łańcucha oddechowego. Po raz pierwszy został opisany w nabłonku plemnikotwórczym myszy [48]. Gen cyt  $c_T$  u myszy zlokalizowany jest na chromosomie 2, podczas gdy gen cyt  $c_s$  na chromosomie 6 [45]. Geny różnią się liczbą, wielkością i pozycją intronów [125]. Gen cyt  $c_T$  zawiera 4 eksony i 3 introny, a gen cyt  $c_s$  tylko 1 intron. Ponadto, różnica najprawdopodobniej związana jest ze specyficzną ekspresją na poziomie transkrypcji. Dla obu białek, w gonadzie męskiej, stwierdza się alternatywne mRNA będące wariantami splicingu [44]. Apoproteina cyt  $c_T$  i cyt  $c_s$  zawiera 104 aminokwasy. Oba białka różnią się tylko 14 aminokwasami.

Oba typy cytochromu koegzystują jednocześnie w różnicujących się i dojrzewających spermatocytach i spermatach. Cyt  $c_T$  wykazuje swoją zwiększoną ekspresję podczas spermatogenezy w profazie pierwszego podziału mejozytycznego spermatocytów I-rzędowych, obok zmniejszonej ekspresji cyt  $c_s$ . Ekspresja zarówno mRNA cyt  $c_T$ , jak i jego białka wyraźnie jednak wzrasta podczas mejozy i dalej spermiogenezy [50]. Stosując metodę immunocytochemiczną Hess i wsp [50] wykazali cyt  $c_T$  u szczura, w spermatocytach zygotenowych i pachytenowych, spermatach oraz w ciałkach chromatoidalnych spermatach. Ponadto, cytochrom ten występował w mitochondriach odrzucanej cytoplazmy spermatydy oraz w

ciałach resztkowych powstających z tej odrzucanej zbytecznej cytoplazmy wraz z organellami [50]. Ekspresja tego białka w zbytecznej cytoplazmie i ciałach resztkowych niewątpliwie jest efektem redukcji liczby mitochondriów podczas różnicowania się okrągłej spermatydy w wydłużającą i jest jednocześnie dowodem, że nadmiar mitochondriów jest odrzucany.

Synteza cyt  $c_T$  ma miejsce najprawdopodobniej w ciałach chromatoidalnych w spermatocytach I-rzędowych. Apoproteina cyt  $c_T$  z tych specyficznych organelli, zgodnie z sugestią Hess i wsp. [50], jest importowana do przestrzeni międzybłonowej mitochondriów, w której następuje dołączanie hemu cytochromu c za pomocą liazy hemu cytochromu c, co związane jest z powstaniem funkcjonalnej formy cyt  $c_T$ . Nagromadzenie cyt  $c_T$  w mitochondriach różnicujących się komórek plemnikotwórczych przebiega równolegle z ich zmianami ultrastrukturalnymi mającymi miejsce podczas mejozy i spermiogenezy, prowadzącymi do powstania skondensowanego typu mitochondriów [50].

Brak cyt  $c_T$ , jak wykazano w badaniach doświadczalnych, powoduje liczne morfologiczne zmiany na terenie gonady męskiej, prowadzące do obniżonej płodności [91]. Narisawa i wsp. [91] u homozygotycznych myszy (*testis specific cytochrome c-null mice*) z brakującym genem cyt  $c_T$  wykazali wczesną atrofię ich gonad i obniżoną zdolność ich plemników do zapłodnienia komórki jajowej. Ponadto stwierdzono mniejszą ruchliwość plemników izolowanych z ogona najądrza, co sugerowało upośledzenie fosforylacji oksydacyjnej. Kanaliki kręte myszy z inaktywowanym genem cyt  $c_T$  zawierały mniejszą liczbę spermatocytów, spermatyd i plemników. Zgodnie z sugestią autorów, redukcja liczby wymienionych komórek germinalnych, mogła być efektem ich wzmożonej apoptozy, bowiem w nabłonku plemnikotwórczym zidentyfikowano, za pomocą reakcji TUNEL, liczne komórki z pofragmentowanym jądrem. Wynika z tego, że komórki plemnikotwórcze zawierające uszkodzone mitochondria mogły być eliminowane w drodze apoptozy.

#### Dehydrogenaza mleczanowa: LDH-C<sub>4</sub>

LDH-C<sub>4</sub> jest specyficznym izoenzymem dla komórek linii spermatogenicznej [13,15,40,42,72]. Zbudowany jest z 4 protomerów C, odmiennych od A i B, budujących pozostałe izoenzymy w komórkach somatycznych [14,41,42]. Białko to, podczas spermatogenezy, wykazuje swoją ekspresję dopiero w cytoplazmie spermatocytów pachytenowych i spermatyd, a także w matriksie dojrzewających mitochondriów (*sperm type mitochondria*) wydłużającej się spermatydy [15,131]. Pojawienie się LDH-C<sub>4</sub> w kondensujących się mitochondriach spermatyd związane jest z funkcjonalnymi zmianami mitochondriów podczas spermiogenezy.

Zhong i wsp. [131] starali się ustalić, czy gen LDH-C<sub>4</sub> należy do transpozonów włączanych do genomu komórek germinalnych za pomocą odwrotnej transkryptazy. W badaniach przeprowadzonych na myszach, autorzy stwierdzili, że gen ten występuje w pojedynczej kopii. W cytoplazmie wcześniej wymienionych komórek spermatogenicznych wykazano kopie cDNA, powstałe dzięki aktywności odwrotnej transkryptazy. Nie są one jednak włączane do genomu komórek germinalnych [131].



W plemnikach LDH-C<sub>4</sub> występuje we wstawce i witce, w obrębie ich błony komórkowej, cytoplazmy i mitochondriów. Enzym ten identyfikowany jest również w plazmie nasienia. Ze względu na swoją molekularną, funkcjonalną i immunologiczną odmienność, LDH-C<sub>4</sub> jest także autoantygenu plemników [13,14,15,23,35,36,61,72]. Epitop LDH-C<sub>4</sub> odpowiedzialny za immunizację zlokalizowany jest w N-terminalnym końcu białka [13].

Dystrybucja LDH-C<sub>4</sub> w obrębie plemnika oraz jego istotna rola w ich energetycznym metabolizmie i kapacytacji jest przedmiotem intensywnych badań w kontekście męskiej niepłodności [40,42,59,60,94] i antykoncepcji [23]. Ze względu na swoją unikalną mitochondrialną lokalizację, związany jest z tlenowym utlenianiem substratów energetycznych [11,15,40,59]. Utleniając w cytoplazmie lub w mitochondriach mleczan, do którego wykazuje silne powinowactwo i specyficzność, oraz utleniając  $\alpha$ -hydroksykwas – pochodne rozgałęzionych aminokwasów, dostarcza równoważników redukcyjnych (NADH) dla łańcucha oddechowego, przyczyniając się w ten sposób do podtrzymania fosforylacji oksydacyjnej, źródła ATP dla ruchu plemników [11,29,40,58,60]. Ponadto, wydaje się, że wraz z diaforazą/NADH (oksydoreduktazy/NADH), odnoszoną do flawoprotein, które współpracują z łańcuchem oddechowym [4], LDH-C<sub>4</sub> utrzymuje prawidłowy stosunek mleczan/pirogronian. Enzym ten, w ten sposób kontroluje stosunek NADH/NAD i przez to, obok oksydoreduktaz zależnych od NADH, utrzymuje homeostazę oksydoredukcyjną [11,29]. Plemniki gromadzone w ogniu najądra utleniają bezpośrednio mleczan pobrany z krwi lub produkują go z glukozy dostarczanej również przez krew. Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku ejakulowanych plemników i tych, które znalazły się w żeńskich drogach rodnych. Substraty energetyczne są w tej sytuacji wydzielane przez gruczoły dodatkowe męskiego układu płciowego oraz przez komórki nabłonkowe macicy czy jajowodu [59].

### Markery dojrzewania mitochondriów komórek germinalnych

Obok cyt c<sub>t</sub> innymi specyficznymi białkami pojawiającymi się podczas spermatogenezy są oksydaza sulfydrylowa (*FAD-dependent sulfhydryl oxidase Erv1p/Alrp*) [69], proteaza LON (*ATP-dependent mitochondrial matrix enzyme – LON protease*) [113] oraz hsp60 białko szoku termicznego (*heat shock protein*) należące do chaperonów – białek opiekuńczych [82].

**Oksydaza sulfhydriolowa** utleniając grupy sulfhydriolowe białek powoduje powstanie mostków dwusiarczkowych, co związane jest z molekularną transformacją białek tak enzymatycznych, jak i strukturalnych. Kofaktorami reakcji utleniania są tlen i FAD. Oksydaza sulfhydriolowa Erv1p/Alrp należy do nowej rodziny białek oksydoredukcyjnych ALR (*augmenter of liver regeneration*), które w zależności od długości molekularnych form pełnią różnorodne funkcje i mają różną narządową lokalizację [38,76,77]. Odgrywają one specyficzną rolę w regeneracji wątroby (15 kD) [128] i występują również w tkankach pozawątrobowych [70]. Mogą być traktowane jako czynniki wzrostu i cytokiny, uczestniczące we wzroście i różnicowaniu komórek, w molekularnych zmianach błon mitochondrialnych i komórkowych, a także w tworzeniu

substancji międzykomórkowej [26,73]. W warunkach fizjologicznych enzym Alrp (długa forma 23 kD) w postaci dimeru zlokalizowany jest w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów i uczestniczy w biogenezie białek zawierających centra Fe/S. W ten sposób uczestniczy w komórkowej homeostazie żelaza [70].

Oksydaza sulfhydrylowa (23 kD) została zidentyfikowana w nabłonku plemnikotwórczym [69,113]. Klissenbauer i wsp. [69] wykazali największą immunocytochemiczną ekspresję tego białka we wczesnych stadiach spermatogenezy myszy, w mitochondriach spermatogonii i pierwszorzędowych spermatocytów, natomiast niewielką w mitochondriach spermatyd i plemników. Inni autorzy [113] enzym ten wykazali przede wszystkim w kondesujących się mitochondriach spermatocytów pachy-tenowych i spermatyd. Ekspresja enzymu nie była jednoczesna z ekspresją składników łańcucha oddechowego (np. Vb podjednostki oksydazy cytochromowej lub cytochromu c). Wydaje się, że w przypadku komórek plemnikotwórczych omawiana oksydaza sulfhydrylowa nie tyle uczestniczy w fosforylacji oksydacyjnej, ile odgrywa raczej istotną rolę w molekularnym dojrzewaniu błon mitochondrialnych, związanym z powstaniem kowalencyjnych wiązań S-S w ich integralnych białkach. Enzym ten, przyczynia się w ten sposób do morfologicznych i funkcjonalnych zmian mitochondriów komórek plemnikotwórczych, które są niezbędne w dojrzewaniu białek osłonki mitochondrialnej plemników.

Inna istotna rola Erv1p/Alrp podczas spermatogenezy – sugerowana przez Klissenbauer i wsp. [69] – dotyczy biogenezy zarówno białek mitochondrialnych, jak i cytozolowych zawierających centra Fe/S, podobnie jak w przypadku komórek somatycznych [70]. Synteza tych białek odbywa się niezależnie od syntezy białek łańcucha oddechowego. W tym przypadku oksydaza sulfhydrylowa może być częścią skomplikowanej maszyny odpowiedzialnej za nagromadzenie i dojrzewanie białek enzymatycznych i regulatorowych zawierających Fe/S (*iron/sulphur cluster – ISC – assembly machinery*) [65,67].

**Zależna od ATP, mitochondrialna proteaza LON**, obok peptydaz procesorowych i chaperonów, zaangażowana jest w autonomiczny proces degradacji białek mitochondrialnych, związany z biogenezą mitochondriów, podtrzymaniem oddychania i utrzymaniem homeostazy tych organelli. Ze względu na swoją istotną rolę jest konserwatywna ewolucyjnie. Białka LON kodowane są na genomie jądrowym, a następnie importowane do mitochondriów. Mogą być indukowane szokiem termicznym. Ekspresję transkryptu proteaz LON rejestrowano w wątrobie, sercu, nerkach i gonadzie męskiej, a także podczas wczesnych etapów rozwoju embrionalnego [8,14,64,78,124].

Proteazy, zależne od ATP, mogą być związane z błoną, jak również są enzymami rozpuszczalnymi, zlokalizowanymi w różnych subkompartamentach mitochondriów, a nawet wiążą się z miejscami promotorowymi pojedynczej nici mtDNA. Ludzka LON proteaza potrafi rozpoznać bardzo podobne miejsca promotorowe, związane z regulacją replikacji i transkrypcji, zarówno w lekkim, jak i ciężkim łańcuchu mtDNA [31,124].

LON proteazy kontrolują jakość i poziom specyficznych mitochondrialnych białek strukturalnych, enzymatycznych i regulatorowych, poprzez usuwanie niezłożonych i niezwinionych polipeptydów i białek krótko żyjących zarówno tych syntetyzowanych w mitochondriach, jak i mitochondrialnych kodowanych na genomie jądrowym. Zapewnia



to integralność, ekspresję genomu mitochondrialnego i odpowiedni poziom nagromadzonych form aktywnych białek kompleksów łańcucha oddechowego, niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania mitochondriów [8,31,54,64,132].

Ekspresja mitochondrialnej ATP-zależnej LON proteazy podczas spermatogenezy ma miejsce w mitochondriach ortodoksyjnych spermatogonii oraz mitochondriach pośrednich (*intermediate type*) spermatocytów leptotenowych i zygotenowych [113]. Obecność enzymu związana jest ze wspomnianymi wcześniej morfologicznymi i funkcjonalnymi zmianami mitochondriów komórek plemniko-twórczych, które składają się na dojrzewanie tych organelli. Rola omawianego enzymu jest niezwykle istotna, dlatego też jakiegokolwiek zaburzenia w ekspresji tego białka mogą mieć swój wyraz kliniczny w dysfunkcji mitochondriów i w konsekwencji mogą prowadzić do obniżenia ruchu plemników.

**Hsp60**, obok hsp70 i proteazy LON, odgrywa istotną rolę w biogenezie mitochondriów. Białko to uczestniczy w powstaniu i utrzymaniu prawidłowej konformacji (zwinięciu) białek mitochondrialnych kodowanych na genomie jądrowym i importowanych do mitochondriów [28,53,100,126]. Nadekspresja hsp60 ma miejsce podczas szoku termicznego, stresu tlenowego, głodu, działania wolnych rodników, infekcji patogenami i uszkodzeniu tkanek [16]. Immunohistochemiczne badania wykazały ekspresję hsp60 w spermatogoniach, pierwszorzędowych spermatocytach, komórkach Sertoliego i Leydiga w gonadzie dojrzałych płciowo szczurów oraz w bioptatach z jądra męczyzn z zaburzeniem płodności [82,129]. U tych ostatnich, zmniejszenie ekspresji występowało w przypadku zatrzymania spermatogenezy na etapie różnicowania się spermatocytów. Wysokie stężenie hsp60 stwierdzono w stadiach, w których miał miejsce podział spermatogonii, w pozostałych stężenie to było wyraźnie mniejsze. Hsp60 jest niezbędne podczas mitotycznych podziałów spermatogonii, natomiast podczas różnicowania się spermatocytów i dalej okrągłych spermatyd w wydłużające, rola tego białka zmniejsza się. Ma to odzwierciedlenie w ekspresji hsp60 zanikającej w tych komórkach. Spermatydy zawierające skondensowane mitochondria nie wykazują ekspresji tego białka. Wskazuje to, że największy import białek do mitochondriów ma miejsce w fazie spermatogonialnej spermatogenezy. Wydaje się, że ekspresja hsp60 podczas spermatogenezy jest regulowana hormonalnie [82,83].

## PODZIĘKOWANIE

Składam serdeczne podziękowania prof.dr hab. Lidii Wenda-Różewickiej, prof. dr hab. Jerzemu Kawiakowi, dr hab. Marii Laszczyńskiej i dr hab. Barbarze Wiszniewskiej za pomoc w przeprowadzeniu moich badań oraz uwagi w przygotowaniu manuskryptu.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ADHAM IM, TESSMANN D, SOLIMAN KA, MURPHY D, KREMLING H, SZPIRER C, ENGEL W. Cloning, expression, and chromosomal localization of the rat mitochondrial capsule selenoprotein gene (MCS); the reading frame does not contain potential UGA selenocysteine codons. *DNA Cell Biol* 1996; 15: 159-166.

- [2] AHO H, SCHWEMMER M, TESSMANN D, MURPHY D, MATTEI G, ENGEL W. Isolation, expression, and chromosomal localization of the human mitochondrial capsule selenoprotein gene (MCSP). *Genomics* 1996; **32**: 184–190.
- [3] ANKEL-SIMONS F, CUMMINS JM. Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: implications for theories on human evolution. *Proc Natl Acad Sci* 1996; **93**: 13859–13863.
- [4] ATANASSOV B, DENKOVA R, GEORGIEV G. Activity and localization of NADH-dependent oxidoreductase (diaphorase) in boar spermatozoa. *Andrologia* 1987; **19**: 474–477.
- [5] BACCETTI B. The human spermatozoon. W: Van Blerkom J, Motta PM. [red.] *Ultrastructure of Reproduction*. Boston: Kluwer Academic Publisher, 1984; 110–126.
- [6] BACCETTI C, BERNIERI G, BURRINI S, CAPITANI G, COLLODEL M, MIROLI M, PIOMBONI P, RENIERI T. Notulae Seminologicae. 4. Mathematical evaluation of submicroscopical alterations in spermatozoa of sterile men with varicocele. *Andrologia* 1995; **27**: 13–17.
- [7] BACCETTI B, CAPITANI S, COLLODEL G, CAIRANO GDI, GAMBERA L, MORETTI E, PIOMBONI P. Genetic sperm defects and consanguinity. *Hum Reprod* 2001; **16**: 1365–1371.
- [8] BARROS TF, PUCCIA R. Cloning and characterization of a LON gene homologue from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast* 2001; **18**: 981–988.
- [9] BARTOOV B, ELTES F, REICHAERT M, LANGZAM J, LEDERMAN H, ZABLUDOVSKY N. Quantitative ultramorphological (QUM) analysis of human sperm: diagnosis and management of male infertility. *Arch Androl* 1999; **42**: 161–177.
- [10] BEDFORD JM, CALVIN HI. Changes in S-S linked structures of the sperm tail during epididymal maturation, with comparative observations in sub-mammalian species. *J Exp Zool* 1974; **187**: 181–204.
- [11] BLANCO A. On the functional significance of LDH X. *The Johns Hopkins Med J* 1980; **146**: 231–235.
- [12] BOURGERON T. Mitochondrial function and male infertility. W: McElreavey M [red.] *Results and Problems in Cell Differentiation*. The Genetic Basis of Male Infertility. Berlin-Haidelberg: Springer-Verlag 2000; **28**: 197–210.
- [13] BRADLEY MP, GEELAN A, LEITCH V, GOLDBERG E. Cloning, sequencing, and characterization of LDH-C4 from a fox testis cDNA library. *Mol Reprod Dev* 1996; **44**: 452–459.
- [14] BROOKS GA. Lactate shuttles in nature. *Biochem Soc Trans* 2002; **30**: 258–263.
- [15] BURGOS C, MALDONADO C, GEREZ DE BURGOS NM, AOKI A, BLANCO A. Intracellular localization of the testicular and sperm-specific lactate dehydrogenase isozyme C4 in mice. *Biol Reprod* 1995; **53**: 84–92.
- [16] CABISCOL E, BELLI G, TAMARIT J, ECHAVE P, HERRERO E, ROS J. Mitochondrial Hsp60, resistance to oxidative stress, and the labile iron pool are closely connected in *Sacharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2002; **277**: 44531–44538.
- [17] CALVIN HI, GROSSHANS K, MUSICANT-SHIKORA SR, TURNER SI. A developmental study of rat sperm and testis selenoproteins. *J Reprod Fertil* 1987; **81**: 1–11.
- [18] CATALDO KB, OKO R, MASTRANGELO MA, KLEENE KC. Developmental expression, intracellular localization, and selenium content of the cysteine-rich protein associated with the mitochondrial capsules of mouse sperm. *Mol Reprod Dev* 1996; **45**: 320–331.
- [19] COOPER TG, YEUNG CH. Physiology of sperm maturation and fertilization. W: Nieschlag E, Behre HM [red.] *Andrology*. Springer-Verlag Berlin Heidenberg New York 2000: 63–82.
- [20] COOPER TG, YEUNG CH. Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and role of the cytoplasmic droplet. *Microsc Res Tech* 2003; **61**: 28–38.
- [21] CUMMINS J. Mitochondrial DNA in mammalian reproduction. *Rev Reprod* 1998; **3**: 172–182.
- [22] CURRY MR, WATSON PF. Sperm structure and function. W: Gruzínska JG, Yovich JL [red.] *Gametes – The spermatozoa*. Cambridge UK: Cambridge University Press 1995; 52.
- [23] DIEKMAN AB, HERR JC. Sperm antigens and their use in the development of an immun contraceptive. *Am J Reprod Immunol* 1997; **37**: 111–117.
- [24] DOIGUCHI M, TAKAYUKI M, TOSHIMORI K, SHIBATA Y, IIDA H. Spergen-1 might be an adhesive molecule associated with mitochondria in the middle piece of spermatozoa. *Dev Biol* 2002; **252**: 127–137.
- [25] DOIGUCHI M, YAMASHITA H, ICHINOSE J, MORI T, SHIBATA Y, IIDA H. Complementary DNA cloning and characterization of rat spergen-1, a spermatogenic cell-specific gene-1, containing a mitochondria-targeting signal. *Biol Reprod* 2002; **66**: 1462–1470.



- [26] EICKOFF R, WILHELM B, RENNEBERG H, WENNEMUTH G, BACHER M, LINDER D, BUCALA R, SEITZ J, MEINHARDT A. Purification and characterization of macrophage migration inhibitory factor as a secretory protein from rat epididymis: evidence for alternative release and transfer to spermatozoa. *Mol Med* 2001; **7**: 27–35.
- [27] EISENBACH M. Sperm chemotaxis. *Rev Reprod* 1999; **4**: 56–66.
- [28] FENG HL, SANDLOW JI, SPARKS AET. Decreased expression of the heat shock protein hsp 70-2 is associated with the pathogenesis of male infertility. *Fertil Steril* 2001; **76**: 1136–1139.
- [29] FERNANDO G, GALLINA G, NELIA M, GEREZ DE BURGOS NM, BURGOS C, CORONEL CE, BLANCO A. The lactate/pyruvate shuttle in spermatozoa: operation *in vitro*. *Arch Biochem Biophys* 1994; **308**: 515–519.
- [30] FORESTA C, FLOHE L, GAROLLA A, ROVERI A, URSINI F, MAIORINO M. Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biol Reprod* 2002; **67**: 967–971.
- [31] FU GK, MARKOVITZ DM. The human LON protease binds to mitochondrial promoters in a single stranded, site-specific, strand-specific manner. *Chemistry* 1998; **37**: 1905–1907.
- [32] FURUSAWA M, OHNISHI T, TAIRAT, IGUCHI-ARIGA SMM, ARIGA H. Amy-1, a c-Myc-binding protein, is localized in the mitochondria of sperm by association with S-AKAP84, an anchor protein of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2001; **276**: 36647–36651.
- [33] GADELLA BM, RATKI R, BROUWERS JFHM, STUT TAE, COLENBRANDER B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reprod Science* 2001; **2183**: 1–17.
- [34] GANDINI L, LOMBARDO F, PAOLI D, CAPONECCHIA L, FAMILIARI G, VERLENGIA C, DONDERO F, LENZI A. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000; **15**: 830–839.
- [35] GAVELLA M, LIPOVAC V. NADH-dependent oxidoreductase (diaphorase) activity and isozyme pattern of sperm in infertile men. *Arch Androl* 1992; **28**: 135–141.
- [36] GAVELLA M, LIPOVAC V, ŠVERKO V. Superoxide anion production and some sperm-specific enzyme activities in infertile men. *Andrologia* 1995; **27**: 7–12.
- [37] GIANNELLI F. Mitochondria and the quality of human gametes. *Am J Hum Genet* 2001; **68**: 1535–1537.
- [38] GERBER J, MUHLENHOFF U, HOFHAUS G, LILL R, LISOWSKY T. Yeast ERV2p is the first microsomal Fad-linked sulphhydryl oxidase of the Erv1p/Alrp protein family. *J Biol Chem* 2001; **276**: 23486–23491.
- [39] GODEAS C, TRAMER F, MICALI F, SORANZO M., SANDRI G, PANFILI E. Distribution and possible novel role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 1997; **57**: 1502–1508.
- [40] GUPTA GS. LDH-C4: a unique target of mammalian spermatozoa. *Cit. Rev Biochem Mol Biol* 1999; **34**: 361–385.
- [41] GUPTA GS, CHATURVEDI G. Regulation of immune function by sperm-specific LDH and its differences with somatic isozyme in primary and secondary lymphocyte cultures. *Am J Reprod Immunol* 2000; **44**: 160–169.
- [42] GUPTA GS, KANG BP. Molecular and kinetic properties of sperm specific LDH after radiation inactivation. *Mol Cell Biochem* 2000; **206**: 27–32.
- [43] HAN-HEN HO, SUAREZ S. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction* 2001; **122**: 519–526.
- [44] HAKE LE, HECHT NB. Utilization of alternative transcription initiation site of somatic cytochrome c in the mouse produces a testis-specific c cytochrome c mRNA. *Development* 1993; **268**: 4788–4797.
- [45] HAKE LE, KUEMMERLE N, HECHT NB, KOZAK CA. The genes encoding the somatic and testis-specific c isoforms of the mouse cytochrome c genes map to paralogous regions chromosomes 6 and 2. *Genomics* 1994; **20**: 503–505.
- [46] HARADA H, BECKNELL B, WILM M, MANN M, HUANG LJ, TAYLOR SS, SCOTT JD, KOSMEYER SJ. Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol Cell* 1999; **3**: 413–422.
- [47] HARAGUCHI CM, MABUHI T, HIRATA S, SHODA T, YAMADA AT, HOSHI K, YOKOTA S. Spatio-temporal changes of levels of a moonlighting protein, phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, in subcellular compartment during spermatogenesis in the rat testis. *Biol Reprod* 2003; **69**: 885–895.
- [48] HENNING B. Change of cytochrome c structure during development of the mouse. *Eur J Biochem* 1975; **55**: 167–183.

- [49] HERR JC, THOMAS D, BUSH LA, COONROD S, KHOLE V, HOWARDS SS, FLICKINGER ChJ. Sperm mitochondria-associated cysteine rich protein (SMCP) is an autoantigen in Lewis rats. *Biol Reprod* 1999; **61**: 428–435.
- [50] HESS RA, MILLER LA, KIRBY JD, MARGOLIASH E, GOLDBERG E. Immunoelectron microscopic localization of testicular and somatic cytochromes c in the seminiferous epithelium of the rat. *Biol Reprod* 1993; **48**: 1299–1308.
- [51] HINSCH KD, ASMARINAH, HINSCH E, KONRAD L. VDAC2 (porin2) expression pattern and localization in the bovine testis. *Biochim Biophys Acta* 2001; **1518**: 329–333.
- [52] HOLSTEIN AF, ROOSEN-RUNGE EC. *Atlas of human spermatogenesis*. Grosse Verlang Berlin 1981.
- [53] HOOD DA, ADHIHETTY PJ, COLAVECCHIA M, GORDON JW, IRRCHER I, JOSEPH AM, LOWE ST, RUNGI AA. Mitochondrial biogenesis and the role of the protein import pathway. *Med Sci Sports Exerc* 2003; **35**: 86–94.
- [54] HORI O, ICHINODA F, TAMATANI T, YAMAGUCHI A, SATO N, OZAWA K, KITAO Y, MIYAZAKI M, HARDING HP, RON D, TOHYAMA M, STERN D, OGAWA S. Transmission of cell stress from endoplasmic reticulum to mitochondria: enhanced expression of Lon protease. *Cell Biol* 2002; **157**: 1151–1160.
- [55] HRUDKA F. Morphological and cytochemical study on isolated sperm mitochondria. *J Ultrastruct Res* 1978; **63**: 1–19.
- [56] HUTSON SM, VAN DOP C, LARDY HA. Mitochondrial metabolism of pyruvate bovine spermatozoa. *J Biol Chem* 1977; **25**: 1309–1315.
- [57] IMAI H, SUZUKI K, ISHIZAKA K, ICHINOSE S, OSHIMA H, OKAYASU I, EMOTO K, UMEDA M, NAKAGAWA Y. Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males. *Biol Reprod* 2001; **64**: 674–683.
- [58] JONES AR. Metabolism of lactate by mature boar spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 1997; **9**: 227–232.
- [59] JONES AR. Chemical interference with sperm metabolic pathways. *J Reprod Fertil* 1998; **53**: 227–234.
- [60] JONES AR, BUBB WA. Substrate for endogenous metabolism by mature boar spermatozoa. *J Reprod Fertil* 2000; **119**: 129–135.
- [61] JOSE A, NOUGERA V, ZAPATA IT, HERNANDEZ PM. Lactic dehydrogenase-C4 activity in seminal plasma and male infertility. *Fertil Steril* 1993; **60**: 331–335.
- [62] JOSHI NV, MEDINA H, COLASANTE C, OSUNA A. Ultrastructural investigation of human sperm using atomic force microscopy. *Arch Androl* 2000; **44**: 51–57.
- [63] KARIMPOUR I, CUTLER M, SHIH D, SMITH D, KLEENE KC. Sequence of the gene encoding the mitochondrial capsule selenoprotein of mouse sperm: identification of three in-phase TGA selenocysteine codons. *DNA Cell Biol* 1992; **11**: 693–699.
- [64] KASER M, LANGER T. Protein degradation in mitochondria. *Cell Dev Biol* 2000; **11**: 181–190.
- [65] KAUT A, LANGE H, DIEKERT K, KISPAL G, LILL R. Isa 1 p is a component of the mitochondrial machinery for maturation of cellular iron-sulphur proteins requires conserved cysteine residues for function. *J Biol Chem* 2000; **275**: 15955–15961.
- [66] KEATING J, GRUNDY CE, FIVEY PS, ELLIOTT M, ROBINSON J. Investigation of the association between the presence of cytoplasmic residues on the human sperm midpiece and defective sperm function. *J Reprod Fertil* 1997; **11**: 71–77.
- [67] KISPAL G, CSERE P, PROHL C, LILL R. The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J* 1999; **18**: 1192–1198.
- [68] KLEENE KC, SMITH J, BOZORGZADEH A, HARRIS M, HAHN L, KARIMPOUR I, GERSTEL J. Sequence of developmental expression of the mRNA encoding the selenoprotein of the sperm mitochondrial capsule in the mouse. *Dev Biol* 1990; **137**: 395–402.
- [69] KLISSENBAUER M, WINTERS S, HEINLEIN UAO, LISOWSKY T. Accumulation of the mitochondrial form of the sulphhydryl oxidase Erv1p/Alrp during the early stages of spermatogenesis. *J Exp Biol* 2002; **205**: 1979–1986.
- [70] LANGE H, LISOWSKY T, GERBER J, MUHLENHOFF U, KISPAL G, LILL R. An essential of the mitochondrial sulphhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S protein. *EMBO Rep* 2001; **2**: 715–720.
- [71] LASZCZYŃSKA M, ŚLUCZANOWSKA-GŁĄBOWSKA S, PIASECKA M, SKOWRON J, DĘBIŃSKA-SZYMAŃSKA T. Germ cells with nuclear DNA fragmentation related to apoptotic cells in rat testis in experimental hyperprolactinemia induced by metoclopramide. *Fol Histochem Cytobiol* 2002; **40**: 163–164.
- [72] LAUDAT A, FOUCAULT P, PALLUEL AM. Relationships between seminal LDH-C4 and spermatozoa with acrosome anomalies. *Clin Chim Acta* 1997; **265**: 219–224.



- [73] LEE J, HOFHAUS G, LISOWSKY T. Erv1p from *Saccharomyces cerevisiae* is a FAD-linked sulphhydryl oxidase. *FEBS Lett* 2000; **477**: 62–66.
- [74] LENZI A, GANDINI L, LOMBARDO F, PICARDO M, MARESCA V, PANFILI E, TRAMER F, BOITANI C, DONDERO F. Polyunsaturated fatty acids of germ cell membranes, glutathione and glutathione-dependent enzyme-PHGPx: from basic to clinic. *Contraception* 2002; **65**: 301–304.
- [75] LIN RY, MOSS SB, RUBIN CS. Characterization of S-AKAP84, a novel developmentally regulated A kinase anchor protein of male germ cells. *J Biol Chem* 1995; **270**: 2784–27811.
- [76] LISOWSKY T. Sulphydryl oxidases and the genetics of mitochondrial biogenesis. *Rec Res Dev Curr Genet* 2001; **1**: 1–10.
- [77] LISOWSKY T, LEE JE, POLIMENO L, FRANCAVILLA A, HOFHAUS G. Mammalian augments of liver regeneration protein is a sulphhydryl oxidase. *Dig Liver Dis* 2001; **33**: 173–180.
- [78] LU B, LIU T, CROSBY JA, THOMAS-WOHLER J, LEE I, SUZUKI CK. The ATP-dependent Lon protease of *Mus musculus* is a DNA-binding protein that is functionally conserved yeast and mammals. *Gene* 2003; **306**: 45–55.
- [79] MAIORINO M, URSINI F. Oxidative stress, spermatogenesis and fertility. *Biol Chem* 2002; **383**: 591–597.
- [80] MAIORINO M, SCAPIN M, URSINI F, BIASOLO M, BOSELLO V, FLOHE L. Distinct promoters determine alternative transcription of gpx-4 into phospholipids-hydroperoxide glutathione peroxidase variants. *J Biol Chem* 2003; **278**: 34286–34290.
- [81] MARTINČIĆ DŠ, KLUN IV, ZORN B, VRTOVEC HM. Germ cell apoptosis in the human testis. *Eur J Physiol* 2001; **442**: 159–160.
- [82] MEINHARDT A, PARVINEN M, BACHER M, AUMULLER G, HAKOVIRTA H, YAGI A, SEITZ J. Expression of mitochondrial heat shock protein 60 in distinct cell types and defined stages of rat seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 1995; **52**: 798–807.
- [83] MEINHARDT A, SEITZ J, ARSLAN M, AUMULLER G, WEINBAUER GF. Hormonal regulation and germ cell-specific expression of heat shock protein 60 (hsp60) in the testis of macaque monkeys (*Macaca mulatta* and *M. fascicularis*). *Int J Androl* 1998; **21**: 301–307.
- [84] MEINHARDT A, WIHELM B, SEITZ J. Mini symposium. New aspect of spermatogenesis. Expression of mitochondrial marker proteins during spermatogenesis. *Hum Reprod Update* 1999; **5**: 108–119.
- [85] MEINHARDT A, MCFARLANE JR, SEITZ J, DE KRETZER DM. Activin maintains the condensed mitochondria in germ cells. *Mol Cell Endocrin* 2000; **168**: 111–117.
- [86] MIZUNO K, HIRATA S, HOSHI K, SHINOHARA A, CHIBA M. Analysis of the phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase mRNA in the rat spermatozoa and effect of selenium deficiency on the mRNA. *Biol Trace Elem Res* 2000; **74**: 71–79.
- [87] MUNDY AJ, RYDER TA, EDMONDS DK. Asthenozoospermia and the human sperm mid-piece. *Hum Reprod* 1995; **10**: 116–119.
- [88] MURATORI M, PIOMBONI P, BALDI E, FILIMBERTI E, PECCHIOLI P, MORETTI E, GAMBERA L, BACCETTI B, BIAGOTTI R, FORTI G, MAGGI M. Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl* 2000; **21**: 903–912.
- [89] NAKAGAWA Y, IMAI H. Novel functions of mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) as an anti-apoptotic factor. *Health Sci* 2000; **46**: 414–417.
- [90] NAM SY, FUJISAWA M, KIM JS, KUROHMARU M, HAYASHI Y. Expression pattern phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase messenger ribonucleic acid in mouse testis. *Biol Reprod* 1998; **58**: 1272–1276.
- [91] NARISAWA S, HECHT NB, GOLDBERG E, BOATRIGT KM, REED JC, MILLAN JL. C-null mice produce functional sperm but undergo early testicular atrophy. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 5554–5562.
- [92] NAYERNIA K, ADHAM IM, BURKHARDT-GOTTGES, NEESEN J, MANDY RIECHE, WOLF S, SANCKEN U, KLEENE K, ENGEL W. Asthenozoospermia in mice with targeted deletion of the sperm mitochondrion-associated cysteine-rich protein (Smcp) gene. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 3046–3052.
- [93] NOMURA K, IMAI H, KOUMARA T, ARAI M, NAKAGAWA Y. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway. *J Biol Chem* 1999; **274**: 29294–29302.
- [94] O'FLAHERTY CM, BEORLEGUI NB, BECONI MT. Lactate dehydrogenase-c is involved in heparin- and NADH-dependent bovine sperm capacitation. *Andrologia* 2002; **34**: 91–97.
- [95] OKO R, HRUDKA F. Segmental aplasia of the mitochondrial sheath and sequelae induced by gossypol in rat spermatozoa. *Biol Reprod* 1982; **26**: 183–195.
- [96] OLSON GE, WINFREY VP. Identification of a cytoskeletal network adherent to the mitochondria of mammalian spermatozoa. *J Ultrastruct Mol Struct Res* 1986; **94**: 131–139.

- [97] OLSON GE, WINFREY VP. Mitochondria-cytoskeleton interaction in the sperm midpiece. *J Struci Biol* 1990; **103**: 13–32.
- [98] OLSON GE, WINFREY VP. Structural organization of surface domains of sperm mitochondria. *Mol Reprod Develop* 1992; **33**: 89–98.
- [99] PALLINI V, BACCETTI B, BURRINI AG. A peculiar cysteine-rich polypeptide related to some unusual properties of mammalian sperm mitochondria. W: Fawcett DW, Bedford JM. [red.] *The Spermatozoon*. Baltimore, Munich: Urban and Schwarzenberg Inc. 1979; 141–151.
- [100] PARANKO J, SEITZ J, MEINHARDT A. Developmental expression of hest shock protein 60 (HSP60) in the rat testis and ovary. *Differentiation* 1996; **60**: 159–67.
- [101] PEDERSEN H, REBBE H, HAMMEN R. Human sperm fine structure in a case of severe asthenospermia-necrospermia. *Fertil Steril* 1971; **22**: 156–164.
- [102] PHILLIPS DM. Mitochondrial disposition in mammalian spermatozoa. *J Ultrastruct Res* 1977; **58**: 144–154.
- [103] PIASECKA M, WENDA-RÓŻEWICKA L, OGOŃSKI T. Computerized analysis of cytochemical reaction for dehydrogenases and oxygraphic studies as methods to evaluate the mitochondrial sheath in rat spermatozoa. *Andrologia* 2001; **33**: 1–12.
- [104] PIASECKA M., KAWIAK J. Sperm mitochondria of patients with normal sperm motility and with asthenozoospermia: morphological and functional study. *Folia Histochem Cytobiol* 2003; **41**: 125–139
- [105] PIASECKA M, LASZCZYŃSKA M, GĄCZARZEWICZ D. Morphological and functional evaluation of spermatozoa from patients with asthenozoospermia. *Folia Morphol* 2003; **62**: 167–169.
- [106] PILDER SH, OLDS-CLARKE P, ORTH JM, JESTER WF, DUGAN L. Hst7: A male sterility mutation perturbing sperm motility, flagellar assembly, and mitochondrial sheath differentiation. *J Androl* 1997; **18**: 663–671.
- [107] PUGLISI R, TRAMER F, PANFILI E, MICALI F, SANDRI G, BOITANI C. Differential splicing of the phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene in diploid and haploid male germ cells in the rat. *Biol Reprod* 2003; **68**: 405–411.
- [108] RAWE VY, GALAWERNA GD, ACOSTA AA, OLMEDO SB, CHEMES HE. Incidence of tail structure distortions associated with dysplasia of the fibrous sheath in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2001; **16**: 879–886.
- [109] RAWE VY, OLMEDO SB, BENMUSA A, SHIIGI SM, CHEMES HE, SUTOWSKY P. Sperm ubiquitination in patients with dysplasia of the fibrous sheath. *Hum Reprod* 2002; **17**: 2119–2127.
- [110] ROVERI A, URSINI F, FLOHE L, MAIORINO M. PHGPx and spermatogenesis. *Biofactors* 2001; **14**: 213–222.
- [111] SAKKAS D, MARIETHOZ E, MANICARDI G, BIZZARO D, BIANCHI PG, BIANCHI U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999; **4**: 31–37.
- [112] SAKKAS D, MOFFATT O, MANICARDI GC, MARIETHOZ E, TAROZZI N, BIZZARO D. Nature of DNA damage in ejaculated spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 2002; **4**: 1061–1067.
- [113] SEITZ J, MOBIUS J, BERGMANN M, MEINHARDT A. Mitochondrial differentiation during meiosis of male germ cells. *Int J Androl* 1995; 18 suppl **2**: 7–11.
- [114] SHEN HM, DAI J, CHIA SE, LIM A, ONG CN. Detection of apoptotic alternations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod* 2002; **17**: 1266–1273.
- [115] SIDHA HIKIM AP, SWERDLOFF R. Hormonal and genetic control cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod* 1999; **4**: 38–47.
- [116] SUN F, GIOJALAS LC, ROVASIO RA, TUR-KASPA I, SANCHEZ R, EISENBACH M. Lack of species-specificity in mammalian sperm chemotaxis. *Dev Biol* 2003; **255**: 423–427.
- [117] SUTOWSKY P, MORENO RD, RAMALHO-SANTOS J, DOMINKO T, SIMERLY C, SCHATTEN G. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* 1999; **402**: 371–372.
- [118] SUTOWSKY P, MORENO RD, RAMALHO-SANTOS J, DOMINKO T, SIMERLY C, SCHATTEN G. Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biol Reprod* 2000; **63**: 582–590.
- [119] THOMPSON WE, RAMALHO-SANTOS J, SUTOWSKY P. Ubiquitination of prohibitin in mammalian sperm mitochondria: Possible roles in the regulation of mitochondrial inheritance and sperm quality control. *Biol Reprod* 2003; **61**: 88–102.
- [120] TOSHIMORI K. Biology of spermatozoa maturation: An overview with an introduction to this issue. *Microsc Res Tech* 2003; **61**: 1–6.



- [121] TRAMER F, MICALI F, SANDRI G, BERTONI A, LENZI A, GANDINI L, PANFILI E. Enzymatic and immunochemical evaluation of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) in testes and epididymal spermatozoa of rats of different ages. *Int J Androl* 2002; **25**: 72–83.
- [122] TRENDELENBURG G, HUMMEL M, RIECKEN EO, HANSKI C. Molecular characterization of AKAP149, a novel A kinase anchor protein with a KH domain. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **225**: 313–319.
- [123] URSINI F, HEIMS, KIESS M, MAIORINO M, ROVERI A, WISSING J, FLOHE L. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* 1999; **285**: 1393–1396.
- [124] Van DYCK L, LANGER T. ATP-dependent proteases controlling mitochondrial function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Life Sci* 1999; **56**: 825–842.
- [125] VIRBASIVS J, SCARPULLA SC. Structure and expression of rodent genes encoding the testis-specific cytochrome c. *J Biol Chem* 1988; **263**: 6791–6796.
- [126] VOOS W, ROTTGERS K. Molecular chaperones as essential mediators of mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1592**: 51–62.
- [127] VORUP-JENSEN T, HJORT T, ABRAHAM-PESKIR JV, GUTTANN P, JENSENIUS JC, UGGERHOJE, MADENWALDT R. X-ray microscopy of human spermatozoa shows change of mitochondrial morphology after capacitation. *Hum Reprod* 1999; **14**: 880–884.
- [128] WANG G, YANG X, ZHANG Y, WANG Q, CHEN H, WEI H, XING G, XIE L, HU Z, ZHANG C, FANG D, WU C, HE F. Identification and characterization of receptor for mammalian hepatopoietin that is homologous to yeast ERV1. *J Biol Chem* 1999; **274**: 11469–11472.
- [129] WERNER A, MEINHARDT A, SEITZ J, BERGMANN M. Distribution of heat-shock protein 60 immunoreactivity in testes of infertile men. *Cell Tissue Res* 1997; **288**: 539–544.
- [130] ZEGINIADOU T, PAPANIKOLAOU J, MANTALENAKIS S. Acrosome reaction: methods for detection and clinical significance. *Andrologia* 2000; **32**: 335–343.
- [131] ZHONG X, KLEENE KC. cDNA copies of the testis-specific lactate dehydrogenase (LDH-C) mRNA are present in spermatogenic cells in mice, but processed pseudogenes are not derived from mRNAs that are expressed in haploid and late meiotic spermatogenic cells. *Mamm Genome* 1999; **10**: 6–12.
- [132] ZHU Y, WANG M, LIN H, HUANG C, SHI X, LUO J. Epidermal growth factor up-regulates the transcription of mouse Irf1 through extracellular signal-regulated protein kinase- and phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathways. *Exp Cell Res* 2002; **280**: 97–106.
- [133] ZINI A, O'BRYAN MK, ISRAEL L, SCHLEGEL PN. Human sperm NADH and NADPH diaphorase cytochemistry: correlation with sperm motility. *Urology* 1998; **51**: 464–468.

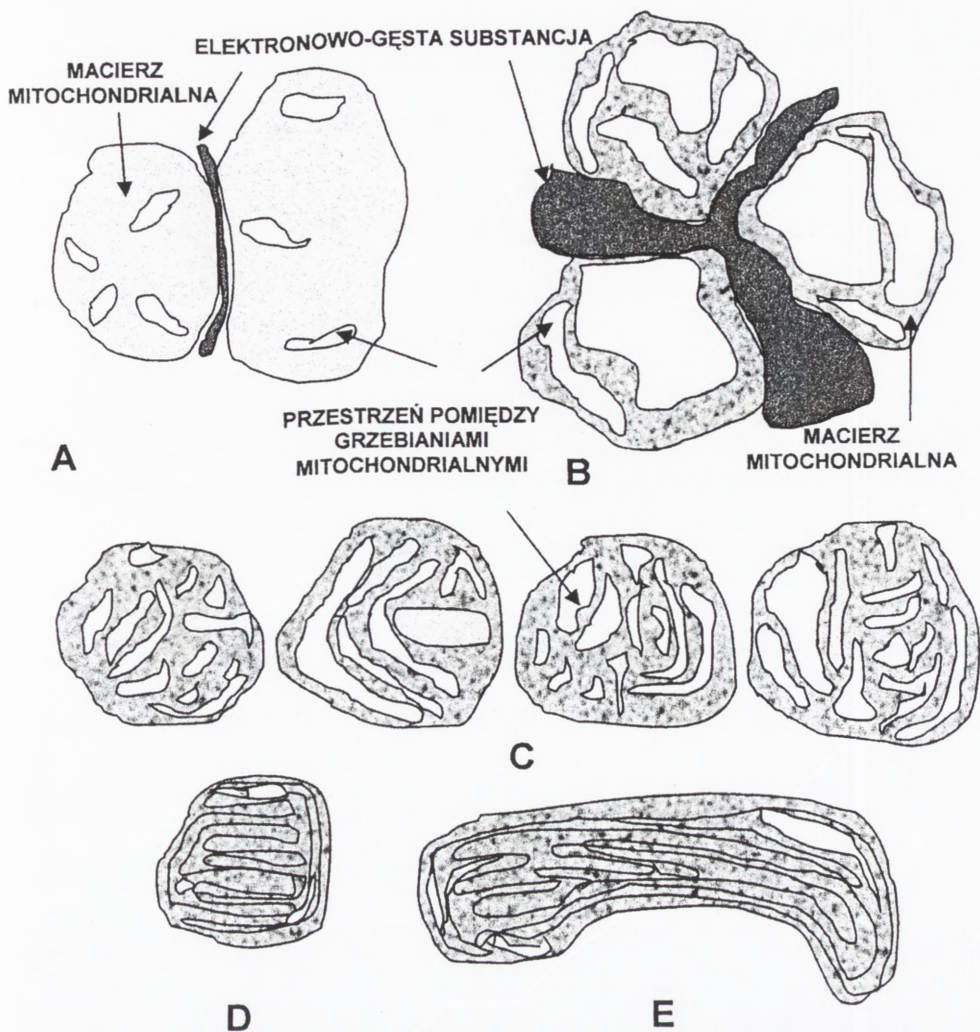
Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 18.02.2004 r

Przyjęto: 31.03.2004 r.

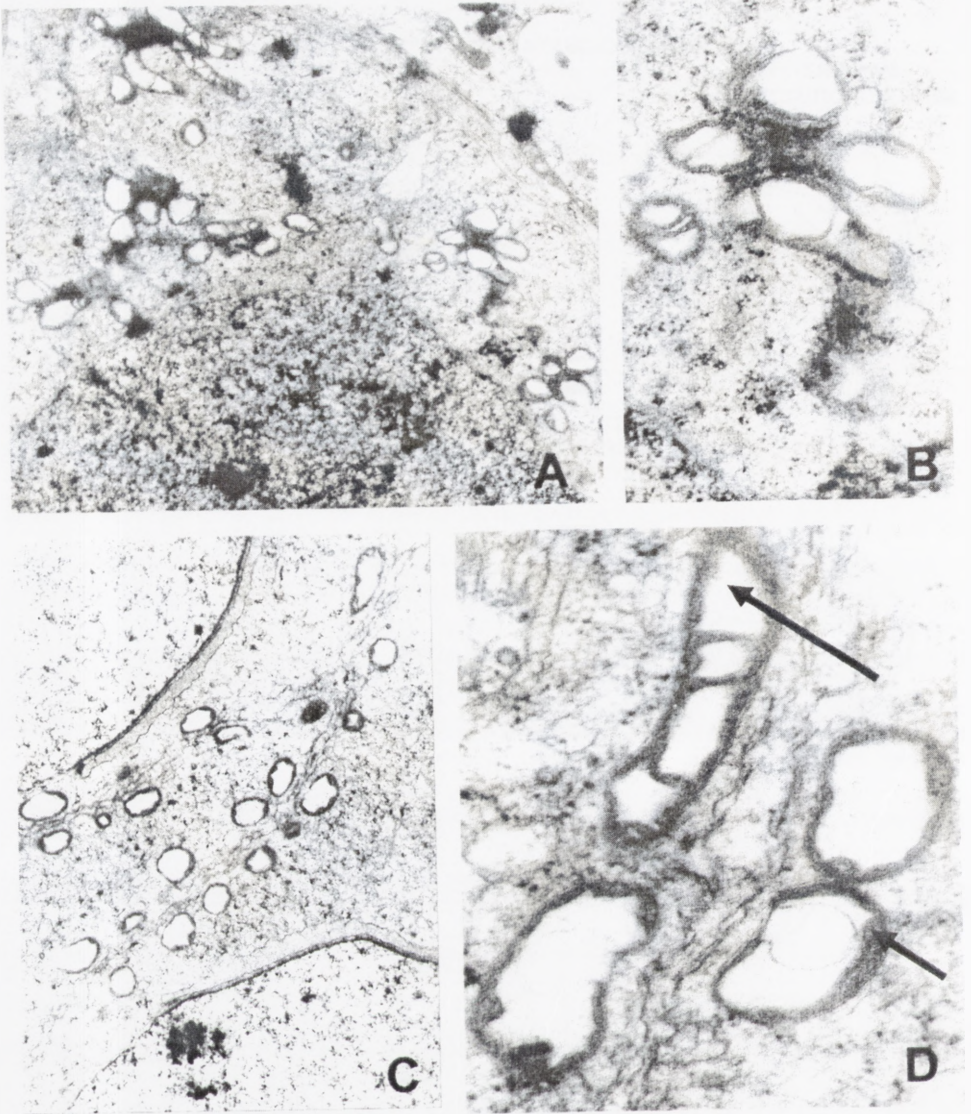
ul. Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin

email: mpiasecka@ipartner.com.pl

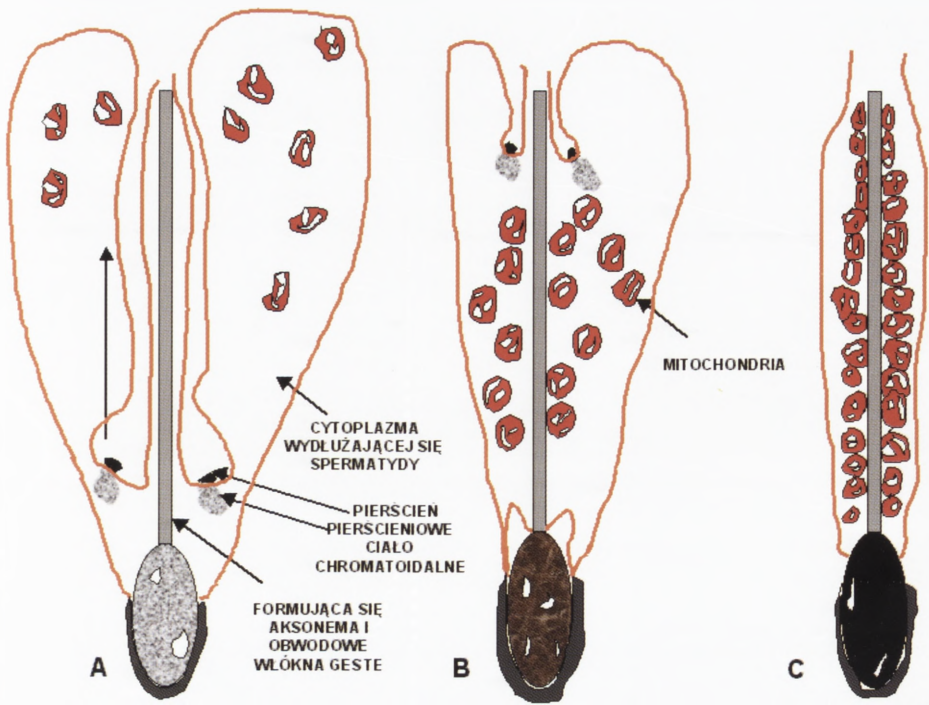


RYCINA 1. Schemat przedstawiający morfologiczne zmiany mitochondriów komórek plemnikotwórczych podczas spermatogenezy – okrągłe ortodoksyjne mitochondria spermatogonii A – jasnych z przejaśnioną macierzą i niewielką ilością grzebień występują przeważnie w grupach, pomiędzy nimi elektronowo-gęsta substancja (substancja cementująca); B – typ pośredni okrągłych, zwakuolizowanych mitochondriów spermatocytów zygotenowych z wyraźnie poszerzonymi przestrzeniami pomiędzy grzebieniami (jamki mitochondrialne) i ciemniejszą macierzą niż w przypadku poprzednim, organelle również skupiają się, zwiększa się ilość elektronowo-gęstej substancji pomiędzy nimi; C – typ skondensowany mitochondriów w przekroju poprzecznym wydłużającej się spermatydy, zwiększa się ilość grzebień, ale zmniejsza się przestrzeń pomiędzy grzebieniami w porównaniu ze zwakuolizowanym typem organeli; D, E – mitochondria w przekroju poprzecznym (D) i podłużnym (E) plemników uwalnianych z nabłonka plemnikotwórczego, mniejsze przestrzenie pomiędzy ciasno upakowanymi grzebieniami, macierz wykazuje dużą gęstość elektronową, w przekroju podłużnym widoczny wydłużony i zakrzywiony kształt mitochondriów (na podstawie wyników własnych oraz Holstein i wsp.[52])



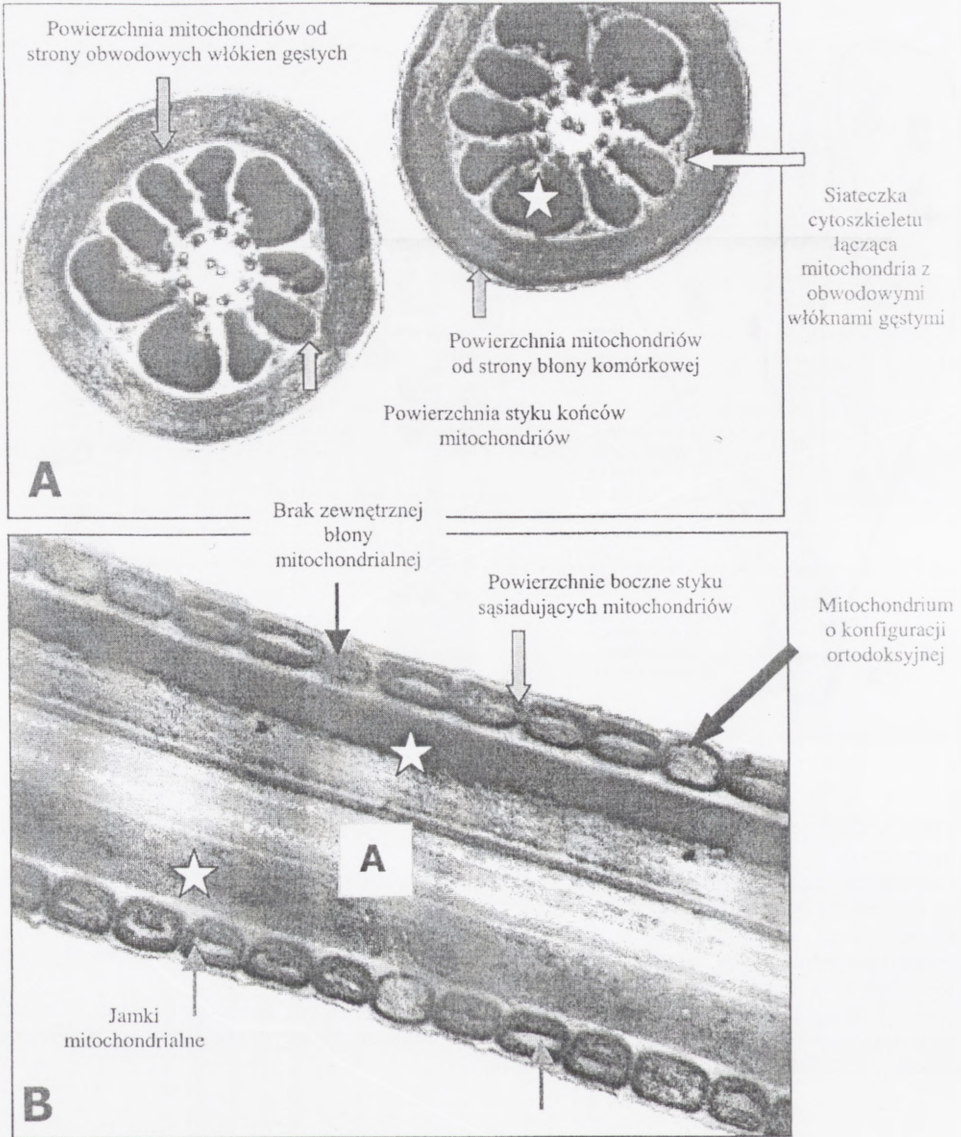


RYCINA 2. Ultrastruktura mitochondriów spermatocytów zygotenowych (A,B) i okrągłych spermatyd (C,D). A,B – typ pośredni zwakuolizowanych mitochondriów z charakterystycznymi dużymi przestrzeniami pomiędzy grzebieniami, organelle występują w grupach, pomiędzy nimi widoczna elektronowo-gęsta substancja; C – lokalizacja mitochondriów w dwóch sąsiadujących, okrągłych spermatydach, kondensujące się mitochondria układają się pojedynczo pomiędzy błonami cytoplazmatycznymi na obwodzie komórek; D – macierz mitochondrialna wykazuje dużą gęstość elektronową (krótka strzałka), widoczne jeszcze duże przestrzenie pomiędzy grzebieniami mitochondrialnymi (długa strzałka). A 95000 $\times$ , B 22500  $\times$ , C 13000  $\times$ , D 53000  $\times$ ; mikroskop elektronowy transmisyjny JEM-1200 EX (JOEL Ltd, Tokyo Japan); materiał do badań został przygotowany wg rutynowego postępowania [71]

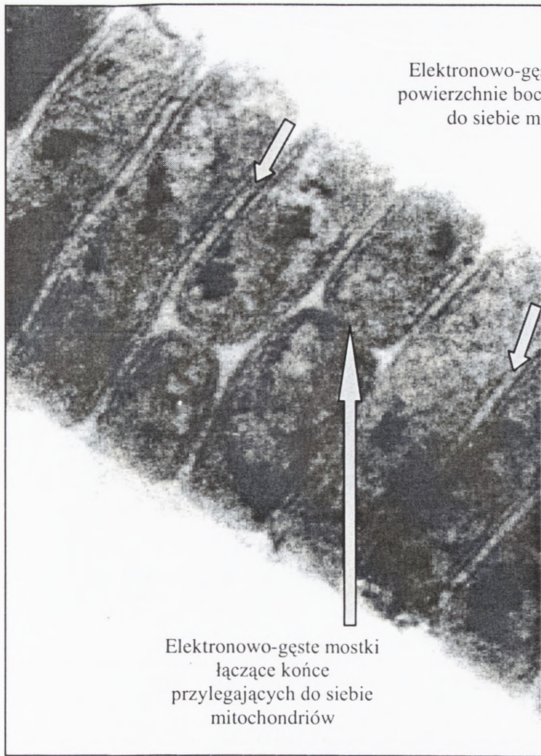


RYCINA 3. Morfogeneza osłonki mitochondrialnej wstawki plemnika podczas różnicowania wydłużającej się spermatydy w spermiogenezie (faza akrosomu – A,B i dojrzewania – C). Mitochondria z peryferycznych części cytoplazmy spermatydy (A) gromadzą się w części proksymalnej formującej się witki, dopiero po przesunięciu się pierścienia i pierścieniowego ciała chromatoidalnego w kierunku dystalnym (długa strzałka) tworzącej się aksonemy i obwodowych włókien gęstych (B); regularne ułożenie odpowiedniej liczby mitochondriów, wzajemne ich połączenie i przytwierdzenie do obwodowych włókien gęstych następuje pod koniec fazy akrosomu i dalej kontynuuje się w fazie dojrzewania, w której ma miejsce odrzucenie zbyt licznej, resztkowej cytoplazmy spermatydy zawierającej między innymi nadmiar mitochondriów niewchodzących w skład osłonki mitochondrialnej (C) (szczegóły w tekście); na podstawie wyników własnych oraz Holstein i wsp.[52]



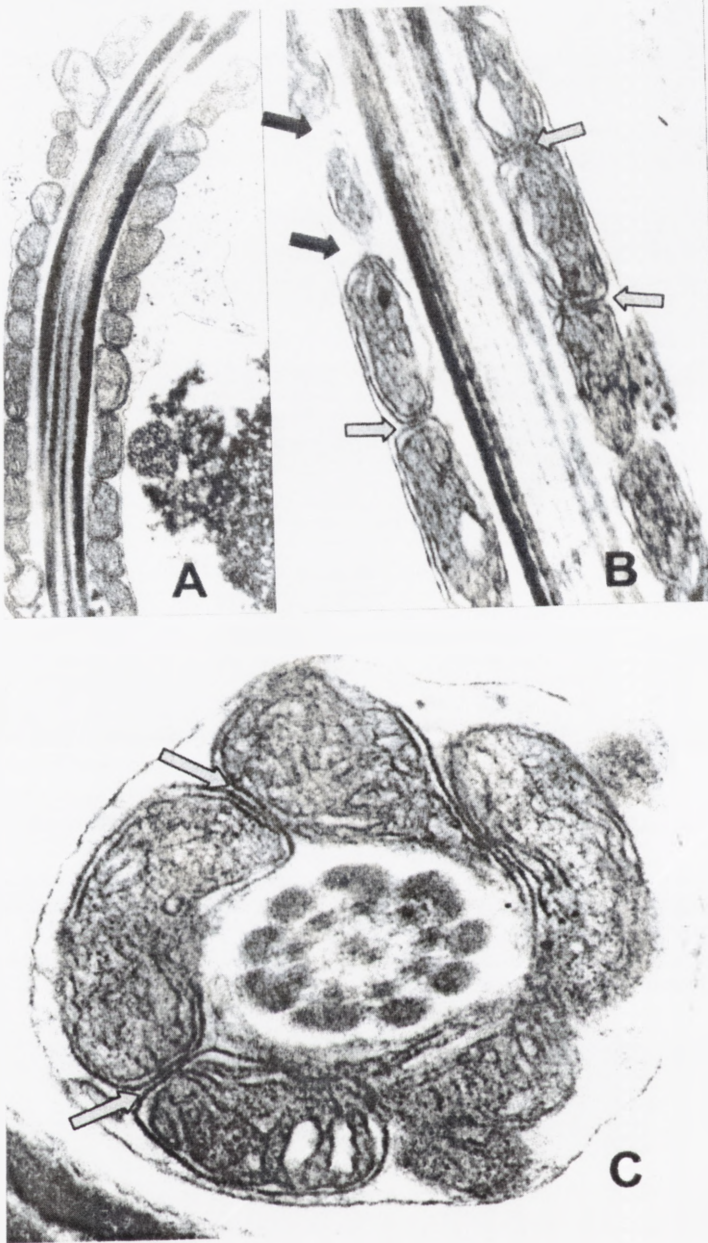


RYCINA 4. Ultrastruktura wstawki plemników szczura, izolowanych z ogona najądrza, w przekroju poprzecznym (A) i podłużnym (B). Mitochondria w sposób regularny układają się pod błoną komórkową tworząc osłonkę mitochondrialną, przestrzeń pomiędzy mitochondriami i błoną komórkową jest bardzo mała ze względu na zredukowaną cytoplazmę, co świadczy o morfologicznej dojrzałości plemników; A – widoczne jedno bardzo długie, skondensowane mitochondrium o elektronowo-gęstej macierzy z ciasno upakowanymi grzebieniami, otaczające obwodowe włókna gęste; szczegóły w tekście [98]; obwodowe włókna gęste – gwiazdka; aksonema – A; A 5830×, B 7480×; mikroskop elektronowy transmisyjny JEM-1200 EX (JOEL Ltd, Tokyo Japan); materiał do badań został przygotowany wg rutynowego postępowania [104]



RYCINA 5. Ultrastruktura osłonki mitochondrialnej plemników szczura w przekroju podłużnym. Powierzchnie boczne przylegających do siebie mitochondriów (mała szara strzałka) oraz powierzchnie końców mitochondriów (duża szara strzałka) są ściśle ze sobą połączone, szczegóły w tekście [62]; 12440 ×; mikroskop elektronowy transmisyjny JEM-1200 EX (JOEL Ltd, Tokyo Japan); materiał do badań został przygotowany wg rutynowego postępowania [104]





RYCINA 6. Ultrastruktura wstawki ejakulowanych plemników ludzkich, w przekroju podłużno-skośnym (A), podłużnym (B) i poprzecznym (C). B,C – niektóre mitochondria są ściśle ze sobą połączone swoimi powierzchniami bocznymi (B) i powierzchniami swoich końców (C) (szara strzałka), widoczne mitochondrium zmniejszone i odizolowane od sąsiednich – brak typowego połączenia (B); większość mitochondriów zawiera ciasno upakowane grzebienie i niewielkie przestrzenie pomiędzy nimi oraz elektronowo-gęstą macierz; A 20000 $\times$ , B 53000 $\times$ , C 80000 $\times$ ; mikroskop elektronowy transmisyjny JEM-1200 EX (JOEL Ltd, Tokyo Japan); materiał do badań został przygotowany wg rutynowego postępowania [104]

## MORFOLOGIA I FUNKCJA MITOCHONDRIÓW PLEMNIKA A MĘSKA PŁODNOŚĆ. CZĘŚĆ II. ZABURZENIA MORFOLOGICZNO-FUNKCJONALNE MITOCHONDRIÓW WSTAWKI PLEMNIKA\*

MORPHOLOGY AND FUNCTION OF SPERM MITOCHONDRIA  
AND MALE FERTILITY. PART II. MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL  
DEFECTS OF SPERM MIDPIECE MITOCHONDRIA

Małgorzata PIASECKA

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Pomorskiej Akademii Medycznej  
Szczecin

*Streszczenie:* Zaburzenia morfologiczno-funkcjonalne mitochondriów wstawki plemnika, które są coraz częściej przyczyną niepłodności męskiej (astenoteratozoospermii) można identyfikować stosując precyzyjną diagnostykę mitochondriów wstawki plemnika. Obejmuje ona: 1) skryningowy test cytochemiczny na mitochondrialne oksydoreduktazy/NADH, 2) cytofluorometryczną ocenę mitochondrialnego potencjału błonowego oraz badania: 3) fluorescencyjne z zastosowaniem sond mitochondrialnych, 4) mikroskopowo-elektronowe, 5) biochemiczne ujawniające zaburzenia aktywności enzymów łańcucha oddechowego i LDH-C<sub>4</sub>, 6) immunocytochemiczne w celu wykrycia ubikwitynowanych mitochondriów plemników i zmniejszonej ekspresji białek tworzących keratynową torebkę mitochondrialną i 7) genetyczne wykrywające mutacje mitochondrialnego genomu. Wiele funkcjonalnych i morfologicznych defektów osłonki mitochondrialnej plemnika wynika z zaburzeń morfogenezy jego wstawki podczas spermiogenezy. Defekty te mogą być związane z apoptozą spermatyd, z zaburzeniami genetycznymi ich genomu jądrowego (t haplotyp) lub mitochondrialnego, bądź też mogą powstać w najądrzu. Zmiany mitochondrialne obniżają ruchliwość plemników i przez to ich zdolność do zapłodnienia komórki jajowej. Ponadto, w niektórych przypadkach uzyskania nawet koncepcji (*in vivo* i *in vitro*), mogą uniemożliwiać własną eliminację (ubikwitynacja mitochondriów) w zapłodnionej komórce jajowej. Może być to przyczyną spontanicznych przedimplantacyjnych poronień, niekiedy w idiopatycznej niepłodności. Zwrócono uwagę na poznawcze znaczenie diagnostyki mitochondriów plemnika umożliwiającej wykrycie przyczyn astenozoospermii oraz prognostyczne pozwalające przewidzieć szansę na uzyskanie zapłodnienia, zwłaszcza przy zastosowaniu technik wspomaganego rozrodu.

\*Wszystkie prezentowane wyniki pochodzą z badań własnych przeprowadzonych w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii oraz w Zakładzie Patomorfologii Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie



*Słowa kluczowe:* plemniki, mitochondria, mitochondrialny DNA, astenoteratozoospermia.

*Summary:* The male infertility (asthenozoospermia) is very often connected with the morphological and functional defects of sperm midpiece. The mitochondrial defects can be identified with precise and comprehensive diagnostic methods. They include: 1) cytochemical screening test for mitochondrial oxidoreductases/NADH, 2) cytofluorometric evaluation of mitochondrial membrane potential, 3) fluorescence studies using mitochondrial probes, 4) electron-microscopic assessment, 5) biochemical studies revealing disorders of mitochondrial respiratory chain and LDH-C<sub>4</sub> activity, 6) immunocytochemical studies to display ubiquitinated sperm mitochondria or spermatozoa with lower expression of mitochondrial keratinous capsule proteins and 7) genetic studies showing mitochondrial genome mutations. Many morphological and functional defects of mitochondrial sheath result from the disturbances of their midpiece morphogenesis during spermiogenesis. These defects can be connected with spermatids apoptosis, genetic disorders of their nuclear (t haplotype) or mitochondrial genome and can develop in the epididymis. The mitochondrial defects decrease the sperm movement and finally the sperm ability to fertilize egg cell. Moreover, in some cases of conception (*in vitro* and *in vivo*) they may deactivate their own elimination (ubiquitination of mitochondria) in fertilized egg cell. Sometimes in idiopathic infertility it may trigger the spontaneous, pre-implantation embryo abortions. The mitochondrial diagnostics which enables the discovering of the causes of asthenozoospermia is of considerable prognostic and predictive value for *in vitro* and *in vivo* fertilization.

*Key words:* spermatozoa, mitochondria, mitochondrial DNA, asthenoteratozoospermia.

Rozwój biologii i genetyki molekularnej pozwala na ujawnienie coraz większej różnorodności w molekularnej budowie struktur plemnika. Znajomość ich umożliwia z kolei wykryć i zrozumieć podłoże morfologiczno-funkcjonalnych defektów plemników [8,9,14,28,29,45,46,63,104,114], które w wielu przypadkach dotyczą zmian ich jądrowego i mitochondrialnego DNA [2,20,24,30,63,102,116], wstawki, jak i witki [8,9,11,17,30,35,61,66,81,93,94]. Gdy defekty tych organelli występują w dużej liczbie plemników prowadzą do obniżonej lub całkowitej niepłodności [8,14,30,46,53]. Identyfikacja tych zaburzeń i powszechne stosowanie metod ich wykrywania, zwłaszcza wobec intensywnego i wręcz nieuniknionego rozwoju technik wspomaganego rozrodu, staje się koniecznością dla pracowni andrologicznych [8,11,14,61,63,72,88,116].

Zmiany mitochondrialne należą do tych, które licznie występują w plemnikach. Odsetek pacjentów niepłodnych to w większości przypadki astenoteratozoospermii związane z nieprawidłowościami wstawki [17,35,66,81,88,93]. Defekty mitochondrialne obejmują zarówno nieprawidłowości morfologiczne tych organelli (zmiany kształtu, wielkości, liczby i rozmieszczenia w obrębie wstawki) [11,14,66,81,88,89,93], jak i liczne ich zaburzenia funkcjonalne: zmniejszona aktywność enzymów kompleksów łańcucha oddechowego [14,28,98,99], zaburzenia oksydoredukcyjne [35,88,89], obniżony potencjał błonowy [24,46,63,88,89,122], deficyty substratów [100], obniżona aktywność lub ekspresja niektórych enzymów mitochondrialnych [14,29,46], mutacje mitochondrialnego DNA [40,98,126], ubikwitynacja mitochondriów [94,117,121]. Zaburzenia te często mają podłoże molekularne i genetyczne, i w wielu przypadkach prowadzą do apoptozy komórek plemnikotwórczych [67,70,73,89,114]. Ponadto należy również uwzględnić, że nieprawidłowe mitochondria plemnika nie są obojętne dla dzielącej się zygoty, nierozpoznane przez komórkę jajową mogą doprowadzić do poronień ze względu na swoje molekularne defekty [14,48,50,120].

Wobec tak różnorodnych defektów, precyzyjna morfologiczno-funkcjonalna diagnostyka mitochondriów plemników, w przypadku niepłodności, powinna być uzupełnieniem rutynowej diagnostyki nasienia [8,10,11,14,88]. Wyjaśnienie patofizjologii astenozoospermii umożliwia podjęcie odpowiedniej decyzji o leczeniu i dalszym monitorowaniu pacjenta lub też skłania do wyboru odpowiedniej techniki wspomaganego rozrodu.

## **ZABURZENIA MORFOLOGICZNE I FUNKCJONALNE MITOCHONDRIÓW PLEMNIKA OBNIŻAJĄ JEGO RUCHLIWOŚĆ I ZDOLNOŚĆ DO ZAPŁODNIENIA KOMÓRKI JAJOWEJ**

Defekty keratynowej torebki mitochondrialnej identyfikowanej jako SMPC (*Sperm Mitochondria-associated Cysteine-rich Protein*) lub PHGP<sub>x</sub> (*selenoprotein Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase*) przyczyniają się do obniżenia zdolności plemników do zapłodnienia, co zostało potwierdzone w badaniach doświadczalnych [65,71,110] i klinicznych [29,46,110].

Nayernia K. i wsp. [71], w badaniach *in vivo* przeprowadzonych na homozygotycznych mutantach mysich z uszkodzonym genem dla białka SMCP tworzącego torebkę mitochondrialną (gen *Smpc*, -/-) wykazali ruch plemników upośledzony w porównaniu z ruchem plemników osobników niezmutowanych. Natomiast, *in vitro*, plemniki zmutowanych myszy miały zdolność przyłączenia się do oocytu, ale liczba zapłodnionych komórek jajowych była mniejsza niż w przypadku zwierząt kontrolnych. Autorzy sugerują, że uszkodzenie białka SMPC niekoniecznie wywołuje zmiany morfologiczne mitochondriów wstawki plemnika, ale z pewnością prowadzi do upośledzenia ruchu lub dyskinezy plemników, zmniejsza ich zdolność do hyperaktywacji i w konsekwencji do penetracji *zona pellucida*.

Z kolei inne badania dowodzą, że uszkodzenie zewnętrznej błony mitochondrialnej może wiązać się z zaburzeniami morfologicznymi i funkcjonalnymi mitochondriów oraz w niektórych przypadkach powodować nawet apoptozę komórek plemnikotwórczych [29,46,67,110]. Z badań dotyczących roli selenu w płodności męskiej wynika, że selen zawarty w SMCP ma decydujące znaczenie dla kształtu i lokalizacji mitochondriów w obrębie wstawki plemnika, a przez to decyduje o funkcji, i dalej ruchu plemników. Wykazano, że nieprawidłowa morfologia wstawki i obniżona ruchliwość plemników pojawia się w przypadku deficytu selenu w diecie lub w nasieniu tak zwierząt, jak i mężczyzn [110].

U niepłodnych mężczyzn wykazano zmniejszoną ekspresję i aktywność PHGP<sub>x</sub> we wstawce plemników [29,46,67] oraz mniejszą zdolność mitochondriów takich plemników do gromadzenia rodaminy 123, co wskazywało na obniżony potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej [46]. Jednocześnie obserwowano nieprawidłową ultrastrukturę tych mitochondriów [46,67]. Zmiany te prowadziły do dyskinezy plemników i występowały u pacjentów z oligoastenozoospermia [29,46]. Zmniejszona ekspresja PHGP<sub>x</sub> może wywoływać apoptozę komórek plemnikotwórczych podczas spermatogenezy,



co wiąże się z antyapoptotyczną rolą PHGP<sub>x</sub>, zapobiegającą powstawaniu i gromadzeniu się nadtlenków w mitochondriach komórek plemnikotwórczych [67,73].

W innych przypadkach, zaburzenia funkcjonalne mitochondriów wiązały się z ich zmianami morfologicznymi [28]. Folgero i wsp. [28] wykazali upośledzenie aktywności enzymów kompleksów łańcucha oddechowego mitochondriów plemników pacjentów z chorobami mitochondrialnymi. Plemniki takich pacjentów miały obniżoną zdolność do ruchu, a ich mitochondria ujawniały pogrubienia błon, zwiększenie macierzy oraz liczne inkluzje lipidowe.

Obniżona aktywność enzymów łańcucha oddechowego oraz enzymów mitochondrialnych współpracujących z łańcuchem oddechowym (LDH-C<sub>4</sub>, oksydoreduktazy zależne od NADH-diaforaza/NADH) często jest przyczyną astenozoospermii, niekiedy idiopatycznej [31,32,97,98,99,123].

Aktywność wspomnianych enzymów decyduje o funkcji energetycznej plemników i dalej o jakości ich ruchu i przeżyciu. Obniżona zdolność oksydoredukcyjna mitochondriów plemników czy też niski potencjał ich wewnętrznej błony mitochondrialnej – jak wynika z badań własnych – zanotowana była w niektórych przypadkach astenozoospermii (ryc.5) [88]. Podobne zaburzenia funkcjonalne mitochondriów obserwowano również w badaniach doświadczalnych przeprowadzonych na zwierzętach. Zmniejszone odczyny cytochemiczne na mitochondrialne oksydoreduktazy/NADH, częściowy lub całkowity ich brak we wstawkach plemników obserwowano w przypadku intoksykacji szczurów związkami ołowiu (ryc.1A) [84], w eksperymentalnej hiperprolaktynemii wywołanej metaklopramidem [56] oraz podczas rozrzedzania nasienia knura stosując rozrzedzalnik BTS [34].

Większość wyników badań ujawnia istotne korelacje między aktywnością łańcucha oddechowego lub aktywnością LDH-C<sub>4</sub> a ruchem, żywotnością czy koncentracją plemników [57,99,123]. W niektórych przypadkach badania aktywności LDH-C<sub>4</sub> [57] oraz w przypadku oceny aktywności diaforazy/NADH, badacze donoszą o braku korelacji między ruchem plemników lub ich żywotnością, a aktywnością wspomnianych enzymów [32]. Podwyższoną aktywność diaforazy i LDH-C<sub>4</sub> stwierdza się w przypadkach oligozoospermii [32,80], oligoastenoteratozoospermii [33], a także w przypadku plemników z uszkodzonym akrosomem [57]. Badania sugerują, iż obecność niedojrzałych form plemników zawierających krople cytoplazmatyczne może być przyczyną podwyższonej aktywności enzymów [33]. Z badań własnych, przeprowadzonych na pacjentach z astenozoospermia wynika, że przetrwałe krople cytoplazmatyczne zawierają dodatkowe mitochondria o prawidłowej funkcji (ryc. 3) [85,88,89]. Mogłoby to tłumaczyć zwiększoną aktywność omawianych enzymów. Ponadto, dyskutowane wyniki są dowodem, iż plemniki tworzą heterogenną populację i nie zawsze dysfunkcja mitochondriów jest przyczyną astenozoospermii, co również potwierdziły wyniki badań własnych [88,89]. W niektórych przypadkach astenozoospermii stwierdzono wysoki odsetek plemników z mitochondriami o prawidłowej funkcji, spolaryzowanych, z wysokim potencjałem wewnętrznej błony (ryc. 5). Wyniki wskazywały, że astenozoospermia była związana z różnorodnymi deformacjami wstawki plemników [88,89].

## MORFOLOGICZNE DEFORMACJE OSŁONKI MITOCHONDRIALNEJ MOGĄ BYĆ EFEKTEM ZABURZEŃ SPERMIOGENEZY I MOGĄ MIEĆ PODŁOŻE GENETYCZNE

W niektórych przypadkach astenoteratozoospermii, gdy stwierdza się niewielki odsetek komórek wykazujących ruch postępowy oraz silne deformacje wstawki i witki plemników, można oczekiwać, iż przyczyna tych zaburzeń ma podłoże genetyczne [6,7,9,16,35,66,81,85,88,90,94].

Z badań przeprowadzonych na myszach [78,90] wynika, że za prawidłowe różnicowanie się osłonki mitochondrialnej i wytworzenie witki plemnika odpowiedzialne są geny zlokalizowane w proksymalnym rejonie chromosomu 17. Rejon ten oznaczony u szczepu dzikiego (+/+) jako *t complex* podlega całkowitemu odwróceniu (*t* haplotyp) lub częściowemu odwróceniu (*s* haplotyp) prowadzącemu do niepłodności. Tutaj zlokalizowane są, oddziałujące ze sobą, genetyczne czynniki niepłodności (*interacting sterility factors*): *tsc1*, *tsc2* itd., zawierające geny (*Hst*) przyczyniające się do obniżonej lub braku ruchliwości plemników. *Hst-7*, najprawdopodobniej związany z ekspresją *tcs1*, odgrywa decydującą rolę dla ruchu postępowego plemnika, gdyż wpływa na rozmieszczenie, jak również dojrzewanie mitochondriów i powoduje powstanie silnie zawiniętych witek przypominających worki (*sacks*), natomiast *Hst-6*, związany z ekspresją *tcs2*, odpowiedzialny jest za wytworzenie zakręconej witki plemnika (*curlicules*). U heterozygot *s/t*, w obrazach mikroskopowo-elektronowych, obok wymienionych deformacji witek plemników obserwuje się plemniki ze skróconą witką i/lub z pogrubionymi wstawkami (*bubbles*) zawierające zwakuolizowane, morfologicznie niedojrzałe i nieprawidłowo rozmieszczone nadliczbowe mitochondria oraz plemniki z segmentowym brakiem mitochondriów. W przypadku heterozygot *t/+* wykazano umiarkowanie obniżoną ruchliwość plemników i opóźnioną ich zdolność do penetracji *zona pellucida*, podczas gdy u homozygot *t/t* rejestrowano całkowitą sterylność [78].

Z badań własnych [88,89], przeprowadzonych na plemnikach ludzkich, wynika, że w niektórych przypadkach astenozoospermii przyczyną zaburzeń ruchu plemników są zmiany morfologiczne ich wstawek, co wykazał również Pedersen i wsp. [81] oraz Mundy i wsp. [66]. Bardzo często defekty te występowały obok jednoczesnych zmian akrosomu, główki i zaburzeń kondensacji chromatyny. Klasyfikowało to także pacjenta do grupy zaburzeń morfologicznych – teratozoospermii. Stąd większość badanych pacjentów z astenozoospermia to przypadki astenoteratozoospermii (70–80%). Badania z użyciem fluorochromów mających powinowactwo do mitochondriów (JC-1, Mito Tracker Green FM) (ryc. 1D,E,F) oraz obserwacje mikroskopowo-elektronowe wykazały różnorodność zaburzeń morfologicznych wstawek, często zawierających nadliczbowe, zbyt liczne mitochondria zlokalizowane poza osłonką mitochondrialną, tuż pod błoną komórkową lub w przetrwałej kropli cytoplazmatycznej plemnika (ryc. 3), co sugerowało obecność niedojrzałych form plemników [85,88,89]. Niekiedy ilość mitochondriów wydawała się prawidłowa, ale ich rozmieszczenie było nieuporządkowane, nieregularne. Ponadto, występowały plemniki z zawiniętą witką wokół główki i kropli cytoplazmatycznej zawierającej mitochondria. Najbardziej drastyczne defekty morfologiczne obserwowano w plemnikach, które nie miały długiej



typowej witki, zawierały jedynie cytoplazmatyczne „worki” z nieprawidłowo ukształtowaną wstawką, często z bezładnie rozrzuconymi mitochondriami (ryc. 4).

W większości, mitochondria zdeformowanych wstawek miały wysoki potencjał wewnętrznej błony stwierdzony testem z JC-1 w mikroskopie fluorescencyjnym (ryc. 1E), jak również pełne zdolności oksydoredukcyjne ocenione za pomocą reakcji cytochemicznej na oksydoreduktazy/NADH [83,85,88,89]. Nadliczbowe mitochondria, jak i te ułożone w sposób nieuporządkowany w obrębie wstawki, były organellami o prawidłowej funkcji. Ich ilość i nieprawidłowe rozmieszczenie oraz obecność kropli cytoplazmatycznej zdecydowanie obciążała zarówno morfologicznie, jak i funkcjonalnie plemniki. Takie plemniki wykazywały jedynie ruch postępowy nieprostoliniyny (ruch wolny) lub też niepostępowy, bądź też nie miały ruchu. W takich przypadkach kategoria ruchu plemnika zależała od stopnia zaawansowania deformacji jego wstawki. Te przypadki astenozoospermii nie były związane z zaburzeniami energetycznymi mitochondriów plemników, ale z wyraźnymi zmianami morfologicznymi ich wstawek (ryc. 2,3,4,5) [88,89].

Ponadto, morfologiczno-funkcjonalne badania (ocena mikroskopowo-elektronowa, cytochemiczna i fluorescencyjna z użyciem sond mitochondrialnych) wykazały we wstawkach plemników, niektórych pacjentów z astenozoospermia, wyraźne skrócenie wstawek plemników. Wstawki zawierały mniejszą ilość mitochondriów, ich brak segmentowy lub też całkowity (około 80% komórek) (ryc. 2,4) [88]. Podobne wyniki morfologiczne uzyskał Mundy i wsp. [66]. Autorzy stwierdzili istotnie mniejszą długość wstawek plemników pacjentów z zaburzeniem ruchu plemników niż u pacjentów płodnych. Obserwacje mikroskopowo-elektronowe plemników wykazały ponadto, że zaburzenia mitochondrialne nie są jedyną przyczyną obniżonej ruchliwości. Uszkodzenie obwodowych włókien gęstych i aksonemy – struktur zaangażowanych w ruch plemnika – może towarzyszyć zmianom mitochondrialnym [35,85,88,89].

Te liczne morfologiczne zmiany wstawek i witek plemników sugerują wyraźne zaburzenia w formowaniu się osłonki mitochondrialnej podczas spermiogenezy [66,81] i mogą być związane z apoptozą spermatyd [30,70,89], jak również mieć podłoże genetyczne [7,90]. Nie wyklucza to jednak, iż niektóre z defektów wstawek i witek mogą powstać w najądrzu zarówno te o charakterze morfologicznym, jak i molekularnym [53,77,82]. Podczas wędrówki plemników przez najądrze zarówno białka mitochondrialne, jak białka otoczki włóknistej plemników podlegają molekularnym zmianom, co w efekcie prowadzi do powstania w ich obrębie kowalencyjnych wiązań S-S, które określają jakość mitochondriów i dalej decydują o jakości ruchu plemników [5,13,14,62,111]. Uszkodzenie funkcji komórek nabłonkowych przewodu najądrza może prowadzić do obniżonej ruchliwości plemników.

## MUTACJE MITOCHONDRIALNEGO DNA PLEMNIKÓW

Mitochondria plemnika są eliminowane podczas zapłodnienia komórki jajowej

Mutacje mitochondrialnego DNA (mtDNA) występujące w plemnikach mogą być dziedziczone po matce lub też powstają podczas spermatogenezy i dalej nie są przekazywane potomstwu, gdyż mitochondria plemnika podczas zapłodnienia podlegają specyficznej proteolizie z udziałem ubikwityny, co wiąże się z usunięciem ojcowskiego mtDNA [19,21,22,58,107,108,112,113,117,118]. Po wnikięciu plemnika do oocyty, mitochondria plemnika pozostają tylko do trzeciego podziału mitotycznego zygoty [21,112,113], gdyż rozpoznawane są jako obce [107]. Shitara i wsp. [107] sugerują, że mitochondria spermatyd i plemnika zawierają specyficzne mitochondrialne czynniki rozpoznawane przez cytoplazmę komórki jajowej. Takich czynników nie mają, testowane przez autorów, np. mitochondria hepatocytów. Wprowadzone do komórki jajowej nie są przez nią eliminowane. W stadium czterech blastomerów, mitochondria plemnika ulegają eliminacji wskutek ubikwitynacji i nie wchodzi w skład mitochondriów dzielących się blastomerów. Sutowsky i wsp. [112,113,118] wykazali, że ubikwityna ma zdolność przyłączenia się do białek błonowych mitochondriów plemnika (np. prohibityny) podczas pierwszych podziałów zygoty. Zamaskowane ubikwitynowane epitopy białek mitochondrialnych stają się dostępne dla ubikwityny dzięki redukcji mostków dwusiarczkowych tych białek, które – jak wspomniano wcześniej – powstają podczas dojrzewania plemników w najądrzu. Redukcja błonowych białek mitochondrialnych najprawdopodobniej powoduje destabilizację osłonki mitochondrialnej podczas pierwszych podziałów zygoty i umożliwia dalszą degradację mitochondriów plemnika w obrębie proteasomów. Molekularna transformacja białek mitochondrialnych wydaje się procesem niezbędnym w usuwaniu mitochondriów plemnika z komórki jajowej.

Komórki plemnikotwórcze i plemniki zawierające uszkodzone mitochondria  
mogą być eliminowane

Podczas spermatogenezy może powstawać duża ilość mutacji zarówno jądrowego, jak i mitochondrialnego genomu, ze względu na wysoką aktywność mitotyczną komórek prekursorowych – spermatogonii, które w takiej sytuacji narażone są na działanie różnych czynników mutagennych (np. promieniowanie, ksenobiotyki, toksyny metaboliczne, dym papierosowy i inne), w tym szczególnie stresu tlenowego [2,103,126]. Zwraca się uwagę na agresywne działanie zarówno w nabłonku plemnikotwórczym, jak i w nasieniu, reaktywnych form tlenu (ROS – *reactive oxygen species*), które wobec mało skutecznej ochrony antyoksydacyjnej komórek germinalnych i plemników [2,47,62,101] mogą uszkadzać nieosłonięty białkami histonowymi genom mitochondrialny będący przez to łatwym dla nich celem [103,126]. Należy również pamiętać, że w warunkach fizjologicznych same mitochondria są źródłem ROS, gdyż 1–5% tlenu zużytego przez łańcuch oddechowy jest uwalniane w postaci nadtlenków i  $H_2O_2$  produkowanych przez kompleks I i III łańcucha oddechowego [103]. W ten sposób mtDNA jest bardziej narażony na działanie ROS niż genom jądrowy. Sytuacja staje się jeszcze bardziej kry-



tyczna, ponieważ uszkodzenie mtDNA prowadzi do zmniejszenia aktywności łańcucha oddechowego, który w takiej sytuacji zwiększa produkcję ROS, a zatem i uszkodzenie mtDNA prowadzące do powstania mutacji (ryc.7) [103,126]. Miarą uszkodzenia mtDNA jest obecność w nim 8-hydroksydeoksyguaniny. Naprawa mtDNA głównie dotyczy wycinania uszkodzonych zasad (BER – *base excision repair*), a nie nukleotydów, bowiem mitochondria nie dysponują dostatecznym systemem eliminującym nieprawidłowe nukleotydy (NER – *nucleotide excision repair*) [103].

Większość błędów w jądrowym DNA jest usuwana przez enzymatyczne systemy naprawcze [4]. W innych przypadkach, gdy defekty jądrowego i mtDNA nie są naprawiane, komórki podlegają programowanej śmierci, czyli apoptozie (ryc.7) [15,64,125]. Apoptoza w nabłonku plemnikotwórczym jest w pewien sposób zjawiskiem korzystnym, obronnym, niedopuszczającym do rozwoju tych komórek, które mają poważne zaburzenia materiału genetycznego lub też zostały uszkodzone w inny sposób [38,70]. Z drugiej jednak strony, w warunkach patologicznych, może przyczynić się do zmniejszenia populacji dojrzałych plemników [119]. Nieprawidłowe komórki są fagocytowane przez komórki Sertoliego zlokalizowane w nabłonku plemnikotwórczym [68]. Wyniki badań doświadczalnych i klinicznych wskazują, że eliminacja uszkodzonych komórek może odbywać się na terenie gonady lub też najądrza (ryc. 6) wskutek ubikwitynacji białek plemnika, w tym – wspomnianej wcześniej – prohibityny występującej w zewnętrznej błonie mitochondrialnej [115,116, 117,121]. Ubikwityna produkowana w gonadzie, jak i wydzielana przez komórki nabłonkowe najądrza łącząc się z powierzchnią uszkodzonych plemników zarówno z osłonką mitochondrialną, jak i główką i wtyką plemników „naznacza” uszkodzone plemniki. Ubikwitynowane plemniki są fagocytowane przez komórki nabłonkowe najądrza [115,117]. W takiej sytuacji ubikwitynacja plemników pozwala na kontrolę jakości nasienia [94,114,115,116,121]. Należy się spodziewać, że podczas apoptozy i/lub fagocytozy będą eliminowane te komórki, które również zawierają zmutowany mtDNA [125]. W wydłużonych spermatach, u pacjentów z zaawansowaną oligozoospermia (<5 mln plemników/ml ejakulatu), stwierdzono mutację punktową w mtDNA, w obrębie genu kodującego 6. podjednostkę syntazy ATP (ATPaza) [39]. Nie stwierdzono tej mutacji jednak w dojrzałych plemnikach obecnych w ejakulacie. Sugerowało to eliminację wydłużonych spermatach z uszkodzonymi mitochondriami z nabłonka plemnikotwórczego. W tym przypadku mutacja punktowa w mtDNA nie miała możliwości ekspresji w dojrzałych plemnikach, ale w konsekwencji spowodowała zmniejszenie populacji plemników w ejakulacie, co mogło się przyczyniać do obniżonej lub całkowitej niepłodności tych mężczyzn.

Eliminacja komórek uszkodzonych nie jest jednak procesem do końca skutecznym zarówno na terenie gonady, jak i najądrza. Wydaje się, że natura nie przewidziała tak szerokiego wachlarza defektów komórkowych, które najprawdopodobniej przekraczają zarówno możliwości naprawcze komórek, jak i możliwość eliminacji tych defektów. Zaburzenia genetyczne (zwłaszcza aneuploidie) wciąż stwierdza się w dojrzałych plemnikach [106], a ejakulowane plemniki mogą wykazywać morfologiczne i biochemiczne cechy komórek apoptotycznych [7,30,102,105]. Ponadto, w nasieniu mogą występować również ubikwitynowane plemniki, które nie zostały sfagocytowane w najądrzu. Ich odsetek w nasieniu jest istotnie większy u niepłodnych mężczyzn z astenozoospermia niż u mężczyzn

bez zaburzeń płodności [94,114]. Wydaje się, że uszkodzone komórki potrafią „uniknąć” eliminacji. Obecność ich w dużej liczbie w nasieniu nie rokuje dobrze. Z drugiej jednak strony, biorąc pod uwagę, jak duża liczba spermatogonii wchodzi w proces spermatogenezy i jak duża liczba dzielących się i różnicujących komórek plemnikotwórczych podlega programowanej śmierci (do 50%) [38,64], można się spodziewać, że natura niejako przewiduje i dopuszcza określoną ilość nieprawidłowych komórek w stosunku do odpowiednio dużej liczby form prawidłowych.

### Obecność mutacji w mtDNA plemnika może przyczyniać się do niepłodności męskiej

Mutacje mtDNA mogą być przyczyną zaburzeń spermatogenezy i powodować niepłodność męską [40,44,51,52,95,98,126]. Na początku lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku wykazano, że delecja mtDNA 4977bp powoduje przedwczesne starzenie się gonady męskiej (*premature testicular ageing*) u mężczyzn w wieku 36 lat [18]. Wykryto ją ponadto w prawidłowym mięśniu sercowym, mózgu starszych pacjentów, a także w mieszkach włosowych.

Mutacje mtDNA plemników są przyczyną obniżonej aktywności enzymów kompleksów łańcucha oddechowego, prowadzącej do mało wydajnej fosforylacji oksydacyjnej, spadku ATP i w końcu do apoptozy i/lub dyskinezy plemników ludzkich (ryc. 7) [28,98,126]. Ruiz-Pesini i wsp. [98] analizując występowanie mutacji w mtDNA plemników ludzkich rasy białej wykazali, że pacjenci z astenozoospermią zawierają mtDNA należący do haplogrupy T, natomiast pacjenci z prawidłowym ruchem plemników do haplogrupy H. Autorzy stwierdzili, że haplogrupa T zawierała mutacje w mtDNA w obrębie genów 1 i 2 podjednostki kompleksu I i IV łańcucha oddechowego (ND1 i ND2 oraz CO I i CO II odpowiednio), w genie 6 podjednostki syntazy ATP, w genach rRNA i tRNA. Wymienione mutacje punktowe prowadzą do substytucji aminokwasowej odpowiednich białek łańcucha oddechowego oraz zaburzeń syntezy ATP i białek mitochondrialnych w mitochondriach plemników. Ruiz-Pesini i wsp. [98] sugerują, że mogą być patogenne, gdyż u pacjentów z astenozoospermią, należących do haplotypu T, występował istotny spadek aktywności kompleksu I i IV łańcucha oddechowego. Fenotypowo ujawniają się one zaburzeniem ruchu w dużej liczbie plemników.

Wielokrotne delecje 4977 oraz 7345 i 7599 bp mtDNA plemników, mutacje punktowe A3243G, 9055, 11719 mtDNA pojawiają się częściej u niepłodnych mężczyzn z oligozoospermią i astenozoospermią, a także u pacjentów z oligoastenoteratozoospermią niż u pacjentów płodnych z prawidłowymi parametrami nasienia [40,51,52,75,99,109]. Stwierdzono [51,109,126] ujemną korelację pomiędzy częstością występowania mutacji mtDNA a ruchem plemników. We frakcji plemników ruchliwych 2,5% badanych komórek wykazywała delecje mtDNA, natomiast we frakcji plemników ze zmniejszoną ruchliwością aż 40% [51], co wyraźnie wskazuje, że mutacje mtDNA wiążą się z dyskinezą plemników [51,52,75,98,109]. Potwierdzają to również wyniki badań O'Connell i wsp. [76]. Autorzy ci zaobserwowali większy zasięg występowania mutacji mtDNA we frakcji plemników z obniżoną ruchliwością niż we frakcji plemników



ruchliwych. Wyniki badań są jednak rozbieżne. Ci sami autorzy [75], w innych badaniach nie stwierdzili istotnej różnicy w odsetku plemników zawierających wielokrotne delecje mtDNA pomiędzy pacjentami płodnymi i z zaburzeniem płodności. Odsetek plemników z prawidłowym mtDNA u pacjentów płodnych wynosił 50%. Wyniki badań klinicznych dowodzą, że mutacje mtDNA plemników mogą, w stosunkowo dużym zakresie, występować u mężczyzn z prawidłowymi parametrami nasienia, jak i w grupie pacjentów z morfologiczno-funkcjonalnymi zaburzeniami plemników [20,95]. Reynier i wsp [95] wykazali wielokrotne delecje mtDNA plemników u pacjentów z normozoospermią (84% badanych pacjentów), jak i z oligoastenozoospermią (86%). Ten wysoki odsetek w obu grupach pacjentów z delecjami mtDNA plemników autorzy tłumaczą małą stabilnością mtDNA, którego replikacja i transkrypcja podczas spermatogenezy ulega zmniejszeniu. Podyktowane jest to funkcją plemnika, wyposażonego w niezbędne białka enzymatyczne i strukturalne potrzebne do przeżycia w męskich i żeńskich drogach płciowych, aby przenieść materiał genetyczny do komórki jajowej. Główną funkcją mitochondriów dojrzałych plemników jest dostarczanie ATP. Organelle te nie dzielą się. Można zatem przypuszczać, zgodnie z sugestią Reynier i wsp. [95], że system genetyczny mitochondriów plemników staje się poniekąd zbędny. Dowodem na to może być zmniejszenie się ekspresji (*down regulation*), specyficznego dla gonady męskiej, mitochondrialnego czynnika transkrypcyjnego (*testis specific mtTFA*) zaangażowanego w replikację mtDNA podczas spermatogenezy [55,74,75,91,92].

Porównując jakość mtDNA plemników aspirowanych z gonady i najądrza wykazano większą wrażliwość tych ostatnich na uszkodzenia [74,75]. W przypadku pacjentów z obstrukcyjną azoospermią ich plemniki najądrzowe zawierały więcej wielokrotnych delecji mtDNA i ich genom mitochondrialny był bardziej pofragmentowany niż genom mitochondriów plemników pobranych z gonady. Podobna sytuacja występowała w przypadku genomu jądrowego plemników najądrzowych, który wykazywał zaburzenia integralności [74]. Wskazuje to również na powiązanie jakości obu genomów [60,74,76].

Jakość i zawartość kopii genomu mitochondrialnego dojrzałych plemników może decydować o płodności męskiej [96]. W mitochondriach plemników pacjentów nieplodnych lub z upośledzoną płodnością stwierdza się zmniejszoną liczbę kopii mtDNA (*depletion*) [51,52,126]. Każde mitochondrium zawiera jedną kopię mtDNA. W dojrzałych plemnikach ludzkich występuje 100 cząsteczek mtDNA [19]. Należy zwrócić uwagę, że w różnych przypadkach astenozoospermii może występować nadmiar mitochondriów deformujących wstawkę lub zmniejszona ich ilość, bądź też brak mitochondriów w obrębie wstawkę plemnika [35,66,81,88], co niewątpliwie będzie wiązało się z zawartością mtDNA. Dlatego też ilość mtDNA może być powiązana z morfologiczno-funkcjonalnymi parametrami plemników i może się zmieniać w zależności od odsetka ruchliwych plemników zawierających prawidłową liczbę funkcjonalnych mitochondriów [23]. Niektórzy autorzy [52,126], badając parametry ruchu plemników za pomocą komputerowej analizy ruchu (*CASA, Computer Assisted Semen Analyzer*), znaleźli pozytywną korelację pomiędzy zawartością mtDNA a odsetkiem plemników z ruchem progresywnym oraz odsetkiem plemników z innymi istotnymi parametrami ruchu: BCF (*Beat-Cross Frequency*), LIN (*linearity*) i ALH (*the amplitude of the lateral head displacement*). Ilość mtDNA zwiększała się wraz ze wzrostem odsetka

plemników ruchliwych. Wskazuje to na ścisłą zależność pomiędzy zdolnością plemników do ruchu a zawartością jego mtDNA, który decyduje o prawidłowej funkcji mitochondriów [23,126]. Okazuje się jednak, że zawartość ta niekoniecznie musi być związana ze zmniejszoną liczbą czy nieprawidłową ultrastrukturą mitochondriów w obrębie wstawki plemnika. Wei i wsp [126] przeprowadzając badania mikroskopowo-elektronowe plemników pacjentów z astenozoospermią, u których wykazali zmniejszoną liczbę kopii mtDNA, nie stwierdzili zmian w mitochondriach. Wydaje się zatem, że w tym przypadku zmniejszona liczba kopii mtDNA może być powiązana z upośledzeniem jego replikacji podczas spermatogenezy [54,96,126]. Rovio i wsp. [96] wykazali, że mutacja mitochondrialnej polimerazy wiąże się z niepłodnością męską. Wynika z tego, że prawidłowa liczba mitochondriów w populacji badanych plemników niekoniecznie wskazuje na prawidłową ilość mtDNA.

Omawiane jednak zaburzenia genetyczne mają jedynie swoją kliniczną ekspresję podczas życia pacjenta. Nie są dziedziczone, ale mogą odgrywać istotną rolę podczas zapłodnienia komórki jajowej.

## **ZNACZENIE MITOCHONDRIÓW PLEMNIKA W ZAPŁODNIENIU KOMÓRKI JAJOWEJ**

W dobie intensywnego rozwoju technik wspomaganego rozrodu, a przede wszystkim metod zapłodnienia pozaustrojowego, w tym mikromanipulacji, wydaje się, że brak akrosomu czy dyskineza plemników mają niewielkie znaczenie. Zastosowanie metody zapłodnienia pozaustrojowego – ICSI (*Intracytoplasmic Sperm Injection*) pozwala na przeniesienie do komórki jajowej nawet plemnika o nieprawidłowej morfologii, z brakiem lub obniżoną ruchliwością czy też niezdolnego do odbycia reakcji akrosomalnej [3,12,26,41,69,79]. W takich przypadkach czynnikiem ograniczającym powstanie zygoty i dalszy jej rozwój jest dojrzałość chromatyny plemnika, jej kondensacja i integralność. Nieprawidłowo skondensowana i pofragmentowana chromatyna, a także zaburzenia chromosomowe mogą być przyczyną braku uzyskania koncepcji czy też spontanicznych poronień [25,36,37,42,43,44,59,60,74,87]. Wykazano również, że istnieje związek pomiędzy integralnością genomu jądrowego a jakością mtDNA plemników [60,74,76]. Czy uszkodzenie mitochondriów plemnika ma zatem znaczenie podczas zapłodnienia i podziałów zygoty? Wyniki badań klinicznych i doświadczalnych oraz opinie o roli mitochondriów w procesie zapłodnienia są kontrowersyjne.

Olmedo i wsp. [79] oraz Alosilla Fonttis i wsp.[3] uzyskali ciążę u pacjentek objętych programem zapłodnienia pozaustrojowego, gdy do ICSI użyli plemników z uszkodzoną lub brakiem osłonki mitochondrialnej, defektami aksonemy oraz z dysplazją osłonki włóknistej. Wskazuje to, że uszkodzenie witki plemnika w tych przypadkach nie miało wpływu na uzyskanie koncepcji. Podobnie, Ahmadi i wsp. [1] nie stwierdzili zaburzeń tworzenia się przedjądrza męskiego i rozwoju blastocysty mysiej w przypadku użycia,



w warunkach *in vitro*, plemników z niefunkcjonalnymi mitochondriami, traktowanymi wcześniej cyjankiem potasu.

Uszkodzenie mitochondriów plemników nie jest jednak obojętne dla dzielącej się zapłodnionej komórki jajowej. W warunkach prawidłowych ma ona zdolność rozpoznawania mitochondriów plemnika jako obcych i ich usuwania przez ubikwitinację białek mitochondrialnych, co wiąże się z usunięciem ojcowskiego mtDNA [112,113,117,-118]. Uszkodzenie mitochondriów może zakłócać proces ich degradacji, co z kolei może prowadzić do apoptozy dzielących się blastomerów i w dalszej konsekwencji do aborcji rozwijającego się przedimplantacyjnego zarodka [48,50,120]. Zatem wprowadzenie do komórki jajowej plemnika z nieprawidłową chromatyną i/lub uszkodzoną osłonką mitochondrialną stwarza ryzyko poronień. Z badań własnych przeprowadzonych w mikroskopie elektronowym oraz analizy nacięć DNA, wyraźnie wynika, że plemniki, których chromatyna wykazuje zaburzenia kondensacji i integralności, przeważnie ujawniają również defekty osłonki mitochondrialnej i w obrębie wstawki zawierają zwykle przetrwałą kroplę cytoplazmatyczną, która często obejmuje również szyjkę i główkę plemnika (ryc. 3A,B,F; 4B,C) [88,89]. Potwierdziły to również badania Fisher i wsp. [27], którzy stwierdzili pozytywną korelację między odsetkiem plemników z kroplą cytoplazmatyczną a odsetkiem plemników ze zdenaturowanym DNA

Uszkodzenie mitochondriów może dotyczyć morfologicznych zmian o różnym nasileniu, jak i zmian molekularnych w obrębie białek mitochondrialnych, w tym prohibityny, będącej substratem dla ubikwityny. Zmienione, czy też niedojrzałe białka mitochondrialne plemnika, wskutek zaburzeń ich dojrzewania na terenie najądrza, gdzie ma miejsce powstawanie niezbędnych mostków siarczkowych w ich obrębie, zapobiegające przedwczesnej ich ubikwitinacji, mogą być rozpoznane i ubikwitynowane już w najądrzu, zamiast w warunkach prawidłowych dopiero w cytoplazmie komórki jajowej. Dokonuje ona redukcji mostków siarczkowych prohibityny, o czym wspomniano już wcześniej. Plemniki z tak zmienionymi mitochondriami są fagocytowane przez komórki nabłonkowe najądrza, bądź jeśli „wymkną” się fagocytozie, będą dalej pojawiały się w ejakulacie [115,117,121]. Można przypuszczać, że komórka jajowa zapłodniona takimi plemnikami, zwłaszcza przy zastosowaniu ICSI, w konsekwencji, nie będzie mogła rozpoznać i degradować jego mitochondriów. **Dlatego też nie można bagatelizować defektów mitochondrialnych plemników.**

Pełna diagnostyka mitochondriów obejmująca skryningowy test cytochemiczny na oksydoreduktazy/NADH (ryc.1A,B,C) [34,56,83,84,85,86,88,89], cytofluorometryczna ocena funkcji mitochondriów (ryc.5) [63,88,122], obserwacje mikroskopowo-fluorescencyjne z wykorzystaniem sond mitochondrialnych (ryc.1D,E,F) [88,89], identyfikacja plemników ubikwitynowanych [94,114,116,121] oraz w niektórych przypadkach, jako uzupełniająca i potwierdzająca ocena mikroskopowo-elektronowa wstawki plemników (ryc.2,3,4) [8,9,10,11,14,86,89,94], nie tylko ma wartość poznawczą, ale i aplikację kliniczną [8,26,61,69]. Pozwala poniekąd przewidzieć szansę na uzyskanie zapłodnienia tak w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro*. Taka morfologiczno-funkcjonalna diagnostyka mitochondriów plemników staje się wręcz konieczna, zwłaszcza przy zastosowaniu technik wspomaganego rozrodu.

## PODZIĘKOWANIA

Składam serdeczne podziękowania prof.dr hab. Lidii Wenda-Różewickiej, prof. dr hab. Jerzemu Kawiakowi, dr hab. Marii Laszczyńskiej i dr hab. Barbarze Wiszniewskiej za pomoc w przeprowadzeniu moich badań oraz uwagi w przygotowaniu manuskryptu.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] AHMADI A, NG Sch. Sperm head decondensation, pronuclear formation, cleavage and embryonic development following intracytoplasmic injection of mitochondria-damaged sperm in mammals. *Zygote* 1997; **5**: 247–253.
- [2] AITKEN RJ, KRAUSZ C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*. 2001; **122**: 497–506.
- [3] ALOSILLA FONTTIS A, NAPOLITANO R, TOMAS MA. Successful ICSI in a case of severe asthenozoospermia due to 93% nonspecific axonemal alterations and 90% abnormal or absent mitochondrial sheaths. *Reprod Biomed Online* 2002; **5**: 270–272
- [4] BAARENDS WM, LAAN R, GROOTGOED A. DNA repair mechanism and gametogenesis. *Reproduction* 20001; **121**: 31–39.
- [5] BACCETTI B. The human spermatozoon. W: Van Blerkom J, Motta PM. [red.] *Ultrastructure of Reproduction*. Boston: Kluwer Academic Publisher, 1984; 110–126.
- [6] BACCETTI B. Sperm ultrastructural defects. W: Frick J, Waites GMH [red.] *The VIth International Congress of Andrology Postgraduated courses*. Salzburg, 1997: 33–38.
- [7] BACCETTI B, CAPITANI S, COLLODEL G, CAIRANO GDI, GAMBERA L, MORETTI E, PIOMBONI P. Genetic sperm defects and consanguinity. *Hum Reprod*. 2001; **16**: 1365–1371.
- [8] BACCETTI B, CAPITANI S, COLLODEL S, COLLODEL G, STREHLER E, PIOMBONI P. Recent advances in human sperm pathology. *Contraception* 2002; **65**: 283–287.
- [9] BACCETTI B, CAPITANI S, COLLODEL G, ESTENOZ M, GAMBERA L, PIOMBONI P. Infertile spermatozoa in a human carrier of robertsonian translocation 14;22. *Fertil Steril* 2002; **78**: 1127–1130.
- [10] BARTOOV B, ELTES F, PANSKY M, LANGZAM J, REICHART M, SOFFER Y. Improved diagnosis of male fertility potential via a combination of quantitative ultramorphology and routine semen analyses. *Hum Reprod* 1994; **9**: 2096–2975.
- [11] BARTOOV B, ELTES F, REICHART M, LANGZAM J, LEDERMAN H, ZABLUDOVSKY N. Quantitative ultramorphological (QUM) analysis of human sperm: diagnosis and management of male infertility. *Arch Androl* 1999; **42**: 161–177.
- [12] BARTOOV B, BERKOVITZ A, ELTES F, KOGOSOVSKY A, YAGODA A, LEDERMAN H, ARTZI S, GROSS M, BARAK Y. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril* 2003; **80**: 1413–1419.
- [13] BEDFORD JM, CALVIN HI. Changes in S-S linked structures of the sperm tail during epididymal maturation, with comparative observations in sub-mammalian species. *J Exp Zool* 1974; **187**: 181–204.
- [14] BOURGERON T. Mitochondrial function and male infertility. W: McElreavey M [red.] *Results and Problems in Cell Differentiation. The Genetic Basis of Male Infertility*. Berlin-Haidelberg: Springer-Verlag 2000; **28**: 197–210.
- [15] CAI L, HALESBF, ROBAIRE B. Induction of apoptosis in the germ cells of adult male rats after exposure to cyclophosphamide. *Biol Reprod* 1997; **56**: 1490–1497.
- [16] CHEMES EH, RAWE YV. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum Reprod Update* 2003; **9**: 405–428.
- [17] COURTADE M, LAGORCE CH, BUJAN L, CARATERO C, MIEUSSET R. Clinical characteristics and light and transmission electron microscopic sperm defects of infertile men with persistent unexplained asthenozoospermia. *Fertil Steril* 1998; **70**: 297–304.
- [18] CUMMINS JM, JEQUIER AM, KAN R. Molecular biology of human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics, and oxidative stress? *Mol Reprod Dev* 1994; **37**: 345–362.



- [19] CUMMINS JM. Mitochondrial DNA in mammalian reproduction. *Rev Reprod* 1998; **3**: 172–182.
- [20] CUMMINS JM, JEQUIER JM, MARTIN R, MEHMET D, GOLDBLATT J. Semen levels of mitochondrial DNA deletions in men attending an infertility clinic do not correlate with phenotype. *Int J Androl* 1998; **21**: 47–52.
- [21] CUMMINS JM. Fertilization and elimination of the paternal mitochondrial genome. *Hum Reprod* 2000; **2**: 92–101.
- [22] CUMMINS JM. Cytoplasmic inheritance and its implications for animal biotechnology. *Theriogenology* 2001; **55**: 1381–1399.
- [23] DIEZ-SANCHEZ C, RUIZ-PESINI E, LAPENA AC, MONTOYA J, PEREZ-MARTOZ A, ENRIQUEZ JA, LOPEZ-PEREZ MJ. Mitochondrial DNA content of human spermatozoa. *Biol Reprod* 2003; **68**: 180–185.
- [24] DONNELLY ET, O'CONNELL M, MCCLURE N, LEWIS SEM. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and preprepared human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000; **15**: 1552–1561.
- [25] EGOZCUE S, BLANCO J, VENDRELL JM, GARCIA F, VEIGA A, ARAN B, BARRI PN, VIDAL F, EGOZCUE J. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* 2000; **6**: 93–105.
- [26] EVIRGEN O, OZGUNER M, DEMIREL LC, SATIROGLU H, ERDEMLI E, TEKELIOGLU M. Ultrastructural analysis of TESE and semen sperm tails from patients exhibiting absolute immotility on the day of ICSI. *Arch Androl* 2003; **49**: 57–67.
- [27] FISHER MA, WILLIS J, ZINI A. Human sperm DNA integrity: correlation with sperm cytoplasmic droplets. *Urology* 2003; **61**: 207–211.
- [28] FOLGERO T, BERTHEUSSEN K, LINDAL S, TORBENGEN T, OIAN P. Mitochondrial disease and reduced sperm motility. *Hum Reprod* 1993; **8**: 1863–1868.
- [29] FORESTA C, FLOHE L, GAROLLA A, ROVERI A, URSINI F, MAIORINO M. Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biol Reprod* 2002; **67**: 967–971.
- [30] GANDINI L, LOMBARDO F, PAOLI D, CAPONECCHIA L, FAMILIARI G, VERLENGIA C, DONDERO F, LENZI A. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000; **15**: 830–839.
- [31] GAVELLA M, CVITKOVITC P. Semen LDH-X deficiency and male infertility. *Arch Androl* 1985; **15**: 173–176.
- [32] GAVELLA M, LIPOVAC V. NADH-dependent oxidoreductase (diaforase) activity and isozyme pattern of sperm in infertile men. *Arch Androl* 1992; **28**: 135–141.
- [33] GAVELLA M, LIPOVAC V, ŠVERKO V. Superoxide anion production and some sperm-specific enzyme activities in infertile men. *Andrologia* 1995; **27**: 7–12.
- [34] GAŹCZARZEWICZ D, PIASECKA M, UDAŁA J, BŁASZCZYK B, LASZCZYŃSKA M, KRAM A. Oxidoreductive capability of boar sperm mitochondria in fresh semen and during their preservation in BTS extender. *Reprod Biol* 2003; **3**: 161–172.
- [35] GOPALKRISHNAN K, PADWAL V, D'SOUZA, SHAH R. Severe asthenozoospermia: a structural and functional study. *Inter J Androl* 1995; **1**: 67–74.
- [36] HASHIMOTO S, YANAGIDA K, KATAYOSE H, YAMADA H, SATO A. Relationship between fertilizing ability of ejaculated spermatozoa and its chromatin heterogeneity. *J Obstet Gynaecol Res* 2003; **29**: 360–361.
- [37] HENKEL R, KIERSPEL E, HAJIMOHAMMAD M, STALF T, HOOGENDIJK C, MEHNERT C, MENKVELD R, SCHILL WB, KRUGER TF. DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reprod Biomed Online* 2003; **7**: 477–484.
- [38] HIKIM APS, SWERDLOFF RS. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod* 1999; **4**: 38–47.
- [39] HOLYOAKE AJ, SIN IL, BENNY PS, SIN FYT. Association of a novel human mtDNA ATPase 6 mutation with immature sperm cells. *Andrologia* 1999; **31**: 339–345.
- [40] HOLYOAKE AJ, MCHUGH P, WU M, O'CARROLI S, BENNY P, SIN L, SIN FYT. High incidence of single nucleotide substitutions in the mitochondrial genome is associated with poor semen parameters in men. *Inter J Androl* 2001; **24**: 175–182.
- [41] HOST E, LINDERBERG S, ERNST E, CHRISTENSEN F. Sperm morphology and IVF: embryo quality in relation to sperm morphology following the WHO and Kruger's strict criteria. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1999; **78**: 526–529.

- [42] HOST E, LINDERBERG S, ERNST E, CHRISTENSEN F. DNA strand breaks in human spermatozoa: a possible factor, to be considered in couples suffering from unexplained infertility. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1999; **78**: 622–625.
- [43] HOST E, LINDERBERG S, SMIDT-JENSEN S. DNA strand breaks in human spermatozoa: correlation with fertilization *in vitro* in oligozoospermic men and in men with unexplained infertility. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000; **79**: 189–193.
- [44] HOST E, LINDERBERG S, SMIDT-JENSEN S. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000; **79**: 559–563.
- [45] HUYNH T, MOLLARD R, TROUNSON A. Selected genetic factors associated with male infertility. *Hum Reprod* 2002; **8**: 183–198.
- [46] IMAI H, SUZUKI K, ISHIZAKA K, ICHNOSE S, OSHIMA H, OKAYASU I, EMOTO K, UMEDA M, NAKAGAWA Y. Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males. *Biol Reprod* 2001; **64**: 674–683.
- [47] IRVINE DS, TWIGG JP, GORDON EL, FULTON N, MILNE PA, AITKEN RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 2000; **21**: 33–44.
- [48] JESENBERGER V, JENTSCH S. Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; **3**: 112–121.
- [49] JOHN JC, JOKHI RP, BARRATT CL. Men with oligoasthenoatozoospermia harbour higher number of multiple mitochondrial DNA deletions in their spermatozoa, but individual deletions are not indicative of overall aetiology. *Mol Hum Reprod* 2001; **7**: 103–111.
- [50] JURISCOVA A, LATHAM KE, CASPERR RF, VARMUZA SL. Expression and regulation of genes associated with cell death murine preimplantation embryo development. *Mol Reprod Dev* 1998; **51**: 243–253.
- [51] KAO SH, CHAO HT, WEI YH. Mitochondrial deoxyribonucleic acid 4977-bp deletion in associated with diminished fertility and motility of human sperm. *Biol Reprod* 1995; **52**: 729–736.
- [52] KAO SH, CHAO HT, WEI YH. Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 1998; **4**: 657–666.
- [53] KRETZER DM, BAKER HWG. Infertility in men: Recent advances and continuing controversies. *J Clin Endocrin* 1999; **84**: 3443–3450.
- [54] LARSSON NG, GARMAN JD, OLDFORS A, BARSH GS, CLAYTON DA. A single Mouse gene encodes the mitochondrial transcription factor A and a testis-specific nuclear HMG-box protein. *Nat Genet* 1996; **13**: 296–302.
- [55] LARSSON NG, OLDFORS A, GARMAN JD, BARSH GS, CLAYTON DA. Down-regulation of mitochondrial transcription factor A during spermatogenesis in humans. *Hum Mol Genet* 1997; **2**: 185–191.
- [56] LASZCZYŃSKA M, PIASECKA M, KRAM A. Alterations in the mitochondria of rat spermatozoa after experimental hyperprolactinemia. *Folia Histochem Cytobiol* 1999; **37**: 87–88.
- [57] LAUDAT A, FOUCAULT P, PALLUEL AM. Relationships between seminal LDH-C4 and spermatozoa with acrosome anomalies. *Clin Chim Acta* 1997; **265**: 219–224.
- [58] LEE YJ, YJ, KIM BK, CUI XS, KIM NH. Male pronuclear formation and sperm mitochondria in porcine oocytes following intracytoplasmic injection of pig or mouse sperm. *Zygote* 2002; **10**: 117–22.
- [59] LEVY R, SEIFER-AKNIN I. Apoptosis during spermatogenesis and in ejaculated spermatozoa: importance for fertilization. *Ann Biol Clin* 2001; **59**: 531–545.
- [60] LEWIS SE. Importance of mitochondrial and nuclear sperm DNA in sperm quality assessment and assisted reproduction outcome. *Hum Fertil* 2002; **5**: 102–109.
- [61] LIM CC, LEWIS SEM, KENNEDY M, DONNELLY ET, THOMPSON W. Human sperm morphology and *in vitro* fertilization: sperm tail defects are prognostic for fertilization failure. *Andrologia* 1998; **30**: 43–47.
- [62] MAIORINO M, URSINI F. Oxidative stress, spermatogenesis and fertility. *Biol Chem* 2002; **383**: 591–597.
- [63] MARCHETTI C, OBERT G, DEFFOZEZ A, FORMSTECHEP P, MARCHETTI P. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum Reprod* 2002; **17**: 1257–1265.
- [64] MARTINČIĆ DS, KLUN IV, ZORN B, VRTOVEC HM. Germ cell apoptosis in the human testis. *Eur J Physiol* 2001; **442**: 159–160.
- [65] MIZUNO K, HIRATA S, HOSHI K, SHINOHARA A, CHIBA M. Analysis of the phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase mRNA in the rat spermatozoa and effect of selenium deficiency on the mRNA. *Biol Trace Elem Res* 2000; **74**: 71–79.
- [66] MUNDY AJ, RYDER TA, EDMONDS DK. Asthenozoospermia and the human sperm mid-piece. *Hum Reprod* 1995; **10**: 116–119.



- [67] NAKAGAWA Y, IMAI H. Novel functions of mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) as an anti-apoptotic factor. *Health Sci* 2000; **46**: 414–417.
- [68] NAKANISHI Y, SHIRATSUCHI A. Phagocytic removal of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells: mechanism and consequences. *Biol Pharm Bull* 2004; **27**: 13–16.
- [69] NARDO LG, SINATRA F, BARTOLONI G, ZAFARANA S, NARDO F. Ultrastructural features and ICSI treatment of severe teratozoospermia: report of two human cases of globozoospermia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002; **104**: 40–42.
- [70] NARISAWA S, HECHT NB, GOLDBERG E, BOATRRIGHT KM, REED JC, MILLAN JL. C-null mice produce functional sperm but undergo early testicular atrophy. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 5554–5562.
- [71] NAYERNIA K, ADHAM IM, BURKHARDT-GOTTGES, NEESEN J, MANDY RIECHE, WOLF S, SANCKEN U, KLEENE K, ENGEL W. Asthenozoospermia in mice with targeted deletion of the sperm mitochondrion-associated cysteine-rich protein (Smcp) gene. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 3046–3052.
- [72] NIKOLETTOS N, KUPKER W, DEMIREL C, SCHOPPER B, BLASING C, STURM R, FELBERBAUM R, BAUER O, DIEDRICH K, AL-HASANI S. Fertilization potential of spermatozoa with abnormal morphology. *Hum Reprod* 1999; **14**: 47–70.
- [73] NOMURA K, IMAI H, KOUMARA T, ARAI M, NAKAGAWA Y. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway. *J Biol Chem* 1999; **274**: 29294–29302.
- [74] O'CONNELL M, MCCLURE N, LEWIS SE. Mitochondrial DNA deletions and nuclear DNA fragmentation in testicular and epididymal human sperm. *Hum Reprod* 2002; **17**: 1565–1570.
- [75] O'CONNELL M, MCCLURE N, LEWIS SE. A comparison of mitochondrial and nuclear DNA status in testicular sperm from fertile men and those with obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2002; **17**: 1571–1577.
- [76] O'CONNELL M, MCCLURE N, POWELL LA, STEELE EK, LEWIS SE. Differences in mitochondrial and nuclear DNA status of high-density and low-density sperm fractions after density centrifugation preparation. *Fertil Steril* 2003; **79** (suppl 1): 754–762.
- [77] OKO R, HRUDKA F. Segmental aplasia of the mitochondrial sheath and sequelae induced by gossypol in rat spermatozoa. *Biol Reprod* 1982; **26**: 183–195.
- [78] OIDS-CLARKE P. Models for male infertility: the t haplotypes. *Rev Reprod* 1997; **2**: 157–164.
- [79] OLMEDO SB, NODAR F, CHILLIK C, CHEMES HE. Successful intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa from a patient with dysplasia of the fibrous sheath and chronic respiratory disease. *Hum Reprod* 1997; **12**: 1497–1499.
- [80] ORLANDO C, KRAUSZ C, FORTI G, CASANO R. Simultaneous measurement of sperm LDH, LDH-X, CPK activities and ATP content in normospermic and oligozoospermic men. *Inter J Androl* 1994; **17**: 13–18.
- [81] PEDERSEN H, REBBE H, HAMMEN R. Human sperm fine structure in a case of severe asthenospermia- necrospermia. *Fertil Steril* 1971; **22**: 156–164.
- [82] PIASECKA M, BARCEW-WISZNIEWSKA B, MARCHLEWICZ M, WENDA-RÓŻEWICKA L. Ultrastructure of spermatozoa from the cauda epididymis in rat chronically treated with lead acetate [Pb(II)]. *Pol J Pathol* 1996; **47**: 65–71.
- [83] PIASECKA M, WENDA-RÓŻEWICKA L, KURZAWA R, RYMASZEWSKA A. Odczyn cytochemiczny na diaforazę/NADH jako dodatkowy wskaźnik oceny plemników. *Gin Pol* 1996; suplement **IV**: 147–150.
- [84] PIASECKA M, WENDA-RÓŻEWICKA L, KRAM A. Computerized analysis of cytochemical reactions of spermatozoa in rats chronically treated with lead acetate. *Folia Histochem Cytobiol* 1997; **35**: 129–131.
- [85] PIASECKA M, WENDA-RÓŻEWICKA L, KOZANECKA A, RÓŻEWICKI S, LASZCZYŃSKA M, MARCHLEWICZ M. Zmiany we wstawkach plemników pacjentów z asthenozoospermia. *Gin Pol* 1998; **69**: 479–484.
- [86] PIASECKA M, WENDA-RÓŻEWICKA L, OGOŃSKI T. Computerized analysis of cytochemical reaction for dehydrogenases and oxygraphic studies as methods to evaluate the mitochondrial sheath in rat spermatozoa. *Andrologia* 2001; **33**: 1–12.
- [87] PIASECKA M. Zastosowanie cytometrii przepływowej do oceny kondensacji i integralności DNA plemników ludzkich. *Post Biol Kom* 2002; **29** (supl 20): 25–43.
- [88] PIASECKA M., KAWIAK J. Sperm mitochondria of patients with normal sperm motility and with asthenozoospermia: morphological and functional study. *Folia Histochem Cytobiol* 2003; **41**: 125–139
- [89] PIASECKA M, LASZCZYŃSKA M, GAJCZARZEWICZ D. Morphological and functional evaluation of spermatozoa from patients with asthenozoospermia. *Folia Morphol* 2003; **62**: 167–169.

- [90] PILDER SH, OLDS-CLARKE P, ORTH JM, JESTER WF, DUGAN L. Hst7: A male sterility mutation perturbing sperm motility, flagellar assembly, and mitochondrial sheath differentiation. *J Androl* 1997; **18**: 663–671.
- [91] RANTANEN A, LARSSON NG. Regulation of mitochondrial DNA copy number during spermatogenesis. *Hum Reprod* 2000; **2**: 86–91.
- [92] RANTANEN A, JANSSON M, OLDFORS A, LARSSON NG. Downregulations of Tfam and mtDNA copy number during mammalian spermatogenesis. *Mamm Genome* 2001; **12**: 787–792.
- [93] RAWE VY, GALAWERNA GD, ACOSTA AA, OLMEDO SB, CHEMES HE. Incidence of tail structure distortions associated with dysplasia of the fibrous sheath in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2001; **16**: 879–886.
- [94] RAWE VY, OLMEDO SB, BENMUSA A, SHIIGI SM, CHEMES HE, SUTOWSKY P. Sperm ubiquitination in patients with dysplasia of the fibrous sheath. *Hum Reprod* 2002; **17**: 2119–2127.
- [95] REYNIER P, CHRETIEN MF, SAVAGNER F, LARCHER G, ROHMER V, BARRIERE P, MALTHIERI Y. Long PCR analysis of human gamete mtDNA suggests defective mitochondrial maintenance in spermatozoa and supports the bottleneck theory for oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **252**: 373–377.
- [96] ROVIO AT, MARCHINGTON DR, DONAT S, SCHUPPE HC, ABEL J, FRITSCH E, ELLIOTT DJ, LAIPPALA P, HOLA AL i wsp.. Mutations At the mitochondrial DNA polymerase (POLG) locus associated with male infertility. *Nat Genet* 2001; **29**: 261–262.
- [97] RUIZ-PESSINI E, DIEZ C, LAPENA CHA, PEREZ-MARTOS A, MONTOYA J, ALVAREZ E, ARENAZ J, LOPEZ-PEREZ M. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. *Clin Chem* 1998; **44**: 1616–1620.
- [98] RUIZ-PESINI E, LAPENA AC, DIEZ-SANCHEZ C, PEREZ-MARTOS A, MONTOYA J, ALVAREZ E, DIAZ M, URRIES A, MONTORO L, LOPEA-PEREZ MJ, ENRIQUEZ JA. Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am J Hum Genet* 2000; **67**: 682–696.
- [99] RUIZ-PESINI E, LAPENA AC, DIEZ C, ALVAREZ E, ENRIQUEZ JA, LOPEZ-PEREZ MJ. Seminal quality correlates with mitochondrial functionality. *Clin Chim Acta* 2000; **300**: 97–105.
- [100] RUIZ-PESINI E, ALVAREZ E, ENRIQUEZ JA, LOPEZ-PEREZ MJ. Association between seminal plasma carnitine and sperm mitochondrial enzymatic activities. *Inter J Androl* 2001; **24**: 335–340.
- [101] SALEH R, AGARWAL A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl* 2002; **23**: 737–752.
- [102] SAKKAS D, MOFFATT O, MANICARDI GC, MARIETHOZ E, TAROZZI N, BIZZARO D. Nature of DNA damage in ejaculated spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 2002; **4**: 1061–1067.
- [103] SAWYER DE, HOUTEN BV. Repair of DNA damage in mitochondria. *Mut Res* 1999; **434**: 161–176.
- [104] SESHAGIRI PB. Molecular insights into the causes of male infertility. *J Biosci* 2001; **26**: 429–435.
- [105] SHEN HM, DAI J, CHIA SE, LIM A, ONG CN. Detection of apoptotic alternations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod* 2002; **17**: 1266–1273.
- [106] SHI Q, MARTIN RH. Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men. *Reproduction* 2001; **121**: 655–666.
- [107] SHITARA H, KANEDA H, SATO A, INOUE K, OGURA A, YONEKAWA H, HAYASHI JI. Selective and continuous elimination of mitochondria microinjected into mouse eggs from spermatids, but not from liver cells, occurs throughout embryogenesis. *Genetics* 2000; **156**: 1277–1284.
- [108] SHITARA H, KANEDA H, SATO A, IWASAKI K, HAYASHI J, TAYA C, YONEKAWA H. Non-invasive visualization of sperm mitochondria behaviour in transgenic mice with introduced green fluorescent protein (GFP). *FEBS Lett* 2001; **500**: 7–11.
- [109] SPIROPOULOS J, TURNBULL DM, CHINNERY PF. Can mitochondrial DNA mutations cause sperm dysfunction? *Mol Hum Reprod* 2002; **8**: 719–721.
- [110] STRAUSS E. Selenium's role in infertility explained. *Science* 1999; **285**: 1339.
- [111] SUTOVSKY P, TENGOWSKY MW, NAVARA CS, ZORAN SS, SCHATTEN G. Mitochondrial sheath movement and detachment in mammalian, but not nonmammalian, sperm induced by disulfide bond reduction. *Mol Reprod Dev* 1997; **47**: 79–86.
- [112] SUTOVSKY P, MORENO RD, RAMALHO-SANTOS J, DOMINKO T, SIMERLY C, SCHATTEN G. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* 1999; **402**: 371–372.
- [113] SUTOVSKY P, MORENO RD, RAMALHO-SANTOS J, DOMINKO T, SIMERLY C, SCHATTEN G. Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biol Reprod* 2000; **63**: 582–590.



- [114] SUTOVSKY P, TERADA Y, SCHATTEN G. Ubiquitin-based sperm assay for diagnosis of male factor infertility. *Hum Reprod* 2001; **16**: 250–258.
- [115] SUTOVSKY P, MORENO R, RAMALHO-SANTOS J, DOMINKO T, THOMPSON WE, SCHATTEN G. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *J Cell Science* 2001; **114**: 1665–1675.
- [116] SUTOVSKY P, NEUBER E, SCHATTEN G. Ubiquitin-dependent sperm quality control mechanism recognizes spermatozoa with DNA defects as revealed by dual ubiquitin-TUNEL assay. *Mol Reprod Dev* 2002; **61**: 406–413.
- [117] SUTOVSKY P. Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control: Killing three birds with one stone. *Microsc Res Tech* 2003; **61**: 88–102.
- [118] SUTOVSKY P, MCCAULEY TC, SUTOWSKY M, DAY BN. Early degradation of paternal mitochondria in domestic pig (*Sus scrofa*) is prevented by selective proteasomal inhibitors lactacystin and MG 132. *Biol Reprod* 2003; **68**: 1793–1800.
- [119] TAKAGI S, ITOH N, KIMURA M., SASAO T, TSUKAMOTO T. Spermatogonial proliferation and apoptosis in hypospermatogenesis associated with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2001; **76**: 901–907.
- [120] THOMPSON WE, BRANCH A, WHITTAKER JA, LYN D, ZIBERSTEIN M, MAYO KE, THOMAS K. Characterization of prohibitin in a newly established rat ovarian granulosa cell line. *Endocrinology* 2001; **142**: 4076–4085.
- [121] THOMPSON WE, RAMALHO-SANTOS J, SUTOVSKY P. Ubiquitination of prohibitin in mammalian sperm mitochondria: Possible roles in the regulation of mitochondrial inheritance and sperm quality control. *Biol Reprod* 2003; **61**: 88–102.
- [122] TROIANO L, GRANATA ARM, COSSARIZZA A, KALSHNIKOVA G, BIANCHI R, PINI G, TROPEA F, CARANI C, FRANCESCHI C. Mitochondrial membrane potential and DNA stability in human sperm cells: A flow cytometry analysis with implications for male infertility. *Ex Cell Res* 1998; **241**: 384–393.
- [123] VELASCO JAN, ZAPATA IT, HERNANDEZ PM, ALBACETE MP, OLTRA JT, PARICIO JJP. Lactic dehydrogenase-C4 activity in seminal plasma and male infertility. *Fertil Steril* 1993; **60**: 331–335.
- [124] VORUP-JENSEN T, HJORT T, ABRAHAM-PESKIR JV, GUTTANN P, JENSENIUS JC, UGGERHOJ E, MADENWALDT R. X-ray microscopy of human spermatozoa shows change of mitochondrial morphology after capacitation. *Hum Reprod* 1999; **14**: 880–884.
- [125] WANG J, SIVA JP, GUSTAFSSON CM, RUSTIN P, LARSSON NG. Increased *in vivo* in cells lacking mitochondrial DNA gene expression. *Proc Natl Acad Sci* 2001; **98**: 4038–4043.
- [126] WEI YH, KAO SH. Mitochondrial DNA mutation and depletion are associated with decline of fertility and motility of human sperm. *Zoological Studies* 2000; **39**: 1–12.

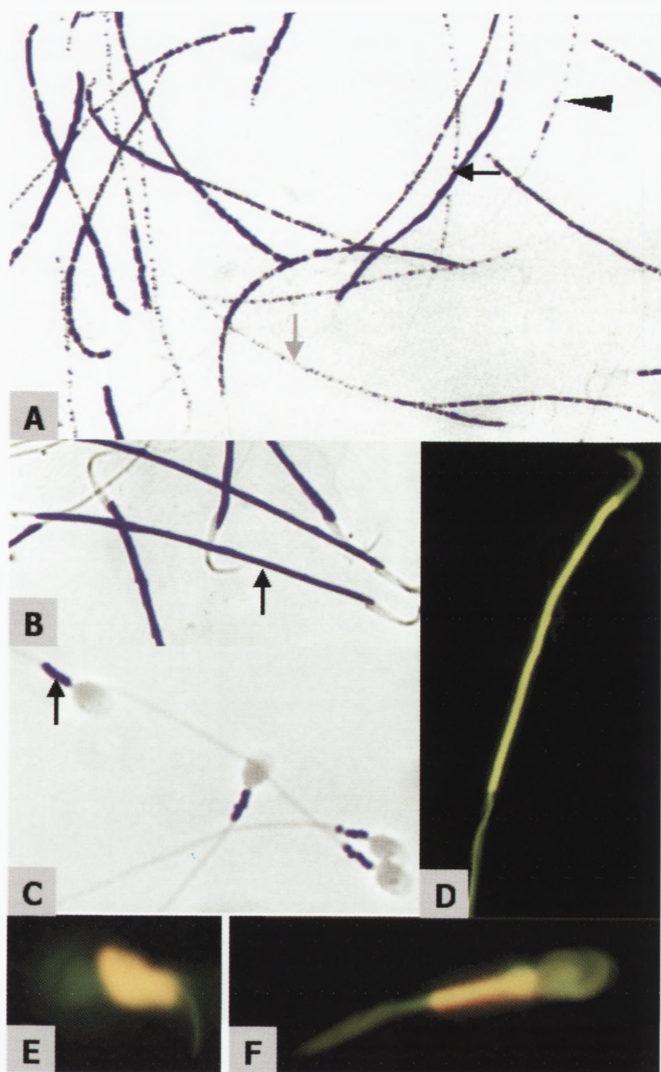
Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 18.02.2004 r.

Przyjęto: 31.03.2004 r.

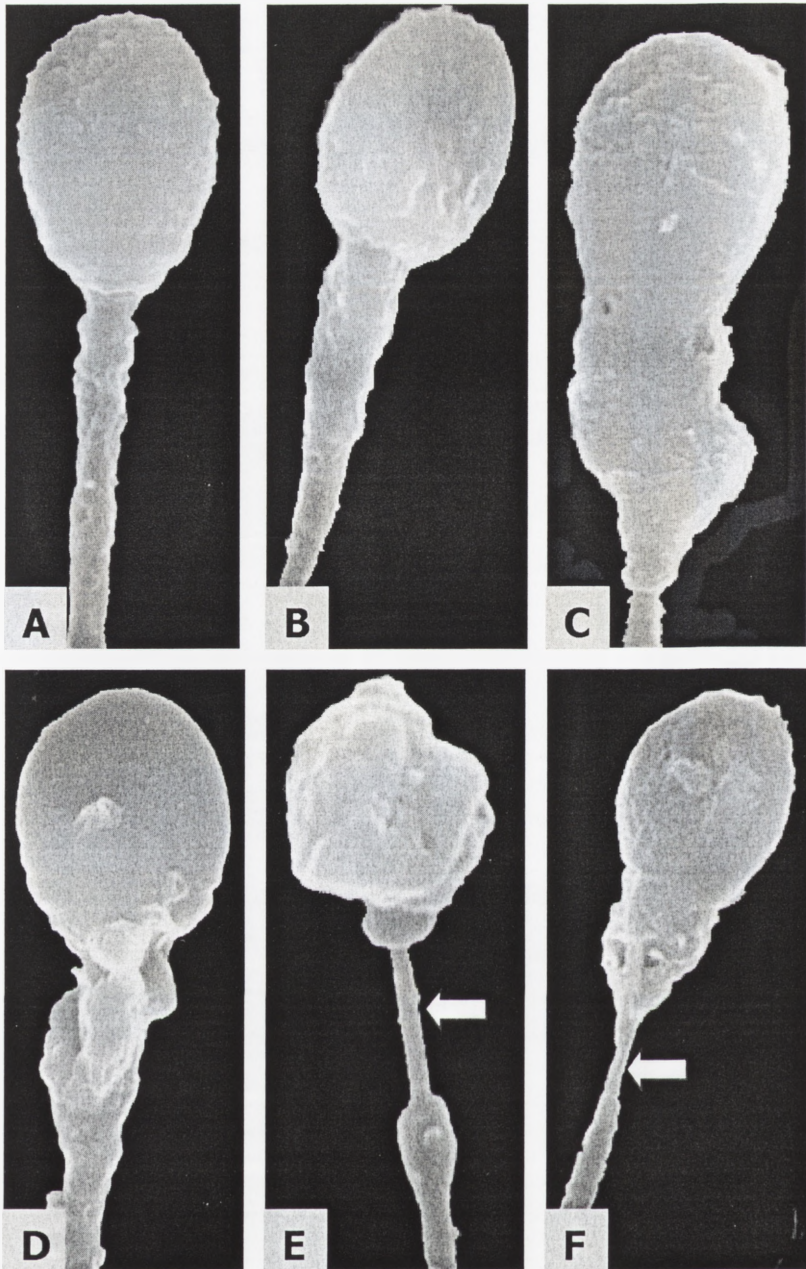
ul. Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin

email: mpiasecka@ipartner.com.pl

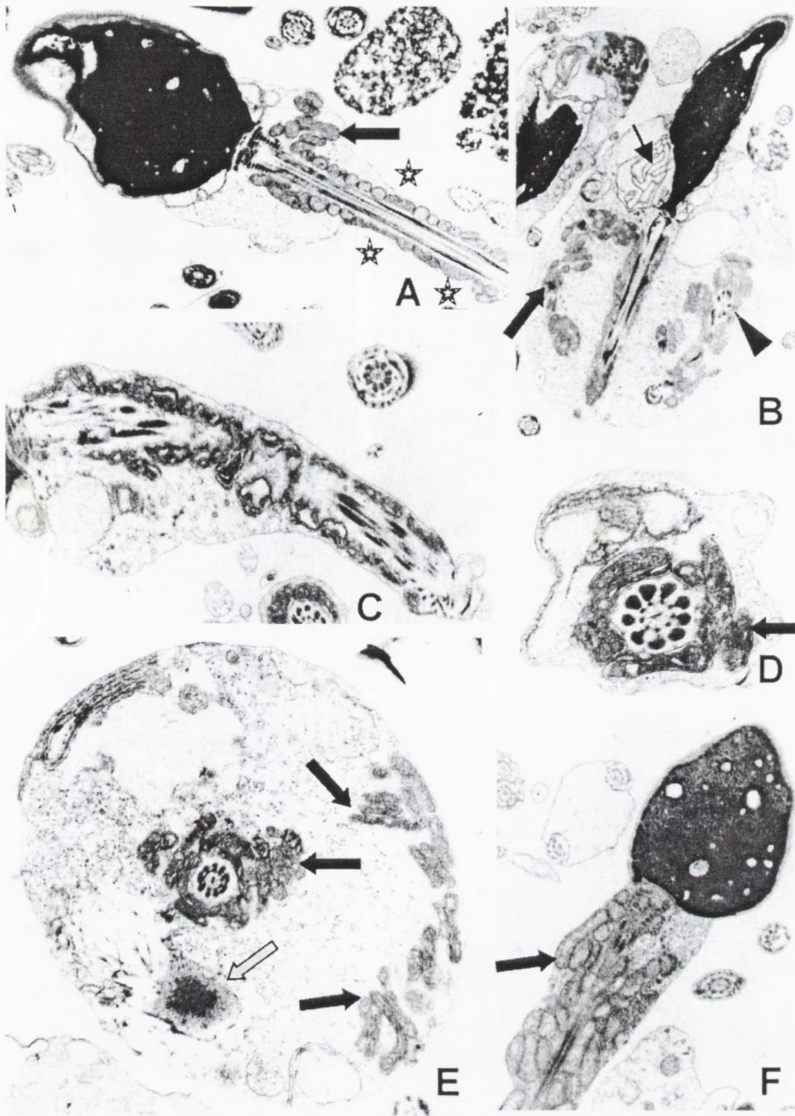


RYCINA 1. Wizualizacja mitochondriów plemników izolowanych z ogona najądrza (A,B,D) szczurów kontrolnych (B,D) i intoksykowanych octanem ołowiu (A) [84,86], ejakulowanych plemników ludzkich (C,E) [88,89] oraz knura (F). A,B,C: intensywna reakcja cytochemiczna na oksydoreduktazy/NADH, niebieskie depozyty formazanów obficie wypełniają aktywne mitochondria na całej długości wstawki (czarna strzałka), reakcja osłabiona występująca tylko w pojedynczych mało aktywnych mitochondriach wstawki (główka strzałki), brak reakcji cytochemicznej na różnych odcinkach wstawki zawierającej nieaktywne mitochondria lub ich brak (szara strzałka) [84,86,88]; D: zielonożółta fluorescencja widoczna w mitochondriach na całej długości wstawki plemnika barwionego sondą mitochondrialną Mito Tracker Green FM (0,2  $\mu\text{g/ml}$ , 10 min, 4°C), wiążącą się z mitochondriami niezależnie od potencjału ich wewnętrznej błony [88]; E,F: żółto-pomarańczowa fluorescencja w aktywnych mitochondriach pogrubionej i zdeformowanej (E) oraz prawidłowej wstawki plemników (F) barwionych sondą mitochondrialną JC-1 (10  $\mu\text{g/ml}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 37°C, 25min), wiążącą się z mitochondriami w zależności od potencjału ich wewnętrznej błony, mitochondria funkcjonalne gromadzą pomarańczowe agregaty JC-1 i emitują pomarańczową fluorescencję, mitochondria o niskim potencjale błonowym gromadzą monomery JC-1 i emitują zieloną fluorescencję [88]; A,B,D  $\times 1340$ , C  $\times 2400$ , E  $\times 3000$ , F  $\times 1425$ ; mikroskop świetlny (A,B,C) i fluorescencyjny (D,E,F) Axioskop, Carl Zeiss, Jena GmbH, Germany



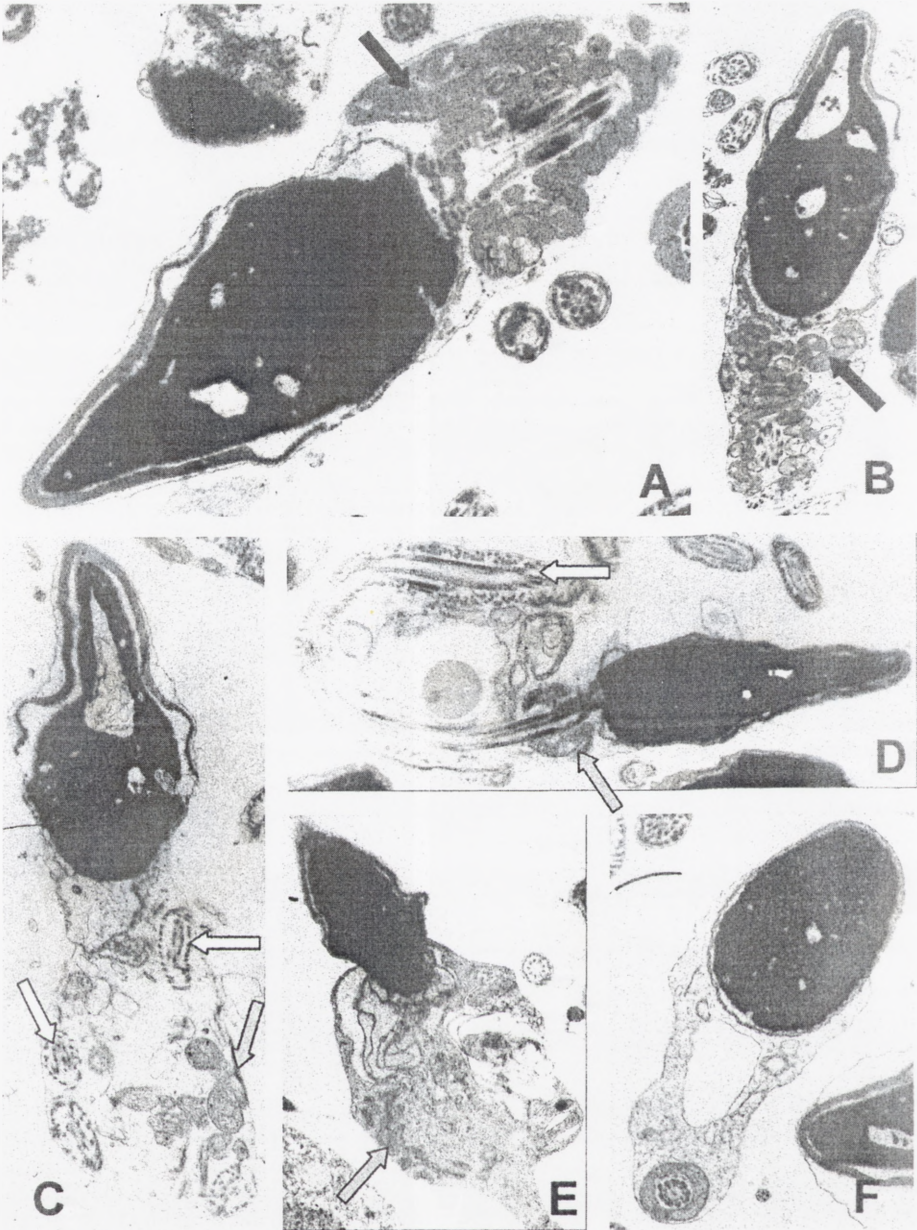


RYCINA 2. Ejakulowane ludzkie plemniki pacjentów z astenoteratozoospermią. Widoczne prawidłowe (A,B), pogrubione i zdeformowane (C,D) wstawki; wstawka plemnika na ryc. B jest grubsza niż wstawka na ryc. A, zgodnie z wynikami Vorup-Jensen i wsp. [124], osłonka mitochondrialna może podlegać fizjologicznym zmianom powodując pogrubienie wstawki (patrz część I); segmentowa aplazja osłonki mitochondrialnej (E,F); zmianie wstawki towarzyszy zmiana kształtu główki (główka kraterowa) i brak akrosomu (E); 7600 $\times$ ; mikroskop elektronowy skaningowy JEOL JSM-6100 EX, JEOL Ltd, Tokyo, Japan; materiał do badań został przygotowany wg rutynowego postępowania [88]

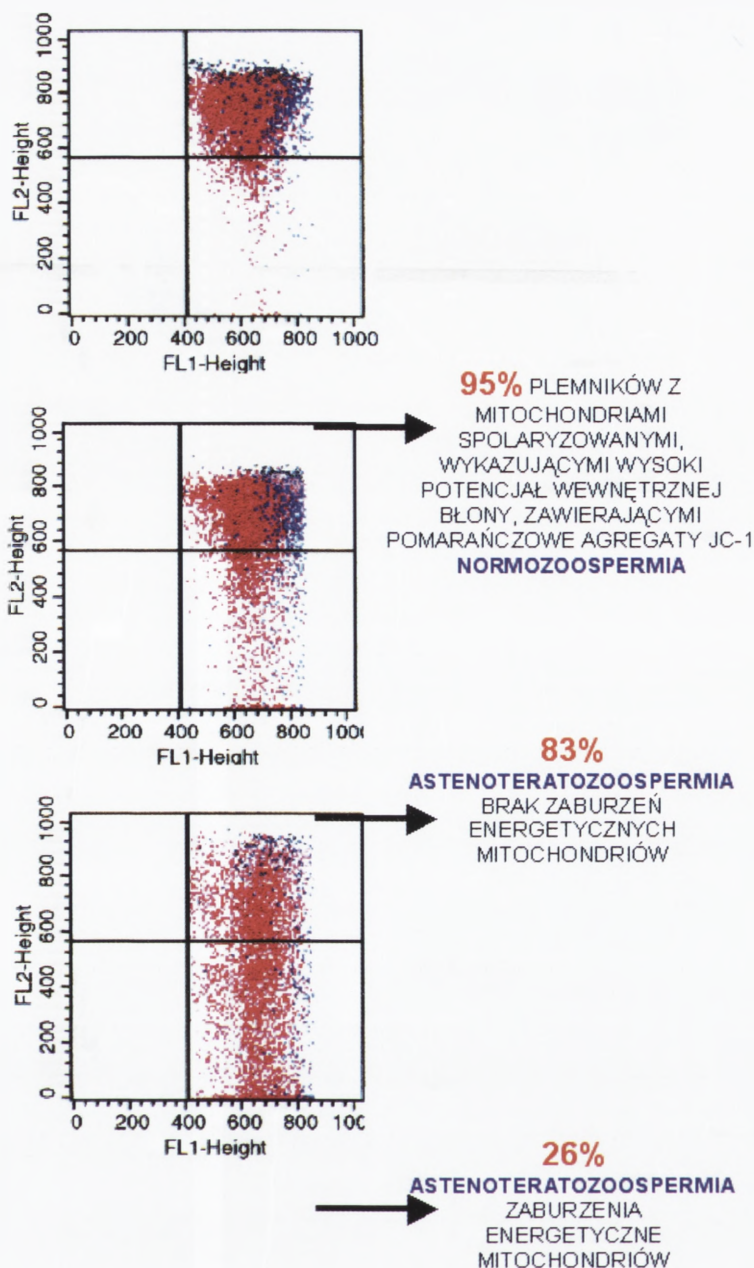


RYCINA 3. Ultrastruktura ludzkich ejakulowanych plemników pacjentów z astenoteratozoospermia. Przekroje podłużne (A,F), skośne (B,C) i poprzeczne (D,E) przez wstawkę plemników, zawierające nieprawidłowo wykształconą osłonkę mitochondrialną. Wstawkę plemników z przetrwałą kroplą cytoplazmatyczną z beładnie rozrzuconymi, nadliczbowymi, zbytecznymi mitochondriami (czarna strzałka) (A,B,D,E,F), o prawidłowej, skondensowanej ultrastrukturze, wykazującymi dużą gęstość elektronową (A,B,D,E) lub o zmniejszonej gęstości elektronowej (F); w kroplach cytoplazmatycznych widoczny ziarnisty i błoniasty materiał (A-F), niekiedy będący pozostałością po zbytecznej otoczce jądrowej (wąska czarna strzałka) (B), kropla lipidowa (szara strzałka) (E) oraz dodatkowa wstawkę (główka strzałki); widoczne regularnie (A), częściowo (C) lub całkowicie nieregularnie (F) ułożone mitochondria w obrębie wstawkę, niekiedy mitochondria o nieprawidłowym wydłużonym kształcie (gwiazdka) (A); zaburzenia kształtu główki (A,B) i akrosomu (A) lub jego brak (F); zaburzenia kondensacji chromatyny (A,B,F); A,F – 9600 $\times$ , B – 6080 $\times$ , C – 12000 $\times$ , D – 21300 $\times$ , E – 12800 $\times$ , F – 9600 $\times$ ; mikroskop elektronowy transmisyjny JEM-1200 EX, JOEL Ltd, Tokyo Japan; materiał do badań został przygotowany wg rutynowego postępowania [88]



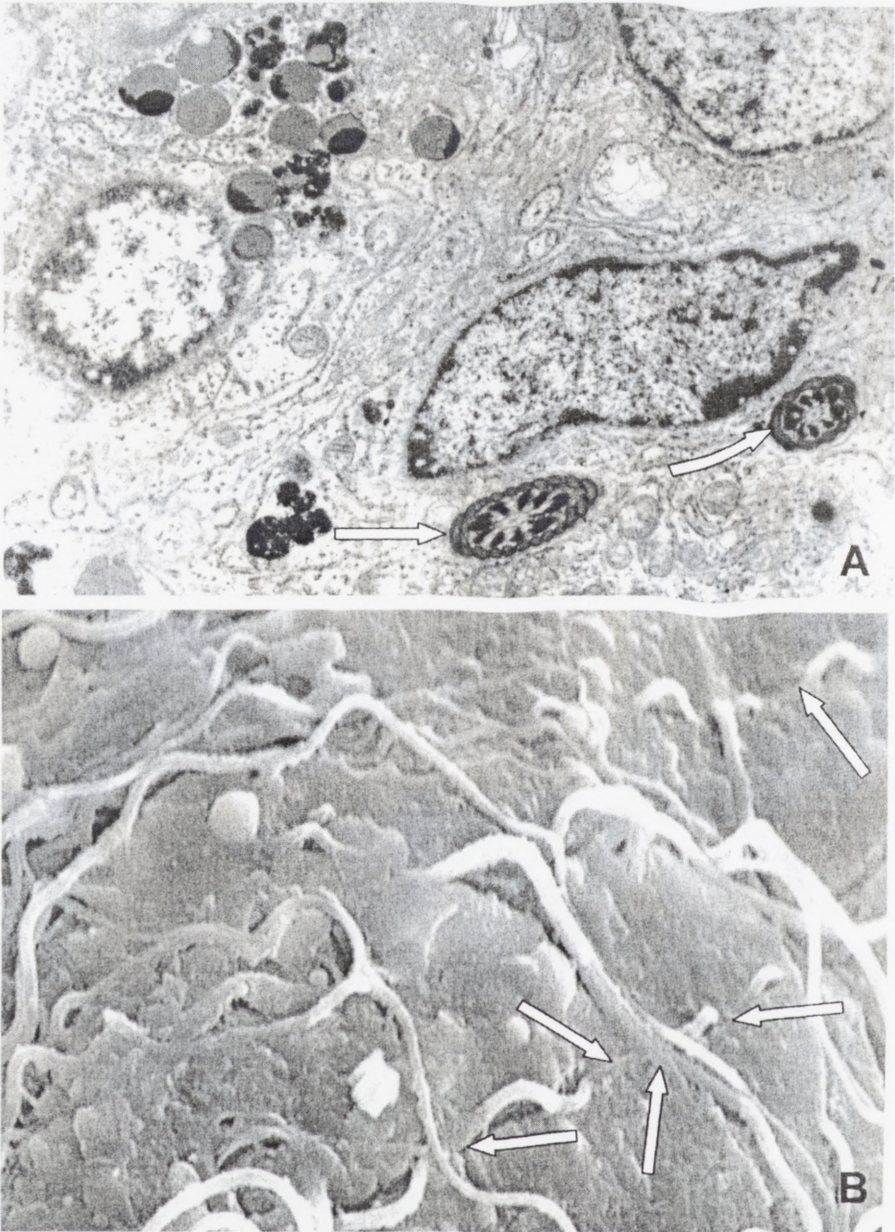


RYCINA 4. Niedojrzałe formy ludzkich ejakulowanych plemników pacjentów z asthenoteratozoospermia. Plemniki z „workami cytoplazmatycznymi” z nieprawidłowo wykształconą wstawką (A,B,D,F) lub jej brakiem (C,E); „worki cytoplazmatyczne” zawierają nieregularnie ułożone nadliczbowe, zbyt czyste, skondensowane mitochondria o dużej gęstości elektronowej (czarna strzałka) (A,B) lub niewiele mitochondriów (szara strzałka) (C,D,E), niekiedy o zmniejszonej gęstości elektronowej (C); liczne przekroje przez włtki zasadnicze (biała strzałka) (C,D), ziarnisty i błoniasty materiał (A-F); widoczna aplazja osłonki mitochondrialnej w plemniku z zawiniętą włtką w „worku cytoplazmatycznym”(D); zaburzenia kondensacji chromatinu (B,C); A – 18000×, B – 9200×, C – 15000×, D – 13000×, E – 10500×, F – 14000×; mikroskop elektronowy transmisyjny JEM-1200 EX ,JOEL Ltd, Tokyo Japan; materiał do badań został przygotowany wg rutynowego postępowania [88]

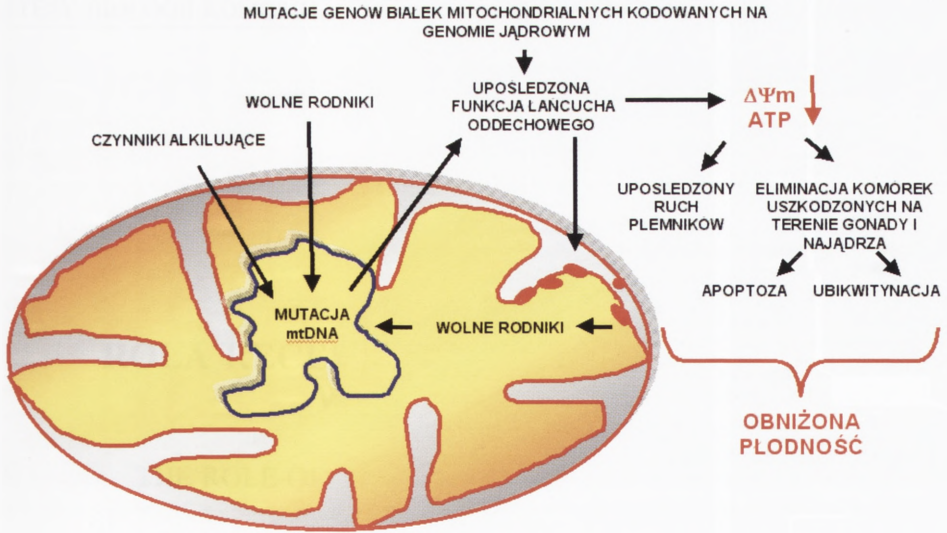


RYCINA 5. Cytogramy przedstawiające analizę odsetka ejakulowanych plemników ludzkich z mitochondriami funkcjonalnymi (spolaryzowanymi) w cytometrze przepływowym (FACSCalibur cytometer, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Plemniki inkubowano z JC-1 (10 µg/ml, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C, 25 min) [88]. Przedstawione odsetki plemników ustalono na podstawie analizy kwadrantów zaznaczonych na cytogramie FL1/FL2; ustawienie kwadrantów było zgodne z wynikami cytofluorometrycznymi pacjentów bez zaburzeń ruchu plemników (kontrola pozytywna) [88]. FL-1: numery kanałów dla zielonej fluorescencji (monomery JC-1), FL-2: numery kanałów dla pomarańczowej fluorescencji (agregaty JC-1)





RYCINA 6. Fagocytoza plemników szczura przez komórki nabłonkowe przewodu głowy najądrza. Przekroje przez wstawkę plemników w cytoplazmie komórek (strzałka) (A); widoczne na powierzchni komórek fagocytowane witki plemników (strzałka) (B); A – 10800 $\times$ , B – 4200 $\times$ ; mikroskop elektronowy transmisyjny JEM-1200 EX, JEOL Ltd, Tokyo, Japan (A); mikroskop elektronowy skaningowy JEOL JSM-6100 EX, JEOL Ltd, Tokyo, Japan (B); materiał do badań został przygotowany wg rutynowego postępowania [88]



RYCINA 7. Proponowany model uszkodzenia mtDNA komórek plemnikotwórczych i plemników oraz jego wpływ na płodność. Uszkodzenia mtDNA mogą być spowodowane czynnikami alkilującymi zasady azotowe, a także wolnymi rodnikami pochodzenia pozamitochondrialnego lub powstałymi w niepełnosprawnym łańcuchu oddechowym. Upośledzona funkcja mitochondriów komórek prowadzi do ich eliminacji w drodze apoptozy lub ich ubikwitynacji i dalej fagocytozy. Nadmierne uszkodzenia mitochondriów w dużej liczbie komórek plemnikotwórczych mogą powodować: 1) zmniejszenie populacji plemników uwalnianych z gonady (oligozoospermia), 2) zwiększenie odsetka ejakulowanych plemników o obniżonej ruchliwości (astenozoospermia) i wykazujących ekspresję ubikwityny, wskutek uniknięcia eliminacji na terenie gonady i najądrza, 3) możliwy brak uzyskania koncepcji *in vivo* i *in vitro*.  $\Delta\Psi_m$  – mitochondrialny potencjał błonowy





## ROLA RECEPTORÓW TOLL-PODOBNYCH W ODPORNOŚCI

### THE ROLE OF TOLL-LIKE RECEPTORS IN IMMUNITY

Mirosław J. SZCZEPAŃSKI <sup>1</sup>, Michał GÓRALSKI <sup>1</sup>,  
Iwona MOZER-LISEWSKA <sup>2</sup>, Husam SAMARA <sup>1</sup>, Jan ŻEROMSKI <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej, <sup>2</sup>III Katedra Pediatrii, Klinika Chorób  
Zakaźnych i Neurologii Rozwojowej Akademii Medycznej im. Karola  
Marcinkowskiego w Poznaniu

**Streszczenie:** Receptory Toll należą do rodziny receptorów o znacznym konserwatyźmie ewolucyjnym. Odgrywają one ważną rolę w aktywacji odporności wrodzonej od owadów aż do ptaków. Po raz pierwszy zostały wykryte i scharakteryzowane u muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*), gdzie biorą udział w embriogenezie i w odporności przeciw patogenom. Wykryto też homologiczne receptory u ssaków, w tym u człowieka, które nazwano receptorami Toll-podobnymi (TLRs; *Toll-Like Receptors*). Podobnie jak u muszki owocowej, TLRs ssaków zawierają w części zewnątrzkomórkowej domenę z licznymi powtórzeniami leucynowymi (LRR; *Leucine Rich Repeats*), domenę przezbłonową, a także domenę cytoplazmatyczną homologiczną z domeną cytoplazmatyczną receptora typu I interleukiny 1 (IL-1RI). TLRs występują przede wszystkim na monocytach, makrofagach, granulocytach, ale też na limfocytach, komórkach nabłonkowych i śródbłonku. Znane są także formy rozpuszczalne tych receptorów znajdujące w płynach wydzielniczych. Obecnie znanych jest 10 rodzajów ludzkich TLRs. Częściowo poznane są też ich ligandy, które pochodzą głównie z drobnoustrojów (egzogenne), ale też od gospodarza (endogenne). TLRs rozpoznają, w przypadku ligandów egzogennych, tzw. wzory molekularne związane z patogenami (PAMPs; *Pathogen Associated Molecular Patterns*), a ligandami endogennymi są dla nich białka powstające w czasie uszkodzenia komórek i tkanek. Przyłączenie ligandu do TLR powoduje szybką aktywację odporności wrodzonej, inicjację procesu zapalnego w wyniku indukcji syntezy cytokin prozapalnych, zwiększoną ekspresję antygenów głównego kompleksu zgodności tkankowej klasy I i II, cząsteczek kostymulujących na komórkach prezentujących antygen (APC; *Antigen Presenting Cells*), a co za tym idzie lepszą prezentację antygeny i w efekcie odpowiednią aktywację odporności nabytej. Dokładne poznanie mechanizmów efektorowych i transdukcji sygnałów w wyniku przyłączenia ligandu do TLR może mieć duże znaczenie w poznaniu mechanizmów rozpoznawania swój-obcy, aktywacji procesu zapalnego, a także znaczenie odporności wrodzonej dla aktywacji, swoistości i typu odporności nabytej.

**Słowa kluczowe:** receptory Toll-podobne (TLRs), odporność wrodzona, wzory molekularne związane z patogenami (PAMPs), bioinformatyka.



**Summary:** Toll receptors belong to highly conserved in the evolution receptor family, from insects to mammals. They play an important role in innate immunity. They were uncovered and characterized in a fly *Drosophila melanogaster*, in which they participate in embryogenesis and immunity versus pathogens. Homologous receptors were detected in mammals, including man, known as a Toll-like receptors (TLRs). As in *Drosophila*, TLRs of mammals contain extracellular domain with multiple leucine-rich repeats (LRR), transmembrane portion and cytoplasmic domain, homologous with that of type I interleukin 1 receptor (IL-1RI). TLRs are expressed on monocytes, macrophages, granulocytes but also on lymphocytes, epithelial cells and endothelia. Soluble forms of these receptors are also known, found in secretions. Ten types of human TLRs have been described so far. Their ligands are only partially known. Most of them are microbial origin (egzogenous), but also from the host (endogenous). TLRs recognize, in the case of egzogenous ligands, so called pathogen associated molecular patterns (PAMPs). Endogenous ligands include proteins and peptides formed during cell or tissue damage. Binding of ligand to receptor results in a fast activation of innate immunity, initiation of inflammatory response due to induction of proinflammatory cytokines, increased expression of MHC antigens, costimulatory molecules on antigen-presenting cells (APC). This leads to better antigen processing and presentation and in effect, proper activation of aquired (adaptive) immunity. Precise knowledge of effector mechanisms and signal transduction due to ligand binding to TLRs may be of value in exploration of recognition self-nonsel, activation of inflammatory process and also the role of innate immunity on induction, specificity and type of adaptive immunity.

**Key words:** Toll-like receptors (TLRs), innate immunity, pathogen associated molecular patterns (PAMPs), bioinformatics.

## WPROWADZENIE

Odporność organizmów wyższych można ogólnie podzielić na wrodzoną (nieklonalną) i nabytą (klonalną). Nabyta, która występuje jedynie u kręgowców, cechuje się klonalnością limfocytów T i B powstałą w wyniku przegrupowania (rearanżacji) genów receptora limfocytów T (TCR; *T Cell Receptor*) i genów immunoglobulinowych. Warunkuje to powstanie dużej swoistości i pamięci immunologicznej. Swoistość i pamięć nabyta w ciągu życia osobnika nie jest jednak przekazywana następnym pokoleniom. Odporność wrodzona, która realizowana jest głównie za pomocą granulocytów, monocytów, makrofagów i części białek surowicy krwi, jest starą ewolucyjnie, a zarazem uniwersalną formą odporności organizmów przeciw patogenom. Badania ostatnich lat wykazały, że wiele aspektów odporności wrodzonej jest bardzo podobnych między tak odległymi ewolucyjnie organizmami, jak owady i ssaki, nawet między roślinami i zwierzętami [3, 34, 58]. Wynika z tego, że odporność wrodzona odgrywa bardzo ważną rolę w obronie organizmów przed patogenami, skoro ta cecha jest tak konserwowana ewolucyjnie, tzn. ewoluuje bardzo wolno. Warto dodać, że kręgowce, u których występuje odporność zarówno wrodzona, jak i nabyta, stanowią zdecydowaną mniejszość wszystkich organizmów występujących na Ziemi, natomiast rośliny i bezkręgowce, u których występuje tylko odporność wrodzona, przetrwały do dziś mimo ciągłej presji doboru naturalnego, co świadczy, że ten typ odporności zupełnie im wystarcza, aby przeżyć. Głównym zadaniem odporności wrodzonej w rozumieniu infekcyjnym jest rozróżnienie charakterystycznych struktur związanych z patogenami (PAMPs, *Pathogen Associated Molecular Patterns*), czyli *de facto* odróżnienie swój-obcy. Zadanie to

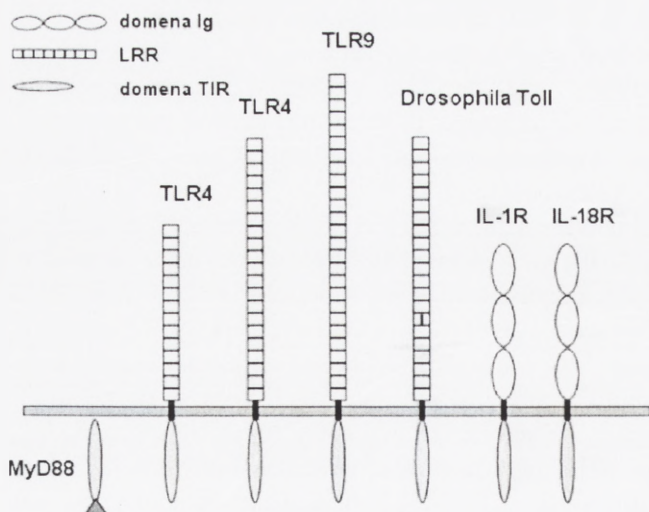
wykonywane jest perfekcyjnie, ponieważ nieznana jest dotychczas żadna choroba autoimmunizacyjna spowodowana przez odporność wrodzoną [38]. Warunek ten, jak wiadomo, nie zawsze spełniony jest przez odporność nabytą. Kolejnym zadaniem odporności wrodzonej jest szybka reakcja na patogen poprzez uruchomienie mechanizmów efektorowych oraz aktywowanie i orientacja odporności nabytej. Odporność wrodzona przekazywana jest kolejnym pokoleniom przez komórki linii zarodkowej (komórki germinalne), a w ciągu życia osobnika nie nabiera ona cech większej swoistości i pamięci immunologicznej. Rozpoznanie PAMPs realizowane jest głównie przez rodzinę receptorów Toll, które zostały wykryte i scharakteryzowane pierwotnie u muszki owocowej. Homologami tych receptorów u ssaków, w tym u człowieka, są receptory Toll-podobne (TLRs). TLRs odgrywają zasadniczą rolę w inicjacji odporności wrodzonej. Przyłączenie ligandu do TLR, poprzez skomplikowaną kaskadę transdukcji sygnału do komórki, powoduje szybką aktywację odporności wrodzonej przez wzmożenie reakcji zapalnej, pobudzenie wybuchu tlenowego [68]. Powstające zapalenie jest wynikiem zwiększonej syntezy cytokin prozapalnych, głównie IL-1, TNF- $\alpha$  i IL-6. Dodatkowo indukowana jest synteza IL-12, zwiększona ekspresja cząsteczek kostymulujących i antygenów głównego kompleksu zgodności tkankowej obydwu klas na komórkach prezentujących antygen (APC), przyspieszone dojrzewanie komórek dendrytycznych, co jest niezbędne do właściwej aktywacji odporności nabytej [9, 58].

## RODZINA RECEPTORÓW Toll

Rodzina receptorów Toll należy do nadrodziny białek receptora typu I dla IL-1 (IL-1RI). Mają one część zewnątrzkomórkową, przezbłonową i cytoplazmatyczną [54, 61]. Po raz pierwszy zidentyfikowano i określono ich rolę u muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*), gdzie, jak wykazano, biorą udział w embriogenezie [26], a u dorosłego osobnika w odporności przeciwzakaźnej rozpoznając PAMPs, co indukuje syntezę białek przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych, takich jak: dipterycyna działająca głównie na bakterie Gram ujemne, defenzyna – na bakterie Gram dodatnie i drosomycyna działająca przeciwgrzybiczo [34]. Interesujące jest, że zakażenie muszki owocowej różnymi rodzajami patogenów powodowało indukcję syntezy białek właściwych dla eliminacji danej grupy mikroorganizmów [52]. Zauważono również, że u muszek owocowych z mutacją Toll drastycznie spada przeżycie w przypadku infekcji grzybiczych [53].

Część zewnątrzkomórkowa Toll bogata jest w reszty leucynowe (LRR; *Leucine Rich Repeats*) i jeden lub dwa regiony bogate w cysteinę. Transdukcja sygnału do komórki mediowana przez Toll przebiega przy udziale wielu białek, m.in. z rodziny czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B, tj. Dorsal i Cactus. W badaniach okazało się, że białka te wykazują znaczną homologię z białkami ludzkimi biorącymi udział w transkrypcji odpowiednio NF- $\kappa$ B i I- $\kappa$ B [38] i pełnią one też analogiczną funkcję. Okazało się, że część cytoplazmatyczna Toll jest również homologiczna z cytoplazmatyczną domeną



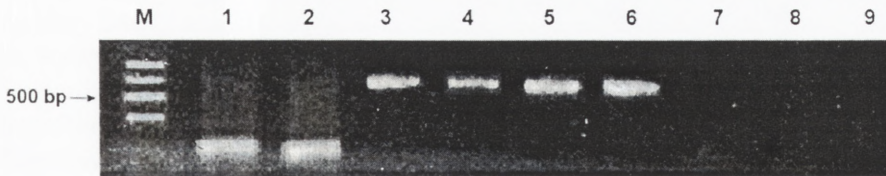


RYCINA 1. Przykład rodziny białek z domeną TIR. W części cytoplazmatycznej IL-1R, IL-18, TLR, Toll i MyD88 wykazują bardzo dużą homologię. Natomiast znacznie różnią się w części zewnątrzkomórkowej: rodzina IL-1R zawiera trzy domeny immunoglobulino-podobne, a rodzina TLR liczne powtórzenia leucynowe (LRR – *Leucine Rich Repeats*) podobnie jak Toll u muszki owocowej. MyD88 oprócz TIR zawiera dodatkowo „domenę śmierci” (FADD – *Fas Associated Death Domain*)

receptora dla IL-1 (IL-1R) [23]. Ze względu na duże podobieństwo domen cytoplazmatycznych receptora Toll muszki owocowej i ludzkiego IL-1R, a także, jak się następnie okazało, duże podobieństwo drogi transdukcji sygnału obu receptorów, domeny te nazwano TIR (*Toll-Interleukin-1R domain*) (ryc. 1). Odkryto też, że znaczne analogie z receptorem Toll występują u roślin, gdzie stwierdzono, że gen odporności na wirus mozaiki tytoniowej koduje białko, zawierające domenę transdukcji sygnału jak w Toll, ma zewnątrzkomórkową część bogatą w reszty leucynowe (LRR) i jest odpowiedzialna za odporność przeciwzakaźną [89]. Powyższe dane sugerowały, że odpowiedź immunologiczna mediowana przez Toll może stanowić stary ewolucyjnie, ale zarazem uniwersalny mechanizm obrony gospodarza przeciw patogenom. Zastanawiano się, czy podobny receptor może istnieć u ssaków, w tym u człowieka. Znaczna homologia domen cytoplazmatycznych receptora Toll i IL-1R mogła sugerować podobieństwo obydwu receptorów, jednak IL-1R w części zewnątrzkomórkowej nie ma LRR, zawiera natomiast trzy domeny immunoglobulinopodobne. Aby sprawdzić możliwość występowania homologicznego na całej długości receptora Toll u kręgowców, przeszukano tzw. sekwencje EST (*Expressed Sequence Tags*) w bazie danych cDNA człowieka w NCBI (*National Center for Biotechnology Information* <http://www.ncbi.nih.gov>), gdzie dla profilu sekwencji transdukcji sygnału Toll/IL-1R zidentyfikowano pasującą sekwencję w bibliotece ludzkich EST (GenBank Accession Number: H48602, odpowiadał klonowi 202057 z konsorcjum IMAGE). Po przeszukaniu biblioteki cDNA z ludzkiej wątroby i śledziony udało się w efekcie sklonować i zsekwencjonować ludzki gen homologiczny z genem receptora Toll, który miał długość ok. 5 kbp, a po predykcji do sekwencji aminokwasowej mógł kodować białko o długości ok. 800 aminokwasów. Po porównaniu tej przewidzianej sekwencji aminokwasowej z sekwencją białka Toll muszki owocowej (tzw. *alignment*) okazało się, że wykazują one wysoką homologię na całej długości. Ze względu na znaczny zakres homologii, ludzkie receptory nazwano Toll-podobnymi (TLRs) [58]. Należy dodać, że nieprzecenioną rolę w odkryciu receptorów Toll-podobnych odegrała bioinformatyka w ujęciu ogólnodostępnej bazy danych i narzędzi bioinformatycznych niezbędnych do „obróbki” uzyskiwanych informacji.

## Ludzkie TLRs

Obecnie znanych jest 10 rodzajów ludzkich TLRs [16, 18, 20, 33, 58, 71, 79, 80]. Wykazano, że TLRs ulegają ekspresji na komórkach zarówno limfoidalnych (ryc.2) [60], jak i nielimfoidalnych. Na podstawie analiz przy zastosowaniu techniki *Northern blots* i ekspresji mRNA ustalono, że TLR1 występuje głównie na limfocytach B, TLR2 na monocytach, neutrofilach, ale też na komórkach dendrytycznych; TLR3 przede



RYCINA 2. Produkty reakcji RT-PCR dla primerów TLR2: monocyty (3), granulocyty (4) oraz TLR4: monocyty (5) i granulocyty (6) krwi obwodowej zdrowego dawcy krwi. Kontrole dodatnie: cDNA + primery dla GAPDH: monocyty (1) i granulocyty (2). Kontrole ujemne: primery bez cDNA: 7, 8, 9 – odpowiednio dla GAPDH, TLR2 i TLR4. Użyto markera mas Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Fermentas (M)

wszystkim na komórkach dendrytycznych; TLR4 jest receptorem o szerokim występowaniu, ponieważ wykazano jego ekspresję mRNA na monocytach, makrofagach, neutrofilach, komórkach dendrytycznych, komórkach śródbłonna i komórkach nabłonkowych; TLR5 na monocytach i komórkach dendrytycznych; TLR9 na monocytach. Przy użyciu RT-PCR wykazano również różnicę w ekspresji TLR w zależności od subpopulacji komórek dendrytycznych: monocyty wykazywały ekspresję TLR 1, 2, 4, 5, 6, 8, niedojrzałe komórki dendrytyczne TLR 1, 2, 3, 5, 6, 8, 10, a plazmocytoidalne komórki dendrytyczne TLR 1, 6, 7, 9. Wykazano również obecność rozpuszczalnych form TLR2 w mleku karmiących matek i surowicy krwi, co może mieć wpływ na modulację odpowiedzi immunologicznej [51, 54, 66]. Należy jednak pamiętać, że powyższe dane uzyskane zostały głównie na podstawie oceny ekspresji mRNA, co nie zawsze oznacza ekspresję funkcjonalnego białka. Co więcej, ocena ekspresji jedynie mRNA nie odpowiada również na pytanie, czy dany TLR ulegnie ekspresji na powierzchni komórki, czy też będzie białkiem cytoplazmatycznym lub rozpuszczalnym.

## Ligandy TLRs

Ważną rolę i zaangażowanie receptorów Toll-podobnych w odporności zaczęto brać pod uwagę, gdy badania wykazały, że w wyniku interakcji TLR-ligand na komórkach stale wykazujących ekspresję TLR może dochodzić do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B, a następnie do wzrostu syntezy cytokin prozapalnych, głównie IL-1 i TNF- $\alpha$ , a także wyższej ekspresji powierzchniowej cząsteczki kostymulującej B7.1 (CD80) [9, 19, 58].

Prawidłowo działający układ immunologiczny musi mieć mechanizmy rozpoznające patogeny przy równoczesnym zachowaniu tolerancji wobec antygenów gospodarza. Czułość i swoistość tego rozpoznania jest określona, przynajmniej w części, przez



TABELA 1. Główne ligandy egzogenne TLRs ssaków

TLR	Ligand
TLR1 (z TLR2)	Produkty metabolizmu bakteryjnego z LPS [92]
TLR2	Bakterie Gram dodatnie [22] Peptydoglikan [77] Kwas lipotejchowy [77] Zymosan [84]
TLR3	Poli I:C (wirusowa podwójna nić RNA) [5]
TLR4	Bakterie Gram ujemne [81] LPS, lipid A [17, 67] BCG [83] <i>Aspergillus fumigatus</i> hyphae [88]
TLR5	Bakterie z flageliną [27]
TLR6 (z TLR2)	Peptydoglikan, zymosan, bakterie Gram dodatnie [63]
TLR7 i TLR8	Pojedyncza wirusowa nić RNA (ssRNA) [31]
TLR9	Bakteryjny CpG DNA [33]

możliwość rozpoznania swoistych wzorów molekularnych związanych z patogenami (PAMPs) przez TLRs. Do PAMPs należy wiele różnych związków, które mogą być składowymi ścian komórkowych bakterii zarówno Gram dodatnich, jak i Gram ujemnych, produkty ich metabolizmu, struktury chemiczne wielu grzybów, białka wirusowe, wreszcie do PAMPs należą kwasy nukleinowe, które różnią się od ludzkiego przede wszystkim brakiem metylacji wysp CpG i w ten sposób stają się ligandem dla TLRs. Dla przypomnienia, do chwili obecnej zostało zidentyfikowanych 10 rodzajów ludzkich TLR, w większości poznano ich miejsce w genomie i każdy z nich wydaje się odgrywać kluczową rolę w aktywacji odpowiedzi immunologicznej na konkretny PAMP (tab. 1).

TLR2 był pierwszym zaproponowanym receptorem endotoksyny bakterii gram ujemnych – lipopolisacharydu (LPS; *lipopolysaccharide*) [44, 93]. LPS jest jednym z silniejszych związków aktywujących układ immunologiczny i proces zapalny. Gdy LPS znajdzie się w krwioobiegu (nawet bez obecności samych bakterii), wywołuje silną odpowiedź zapalną, a nawet objawy wstrząsu septycznego trudnego w leczeniu [62]. Badania wykazały jednak, że u myszy znokautowanych (*knock-out*) pod względem genu dla TLR2 dochodziło do transdukcji sygnału i aktywacji NF- $\kappa$ B po stymulacji LPS-em [81]. Udowodniono też, że z kolei myszy C3H/HeJ z punktową mutacją (P712H) genu TLR4 miały fenotyp odpowiadający za niższą wrażliwość na LPS, identyfikując równocześnie TLR4 jako produkt genu *Lps*. Wykazano również, że inne większe mutacje genu TLR4 powodowały podobny efekt po LPS jak u mysz C3H/HeJ [35]. W innych badaniach udowodniono również, że TLR4 może mediować aktywację NF- $\kappa$ B w komórkach HEK293 po transfekowaniu ich wektorem z genem TLR4 [17]. Ostatecznie

ustalono, że TLR4 jest głównym receptorem LPS, czyli odpowiedzialny jest za rozpoznanie przede wszystkim struktur bakterii Gram ujemnych, jednak do pełnego i efektywnego rozpoznania konieczna jest obecność dodatkowych cząsteczek, takich jak CD14 i MD-2 [54, 75]. TLR2 mediuje odpowiedź na kwas lipoteichojowy, peptydoglikan z bakterii Gram dodatnich i mykobakterii [57, 77]. DNA pochodzący z różnych mikroorganizmów zawiera motywy (brak metylacji wysp CpG DNA), które są rzadko spotykane u ssaków i są rozpoznawane jako obce. TLR9 jest potrzebny *in vivo* i *in vitro* do wyzwolenia reakcji zapalnej i objawy wstrząsu septycznego w reakcji na obcy DNA [11, 33]. Wykazano również, że myszy *knock-out* w TLR9 były odporne na wywołanie wstrząsu septycznego w odpowiedzi na bakteryjny CpG DNA [33]. Stwierdzono również, że w komórkach linii CHO (*Chinese Hamster Ovary*), które transfekowano genem TLR5, dochodzi do aktywacji NF- $\kappa$ B w odpowiedzi na bakteryjne flageliny, stąd wysunięto wniosek, że TLR5 inicjuje i wzmacnia odpowiedź na bakterie z tą składową [32]. TLR3 związany jest z aktywacją NF- $\kappa$ B w odpowiedzi na poly(I:C) (podwójna nić wirusowego RNA) [5]. Najwięcej jednak jest danych na temat roli TLR2 i TLR4 w odpowiedzi na patogeny. Istnieją przypuszczenia, że TLRs mogą tworzyć funkcjonalne pary (homo- lub heterodimery) w interakcji z właściwym ligandem, np. TLR4-TLR4, TLR2-TLR6, TLR1-TLR2 [25, 63], co wydaje się mieć znaczenie w lepszym rozpoznaniu właściwego patogenu. Wykazano, że TLR6 i TLR2 kooperują w odpowiedzi na bakterie Gram dodatnie, zymosan, peptydoglikan, modulinę [13, 25, 63]. TLRs mogą również być rekrutowane do fagosomów [63, 84] i wtedy inicjują właściwą odpowiedź immunologiczną.

Okazuje się również, że ligandami dla TLRs aktywnymi odporność wrodzoną mogą być białka gospodarza (tab. 2), co z punktu widzenia odporności wrodzonej, która powinna rozpoznawać bezbłędnie układ swój-obcy, wydaje się dość dziwne. Ligandami tymi są najczęściej białka powstające w czasie stresu komórkowego, uszkodzenia tkanek, martwicy [12, 41]. Fakt rozpoznania własnych białek staje się jednak logiczny, jeśli uwzględni się następujące powody: 1) w przypadku martwicy muszą być uruchomione mechanizmy zapalne celem naprawy i usunięcia zmiany, 2) białka uwalniane w czasie wymienionych stanów (głównie białka szoku cieplnego) wykazują znaczną homologię z białkami pochodzącymi z niższych organizmów – są silnie zachowane w ewolucji (ryc. 3) pełniąc bardzo ważną funkcję [41].

Nie ma natomiast obecnie danych na temat roli TLRs w embriogenezie człowieka, tak jak wykazano to u muszki owocowej.

TABELA 2. Główne ligandy endogenne TLRs ssaków

TLR	Ligand
TLR2	Produkty rozpadu martwych komórek [72]
TLR4	HSP60, HSP70, Gp96 [72, 85, 86]
TLR9	Kompleks chromatyna-IgG [50]



```

1) Strept. pyogenes DRWTTIPTSRSQVFEVSTAAEDNQPAVDLHVLRGERPHAADNKTLLGRFQLTDIPAAAPRGIPQI 442
2) Helicob. pylori DRGTTIIPAKRSQVFEVSTAAEDNQPAVSIIMVLRGERELARDNKSLSGKFDLQGIAPAPRGVPI 466
3) Drosoph. melanog. ERNARIIPCKQQQIFITITYSNQNNAVTLIQVYGERAMTKDNNLLGTENLTGIPAPRGVPI 475
4) Mus Musculus KRNTTIPTKQTTFITITYSNQPVGVLIQVYGERAMTKDNNLLGKFEFTGIPAPRGVPI 474
5) Homo Sapiens NCNTTIPTKQTTFITITYSNQPVGVLIQVYGERAMSKDNNLLGKFEFT----- 96
. .: ** .: * * * * * ** . * * * :*** : : ** : * * * :

```

RYCINA 3. Przykład „multiple alignment” wskazujący na duży konserwatywizm w ewolucji białek szoku cieplnego (sekwencje aminokwasowe *Accession Number* w NCBI: 1) NP\_269780.1; 2) NP\_206909.1; 3) P11146; 4) NP\_112442.2; 5) XP\_374403.1)

## INTERAKCJE TLRs Z INNYMI BIAŁKAMI

Oprócz TLRs rozpoznających PAMPs, komórki syntezują też inne białka powierzchniowe lub rozpuszczalne, które również mogą rozpoznawać PAMPs, ale z reguły nie są w stanie same transdukować sygnału do komórki. Uczestniczą one natomiast w interakcjach z TLRs, ułatwiając im rozpoznanie danego patogenu i lepszą interakcję ligand-receptor.

### CD14

Jest to białko o masie 55 kDa, występuje głównie na monocytach [90] i w mniejszym stopniu na neutrofilach [8]. Występuje jako białko błonowe mCD14 (*membrane CD14*) i w formie rozpuszczalnej sCD14 (*soluble CD14*). W błonie komórkowej zakotwiczone jest przy pomocy fosfatydyloinozytolu. CD14 pełni tam funkcje cząsteczki wiążącej głównie LPS i ułatwiającej dostęp do TLR. Może również wiązać się z innymi produktami mikroorganizmów, takimi jak: peptydoglikan, kwas lipoteichojowy, a także z antygenami grzybów [6, 47]. mCD14 określany był wcześniej jako główny receptor LPS, ale po odkryciu, że mCD14 jest zakotwiczony w błonie komórkowej przez fosfatydyloinozytol i nie ma domeny cytoplazmatycznej, jasne stało się, że nie może transdukować sygnału do komórki. Dopiero odkrycie TLRs, które mają domenę przezbłonową i cytoplazmatyczną, zmieniło pogląd na główny receptor PAMPs. sCD14 występuje w surowicy krwi w stężeniu 1–3 µg/ml [3]. Wykazano, że sCD14 bierze udział w odpowiedzi na LPS tych komórek, które nie wykazują ekspresji mCD14 (np. komórki śródbłonna) i wtedy mogą uczestniczyć w produkcji cytokin prozapalnych w przebiegu wstrząsu septycznego. Stąd logiczne wydaje się, że u chorych we wstrząsie septycznym wzrost stężenia sCD14 wiązał się ze zwiększoną umieralnością [48]. Nie jest jednak jasne, czy sCD14 wpływa na patomechanizm wstrząsu septycznego, czy raczej prezentuje ciężkość choroby. Wykazano bowiem na modelu mysim, że rekombinowany sCD14 był w stanie zredukować śmiertelność nawet, jeśli był podany po iniekcji LPS [28]. Prawdopodobne jest, że sCD14 może wykazywać różny efekt w zależności od dawki.

### MD-2

Jest to glikoproteina o masie 20–30 kDa bez domeny przezbłonowej i funkcjonująca jako białko wydzielnicze. Może jednak uczestniczyć w interakcjach z zewnątrzkomórkową domeną TLR4 wzmacniając indukowaną za pomocą LPS odpowiedź immunologiczną.

## LBP

Białko wiążące LPS (LBP; *LPS Binding Protein*). Jest to białko osocza o masie 60 kDa, które mediuje odpowiedź na LPS [76, 82]. Należy do białek ostrej fazy i produkowane jest przez wątrobę. Podanie LBP drastycznie zwiększa wrażliwość komórek CD14+ na stymulację przez LPS. Wykazano, że LBP ułatwia wiązanie do CD14, jego koniec -NH<sub>2</sub> odpowiedzialny jest za wiązanie LPS, a koniec -COOH za transfer LPS do CD14 [1]. Dodatkowe badania wykazały, że LBP kooperuje również z lipoproteiną osocza o dużej gęstości HDL (*High Density Lipoprotein*), gdzie przenosi LPS do kompleksu HDL i tam LPS jest funkcjonalnie unieczynniany [91]. Wykazano również, że duże stężenie LBP obniża *in vivo* aktywność LPS i może chronić przed wstrząsem septycznym wywołanym przez bakterie Gram ujemne [46]. Podsumowując, LBP działa dwójako: wzmacniając odpowiedź na LPS, jak i neutralizując jego aktywność biologiczną. Wykazano, że stosunek LBP:LPS determinuje konkretny efekt, tj. aktywację monocytów [46] lub inaktywację LPS w wyniku transferu do HDL [91].

## CD11b/CD18

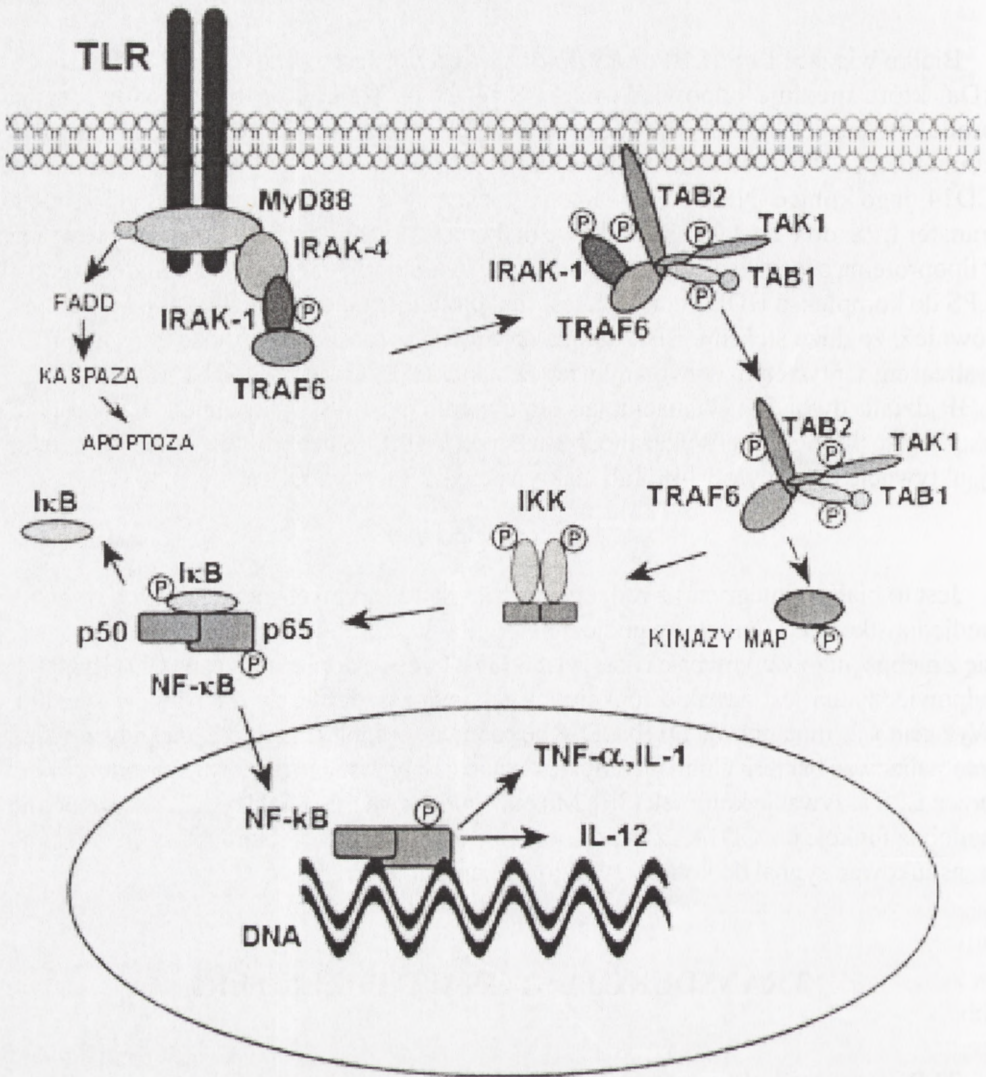
Jest to białko (integryna) z rodziny cząsteczek adhezyjnych zawierających wspólną podjednostkę beta i unikatową podjednostkę alfa. Wykazano, że integryny mogą wiązać się z nieopsonizowanymi bakteriami i LPS [37]. Część cytoplazmatyczna CD11b/CD18 odpowiedzialna jest za takie funkcje jak fagocytoza, ale nie za transdukcję sygnału. Wykazano, że mutanty w CD11b/CD18 bez domeny cytoplazmatycznej nie były w stanie internalizować bakterii Gram ujemnych, ale nadal były w stanie reagować na indukowaną przez LPS aktywację komórek [36]. Można wnioskować, że CD11b/CD18 może pełnić podobną funkcję jak CD14, czyli przenosi LPS do drugiego receptora, który jest w stanie transdukować sygnał do komórki. Takimi receptorami mogą być TLRs.

## TRANSDUKCJA SYGNAŁU PRZEZ TLRs

TLRs mogą być zaliczone do nadrodziny białek receptora typu I dla interleukiny 1 (IL-1RI), ponieważ wykazują wysoką homologię z IL-1RI w regionie cytoplazmatycznym na długości około 200 aminokwasów. Z tego względu nazwano ten region domeną TIR (*Toll/IL-1R domain*). Region homologii w domenie TIR jest ograniczony do trzech konserwowanych kaset zawierających aminokwasy krytyczne dla transdukcji sygnału. W przeciwieństwie do regionu cytoplazmatycznego, część zewnątrzkomórkowa wykazuje znaczne różnice. Domena zewnątrzkomórkowa TLRs zawiera liczne powtórzenia leucynowe (LRR) długości od 24 do 29 reszt aminokwasowych poprzedzielanych innymi aminokwasami, ale układające się w motyw xxLxLxx. Uważa się, że domena LRR jest bezpośrednio zaangażowana w rozpoznanie różnych patogenów [4].

Transdukcja sygnału przez IL-1R i rodzinę receptorów Toll-podobnych przebiega przy zaangażowaniu wielu białek, takich jak MyD88; kinaz IRAK (*IL-1RI-associated*





RYCINA 4. Transdukcja sygnału mediowana przez TLR (wg Akira Shizuko 2003, zmodyfikowane), opis w tekście

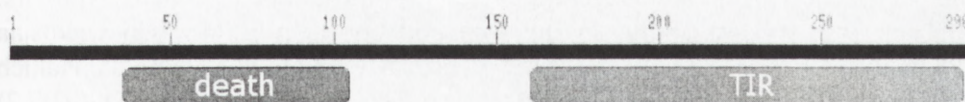
protein kinases 1,2,4,M); kinazy TAK1 (*TGF-beta-Activated Kinase*); białka wiążące kinazę TAK1, czyli TAB1 (*TAK1-binding protein 1*) i TAB2; czynnik związany z receptorem czynnika martwicy nowotworu, czyli TRAF6 (*Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 6*), Tollip (*Toll Interacting Protein*) [4]. Ogólnie akceptowany przebieg transdukcji sygnału IL-1R/TLR pokazano na rycinie 4.

Pobudzenie IL-1R lub TLR powoduje, że cząsteczka adaptorowa MyD88 wiąże się z kompleksem receptorowym i w następstwie tego dochodzi do asocjacji z kinazami

IRAK-4 i IRAK-1. Warto dodać, że MyD88 oprócz domeny TIR ma „domenę śmierci” FADD [*Fas-associated Death Domain*], którą może indukować apoptozę w drodze kaspazo-zależnej. Podczas tworzenia tego kompleksu, IRAK-4 sam ulega aktywacji, a następnie aktywuje IRAK-1 przez jego fosforylację, co z kolei indukuje interakcję TRAF6 z kompleksem receptorowym. Połączenie IRAK-4/IRAK-1/TRAF6 powoduje pewne zmiany konformacyjne w tych czynnikach i w wyniku tego dochodzi do odłączenia się ich od kompleksu receptorowego. Następnie kompleks IRAK-4/IRAK-1/TRAF6 wchodzi w interakcje w błonie komórkowej z innym kompleksem składającym się z TAK1, TAB1 i TAB2, przez co TAB2 i TAK1 ulegają fosforylacji, co z kolei powoduje ich translokację razem z TRAF6 i TAB1 do cytozolu. Następnie TAK1 jest w cytoplazmie znowu aktywowany, co z kolei prowadzi do aktywacji kompleksu kinazy I $\kappa$ B (IKK). Nieaktywny IKK wiąże NF- $\kappa$ B w cytoplazmie, ale jego aktywacja powoduje fosforylację i degradację inhibitora białkowego I $\kappa$ B, co w konsekwencji doprowadza do uwolnienia NF- $\kappa$ B. Aktywacja TAK1 powoduje również aktywację kinaz MAP i JNK [4, 10]. Uwolniony NF- $\kappa$ B wnika do jądra komórkowego i po przyłączeniu w miejscach promotorowych indukuje transkrypcję mRNA głównie dla cytokin prozapalnych, IL-12, cząstek kostymulujących B7.1 i B7.2, antygenów głównego kompleksu zgodności tkankowej obydwu klas [9, 58].

## ROLA MYD88 W TRANSDUKCJI SYGNAŁU PRZEZ TLRs

MyD88 (*Myeloid Differentiation 88*) był pierwotnie wyizolowany z komórek białaczki szpikowej M1 jako czynnik indukujący różnicowanie komórek w makrofagi po indukcji przez IL-6 [55]. Ludzki MyD88 zbudowany jest z 296 aminokwasów (*Accession Number* w NCBI: NP\_002459), zawiera N-końcową „domenę śmierci” oddzieloną od C-końcowej domeny TIR sekwencją około 50 aminokwasów (ryc. 5). MyD88 pełni kluczową rolę w transdukcji sygnału przez TLRs. U myszy z niedoborem MyD88 wykazano kompletny brak reakcji na stymulację IL-1 i innymi cytokinami powiązanych z IL-1R (IL-18) [2], dodatkowo makrofagi pozbawione MyD88 były całkowicie niewrażliwe na LPS, peptydoglikan, lipoproteiny, CpG DNA, flageliny bakteryjne [4]. Wykazano jednak, że może istnieć droga transdukcji sygnału niezależna od MyD88, ponieważ u makrofagów z deficytem MyD88 dochodzi do aktywacji kinaz MAP i NF- $\kappa$ B, ale zachodzi to ze znacznym opóźnieniem i jest to proces o mniejszym nasileniu [43].



RYCINA 5. Domeny w 296 aminokwasowym MyD88 znalezione w NCBI *Conserved Domain Summary* – *Accession Number* NP\_002459; „domena śmierci” (*death*) i domena TIR



## ROLA TLR W INDUKCJI NABYTEJ ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ

Indukcja nabytej komórkowej odpowiedzi immunologicznej wymaga prezentacji odpowiednio przetworzonych peptydów antygenowych limfocytom T. Kluczową rolę odgrywają tu komórki prezentujące antygen (APC). Do APC zalicza się głównie komórki dendrytyczne i makrofagi. Ekspresja TLR ma miejsce przede wszystkim na tych komórkach i wydaje się, że ma to swój głęboki sens. TLR pobudzone przez PAMPs uruchamiają bowiem program dojrzewania komórek dendrytycznych (DC; *Dendritic Cell*). Manifestuje się to wzrostem ekspresji antygenów MHC klasy I i II, cząstek kostymulujących, a także ekspresją w tych komórkach cytokin prozapalnych, takich jak IL-1 i TNF- $\alpha$ . Ma to zasadnicze znaczenie dla powstania swoistej odpowiedzi na napotkane antygeny. Tylko dojrzałe komórki dendrytyczne mogą skutecznie stymulować limfocyty, które nie miały uprzedniego kontaktu z antygenem (naiwne) i odbywa się to przy współdziałaniu CD40 [24, 59]. Natomiast zwiększona ekspresja cząsteczek kostymulacyjnych na APC, takie jak CD80 i CD86, warunkuje jakość prezentacji i powoduje, że powstała synapsa immunologiczna (między limfocytom T i APC) jest trwała.

Limfocyty CD4+ (pomocnicze – *helper*) pod wpływem sygnałów z APC różnicują się w komórki Th1 warunkujące odpowiedź komórkową i w Th2 stymulujące produkcję przeciwciał. Rola TLR w sterowaniu tymi dwoma typami odpowiedzi nie jest w pełni wyjaśniona. Z jednej strony wiadomo, że w ustroju istnieją co najmniej 3 rodzaje komórek dendrytycznych: limfoidalne, mieloidalne i plazmocytoidalne, różniące się pochodzeniem, lokalizacją, a także ekspresją TLR. Z drugiej strony, dla indukcji odpowiedzi Th1 konieczna jest znaczna produkcja cytokiny IL-12 przez komórki dendrytyczne i wiele ligandów TLR, takich jak LPS, peptydoglikan czy kwas lipotejchojowy, stymulują tę produkcję. Okazało się, że poszczególne rodzaje komórek dendrytycznych różnią się ekspresją TLR7 i TLR9 [39, 42]. Plazmocytoidalne DC nie wytwarzają IL-12, prawdopodobnie z powodu braku ekspresji TLR7, co może kierować odpowiedź w stronę Th2. Nie jest to jednak przekonujące, gdyż całkowite wyłączenie białka adaptorowego MyD88 u myszy znokautowanych pod względem odpowiedniego genu znosi całkowicie odpowiedź Th1, ale nie narusza odpowiedzi Th2, co sugeruje inną drogę aktywacji tej ostatniej [74]. Przypuszcza się, że szlak Th2 mogą indukować receptory inne niż TLR. Wiadomo bowiem, że oprócz TLR istnieje cała grupa tzw. receptorów rozpoznających wzory (PRR; *Pattern Recognition Receptors*) czynnych w odporności naturalnej, takich jak: lektyny typu-C, receptory zmiatacze, pentraksyny i inne [21]. Istnieją jednak dane sugerujące rolę TLR4 w rozwoju odpowiedzi typu Th2. Dabbagh i wsp. wykazali, że myszy *knock-out* pod względem TLR4 w odpowiedzi na LPS miały upośledzoną reaktywność Th2 wyrażoną w zmniejszonej produkcji takich cytokin, jak IL-4 i IL-5 [19]. Towarzyszył temu spadek ekspresji molekuly CD86 (B7.2) na komórkach dendrytycznych. Natomiast inni autorzy wykazali, że LPS indukuje antygenowo-swoistą odpowiedź IgE [40, 87] i eozynofilię płucną. Brak jest danych o roli TLR w aktywacji szlaku Th2 u człowieka.

## MOŻLIWA ROLA TLR W PATOLOGII LUDZKIEJ

### Uraz

Znaczny stopień urazu organizmu prowadzi do istotnego wzrostu ekspresji TLR2 i TLR4 na krwinkach białych już po jednym dniu od zadziałaniu czynnika uszkadzającego. Towarzyszy temu wzrost produkcji cytokin prozapalnych IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$  [65].

### Posocznica

Rozwój posocznicy jest uwarunkowany nie tylko liczbą i wirulencją bakterii, ale także nadmierną sygnalizacją przez receptory Toll-podobne, zwłaszcza TLR4 [49]. Istnieją próby, na razie na materiale doświadczalnym, przerwania przekazywania sygnału przez TLR w celu zahamowania rozwoju choroby. Myszy pozbawione IRAK-4, białka biorącego udział w przekazywaniu sygnałów TLR, okazały się odporne na latentne dawki LPS [78]. Podobną odporność wykazywały myszy pozbawione molekuly CD14 [29], a także króliki otrzymujące przeciwciała monoklonalne anty CD14 [73].

### Autoimmunizacja

Istnieją przesłanki pozwalające sądzić, że TLR mogą w pewnych warunkach indukować powstawanie autoprzeciwciał. W reumatoidalnym zapaleniu stawów powstają niekiedy przeciwciała przeciw DNA. Tłumaczy się to różnicą w metylacji regionów CpG DNA bakteryjnego (prokariota) i kręgowców (eukariota). Metylowane CpG DNA kręgowców są zasadniczo nieimmunogenne, podczas gdy CpG bakterii mają tę właściwość i są rozpoznawane przez TLR9. Natomiast w przebiegu chorób autoimmunizacyjnych samoistnie, a także wskutek leczenia, dochodzi do spadku metylacji DNA. Ponadto kompleksy immunologiczne zawierające między innymi bakteryjny DNA mogą stymulować komórki B z jednej strony przez aktywację receptora dla antygeny, a z drugiej przez pobudzenie TLR9, który występuje konstytutywnie na limfocytach B [45, 69, 94].

### Przewlekłe choroby zapalne jelit

Choroba Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejące zapalenie jelita grubego uważane są za schorzenia, w przebiegu których dochodzi do nadmiernej reakcji obronnej przeciwko florze bakteryjnej jelita. Często towarzyszą temu wykładniki autoimmunizacji, jak np. autoprzeciwciała przeciw cytoplazmie granulocytów typu pANCA, a także inne. Nabłonek pokrywający od światła ścianę jelita jest niemal całkowicie pozbawiony ekspresji TLR. Natomiast w odcinkach jelita zajętych przez chorobę nabłonki wykazują silną ekspresję TLR4 i prowadzi to do aktywacji NF- $\kappa$ B w odpowiedzi na LPS *in vitro* [14, 15].

### Choroby wątroby

Hepatocyty wykazują ekspresję niemal wszystkich TLR, od TLR1 do TLR9, co prawdopodobnie jest odbiciem ich reaktywności na spektrum antygenów pokarmowych docierających do wątroby drogą żyły wrotnej. W marskości wątroby dochodzi do



znacznego wzrostu ekspresji TLR4 i TLR2 na komórkach jednojądrzastych krwi. Towarzyszy temu wzrost poziomu endotoksyn, TNF- $\alpha$  i TNF-R w surowicy krwi, a także LPS i CD14 [56, 70]. LPS stymuluje komórki Browicza-Kupffera i komórki gwiaździste wątroby. Oba rodzaje komórek mają ekspresję TLR2 i TLR4. Stymulacja komórek gwiaździstych przez LPS *via* TLR4 prowadzi do działania fibrogennego w wątrobie [64].

### Nowotwory

Jednym z najważniejszych zadań w immunoterapii nowotworów jest wywołanie wzmocnienia odpowiedzi przeciwnowotworowej gospodarza. Ostatnie badania sugerują, że transdukcja sygnału mediowana przez TLR może mieć duże znaczenie w odpowiedzi przeciwnowotworowej układu odpornościowego. Azuma i wsp. wykazali, że komórki dendrytyczne znacznie szybciej dojrzewają i produkują TNF- $\alpha$  pod wpływem przyłączenia do TLR2 i TLR4 fragmentów ściany komórkowej bakterii gruźlicy [7]. Wykazano, że te ligandy znacząco wzmacniały odpowiedź cytotoksyczną limfocytów Tc i makrofagów przeciw komórkom nowotworowym w wyniku lepszej prezentacji antygenów. Inne badania na modelu mysim wykazały, że dojrzałe komórki dendrytyczne uczulone *in vitro* antygenem związanym z nowotworem i następnie podane w okolicy raka jelita grubego razem z bakteryjnym CpG DNA powodowały, że tolerancja immunologiczna na nowotwór została odwrócona i guz został efektywnie wyeliminowany [30].

## UWAGI KOŃCOWE

Układ receptorów Toll-podobnych, kluczowy element odporności naturalnej, jest wciąż zagadnieniem nowym w immunologii, ale dotychczasowe dane wskazują na jego wielkie i dotąd niedocenione znaczenie. Obecność TLR na komórkach ustroju pozwala bowiem na wczesną sygnalizację zagrożenia infekcją i eliminację patogenów jeszcze przed powstaniem odpowiedzi nabytej, przynajmniej w części przypadków. Pełni również ważną funkcję w inicjowaniu procesów zapalnych i naprawczych w przypadku uszkodzenia komórek/tkanek. Konserwatywny charakter TLR zachowany także u Naczelnych wskazuje na bezwzględną potrzebę jego istnienia.

Związki układu odporności wrodzonej z indukcją odpowiedzi immunologicznej nabytej, a nawet możliwości jej sterowania, otwierają nowe perspektywy w immunologii. Dane doświadczalne sugerują, że zastosowanie agonistów i/lub antagonistów TLRs, a także rozpuszczalnych form tych receptorów może być użyteczne w patologii ludzkiej.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ABRAHAMSON SL, WU HM, WILLIAMS RE, DER K, OTTAH N, LITTLE R, GAZZANO-SANTORO H, THEOFAN G, BAUER R, LEIGH S, ORME A, HORWITZ AH, CARROLL SF, DEDRICK RL. Biochemical characterization of recombinant fusions of lipopolysaccharide binding protein and bactericidal/permeability-increasing protein. Implications in biological activity. *J Biol Chem* 1997; **272**: 2149–2155.

- [2] ADACHI O, KAWAI T, TAKEDA K, MATSUMOTO M, TSUTSUI H, SAKAGAMI M, NAKANISHI K, AKIRA S. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 1998; **9**: 143–150.
- [3] AKIRA S, HOSHINO K, KAISHO T. The role of Toll-like receptors and MyD88 in innate immune responses. *J Endotoxin Res* 2000; **6**: 383–387.
- [4] AKIRA S, YAMAMOTO M, TAKEDA K. Role of adapters in Toll-like receptor signalling. *Biochem Soc Trans* 2003; **31**: 637–642.
- [5] ALEXOPOULOU L, HOLT AC, MEDZHITOV R, FLAVELL RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; **413**: 732–738.
- [6] ANTAL-SZALMAS P. Evaluation of CD14 in host defence. *Eur J Clin Invest* 2000; **30**: 167–179.
- [7] AZUMA I, SEYA T. Development of immunoadjuvants for immunotherapy of cancer. *Int Immunopharmacol* 2001; **1**: 1249–1259.
- [8] BALL ED, GRAZIANO RF, SHEN L, FANGER MW. Monoclonal antibodies to novel myeloid antigens reveal human neutrophil heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79**: 5374–5378.
- [9] BARTON GM, MEDZHITOV R. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2002; **14**: 380–383.
- [10] BARTON GM, MEDZHITOV R. Toll-like receptor signaling pathways. *Science* 2003; **300**: 1524–1525.
- [11] BAUER S, KIRSCHNING CJ, HACKER H, REDECKE V, HAUSMANN S, AKIRA S, WAGNER H, LIPFORD GB. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 9237–9242.
- [12] BEG AA. Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends Immunol* 2002; **23**: 509–512.
- [13] BULUT Y, FAURE E, THOMAS L, EQUILS O, ARDITI M. Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling. *J Immunol* 2001; **167**: 987–994.
- [14] CARIO E, PODOLSKY DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 2000; **68**: 7010–7017.
- [15] CARIO E, ROSENBERG IM, BRANDWEIN SL, BECK PL, REINECKER HC, PODOLSKY DK. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J Immunol* 2000; **164**: 966–972.
- [16] CHAUDHARY PM, FERGUSON C, NGUYEN V, NGUYEN O, MASSA HF, EB Y, JASMIN A, TRASK BJ, HOOD L, NELSON PS. Cloning and characterization of two Toll/Interleukin-1 receptor-like genes TIL3 and TIL4: evidence for a multi-gene receptor family in humans. *Blood* 1998; **91**: 4020–4027.
- [17] CHOW JC, YOUNG DW, GOLENBOCK DT, CHRIST WJ, GUSOVSKY F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 1999; **274**: 10689–10692.
- [18] CHUANG TH, ULEVITCH RJ. Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur Cytokine Netw* 2000; **11**: 372–378.
- [19] DABBAGH K, DAHL ME, STEPICK-BIEK P, LEWIS DB. Toll-like receptor 4 is required for optimal development of Th2 immune responses: role of dendritic cells. *J Immunol* 2002; **168**: 4524–4530.
- [20] DU X, POLTORAK A, WEI Y, BEUTLER B. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur Cytokine Netw* 2000; **11**: 362–371.
- [21] FEARON DT, LOCKSLEY RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996; **272**: 50–53.
- [22] FLO TH, HALAAS O, LIEN E, RYAN L, TETI G, GOLENBOCK DT, SUNDAN A, ESPEVIK T. Human toll-like receptor 2 mediates monocyte activation by *Listeria monocytogenes*, but not by group B streptococci or lipopolysaccharide. *J Immunol* 2000; **164**: 2064–2069.
- [23] GAY NJ, KEITH FJ. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature* 1991; **351**: 355–356.
- [24] HAASE C, MICHELSEN BK, JORGENSEN TN. CD40 is necessary for activation of naive T cells by a dendritic cell line *in vivo* but not *in vitro*. *Scand J Immunol* 2004; **59**: 237–245.
- [25] HAJJAR AM, O'MAHONY DS, OZINSKY A, UNDERHILL DM, ADEREM A, KLEBANOFF SJ, WILSON CB. Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J Immunol* 2001; **166**: 15–19.
- [26] HASHIMOTO C, HUDSON KL, ANDERSON KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988; **52**: 269–279.



- [27] HAYASHI F, SMITH KD, OZINSKY A, HAWN TR, YI EC, GOODLETT DR, ENG JK, AKIRA S, UNDERHILL DM, ADEREM A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001; **410**: 1099–1103.
- [28] HAZIOT A, RONG GW, LIN XY, SILVER J, GOYERT SM. Recombinant soluble CD14 prevents mortality in mice treated with endotoxin (lipopolysaccharide). *J Immunol* 1995; **154**: 6529–6532.
- [29] HAZIOT A, FERRERO E, KONTGEN F, HIJIYA N, YAMAMOTO S, SILVER J, STEWART CL, GOYERT SM. Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity* 1996; **4**: 407–414.
- [30] HECKELSMILLER K, BECK S, RALL K, SIPOS B, SCHLAMP A, TUMA E, ROTHENFUSSER S, ENDRES S, HARTMANN G. Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy. *Eur J Immunol* 2002; **32**: 3235–3245.
- [31] HEIL F, HEMMI H, HOCHREIN H, AMPENBERGER F, KIRSCHNING C, AKIRA S, LIPFORD G, WAGNER H, BAUER S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004; **303**: 1526–1529.
- [32] HEINE H, KIRSCHNING CJ, LIEN E, MONKS BG, ROTHE M, GOLENBOCK DT. Cutting edge: cells that carry a null allele for toll-like receptor 2 are capable of responding to endotoxin. *J Immunol* 1999; **162**: 6971–6975.
- [33] HEMMI H, TAKEUCHI O, KAWAI T, KAISHO T, SATO S, SANJO H, MATSUMOTO M, HOSHINO K, WAGNER H, TAKEDA K, AKIRA S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; **408**: 740–745.
- [34] HOFFMANN JA, KAFATOS FC, JANEWAY CA, EZEKOWITZ RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 1999; **284**: 1313–1318.
- [35] HOSHINO K, TAKEUCHI O, KAWAI T, SANJO H, OGAWA T, TAKEDA Y, TAKEDA K, AKIRA S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999; **162**: 3749–3752.
- [36] INGALLS RR, ARNAOUT MA, GOLENBOCK DT. Outside-in signaling by lipopolysaccharide through a tailless integrin. *J Immunol* 1997; **159**: 433–438.
- [37] INGALLS RR, MONKS BG, SAVEDRA R, JR., CHRIST WJ, DELUDE RL, MEDVEDEV AE, ESPEVIK T, GOLENBOCK DT. CD11/CD18 and CD14 share a common lipid A signaling pathway. *J Immunol* 1998; **161**: 5413–5420.
- [38] JANEWAY CA, JR., MEDZHITOV R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; **20**: 197–216.
- [39] JARROSSAY D, NAPOLITANI G, COLONNA M, SALLUSTO F, LANZAVECCHIA A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001; **31**: 3388–3393.
- [40] JIANG GZ, KATO Y, SUGIYAMA T, KOIDE N, CHAKRAVORTTY D, KAWAI M, FUKADA M, YOSHIDA T, YOKOCHI T. Role of CD86 (B7-2) in triggering of antigen-specific IgE antibody response by lipopolysaccharide. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998; **21**: 303–311.
- [41] JOHNSON GB, BRUNN GJ, TANG AH, PLATT JL. Evolutionary clues to the functions of the Toll-like family as surveillance receptors. *Trends Immunol* 2003; **24**: 19–24.
- [42] KADOWAKI N, HO S, ANTONENKO S, MALEFYT RW, KASTELEIN RA, BAZAN F, LIU YJ. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001; **194**: 863–869.
- [43] KAWAI T, TAKEUCHI O, FUJITA T, INOUE J, MUHLRADT PF, SATO S, HOSHINO K, AKIRA S. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* 2001; **167**: 5887–5894.
- [44] KIRSCHNING CJ, WESCHE H, MERRILL AYRES T, ROTHE M. Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1998; **188**: 2091–2097.
- [45] KRIEG AM. A role for Toll in autoimmunity. *Nat Immunol* 2002; **3**: 423–424.
- [46] LAMPING N, DETTMER R, SCHRODER NW, PFEIL D, HALLATSCHEK W, BURGER R, SCHUMANN RR. LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or gram-negative bacteria. *J Clin Invest* 1998; **101**: 2065–2071.
- [47] LANDMANN R, MULLER B, ZIMMERLI W. CD14, new aspects of ligand and signal diversity. *Microbes Infect* 2000; **2**: 295–304.
- [48] LANDMANN R, ZIMMERLI W, SANSANO S, LINK S, HAHN A, GLAUSER MP, CALANDRA T. Increased circulating soluble CD14 is associated with high mortality in gram-negative septic shock. *J Infect Dis* 1995; **171**: 639–644.

- [49] LAWTON JA, GHOSH P. Novel therapeutic strategies based on toll-like receptor signaling. *Curr Opin Chem Biol* 2003; **7**: 446–451.
- [50] LEADBETTER EA, RIFKIN IR, HOHLBAUM AM, BEAUDETTE BC, SHLOMCHIK MJ, MARSHAK-ROTHSTEIN A. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 2002; **416**: 603–607.
- [51] LÉBOUDER E, REY-NORES JE, RUSHMERE NK, GRIGOROV M, LAWN SD, AFFOLTER M, GRIF-FIN GE, FERRARA P, SCHIFFRIN EJ, MORGAN BP, LABETA MO. Soluble forms of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. *J Immunol* 2003; **171**: 6680–6689.
- [52] LEMAITRE B, REICHHART JM, HOFFMANN JA. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 14614–14619.
- [53] LEMAITRE B, NICOLAS E, MICHAUT L, REICHHART JM, HOFFMANN JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; **86**: 973–983.
- [54] LIEN E, INGALLS RR. Toll-like receptors. *Crit Care Med* 2002; **30**: S1–S11.
- [55] LORD KA, HOFFMAN-LIEBERMANN B, LIEBERMANN DA. Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6. *Oncogene* 1990; **5**: 1095–1097.
- [56] MANIGOLD T, BOCKER U, HANCK C, GUNDT J, TRABER P, ANTONI C, ROSSOL S. Differential expression of toll-like receptors 2 and 4 in patients with liver cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; **15**: 275–282.
- [57] MEANS TK, WANG S, LIEN E, YOSHIMURA A, GOLENBOCK DT, FENTON MJ. Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1999; **163**: 3920–3927.
- [58] MEDZHITOV R, PRESTON-HURLBURT P, JANEWAY CA, JR. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; **388**: 394–397.
- [59] MELLMAN I, STEINMAN RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 2001; **106**: 255–258.
- [60] OCHOA MT, LEGASPI AJ, HATZIRIS Z, GODOWSKI PJ, MODLIN RL, SIELING PA. Distribution of Toll-like receptor 1 and Toll-like receptor 2 in human lymphoid tissue. *Immunology* 2003; **108**: 10–15.
- [61] O'NEILL L. The Toll/interleukin-1 receptor domain: a molecular switch for inflammation and host defence. *Biochem Soc Trans* 2000; **28**: 557–563.
- [62] OPAL SM, GLUCK T. Endotoxin as a drug target. *Crit Care Med* 2003; **31**: S57–64.
- [63] OZINSKY A, UNDERHILL DM, FONTENOT JD, HAJJAR AM, SMITH KD, WILSON CB, SCHROEDER L, ADEREM A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 13766–13771.
- [64] PAIK YH, SCHWABE RF, BATALLER R, RUSSO MP, JOBIN C, BRENNER DA. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2003; **37**: 1043–1055.
- [65] PATERSON HM, MURPHY TJ, PURCELL EJ, SHELLEY O, KRIYNOVICH SJ, LIEN E, MANNICK JA, LEDERER JA. Injury primes the innate immune system for enhanced Toll-like receptor reactivity. *J Immunol* 2003; **171**: 1473–1483.
- [66] PIVARCSI A, BODAI L, RETHI B, KENDERESSY-SZABO A, KORECK A, SZELL M, BEER Z, BATA-CSORGOO Z, MAGOCSI M, RAJNAVOLGYI E, DOBOZY A, KEMENY L. Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int Immunol* 2003; **15**: 721–730.
- [67] POLTORAK A, HE X, SMIRNOVA I, LIU MY, VAN HUFFEL C, DU X, BIRDWELL D, ALEJOS E, SILVA M, GALANOS C, FREUDENBERG M, RICCIARDI-CASTAGNOLI P, LAYTON B, BEUTLER B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 1998; **282**: 2085–2088.
- [68] REMER KA, BRCIC M, JUNGI TW. Toll-like receptor-4 is involved in eliciting an LPS-induced oxidative burst in neutrophils. *Immunol Lett* 2003; **85**: 75–80.
- [69] RICHARDSON B, SCHEINBART L, STRAHLER J, GROSS L, HANASH S, JOHNSON M. Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1990; **33**: 1665–1673.



- [70] RIORDAN SM, SKINNER N, NAGREE A, MCCALLUM H, MCIVER CJ, KURTOVIC J, HAMILTON JA, BENCHMARK S, WILLIAMS R, VISVANATHAN K. Peripheral blood mononuclear cell expression of toll-like receptors and relation to cytokine levels in cirrhosis. *Hepatology* 2003; **37**: 1154–1164.
- [71] ROCK FL, HARDIMAN G, TIMANS JC, KASTELEIN RA, BAZAN JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 588–593.
- [72] SAUTER B, ALBERT ML, FRANCISCO L, LARSSON M, SOMERSAN S, BHARDWAJ N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 2000; **191**: 423–434.
- [73] SCHIMKE J, MATHISON J, MORGIEWICZ J, ULEVITCH RJ. Anti-CD14 mAb treatment provides therapeutic benefit after in vivo exposure to endotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 13875–13880.
- [74] SCHNARE M, BARTON GM, HOLT AC, TAKEDA K, AKIRA S, MEDZHITOV R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2001; **2**: 947–950.
- [75] SCHROMM AB, LIEN E, HENNEKE P, CHOW JC, YOSHIMURA A, HEINE H, LATZ E, MONKS BG, SCHWARTZ DA, MIYAKE K, GOLENBOCK DT. Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *J Exp Med* 2001; **194**: 79–88.
- [76] SCHUMANN RR, LEONG SR, FLAGGS GW, GRAY PW, WRIGHT SD, MATHISON JC, TOBIAS PS, ULEVITCH RJ. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 1990; **249**: 1429–1431.
- [77] SCHWANDNER R, DZIARSKI R, WESCHE H, ROTHE M, KIRSCHNING CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 1999; **274**: 17406–17409.
- [78] SUZUKI N, SUZUKI S, DUNCAN GS, MILLAR DG, WADA T, MIRTSOS C, TAKADA H, WAKEHAM A, ITIE A, LIS, PENNINGER JM, WESCHE H, OHASHI PS, MAK TW, YEH WC. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 2002; **416**: 750–756.
- [79] TAGUCHI T, MITCHAM JL, DOWER SK, SIMS JE, TESTA JR. Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the *Drosophila* transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14. *Genomics* 1996; **32**: 486–488.
- [80] TAKEUCHI O, KAWAI T, SANJO H, COPELAND NG, GILBERT DJ, JENKINS NA, TAKEDA K, AKIRA S. TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene* 1999; **231**: 59–65.
- [81] TAKEUCHI O, HOSHINO K, KAWAI T, SANJO H, TAKADA H, OGAWA T, TAKEDA K, AKIRA S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999; **11**: 443–451.
- [82] TOBIAS PS, SOLDAU K, ULEVITCH RJ. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med* 1986; **164**: 777–793.
- [83] TSUJI S, MATSUMOTO M, TAKEUCHI O, AKIRA S, AZUMA I, HAYASHI A, TOYOSHIMA K, SEYA T. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll-like receptors. *Infect Immun* 2000; **68**: 6883–6890.
- [84] UNDERHILL DM, OZINSKY A, HAJJAR AM, STEVENS A, WILSON CB, BASSETTI M, ADEREM A. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 1999; **401**: 811–815.
- [85] VABULAS RM, AHMAD-NEJAD P, GHOSE S, KIRSCHNING CJ, ISSELS RD, WAGNER H. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* 2002; **277**: 15107–15112.
- [86] VABULAS RM, BRAEDEL S, HILF N, SINGH-JASUJA H, HERTER S, AHMAD-NEJAD P, KIRSCHNING CJ, DA COSTA C, RAMMENSEE HG, WAGNER H, SCHILD H. The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *J Biol Chem* 2002; **277**: 20847–20853.
- [87] WAN GH, LI CS, LIN RH. Airborne endotoxin exposure and the development of airway antigen-specific allergic responses. *Clin Exp Allergy* 2000; **30**: 426–432.
- [88] WANG JE, WARRIS A, ELLINGSEN EA, JORGENSEN PF, FLO TH, ESPEVIK T, SOLBERG R, VERWEIJ PE, AASEN AO. Involvement of CD14 and toll-like receptors in activation of human monocytes by *Aspergillus fumigatus* hyphae. *Infect Immun* 2001; **69**: 2402–2406.
- [89] WHITHAM S, DINESH-KUMAR SP, CHOI D, HEHL R, CORR C, BAKER B. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* 1994; **78**: 1101–1115.
- [90] WRIGHT SD, RAMOS RA, TOBIAS PS, ULEVITCH RJ, MATHISON JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; **249**: 1431–1433.

- [91] WURFEL MM, KUNITAKE ST, LICHENSTEIN H, KANE JP, WRIGHT SD. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. *J Exp Med* 1994; **180**: 1025–1035.
- [92] WYLLIE DH, KISS-TOTH E, VISINTIN A, SMITH SC, BOUSSOUF S, SEGAL DM, DUFF GW, DOWER SK. Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *J Immunol* 2000; **165**: 7125–7132.
- [93] YANG RB, MARK MR, GRAY A, HUANG A, XIE MH, ZHANG M, GODDARD A, WOOD WI, GURNEY AL, GODOWSKI PJ. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signaling. *Nature* 1998; **395**: 284–288.
- [94] YUNG RL, QUDDUS J, CHRISP CE, JOHNSON KJ, RICHARDSON BC. Mechanism of drug-induced lupus. I. Cloned Th2 cells modified with DNA methylation inhibitors *in vitro* cause autoimmunity *in vivo*. *J Immunol* 1995; **154**: 3025–3035.

*Redaktor prowadzący – Barbara Płytycz*

*Otrzymano: 09.04.2004 R.*

*Przyjęto: 01.06.2004 R.*

*ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań;*

*e-mail: jzeromski@amp.edu.pl*





## MÓZGOWE NACZYNIA KAPILARNE. ULTRASTRUKTURALNE WYKŁADNIKI PROCESÓW ANGIOGENEZY

BRAIN CAPILLARIES. ULTRASTRUCTURAL MANIFESTATION  
OF ANGIOGENESIS

Małgorzata FRONTCZAK-BANIEWICZ i Michał WALSKI

Zakład Ultrastruktury Komórki, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im  
M. Mossakowskiego PAN, Warszawa

*Streszczenie:* W artykule opisano cechy morfologiczne naczyń kapilarnych w okolicy barierowej i bezbarierowej mózgu. Przedstawiono również na poziomie ultrastrukturalnym przykłady nowoformowanych naczyń, które powstają według dwóch różnych mechanizmów oraz z udziałem macierzystych komórek śródbłonkowych. Obserwacje morfologiczne znajdują potwierdzenie w badaniach immunocytochemicznych.

*Słowa kluczowe:* naczynia kapilarne, ultrastruktura, angiogeneza, macierzyste komórki śródbłonkowe.

*Summary:* The morphological features of microvessels in barrier competent and barrier free regions of brain are described. Some examples of new vessel formation are presented on ultrastructural level. New vessel formation comprises two different mechanisms: endothelial sprouting and intussusceptive microvascular growth. Recently, intensive studies are evaluated on endothelial progenitors participation in new vessel formation. We present samples of new formed blood capillaries. Immunocytochemical ultrastructural studies additionally confirmed our morphological observations.

*Key words:* brain capillaries, ultrastructure, vasculogenesis, angiogenesis, progenitor endothelial cell.

### WSTĘP

Kiedy Leonardo da Vinci prowadził rozważania na temat mechanizmów formowania serca i układu krążenia, mógł jedynie poprzez analogię porównywać te procesy ze znanymi już wcześniej. Stwierdził więc, że układ naczyniowy rozwija się podobnie jak drzewo z nasiona, którym jest serce. Tworzy ono bogatą sieć naczyniową i pień z wieloma odgałęzieniami, którymi są aorta i tętnice. Znaczna część układu krwionośnego zostaje uformowana, zanim nastąpi pierwsze uderzenie serca. Chociaż „wypuszczanie



nowych pędów” od istniejących naczyń krwionośnych jest rzeczywiście głównym mechanizmem formowania nowych naczyń krwionośnych, nazywanym angiogenezą, to obecnie znane są również inne mechanizmy. W dojrzałym organizmie w odpowiedzi na sygnał naczynia krwionośne powstają z naczyń uformowanych w czasie rozwoju embrionalnego oraz w okresie pourodzeniowym.

W pracy podsumujemy główne informacje związane z formowaniem nowych naczyń, a także na mikrofotografiach elektronowych przedstawimy cechy morfologiczne wszystkich elementów naczyń oraz zmiany, jakim ulegają w trakcie ich formowania w parenchymie mózgowej.

## BUDOWA ULTRASTRUKTURALNA KAPILAR MÓZGOWYCH

Naczynia kapilarne ośrodkowego układu nerwowego zbudowane są z pojedynczej warstwy komórek śródbłonka otoczonej od zewnątrz błoną podstawną i elementami przydanki [32]. Błona wewnętrzna utworzona z komórek śródbłonkowych nie zawiera włóknistych elementów łącznotkankowych, natomiast w przydancie naczyń kapilarnych mogą występować nieliczne komórki mięśni gładkich.

W obrazie mikroskopowo-elektronowym naczyń włosowatych ich światło wyścielone jest pojedynczą warstwą płaskich komórek śródbłonka, których długa oś ułożona jest równolegle do kierunku krwi płynącej w naczyniu. Powierzchnia luminalna komórek śródbłonka wykazuje nieliczne uwypuklenia i zagłębienia. Gładką powierzchnię abluminalną komórek śródbłonkowych otacza lita, miejscami rozgałęziona błona podstawna, zbudowana z bezpostaciowej substancji o umiarkowanej gęstości elektronowej. W rozgałęzienia błony podstawnej wnikają wypustki komórek śródbłonka i pericyty. Sąsiadujące komórki śródbłonka tworzą połączenia desmosomalne, wytwarzając tzw. zespolenia ścisłe, całkowicie nieprzepuszczalne dla substancji wielkocząsteczkowych i wysoce ograniczające przechodzenie substancji niskocząsteczkowych. Stanowią one istotny element morfologiczny bariery krew-mózg [3, 18]. Cechą wyróżniającą śródbłonki naczyń włosowatych kory mózgowej jest obecność ścisłych połączeń.

Komórki śródbłonka w obrazie mikroskopowo-elektronowym wykazują obecność typowych organelli komórkowych. Ich spłaszczone, owalne jądra zawierają obfitą elektronowo-gęstą heterochromatynę, z wyraźną agregacją na obwodzie ściany jądrowej oraz euchromatynę tworzącą jasne przestrzenie i stanowiącą główną część plazmy jądrowej. W cytoplazmie występują spłaszczone kanały siateczki śródplazmatycznej ziarnistej. Z zewnętrzną powierzchnią otoczki jądrowej, jak również z kanałami siateczki związane rybosomy o średnicy około 20 nm. Obok rybosomów związanych z błonami siateczki śródplazmatycznej występują one także w postaci wolnej w cytoplazmie podstawowej. W strefie przyjądrowej cytoplazmy komórek śródbłonkowych znajdują się także cysterny Golgiego oraz mitochondria. Elementy szkieletu plazmatycznego w rutynowych badaniach ultrastrukturalnych nie są widoczne. Komórki śródbłonka naczyń kapilarnych ośrodkowego układu nerwowego wyróżniają się ponadto małą liczebnością pęcherzyków pinocytarnych.

Do elementów budujących ściany naczyń kapilarnych mózgu zaliczane są także pericyty. Tworzą one populację komórek przynaczyniowych znajdujących się między blaszkami błony podstawnej. Błona podstawna oddziela pericyty od komórek śródbłonkowych, a z drugiej strony od wypustek przynaczyniowych astrocytów. Pericyty są heterogenną populacją komórek wykazującą specyfikę zależną od rodzaju tkanki i od rodzaju naczynia [2]. Wypustki cytoplazmatyczne pericytów stanowią dla komórek śródbłonkowych naczyń kapilarnych mózgu strukturalne rusztowanie. W ich wnętrzu widoczne są pojedyncze filamenty wchodzące w skład szkieletu plazmatycznego [23].

W przestrzeni okołonaczyniowej znajdują się komórki, które są w kontakcie z abluminalną powierzchnią naczyń krwionośnych, ale od komórek śródbłonkowych oddzielone pozostają blaszką podstawną. Uważa się, iż mają one wpływ na zmiany funkcjonalne komórek śródbłonkowych. Do grupy tej należą komórki przynaczyniowe o morfologii komórek fagocytarnych [43]. Wykazano, iż ta populacja fagocytów może uwalniać cytokiny i enzymy proteolityczne [39]. Inną grupę stanowi subpopulacja przynaczyniowych makrofagów mających w cytoplazmie liczne piankowate fagolizosomy. Komórki te produkują i wydzielają proteazy biorące udział w degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej [6].

Istotnym elementem budowy naczyń kapilarnych w ośrodkowym układzie nerwowym jest blaszka podstawna. Jest to warstwa macierzy zewnątrzkomórkowej występująca na granicy komórek śródbłonka naczyń krwionośnych, oraz przynaczyniowych wypustek astrocytów. Elementy składowe błon podstawnych są wytworem komórek śródbłonkowych, pericytów i przynaczyniowych wypustek cytoplazmatycznych astrocytów [16, 45, 38, 11]. Zbudowana jest z materiału ziarnisto-włókninkowatego, ułożonego w trzy warstwy. Pomiędzy dwiema elektronowo-jasnymi warstwami brzeżnymi znajduje się elektronowo-gęsta warstwa zbudowana z delikatnych włókienek. Blaszkę jasną przyległą do błony plazmatycznej komórek śródbłonka tworzy, zbudowany głównie z proteoglikanów, glikokaliks. Położona poniżej blaszki jasnej elektronowo-gęsta, ziarnisto-włóknista warstwa zbudowana jest z kolagenu typu IV oraz glikoprotein, takich jak fibronektyna i laminina [32].

Przeniesienie sygnału między komórkami śródbłonkowymi i błoną podstawną lub macierzą zewnątrzkomórkową odbywa się za pośrednictwem integryn. Następuje to w mechanizmie reorganizacji cytoszkieletu, a tym samym zmiany kształtu komórki [10, 19]. Komórki śródbłonkowe mają na swojej powierzchni receptory integrynowe, które rozpoznają większość elementów składowych błony podstawnej. Uważa się, iż spośród receptorów integrynowych tylko  $\alpha_v\beta_3$  rozpoznaje wszystkie białka macierzy zewnątrzkomórkowej [14].

Wracając do morfologii naczyń kapilarnych należy podkreślić, że nie we wszystkich strukturach ośrodkowego układu nerwowego charakteryzują się one posiadaniem śródbłonka typu ciągłego. W okolicach, w których nie ma układu barierowego między komórkami śródbłonkowymi, brak jest połączeń desmosomalnych. Należą do nich: nerwowa część przysadki mózgowej, splot naczyniówkowy, szyszynka oraz niektóre ugrupowania jąder podwzgórza, a także pole najdalsze w dnie komory czwartej. Ściana większości naczyń kapilarnych nerwowej części przysadki jest cienka, a jej kształt jest nieregularny. Komórki śródbłonka spoczywają na cienkiej błonie podstawnej i leżącej



pod nią szerokiej warstwie macierzy zewnątrzkomórkowej. W większości naczyń włosowatych nerwowej części przysadki mózgowej między komórkami śródbłonka nie obserwuje się zespołów ścisłych. Od błon plazmatycznych komórek śródbłonka naczyń kapilarnych nerwowej części przysadki mózgowej odcinane są liczne różnej wielkości pęcherzyki pinocytarne. Uważa się, iż okienkowaty śródbłonek umożliwia zwiększoną przepuszczalność cząsteczek o niskiej masie. Oprócz komórek śródbłonka i błony podstawnej ścianę naczyń budują pericyty oraz inne komórki przynacyniowe.

W ostatnich latach coraz częściej zwraca się uwagę na istotną rolę śródbłonka naczyń zarówno w procesach fizjologicznych, jak i w patologii wielu stanów chorobowych [13, 40]. W mózgu śródbłonek naczyń kapilarnych stanowiący składową bariery krew-mózg, pełni szczególną rolę związaną ze stworzeniem środowiska dla prawidłowego funkcjonowania wszystkich elementów tkanki nerwowej będąc kluczowym regulatorem homeostazy w ośrodkowym układzie nerwowym. Prawidłowo funkcjonujące komórki śródbłonka utrzymują równowagę w układzie naczyniowym, a także biorą udział w regulacji procesów, takich jak: kurczliwość i rozszerzanie naczyń [41], przyleganie elementów morfotycznych krwi [9, 24, 30], w procesach wykrzepiania [37, 33] oraz promocji wzrostu np. komórek mięśniowych w trakcie rozwoju miażdżycy naczyń [41, 29, 30].

Niezwykle istotna okazała się współzależność między komórkami śródbłonkowymi i błoną podstawną lub macierzą zewnątrzkomórkową. Interakcje komórek śródbłonkowych naczyń kapilarnych z komponentami macierzy zewnątrzkomórkowej, sąsiadującymi komórkami, a także odpowiedź komórek śródbłonkowych na autokrynną i parakrynną czynniki wzrostowe odgrywają istotną rolę w czasie rozwoju układu naczyniowego w utrzymaniu prawidłowej struktury i funkcji kapilar [8].

Przenoszenie takich informacji często wymaga przykomórkowej, kontrolowanej proteolizy błony podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej. W procesach proteolizy zaangażowanych jest wiele klas enzymów. Wśród nich znaczną rolę odgrywają metaloproteazy [6, 31]. Badania ostatnich lat wykazały udział metaloproteaz w patogenezie wielu chorób układu nerwowego w procesach przebiegających z uszkodzeniem bariery krew-mózg [20]. Przykładem tej patologii jest wewnątrzmożgowe krwawienie, ischemia, zawał mózgu, a także choroby związane z procesami zapalnymi, takie jak: stwardnienie rozsiane i eksperymentalny model stwardnienia rozsianego (EAE). Udział metaloproteaz wykazano również w procesach towarzyszących wzrostowi nowotworów [31].

W odpowiedzi na czynnik uszkodzający, stan zapalny lub czynniki angiogeniczne komórki śródbłonka naczyń kapilarnych uczestniczą w degradacji błon podstawnych, proliferują oraz migrują do przestrzeni pozanaczyniowej biorąc udział w formowaniu nowych naczyń [7]. Liczebność nowo utworzonych naczyń kapilarnych może być wskaźnikiem wczesnych procesów naprawczych.

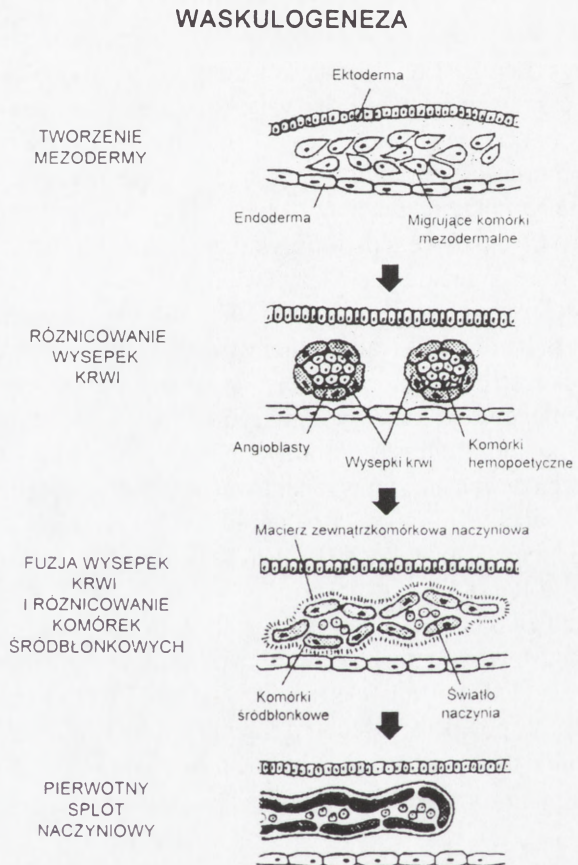
## FORMOWANIE NACZYŃ

Pierwotny splot naczyniowy powstaje z prekursorowych komórek śródbłonkowych (angioblastów), które wywodzą się z mezodermy i ulegają różnicowaniu w ścisłym sąsiedztwie komórek, które dadzą początek liniom komórek krwi. Ścisły kontakt i

zależność między komórkami śródbłonkowymi i komórkami krwi potwierdza też istnienie wspólnego progenitora – hemangioblastu. Proces różnicowania angioblastu i powstanie pierwotnego splotu naczyniowego zwane jest waskulogenezą [35, 44] (ryc. 1). Odtąd wszystkie powstające naczynia wywodzą się z pierwotnego splotu naczyniowego i powstają poprzez migrację komórek śródbłonkowych w procesie zwanym angiogenezą. W rzeczywistości, większość naczyń krwionośnych zarodka powstaje w procesie angiogenezy. Angiogeneza jest również główną drogą formowania naczyń w dorosłym organizmie. Dojrzewanie układu naczyniowego obejmuje tworzenie światła naczynia, powstawanie małych i dużych naczyń, rekrutację przynaczyniowych komórek podporowych oraz proces niszczenia nadmiaru powstałych naczyń (remodelowanie naczyń) [36].

Naczynia krwionośne mózgu powstają w trakcie procesu angiogenezy, gdyż angioblasty migrują w okolice głowy, aby utworzyć okołonerwowy splot naczyniowy, który oplata mózg. Wywodzące się z tego splotu kapilary przenikają w głąb neuroektodermę w określonym okresie rozwoju embrionalnego (np. u szczura ma to miejsce około 11 dnia życia zarodka), a proces nazywany jest wewnątrz-mózgowym unaczynianiem [33]. Następnie rozpoczyna się intensywne namnażanie komórek śródbłonkowych w celu uformowania wewnątrz-mózgowej sieci naczyniowej. Jednocześnie formowaniu tej sieci towarzyszy dojrzewanie morfologiczne i funkcjonalne naczyń. Procesy związane z tworzeniem i formowaniem naczyń mózgowych ulegają zakończeniu około 2 tygodnia po urodzeniu.

Formowanie nowych naczyń jest procesem, który wymaga aktywności chemo-taktycznej, proteolitycznej oraz mitogennej komórek śródbłonkowych oraz współdziałania komórek śródbłonkowych z macierzą zewnątrzkomórkową komórkami



RYCINA 1. Ilustracja przebiegu procesu waskulogenezy wykonana na podstawie własnych rozważań i danych z literatury



przynaczyniowymi. W regulacji tych procesów kluczową rolę pełni naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) oraz jego receptory VEGFR-1, VEGFR-2 i VEGFR-3, które należą do rodziny kinaz tyrozynowych [33, 5, 12]. Związanie VEGF przez receptory VEGFR-2 (FLK-1) powoduje zmianę w morfologii komórki śródbłonkowej oraz indukuje jej podziały [15,22]. Receptory Flk-1 występują na komórkach śródbłonkowych już we wczesnym rozwoju i uważane są za markery macierzystej komórki śródbłonkowej.

## MECHANIZMY ANGIOGENEZY

Po utworzeniu pierwotnego spłotu naczyniowego następuje dalsze namnażanie komórek śródbłonkowych i nowe naczynie kapilarne powstaje przez migrację komórek śródbłonkowych ze ściany naczynia macierzystego (*sprouting angiogenesis*) lub przez jej podział w ścianie naczynia macierzystego i tworzenie mostka (*non-sprouting angiogenesis*) [4, 17, 43].

Uwolnienie komórki śródbłonkowej ze ściany naczynia możliwe jest dzięki proteolitycznej degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej. Migrujące i namnażające się komórki śródbłonkowe tworzą światło nowego naczynia, które ulega następnie dojrzeniu i przebudowie (ryc. 2).

Tworzenie nowych naczyń w obrębie naczyń już istniejących następuje przez podział komórek śródbłonkowych w ścianie naczynia (ryc. 3). W następnym etapie dochodzi do wytworzenia macierzy zewnątrzkomórkowej w pobliżu tak powstającego mostka, co w konsekwencji doprowadza do uformowania nowego naczynia kapilarnego. Formowanie nowych naczyń według tych mechanizmów następuje w czasie tworzenia sieci naczyniowej takich narządów, jak płuca i serce.

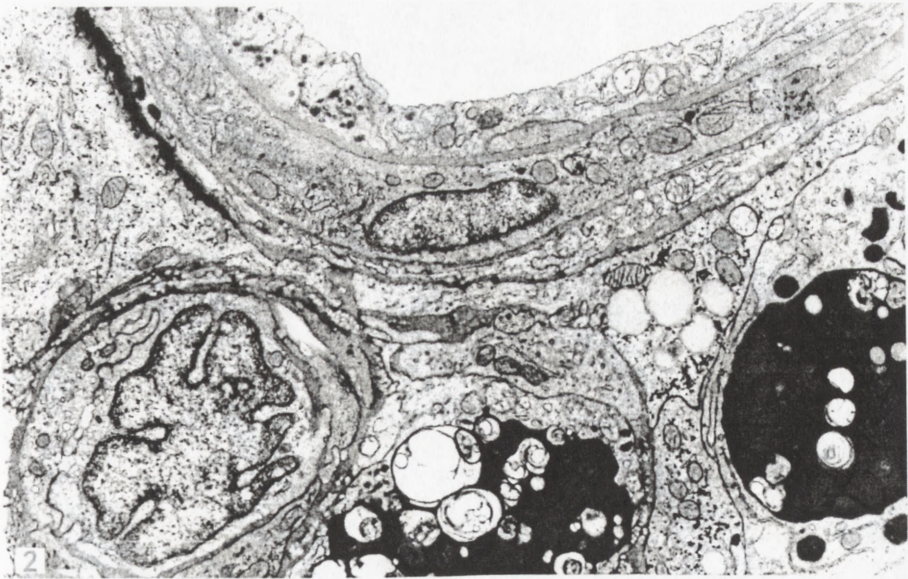
Badania ultrastrukturalne w transmisyjnym mikroskopie elektronowym pozwalają wykazać cechy morfologiczne zarówno komórek śródbłonkowych, jak i pozostałych elementów strukturalnych naczyń w czasie angiogenezy. Analiza immunocytochemiczna na poziomie ultrastrukturalnym pozwala przy pomocy przeciwciał będących markerami np. młodych naczyń wyznaczać je w sieci naczyniowej.

Badania immunocytochemiczne na poziomie ultrastrukturalnym zasadniczo są podobne do metod stosowanych na poziomie mikroskopu świetlnego. Ze względu jednak na kolejność i sposób postępowania techniki immunocytochemiczne na poziomie mikroskopu elektronowego zostały podzielone na przedzatopieniowe i pozatopieniowe. Zastosowana przez nas technika pozatopieniowa uważana jest za najbardziej korzystną ze względu na największą wiarygodność lokalizacji antygeny. Dzięki tej technice udało nam się potwierdzić fenotyp angiogeniczny komórki śródbłonkowej (ryc. 4) i wyodrębnić młode naczynia w parenchymie mózgowej [17].

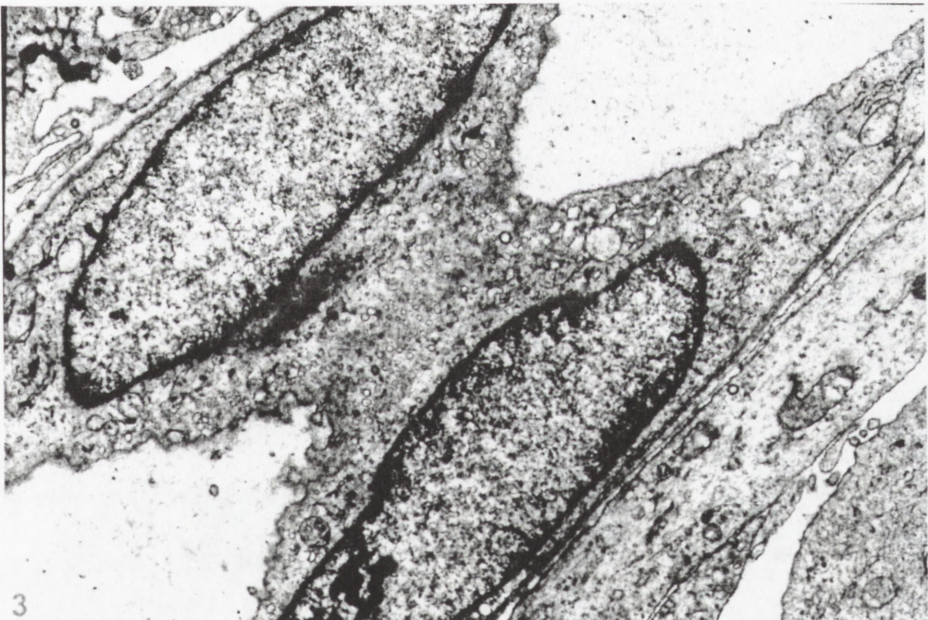
## MACIERZYSTE KOMÓRKI ŚRÓDBŁONKOWE

Do niedawna przypuszczano, iż formowanie nowych naczyń w dorosłym organizmie odbywa się wyłącznie według jednego z mechanizmów angiogenezy. Badania ostatnich lat wykazały jednakże obecność w krążącej krwi prekursorów komórek śródbłonkowych



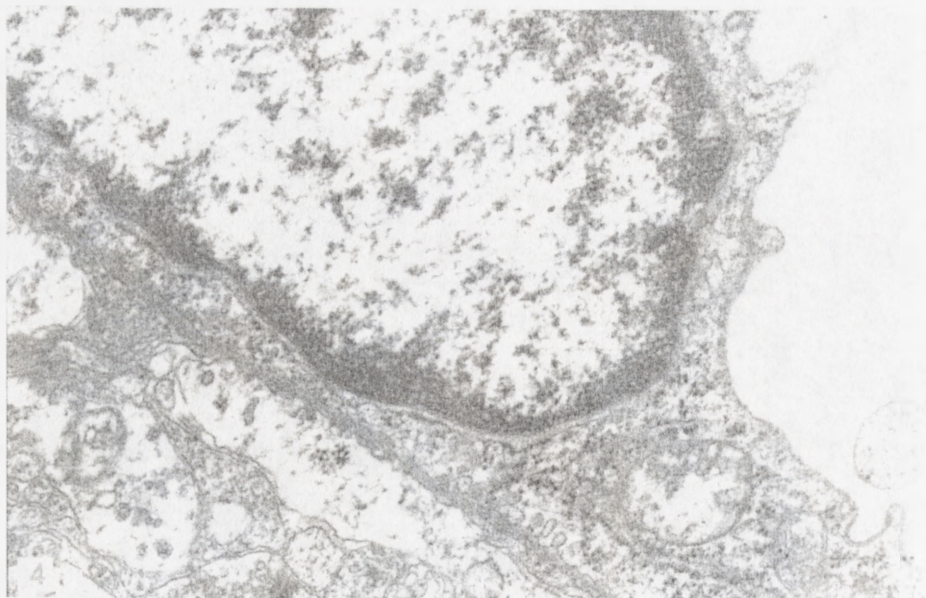


RYCINA 2. Mikrografia elektronowa wykonana z preparatu kory mózgu szczura okolicy czołowo-skroniowej, 7 dni po urazie mechanicznym. Nowopowstająca kapilara jest połączona z naczyniem macierzystym materiałem błonpodstawnym. Komórki śródbłonkowe są zróżnicowane morfologicznie i prawie w całości zamykają nieuformowane ostatecznie światło. Jądro śródbłonka jest wielopłatowe z bogatą euchromatyną. W otoczeniu powstającego naczynia znajdują się wypustki astrocytów oraz fagocyty zawierające fagolizosomy. Samo naczynie macierzyste ma liczne organella komórkowe oraz ciała Weibel-Palade'a (pow. 18000)

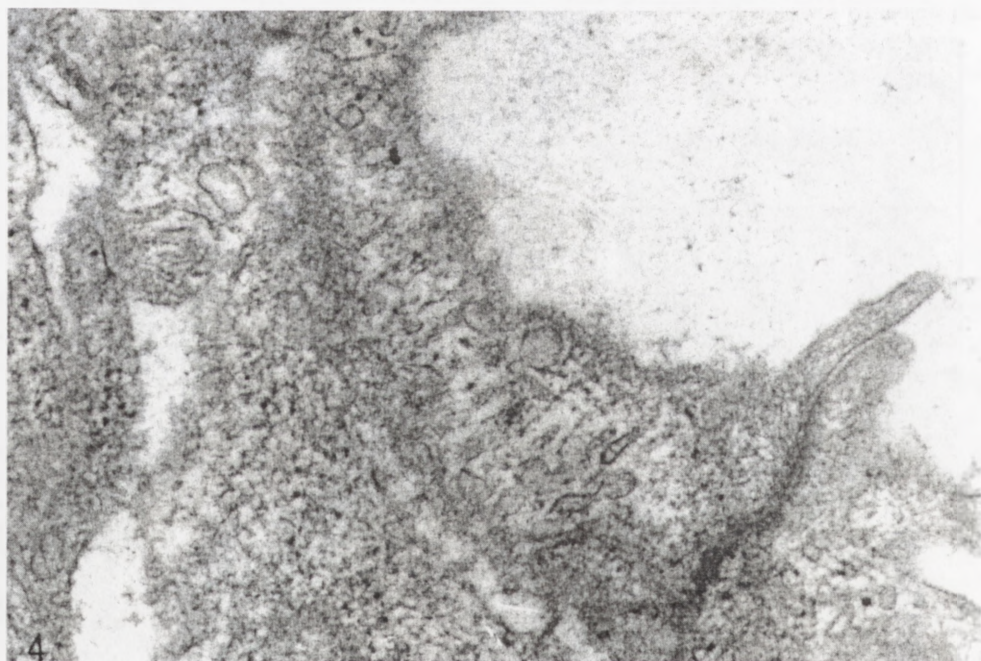


RYCINA 3. Podział komórki śródbłonkowej w naczyniu macierzystym. Widoczne są dwa oddzielone od siebie jądra komórkowe. W cytoplazmie, w miejscu, gdzie dochodzi do jej rozdzielenia, obserwujemy bardzo liczne pęcherzyki. Materiał pobrany 4 dni po dokonany urazie (pow. 15000)





RYCINA 4. Ekspresja  $\alpha_v \beta_3$  integryny na powierzchni komórki śródbłonkowej nowopowstającego naczynia. Zastosowano do znakowania cząstki złota koloidalnego o wielkości 18 nm. Materiał pobrano 4 dni po dokonanym urazie (pow. 45000)



RYCINA 5. Cząstki złota koloidalnego widoczne na włóknkach cytoszkieletu wskazują na obecność receptorów Flk-1. Wycinki pobrano 4 dni po urazie (pow. 70000)

[1]. Wykazano ich czynny udział w formowaniu naczyń w procesach niedotlenienia mózgu, mięśnia sercowego, a także gojenia ran [27, 25, 34, 26]. Dowiedziono również, iż komórki te biorą udział w formowaniu nowych naczyń zaopatrujących guzy.

Na obecnym etapie wiedzy nie jest wiadome, czy wolnokrążące prekursorzy komórek śródbłonkowych są odpowiednikiem hemangioblastów lub angioblastów płodowych, chociaż formują one naczynia w sposób podobny jak to ma miejsce w czasie waskulogenezy w życiu embrionalnym. Dzięki badaniom w transmisyjnym mikroskopie elektronowym wykazaliśmy cechy ultrastrukturalne macierzystej komórki śródbłonkowej, a także udało nam się prześledzić kolejne etapy formowania naczyń z udziałem tej komórki. Cechą ultrastrukturalną pozwalającą odróżnić komórkę macierzystą od dojrzałej komórki śródbłonkowej jest obecność w cytoplazmie komórki macierzystej włókienek odpowiadających morfologią filamentom pośrednim.

Zarówno macierzyste komórki śródbłonkowe, jak również dojrzałe komórki śródbłonkowe mają na swej powierzchni specyficzne markery. Liczne badania wykazały, iż receptor VEGFR-2 (Flk-1) pełni zasadniczą rolę w procesach formowania naczyń zarówno w czasie waskulogenezy, jak i angiogenezy [28].

Przeprowadzając badania immunocytochemiczne na poziomie mikroskopu elektronowego z użyciem przeciwciała będącego markerem macierzystych komórek śródbłonkowych-Flk-1 potwierdziliśmy fenotyp immunologiczny tej komórki (ryc. 5).

## PODSUMOWANIE

W podsumowaniu należy podkreślić, iż proces tworzenia naczyń krwionośnych przebiega w życiu płodowym z udziałem komórek zwanych angioblastami. W życiu dorosłym nowe naczynia mogą powstawać z naczyń już istniejących oraz przy udziale komórek macierzystych. Procesem rozpoczynającym angiogenezę, w szerokim pojęciu, jest uwalnianie czynników angiogenicznych, których działanie następuje przez stymulowane śródbłonki oraz komórki pośrednio zaangażowane, np. makrofagi i komórki zrębu. Komórki macierzyste zdolne są do nieograniczonego samoodnawiania i mogą wytwarzać co najmniej jeden typ zróżnicowanej komórki potomnej. Podlegają one transdyferencjacji w niszach tkankowych i mogą stać się komórkami różnych listków zarodkowych. Dlatego też z tymi komórkami wiąże się nadzieje na ich udział w odtwarzaniu naczyń krwionośnych w narządach, w których doszło do trwałego niedokrwienia [21]. Z drugiej strony należy się zastanowić, na ile niekontrolowana ingerencja człowieka polegająca na wprowadzeniu komórek macierzystych do zmienionego patologicznie organu może doprowadzić do zwiększonej, niekontrolowanej produkcji naczyń krwionośnych sprzyjającej m.in. rozplemowi nowotworów.

## LITERATURA

- [1] ASAHARA T, TAKAHASHI T, MASUDA H, KALKA C, CHEN D. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 1999; 18: 3964–3972.



- [2] BANDOPADHYAY R, ORTE C, LAWRESON JG, REID AR, de SILVA S, ALLT G. Contractile proteins in pericytes at the blood-brain and blood-retinal barrier. *J Neurocytol* 2001; **30**(1): 35–44.
- [3] BRAET K, PAEMELEIRE K, D'HERE K, SANDERSON MJ, LEYBAERT L. Astrocyte-endothelial cell calcium signals conveyed by two signalling pathways. *Eur J Neurosci* 2001; **13** (1): 79–91.
- [4] CARMELIET P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; **6**: 389–395.
- [5] CARMELIET P, COLLEN D. Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; **237**: 133–158.
- [6] CHANDRASEKAR N, JASTI S, ALFRED-YUNG WK, ALI-OSMAN F, DINH DH, OLIVERO WC, GUJRATI M, KYRITSIS AP, NICOLSON GL, RAO JS, MOHANAM S. Modulation of endothelial cell morphogenesis *in vitro* by MMP-9 during glial-endothelial cell interactions. *Clin Exp Metastasis* 2000; **18**(4): 337–342.
- [7] CHŁOPICKI S. The vascular endothelium and pharmacological therapy of atherothrombosis. *Kardiol Pol* 2003; **59**: 62–69.
- [8] CHŁOPICKI S, GRYGLEWSKI R. Endothelial secretory function and atherothrombosis. W: Peter Curtis-Prior [red.] *The Eicosanoids*. London, John Wiley & Sons, Ltd. 2004: 269–276.
- [9] COLLINS RG, VELJI R, GUEVARA NV, HICKS MJ, CHAN L, BEAUDET AL. P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med* 2000; **191**: 189–194.
- [10] DANIEL TO, ABRAHAMSON D. Endothelial signal integration in vascular assembly. *Annu Rev Physiol* 2000; **62**: 649–671.
- [11] DONG L, CHEN Y, LEWIS M, HSIEH JC, REING J, CHAILLET JR, HOWELL CY, MELHEM M, INOUE S, KUSZAK JR, DeGEEST K, CHUNG AE. Neurologic defects and selective disruption of basement membranes in mouse lacking entactin-1/nitrogen-1. *Lab Invest* 2002; **82**(12): 1617–1630.
- [12] DVORAK HF, NAGY JA, FENG D, BROWN LF, DVORAK AM. Vascular permeability factor / vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; **237**: 97–132.
- [13] DREXLER H, HORING B. Endothelial dysfunction in human disease. *J Mol Cell Cardiol* 1999; **31**: 51–60.
- [14] ELICEIRI BP, CHERESH DA. The role of  $\alpha$  integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest* 1999; **103**: 1227–1230.
- [15] FERRERA N, DAVIS-SMYTH T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; **18**: 4–25.
- [16] FRONTCZAK-BANIEWICZ M, OLSZEWSKA H, GADAMSKI R, BRASKOV I, GAJKOWSKA B. Alterations in rat's brain capillaries in a model of focal cerebral necrosis. *Exp Toxicol Pathol* 2000; **52**(1): 77–85.
- [17] FRONTCZAK-BANIEWICZ M, WALSKI M. New vessel formation after surgical brain injury in rat's cerebral cortex. Formation of the blood vessels proximally to the surgical injury. *Acta Neurobiol Exp (Wars.)* 2003; **63**(2): 65–75.
- [18] GAILLARD PJ, VOORDWINDEN LH, NIELSEN JL, IVANOV A, ATSUMI R, ENGMAN H, RINGBOM C, DE BOER A.G, BREIMER DD. Establishment and functional characterization of an *in vitro* model of the blood-brain barrier, comprising a co-culture of brain capillary endothelial cells and astrocytes. *Eur J Pharm Sci* 2001; **12**(3): 215–222.
- [19] GARCIA-CARDENA G, COMANDER J, ANDERSON KR, BLACKMAN BR, GIMBRONE MA. Jr. Bio-mechanical activation of vascular endothelium as a determinant of its functional phenotype. *Proc Natl Acad Sci* 2001; **98**: 4478–4485.
- [20] GASCHE Y, COPIN JC, SUGAWARA T, FUJIMURA M, CHAN PH. Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress-associated blood-brain barrier disruption after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; **21**(12): 1393–1400.
- [21] HARUCHIKA M, TAKAYUKI A. Postnatal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration. *Cardiovasc Res* 2003; **58**: 390–398. Review.
- [22] HE H, VENEMA VJ, GU X, VENEMA RC, MARRERO MB, CALDWELL RB. Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through Flk-1/ KDR activation of c-Src. *J Biol Chem* 1999; **274** / 35: 25130–25135.
- [23] HELLSTROM M, GERHARDT H, KALEN M, LI X, ERIKSSON U, WOLBURG H, BETSHOLTZ C. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol* 2001; **153**(3): 543–553.

- [24] von HUNDELSCHAUSEN P, WEBER KS, HUO Y, PROUDFOOT AE, NELSON PJ, LEY K. RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation* 2001; **103**: 1772–1777.
- [25] ISNER JM. Angiogenesis: a „breakthrough” technology in cardiovascular medicine. *J Invasive Cardiol* 2000 Suppl A, 7 A–14 A.
- [26] ISNER JM, KALKA C, KAWAMOTO A, ASAHARA T. Bone marrow as a source of endothelial cells for natural and iatrogenic vascular repair. *Ann N Y Acad Sci* 2001; **953**: 75–84.
- [27] ISNER JM, ASAHARA T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 1999; **103**: 1231–1236.
- [28] ISSA R, KRUPINSKI J, BUJNY T, KUMAR S, KALUZA J, KUMAR P. Vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, in human brain tissue after ischemic stroke. *Lab Invest* 2000; **79**: 417–425.
- [29] de JONGH S, LILIJEN MR, BAKKER HD, HUTTEN BA, KASTELEIN JJ, STROES ES. Family history of cardiovascular events and endothelial dysfunction in children with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2002; **163**: 193–197.
- [30] LIBBY P, RIDKER PM, MASERI A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; **105**: 1135–1143.
- [31] MORELLI C, CAMPIONI K, PAROLIN C, PAULU G, TOGNON M. Activity of the matrix metalloproteinase-9 promoter in human normal and tumor cells. *J Cell Physiol* 2004; **199**(1): 126–133.
- [32] NAG S. Morphology and molecular properties of cellular components of normal cerebral vessels. *Methods Mol Med* 2003; **89**: 3–36. Review.
- [33] PLATE KH. Mechanisms of angiogenesis in the brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; **58**: 313–320.
- [34] RAFII S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J Clin Invest* 2000; **105**: 17–19.
- [35] RISAU W. Differentiation of endothelium. *FASEB J* 1995; **9**: 926–933. Review A.
- [36] RISAU W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; (17); **386**: 671–674. B.
- [37] SACHAIS BS. Platelet-endothelial interactions in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2001; **3**: 412–416.
- [38] SALLOWAY S, GUR T, BERZIN T, TAVARES R, ZIPSER B, CORREIA S, HOVANESIAN V, FALLON J, KUO-LEBLANC V, GLASS D, HULETTE C, ROSENBERG C, VITEK M, STOPA E. Effect of APOE genotype on microvascular basement membrane in Alzheimer’s disease. *J Neurol Sci* 2002; 2003–2004:183–7. Erratum in: *J Neurol Sci* 2003; **205**(1): 115.
- [39] TOTH P, LAZAR G. Brain phagocytes may empty tissue debris into capillaries. *J Neurocytol* 2001; **30**(8): 717–726.
- [40] VERMA S, ANDERSON TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation* 2002; **105**: 546–549.
- [41] VITA JA, LOSCALZO J. Shouldering the risk factor burden: infection, atherosclerosis, and the vascular endothelium. *Circulation* 2002; **106**: 184–190.
- [42] WALSKI M, GAJKOWSKA B. Changes in the ultrastructure of the cerebrovascular junction after traumatic injury of the cerebral cortex in rat’s. *Neuroendocrinol Lett* 2001; **22**: 19–26.
- [43] WALSKI M, FRONTCZAK-BANIEWICZ M. New vessel formation after surgical brain injury in rat’s cerebral cortex. Formation of the blood vessels distal to the surgical injury. *Acta Neurobiol Exp (Wars.)* 2003; **63**(2): 77–82.
- [44] WEINSTEIN BM. What guides early embryonic blood vessel formation? *Dev Dyn* 1999; **215**: 2–11.
- [45] ZHANG C, HARDER DR. Cerebral capillary endothelial cell mitogenesis and morphogenesis induced by astrocytic epoxyeicosatrienoic acid. *Stroke* 2002; **33**(12): 2957–2964.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 28.05.2004 r.

Przyjęto: 13.06.2004 r.

02-106 Warszawa, ul. Pawińskiego 5





## KANAŁY APARATU IMPORTU BIAŁKA DO MITOCHONDRIÓW

### THE CHANNELS OF THE MITOCHONDRIAL PROTEIN IMPORT APPARATUS

Małgorzata WOJTKOWSKA, Hanna KMITA

Zakład Bioenergetyki, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM Poznań

**Streszczenie:** Podstawową rolę w przebiegu importu białka do mitochondriów odgrywają kanały umożliwiające translokację białek przez błony mitochondrialne, jak i ich wbudowywanie w obszar tych błon. W zewnętrznej błonie mitochondrialnej zlokalizowany jest kanał importowy kompleksu TOM (*the translocase of the outer membrane*) oraz kanał uczestniczący w fałdowaniu białek o strukturze beczułki  $\beta$  kompleksu TOB (*the topogenesis of mitochondrial outer membrane  $\beta$ -barrel proteins*). Z kolei w błonie wewnętrznej zlokalizowane są dwa kanały o odrębnej specyficzności substratowej. Funkcjonują one w obrębie kompleksów TIM (*the translocase of the inner membrane*); TIM23 i TIM22. Nie ulega wątpliwości, że kanały mitochondrialnego aparatu importu białka stanowią istotne punkty kontrolne w przebiegu importu białka do mitochondriów. W związku z tym stanowią one ważny cel w terapii ludzkich chorób pochodzenia mitochondrialnego.

**Słowa kluczowe:** kanał kompleksu TOM, kanały kompleksów TIM, kanał VDAC, kanał kompleksu TOB, import białka.

**Summary:** Channels are crucial for protein import into mitochondria as they enable protein translocation across mitochondrial membranes and their insertion into these membranes. The outer mitochondrial membrane contains the TOM complex channel (the channel of the translocase of the outer membrane) and the TOB complex channel (the channel of the complex supporting the topogenesis of mitochondrial outer membrane  $\beta$ -barrel proteins), in which the  $\beta$ -stranded membrane proteins can fold. The inner mitochondrial membrane contains two channels of distinct specificity. They are present within the TIM complexes (the translocase of the inner membrane), namely TIM23 and TIM22. Undoubtedly, the channels are fundamental checkpoints in protein import into mitochondria, which means that they could be regarded as therapeutic goals in mitochondrial diseases.

**Key words:** the TOM complex channel, the TIM complex channels, the VDAC channel, the TOB complex channel, protein import.

**Wykaz stosowanych skrótów:** **GIP** (ang. *general insertion pore*) – główna pora importowa kompleksu TOM; **SAM** (ang. *sorting and assembly machinery*) – kompleks służący sortowaniu białek do zewnętrz-



nej błony mitochondrialnej i ich składaniu; **TIM** (ang. *translocase of the inner membrane*) – translokaza wewnętrznej błony mitochondrialnej; **TOB** (ang. *topogenesis of mitochondrial outer membrane  $\beta$ -barrel proteins*) – kompleks służący sortowaniu i składaniu białek tworzących strukturę beczulki  $\beta$ ; **TOM** (ang. *translocase of the outer membrane*) – translokaza zewnętrznej błony mitochondrialnej.

## WSTĘP

Import białka do mitochondriów jest możliwy dzięki obecności wyspecjalizowanych błonowych kompleksów, którymi są translokaza błony zewnętrznej – kompleks TOM (ang. *translocase of the outer membrane*) i translokazy błony wewnętrznej – kompleksy TIM (ang. *translocase of the inner membrane*). Dzięki zawartym w nich kanałom, kompleksy te umożliwiają translokacje importowanych białek przez błony mitochondrialne lub ich wbudowywanie w obszar tych błon [18,25,28,34,50,-59,60]. Dynamiczna natura kompleksów TOM i TIM pozwala na sortowanie białek o odmiennych mechanizmach importu. Istotną rolę w imporcie odgrywają również białka zlokalizowane w cytoplazmie, mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej i matriks mitochondrialnej. Na przykład białka z rodziny Hsp (ang. *heat shock protein*), nazywane również białkami szoku termicznego, występujące w cytoplazmie i matriks mitochondrialnej, uczestniczą w rozfałdowaniu importowanych białek, co umożliwia ich translokację przez błony mitochondrialne oraz wspomagają przyjęcie “dojrzałej” struktury przez białka importowane do matriks mitochondrialnej [7,61].

Prace dotyczące importu białka do mitochondriów prowadzone są już od ponad 20 lat i dotyczą przede wszystkim dwóch mikroorganizmów: *Neurospora crassa* i *Saccharomyces cerevisiae*. Stanowią one obecnie materiał modelowy w badaniach budowy aparatu importu białka, jak również tego procesu w przypadku mitochondriów organizmów bardziej złożonych, takich jak rośliny [33,62] i ssaki, w tym człowiek [19,52]. Dlatego, dane uzyskiwane w badaniach importu białka do mitochondriów różnych organizmów odnosi się zawsze do wzorca, za jaki uznano mitochondria *S. cerevisiae* i *N. crassa*.

## STRUKTURA KOMPLEKSU TOM

Na powierzchni zewnętrznej błony mitochondrialnej zachodzi rozpoznawanie białek oraz insercja importowanego białka, umożliwiająca jego translokację lub wbudowanie w tę błonę. Za procesy te odpowiedzialny jest kompleks TOM (ryc. 1). Zatem, pełni on niezmiernie istotną rolę w imporcie białek mitochondrialnych syntetyzowanych w cytozolu, co ma podstawowe znaczenie dla funkcjonowania mitochondriów. Co więcej, odpowiada także za swoje powstanie, ponieważ wszystkie jego podjednostki kodowane są przez genom jądrowy i syntetyzowane są na rybosomach cytoplazmatycznych [36,48]. Masa cząsteczkowa integralnego kompleksu TOM (ang. *the TOM holo complex*) wynosi 490–600 kDa w przypadku mitochondriów *N. crassa* [3,29] i 400–500 kDa w przypadku mitochondriów *Saccharomyces cerevisiae* [34,35]. Natomiast kompleks TOM wyizolowany z mitochondriów ziemniaka *Solanum tuberosum* i rzodkiewnika *Arabidopsis thaliana* jest w przybliżeniu o połowę mniejszy – ok. 230 kDa [63].

W sensie strukturalnym kompleks TOM stanowi połączenie podjednostek o zróżnicowanej stechiometrii i funkcji. Nazwy tych podjednostek utworzone są ze skrótu Tom i liczby odpowiadającej przybliżonej masie cząsteczkowej [45], a liczba ich typów w opisanych dotąd kompleksach izolowanych z różnych źródeł jest zmienna. Do najlepiej poznanych należy kompleks TOM wyizolowany z mitochondriów drożdży *S. cerevisiae* (9 podjednostek) [22,34], *N. crassa* (6 podjednostek) [3,28,29], ziemniaka (7 podjednostek) [46]. Wiedza dotycząca budowy kompleksu TOM w mitochondriach ssaków jest nadal niepełna, jakkolwiek udało się zidentyfikować białka stanowiące jego podjednostki [19,52,56].

### Receptory importowanych białek

Funkcję receptorów błonowych pełnią podjednostki kompleksu TOM zawierające duże domeny skierowane do cytoplazmy. W mitochondriach drożdży *S. cerevisiae* do tej pory zidentyfikowano cztery białka receptorowe kompleksu TOM: Tom20, Tom22, Tom37 i Tom70 (ryc. 1). Występują one w postaci heterodimerów Tom20–Tom22 i Tom37–Tom70, przy czym zdolność rozpoznawania większej liczby importowanych białek wykazuje heterodimer Tom20–Tom22. Wchodzące w jego skład białka formują jednostkę receptorową niezbędną do tworzenia miejsca rozpoznawania i wiązania importowanego białka zwanego “miejscem *cis*” (ryc. 1) [64]. Istotną rolę odgrywa tu domena Tom22, w której przeważają reszty aminokwasowe obdarzone ładunkiem ujemnym, uczestniczące w oddziaływaniach jonowych z presekwencją importowanego białka, w której z kolei dominują aminokwasy obdarzone ładunkiem dodatnim [53]. Natomiast koniec karboksylowy białka Tom22 wraz z białkiem Tom40 bierze udział w tworzeniu od strony przestrzeni międzybłonowej “miejsca *trans*” (ryc. 1), odpowiedzialnego za skierowanie translokowanego białka do dalszych przedziałów mitochondrialnych [64].

### Kanał importowy

Białka rozpoznawane przez Tom70 kierowane są do heterodimeru Tom20–Tom22, skąd mogą być transportowane do kanału importowego, nazwanego również główną porą importową (ang. *GIP* – *general import/insertion pore*) lub rdzeniem kompleksu TOM (z ang. *the TOM core complex*) [2,3,28,29,49] (ryc. 1). Charakteryzuje się on wysoką stabilnością, a jego masę cząsteczkową szacuje się na około 400 kDa w przypadku mitochondriów *Neurospora crassa* [3,28,46,48], drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [34,36] i szczura [52]. W przypadku mitochondriów roślinnych, ze względu na niepełne dane dotyczące składników kompleksu, nie wyróżniono dotąd rdzenia kompleksu TOM, stąd brak jest danych o jego przypuszczalnej masie.

Podstawową podjednostką uczestniczącą w tworzeniu kanału importowego jest dominujące ilościowo w kompleksie białko Tom40 (6–8 cząsteczek), którego oligomery tworzą w obrębie kompleksu dwa lub nawet trzy kanały prowadzące translokację białka [2,3,28,35,36]. Pozostałe składniki kanału importowego to Tom22, a w szczególności jego domena transbłonowa (3–4 cząsteczek) oraz małe białka Tom: Tom5, Tom6, Tom7 (po 2 cząsteczki każdego) [3,28,34,64,65]. Białko Tom22 stabilizuje strukturę kanału importowego. Jego brak prowadzi do powstania kompleksów o niższej masie



cząsteczkowej (100 kDa), w skład których wchodzi dimery białka Tom40 oraz małe białka Tom [36,49,65]. Oddziaływania Tom40 - odcinki transbłonowe Tom22 wymagają funkcjonalnego białka Tom5 [11], które uznawane jest za receptor trzeciego poziomu, wspomagający wprowadzenie presekweny w kanał. Białko Tom6 pełni rolę stabilizatora kanału importowego, zaś Tom7 odpowiada za destabilizację oddziaływań między Tom40, a heterodimerami receptorowymi, dodatkowo osłabiając wiązanie Tom20-Tom22 [11]. Brak Tom7 zwiększa oddziaływania pomiędzy Tom20-Tom22-Tom40, co utrudnia uwalnianie translokowanego białka do błony. Warty podkreślenia elementem regulującym działanie kanału importowego jest obecność białek receptorowych Tom20 i Tom70. Kompleks TOM jest zdolny do translokacji przy braku tych białek, jednakże zachodzi ona zdecydowanie wolniej [3]. Kontrolę szybkości działania kanału importowego sprawują również translokowane białka [29].

Podczas translokacji przez kompleks TOM białka mogą przyjmować różne struktury przestrzenne, w zależności od zawartych w nich mitochondrialnych sekwencji kierujących. Białka z presekwenją transportowane są w postaci rozfałdowanej, podczas gdy białka z sygnałami wewnętrznymi przechodzą przez kompleks TOM w postaci częściowo pofałdowanej, tj. podstawową jednostką podlegającą translokacji są dwie helisy  $\alpha$  oddzielone od dwóch kolejnych pętli [50]. Dwie helisy  $\alpha$  mogą przejść równocześnie przez każdy z kanałów zlokalizowanych w obrębie kanału importowego. Warto zaznaczyć, iż kanał importowy nie jest jedynie miejscem biernej translokacji białek. Najnowsze dane wskazują, iż stanowi on skomplikowaną "stację rozdzielczą" odpowiedzialną za specyficzne kierowanie białek transportowanych przez błonę zewnętrzną do miejsca przeznaczenia. Stwierdzono, na przykład, iż zastąpienie w białku Tom40 tryptofanu (w pozycji 243) arginina upośledza selektywnie kierowanie białek do kompleksu TIM23 [17].

### Białka umożliwiające złożenie kompleksu

Intensywne prace nad zagadnieniem wbudowywania białka Tom40 w błonę i następnie w kompleks doprowadziły do odkrycia białek błony zewnętrznej mitochondriów *S. cerevisiae* i *N. crassa* tworzących kompleks białkowy o podstawowym znaczeniu dla biogenezy kompleksu TOM (ryc. 1). Jest to kompleks SAM (ang. *sorting and assembly machinery*) [27], nazywany także kompleksem TOB (ang. *topogenesis of mitochondrial outer membrane  $\beta$ -barrel protein*) [41]. Masa tego kompleksu wynosi ok. 200 kD, a jego podstawowym składnikiem jest białko Sam50 [27], nazywane także Tob55 [41]. Białko to stanowi również składnik, powstającego w biogenezie kompleksu TOM, przejściowego kompleksu o masie 250 kDa, umożliwiając równocześnie jego powstanie. Jest ono także niezbędne dla biogenezy innych białek zewnętrznej błony mitochondrialnej o strukturze beczułki  $\beta$ , do których należą kanał VDAC i białko Mdm10, kluczowe dla prawidłowej morfologii mitochondriów. Co ciekawe, białko to przyjmuje strukturę beczułki  $\beta$ , a jego homologi występują zarówno u bakterii, jak i u innych organizmów eukariotycznych. Białko Tob55 poddane nadekspresji tworzy w układach rekonstruowanych kanał o wysokim przewodnictwie (3,7 nS w 1 M KCl) i słabej zależności od potencjału [41]. Ponieważ wyniki badań nad oddziaływaniem

importowanych białek o strukturze beczułki  $\beta$  z kompleksem TOM i kompleksem TOB (SAM) wskazują, iż białka te w drodze do mitochondriów najpierw korzystają z kompleksu TOM, a następnie oddziałują z kompleksem TOB, obecnie proponuje się następujący model funkcjonowania obu kompleksów. Białka przyjmujące strukturę beczułki  $\beta$  ulegają translokacji przez błonę zewnętrzną, w czym uczestniczy kompleks TOM, po czym od strony przestrzeni międzybłonowej zostają wprowadzone do kanału kompleksu TOB (SAM), gdzie zachodzi ich fałdowanie i następnie uwolnienie do błony [41]. Co ciekawe, kanał kompleksu TOB rozważany jest także jako miejsce uwalniania cytochromu c z mitochondriów, co stanowi jeden z kluczowych etapów apoptozy.

### Kompleks TOM roślin

Badania wyizolowanych kompleksów TOM roślin, jak i analiza porównawcza sekwencji kodujących podjednostki tego kompleksu doprowadziły do wniosku, iż roślinny kompleks TOM różni się istotnie od kompleksu TOM opisanego dla drożdży *S. cerevisiae* [6,9,33,62,63]. Jedną z podstawowych różnic jest obecność białka Tom9, które stanowi analog białka Tom22. Zmniejszenie masy cząsteczkowej tego białka wynika z utraty domeny z końca aminowego uczestniczącej w tworzeniu miejsca *cis*. Jest to jeden z istotnych elementów zabezpieczenia komórki roślinnej przed importem białek chloroplastowych, których sekwencje kierujące są niezwykle podobne do tych występujących w białkach importowanych do mitochondriów. Istnieje nawet hipoteza zakładająca, iż zmiany dotyczące białka Tom22 były niezbędne dla zaistnienia mitochondriów i chloroplastów w jednej komórce [33]. Innym rozwiązaniem, które ma związek ze zwiększeniem selektywności kompleksu TOM w komórkach roślin, jest zmiana struktury przestrzennej receptora Tom20, kotwiczonego w błonie końcem karboksylowym, podczas gdy w mitochondriach zwierząt i grzybów końcem kotwiczącym jest koniec aminowy (ryc. 3). Co więcej, analiza sekwencji kodujących podjednostki kompleksu TOM u roślin, jak i badania polegające na prowadzeniu rozdziałów elektroforetycznych w warunkach natywnych wskazują na istnienie izoform tychże podjednostek.

## STRUKTURA KANAŁU IMPORTOWEGO

Jak dotąd nie udało się całkowicie wyjaśnić organizacji strukturalnej kanału importowego. Analiza trójwymiarowych map uzyskanych za pomocą tomografii elektronowej pozwoliła stwierdzić, że kanał importowy zbudowany jest z dwóch lub trzech por o średnicy około 2 nm każda [3,28,35] (ryc. 2). Zatem, w obrębie kanału importowego istnieją w istocie dwa lub nawet trzy kanały. Obecność trzeciego kanału jest ściśle związana z obecnością białka Tom20; odpowiadający mu pierścień obserwowany jest w preparatach integralnego kompleksu TOM, ale nie w przypadku preparatów rdzenia kompleksu TOM [3]. Nie wiadomo, czy trzeci kanał bierze udział w translokacji białka [3,28,39]. Co więcej, uważa się, iż obecność dwóch lub trzech kanałów w badanych preparatach kompleksu TOM jest konsekwencją zmian



konformacyjnych warunkowanych obecnością lub brakiem białka Tom20, prowadzących w konsekwencji do fuzji niektórych kanałów. Znajduje to potwierdzenie w wynikach elektroforezy typu *Blue Native*, które wskazują, iż brak trzeciego kanału nie powoduje zmniejszenia masy kompleksu o jedną trzecią [35]. Na obecność w obrębie kompleksu TOM przynajmniej dwóch kanałów o sprzężonej aktywności wskazują również wyniki badań prowadzonych w układach rekonstruowanych [18,29,34].

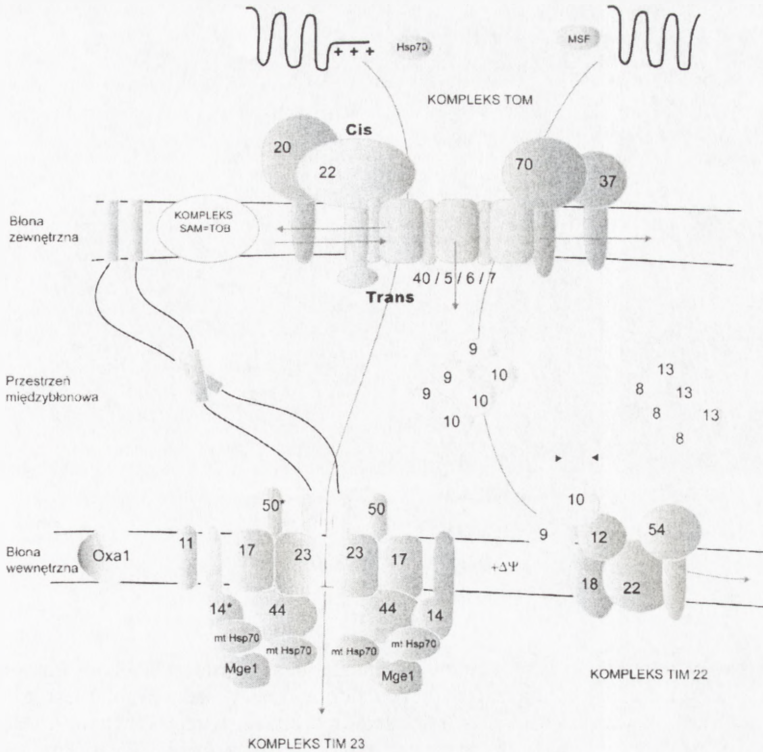
### Tom40 – podstawowy składnik kanału importowego

Obowiązujący obecnie model struktury przestrzennej białka Tom40 zakłada istnienie w jego obrębie odcinków o strukturze harmonijki  $\beta$  i helisy  $\alpha$ . Jednak zależnie od zastosowanej metody pomiaru, jak i typu preparatu białka Tom40 stwierdza się różną zawartość tych struktur. W przypadku preparatu uzyskanego metodą nadekspresji badanego metodą dichroizmu kołowego udział harmonijki  $\beta$  i helisy  $\alpha$  wynosi odpowiednio ok. 60% i 5% [18], podczas gdy dla białka izolowanego z kompleksu TOM przy zastosowaniu metody dichroizmu kołowego i widma w podczerwieni udział tych struktur oszacowano na poziomie ok. 30 i ok. 22% [2]. Ponieważ wyniki uzyskane dla białka Tom40 izolowanego z kompleksu są zgodne z wynikami uzyskanymi dla całego kompleksu uważa się, iż nadekspresja białka Tom40 w komórkach bakterii i następnie jego izolacja w obecności wysokiego stężenia mocznika może prowadzić do zmian w natywnej strukturze tego białka [2]. Co więcej, uzyskanie porównywalnych procentowych zawartości harmonijki  $\beta$  dla izolowanego białka Tom40 i całego kompleksu TOM potwierdza wcześniejsze ustalenia wskazujące, iż białko Tom40 jest jedynym białkiem w kompleksie TOM zdolnym do tworzenia struktury harmonijki  $\beta$  [44,47,48,58] (ryc. 3).

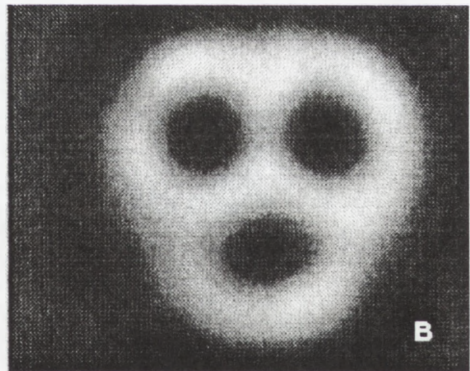
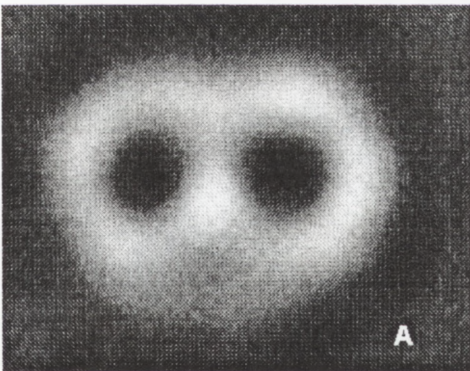
Autorzy prac opisujących strukturę przestrzenną białka Tom40 są zgodni, iż odcinki o strukturze harmonijki  $\beta$  mogą łącznie tworzyć beczkę  $\beta$ , co z kolei umożliwia powstanie kanału [2,18]. Jest to więc struktura analogiczna do występującej w przypadku kanału VDAC [22]. Istnieją jednak różnice w ilości proponowanych odcinków o strukturze harmonijki  $\beta$  oraz ich długości, czego pochodną są odmienne odpowiedzi na pytanie, czy monomer białka Tom40 może utworzyć kanał samodzielnie. Jeśli istotnie, jak wskazują najnowsze ustalenia, zawartość struktury harmonijki  $\beta$  w białku Tom40 wynosi ok. 30% [2], to możliwe jest powstanie od 8 do 10 odcinków o takiej strukturze, co z kolei wyklucza możliwość tworzenia kanału przez monomer białka Tom40 [2].

## AKTYWNOŚĆ KANAŁOWA KOMPLEKSU TOM

Jak wspomniano, główną podjednostką uczestniczącą w tworzeniu kanału importowego jest białko Tom40. Poddane nadekspresji lub izolowane z kompleksu może ono samodzielnie tworzyć kanał. W układach rekonstruowanych, Tom40 tworzy głównie kanał o wysokim przewodnictwie i selektywności kationowej, modulowany przez potencjał i mitochondrialne sekwencje kierujące [2,18]. Średnicę kanału tworzonego przez Tom40 szacuje się na ok. 2 nm, co jest wielkością porównywalną ze średnicą kanałów w kompleksie TOM [18,28]. Jednak w obrębie kompleksu TOM znajdują się

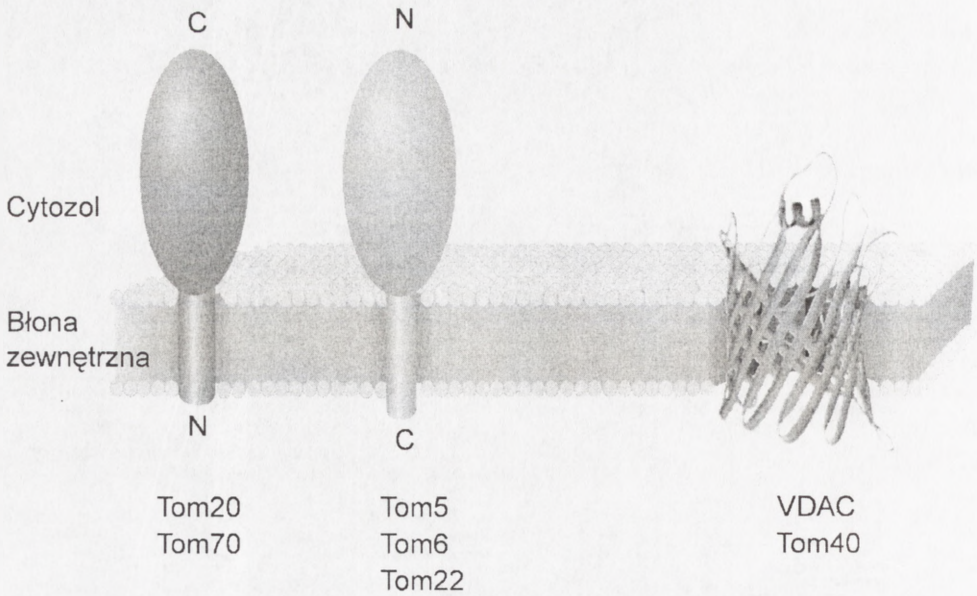


RYCINA 1. Ogólny schemat aparatu importu białka do mitochondriów. Szczegółowy opis w tekście. Cyfry odpowiadają poszczególnym składnikom kompleksu TOM i kompleksów TIM. MSF (z ang. *mitochondrial import stimulating factor*) i Hsp70 (z ang. *heat shock protein*) – białka opiekuńcze istotne dla zapoczątkowania importu; mtHsp70 – mitochondrialna forma białka Hsp70; Tom37 – składnik kompleksu TOM *S. cerevisiae*, którego homolog występuje prawdopodobnie w mitochondriach ssaków; Oxa1p – kompleks prowadzący insercję białek kodowanych przez genom mitochondrialny, jak i prekursorów białek mitochondrialnych, które są importowane z cytoplazmy do matriks mitochondrialnej



RYCINA 2. Obraz organizacji kanału importowego uzyskany za pomocą tomografii komputerowej (według [28], zmodyfikowany) W obrębie kanału importowego istnieją dwa (A) lub nawet trzy kanały (B). Obecność trzeciego kanału jest ściśle związana z obecnością białka Tom20; odpowiadający mu pierścień obserwowany jest w preparatach integralnego kompleksu TOM, ale nie w przypadku preparatów rdzenia kompleksu TOM





RYCINA 3. Sposoby kotwiczenia w zewnętrznej błonie mitochondrialnej składników kompleksu TOM (według [47], zmodyfikowany). W przypadku mitochondriów roślin białko Tom20 jest kotwiczone w błonie końcem C, co prowadzi do zmian w strukturze przestrzennej tego receptora [Macasev i in., 2000]. Jest to element obrony komórki roślinnej przed transportem białek chloroplastowych do mitochondriów

dwa, a nawet trzy kanały tworzone przez Tom40, podczas gdy w przypadku izolowanego białka Tom40 obserwuje się głównie pojedyncze kanały i niewielką frakcję sprzężonych dwóch kanałów [2,28,50]. Wynika to prawdopodobnie z braku innych białek Tom, które w kompleksie działają stabilizująco. W układach rekonstruowanych szansa zamknięcia kanału tworzonego samodzielnie przez białko Tom40 jest dużo mniejsza niż kanałów w kompleksie. Co więcej, podstawowa charakterystyka elektrofizjologiczna kanału utworzonego samodzielnie przez białko Tom40 nie jest identyczna z charakterystyką aktywności kanałowej kompleksu TOM [2,18,29], co stanowi dodatkowe potwierdzenie modulacyjnego wpływu innych białek Tom. Podstawowe parametry elektrofizjologicznej charakterystyki kanału to wartość przewodnictwa, selektywność jonowa i wrażliwość na potencjał lub inne czynniki modulujące. Średnia wartość przewodnictwa wyznaczona dla poddanego rekonstrukcji kompleksu TOM, w obecności 1 M KCl przy potencjale +20 mV, wynosi 2,3 nS [2,28]. W tych samych warunkach pomiarowych średnia wartość przewodnictwa dla kanału tworzonego samodzielnie przez Tom40 wynosi ok. 2,8 nS [2]. Różnice w wartości przewodnictwa uzyskano także dla kompleksu TOM i białka Tom40 przy zastosowaniu analizy przewodnictwa pojedynczych kanałów [2].

Aktywność kanałowa rejestrowana dla rekonstruowanego kompleksu TOM, podobnie jak kanał tworzony samodzielnie przez Tom40, wykazuje zależność od

potencjału i selektywność kationową, przy czym w opisie tych właściwości zauważyć można niewielkie różnice [2,3,18,28,29]. Wspólnym elementem podstawowej charakterystyki kanału tworzonego przez białko Tom40 i aktywności kanałowej kompleksu TOM jest ponadto możliwość modulacji przez mitochondrialne sekwencje kierujące [2,18,29]. Działanie sekwencji kierujących sprowadza się do zmniejszenia przepływu jonów przez kanał, przy czym oddziaływanie tychże sekwencji może być dodatkowo modulowane przez przyłożony potencjał. Podsumowując, na podstawie uzyskanej charakterystyki kompleks TOM zaliczyć można do kanałów bramkowanych przez sekwencje sygnałowe [28], jednak obserwowana w układzie rekonstruowanym zależność przewodnictwa od potencjału może mieć istotne znaczenie fizjologiczne [55].

Oprócz kanałów o charakterystyce porównywalnej z uzyskaną dla kompleksu TOM, białko Tom40 może tworzyć kanały o wyraźnie innym przewodnictwie i zależności od potencjału oraz niewrażliwe na mitochondrialne sekwencje kierujące, co tłumaczy się brakiem stabilizującego wpływu innych białek Tom [2].

## TRANSLOKAZY WEWNĘTRZNEJ BŁONY MITOCHONDRIALNEJ – KOMPLEKSY TIM

Po translokacji białka przez zewnętrzną błonę mitochondrialną, prowadzonej przez kompleks TOM, następuje jego "przechwycenie" przez maszynę importu zlokalizowaną wewnątrz mitochondriów.

### Kompleks TIM23

Białka zlokalizowane w matryks mitochondrialnej i niektóre białka wewnętrznej błony mitochondrialnej, których wspólną cechą jest presekwencja na końcu aminowym transportowane są dalej przez kompleks TIM23 [5,37,38,42,51] (ryc. 1). Rdzeń tego kompleksu o masie ok. 90 kDa tworzą dwa białka – Tim17 i Tim23, zaangażowane w formowanie kanału i receptora rozpoznającego translokowane białko [50]. Pozostałymi składnikami tego kompleksu są białka umożliwiające translokację importowanego białka przez błonę, czyli tworzące motor importowy: peryferyczne, hydrofilowe białko Tim44, białko opiekuńcze mtHsp70 i wspomagające jego aktywność białko Tim14 (czynnik wzmacniający aktywność ATP-azową), białko Tim16, uczestniczące w rekrutacji białka Tim14, oraz białko Mge1 (czynnik wymiany nukleotydów) [26]. Białka Tim17, Tim23 i Tim44 występują w ilościach ekwimolowych, podczas gdy ilość mtHsp70 jest trzydziestokrotnie wyższa. Białka Tim17 i Tim23 charakteryzują się powtarzającym się motywem heptaleucynowym odpowiedzialnym za formowanie struktury suwaka leucynowego, która odgrywa istotną rolę w ich dimeryzacji [14].

W przeciwieństwie do Tim17 [39], dimeryzacja Tim23 jest ściśle zależna od potencjału błony wewnętrznej ( $\Delta\Psi$ ) oraz obecności translokowanego białka. W nieobecności potencjału błony wewnętrznej białko Tim23 tworzy dimer i wówczas tworzony przez to białko kanał jest zamknięty. Natomiast w obecności  $\Delta\Psi$ , białko Tim23 wiąże się z presekwencją translokowanego białka, co prowadzi do dysocjacji dimeru i otwarcia



kanału. Presekwencja zostaje przeniesiona przez błonę, ale translokacja pozostałej części białka wymaga udziału białek mtHsp70, Tim44, Tim14, Tim16 i Mge1 oraz hydrolizy ATP [26,54]. Wymienione białka działają jak kontrolowany przez ATP molekularny mechanizm “zapadkowy” dla kolejnych segmentów białka wyłaniających się z kanału. W ten sposób wspólnie stanowią one “siłę ciągnącą” translokowane białko [32,40]. Obecność potencjału błonowego zapobiega zwrotnemu ruchowi łańcucha polipeptydowego, aż do momentu włączenia się w matriks białka mtHsp70. Wówczas proces translokacji białka do matriks staje się nieodwracalny [32,40].

### Związek kompleksów TIM23 i TOM

Podczas translokacji białka kompleks TIM23 pozostaje w ścisłej zależności funkcjonalnej i strukturalnej z kompleksem TOM. Oba kompleksy tworzą łącznie tak zwane miejsca kontaktowe pomiędzy błonami mitochondrialnymi. Ich obecność stwierdzono izolując kompleks o masie około 600 kDa, powstały podczas translokacji białka specyficznym zatrzymanego na poziomie jego oddziaływań z białkami obu błon mitochondrialnych [50]. Istotną rolę w funkcjonowaniu miejsc kontaktowych i współdziałaniu obu kompleksów odgrywa białko Tim23 [14]. Koniec aminowy Tim23 zlokalizowany jest w zewnętrznej błonie mitochondrialnej (ryc. 1), dzięki czemu w przestrzeni międzybłonowej znajduje się jego domena (o wypadkowym ładunku ujemnym) rozpoznająca presekwencję białka związanego wcześniej przez kompleks TOM. Oddziaływania między tą domeną Tim23 i presekwencją, prowadzą do odłączenia się importowanego białka od błony zewnętrznej i jego skierowania do kompleksu TIM23. Istotną rolę w przekazywaniu prekursora białka z kompleksu TOM do kompleksu TIM23 prawdopodobnie odgrywa również zidentyfikowane ostatnio w mitochondriach *S. cerevisiae* i *N. crassa* białko Tim50 [37,66]. Białko Tim50 (ryc. 1) zawiera bowiem dużą, hydrofilową, wysoce konserwatywną domenę skierowaną do przestrzeni międzybłonowej, która oddziałując z prekursorem ułatwia jego transfer z kompleksu TOM do kanału TIM23. Z kolei transfer białka z kompleksu TOM do kompleksu TIM23 może zostać upośledzony w wyniku punktowej mutacji w obrębie białka Tom40, nie mającej równocześnie wpływu na działanie innych dróg importu białka [17]. Co więcej, białko Tim50 uznawane jest za element odpowiedzialny za powstanie miejsca kontaktowego obejmującego kompleksy TOM i TIM23. Natomiast elementem stabilizującym powstałe miejsce kontaktowe jest prawdopodobnie domena białka Tom22 skierowana do przestrzeni międzybłonowej [10].

### Kompleks TIM22

Obok kompleksu TIM23, prowadzącego translokację białek mitochondrialnych zawierających sekwencję kierującą w postaci presekwencji, w wewnętrznej błonie mitochondrialnej istnieje druga translokaza, która uczestniczy w imporcie białek kierowanych do tejże błony i charakteryzujących się obecnością sygnałów wewnętrznych, takich jak: przenośnik fosforanu, translokaza nukleotydów adeninowych oraz białka Tim23, Tim22 i prawdopodobnie Tim17 [13,15,16,30]. Jest to kompleks TIM22 o masie ok. 300 kD [6,20,25,42,50] (ryc. 1), który zbudowany jest z integralnych białek

blonowych Tim54, Tim22 i Tim18 oraz peryferycznego białka Tim12 [23]. Importowane przez ten kompleks białka uwalniane są bezpośrednio do błony w sposób zależny od  $\Delta\Psi$ , dzięki istniejącemu w jego obrębie kanałowi [25,50,51].

### Związek kompleksów TIM22 i TOM

Istotną rolę w funkcjonowaniu TIM22 odgrywają oddziaływania z białkami przestrzeni międzybłonowej: Tim8, Tim9, Tim10 i Tim13 [1,4,23,24,50] (ryc. 1). Białka te tworzą dwa typy kompleksów, Tim9-Tim10 i Tim8-Tim13, mających postać heterooligomerów i uczestniczących w komunikacji między kompleksem TOM i kompleksem TIM22.

Zidentyfikowano ludzki gen kodujący homolog białka Tim8 drożdży. Produkt tego genu nazywany jest białkiem Tim8a lub białkiem DDP1 (ang. *deafness dystonia peptide*), a jego mutacje są przyczyną schorzenia nazywanego zespołem Mohra-Tranebjaerga (MTS) [4,6,23,24]. Dostępne dane wskazują, iż istotną rolę w powstaniu MTS odgrywają zakłócenia w imporcie białka Tim23 do mitochondriów człowieka, będące konsekwencją pojawienia się wadliwego białka Tim8 [43].

## KANAŁY KOMPLEKSÓW TIM

Obecność kanałów w obrębie kompleksów TIM wydaje się dla komórki teoretycznie problematyczna. Wewnętrzna błona mitochondrialna musi być przecież wystarczająco szczelna dla jonów celem utrzymywania elektrochemicznego gradientu protonów generowanego przez białka łańcucha oddechowego i niezbędnego do utworzenia ATP. Dlatego też kanały funkcjonujące w obrębie kompleksów TIM podlegają ścisłej kontroli, co uniemożliwia dysypację potencjału błonowego. Aktywacja obu typów kanałów wymaga obecności odpowiedniego sygnału kierującego zawartego w białku importowanym do danego przedziału mitochondrialnego oraz określonej wartości potencjału błonowego. Brak sygnału kierującego zapobiega otwarciu kanału nawet w obecności potencjału błonowego [25,50,60].

W przypadku kompleksu TIM23 aktywność kanałową uzyskano dotychczas jedynie dla poddanego nadekspresji białka Tim23, które w układach rekonstruowanych tworzy kanał o wysokim przewodnictwie, selektywności kationowej i średnicy ok. 1,3 nm [60]. Natomiast w przypadku kompleksu TIM22 wykazano, iż za aktywność kanałową odpowiedzialne jest białko Tim22. Poddane rekonstrukcji, białko to tworzy kanał o wysokim przewodnictwie, selektywności kationowej i średnicy 1,15–1,8 nm [25]. Zmienność średnicy kanału umożliwia prawdopodobnie zajście różnych procesów związanych z wbudowywaniem importowanego białka w błonę. Przy dużym rozmiarze średnicy możliwe jest wprowadzenie fragmentu białka obejmującego dwie helisy  $\alpha$ . Natomiast zmniejszenie rozmiaru średnicy umożliwia jego uwolnienie do błony [50]. Ostatnio udało się także przeprowadzić pomiary aktywności kanałowej wyizolowanego kompleksu TIM22 [25,51]. Dzięki temu wykazano, iż w obrębie tego kompleksu znajdują się w istocie dwa sprzężone funkcjonalnie kanały uczestniczące w uwalnianiu



importowanego białka do błony, przy czym w trakcie oddziaływań z białkiem każdy z nich podlega innym zmianom funkcjonalnym.

Podsumowując, podstawową rolę w przebiegu importu białka do mitochondriów odgrywa kanał umożliwiający translokację białek przez błony mitochondrialne, jak i ich wbudowanie w obszar tych błon. Kanał stanowi także podstawowy mechanizm transportu metabolitów przez zewnętrzną błonę mitochondrialną. Jest on tworzony przez poryę mitochondrialną, nazywaną także kanałem VDAC (ang. *voltage dependent anion selective channel*) [8,22]. Obok kanałów kompleksów TIM, wewnętrzna błona mitochondrialna zawiera również inne, różnorodne kanały o określonej selektywności jonowej, przewodności i wrażliwości na czynniki modulujące, co stanowi poważne wyzwanie dla założeń teorii chemiosmotycznej Mitchella, zakładającej szczelność wewnętrznej błony mitochondrialnej dla jonów. Kanały te umożliwiają przemieszczanie kationów, takich jak  $K^+$  lub  $Ca^{2+}$  oraz anionów  $Cl^-$ , a kontrola ich aktywności ma kluczowe znaczenie dla metabolizmu mitochondriów i stanu funkcjonalnego komórki [12,21,57]. Wiedza o białkach tworzących kanały w obrębie błon mitochondrialnych, ich funkcji oraz przebiegu procesów, w których uczestniczą może przyczynić się do identyfikacji nowego typu chorób mitochondrialnych, jak i opracowania skutecznych sposobów terapii.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ADAM A, ENDRES M, SIRRENBERG C, NEUPERT W. Tim9, a new component of the Tim22-Tim54 translocase in the mitochondria. *EMBO J* 1999; **18**: 313–319.
- [2] AHTING U, THIEFFRY M, ENGELHARDT H, HEGERL R, NEUPERT W, NUSSBERGER S. Tom40, the pore-forming component of the protein-conducting TOM channel in the Outer Membrane of Mitochondria. *J Cell Biol* 2001; **153**: 1151–1160.
- [3] AHTING U, THUN C, HERGEL R, NEUPERT W. TOM Core complex the General Protein Import Pore of the Outer Membrane of Mitochondria. *J Cell Biol* 1999; **147**: 959–968.
- [4] BAUER MF, NEUPERT W. Import of proteins into mitochondria: A novel pathomechanism for progressive neurodegeneration. *J Inher METAB DIS* 2001; **24**: 166–180.
- [5] BAUER MF, HOFFMANN S, NEUPERT W, BRUNNER M. Protein translocation into mitochondria; the role of the TIM complex. *Trends Cell Biol* 2000; **10**: 25–31.
- [6] BAUER M, ROTHBAUER U, MUHLENBEIN N, NEUPERT W. The Mitochondrial Tim22 preprotein translocase is highly conserved throughout the eucariotic kingdom. *FEBS Lett* 1999; **464**: 41–47.
- [7] BEDDOE T, LITHGOW T. Delivery of nascent polipeptides to the mitochondria surface. *Biophys Biochim Acta* 2002; **1592**: 35–39.
- [8] BLACHY-DYSON E, FORTE M. VDAC channels. *IUBMB Life* 2001; **52**: 113–118.
- [9] BRAUN HP, SCHMITZ UK. The protein import apparatus of plant mitochondria. *Planta* 1999; **209**: 267–274.
- [10] CHACIŃSKA A, REHLING P, GUIARD B, FRAIZER AE, SCHULZE-SPECKING A, PFANNER N, VOSS W, MEISINGER CH. Mitochondrial translocase contact sites: separation of dynamic and stabilizing elements in formation of a TOM–TIM-preprotein supercomplex. *EMBO J* 2003; **22**: 5370–5381.
- [11] DEMBOWSKI M, KÜNKELE KP, NARGANG FE, NEUPERT W, RAPAPORT D. Assembly of Tom6 and Tom7 into the TOM Core Complex of *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* 2001; **276**: 17679–17685.
- [12] DĘBSKA G, KICIŃSKA A, SKALSKA J, SZEWCZYK A. Intracellular potassium and chloride channels: An update. *Acta Biochim Pol* 2001; **48**: 137–144.
- [13] DIEKIERT K, KISPAL G, GUIARD B, LILL R. An internal targeting signal directing proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Proc Natl Acad Sci* 1999; **96**: 11752–11757.
- [14] DONZEAU M, KALDI K, ADAM A, PASCHEN S, WANNER G, GUIARD B, BAKER MF, NEUPERT W, BRUNNER M. Tim23 links the inner and outer mitochondrial membranes. *Cell* 2000; **101**: 401–412.

- [15] ENDRES M, NEUPERT W, BRUNNER W. Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the Tim22-Tim54 complex. *EMBO J* 1999; **18**: 3214–3221.
- [16] ENDRES M, NEUPERT W, BRUNNER W. Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the Tim22-Tim54 complex. *EMBO J* 1999; **94**: 211–218.
- [17] GABRIEL K, EGAN B, LITHGOW T. Tom40, the import channel of the mitochondrial outer membrane, plays an active role in sorting imported proteins. *EMBO J* 2003; **22**: 2380–2386.
- [18] HILL K, MODEL, RYAN MT, DIETMEIER K, MARTIN F, WAGNER R, PFANNER N. Tom40 forms the hydrophobic channel of the mitochondrial import pore for preproteins. *Nature* 1998; **396**: 516–521.
- [19] HOOGENRAAD NJ, WARD LA, RYAN MT. Import and assembly of proteins into mitochondria of mammals. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1592**: 97–105.
- [20] KERCHER O, NARESH B, SEPURI J. Tim18 is a new Component of the Tim54-Tim22, translocation in the mitochondrial inner membrane. *Mol Biol of the Cell* 2000; **11**: 109–116.
- [21] KICIŃSKA A, DĘBSKA G, KUNZ W, SZEWCZYK A. Mitochondrial potassium and chloride channels. *Acta Biochim Pol* 2000; **47**: 541–551.
- [22] KMITA H, ANTOS N. Udział kanałów błony zewnętrznej w fizjologii mitochondriów. *Post Biol Kom* 2002; **29**: 203–220.
- [23] KOEHLER C. Protein translocation pathways of the mitochondrion. *FEBS Lett* 2000; **476**: 27–31.
- [24] KOEHLER CM, LEUENBERGER D, MERCHANT S, RENOLD A, JUNNE T, SCHATZ G. Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease. *Proc Natl Acad Sci* 1999; **96**: 2141–2146.
- [25] KOVERMANN P, TRUSCOT KN, GUIARD B, REHLING P, SEPURI N, MÜLLER H. Tim22, the essential core of the mitochondrial protein insertion complex, forms a voltage-activated and signal-gated channel. *Mol Cell* 2002; **9**: 363–373.
- [26] KOZANY C, MAOKRANCJAC D, SICHTING M, NEUPERT W, HELL K. The J domain-related cochaperone Tim16 is a constituent of the mitochondrial TIM23 preprotein translocase. *Nat Struct Mol Biol* 2004; **11**: 234–241.
- [27] KOZAK V, WIEDEMANN N, MILENKOVIC D, LOHAUS CH, MEYER HE, GUIARD B, MEISINGER CH, PFANNER N. An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 2003; **278**: 48520–48523.
- [28] KÜNKELE KP, HEINS KP, DEMBOWSKI M, NARGANG FE, BENZ R, THIEFFRY M, WALZ Y, LILL R, NUSSBERGER S, NEUPERT W. The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell* 1998; **93**: 1009–1019.
- [29] KÜNKELE KP, JUIN C, POMPA, NARGANG FE, HENRY JP, NEUPERT W, LILL R, THIEFFRY M. The isolated complex of the translocase of the outer membrane of mitochondria. *J Biol Chem* 1998; **273**: 31032–31039.
- [30] KURZ M, MARTIN H, RASSOW J, PFANNER N, RYAN MT. Biogenesis of Tim proteins of the mitochondrial carrier import pathway: differential targeting mechanisms and crossing over with the main import pathway. *Mol Biol Cell* 1999; **10**: 2461–2474.
- [31] LEUENBERGER P, BALLY NA, SCHATZ G. Different import pathway through the mitochondrial intermembrane space for inner membrane proteins. *EMBO J* 1999; **17**: 4816–4822.
- [32] LIU Q, D'SILVA P, WALTER W, MARSZAŁEK J, CRAIG EA. Regulated cycling of mitochondrial Hsp70 at the protein import channel. *Science* 2003; **300**: 139–141.
- [33] MASACEV D, NEWBIGIN ED, WHELAN J, LITHGOV T. How do plant mitochondria avoid importing chloroplast proteins? Components of the import apparatus Tom20 and Tom22 from *Arabidopsis* differ from their fungal counterparts. *Plant Phys* 2000; **123**: 811–816.
- [34] MEISINGER MT, HILL K, MODEL K, LIM JH, SICKMN A, MELLER H, MEYER HE, PFANNER R. Protein import channel of the outer mitochondrial membrane: a highly stable Tom40-Tom22 core structure differentially interacts with preproteins, small Tom proteins and import receptors. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 2337–2348.
- [35] MODEL K, PRINZ T, RUIZ T, RADERMACHER M, KRIMMER T, KUHLEBRANDT W. Protein translocase of the outer mitochondrial membrane: role of import receptors in the structural organization of the TOM complex. *J Mol Biol* 2002; **316**: 657–666.
- [36] MODEL K, MEISINGER CH, PRINZ T, WIEDEMANN N, TRUSCOTT KN, PFANNER N, RYAN MT. Multistep assembly of the protein import channel of the mitochondrial outer membrane. *Nature Structure Biol* 2001; **8**: 361–370.
- [37] MOKRANCJAC D, PASCHEN SA, KOZANY C, PROKISCH H, HOPPKINS SC, NARGANG FK, NEUPERT W, HELL K. Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *EMBO J* 2003; **22**: 816–825.



- [38] MOKRANJAC D, SICHING M, NEUPERT W, HELL K. Tim14, a novel key component of the import motor of the TIM23 protein translocase of mitochondria. *EMBO J* 2003; **22**: 4945–4956.
- [39] MORO F, SIRRENBERG C, SCHNEIDER H, NEUPERT W, BRUNNER M. The Tim17/Tim23 preprotein translocase of mitochondria: composition and function in protein transport into the matrix. *EMBO J* 1999; **18**: 3367–3675.
- [40] NEUPERT W, BRUNNER M. The protein import motor of mitochondria. *Mol Cell Biol* 2002; **3**: 555–565.
- [41] PFANNER SA, WAIZENEGGER T, STAN T, PREUS M, CYRKLAFF M, HELL K, RAPAPORT D, NEUPERT W. Evolutionary conservation of biogenesis of  $\beta$ -barrel membrane proteins. *Nature* 2003; **426**: 862–866.
- [42] PASCHEN SA, NEUPERT W. Protein import into mitochondria. *IUBMB Life* 2001; **52**: 101–112.
- [43] PASCHEN SA, ROTHENBAUER U, KALDI K, BRUNNER MF, NEUPERT W, BRUNNER M. The role of the Tim8-Tim13 complex in the import of Tim23 into mitochondria. *EMBO J* 2000; **19**: 6332–6400.
- [44] PFANNER N, CHACIŃSKA A.: The mitochondrial import machinery: protein-conducting channels with binding sites for presequences. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1592**: 15–24.
- [45] PFANNER N, DOUGLAS MG, ENDO T, HOOGENRAAD NJ, JENSEN RE, MEIER M, NEUPERT W, SCHATZ G, SCHMITZ UK, SHORE GC. Unicorn nomenclature of the protein transport machinery of the mitochondrial membranes. *Trends Biochem Sci* 1996; **21**: 51–52.
- [46] PIĘKNA-PRZYBYLSKA D, AUGUSTYŃIAK H. Import białek do mitochondriów. *Post Biochem* 2002; **48**: 262–275.
- [47] RAPAPORT D. Finding the right organelle; Targeting signals in mitochondrial outer membrane proteins. *EMBO J* 2003; **4**: 948–952.
- [48] RAPAPORT D. Biogenesis of the mitochondrial TOM complex. Review: *Trends Biochem Science* 2002; **27**: 191–197.
- [49] RAPAPORT D, NEUPERT W. Biogenesis of Tom40, core component of the TOM complex of mitochondria. *J Cell Biol* 1999; **146**: 321–333.
- [50] REHLING P, PFANNER N, MEISINGER C. Insertion of hydrophobic membrane proteins into the inner mitochondrial membrane – A guided tour. *J Mol Biol* 2003; **326**: 639–657.
- [51] REHLING P, MODEL K, BRANDNER K, KOVERMAN P, SICKMANN A, MEYER HE, KUHLEBRANDT W, WAGNER R, TRUSCOT KN, PFANNER N. Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase. *Science* 2003; **299**: 1747–1751.
- [52] SAEKI K, TSUNEOKA M, IWAMOTO R, HAUSUWA H, SHIDA S, TAKAHASHI T, SAKAGUCKI M, ENDO T, MIURA Y, MEKADA E, MIHARA K, SUZUKI H. Identification of Mammalian Tom22 as a subunit of the Preprotein Translocase of the Mitochondrial Outer Membrane. *J Biol Cell* 2000; **147**: 31996–32002.
- [53] SCHATZ G. Just follow the acid chain. *Nature* 1997; **388**: 121–122.
- [54] D'SILVA PD, SCILKE B, WALTER W, ANDREW A, CRAIG EA. J protein cochaperone of the mitochondrial inner membrane required for protein import into the mitochondrial matrix. *PNAS* 2003; **25**: 13839–13844.
- [55] STOBENIA O, WRÓBLEWSKA S, ANTOS N, BUDZIŃSKA M, KMITA H. The key role of the energized state of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria in modulations of the outer membrane channel by the intermembrane space proteins. *J Bioenerg Biomembr* 2002; **34**: 507–516.
- [56] SUZUKI H, OKAZAWA Y, KOMIYA T, SAEKI K, MEKADA E, KITADA S, ITO A, MIHARA K. Characterisation of rat Tom40, a central component of the preprotein translocase of the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 2000; **275**: 37930–37936.
- [57] SZEWCZYK A, MARBAN E. Mitochondria: a new target of  $K^+$  channel openers? *Trends Pharmacol Sci* 1999; **20**: 157–161.
- [58] TAYLOR RD, HALE MC, NARGANG FE. Characterisation of *Neurospora crassa* Tom40-deficient mutants and effect of specific mutations on Tom40 assembly. *J Biol Chem* 2003; **278**: 765–775.
- [59] TOKADLIDIS K, SCHATZ G. Biogenesis of Mitochondrial Inner Membrane Proteins. *J Biol Chem* 1999; **274**: 35285–35288.
- [60] TRUSCOT KN, KOVERMANN P, GEISLER A, MERLIN A, MEIJER M, DRIESSEN AJM, RASSOW J, PFANNER N, WAGNER R. A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23. *Nat Struct Biol* 2001; **8**: 1074–1082.
- [61] VOSS W, RÖTTGERS C. Molecular chaperons as essential mediator of mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1592**: 51–62.

- [62] WERHAHN W, BRAUN HP. Biochemical dissection of the mitochondrial proteome from *Arabidopsis thaliana* by three-dimensional gel electrophoresis. *Electrophys* 2002; **23**: 640–646.
- [63] WERHAHN W, NIEMEYER A, JANSCH L, KRUF T, SCHMITZ UK, BRAUN H-P. Purification and characterisation of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane from *Arabidopsis*. Identification of multiple forms of Tom20. *Plant Phys* 2001; **125**: 943–954.
- [64] WOJTKOWSKA M. Import białka do mitochondriów. *Post Biol Kom* 2002; **29**: 363–379.
- [65] VAN WILPE S, RYAN MT, HILL K, MAARSE AC, MEISINGER C, BRIX J, DEKKER PJ, MOCZKO M, WAGNER R, MEIJER M, GUIARD B, HÖNLINGER A, PFANNER N. Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase. *Nature* 1999; **401**: 485–489.
- [66] YAMAMOTO H, ESAKI M, KANAMORI T, TAMURA Y, NISHIKAWA S, ENDO T. Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner mitochondrial membranes. *Cell* 2002; **111**: 519–528.

*Redaktor prowadzący – Lilla Hryniewiecka*

*Otrzymano: 01.03.2004 r.*

*Przyjęto: 07.05.2004 r.*

*ul. Fredry 10; Poznań 60-701*

*woytek@main.amu.edu.pl*





## MECHANIZMY OPORNOŚCI KOMÓREK BIAŁACZKOWYCH Z UDZIAŁEM ONKOGENNYCH KINAZ TYROZYNOWYCH\*

MECHANISMS OF RESISTANCE IN LEUKEMIA CELLS  
MEDIATED BY THE ONCOGENIC TYROSINE KINASES

Ireneusz MAJSTEREK i Janusz BŁASIAK

Katedra Genetyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki

*Streszczenie:* Chromosom Filadelfia (Ph) jest wynikiem translokacji chromosomalnej prowadzącej do transformacji nowotworowej komórek krwiotwórczych. Powodem jest aktywność onkogennej kinazy tyrozynowej BCR/ABL powstającej z fuzji genów w wyniku przeniesienia fragmentu chromosomu 9 do chromosomu 22 [t(9;22)]. Istnieje cała rodzina fuzyjnych kinaz tyrozynowych (FTKs) spokrewnionych z BCR/ABL, takich jak: TEL/ABL, TEL/JAK2, TEL/TRKC(L), TEL/PDGF $\beta$ R oraz NPM/ALK, które indukują zarówno ostre, jak i przewlekłe białaczki szpikowe oraz chłoniaki. FTKs aktywują szlaki wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału stymulujące komórki do podziałów, chronią je przed apoptozą i aktywują mechanizmy prowadzące do lekooporności. Różne FTKs mają zdolność aktywacji czynników transkrypcyjnych STAT. STAT5 jest niezbędny do zależnej od FTKs regulacji RAD51 w mechanizmie naprawy przez rekombinację homologiczną (HRR). Ponadto podczas terapii lekowej komórki zmienione przez FTKs wykazują opóźnienie cyklu komórkowego w punkcie kontrolnym G2/M. Odnajduje się w nich również podwyższony poziom białek antyapoptotycznych. Najprawdopodobniej współdziałanie wszystkich tych procesów leży u podstaw zjawiska lekooporności i stanowi główny problem skutecznej terapii białaczek.

*Słowa kluczowe:* BCR/ABL, fuzyjne kinazy tyrozynowe, lekooporność, białaczki.

*Summary:* Philadelphia chromosome (Ph) results from a reciprocal chromosomal translocation and causes blood cancer. Ph translocation mediates its biological effects through deregulated, constitutively active tyrosine kinase BCR/ABL derived from relocation of the portion of the *c-ABL* gene from chromosome 9 to the portion of the *BCR* gene locus on chromosome 22 [t(9;22)]. There is a family of BCR/ABL-related fusion tyrosine kinases (FTKs) including TEL/ABL, TEL/JAK2, TEL/PDGF $\beta$ R, TEL/TRKC(L), and NPM/ALK associated with lymphomas, acute and chronic human leukemias. FTKs activate a number of pathways stimulating cell proliferation, protection from apoptosis and drug resistance. Various FTKs can activate STAT transcription factors, which may be required to induce drug resistance. STAT5 is essential

\*Praca finansowana z Grantu KBN 3P04 A03225.



for FTK-dependent regulation of *RAD51*, which plays a central role in homology-dependent recombinational repair (HRR). Moreover, cells transformed by FTKs displayed G2/M delay upon drug treatment. In addition, enhanced expression of antiapoptotic proteins were found in FTKs cells. The most likely all the postulated mechanisms may work in concert to induce drug resistance against anti-cancer therapy in leukemias.

*Keywords:* BCR/ABL, fusion tyrosine kinases, drug resistance, leukemias.

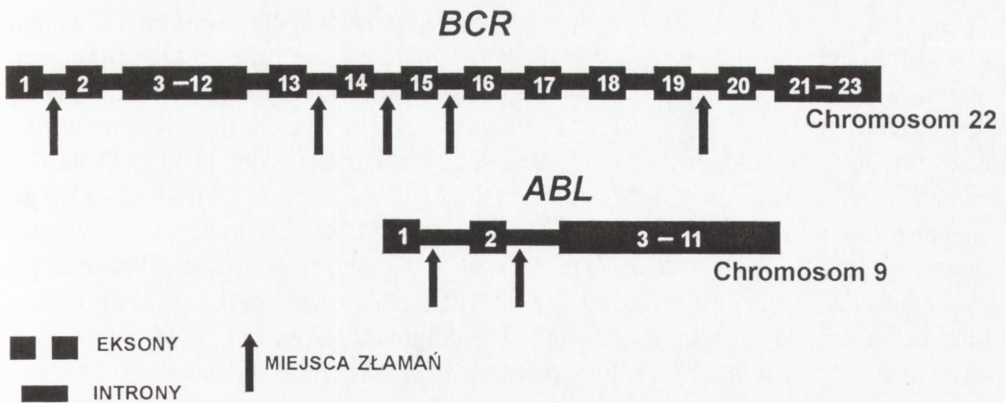
## 1. WPROWADZENIE

Onkogenne kinazy tyrozynowe, takie jak: BCR/ABL, TEL/ABL, TEL/JAK2, TEL/TRKC(L), TEL/PDGF $\beta$ R oraz NPM/ALK, powstające w komórkach w wyniku translokacji chromosomalnych związane są z występowaniem zarówno ostrych, jak i przewlekłych białaczek szpikowych oraz chłoniaków [7, 26, 41]. Kinazy te aktywują szlaki wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału stymulujące komórki do podziałów, chronią komórki przed apoptozą, a także indukują oporność na leki cytostatyczne, takie jak: cisplatyna, mitomicyna c, leki antracyklinowe (idarubicyna, doksorubicyna) oraz promieniowanie  $\gamma$  [25, 32, 43, 46, 50, 60, 62, 70, 78]. Na skutek działania czynników genotoksycznych, w tym leków przeciwnowotworowych, powstają pęknięcia nici DNA, co jest przyczyną zahamowania podziałów, a w konsekwencji śmierci komórek nowotworowych [40]. Onkogenne kinazy tyrozynową chronią komórki nowotworowe przed śmiercią, a mechanizm ten jest nadal nie do końca poznany.

Białaczki są nowotworami krwi i charakteryzują się akumulacją nieprawidłowych krwinek białych w szpiku, są chorobami klonalnymi i wywodzą się zazwyczaj z jednej komórki, która uległa transformacji nowotworowej. Komórką przechodzącą transformację jest najczęściej wielopotencjalna komórka macierzysta, która może dać początek liniom komórkowym krwi, w tym także limfocytom. Podstawą klinicznego podziału białaczek jest stopień dojrzałości dominującego typu komórek w szpiku i we krwi. Wyróżnia się cztery najczęstsze odmiany białaczek: ostrą limfoblastyczną (ang. *Acute Lymphoblastic Leukemia*, ALL), ostrą szpikową (ang. *Acute Myeloid Leukemia*, AML), przewlekłą szpikową (ang. *Chronic Myeloid Leukemia*, CML) i przewlekłą limfocytową (ang. *Chronic Lymphocytic Leukemia*, CLL) [14, 16].

## 2. CHROMOSOM FILADELIA, ONKOGENNA KINAZA BCR/ABL

W 1960 roku Novell i Hungerford opisali pierwszą specyficzną nieprawidłowość chromosomalną nowotworów krwi związaną z obecnością genów fuzyjnych, nazwaną od miasta dokonania odkrycia chromosomem Filadelfia (ang. *Philadelphia Chromosome*, Ph) [64]. Chromosom Ph został zidentyfikowany w komórkach szpiku pobranych od pacjentów z CML i jest on wynikiem translokacji fragmentu chromosomu 22 do



RYCINA 1. Molekularne mechanizmy translokacji prowadzącej do powstania chromosomu Filadelfia; lokalizacja punktów złamań w chromosomie 22 i 9. Na rycinie przedstawiono najczęstsze miejsca, w których dochodzi do pęknięć w genie *BCR* oraz w genie *ABL* z uwzględnieniem eksonów oraz intronów (na podstawie [9, 12, 18, 19, 74])

chromosomu 9 [t(9;22)] [16, 65]. Do pęknięcia dochodzi w pobliżu końca dłuższego ramienia chromosomu 9 (9q34) oraz w dłuższym ramieniu chromosomu 22 (22q11) [66]. Translokacja powoduje przeniesienie i aktywację protoonkogenu komórkowego *c-ABL* z chromosomu 9 i połączenie go z genem *BCR* w chromosomie 22 [4, 30]. Geny tworzą funkcjonalną hybrydę *BCR/ABL* kodującą onkogenne białko mające aktywność cytozolowej kinazy tyrozynowej (ryc. 1) [16, 28, 38]. *BCR/ABL* odnajduwany jest w 95% przypadków CML oraz w około 5% ALL u dzieci i 15–25% ALL u dorosłych. Translokacje typu *BCR/ABL* mogą różnić się punktem pęknięcia w *BCR*, a powstałe geny fuzyjne kodują białka różnych wielkości od 180 do 230 kDa [47, 61, 73].

## 2.1. Rodzina fuzyjnych kinaz tyrozynowych (FTKs) spokrewnionych z *BCR/ABL*

Istnieje cała grupa onkogennych kinaz tyrozynowych zaliczanych ze względu na podobieństwo strukturalne do rodziny FTKs (ang. *Fusion Tyrosine Kinases*) spokrewnionych z *BCR/ABL* (tab. 1). Wszystkie one wykazują podobieństwo strukturalne z *BCR/ABL*, które obejmuje N-końcowy region oligomeryzacji odpowiedzialny za konstytutywną aktywację związanych z nim C-końcowych partnerów fuzyjnych, najczęściej domen wykazujących aktywności kinaz tyrozynowych. Stwierdzono, że poziom ekspresji FTKs ma zasadniczy wpływ na przebieg transformacji blastycznej białaczek u ludzi [34, 70].

Kinaza fuzyjna *TEL/ABL* jest wynikiem translokacji t(9;12) odnajdowanej w przypadkach ALL oraz AML i atypowym CML i zawiera N-końcowy fragment *TEL* związany z eksonem 2 onkogenu *ABL* [23, 41]. *TEL/JACK2* został scharakteryzowany jako produkt translokacji t(9;12), która powoduje przeniesienie domeny oligomeryzacji *TEL* na katalityczną domenę *JAK2* i został znaleziony w przypadkach ALL [59]. *TEL/PDGFβR* jest związany z translokacją t(5;12), która wiąże N-końcowy



region TEL z międzybłonowym regionem kinazy tyrozynowej dla receptora  $\beta$  czynnika wzrostu zależnego od płytek (PDGF $\beta$ R) i występuje w przewlekłej białacze mielomonocytozowej [24, 41]. Konsekwencją translokacji t(12;15) jest ekspresja fuzyjnej kinazy tyrozynowej TEL/TRKC(L) związanej z AML, niemowlęcym włóknakiomięśniakiem i wrodzonym mezoblastycznym rakiem nerki. Fuzja TEL/TRKC(L) wiąże eksony 1 i 4 sekwencji TEL z niemal całą domeną kinazy TRKC (bez 42 pz eksonu blisko C-końca TRKC) [43]. Gen fuzyjny NPM/ALK powstaje w wyniku translokacji t(2;5) i bierze udział w patogenezie rozległego chłoniaka anaplastycznego (ang. *Anaplastic Large Cell Lymphoma*, ALCL) [42]. NPM/ALK koduje białko hybrydowe 75 KDa zawierające N-końcowy fragment sekwencji NPM związany z cytoplazmatyczną domeną receptora kinazy tyrozynowej ALK [51, 52].

### 3. MECHANIZMY OPORNOŚCI KOMÓREK BIAŁACZKOWYCH

Oporność komórek nowotworowych na promieniowanie i leki cytostatyczne stanowi główny problem dla efektywnej terapii przeciwnowotworowej. Zwykle nie jest ona bezpośrednią konsekwencją transformacji nowotworowej, ale raczej jest wynikiem selekcji klonów komórek rakowych zdolnych do rozwinięcia mechanizmów obronnych i do przetrwania terapii [22, 27, 29]. Komórki z ekspresją onkogennych kinaz tyrozynowych, takich jak: BCR/ABL, v-SRC i HER2/neu, wykazują wczesną lekooporność [5, 50, 60].

Różne kinazy tyrozynowe w tym BCR/ABL, v-SRC i HER-2/neu aktywują wiele mechanizmów odpowiedzialnych za ochronę przed apoptozą, indukcję proliferacji niezależnej od czynników wzrostu, oraz oporności na chemioterapeutyki i promieniowanie [86]. Oporność na czynniki uszkodzające DNA jest jednym z głównych powodów niepowodzenia terapii przeciwnowotworowej, sugeruje się istnienie kilku mechanizmów leżących u podstaw zjawiska lekooporności [20, 62, 67]:

- nadekspresję glikoproteinowych transporterów międzybłonowych, np. MDR1, które obniżają wewnątrzkomórkowe stężenie leków,
- zmiany poziomu białek uczestniczących w detoksykacji lub aktywacji chemioterapeutyków, np. NADP,
- wzrost ekspresji białek antyapoptotycznych, np. Bcl-2 i Bcl-xL,
- przejściowe zatrzymanie cyklu komórkowego,
- modulowanie procesu naprawy DNA.

#### 3.1. Lekooporność komórek białaczkowych indukowana przez FTKs

Dotychczasowe badania wskazują, że co najmniej trzy z wymienionych mechanizmów:

- 1) wzrost ekspresji białek antyapoptotycznych,
- 2) przejściowe zatrzymanie cyklu komórkowego oraz
- 3) modulowanie naprawy DNA,

mogą uczestniczyć w lekooporności indukowanej przez kinazę BCR/ABL [2, 5, 41, 55, 80]. BCR/ABL podnosi poziom ekspresji i fosforylacji białka RAD51, które odgrywa kluczową rolę w reperacji DNA w drodze homologicznej rekombinacji (HRR)

TABELA 1. Rodzina fuzyjnych kinaz tyrozynowych (FTKs) spokrewnionych z onkogeną kinazą tryozynową BCR/ABL. W tabeli przedstawiono opis translokacji chromosomalnej prowadzącej do powstania genów fuzyjnych oraz zespół chorobowy, w który zaangażowane są FTKs (na podstawie [14, 23, 25, 42, 43])

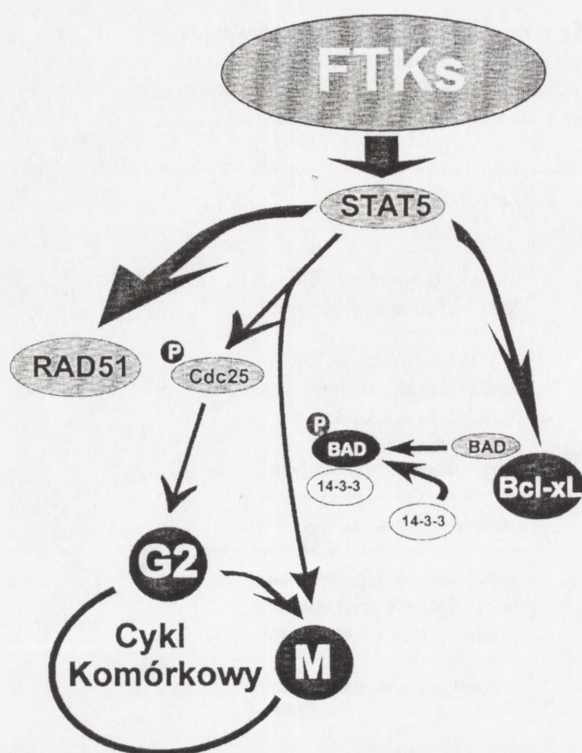
Kinaza FTK	Translokacja chromosomalna	Zespół chorobowy
BCR/ABL	[t(9;22)]	przewlekła białaczka szpikowa, ostra białaczka limfoblastyczna
TEL/ABL	[t(9;12)]	przewlekła białaczka szpikowa, ostra białaczka limfoblastyczna, ostra białaczka szpikowa
TEL/JACK2	[t(9;12)]	ostra białaczka limfoblastyczna
TEL/PDGFR	[t(5;12)]	przewlekła białaczka mielomonocytoza
TEL/TKL1(L)	[t(12;15)]	ostra białaczka szpikowa, niemowlęcy włókniakomięsak, wrodzony mezoblastyczny rak nerki
NPM/ALK	[t(2;5)]	rozległy chłoniak anaplastyczny

podwójnych pęknięć nici DNA (DSBs) [72, 80, 82, 83]. Pęknięcia podwójnej nici DNA powstające na skutek działania cytostatyków są główną przyczyną zahamowania podziałów komórek nowotworowych, zatem BCR/ABL-zależna stymulacja RAD51 może ułatwiać HRR i przyczyniać się do indukowania lekooporności w komórkach białaczkowych [3]. Komórki BCR/ABL pozytywne rozpoznają DSBs oraz reagują na nie w efektywny sposób [40]. W dodatku uszkodzenie DNA może powodować aktywację punktu kontrolnego G2/M cyklu komórkowego [15]. W wyniku tego czas przejścia przez kolejne fazy cyklu komórkowego może zostać wydłużony, dając komórce możliwość naprawy DNA [9, 10]. Przejściowe opóźnienie G2/M wydaje się być niezbędnym elementem oporności na uszkodzenie DNA w komórkach z ekspresją BCR/ABL [5, 55, 84]. Niektóre FTKs mogą wzmacniać ekspresję antyapoptotycznych białek, takich jak Bcl-xL i Bcl-2 oraz hamować proapoptotyczną funkcję białka Bad [1, 39, 68, 69, 78]. Bcl-2 reguluje aktywację kaspazy-3, jego nadekspresja może zapobiegać uwalnianiu cytochromu c z mitochondrium i hamować kaspazę-3 [36, 37]. Mechanizmy zapobiegające aktywacji kaspazy-3 wykryto w komórkach BCR/ABL pozytywnych [2, 41]. Wszystkie te czynniki mogą leżeć u podstaw zjawiska lekooporności białaczek u ludzi.

### 3.2. Czynniki transkrypcyjne STAT aktywowane przez FTKs

Szlak STAT odgrywa kluczową rolę w zależnym do cytokin procesie kontroli wzrostu komórek hematopoetycznych [75]. W prawidłowych komórkach hematopoetycznych cytokiny przekazują sygnał przez aktywację cytoplazmatycznych kinaz JAK, które





RYCINA 2. Oddziaływanie FTKs za pośrednictwem czynników transkrypcyjnych STAT5 na procesy komórkowe związane z lekoopornością. Na ycinie przedstawiono uproszczony schemat systemów aktywowanych przez fizyczne kinazy tyrozynowe (FTKs). Kolorem czarnym oznaczono opóźnienie w fazie G2 oraz M cyklu komórkowego oraz nieaktywne formy białek, jako P oznaczono przyłączenie fosforu w procesach fosforylacji, a kolorem białym oznaczono białka adaptorowe. Szczegółowy opis procesów przedstawionych na rycinie umieszczono w tekście (na podstawie [16])

fosforylują i aktywują czynniki transkrypcyjne z rodziny STAT. W komórkach FTKs odnajduje się stałą aktywację szlaku JAK/STAT [74]. Jak się wydaje, podstawą tego zjawiska jest niezależna od kinazy JAK fosforylacja STAT5 [33]. W komórkach transformowanych FTKs, STAT5 wykazuje właściwości antyapoptotyczne związane z transkrypcyjną aktywacją białka Bcl-xL [31]. W odróżnieniu od naturalnych mechanizmów aktywacji szlaku JAK/STAT, kinazy FTKs mogą bezpośrednio wpłynąć na czynniki STAT, bez uprzedniej fosforylacji kinaz JAK [74, 75].

Zgodnie z hipotezą szlaku STAT, RAD51 jest regulowany przez różne FTKs (BCR/ABL, TEL/ABL, TEL/JACK2, TEL/PDGFβR, NPM/ALK) w STAT5-zależny sposób i pełni niezbędną rolę w ułatwianiu HRR [75]. Proces ten może wydajnie eliminować DSBs powstałe w wyniku działania leków oraz promieniowania i hamować apoptozę. Prawdopodobnie wzrost aktywności RAD51 w komórkach z FTKs jest skutkiem zachodzącej za pośrednictwem STAT5 transaktywacji promotora RAD51 [54]. Dla porównania komórki, w których nie dochodzi do aktywacji STAT5, wykazują podstawowy poziom RAD51, a więc DSBs są rozpoznawane z mniejszą wydajnością. Wzrost ekspresji RAD51 i Bcl-xL połączony z zahamowaniem cyklu komórkowego w fazie G2/M powoduje lekooporność w stopniu porównywalnym do obserwowanego dla komórek z FTKs zdolnych do aktywacji STAT5 [21]. Co interesujące, ekspresja RAD51 i lekooporność w komórkach z TEL/TRKC(L) jest znacząco mniejsza w porównaniu z komórkami zawierającymi inne FTKs (BCR/ABL, TEL/ABL, TEL/

JACK2, TEL/PDGFR $\beta$ , i NPM/ALK). Choć TEL/TRKC(L) jest potencjalnym aktywatorem fosfolipazy C $\gamma$ , kinazy fosfoinozytolu i SHC w porównaniu z innymi FTKs nie aktywuje STAT5 [43]. Możliwy jest następujący szlak lekooporności: FTKs  $\rightarrow$  STAT5  $\rightarrow$  dalszy efektor (np. RAD51 i Bcl-xL, ryc. 2) [54, 80, 81].

#### 4. UDZIAŁ RAD51 W POWSTAWANIU OPORNOŚCI KOMÓREK Z EKSPRESJĄ FTKS

Komórki transfekowane FTKs charakteryzują się lekoopornością, chociaż najczęściej cytostatyki, takie jak cisplatyna i mitomycyna c, indukują w nich więcej uszkodzeń niż w komórkach rodzicielskich przed transfekcją [79]. W komórkach, w których dochodzi do ekspresji FTKs, po inkubacji z lekami cytostatycznie aktywnymi często wykrywa się większą ilość pęknięć DNA niż w prawidłowych komórkach [32, 46, 79]. Wynika z tego, że FTKs nie chronią komórek przed uszkodzeniami DNA wywołanymi przez leki, choć komórki te mają wyższe zdolności przeżyciowe niż komórki macierzyste [32, 48]. Komórki transfekowane FTKs wytwarzają więcej kolonii po dodaniu cytostatyków i mogą wyrastać nawet przy stężeniach leków, które eliminują wszystkie kolonie komórek macierzystych. Jaki jest więc właściwie mechanizm lekooporności indukowanej przez FTKs, skoro w początkowej fazie wykazują one wysoki poziom uszkodzeń DNA w odpowiedzi na działanie czynników genotoksycznych?

W komórkach, w których dochodzi do ekspresji FTKs, po inkubacji z lekami genotoksycznie aktywnymi często wykrywa się większą ilość pęknięć DNA niż w prawidłowych komórkach, nawet jeśli leki te nie reagują z DNA w sposób, który mógłby bezpośrednio prowadzić do tego typu uszkodzeń [78]. Jednocześnie przeprowadzone analizy wykazały, że komórki, w których znajdują się FTKs (z wyjątkiem TEL/TRKC(L)), zawierają pięć do dziesięciu razy więcej RAD51 niż komórki macierzyste, a inhibicja ekspresji RAD51 powodowała w tych komórkach spadek oporności na cytostatyki [78]. Lekooporność wywołana przez FTKs może być więc związana ze wzmocnieniem naprawy przez rekombinację homologiczną (HRR) podwójnych pęknięć DNA (DSBs). Dodatkowo, aby wyjaśnić charakter uszkodzeń DNA w początkowej fazie ich naprawy należy sobie wyobrazić sytuację, że kiedy widełki replikacyjne napotykają na te uszkodzenia, to powoduje to zatrzymanie procesu replikacji i aby rozwiązać ten problem pojawiają się pojedyncze pęknięcia i/lub DSBs (jeśli DSBs nie zostaną naprawione, są śmiertelne) [40]. DSBs związane z widełkami replikacyjnymi są następnie (w większości), naprawiane przez zależną od RAD51 homologiczną rekombinację i jest to etap kluczowy dla ponownej inicjacji replikacji DNA [3].

Wyniki wielu badań łączą RAD51-zależną naprawę przez rekombinację homologiczną z lekoopornością komórek wykazujących ekspresję FTKs [79]. Istnieje podstawowa korelacja między ekspresją RAD51 i opornością na terapię lekową [11, 13, 44, 58, 85]. Onkogeny, które zmieniają ekspresję, fosforylację i/lub funkcję RAD51,



mogą wzmacniać wydajność naprawy DNA i prowadzić do lekooporności [6]. W dodatku RAD51 może być odpowiedzialny za wewnątrzchromosomowe lub międzychromosomowe delecje i translokacje chromosomalne, a w pewnych warunkach może umożliwiać wymianę między łańcuchami DNA zawierającymi krótkie sekwencje niehomologiczne [8]. Dlatego też, nawet niewielkie zmiany zawartości RAD51 w komórce albo jego aktywności mogą powodować leko-oporność, ale również wspomagają niestabilności genomu i prowadzić mogą do ujawnienia złośliwego charakteru nowotworu.

## 5. WSPÓLDZIAŁANIE POMIĘDZY RAD51, PUNKTEM KONTROLNYM G2/M I BIAŁKIEM BCL-XL

Podwyższony poziom RAD51 to nie jedyny czynnik przyczyniający się do lekooporności komórek białaczkowych, jego nadekspresja wywołuje lekooporność poniżej poziomu, jaki obserwujemy w komórkach z FTKs [78]. Prawdopodobnie istnieje współdziałanie między RAD51 oraz innymi mechanizmami komórkowymi zapobiegającymi efektom cytotoksycznym. BCR/ABL oddziałuje z Bcl-xL (ale nie bcl-2) i moduluje fazy cyklu komórkowego, zbadano, że procesy te mogą być regulowane także przez inne FTKs [1, 5, 55]. Obserwacja ta sugeruje, że FTKs stymulują dodatkowe czynniki przyczyniające się do lekooporności i mogą to być właśnie: aktywacja Bcl-xL oraz zahamowanie cyklu komórkowego w punkcie G2/M. Bcl-xL może bowiem zapobiegać apoptozie przez hamowanie uwolnienia cytochromu C z mitochondrium i w następstwie blokować aktywację kaspazy-3 [36]. Zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M zapewnia natomiast więcej czasu potrzebnego do naprawy uszkodzeń DNA zagrażających życiu komórki [9].

Porównywano komórki rodzicielskie oraz transfekowane FTKs wzrastające w obecności cytostatyków, takich jak mitomycyna c i cisplatyna. W różnych odstępach czasu, sprawdzano następnie, jaka część komórek pozostaje w fazie G2/M. Okazało się, że wszystkie badane komórki z FTKs wykazują zahamowanie cyklu komórkowego zaraz po uszkodzeniu ich DNA. Faza G2/M podlega kontroli w dwóch punktach cyklu: przejście G2 → M (punkt kontrolny (Chk1) G2) i przejście metafaza → anafaza (punkt kontrolny (Chk2) M) [10, 15, 72]. Punkt Chk1 zależy od mechanizmów regulujących kompleks cyklin Cdc2-B1 w szlaku ATM → Chk1 → Cdc25C (fosforylacja seryny w Cdc25C). Aktywacja fosfatazy Cdc25C hamuje w cytoplazmie kompleks Cdc2-B1 oraz p52 → p21 i 14-3-3 [9]. Punkt Chk2 kontrolowany jest bezpośrednio przez mechanizmy składania wrzeciona mitotycznego [64, 71]. Stwierdzono, że FTKs oddziałują z antyapoptotycznym białkiem Bcl-xL oraz pośrednio z proapoptotycznym BAD [45, 53]. Fosforylowany BAD tworzy kompleks z białkami adaptorowymi frakcji cytoplazmatycznej z rodziny 14-3-3, w wyniku czego nie może wiązać czynników antyapoptotycznych, w tym Bcl-xL [17]. W konsekwencji FTKs mogą blokować uwalnianie cytochromu C z mitochondriów, aktywację kaspazy 3 i hamować proces apoptozy [19, 25, 36, 68].

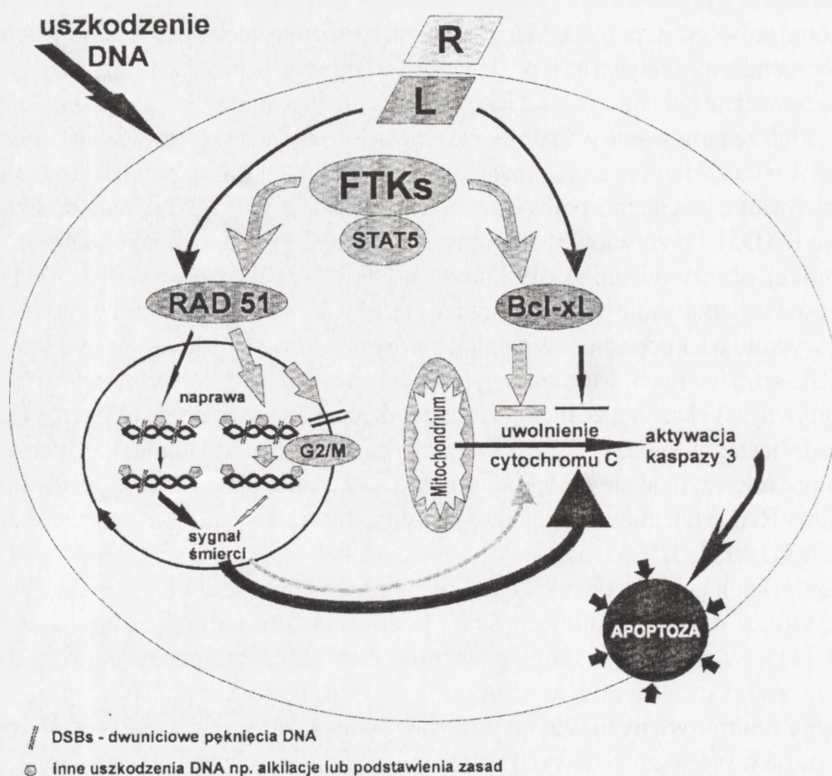
W komórkach prawidłowych procesy związane z RAD51, Bcl-xL oraz zatrzymaniem cyklu komórkowego w punkcie G2/M są regulowane niezależnie od siebie i stymulacja jednego czynnika nie wpływa na inne. Jednakże w komórkach białaczek, każdy z czynników z osobna powoduje tylko nieznaczną lekooporność, dlatego podwyższona ekspresja RAD51 i Bcl-xL i/lub zahamowanie w fazie G2/M, jak się wydaje, mogą współdziałać w ochronie komórek białaczkowych z ekspresją FTKs przeciw lekom i promieniowaniu [78]. Zaobserwowano, że chociaż podwyższona ekspresja Bcl-xL i RAD51 lub podwyższona ekspresja RAD51 i przejściowe zahamowanie fazy G2/M wzmagają lekooporność, zakres leży poniżej obserwowanego dla komórek BCR/ABL-pozytywnych [79]. Dopiero jednoczesne zahamowanie cyklu w punkcie G2/M w komórkach z nadekspresją RAD51 i Bcl-xL, wywołuje lekooporność w stopniu porównywalnym z obserwowaną w komórkach BCR/ABL-pozytywnych. Mechanizmy te muszą więc działać w sposób synergistyczny lub addytywny. Wykazano, że niemalże cała rodzina FTKs wzmacnia ekspresję Bcl-xL w odpowiedzi na terapię lekową [79]. Należy więc rozważyć przynajmniej trzy mechanizmy, które mogą przyczyniać się do lekooporności wywołanej przez FTKs: HRR, w którym pośredniczy RAD51, hamowanie apoptozy przez wzrost ekspresji Bcl-xL oraz zahamowanie w punkcie G2/M [1, 5, 9, 37, 55].

W komórkach pobranych od pacjentów cierpiących na przewlekłą białaczkę limfocytową, którzy wykazywali oporność na podawane leki, potwierdzono nadekspresję RAD51 [11]. W naszych badaniach ekspresja antysensowej sekwencji dla RAD51, wyraźnie zwiększała wrażliwość komórek na działanie badanych cytostatyków (cisplatyny i mitomycyny c) [79]. Wykazano również, że ekspresja BCR/ABL indukuje lekooporność w pierwszorzędowych mureinowych komórkach szpiku kostnego, w których jednocześnie odnajduje się nadekspresję Bcl-xL [1]. Zablockowanie BCR/ABL w komórkach CML aktywuje natomiast procesy proapoptotyczne związane z jedno-czesnym hamowaniem ekspresji Bcl-xL [31]. Ponadto opóźnienie cyklu podziałowego w fazie G2/M i hamowanie apoptozy mają zasadniczy udział w powstawaniu oporności komórkowej na stres genotoksyczny [5]. Badania te potwierdzają wcześniejsze obserwacje, mianowicie wszystkie trzy mechanizmy: nadekspresja RAD51 i Bcl-xL oraz zahamowanie fazy G2/M mają miejsce w pierwszorzędowych hematopoetycznych komórkach przekształconych przez FTKs (ryc. 3) [76, 77].

## 6. PODSUMOWANIE

Przełom w leczeniu nowotworów krwi stanowiło odkrycie, że udział w indukowaniu oporności mogą mieć kinazy tyrozynowe charakterystyczne dla komórek wykazujących stałą ekspresję genów fuzyjnych powstałych w efekcie translokacji chromosomalnych [12]. Poznanie mechanizmów lekooporności indukowanej przez FTKs przyczyniło się istotnie do poszukiwania inhibitorów, uniwersalnych dla całej grupy spokrewnionych z BCR/ABL FTKs. Duże nadzieje na sukces stwarza stosowany w połączeniu z innymi lekami w przypadkach CML i ALL, inhibitor o działaniu kompetecyjnym dla BCR/ABL znany pod nazwą CGP57148B, Imatinib, Gleevec, STI571 [49, 57]. STI571 jest chemicznym związkami 2-fenylaminopirymidy, który posiada właściwość blokowania





RYCINA 3. Ogólny model indukowanej przez fuzyjne kinazy tyrozynowe (FTKs) lekooporności w komórkach białaczek; na rycinie przedstawiono główne mechanizmy aktywowane przez FTKs. Opis: W normalnych hematopoetycznych komórkach poziom RAD51 jest regulowany sygnałem z kompleksu ligand (L) + receptor (R). Może on ulec dalszej modyfikacji poprzez uszkodzenie DNA. Podczas krótkiej fazy G2/M mechanizmy naprawy przez rekombinację homologiczną (HRR) nie są w stanie efektywnie naprawić podwójnych pęknięć nici DNA (DSBs). Pozostające DSBs i inne uszkodzenia uruchamiają ścieżkę „śmierci”. Sygnał „śmierci” nie może być powstrzymany przez podstawowy poziom Bcl-xL wynikający z uwolnienia cytochromu C z mitochondrium i aktywacji kaspazy 3. Dla porównania, komórki z FTKs zawierają wysoki poziom RAD51. W mechanizmie tym uczestniczyć mogą czynniki transkrypcyjne STAT5. Przejściowe zahamowanie fazy G2/M zapewnia dodatkowy czas, dlatego DSBs są naprawiane z wysoką wydajnością i sygnały do apoptozy znacząco zmniejszają się. Dodatkowo ta niewielka ilość sygnałów do apoptozy, w komórkach z FTKs może być powstrzymana dzięki podwyższonemu poziomowi Bcl-xL, który zapobiega uwolnieniu cytochromu C z mitochondrium i aktywacji kaspazy 3. Reasumując, dzięki „ant-apoptotycznemu parasolowi” komórki z FTKs mogą tolerować uszkodzenia DNA (na podstawie [76])

domeny ATP niezbędnej dla aktywności kinazowej białka BCR/ABL [35]. Jest on również wykorzystywany do wyciszania aktywności innych FTKs w tym z porównywalną do BCR/ABL skutecznością dla TEL/PDGFR. STI571 skutecznie przyczynia się do przełamania oporności w przypadkach Ph pozytywnych białaczek i zwiększa skuteczności terapii prowadzonej z zastosowaniem innych leków [49].

Spekulacje na temat współdziałania między RAD51, Bcl-xL i zahamowaniem cyklu komórkowego w indukowaniu oporności na leki w białaczkach z ekspresją FTKs, wydają się być w pełni uzasadnione wynikami dotychczasowych badań prowadzonych w tej dziedzinie. Nie można wykluczyć jednak innych mechanizmów, takich jak: zahamowanie w fazie G1 cyklu komórkowego, wzrost ekspresji Bcl2 i naprawa DSBs przez niehomologiczne łączenie końców (NHEJ) [15, 18, 56, 63]. Można natomiast postawić hipotezę, że FTKs są zdolne indukować lekooporność, na którą składa się z pewnością stymulacja RAD51 (ułatwiającego naprawę DSBs), Bcl-xL (inhibicja aktywacji kaspazy 3) i/lub wydłużenia fazy G2/M cyklu komórkowego (więcej czasu na naprawę DNA). Mechanizmy te mogą razem uczestniczyć w oporności na terapię lekami w komórkach białaczki lub chłoniaków oraz promować niestabilność genomu prowadzącą do złośliwego fenotypu choroby.

## LITERATURA

- [1] AMARANTE-MENDES GP, MCGAHON AJ, NISHIOKA WK, AFAR DE, WITTE ON, GREEN DR. Bcl-2-independent Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis: protection is correlated with up regulation of Bcl-xL. *Oncogene* 1998; **16**: 1383–1390.
- [2] AMARANTE-MENDES GP, NAEKYUNG KIM C, LIU L, HUANG Y, PERKINS CL, GREEN DR, BHALLA K. Bcr-Abl exerts its antiapoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome C and activation of caspase-3. *Blood* 1998; **91**:1700–1705.
- [3] ARNAUDEAU C, LUNDIN C, HELLEDAY T. DNA double-strand breaks associated with replication forks are predominantly repaired by homologous recombination involving an exchange mechanism in mammalian cells. *J Mol Biol* 2001; **307**: 1235–1245.
- [4] BARTRAM CR, DE KLEIN A, HAGEMEIJER A, van AGTHOVEN T, GEURTS van KESSEL A, BOOTSMA D, GROSVELD G, FERGUSON-SMITH MA, DAVIES T, STONE M. Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 1983; **306**: 227–280.
- [5] BEDI A, BARBER JP, BEDI GC, el-DEIRY WS, SIDRANSKY D, VALA MS, AKHTAR AJ, HILTON J, JONES RJ. BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood* 1995; **86**: 1148–1158.
- [6] BISHOP AJ, SCHIESTL RH. Homologous recombination as a mechanism of carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2001; **1471**: 109–121.
- [7] BLUME-JENSEN P, HUNTER T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001; **411**: 355–365.
- [8] BUCKA A, STASIAK A. RecA-mediated strand exchange traverses substitutional heterologies more easily than deletions or insertions. *Nucleic Acids Res* 2001; **29**: 2464–2470.
- [9] CHAN TA, HERMEKING H, LENGAUER C, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. 14-3-3 sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* 1999; **401**: 616–620.
- [10] CHAN TA, HWANG P M, HERMEKING H, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Cooperative effects of genes controlling the G2/M checkpoint. *Genes Dev* 2000; **14**: 1584–1588.
- [11] CHRISTODOULOPOULOS G, MALAPETSA A, SCHIPPER H, GOLUB E, RADDING C, PANASCI LC. Chlorambucil induction of HsRad51 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 1999; **5**: 2178–2184.
- [12] CLARK SS, McLAUGHLIN J, TIMMONS M, PENDERGAST AM, BEN-NERIAH Y, DOW LW, CRIST W, ROVERA G, SMITH SD, WITTE ON. Expression of a distinctive BCR-ABL oncogene in Ph1-positive acute lymphocytic leukemia (ALL). *Science* 1988; **239**: 775–777.
- [13] COLLIS SJ, TIGHE A, SCOTT SD, ROBERTS SA, HENDRY JH, MARGISON GP. Ribozyme minigene-mediated RAD51 down-regulation increases radiosensitivity of human prostate cancer cells. *Nucleic Acids Res* 2001; **29**: 1534–1538.
- [14] COPLEAN AE, McGUIRE EA. The biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood* 1995; **85**: 1151–1168.



- [15] DASIKA GK, LIN SC, ZHAO S, SUNG P, TOMKINSON A, LEE EY. DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene* 1999; **18**: 7883–7899.
- [16] DEININGER MWN, GOLDMAN JM, MELO JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000; **96**: 3343–3356.
- [17] del PESO L, GONZALES-GARCIA M, PAGE C, HERRERA R, NUNEZ G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 1997; **278**: 687–689.
- [18] DEUTSCH E, DUGRAY A, ABDULKARIM B, MARANGONI E, MAGGIORELLA L, VAGANAY S, M'KACHER R, RASY SD, ESCHWEGE F, VAINCHENKER W, TURHAN AG, BOURHIS J. BCR-ABL down-regulates the DNA repair protein DNA-PKcs. *Blood* 2001; **97**: 2084–2090.
- [19] DUBREZ L, EYMIN B, SORDET O, DROIN N, TURHAN AG, SOLARY E. BCR-ABL delays apoptosis upstream of procaspase-3 activation. *Blood* 1998; **91**: 2415–2422.
- [20] EL-DEIRY WS. Role of oncogenes in resistance and killing by cancer therapeutic agents. *Curr Opin Oncol* 1997; **9**: 79–87.
- [21] FUKUSHIMA T, TAKATA M, MORRISON C, ARAKI R, FUJIMORI A, ABE M, TATSUMI K, JASIN M, DHAR PK, SONODA E, CHIBA T, TAKEDA S. Genetic analysis of the DNA-dependent protein kinase reveals an inhibitory role of Ku in late S-G2 phase DNA double-strand break repair. *J Biol Chem* 2001; **276**: 44413–44418.
- [22] GOLDIE JH. Modelling the process of drug resistance. *Lung Cancer* 1994; **10**: 91–96.
- [23] GOLUB TR, GOGA A, BARKER GF, AFAR DE, McLAUGHLIN J, BOHLANDER SK, ROWLEY JD, WITTE ON, GILLILAND DG. Oligomerization of the ABL tyrosine kinase by the Ets protein TEL in human leukemia. *Mol Cell Biol* 1996; **16**: 4107–4116.
- [24] GOLUB TR, BARKER GF, LOVETT M, GILLILAND DG. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell* 1994; **77**: 307–316.
- [25] GREENLAND C, TOURIOL C, CHEVILLARD G, MORRIS SW, BAI R, DUYSER J, DELSOL G, ALLOUCHE M. Expression of the oncogenic NPM-ALK chimeric protein in human lymphoid T-cells inhibits drug-induced, but not Fas-induced apoptosis. *Oncogene* 2001; **20**: 7386–7397.
- [26] GRIGNANI F, FAGIOLI M, ALCOY M, LONGO L, PANDOLFI PP, DONTI E, BIONDI A, LO COCO F, GRIGNANI F, PELICCI PG. Acute promyelocytic leukemia: from genetics to treatment. *Blood* 1994; **83**: 10–25.
- [27] GROSS A, McDONNELL JM, KORSMEYER SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999; **13**: 1899–1911.
- [28] HARBOTT J, RITTERBACH J, JANKA-SCHAUB G, LUDWIG WD, REITER A, RIEHM H, LAMPERT F. Cytogenetics of childhood acute lymphoblastic leukemia in multicenter trials. *Haematol Blood Transfus* 1990; **33**: 451–458.
- [29] HARRISON DJ. Molecular mechanisms of drug resistance in tumours. *J Pathol* 1995; **175**: 7–12.
- [30] HEISTERKAMP N, STEPHENSON JR, GROFFEN J, HANSEN PF, de KLEIN A, BARTRAM CR, GROSVELD G. Localization of the c-abl oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 1983; **306**: 239–242.
- [31] HORITA M, ANDREU EJ, BENITO A, ARBONA C, SANZ C, BENET I, PROSPER F, FERNANDEZ-LUNA JL. Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. *J Exp Med* 2000; **191**: 977–984.
- [32] HOSER G, MAJSTEREK I, ROMANA DL, SLUPIANEK A, BŁASIAK J, SKORSKI T. Fusion oncogenic tyrosine kinases alter DNA damage and repair after genotoxic treatment: role in drug resistance? *Leukemia Research* 2003; **27**: 267–273.
- [33] ILARIA RL Jr, Van ETEN RA. P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J Biol Chem* 1996; **271**: 31704–31710.
- [34] ISSAAD C, AHMED M, NOVAULT S, BONNET ML, BENNARDO T, VARET B, VAINCHENER W, TURHAN AG. Biological effects induced by variable levels of BCR-ABL protein in the pluripotent hematopoietic cell line UT-7. *Leukemia* 2000; **14**: 662–670.
- [35] JAMES HA, GIBSON I. The therapeutic potential of ribozymes. *Blood* 1998; **91**: 371–382.
- [36] JOHNSON BW, CEPERO E, BOISE LH. Bcl-xL inhibits cytochrome c release but not mitochondrial depolarization during the activation of multiple death pathways by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol*

- Chem* 2000; **275**: 31546–31553.
- [37] JOHNSON BW, BOISE LH. Bcl-2 and caspase inhibition cooperate to inhibit tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced cell death in a Bcl-2 cleavage-independent fashion. *J Biol Chem* 1999; **274**: 18552–18558.
- [38] KALWINSKY DK, RAIMONDI SC, SCHELL MJ, MIRRO J JR, SANTANA VM, BEHM F, DAHL GV, WILLIAMS D. Allogeneic bone marrow transplantation in a program of intensive sequential chemotherapy for children and young adults with acute nonlymphocytic leukemia in first remission. *J Clin Oncol* 1990; **8**: 75–83.
- [39] KARNI R, JOVE R, LEVITZKI A. Inhibition of pp60c-Src reduces Bcl-XL expression and reverses the transformed phenotype of cells overexpressing EGF and HER-2 receptors. *Oncogene* 1999; **18**: 4654–4662.
- [40] KHANNA KK, JACKSON SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 2001; **27**: 247–254.
- [41] KOLIBABA KS, DRUKER BJ. Protein tyrosine kinases and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1997; **1333**: F217–F248.
- [42] LADANYI M. Aberrant ALK tyrosine kinase signaling. Different cellular lineages, common oncogenic mechanisms. *Am J Pathol* 2000; **157**: 341–345.
- [43] LIU Q, SCHWALLER J, KUTOK J, CAIN D, ASTER JC, WILLIAMS IR, GILLILAND DG. Signal transduction and transforming properties of the TELTRKC fusions associated with t(12;15) (p13;q25) in congenital fibrosarcoma and acute myelogenous leukemia. *EMBO J* 2000; **19**: 1827–1838.
- [44] MAACKE H, JOST K, OPITZ S, MISKA S, YUAN Y, HASSELBACH L, LUTTGES J, KALTHOFF H, STURZBECHER HW. DNA repair and recombination factor rad51 is overexpressed in human pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene* 2000; **19**: 2791–2795.
- [45] MAJEWSKI M, NIEBOROWSKA-SKORSKA M, SALOMONI P, SLUPIANEK A, REISS K, TROTTA R, CALABRETTA B, SKORSKI T. Activation of mitochondrial Raf-1 is involved in the antiapoptotic effects of Akt. *Cancer Res* 1999; **59**: 2815–2819.
- [46] MAJSTEREK I, SLUPIANEK A, BLASIAK J. TEL-fusion oncogenic tyrosine kinases determine leukemic cells response to idarubicin. *Anti-Cancer Drugs* 2003; **14**: 625–631.
- [47] MAJSTEREK I, BLASIAK J. Chromosom Filadelfia. *Post Biochem* 2002; **48**: 156–166.
- [48] MAJSTEREK I, SLUPIANEK A, BLASIAK J. ABL-fusion oncoproteins activate multi-pathway of DNA repair:role in drug resistance? *Biochimie* 2004; **86**: 53–65.
- [49] MANLEY PW, COWAN-JACOB SW, BUCHDUNGER E, FABBRO D, FENDRICH G, FURET P, MEYER T, ZIMMERMANN J. Imatinib: a selective tyrosine kinase inhibitor. *Europ J Cancer* 2002; **38**: 19–27.
- [50] MASUMOTO N, NAKANOS, FUJISHIMA H, KOHNO K, NIHO Y. V-src induces cisplatin resistance by increasing the repair of cisplatin-DNA interstrand cross-links in human gallbladder adenocarcinoma cells. *Int J Cancer* 1999; **80**: 731–737.
- [51] MORRIS SW, FOUST JT, VALENTINE MB, ROBERTS WM, SHAPIRO DN, LOOK AT. Sublocalization of the chromosome 5 breakpoint of the 3;5 translocation in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 1992; **5**: 385–391.
- [52] MORRIS SW, KIRSTEIN MN, VALENTINE MB, DITTMER K, SHAPIRO DN, LOOK AT, SALTMAN DL. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 1995; **267**: 316–317.
- [53] NESHAT MS, RAITANO AB, WANG HG, REED JC, SAWYERS CL. The survival function of the Bcr-Abl oncogene is mediated by Bad-dependent and -independent pathways: roles for phosphatidylinositol 3-kinase and Raf. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 1179–1186.
- [54] NIEBOROWSKA-SKORSKA M, WASIK MA, SLUPIANEK A, SALOMONI P, KITAMURA T, CALABRETTA B, SKORSKI T. Signal transducer and activator of transcription (STAT)5 activation by BCR/ABL is dependent on intact Src homology (SH)3 and SH2 domains of BCR/ABL and is required for leukemogenesis. *J Exp Med* 1999; **189**:1229–1242.
- [55] NISHII K, KABAROWSKI JH, GIBBONS DL, GRIFFITHS SD, TITLEY I, WIEDEMANN LM, GREAVES MF. Is BCR-ABL kinase activation confers increased resistance to genotoxic damage via cell cycle block. *Oncogene* 1996; **13**: 2225–2234.
- [56] NORBURY CJ, HICKSON ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; **41**: 367–401.



- [57] OETZEL C, JONULEIT T, GOTZ A, van der KUIP H, MICHELS H, DUYSER J, HALLEK M, AULITZKY WE. The tyrosine kinase inhibitor CGP 57148 (ST1 571) induces apoptosis in BCR-ABL-positive cells by down-regulating BCL-X. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 1958–1968.
- [58] OHNISHI T, TAKI T, HIRAGA S, ARITA N, MORITA T. *In vitro* and *in vivo* potentiation of radiosensitivity of malignant gliomas by antisense inhibition of the RAD51 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **245**: 319–324.
- [59] PEETERS P, RAYNAUD SD, COOLS J, WLODARSKA I, GROSSEGEORGE J, PHILIP P, MONPOUX F, Van ROMPAEY L, BAENS M, Van den BERGHE H, MARYNEN P. Fusion of TEL, the ETS-variant gene 6 (ETV6), to the receptor-associated kinase JAK2 as a result of t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukemia. *Blood* 1997; **90**: 2535–2540.
- [60] PIETRAS RJ, FENDLY BM, CHAZIN VR, PEGRAM MD, HOWELL SB, SLAMON DJ. Antibody to HER-2/neu receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene* 1994; **9**: 1829–1838.
- [61] RAITANO AB, WHANG YE, SAWYERS CL. Signal transduction by wild-type and leukemogenic Abl proteins. *Biochim Biophys Acta* 1997; **1333**: 201–216.
- [62] REED JC. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Semin Hematol* 1997; **34**: 9–19.
- [63] RIEDER CL, COLE R. Microtubule disassembly delays the G2-M transition in vertebrates. *Curr Biol* 2000; **10**: 1067–1070.
- [64] ROWLEY JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973; **243**: 290–293.
- [65] ROWLEY JD. The Philadelphia chromosome translocation. A paradigm for understanding leukemia. *Cancer* 1990; **65**: 2178–2184.
- [66] ROWLEY JD. Recurring chromosome abnormalities in leukemia and lymphoma. *Semin Hematol* 1990; **27**: 122–136.
- [67] SALOMONI P, CONDORELLI F, SWEENEY SM, CALABRETTA B. Versatility of BCR/ABL-expressing leukemic cells in circumventing proapoptotic BAD effects. *Blood* 2000; **96**: 676–684.
- [68] SANCHEZ-GARCIA I, MARTIN-ZANCA D. Regulation of Bcl-2 gene expression by BCR-ABL is mediated by Ras. *J Mol Biol* 1997; **267**: 225–228.
- [69] SATTLER M, SALGIA R. Activation of hematopoietic growth factor signal transduction pathways by the human oncogene BCR/ABL. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997; **8**: 63–79.
- [70] SCHEELE JS, RIPPLE D, LUBBERT M. The role of ras and other low molecular weight guanine nucleotide (GTP)-binding proteins during hematopoietic cell differentiation. *Cell Mol Life Sci* 2000; **57**: 1950–1963.
- [71] SHAH JV, CLEVELAND DW. Waiting for anaphase: Mad2 and the spindle assembly checkpoint. *Cell* 2000; **103**: 997–1000.
- [72] SHINOHARA A, OGAWA T. Homologous recombination and the roles of double-strand breaks. *Trends Biochem Sci* 1995; **20**: 387–391.
- [73] SHTIVELMAN E, LIFSHTITZ B, GALE RP, ROE BA, CANAANI E. Alternative splicing of RNAs transcribed from the human abl gene and from the bcr-abl fused gene. *Cell* 1986; **2**: 277–284.
- [74] SILLABER C, GESBERT F, FRANK DA, SATTLER M, GRIFFIN JD. STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells. *Blood* 2000; **95**: 2118–2125.
- [75] SKORSKI T. BCR/ABL regulates response to DNA damage: the role in resistance to genotoxic treatment and in genomic instability. *Oncogene* 2002; **21**: 8591–604.
- [76] SKORSKI T. Oncogenic tyrosine kinases and the DNA-damage response. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 351–360.
- [77] SKORSKI T, BELLACOSA A, NIEBOROWSKA-SKORSKA M, MAJEWSKI M, MARTINEZ R, CHOI JK, TROTTA R, WLODARSKI P, PERROTTI D, CHAN TO, WASIK MA, TSICHLIS PN, CALABRETTA B. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J* 1997; **16**: 6151–6161.
- [78] SLUPIANEK A, HOSER G, MAJSTEREK I, A BRONISZ, MALECKI M, BŁASIAK J, FISHEL R, SKORSKI T. Fusion Tyrosine Kinases Induce Drug Resistance by Stimulation of Homology-Dependent Recombination Repair, Prolongation of G2/M Phase, and Protection from Apoptosis. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 4189–4201.
- [79] SLUPIANEK A, SCHMUTTE C, TOMBLINE G, NIEBOROWSKA-SKORSKA M, HOSER G, NOWICKI MO, PIERCE AJ, FISHEL R, SKORSKI T. BCR/ABL regulates mammalian recA homologs, resulting in drug resistance. *Mol Cell* 2001; **8**: 795–806.

- [80] SOCOLOVSKY M, FALLON AE, WANG S, BRUGNARA C, LODISH HF. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a<sup>-/-</sup> Stat5b<sup>-/-</sup> mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell* 1999; **98**:181–191.
- [81] SONODA E, SASAKI MS, MORRISON C, YAMAGUCHI-IWAI Y, TAKATA M, TAKEDA S. Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 5166–5169.
- [82] SONODA E, SASAKI MS, BUERSTEDDE JM, BEZZUBOVA O, SHINOHARA A, OGAWA H, TAKATA M, YAMAGUCHI-IWAI Y, TAKEDA S. Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *EMBO J* 1998; **17**: 598–608.
- [83] STIEWE T, PARSSANEDJAD K, ESCHE H, OPALKA B, PUTZER BM. E1A overcomes the apoptosis block in BCR-ABL<sup>-</sup> leukemia cells and renders cells susceptible to induction of apoptosis by chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 2000; **60**: 3957–3964.
- [84] TSUZUKI T, FUJII Y, SAKUMI K, TOMINAGA Y, NAKAO K, SEKIGUCHI M, MATSUSHIRO A, YOSHIMURA Y, MORITA T. Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 6236–6240.
- [85] ZDRAVESKI ZZ, MELLO JA, MARINUS MG, ESSIGMANN JM. Multiple pathways of recombination define cellular responses to cisplatin. *Chem Biol* 2000; **7**: 39–50.
- [86] ZOU X, CALAME K. Signaling pathways activated by oncogenic forms of Abl tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1999; **274**: 18141–18144.

*Redaktor prowadzący – Maria Olszewska*

*Otrzymano: 15.05.2004 r.*

*Przyjęto: 22.06.2004 r.*

*ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź,*

*e-mail: imajst@biol.uni.lodz.pl*



The following text is a highly degraded and mirrored scan of a document. It contains several lines of text that are difficult to decipher due to the quality of the scan. The text appears to be a list or a series of numbered items, possibly a table of contents or a list of references. The words are mostly illegible, but some recognizable words include "Table", "Figure", "Text", and "References". The text is arranged in a vertical column on the page.

## MOLEKULARNE I FIZJOLOGICZNE PODSTAWY FUNKCJONOWANIA ROŚLINNEGO ZEGARA OKOŁODOBOWEGO

### MOLECULAR AND PHYSIOLOGICAL BASES OF CIRCADIAN CLOCK IN PLANTS

Agnieszka ZIENKIEWICZ<sup>1</sup>, Andrzej TRETYN<sup>2</sup>, Jan KOPCEWICZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin, <sup>2</sup>Zakład Biotechnologii,  
Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

*Streszczenie.* Zegar okołodobowy stanowi jedno z najbardziej fascynujących przystosowań do życia na Ziemi. Dzięki wewnętrznemu zegarowi organizmy mogą nie tylko reagować na periodyczne następstwo dnia i nocy, ale również mierzyć długość dnia, będącą wskaźnikiem pór roku. Endogeny zegar generuje rytmy około 24-godzinne. Nastawianie zegara odbywa się głównie poprzez zmiany warunków świetlnych i temperatury o świcie i zmierzchu. Mechanizm odpowiedzialny za generowanie rytmów okołodobowych składa się z trzech głównych elementów: drogi wejścia czynników środowiskowych synchronizujących działanie zegara, wewnętrznego oscylatora, drogi wyjścia w postaci rytmiki procesów fizjologicznych i rozwojowych kontrolowanych przez zegar. Światło stanowi zasadniczy sygnał nastawiający zegar. Wykazano ścisły związek pomiędzy fotoreceptorami i elementami zegara biologicznego u różnych modeli badawczych. U roślin obie rodziny cząsteczek fotoreceptorowych, tj. fitochromów i kryptochromów, biorą udział w transdukcji sygnału świetlnego do oscylatora. Rodzina białek ZTL, FKF1 i LKP2 (zawierających domenę LOV, powtórzony motyw kelch oraz kasetę F-box), jak i nowo zidentyfikowane białka jądrowe GI i ELF3 także biorą udział w przekazywaniu sygnału świetlnego do zegara. Molekularne badania dotyczące wewnętrznego oscylatora u różnych organizmów (np. *Arabidopsis thaliana*, *Neurospora crassa*, *Drosophila melanogaster*) wskazują, że działa on na zasadzie pętli sprzężenia zwrotnego, złożonej z elementów pozytywnych i negatywnych. Białka kodowane przez geny zegara działają jako elementy negatywne, które hamują swoją własną ekspresję poprzez blokowanie czynników transkrypcyjnych, będących elementami pozytywnymi. U roślin najbardziej prawdopodobne elementy oscylatora to: białko TOC1 lub APRR1 – komponent dwuskładnikowego systemu regulacji odpowiedzi (ang. *response regulator*) oraz dwa białkowe czynniki transkrypcyjne wyposażone w domenę MYB - LHY i CCA1. Wykazano, iż roślinny zegar okołodobowy sprawuje kontrolę nad wieloma różnorodnymi procesami fizjologicznymi i rozwojowymi roślin m.in. wzrost komórek, otwieranie aparatów szparkowych, ruchy liści oraz kwitnienie.

*Słowa kluczowe:* *Arabidopsis thaliana*, fotoreceptory, okołodobowe rytmy, oscylator, roślinny zegar okołodobowy.



*Summary:* The circadian clock forms one of the most fascinating adaptations to life on earth. Owing to the internal clock organisms can not only react to the periodical sequence of day and night but can make measure daylength, which is an indicator of the seasons. Endogenous clock creates about 24-h rhythms. The clock is set mainly by the alternations in light and temperature conditions at dawn and dusk. The machinery responsible for generating circadian rhythms is composed of three major components: an input pathway by which environmental cues act to synchronize the clock; the endogenous oscillator; and the output pathway as the rhythmic of physiological and developmental processes controlled by the clock. Light forms the dominant signal in resetting the clock. A close link between the photoreceptors and the clock's components has been demonstrated for different experimental models. In plants both of the photoreceptor molecules families – phytochromes (phy) and cryptochromes (cry) participate in light signal transduction to the oscillator. The ZTL, FKF1 and LKP2 proteins family (which contain LOV domain-, Kelch repeat- and F-box) and the novel nuclear proteins GI and ELF3, have also been implicated in light input to the clock. Molecular studies of the central oscillator from several different organisms (ex. *Arabidopsis thaliana*, *Neurospora crassa*, *Drosophila melanogaster*) indicate that it works as feedback loop consisting of positive and negative elements. Proteins encoded by clock genes act as negative elements that repress their own expression by blocking transcriptional activators that act as positive elements. In plants putative elements of the oscillator are: TOC1 or APRR1 protein, an element of two – component response regulator system and two related MYB transcription factors – LHY and CCA1. It was demonstrated that the circadian clock controls many different physiological and developmental processes in plants a.o. cells elongation, stomatal opening, leaf movement and flowering.

*Key words:* *Arabidopsis thaliana*, circadian clock, circadian rhythms, oscillator, photoreceptors, plants.

## WSTĘP

Rytmiczność w świecie żywym jest zjawiskiem bardzo częstym i dotyczy dużej liczby procesów fizjologicznych, biochemicznych oraz wzrostowo-rozwojowych. Różnego rodzaju rytmy obserwuje się u wszystkich organizmów, począwszy od bakterii [36] na człowieku kończąc [11], a także na różnych poziomach organizacji biologicznej, od poziomu molekularnego do populacji włącznie [37].

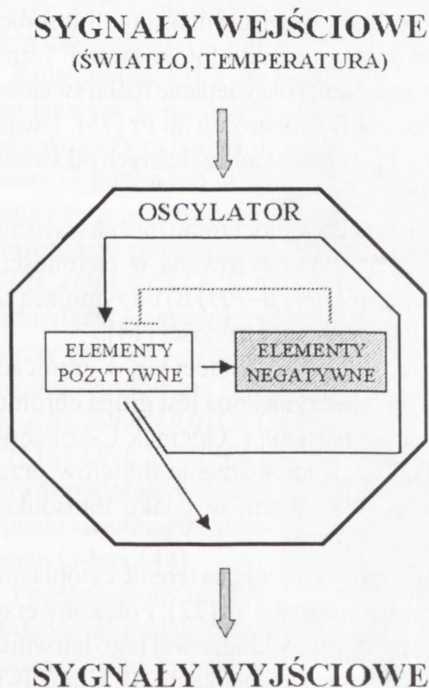
Okresowość procesów biologicznych jest podstawową cechą organizmów żywych, powstałą w wyniku długotrwałego rozwoju filogenetycznego, przystosowującego cykl rozwojowy organizmu do zmian warunków środowiska [37]. Procesy rytmiczne wykazują bardzo szeroki czas trwania, liczony w sekundach (np. dźwięki wydawane przez samce *Drosophila* podczas godów), tygodniach (np. cykle menstruacyjne ssaków naczelnych) lub miesiącach (np. kwitnienie i spoczynek roślin) [65]. Jednakże najczęściej występujące w naturze rytmy są zsynchronizowane z obrotem Ziemi wokół własnej osi i w związku z tym określa się je mianem rytmów dobowych [37]. Ponieważ czas trwania tych rytmów zazwyczaj jest nieznacznie dłuższy lub krótszy niż 24 godziny, stąd rytmy te nazwano okołodobowymi lub cirkadialnymi (łac. *circa* – około, *dies* – dzień).

Rytmy okołodobowe regulowane są przez wewnętrzne zegary komórkowe, których funkcjonowanie może być modulowane przez sygnały środowiskowe, głównie światło i temperaturę. Pierwsze dane literaturowe dotyczące obserwacji rytmów biologicznych pochodzą z 1729 roku, kiedy to francuski astronom Jean Jacques d'Ortous de Mairan wykazał, iż dobowe ruchy liści mimozy zachodzą także po przeniesieniu roślin do nieprzerwanej ciemności [12]. Rytmy okołodobowe u roślin były także przedmiotem

badania Karola Linneusza, który zaobserwował dobowe ruchy płatków kwiatowych i stworzył oparty na tym kryterium zegar kwiatowy, szeregujący gatunki roślin kwitnących ze względu na porę rozchylania się płatków korony. Następne dwa stulecia charakteryzowały się stosunkowo małym zainteresowaniem badaczy rytmicznością u roślin. Przełomem w rozwoju chronobiologii roślin okazały się być prace Erwina Bünninga z 1936 roku. Stworzył on pierwsze teoretyczne podstawy funkcjonowania zegara biologicznego u roślin, głównie w aspekcie kontroli kwitnienia [5].

Jednakże dopiero ostatnie dziesięciolecie stanowi okres intensywnego wzrostu zainteresowania zagadnieniem funkcjonowania zegara biologicznego. Najczęściej wykorzystywane do tego celu modele badawcze to grzyby (*Neurospora crassa*) [23] i zwierzęta (m.in. *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus*) [17]. Do chwili obecnej w komórkach tych organizmów zidentyfikowano liczne białka zegara oraz kodujące je geny. Od kilku lat obserwuje się także znaczący postęp w identyfikacji składników i mechanizmu funkcjonowania roślinnego zegara biologicznego. Największa ilość doniesień dotyczących molekularnych podstaw funkcjonowania zegara okołodobowego pochodzi z badań prowadzonych na modelowej roślinie dnia długiego: rzodkiewniku pospolitym (*Arabidopsis thaliana*). Zsekwencjonowanie genomu tej rośliny [4] umożliwiło prowadzenie badań porównawczych dotyczących genów kodujących składniki zegara, tak pomiędzy roślinami, jak i roślinami i zwierzętami.

Podobieństwo rytmów okołodobowych u różnych gatunków roślin i zwierząt wskazuje na istnienie uniwersalnych zasad funkcjonowania zegara biologicznego u wszystkich



RYCINA 1. Uproszczony model budowy zegara okołodobowego. Sygnały środowiskowe przekazane do wewnętrznego oscylatora modulują ekspresję specyficznych dla niego genów (elementy pozytywne i negatywne), na zasadzie pętli sprzężeń zwrotnych. Generowane przez oscylator rytmy stoją z kolei u podstaw rytmiczności licznych procesów fizjologicznych i rozwojowych organizmu (dokładny opis w tekście)



organizmów (ryc.1). Endogeny mechanizm najogólniej rzecz biorąc składa się z następujących elementów [37]:

- układu związanego z percepcją sygnałów środowiskowych i ich transdukcją do wewnętrznego oscylatora (ang. *input*),
- wewnętrznego oscylatora zdolnego do generowania określonego rytmu,
- układu związanego z przekazywaniem wygenerowanego rytmu do systemów wykonawczych (ang. *output*), kontrolujących rytmiczność określonego procesu (np. ekspresji genów).

## PERCEPCJA I TRANSDUKCJA SYGNAŁÓW ŚRODOWISKOWYCH DO OSCYLATORA

Najważniejszymi czynnikami środowiskowymi wpływającymi na funkcjonowanie zegara okołodobowego u roślin są światło i temperatura [68].

Cykliczne następstwo dnia i nocy, będące wynikiem wirowego ruchu Ziemi jest podstawowym czynnikiem „nastawiającym” (ang. *set, entrain*) roślinny zegar biologiczny. Pierwszym etapem transdukcji sygnału świetlnego do wewnętrznego oscylatora jest jego percepcja przez wyspecjalizowane cząsteczki chromoprotein pełniące funkcje fotoreceptorów, do których zaliczamy: fitochromy i kryptochromy [14]. Odbierają one informacje o zmianach warunków świetlnych w środowisku wzrostu: ilościowych (natężenia, czasu trwania) i jakościowych (składu widma świetlnego) [22].

Fitochromy odpowiedzialne są za pochłanianie światła czerwonego i dalekiej czerwieni. W komórkach fitochromy syntetyzowane są w formie Pr wykazującej maksimum absorpcji światła przy 660 nm. Absorbpcja światła czerwonego prowadzi do fotokonwersji formy Pr fitochromu do Pfr – pochłaniającej daleką czerwień. Z kolei naświetlanie roślin światłem dalekiej czerwieni towarzyszy przekształcanie formy Pfr fitochromu do Pr [75]. Uważa się, że Pfr jest aktywną formą fitochromu, regulującą przebieg wielu zależnych od światła procesów wzrostu i rozwoju roślin [22, 52, 61, 75].

U rzodkiewnika ze względu na okres półtrwania cząsteczek fitochromu można wyróżnić dwie jego pule: labilną (kodowaną przez gen *PHYA*), syntetyzowaną w ciemności i podlegającą szybkiej degradacji na świetle oraz stabilną (*PHYB-PHYE*) utrzymującą się na podobnym poziomie u roślin rosnących na świetle, jak i w ciemności [14].

Fitochromy to chromoproteiny o masie cząsteczkowej wahającej się w granicach od 120 do 130 kDa. Do N-końcowej części tych białek przyłączona jest grupa chromoforowa, która odpowiada za spektralne właściwości barwnika. Odcinek C-końcowy zawiera domeny PAS (ang. *Per-Arnt-Sim*) umożliwiające tworzenie dimerów przez fitochrom i ich interakcje z innymi białkami uczestniczącymi w szlaku transdukcji sygnałów świetlnych [54].

Nieaktywne formy fitochromu labilnego i stabilnego występują na terenie cytoplazmy związane z białkiem PKS1 (ang. *phytochrome kinase substrate 1*) [22]. Fotokonwersja fitochromów z formy Pr do Pfr powoduje aktywację domeny kinazowej tego barwnika prowadzącej do jego autofosforylacji, a następnie do fosforylacji białka PKS1. Umożliwia

to oddysocjowanie cząsteczek fitochromu od PKS1 i ich transport do jądra komórkowego [20]. Proces ten bezpośrednio poprzedza powstawanie odpowiedzi rośliny na działanie światła.

Zakłada się, że przekazanie bodźca świetlnego do oscylatora polega na oddziaływaniu fitochromów z innymi białkami, a interakcje te zachodzą na terenie jądra komórkowego. Najlepiej poznanym pod względem molekularnym wydaje się szlak transdukcji sygnału świetlnego od fitochromu do oscylatora, w którym istotną rolę odgrywa białko PIF3 (ang. *phytochrome interacting factor 3*) [50]. Białko to ma zasadowy motyw helisa-pętla-helisa (bHLH), dzięki czemu wykazuje zdolność bezpośredniego wiązania się z DNA oraz domenę PAS umożliwiającą jego interakcje z fitochromem. Badania *in vitro* wykazały, że białko PIF3 wiąże się z cząsteczkami Pfr fitochromu stabilnego (typu B). Fotokonwersja tego fitochromu do formy nieaktywnej powoduje oddysocjowanie PIF3. W zaproponowanym powyżej szlaku transdukcji zakłada się, że homodimery białka PIF3 są trwale związane z określonymi sekwencjami DNA, pozostają one jednak nieaktywne i nie zmieniają aktywności genu, do którego promotora są przyłączone. Po przejściu fitochromów na teren jądra dochodzi do oddziaływań pomiędzy cząsteczkami fotoreceptorów i białkiem PIF3, co prowadzi do aktywacji genów specyficznych dla PIF3. Zidentyfikowano element regulatorowy znajdujący się w promotorach genów, których aktywność regulowana jest przez czynnik transkrypcyjny PIF3. Elementem tym jest sekwencja zwana G-box spotykana m.in w genach wchodzących w skład zegara biologicznego [44].

Podobieństwo C-końcowych domen PHYA i PHYB wskazuje, że PIF3 może wiązać się z fitochromami obu typów, tj. labilnym i stabilnym. Występowanie wspólnego dla PHYA i PHYB białka wiążącego cząsteczki tych fotoreceptorów wskazuje na możliwość ich współdziałania w indukowanych przez światło szlakach transdukcji sygnałów [53].

Rola białka PIF3 w szlaku transdukcji sygnału świetlnego do wewnętrznego oscylatora w komórkach roślinnych była przedmiotem badań m.in. zespołu P. Quaila [44]. Autorzy ci badali interakcje białka PIF3 z genami, których promotory zawierają kasetę G-box, a ich ekspresja regulowana jest światłem. Do tego celu wykorzystano rośliny ze zredukowanym poziomem białka PIF3, które charakteryzowały się znacznie obniżoną w porównaniu z roślinami dzikiego typu (WT) ekspresją genów *CCA1* (*CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1*) i *LHY* (*LATE ELONGATED HYPOCOTYL*), stanowiących zasadnicze elementy wewnętrznego oscylatora *A. thaliana* (patrz dalej). Istotny przy tym wydaje się fakt, że w przypadku innych genów, których ekspresja również regulowana jest przez światło, np. *SPA1* (*SUPPRESSOR OF PHYTOCHROME A*), *RBCS-1A* (*RIBULOSE - 1,5 - BISPHOSPHATE - CARBOXYLASE*) i *CHS* (*CHALCONE SYNTHASE*), nie obserwowano zmian w poziomie ich ekspresji. Wysoce prawdopodobne wydaje się zatem, że białko PIF3 bierze udział w szlaku transdukcji sygnału świetlnego i aktywuje tylko określoną klasę genów, których promotory zawierają kasetę G-box [44].

Przedstawiony model regulacji genów zegara okołodobowego przez światło stanowi bardzo krótki szlak transdukcji sygnału obejmujący jedynie cząsteczki fotoreceptorowe i jeden czynnik transkrypcyjny.



Inną grupę fotoreceptorów, zaangażowanych w odbiór i transport sygnału do wewnętrznego oscylatora, stanowią kryptochromy 1 i 2 (kodowane przez geny, odpowiednio, *CRY1* i *CRY2*). Poza komórkami roślinnymi, kryptochromy zidentyfikowano także w komórkach zwierzęcych m.in. u muszki owocowej, myszy oraz człowieka. Są to chromoproteiny pochłaniające światło niebieskie i bliski ultrafiolet. Ich część białkowa wykazuje dużą homologię do bakteryjnych fotoliaz; enzymów uczestniczących w procesie naprawy DNA. Udział tych fotoreceptorów w funkcjonowaniu zegara okołodobowego u roślin jest znacznie mniej poznany od fitochromów. Badania prowadzone na mutantach *cry1* i *cry2* *A. thaliana* traktowanych światłem niebieskim o różnym natężeniu wykazały, że mutant *cry1* charakteryzuje się znacznie dłuższym w porównaniu z mutantem *cry2* okresem oscylacji w ekspresji jednego z genów kontrolowanych przez zegar (*CAB-CHLOROPHYLL A/B-BINDING PROTEIN2*) [64]. Wydaje się więc, że białko *CRY2* nie wpływa w istotny sposób na dostrajanie roślinnego zegara okołodobowego. Więcej danych na temat udziału kryptochromów w funkcjonowaniu zegara biologicznego u roślin dostarczyły badania Devlin i Kay [13], prowadzone z wykorzystaniem podwójnych mutantów rzodkiewnika, cechujących się obniżonym poziomem cząsteczek obu typów kryptochromów. Wykazano, że podwójne mutanty *cry1cry2* cechują się znacznie dłuższym okresem oscylacji w ekspresji genu *CAB* niż *cry1*, w świetle niebieskim zarówno o dużej, jak i małej intensywności. Istotne wydaje się porównanie wyników doświadczeń prowadzonych na myszach ze zmutowanymi genami *CRY1*, jak i *CRY2*. Zwierzęta te charakteryzują się całkowitą arytmicznością procesów kontrolowanych przez zegar, co sugeruje, iż geny te są u nich integralną częścią oscylatora [58]. Wydaje się więc, że oba białka kryptochromowe współdziałają w nastawianiu zegara, nie mniej w komórkach roślinnych nie są one prawdopodobnie zasadniczymi elementami wewnętrznego oscylatora.

Dalsze etapy kontrolowanego przez kryptochrom szlaku transdukcji sygnału są słabo poznane. Jednakże wyniki ostatnich badań świadczą o występowaniu współdziałania pomiędzy cząsteczkami kryptochromu z innymi białkami. Przypuszczalnie wynikiem tych oddziaływań są zmiany wewnątrzkomórkowej lokalizacji białek uczestniczących w szlaku transdukcji sygnału świetlnego, jak również zmiany równowagi jonowej, ekspresji określonych genów i innych procesów metabolicznych [42].

Niejasne pozostaje także współdziałanie cząsteczek fitochromów i kryptochromów we wspólnym szlaku transdukcji sygnału świetlnego. Cashmore i wsp. [2] wykazali bowiem bezpośrednie interakcje *PHYA* zarówno z *CRY1*, jak i *CRY2* *in vitro*. Potwierdzono także udział *PHYA* w zależnej od światła fosforylacji *CRY1*, przy czym *PHYA* działa tutaj jako fotoreceptor, a *CRY1* jest dalszym elementem tego samego szlaku transdukcji sygnału. Uzupełnienie przytoczonych wyników stanowić mogą także doniesienia o współwystępowaniu obu opisywanych fotoreceptorów na terenie jąder komórkowych siewek rzodkiewnika eksponowanych na światło [13]. Podobną lokalizację jądrową opisano także dla *CRY2* i *PHYB*, co również może sugerować interakcje pomiędzy tymi dwoma fotoreceptorami [45].

Wyniki badań z użyciem różnych mutantów rzodkiewnika wskazują ponadto na udział białek z rodziny *ZTL/FKF/LKP* w szlaku transdukcji sygnału świetlnego do oscylatora. Rośliny ze zmutowanym genem *ZTL* (*ZEITLUPE*) charakteryzują się

wydłużeniem okresu występowania różnorodnych rytmów oraz opóźnionym czasem kwitnienia [35, 66]. Z kolei nadekspresja białka LKP2 (*LOV kelch protein 2*) powoduje arytmiczność w oscylacjach poziomu transkryptów zarówno na ciągłym świetle, jak i w ciemności oraz opóźnioną fotoperiodyczną indukcją kwitnienia [63]. Delecja genu *FKF1* (*FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F BOX*) wpływa na okołodobowe oscylacje aktywności transkrypcyjnej różnych genów, w tym również samego genu *FKF1*, inaczej niż w przypadku genów *ZTL* i *LKP2* [55]. Wszystkie geny rodziny *ZTL* charakteryzują się jednoczesną obecnością specyficznych sekwencji, niespotykanych razem u innych genów z rodziny F-box. Są to:

- domena LOV będąca specyficzną klasą motywu PAS, odpowiedzialna za interakcje białko-białko i wiązanie grupy chromoforowej do niektórych fotoreceptorów [25],
- domena F-box zaangażowana w procesy ubikwitynacji i późniejszej degradacji białek [6],
- domena kelch – występująca w sześciu powtórzeniach, zaangażowana w interakcje białko-białko [1].

Najlepiej poznanym pod względem biochemicznym i molekularnym białkiem opisywanej rodziny jest *ZTL*. Istnieją różne poglądy na temat jego funkcji. Wykazano wpływ *ZTL* na długość okresu rytmów inicjowanych pod wpływem światła czerwonego i niebieskiego, co może wskazywać na udział tego białka w przekazywaniu sygnału świetlnego zarówno od fitochromu, jak i kryptochromu. Badania *in vitro* potwierdziły interakcje białka *ZTL* z cząsteczkami PHYB, jak i CRY1 [30]. Istnieją również dane dotyczące roli białek rodziny *ZTL* jako nowej klasy fotoreceptorów. Analiza sekwencji motywu LOV tych białek potwierdziła jego homologię względem domen wiążących flawinową (FMN) grupę chromoforową, występujących w białkach: NPH1 (receptor światła niebieskiego u *Arabidopsis*) [8] i PHY3 (fotoreceptor zidentyfikowany u paproci *Adiantum*) [57]. Wysoki stopień homologii domeny LOV białek rodziny *ZTL* ujawniono także względem białka WC-1 (*white colar 1*), funkcjonującego jako czynnik transkrypcyjny pośredniczący w odpowiedzi na światło niebieskie i będący elementem zegara u *Neurospora crassa* [10]. Oprócz udziału w przekazywaniu sygnału świetlnego do oscylatora białka z rodziny *ZTL* pełnią również istotną rolę w regulowanej światłem proteolitycznej degradacji białek związanych z zegarem okołodobowym [34].

Istotną rolę w przekazywaniu sygnału świetlnego do oscylatora wykazano ponadto dla produktów dwóch genów, których ekspresja jest regulowana przez zegar, tj. *ELF3* (*EARLY FLOWERING 3*) oraz *GI* (*GIGANTEA*). W warunkach ciągłego oświetlenia mutacja genu *ELF3* powoduje bowiem arytmie takich procesów fizjologicznych, jak kwitnienie i wydłużanie hypokotyli oraz nierytmiczną ekspresją genów *CAB* i *CCR2* (*COLD AND CIRCADIAN REGULATED*) [9]. Co istotne, w przypadku *CCR2* rytmiczna ekspresja tego genu utrzymuje się przynajmniej przez pięć dni w ciemności, co sugeruje, że aktywność białka *ELF3* nie jest konieczna do funkcjonowania endogenego zegara [9]. Na tej podstawie zaproponowano udział *ELF3* w przekazywaniu sygnału świetlnego do oscylatora. Badania genetyczne, potwierdzają współdziałanie białka *ELF3* z PHYB [62], wskazując, że *ELF3* działa jako negatywny modulator



aktywności PHYB. Potwierdzeniem tej hipotezy może być fakt, że nadekspresja *ELF3* powoduje wydłużenie długości okresu rytmu oraz jednocześnie osłabienie wpływu pulsów światła czerwonego na dostrajanie zegara [9]. Utrata funkcji opisywanego białka u mutantów *elf3* znacznie zwiększa ich wrażliwość na sygnały świetlne [49]. Podsumowując, jest wysoce prawdopodobne, że białko ELF3 pełni funkcję represora, który blokuje wejście sygnału świetlnego do oscylatora [51]. Upośledzenie funkcji drugiego z wymienionych genów – *GI*, objawia się między innymi brakiem rytmiczności ruchów liści, jak również zaburzeniami ekspresji różnorodnych genów regulowanych przez zegar, w tym samego genu *GI* [19]. Skrócenie okresu rytmu jest mniej wyraźne u roślin rosnących w warunkach stałej ciemności aniżeli w stałym świetle, co sugeruje udział białka *GI* w szlaku transdukcji sygnału świetlnego do zegara [59]. Ponadto zaburzenia w hamowaniu wzrostu hypokotyli u mutantów *gi*, występujące jedynie w świetle czerwonym, pozwalają przypuszczać, że białko *GI* podobnie jak ELF3 jest elementem szlaku transdukcji kontrolowanego przez PHYB [29]. Rośliny z niefunkcyjnym białkiem *GI* wykazują ponadto zaburzenia w procesie elongacji hypokotyli, charakterystyczne dla fenotypów *phyB*. Uzyskane wyniki świadczą o istotnej roli *GI* w fitochromowym (PHYB) łańcuchu transdukcji sygnału do zegara [48].

Równie silnym, co światło, bodźcem środowiskowym wpływającym na procesy rozwojowe roślin jest temperatura. Jej udział w generowaniu rytmów okołodobowych roślin jest znacznie słabiej poznany niż wpływ światła. Jednakże dowiedziono, że cykliczne zmiany temperatury wpływają na oscylacje m.in. w ekspresji genu *CAB* u *Arabidopsis*. Pulsowe traktowanie tych roślin niską temperaturą objawia się każdorazowym nastawianiem rytmiki akumulacji mRNA genów *CAB* oraz *CCR2* [39]. Z kolei skok temperatury z 4 do 22°C, jednoznaczny z przerwaniem procesu stratyfikacji, nie wpływa na funkcjonowanie zegara u bardzo młodych siewek, co pozwala przypuszczać, że nie wykazują one w tym stadium rozwojowym wrażliwości na istotne zmiany temperatury. Aktualnie dostępne wyniki, dotyczące wpływu temperatury na generowanie rytmów u roślin, są jeszcze bardzo fragmentaryczne i z pewnością wymagają dalszych badań zarówno na poziomie molekularnym, jak i fizjologicznym.

## MOLEKULARNY MECHANIZM DZIAŁANIA WEWNĘTRZNEGO OSCYLATORA

Pod pojęciem oscylatora rozumiemy tę część zegara okołodobowego, która jest odpowiedzialna za generowanie różnorodnych rytmów biologicznych. Ostatnia dekada charakteryzowała się wzrostem zainteresowania identyfikacją elementów stanowiących kluczowe komponenty oscylatora. Z jednej strony ustalono, że wspólną cechą elementów „maszyny” generującej rytmy okołodobowe zarówno u roślin, jak i zwierząt jest obecność wspomnianej już domeny PAS odpowiedzialnej za interakcje białko-białko. Z drugiej strony wykazano zasadniczą różnicę pomiędzy oscylatorem roślinnym i zwierzęcym ze względu na skład molekularny tego systemu. Badania genetyczne nie

dowodły bowiem istnienia wyraźnej homologii pomiędzy sekwencją genów wchodzących w skład oscylatora u *Arabidopsis* i innych organizmów, jak *Neurospora crassa* czy *Drosophila melanogaster* [4].

Generalnie mechanizm działania oscylatora polega na współlistnieniu powiązanych ze sobą na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego tzw. elementów pozytywnych i negatywnych. Elementy pozytywne indukują ekspresję genów kodujących białka, pełniące rolę elementów negatywnych. Cząsteczki te wpływają z kolei hamująco na ekspresję genów kodujących elementy pozytywne. W rezultacie elementy negatywne, bezpośrednio lub pośrednio, hamują ekspresję własnych genów, co pozwala na generowanie rytmicznych wahań ekspresji genów oscylatora i realizację procesów leżących u podstaw rytmiki okołodobowej (ryc. 1)[79].

Doświadczenia prowadzone na mutantach *Arabidopsis* umożliwiły poznanie molekularnej organizacji wewnętrznego oscylatora tej rośliny. Wykazano, że co najmniej trzy geny i ich produkty zaangażowane są w generowaniu rytmów okołodobowych. Do genów tych należą: *APRR1/TOC1* (*ARABIDOPSIS PSEUDO RESPONSE REGULATOR 1/TIMING OF CAB 1*), *LHY* (*LATE ELONGATED HYPOCOTYL*) oraz *CCA1* (*CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1*) [28].

Rolę genu *APRR1/TOC1* w funkcjonowaniu oscylatora wykazano podczas obserwacji mutantów *toc1*, które cechuje m.in. skrócenie okresu rytmu takich procesów, jak transkrypcja genów *CAB2* i *CCR2* [39] oraz ruchy liści i aparatów szparkowych [64]. Zmiany te są niezależne od natężenia światła i utrzymują się również w całkowitej ciemności, co sugeruje, że białko *APRR1/TOC1* nie jest częścią szlaku transdukcji sygnału świetlnego do zegara, ale może stanowić element wewnętrznego oscylatora. Strayer i wsp. [70] wykazali ponadto, że poziom mRNA genu *APRR1/TOC1* oscyluje w ciągłym świetle, osiągając szczyt pod koniec dnia.

W związku z tym, że u mutantów *toc1* okres tych oscylacji jest krótszy niż u roślin typu dzikiego, uważać można, że białko *APRR1/TOC1* kontroluje swoją własną ekspresję na zasadzie sprzężenia zawrotnego. Eksperymentalnie wykazano, iż nadekspresja genu *APRR1/TOC1* objawia się zniesieniem oscylacji wielu genów będących pod kontrolą zegara, w tym także *CCA1* i *LHY*.

*APRR1/TOC1* należy do rodziny genów *APRR* (*ARABIDOPSIS PSEUDO RESPONSE REGULATOR*) obejmującej 6 przedstawicieli (*APRR1*, 2, 3, 5, 7 i 9) [77]. Poziom mRNA pięciu z nich, z wyjątkiem *APRR2*, oscyluje w rytmie okołodobowym (patrz dalej). *APRR1/TOC1* koduje białko jądrowe, charakteryzujące się obecnością „domeny odbiorczej” (ang. *receiver domain*) spotykanej również w białkowych regulatorach odpowiedzi, funkcjonujących w bakteryjnych dwuskładnikowych układach transdukcji [78]. Drugim specyficznym motywem występującym w C-końcowej części białka *APRR1/TOC1* jest sekwencja CCT, obecna również w białkach *CONSTANS* i *CONSTANS-like*, pełniących rolę czynników transkrypcyjnych [70]. Promotor genu *APRR1/TOC1* charakteryzuje się także obecnością sekwencji określonej terminem EE (*EVENING ELEMENT*) o długości 9 par zasad (AAAATATCT). Motyw ten zidentyfikowano także w promotorach kilkudziesięciu innych genów, których ekspresja osiąga szczyt pod koniec dnia [27]. Białko *APRR1/TOC1* wchodzi w interakcję z



białkiem PIF3, co sugeruje udział APRR1/TOC1 w regulacji wewnętrznego oscylatora pod wpływem docierającego do niego sygnału świetlnego [43]. Wykazano także, że białko APRR1/TOC1 związane jest z czynnikiem ABI3 (ang. *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3*), co wskazuje na związek APRR1/TOC1 ze szlakiem transdukcji sygnału kwasu absycynowego (ABA) do zegara i/lub generowaniem jego odpowiedzi na ten sygnał [40].

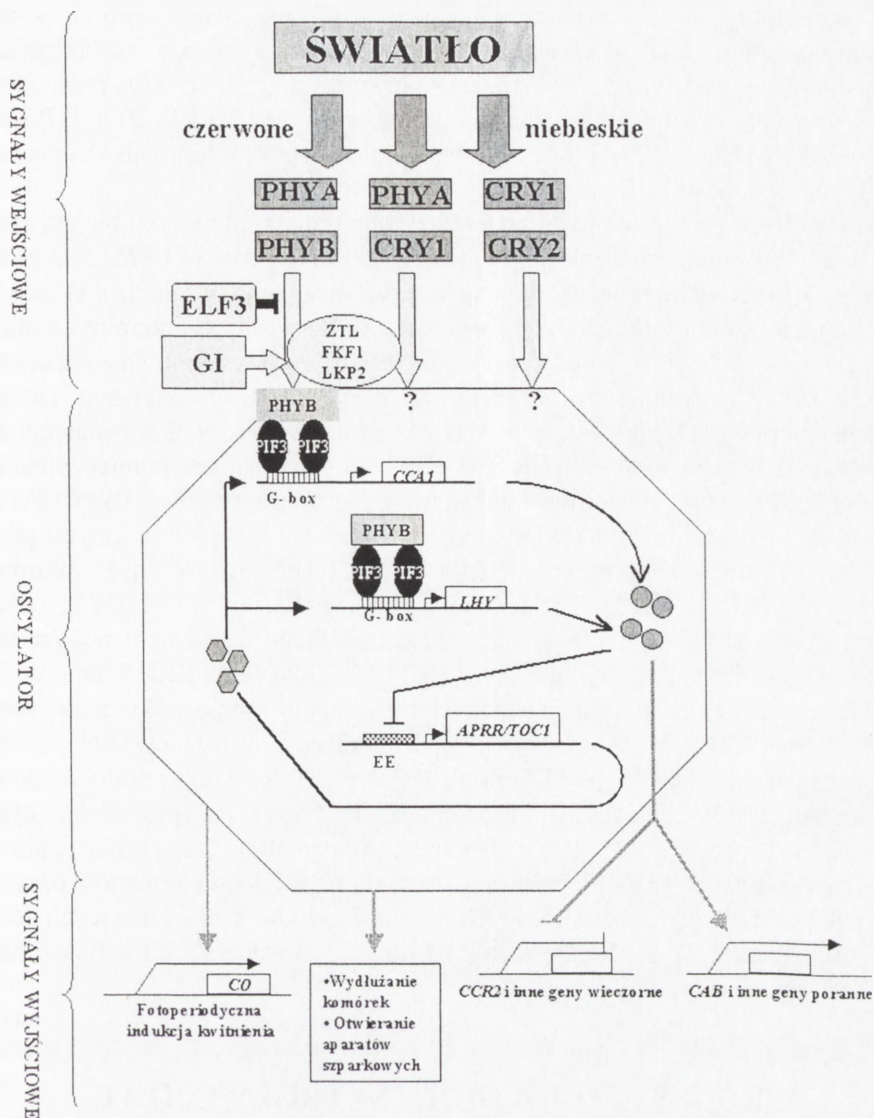
Dwa kolejne składniki wewnętrznego oscylatora w komórkach roślinnych to białka LHY i CCA1. Są to czynniki transkrypcyjne charakteryzujące się obecnością pojedynczej domeny Myb, która w zidentyfikowanych u zwierząt czynnikach transkrypcyjnych występuje zazwyczaj w trzech powtórzeniach. Potrójny motyw Myb tworzy domenę helisa-zwrot-helisa, wiążącą specyficzne elementy promotorowe wielu genów [31].

Rośliny z nadekspresją genów *LHY* lub *CCA1* wykazują arytmiczność różnorodnych procesów regulowanych przez zegar m.in. oscylacji poziomu mRNA genów *CAB2*, *CAT3* (*CATALAZE3*), *CCR2* [76], ruchów liści [69]. Mutanty *cca1* charakteryzują się skróconym okresem oscylacji poziomu mRNA genów regulowanych zegarem, jednakże zachowują rytmiczność ich ekspresji [24]. Podobne cechy obserwowano u mutantów *lhy*. Z kolei u podwójnego mutantu (*cca1/lhy*) obserwuje się arytmiczność ruchu liści oraz ekspresji licznych genów [67]. Wyniki te wskazują na istotną rolę białek LHY i CCA1 w funkcjonowaniu wewnętrznego oscylatora u rzodkiewnika.

Wyniki badań Strayer i wsp. [70] wskazują na udział białek APRR1/TOC1, LHY i CCA1 w tworzeniu wspólnej pętli sprzężenia zwrotnego. Zaobserwowano, że różnica pomiędzy okresem największej akumulacji transkryptów genu *APRR1/TOC1* oraz genów *LHY* i *CCA1* wynosi 12 godzin. Sugeruje to, że białka CCA1 i LHY pełnią rolę represorów genu *APRR1/TOC1*. Stwierdzono, iż nadekspresja genów *LHY* i *CCA1* powoduje niski, ale stały poziom transkryptów *APRR1/TOC1* [3]. Z kolei u roślin ze zmutowanym genem *APRR1/TOC1* dochodzi do silnej redukcji poziomu mRNA genów *LHY* i *CCA1*. Prawdopodobne jest zatem, że białko APRR1/TOC1 działa jako pozytywny regulator tych genów [3].

Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowano model działania endogennego oscylatora *Arabidopsis* (ryc. 2). O świcie, w wyniku interakcji aktywnej formy PHYB z czynnikiem transkrypcyjnym PIF3 (trwale związanym z kasetą G-box promotorów genów *LHY* i *CCA1*) dochodzi do indukcji transkrypcji tych genów. Dwie godziny po pojawieniu się pierwszych transkryptów obserwowany jest szczyt akumulacji białek LHY i CCA1 w cytoplazmie. Po przedostaniu się na teren jądra komórkowego wspomniane czynniki transkrypcyjne wiążą się do sekwencji EE promotora genu *APRR1/TOC1*, powodując hamowanie jego ekspresji w ciągu dnia. Spadek poziomu białka APRR1/TOC1 wpływa z kolei na obniżenie aktywności genów *LHY* i *CCA1*, co w konsekwencji zmniejsza pulę białek przez nie kodowanych. Niski poziom LHY i CCA1, występujący o zmierzchu, pozwala na wznowienie transkrypcji genu *APRR1/TOC1*.

W ciągu nocy następuje wzrost ilości białka APRR1/TOC1, które wchodząc w interakcję z PIF3, jak i PFL1 (*PIF3-like*) [43] umożliwiają ponowną aktywację transkrypcji genów *LHY* i *CCA1* wraz ze wschodem słońca [28]. Białka LHY i CCA1 jednocześnie stymulują ekspresję licznych tzw. genów porannych (ze szczytem ekspresji



RYCINA 2. Uproszczony schemat zegara okołodobowego u *Arabidopsis thaliana*. Bodziec świetlny odbierany przez cząsteczki fotoreceptorowe przekazywany jest za pośrednictwem białek szlaku transdukcji sygnału do oscylatora, gdzie moduluje ekspresję genów oscylatora. Białkowe produkty genów oscylatora funkcjonujące jako czynniki transkrypcyjne wpływają na ekspresję genów oscylatora na zasadzie pętli sprzężenia zwrotnego, jak również regulują aktywność innych genów niezwiązanych z oscylatorem. Ostatecznym efektem oscylacji na poziomie molekularnym jest rytmiczność procesów wzrostowo-rozwojowych rośliny (dokładny opis w tekście)

o świcie) np. *CAB* i hamują transkrypcję tzw. genów wieczornych (ze szczytem ekspresji wieczorem) m.in. *CCR2* [7].

Wiele prowadzonych obecnie badań koncentruje się na określeniu roli i ewentualnego związku białek z rodziny APRR z zegarem okołodobowym *Arabidopsis*. Ekspresja



genów kodujących te białka podlega kontroli zegara okołodobowego na poziomie transkrypcji. Akumulacja mRNA genów *APRR* rozpoczyna się wraz ze wschodem słońca i zachodzi w 2–3-godzinnych przedziałach począwszy od genu *APRR9*, przez *APRR7*, 5, 3. Jako ostatni o zmierzchu pojawia się transkrypt genu *APRR1/TOC1*. Postuluje się w związku z tym, że nie tylko *APRR1/TOC1*, ale także pozostałe białka z opisywanej rodziny mogą stanowić istotną część oscylatora [46].

Okołodobowe oscylacje, zarówno na poziomie transkryptów jak i białek, charakteryzują również homologiczne względem *CCA1* i *LHY* geny *REVEILLE (RVE)*. Ich nazwa (z ang. pobudka) wynika z ich największej ekspresji o wschodzie słońca. Fakt istnienia takiej rodziny białek stawia pytania dotyczące natury interakcji pomiędzy nimi i ich wpływu na funkcjonowanie sprzężeń zwrotnych wewnątrz oscylatora [21].

Intensywnie badanym aspektem działania oscylatora u rzodkiewnika jest także fosforylacja głównych białek zegara. Badania prowadzone z wykorzystaniem drożdżowego systemu dwuhybrydowego ujawniły istnienie interakcji pomiędzy białkiem *CKB3* (stanowiącym regulatorową podjednostkę  $\beta$  kinazy kazeinowej II) z *CCA1* [72]. Badania *in vitro* wykazały także interakcje białka *CCA1* z dwoma innymi podjednostkami  $\beta$  kinazy kazeinowej (*CKB1* oraz *CKB2*), jak również dwoma jej podjednostkami  $\alpha$  (*CKA1* i *CKA2*). Zadaniem kinazy kazeinowej II (*CK2*) jest m.in. fosforylacja białka *CCA1* umożliwiająca wiązanie się tego czynnika transkrypcyjnego z DNA. Dowiedziono także, że enzym ten fosforyluje białko *LHY in vitro* [73]. Nadekspresja *CKB3* objawia się u badanych roślin między innymi skróceniem okresu rytmu poziomu mRNA genów *LHY* i *CCA1*, jak i czterech innych genów kontrolowanych przez zegar, tj. *CAB*, *CCR2*, *CAT2* oraz *CAT3*. Opisane wyniki są podobne do tych, jakie uzyskano w wyniku redukcji poziomu białka *CCA1*. Przypuszczalnie cyklaza kazeinowa II wpływa na działanie wewnętrznego oscylatora przez regulację poziomu białka *CCA1*, a także *LHY* [47]. Inną ważną rolą fosforylacji elementów oscylatora przez *CK2* może być przekształcanie ich w substraty dla białek, mających domenę F-box (np. *ZTL*, *FKF* i *LKP2*), zaangażowanych w procesy ubikwityno-zależnej degradacji białek zegara [48].

## PROCESY FIZJOLOGICZNE I ROZWOJOWE KONTROLOWANE PRZEZ ZEGAR OKOŁODOBOWY

Zegar okołodobowy, jak już podkreślono, kontroluje znaczną liczbę procesów wzrostowo-rozwojowych zarówno u zwierząt, jak i roślin. Kontrola ta odbywa się na poziomie transkrypcji określonych genów i/lub syntezy kodowanych przez nie białek, jak również modyfikacji posttranskrypcyjnych i posttranslacyjnych, a ponadto poprzez regulację przepuszczalności błon komórkowych oraz regulację cyklu komórkowego. Ostatecznym wynikiem tych wszystkich procesów jest kontrola reakcji organizmów na określone bodźce środowiskowe.

Okołodobowe oscylacje u roślin wykazano dla wielu zdarzeń na poziomie komórkowym, takich jak: ekspresja określonych genów m.in. *CAB*, *CAT2*, *CAT3*, cytozolowe stężenie jonów wapniowych i inne [33]. Na poziomie organizmu rytmy okołodobowe dotyczą m.in. otwierania aparatów szparkowych, ruchu liści i liścieni oraz wzrostu hypokotyli [15]. W końcu, zegar biologiczny pośredniczy w kontroli rytmiczności procesów rozwojowych rośliny (niewykazujących oscylacji okołodobowych), takich jak kwitnienie czy spoczynek pąków kwiatowych [74].

W czasie ostatniej dekady poznano wiele nowych genów, których ekspresja wykazuje rytmiczność w ciągu doby. Zidentyfikowano także geny, których ekspresja regulowana jest światłem, a ich produkty wykazują ścisły związek z procesem fotosyntezy. Są to m.in. białka wiążące chlorofil a/b kodowane przez geny należące do rodziny *CAB*, których szczyt ekspresji przypada na pierwsze godziny po wschodzie słońca. Geny należące do tej grupy, kodują m.in: małą podjednostkę karboksylazy 1,5 bisfosforubulozy (RuBP) [60] oraz funkcjonującą w komórkach roślin CAM kinazę karboksylazy fosfoenolopirogronianowej (PEPC). Podwyższona ekspresja ostatniego z wymienionych genów zachodzi o północy w okresie największego zapotrzebowania na ten enzym w komórkach [56]. Regulacyjny udział zegara biologicznego potwierdzono także dla ekspresji innych niezwiązanych z fotosyntezą genów. Przykładem może być tutaj rodzina genów kodujących katalazy *CAT*. Interesujący jest fakt, że szczyty ekspresji genów *CAT2* i *CAT3* u *Arabidopsis* zachodzą na przemian co 12 godzin. Prawdopodobnie ta odzwierciedla zapewne różnorodną rolę produktów opisywanych genów w metabolizmie rośliny [65].

W komórkach *Arabidopsis* stwierdzono także dobowe rytmy cytozolowego oraz chloroplastowego stężenia jonów wapnia, zarówno w ciągłym świetle jak i w stałej ciemności [32]. Regulacja stężenia jonów  $Ca^{2+}$  poprzez zegar okołodobowy odbywa się prawdopodobnie za pośrednictwem enzymów zależnych od  $Ca^{2+}$ , takich jak kinazy białkowe lub też białek wiążących wapń (np. kalmodulina), których poziom może być regulowany przez oscylator [65]. Kontrola zegara okołodobowego nad gospodarką jonową komórek może również pośrednio dotyczyć takich zjawisk fizjologicznych, jak zamykanie i otwieranie aparatów szparkowych oraz ruchy liści. Molekularne podłoże tych procesów nie zostało dotychczas poznane jednakże potwierdzono istnienie oscylacji w aktywności niektórych białek błonowych odpowiedzialnych za transport jonów przez błony komórkowe, np.  $H^+$  ATPaza [38].

Jak powszechnie wiadomo, indukcja kwitnienia wielu roślin jest bardzo wyraźnie powiązana z czasem trwania i periodycznym następstwem okresów światła i ciemności w cyklach okołodobowych [37]. Już w 1936 roku Bünning zakładał, że fotoperiodyzm jest związany z funkcjonowaniem oscylatora generującego rytmy okołodobowe [5]. Wiadomo także, że wszelkie mutacje zakłócające rytmiczną ekspresję genów wpływają na czas kwitnienia [41]. Potwierdzono to licznymi badaniami mutantów u *Arabidopsis*. Poza wspomnianymi wcześniej wynikami badań dotyczących genów *ELF3* czy *GI* wykazano także związek pomiędzy ekspresją genu *CO* (*CONSTANS*), oscylatorem oraz fotoperiodyczną indukcją kwitnienia. Ponieważ mutanty *elf3* charakteryzują się wczesnym kwitnieniem i podwyższonym poziomem ekspresji genu *CO*, a rośliny z nadekspresją genu *LHY* wykazują zredukowaną ekspresję *CO* i opóźniony czas



kwitnienia, to sądzić można, że gen *CO* odgrywa ważną rolę pośrednika pomiędzy endogennym zegarem i indukcją kwitnienia [71]. U roślin typu dzikiego ekspresja genu *CO* wykazuje rytmikę okołodobową, z maksimum w nocy, jednakże ten wzór ekspresji regulowany jest fotoperiodycznie. W warunkach dnia długiego poziom mRNA genu *CO* jest wysoki wczesnym rankiem, po czym zmniejsza się w ciągu dnia, by ponownie wzrosnąć w godzinach nocnych. W warunkach dnia krótkiego natomiast obserwuje się stosunkowo małą akumulację transkryptów *CO* po wschodzie słońca i jej późniejszy wzrost podczas nocy. W związku z tym uważa się, że regulacja ekspresji genu *CONSTANS* zachodzi na poziomie potranskrypcyjnym i jest regulowana przez światło. Zatem jedynie warunki dnia długiego zapewniają wystarczająco długą dostępność sygnału świetlnego, wymaganą do syntezy białka *CO*, a pośrednio indukcji kwitnienia. Białko *CO* jest bowiem czynnikiem transkrypcyjnym aktywującym transkrypcję docelowego genu *FLT* (*FLOWERING LOCUS T*), bezpośrednio odpowiedzialnego za indukcję kwitnienia [28].

## PODSUMOWANIE

W ciągu ostatnich 10 lat wiedza na temat funkcjonowania komórkowego mechanizmu odpowiedzialnego za regulację rytmów okołodobowych znacznie się poszerzyła. Rozwój metod uzyskiwania mutantów oraz techniki molekularne zaowocowały identyfikacją kilkudziesięciu genów pośrednio lub bezpośrednio zaangażowanych w mechanizm zegara okołodobowego. Tylko w latach 2002–2003 wykryto trzy nowe geny: *ELF4* (*EARLY FLOWERING 4*) [16], *TIC* (*TIME FOR COFFEE*) [26] i *TEJ* (gen kodujący glikohydrolazę poli (ADP-rybozy) [18], które odgrywają ważną rolę w mechanizmie funkcjonowania wewnętrznego oscylatora. Wysoce prawdopodobne jest zatem, że przedstawiony w niniejszej pracy model budowy i działania roślinnego zegara okołodobowego ulegnie w niedługim czasie znacznym modyfikacjom. Wiele pytań dotyczących natury zegara nadal pozostaje bez odpowiedzi. Dotychczas nie ustalono także, czy w każdej komórce funkcjonuje jeden czy wiele zegarów, czy wszystkie komórki organizmu wymagają funkcjonowania zegara oraz czy istnieje synchroniczność w działaniu zegara na poziomie tkankowym. Uzyskanie odpowiedzi na te i wiele innych pytań wymaga dalszych badań zarówno fizjologicznych, jak i molekularnych.

## LITERATURA

- [1] ADAMS J, KELSO R, COOLEY L. The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function. *Trends Cell Biol* 2000; **10**: 17–24.
- [2] 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.
- [3] ALABADI D, OYAMA T, YANOVSKY MJ, HARMON FG, MAS P, KAY SA. Reciprocal regulation between *TOC1* and *CCA1/LHY* within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* 2001; **293**: 880–883.

- [4] *ARABIDOPSIS* GENOME INITIATIVE. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 2000; **408**: 796–815.
- [5] BÜNNING E. Die endogene Tagesrhythmik als Grundlage der photoperiodischen Reaktion. *Ber Dtsch Bot Ges* 1936; **54**: 590–607.
- [6] CALLIS J, VIERSTRA RD. Protein degradation in signaling. *Curr Opin Plant Biol* 2000; **3**: 381–386.
- [7] CARRE IA, KIM JY. MYB transcription factors in the *Arabidopsis* circadian clock. *J Exp Bot* 2002; **53**: 1551–1557.
- [8] CHRISTIE JM, SALOMON M, NOZUE K, WADA M, BRIGGS WR. LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 8779–8783.
- [9] COVINGTON MF, PANDA S, LIANG LIU X, STRAYER CA, WAGNER DR, KAY SA. ELF3 modulates resetting of the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2001; **13**: 1305–1315.
- [10] CROSTHWAITE SK, DUNLAP JC, LOROS JJ. *Neurospora wc-1* and *wc-2*: transcription, photoresponses, and the origins of circadian rhythmicity. *Science* 1997; **276**: 763–769.
- [11] CYMBOROWSKI B. Geny zegara biologicznego. *Kosmos* 1999; **48**: 43–51.
- [12] de MAIRAN JJ. Observation botanique. *Historie de l'Academie Royale des Science* 1729: 35–36.
- [13] DEVLIN PF, KAY SA. Cryptochromes are required for Phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell* 2000; **12**: 2499–2509.
- [14] DEVLIN PF. Signs of the time: environmental input to the circadian clock. *J Exp Bot* 2002; **53**: 1535–1550.
- [15] DOWSON-DAY MJ, MILLAR AJ. Circadian dysfunction causes aberrant hypocotyl elongation patterns in *Arabidopsis*. *Plant J* 1999; **17**: 63–71.
- [16] DOYLE MR, DAVIS SJ, BASTOW RM, McWATTERS HG, KOZMA-BOGNAR L, NAGY F, MILLAR AJ, AMASINO RM. The *ELF4* gene controls circadian rhythms and flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 2002; **419**: 74–77.
- [17] DUNLAP JC. Molecular bases for circadian clock. *Cell* 1999; **96**: 271–290.
- [18] ERIKSSON ME, MILLAR AJ. The circadian clock. A plant's best friend in a spinning world. *Plant Physiol* 2003; **132**: 732–738.
- [19] FOWLER S, LEE K, ONOUCHI H, SAMACH A, RICHARDSON K, MORRIS B, COUPLAND G, PUTE-TERIL J. *GIGANTEA*: a circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in *Arabidopsis* and encodes a protein with several membrane-spanning domains. *EMBO J* 1999; **18**: 4679–4688.
- [20] FRANKHAUSER C, YEY KC, 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.
- [21] FRANKHAUSER CH, STAIGER D. Photoreceptors in *Arabidopsis thaliana*: light perception, signal transduction and entrainment of the endogenous clock. *Planta* 2002; **216**: 1–16.
- [22] FRANKOWSKI K, KĘSY J, KOPCEWICZ J. Fitochrom i droga transdukcji światła. *Post Biochem* 2001; **47**: 184–191.
- [23] FROEHLICH AC, PREGUERIO A, LEE K, DENAULT D, CIOLOT H, NOWROUSIAN M, LOROS JJ, DUNLAP JC. The molecular workings of the *Neurospora* biological clock. *Novartis Found Symp* 2003; **253**: 184–198.
- [24] GREEN RM, TOBIN EM. Loss of the circadian clock-associated protein 1 in *Arabidopsis* results in altered clock-regulated gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 4176–4179.
- [25] GU YZ, HOGENESCH JB, BRADFIELD CA. The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000; **40**: 519–561.
- [26] HALL A, BASTOW RM, DAVIS SJ, HANANO S, McWATTERS HG, HIBBERD V, DOYLE MR, SUNG S, HALLIDAYKJ, AMASINO RM. The *TIME FOR COFFEE* gene maintains the amplitude and timing of *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell* 2003; **15**: 2719–2729.
- [27] HARMER SL, HOGENESCH JB, STRAUME M, CHANG HS, HAN B, ZHU T, WANG X, KREPS JA, KAY SA. Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* 2000; **290**: 2110–2113.
- [28] HAYAMA R, COUPLAND G. Shedding light on the circadian clock and the photoperiodic control of flowering. *Curr Opin Plant Biol* 2003; **6**: 13–19.
- [29] HUQ E, TEPPERMAN JM, QAIL PH. *GIGANTEA* is nuclear protein involved in phytochrome signaling in *Arabidopsis*. *Plant Biol* 2000; **97**: 9789–9794.
- [30] JARILLO JA, CAPEL J, TANG RH, YANG HQ, ALONSO JM, ECKER JR, CASHMORE AR. An *Arabidopsis* circadian clock component interacts with both CRY1 and phyB. *Nature* 2001; **410**: 487–490.



- [31] JIANG C, GU J, CHOPRA S, GU X, PETERSON T. Ordered origin of the typical two- and three repeat Myb genes. *Gene* 2004; **326**: 13–22.
- [32] JOHNSON CH, KNIGHT M, KONDO T, MASSON P, SEDBROOK J, HALEY A, TREWAVAS A. Circadian oscillations of cytosolic and chloroplastic free calcium in plants. *Science* 1995; **269**: 1863–1865.
- [33] JOHNSON CH, KNIGHT M, TREWAVAS A, KONDO T. A clock work green: circadian programs in photosynthetic organisms. W: Lumsden PJ, Millar AJ Biological Rhythms and Photoperiodism in Plants. BIOS Scientific Publishers, Oxford 1998: 1–34.
- [34] KIM WY, GENG R, SOMERS DE. Circadian phase-specific degradation of the F-box protein ZTL is mediated by the proteasome. *Plant Biol* 2003; **100**: 4933–4938.
- [35] KIYOSUE T, WADA M. LKP1 (LOV kelch protein 1): a factor involved in the regulation of flowering time in *Arabidopsis*. *Plant J* 2000; **23**: 807–815.
- [36] KONDO T, ISHIURA M. The circadian clocks of plants and cyanobacteria. *Trends Plant Sci* 1999; **4**: 171–177.
- [37] KOPCEWICZ J. Fizjologia roślin. PWN Warszawa 2002.
- [38] KREPS JA, KAY SA. Circadian of plant metabolism and development by the circadian clock. *Plant Cell* 1997; **9**: 1235–1244.
- [39] KREPS JA, SIMON AE. Environmental and genetic effects on circadian clock regulated gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1997; **9**: 297–304.
- [40] KURUP S, JONES HD, HOLDSWORTH MJ. Interactions of the developmental regulator ABI3 with proteins identified from developing *Arabidopsis* seeds. *Plant J* 2000; **21**: 143–155.
- [41] LIN C. Photoreceptors and regulation of flowering time. *Plant Physiol* 2000; **123**: 39–50.
- [42] LIN C. Blue light receptors and signal transduction. *Plant Cell* 2002: 207–225
- [43] MAKINO S, MATSUSHIKA A, KOIJMA M, ODA Y, MIZUNO T. The *APRR1/TOC1* quintet implicated in circadian rhythms of *Arabidopsis thaliana*. I. Characterization with *APRR1* overexpressing plants. *Plant Cell Physiol* 2002 **43**: 58–69.
- [44] MARTINEZ-GARCIA JF, HUQ E, QUAIL PH. Direct targeting of light signals to a promoter element bound transcription factor. *Science* 2000; **288**: 859–863.
- [45] MAS P, DEVLIN PF, PANDA S, KAY SA. Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. *Nature* 2000; **408**: 207–211.
- [46] MATSUSHIKA A, MAKINO S, KOIJMA M, YAMASHINO T, MIZUNO T. Circadian waves of expression of the *APRR1/TOC1* family of pseudo-response regulators in *Arabidopsis thaliana*: insight into the plant circadian clock. *Plant Cell Physiol* 2000; **41**: 1002–1012.
- [47] McCLUNG CR. Circadian rhythms in plants: a millennial view. *Physiol Plantarum* 2000; **109**: 359–371.
- [48] McCLUNG CR, SALOME PA, MICHAEL TP. The *Arabidopsis* circadian system. W: The *Arabidopsis* book. American Society of Plant Biologists 2002.
- [49] McWATTERS HG, BASTOW RM, HALL A, MILLAR AJ. The *ELF3 zeitnehmer* regulates light signaling to the circadian clock. *Nature* 2000; **408**: 716–720.
- [50] MILLAR AJ. Input signals to the plant circadian clock. *J Exp Bot* 2004; **55**: 277–283.
- [51] MOURADOV A, CREMER F, COUPLAND G. Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. *Plant Cell* 2002; **14**: 111–130.
- [52] MÜLLER SG, INGLIS PJ, WKITELMAN GC. The cell biology of phytochrome. *New Phytologist* 2002; **154**: 553–590.
- [53] NAGY F, SCHAFER E. Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* 2002; **53**: 329–355.
- [54] NEFF MM, FRANKHAUSER C, CHORY J. Light: an indicator of time and place. *Genes Deve* 2000; **14**: 257–271.
- [55] NELSON DC, LASSWELL J, LUISE ER, COHEN MA, BARTEL B. *FKF1*, a clock-controlled gene that regulates the transition of flowering in *Arabidopsis*. *Cell* 2000; **101**: 331–340.
- [56] NIMMO HG. Circadian regulation of a plant protein kinase. *Chronobiol Int.* 1998 **15**: 109–118.
- [57] NOZUE K, KANEGAE T, IMAIZUMI T, FUKUDA S, OKAMOTO H, YEH K, LAGARIAS JC, WADA M. A phytochrome from the fern *Adiantum* with features of the putative photoreceptor NPH1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 15826–15830.
- [58] OKAMURA H, YAMAGUCHI S, YAGITA K. Molecular machinery of circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res* 2002; **309**: 47–56.
- [59] PARK DH, SOMERS DE, KIM YS, CHORY YH, LIM HK, SOH MS, KIM HJ, KAY SA, NAM HG. Control of circadian rhythms and photoperiodic flowering by the *Arabidopsis GIGANTEA* gene. *Science* 1999; **285**: 1579–1582.

- [60] PILGRIM ML, McCLUNG CR. Differential involvement of the circadian clock in the expression of genes required for Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase synthesis, assembly, and activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 1993; **103**: 553–564.
- [61] QUAIL PH. Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Curr Opin Cell Biol* 2002; **14**: 180–188.
- [62] REED JW, NAGPAL P, BASTOW RM, SOLOMON KS, DOWSON-DAY MJ, ELUMALAI RP, MILLAR AJ. Independent action of ELF3 and phyB to control hypocotyl elongation and flowering time. *Plant Physiol* 2000; **122**: 1149–1160.
- [63] SCHULTZ TF, KIYOSUE T, YANOVSKY M, WADA M, KAY SA. A role for LKP2 in the circadian clock of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2001; **13**: 2659–2670.
- [64] SOMERS DE, DEVLIN PF, KAY SA. Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of *Arabidopsis* circadian clock. *Science* 1998; **282**: 1488–1490.
- [65] SOMERS DE. The physiology and molecular bases of the plant circadian clock. *Plant Physiol* 1999; **121**: 9–19.
- [66] SOMERS DE, SCHULTZ TF. ZEITLUPE encodes a novel clock associated PAS protein from *Arabidopsis*. *Cell* 2000; **101**: 319–329.
- [67] SONG HR, CARRE I. Function of the *LHY* gene within the *Arabidopsis* circadian clock. 12<sup>th</sup> Conference on *Arabidopsis* Research, Madison WI 2000; Abstract 240.
- [68] STAIGER D. Circadian rhythms in *Arabidopsis*: time for nuclear proteins. *Planta* 2002; **214**: 334–344.
- [69] STRAYER C, KAY SA. The ins and outs of circadian regulated gene expression. *Curr Opin Plant Biol* 1999; **2**: 114–120.
- [70] STRAYER C, OYAMA T, SCHULTZ TF, RAMAN R, SOMERS DE, MAS P, PANDA S, KREPS JA, KAY SA. Cloning of the *Arabidopsis* clock gene *TOC1*, an autoregulatory response regulator homolog. *Science* 2000; **289**: 768–771.
- [71] SUAREZ-LOPEZ P, WHEATLEY K, ROBSON F, ONOUCHI H, VALVERDE F, COUPLAND G. *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* 2001; **410**: 1116–1120.
- [72] SUGANO S, ANDRONIS C, GREEN RM, WANG ZY, TOBIN EM. Protein kinase CK2 interacts with and phosphorylates the *Arabidopsis* circadian clock-associated 1 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 11020–11025.
- [73] SUGANO S, ANDRONIS C, ONG MS, GREEN RM, TOBIN EM. The protein kinase CK2 is involved in regulation of circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 12362–12366.
- [74] THOMAS B, VINCE-PRUE D. Photoperiodism in plants. London: Academic Press 1996.
- [75] TRETYN A. Hormonalna i środowiskowa regulacja wzrostu i rozwoju roślin. *Fizjologia plonowania roślin* rozdz. 10, 2002; UWM: 355–400.
- [76] WANG Z-Y, TOBIN EM. Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* 1998; **93**: 1207–1217.
- [77] YAMAMOTO Y, SATO E, SHIMIZU T, NAKAMICH N, SATO S, KATO T, TABATA S, NAGATANI A, YAMASHINO T, MIZUNO T. Comparative genetic studies on the *APRR5* and *APRR7* genes belonging to the *APRR1/TOC1* quintet implicated in circadian rhythm, control of flowering time, and early photomorphogenesis. *Plant Cell Physiol* 2003; **44**: 1119–1130.
- [78] YANOVSKY MJ, KAY SA. Signaling networks in the plant circadian system. *Curr Opin Plant Biol* 2001; **4**: 429–435
- [79] ŻĄDZIŃSKI R, NOWAK Z. Molekularne podstawy działania i synchronizacji okołodobowego oscylatora biologicznego. *Post Biol Kom* 1999; **26**: 611–628.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 16.04.2004 r.

Przyjęto: 26.06.2004 r.

ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń

tran@biol.uni.torun.pl





## ERRATA

do pracy autorstwa **Zienkiewicz K., Niedojadło J.** pod tytułem: „*Natura i funkcje ciała Cajala w świetle nowych badań*” opublikowanej w *Postęпах Biologii Komórki* t. 31, nr 2 z 2004 r. W związku z niedostateczną jakością ryciny 1 na str. 315 poniżej zamieszczamy rycinę w wersji, mamy nadzieję, lepszej jakości.





## ERRATA

do prac opublikowanych w Postęпах Biologii Komórki tom 31, suplement nr 22/2004:

**J. Kawiak, I. Hus, J. Roliński, G. Hoser, A. Dmoszyńska** pt. „*Mechanizmy immunologiczne w nowotworach i próby wykorzystania ich w immunoterapii*”  
:

strona powinno być

jest

- |    |   |  |
|----|---|--|
| 67 | Na organizm człowieka składa się około $10^{14}$ komórek (dla porównania ludzi na ziemi żyje około $10^9$ ) | Na organizm człowieka składa się około $10^{14}$ komórek (dla porównania ludzi na ziemi żyje około $10^9$ , porównanie W. Korohoda). |
| 71 | W tym typie białaczki jest łagodny przebieg kliniczny i długi czasem przeżycia chorych.                     | W tym typie białaczki jest łagodny przebieg kliniczny i długi czas przeżycia chorych   |

**W. M. Krajewskiej i I. Masłowskiej** pt. „*Kaweolina, kaweole i transformacja nowotworowa*”

92 ...**kodonie 131**...  
wiersz 12 od dołu

...**kodonie 132**.

## KOMUNIKATY

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**  
**e-mail: 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 odwiedzanie.

*Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego*

Dr Andrzej Plewka

### **IV Konferencja Sekcji Endokrynologii Molekularnej Polskiego Towarzystwa Endokrynologicznego**

odbędzie się 2–3 października 2004 r. w sali konferencyjnej Muzeum Archeologicznego w Poznaniu – Pałac Górków (ul. Wodna 27).

**Program naukowy** obejmuje wykłady plenarne i prezentacje prac oryginalnych z zakresu:

***endokrynologii molekularnej*** (postępy w badaniach molekularno-genetycznych endokrynopatii – choroby tarczycy, przysadki, nadnerczy, przytarczyc, zaburzenia gospodarki wapniowo-fosforanowej, nowotwory gruczołów endokrynnych),

***diagnostyki molekularnej,***

***terapii genowej i rekombinowanymi hormonami.***

*Przewodnicząca Komitetu Organizacyjnego*

*dr hab. med. Katarzyna Łacka*

*tel. (61) 8691323, kom. 604 90 50 86*

*fax (61) 8691682*

*e-mail: K\_Lacka@wp.pl lub gradecka\_kubik@op.pl*



## 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 roczna*

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 2005 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 20124010531111000004409533.

Cena prenumeraty rocznika	na rok 2005
dla instytucji (bibliotek) wynosi	150 zł
dla odbiorców indywidualnych	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 20124010531111000004409533.

Price per year 25 dollars USA or 21 euro.

## INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, niepublikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach. Prosimy Autorów o nadsyłanie prac bezpośrednio do Redaktorów odpowiedniej specjalności (adresy na 2 str. okładki), a do Redakcji w Warszawie tylko te artykuły, które nie odpowiadają żadnej z wymienionych specjalności.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają

1) artykuły przeglądowe nie przekraczające 15 stron druku i do 100 pozycji bibliograficznych konieczne z ostatnich 5 lat (natomiast wcześniejsze prace mogą być pracami przeglądowymi); 2) doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach druku z kilkoma pozycjami bibliograficznymi z ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji); 3) listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przysłać 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. 628) 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 kolejny 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 następujące przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawiać 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. Na zdjęciach prosimy zamieszczać podziałkę, a nie podawać powiększenia w podpisie w związku z potrzebą zmniejszania ilustracji. 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 i. 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,
Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę	<i>tak nie</i> nie została wysłana do innej redakcji <i>tak nie</i>
Jest zgoda osób, których informacje nie- publikowane są zamieszczone w tekście	<i>tak nie</i> Dołączono kopię pracy wraz z rycinami na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM <i>tak nie</i>

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

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



## TREŚĆ – CONTENT

W tym Zeszycie	397
<i>Brewczyński K., Fronk J.</i> : Zielone białko fluorescencyjne GFP – struktura i właściwości Green Fluorescent Protein (GFP) – structure and properties	399
<i>Brewczyński K., Fronk J.</i> : Wykorzystanie zielonego białka fluorescencyjnego GFP w badaniach biologicznych Application of Green Fluorescent Protein (GFP) in biological research	421
<i>Hetmann A., Kowalczyk S.</i> : Roślinne receptory światła niebieskiego i UV-A Pośredniczące w reakcjach fototropicznych, fotomorfogenezie i nastawianiu zegara biologicznego Plant blue – UV A light receptors mediating in phototropic reactions, photomorphogenesis and circadian clock entrainment	441
<i>Seidel M., Kurpisz M.</i> : Endotelialna syntaza tlenu azotu Cz. I. Struktura genu i produktu białkowego Endothelial nitric oxide synthase. Part. I. Gene structure and protein product	465
<i>Seidel M., Kurpisz M.</i> : Endotelialna syntaza tlenu azotu Cz. II. Funkcja biologiczna Endothelial nitric oxide synthase. Part II. Functional aspects	477
<i>Piasecka M.</i> : Morfologia i funkcja mitochondriów plemnika a męska płodność. Część I. Prawidłowa morfologia i funkcja wstawki plemnika Morphology and function of sperm mitochondria and male fertility. Part I. Normal morphology and function of sperm midpiece	489
<i>Piasecka M.</i> : Morfologia i funkcja mitochondriów plemnika a męska płodność. Część II. Zaburzenia morfologiczno-funkcjonalne mitochondriów wstawki plemnika Morphology and function of sperm mitochondria and male fertility. Part II. Morphological and functional defects of sperm midpiece mitochondria	517
<i>Szczepański M. J., Góralski M., Mozer-Lisewska I., Samara H., Żeromski J.</i> : Rola receptorów Toll-podobnych w odporności The role of Toll-like receptors in immunity	543
<i>Frontczak-Baniewicz M., Walski M.</i> : Mózgowe naczynia kapilarne. Ultrastrukturalne wykładniki procesów angiogenezy Brain capillaries. Ultrastructural manifestation of angiogenesis	563
<i>Wojtkowska M., Kmita H.</i> : Kanały aparatu importu białka do mitochondriów The channels of the mitochondrial protein import apparatus	575
<i>Majsterek I., Błasiak J.</i> : Mechanizmy oporności komórek białaczkowych z udziałem onkogennych kinaz tyrozynowych Mechanisms of resistance in leukemia cells mediated by the oncogenic tyrosine kinases	591
<i>Zienkiewicz A., Tretyn A., Kopcewicz J.</i> : Molekularne i fizjologiczne podstawy funkcjonowania roślinnego zegara okołodobowego Molecular and physiological bases of circadian clock in plants	607
Erraty	625
Komunikat oraz Wskazówki dla Autorów i warunki prenumeraty	627