

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
BIOLOGII  
KOMÓRKI

POLISH  
ANATOMICAL  
SOCIETY

POLISH SOCIETY  
FOR CELL  
BIOLOGY

VOL. 33, ISSUE 3/2006  
(425–588)

# 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 STOJAŁOWSKA, Lech WOJTCZAK

Adres Redakcji – Editorial Office: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, Poland, tel. (022)5693830, fax 5693712, e-mail: jkawiak@cmkp.edu.pl.

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

Indexed in: 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. 13,5. Ark. druk. 10,5. Podpisano do druku w lipcu i druk ukończono w sierpniu 2006 r.

## W tym Zeszytcie

Limfocyty T regulatorowe o fenotypie CD4+CD25+ (Treg) odgrywają istotną rolę w immunosupresji. Zaburzenia ilościowe lub jakościowe w populacji tych komórek mogą być przyczyną rozwoju chorób autoimmunizacyjnych. W powstawaniu i regulowaniu funkcji limfocytów Treg ważną rolę pełni produkt genu *Foxp3*, należący do czynników transkrypcyjnych. Więcej na ten temat Czytelnik znajdzie na stronie 427.

Niespecyficzne białka transportujące tłuszcze (ns-LTP) należą do dużej rodziny białek roślinnych, których funkcja *in vivo* wciąż pozostaje nieznana. Biorąc pod uwagę budowę, właściwości i przypuszczalnie pełnione przez nie funkcje, wyodrębniono dwie klasy białek transportujących lipidy, ns-LTP1 oraz ns-LTP2. Więcej na ten temat jest na stronie 437.

Symplastowy transport białek i RNA jest wciąż dopiero poznawanym mechanizmem przekazywania informacji między komórkami roślin. Transport ten może zachodzić w sposób selektywny bądź też nieselektywny, w obrębie sąsiadujących komórek, tkanek lub całej rośliny. Proces ten regulowany jest podczas życia rośliny oraz w odpowiedzi na warunki środowiskowe. Ostatnio opisano np. sygnał wyciszania transportowany w postaci 21 nt siRNA amplifikowanego co 10–15 komórek i następnie przenoszonego do kolejnych komórek. Więcej na temat tych transportów znajdzie Czytelnik na stronie 473.

Kwitnienie roślin jest złożonym procesem fizjologicznym zależnym od wielu czynników. Przejście roślin ze stanu wegetatywnego do generatywnego jest u *Arabidopsis thaliana* kontrolowane przez kilka szlaków rozwojowych. Szlak zależny od jakości światła związany jest ze zjawiskiem zwanym syndromem zacienienia. Więcej o tych procesach jest na stronie 493.

Dojrzewanie oocytów kręgowców zostaje zablokowane w stadium metafazy drugiego podziału mejotycznego. Oocyty, które osiągnęły to stadium, są owulowane, a następnie mogą być aktywowane przez wnikaający plemnik albo przez działanie bodźca partenogenetycznego. Za utrzymanie bloku w stadium metafazy drugiego podziału mejotycznego odpowiedzialna jest aktywność cytotatyczna (CSF), która nie dopuszcza do inaktywacji głównego regulatora fazy M, jakim jest kinaza CDK1-cyklina B. Zanik aktywności CSF wydaje się niezbędny do ukończenia przez oocyt drugiego podziału mejotycznego i rozpoczęcia rozwoju zarodkowego. Więcej znajdzie Czytelnik na stronie 509.



## BIOLOGIA NATURALNYCH LIMFOCYTÓW REGULATOROWYCH CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>

### BIOLOGY OF NATURALLY ARISING CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> REGULATORY T CELLS

Monika RYBA, Jolanta MYŚLIWSKA

Katedra Histologii i Immunologii, Zakład Immunologii,  
Akademia Medyczna w Gdańsku

**Streszczenie:** Limfocyty T regulatorowe o fenotypie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Treg) odgrywają istotną rolę w immunosupresji. Zaburzenia ilościowe lub jakościowe w populacji tych komórek mogą być przyczyną rozwoju chorób autoimmunizacyjnych. W powstawaniu i regulowaniu funkcji limfocytów T regulatorowych ważną rolę pełni gen *Foxp3* należący do czynników transkrypcyjnych. Zarówno na poziomie mRNA, jak i białka ekspresja *Foxp3* jest ograniczona do komórek CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. *Foxp3* hamuje ekspresję genów cytokin na skutek oddziaływań z jednym z kluczowych czynników transkrypcyjnych – NFAT. Wzbudzenie ekspresji *Foxp3* w komórkach CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nadaje im w pełni funkcjonalny fenotyp regulatorowy. To odkrycie daje nowy obraz biologii limfocytów T regulatorowych i może przyczynić się do rozwoju terapii w leczeniu schorzeń na podłożu immunologicznym.

**Słowa kluczowe:** komórki regulatorowe, *Foxp3*, choroby autoimmunizacyjne.

**Summary:** The mechanism that plays an essential role in immunosuppression and regulation is the presence of naturally arising CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocytes (Treg). Quantitative or qualitative dysfunctions in these cells may lead to autoimmune diseases. The *Foxp3*, a forkhead/winged helix (FKH) transcription factor, is the key regulatory gene for the development and function of regulatory T lymphocytes. The *Foxp3* expression is limited to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells at both mRNA and protein levels. The *Foxp3* interacts with nuclear factor of activated T cells (NFAT) and repress cytokine gene expression. Induction of the *Foxp3* expression in human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells can convert these cells to a regulatory T cell phenotype. This finding may provide new insight into the biology of regulatory T cells and could become a useful therapeutic tool in the treatment of autoimmunity.

**Key words:** regulatory T cells, *Foxp3*, autoimmunity.

\*Praca została wykonana w ramach badań statutowych AMG (ST-26 – kierownik prof. J. Myśliwska).

## CHARAKTERYSTYKA REGULATOROWYCH KOMÓREK CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>

Limfocyty T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Treg) stanowią od 5 do 10% wszystkich obwodowych komórek CD4<sup>+</sup> [25, 34] i charakteryzują się stałą i wysoką ekspresją podjednostki  $\alpha$  receptora dla IL2 (CD25), co odróżnia je od aktywowanych limfocytów CD4<sup>+</sup>. U człowieka opisano dwie subpopulacje limfocytów T regulatorowych: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> [3, 5], z których tylko pierwsza, wykazująca wyższą ekspresję antygenu CD25, ma w pełni supresorowy fenotyp. Subpopulacja ta stanowi 1–2% komórek CD4<sup>+</sup> [5]. Dodatkowo limfocyty CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dzieli się na te, które wykazują, bądź nie wykazują ekspresji antygenu CD45RO [26, 49]. Analiza FACS wykazała ponadto ekspresję następujących cząsteczek powierzchniowych na świeżo izolowanych limfocytach CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> [2, 26]: HLA-DR, CD-122, CD134, wewnątrzkomórkowego receptora CTLA-4. Jeszcze bardziej charakterystyczny dla tych komórek jest znajdujący się na błonie komórkowej indukowany glukokortykoidami receptor dla TNF – GITR (ang. *glucocorticoid induced tumour necrosis factor receptor*) [4, 31]. Fenotyp powierzchniowy Treg jest bardzo podobny do tego, jaki wykazują komórki CD4<sup>+</sup> pamięci, z tą różnicą, że Treg charakteryzują się konstytutywną ekspresją CD25 i CTLA-4 [2, 3]. Limfocyty T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> mają krótsze telomery niż limfocyty T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> [3]. Nie wiadomo jednak, czy może to być powodem ich ograniczonej zdolności do proliferacji. Limfocyty T regulatorowe dojrzewają w grasicy lub w obwodowych narządach limfatycznych jako limfocyty rozpoznające własne antygeny. W selekcji limfocytów T regulatorowych w grasicy dużą rolę odgrywa stopień powinowactwa receptorów TCR (ang. *T cell receptor*) do antygenów [1]. Uważa się, że tymocyty CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ulegają negatywnej selekcji w wyniku oddziaływań pomiędzy TCR o dużym powinowactwie i antygenów prezentowanych w kontekście MHC klasy II na komórkach nabłonkowych grasicy. W takich tymocytach dochodzi do wzbudzenia ekspresji genu *Foxp3* i różnicowania w kierunku Treg. Tymocyty CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> *Foxp3*<sup>+</sup> stają się anergiczne, co chroni je przed delecją w procesie selekcji pozytywnej. Sygnał pochodzący z TCR o określonym powinowactwie jest niezbędny dla różnicowania w kierunku Treg, ale może być on sygnałem niewystarczającym. Rolę mogą tu odgrywać sygnały pochodzące od innych cząsteczek np. *Notch* [11]. Badania Walker et al. [45], a także Taams et al. [42] pokazały, że limfocyty Treg mogą powstawać również poza grasicą w wyniku wielokrotnej stymulacji antygenem dziewiczych limfocytów T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>.

## AKTYWNOŚĆ PROLIFERACYJNA KOMÓREK CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>

W celu zbadania zdolności proliferacyjnych komórek CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> oraz CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> przeanalizowano zachowanie tych dwóch populacji w hodowli po stymulacji TCR. Okazało się, że limfocyty CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> wykazywały wysoki potencjał proliferacyjny, natomiast limfocyty CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nie proliferowały lub proliferowały bardzo słabo w

odpowiedzi na stymulację przeciwciałami anti-CD3 czy anti-CD28. Taka sama sytuacja powtarzała się nawet po wielokrotnej stymulacji, dowodząc, że limfocyty Treg są limfocytami anergicznymi [35]. Obserwowany ograniczony potencjał proliferacyjny anergicznym limfocytów Treg jest prawdopodobnie wynikiem zatrzymania się tych komórek w fazie G1/G0 cyklu komórkowego [26]. Proliferacja limfocytów Treg może być jednak indukowana przez dodanie do hodowli dużych ilości IL-4 czy IL-15 [2, 26, 35]. Również dodanie do pożywki IL-2 przełamuje stan anergii [2] i jest prawdopodobnie wynikiem oddziaływań w kompleksie receptora dla IL-2 (CD25, CD122, CD132). Limfocyty CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nie wydzielają IL-2 [2], ale ta cytokina jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania i przeżycia Treg [7, 11, 41]. Sygnalizacja poprzez IL-2 wydaje się być krytycznym czynnikiem w utrzymaniu homeostazy w populacji limfocytów T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> [19]. Podanie zdrowym myszom przeciwciał anti-IL2 powodowało zmniejszenie odsetka limfocytów Treg w grasicy i na obwodzie prowadząc do rozwoju chorób autoimmunizacyjnych. Eksperymenty pokazują, że Treg konkurują o IL-2 z komórkami efektorowymi CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> [11, 14]. W hodowlach mieszanych poziom ekspresji CD25 na Treg wzrasta, podczas gdy na komórkach efektorowych ekspresja CD25 jest hamowana. Nadekspresja CD25 przez Treg jest hamowana po dodaniu przeciwciał anti-CD25, a dodanie IL-2 przywraca ekspresję CD25 na komórkach efektorowych [14].

## FUNKCJE KOMÓREK CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>

Limfocyty T regulatorowe są zdolne zarówno do hamowania proliferacji i wydzielania cytokin przez limfocyty efektorowe CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, jak również działają supresyjnie w stosunku do limfocytów CD8<sup>+</sup>, monocytów, komórek NK, komórek dendrytycznych [3, 26], a także mogą w sposób bezpośredni hamować produkcję przeciwciał przez limfocyty B [30]. Aktywność supresyjna Treg zwiększa się po stymulacji TCR [43]. Po stymulacji anti-CD3 w obecności IL-2 wykazano, że wzbudzenie proliferacji w limfocytach T regulatorowych nie ogranicza ich zdolności supresyjnych w stosunku do komórek efektorowych [35], co stwarza możliwości ich wykorzystania w terapii. Badania nad mechanizmem supresji wywieranej przez limfocyty Treg pokazały, że może być ona niezależna od cytokin [26, 35]. Zastosowanie przeciwciał anti-IL-4, anti-IL-10, anti-TGF-β lub kombinacji tych przeciwciał nie blokowało supresji wywieranej przez limfocyty Treg w hodowlach mieszanych z limfocytami efektorowymi [26, 35]. Dopiero oddzielenie komórek Treg od komórek CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> błoną półprzepuszczalną znosiło supresję. Jednak zdania na temat roli TGF-β są podzielone. Badania Nakamura et al. [33] pokazały, że blokowanie tej cytokiny obniżało zdolność limfocytów T regulatorowych do wygaszania odpowiedzi immunologicznej. Inne doświadczenia pokazały, że rzeczywiście limfocyty Treg oddziałują na komórki docelowe za pośrednictwem TGF-β, ale nie w formie rozpuszczalnej, lecz związanej z błoną komórkową [34]. Być może supresja zależna od kontaktu komórka - komórka jest dominującą formą supresji [2], gdyż w pewnych warunkach nie można ominąć

mechanizmów zależnych od cytokin i w regulacji odpowiedzi immunologicznej konieczny jest udział IL-10 czy TGF- $\beta$  [15]. Wyjaśnieniem tych dwóch sprzecznych mechanizmów działania Treg może być tzw. teoria zaraźliwej tolerancji (ang. *infectious tolerance*) [11, 25], według której limfocyty T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> w kontakcie z limfocytami T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> pobudzają je do produkcji IL-10 i TGF- $\beta$ . W ten sposób powstają anergiczne limfocyty Th<sup>sup</sup> (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> po kontakcie z Treg), które są zdolne do hamowania limfocytów efektorowych CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> poprzez wydzielane cytokiny IL-10 lub/i TGF- $\beta$ .

## ROLA CZYNNIKA TRANSKRYPCYJNEGO FOXP3

Jednym z ostatnich odkryć dotyczących biologii limfocytów T regulatorowych jest identyfikacja czynnika transkrypcyjnego Foxp3, który po raz pierwszy został opisany właśnie w tych komórkach [18] i który uważany jest za najlepszy marker limfocytów Treg [39]. Gen *Foxp3* zlokalizowany jest w regionie X p 11.23 [6]. *Foxp3* koduje białko o masie 48 kDa, długości 431 aminokwasów – skurfinę (SFN) [40]. U myszy z mutacją w genie *Foxp3*, tzw. myszy *sf* (ang. *scurfy*) komórki CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> powstają, ale nie wykazują one właściwości regulatorowych [17, 27]. Skutki wynikające z mutacji bądź też delekcji genu *Foxp3* są podobne do tych powstałych po usunięciu populacji limfocytów T regulatorowych, a więc rozwoju chorób o podłożu autoimmunizacyjnym. To skłoniło naukowców do badania udziału genu *Foxp3* w rozwoju i funkcjonowaniu limfocytów CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Mutacja *sf* w genie *Foxp3* polega na insercji dwóch par zasad w regionie kodującym [40], co prowadzi do przedwczesnej terminacji i w efekcie obniżenia ekspresji genu [27]. Skurfina (SFN) zawiera tzw. domenę FKH (ang. *forkhead/winged helix domain*) na swym C-końcu. Usunięcie tej domeny powoduje zatrzymanie białka w cytoplazmie i jego eliminację z jądra komórkowego [40]. Wprowadzenie do komórek CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> białka SFN pozbawionego domeny FKH nie wzbudzało aktywności supresyjnej w tych komórkach [22]. U myszy *sf* ekspresja cytokin, takich jak: IL-2, IL-4, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , jest zaburzona. Główną rolę w regulacji genów dla tych cytokin pełni czynnik transkrypcyjny NFAT (ang. *nuclear factor of activated lymphocytes*). Wykazano, że w przypadku braku funkcjonalnego SFN, ekspresja IL2 i innych genów cytokin zależnych od NFAT jest wzmożona, natomiast nadprodukcja SFN hamuje wydzielanie tych cytokin [40]. Przeanalizowano znane sekwencje regulatorowe genów cytokin zależnych od NFAT jako możliwe miejsca wiązania FKH i stwierdzono, że większość z nich znajduje się w bliskim sąsiedztwie NFAT [40]. Poza tym limfocyty T CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> od myszy *sf* miały drastycznie zwiększony poziom NFAT i NF- $\kappa$ B w porównaniu z typem dzikim [8]. Można więc przypuszczać, że Foxp3 wpływa na transkrypcję IL-2 i innych cytokin zależnych od NFAT blokując miejsce wiązania NFAT z promotorami genów dla tych cytokin [8]. To może być przyczyną anergii limfocytów T regulatorowych CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> i braku syntezy IL-2 przez te komórki. Potwierdziły to doświadczenia, w których wprowadzenie genu *Foxp3* do mysich komórek CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> skutkowało hamowaniem ekspresji



cytokin, takich jak: IL-2, IL-4 czy IFN- $\alpha$  [23]. Wykazano ponad to, że ekspresja Foxp3 może być regulowana przez receptor dla estrogenu, który ma swoje miejsce wiązania w regionie promotorowym genu *Foxp3* [12].

Zarówno na poziomie mRNA, jak i białka ekspresja Foxp3 jest ograniczona do komórek CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> [22, 23]. Badania pokazały, że poziom ekspresji mRNA dla Foxp3 był od 40 do 100 razy wyższy w świeżo izolowanych komórkach CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> w porównaniu z komórkami CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> [18, 22, 24, 28, 38]. mRNA dla Foxp3 był również wykrywalny w niedojrzałych tymocytach, ale tylko o fenotypie CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> [23]. Limfocyty T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> od zdrowych myszy słabo reagowały na stymulację TCR, ale hamowały proliferację komórek efektorowych w hodowlach mieszanych. Z kolei limfocyty T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> od myszy z delecją genu *Foxp3* proliferowały, ale nie wykazywały żadnej aktywności supresyjnej w stosunku do komórek efektorowych. Dodatkowo myszy Foxp3<sup>-/-</sup> miały bardzo powiększone węzły chłonne i śledzionę. Brak ekspresji Foxp3 w innych komórkach CD25<sup>+</sup> (makrofagi, limfocyty B) sugeruje, że ekspresja tego genu jest zarezerwowana dla limfocytów T. Powstaje pytanie, czy ekspresja Foxp3 może być indukowana *in vivo*, a jeśli tak, to w jakich warunkach? Peng et al. [36] sugerują, że takim czynnikiem kostymulującym może być TGF- $\beta$ , który promuje rozwój limfocytów T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> i dzięki temu chroni przed rozwojem cukrzycy typu 1 u myszy. Przemawiają za tym doświadczenia *in vitro*, w których pod wpływem stymulacji przeciwciałami anti-CD3 i anti-CD28 w obecności TGF- $\beta$ , komórki CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> włączały ekspresję Foxp3 i nabywały aktywności regulatorowej [10, 51]. TGF- $\beta$  może indukować ekspresję Foxp3 poprzez aktywację SMAD [12].

Inne doświadczenia *in vitro* pokazały, że sama stymulacja TCR przeciwciałami anti-CD3, anti-CD28 w obecności IL2 wystarczała do wzbudzenia ekspresji genu *Foxp3* w ludzkich komórkach CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> [17, 32, 46]. Indukcja ekspresji genu silnie korelowała z ekspresją cząsteczki powierzchniowej CD25, a komórki CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, które powstawały, wykazywały aktywność regulatorową. Badania te są sprzeczne z podobnymi przeprowadzonymi na mysich komórkach CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, w których nie dochodziło do włączenia ekspresji Foxp3 po stymulacji TCR [22, 38, 46]. Wprowadzenie wektora retrowirusowego niosącego gen *Foxp3* do dziewiczych limfocytów T powoduje przejście ich w stan anergii i nadaje im w pełni funkcjonalny fenotyp regulatorowy [17, 18, 24, 49]. Co ciekawe, w transfekowanych komórkach dochodzi również do wzrostu ekspresji cząsteczek powierzchniowych CD25, CD45RO, HLA-DR, CCR-4, CTLA-4, GITR czy CD103 [18, 22, 23]. Zauważono, że im wyższy był poziom mRNA białka Foxp3, tym wyższy poziom ekspresji wyżej wymienionych cząsteczek. Wydaje się mało prawdopodobne, aby było to wynikiem nadmiernej aktywacji komórek przygotowującej je do transfekcji, gdyż poziom innych markerów związanych z aktywacją (CD4, CD38, CD69) nie zmieniał się wraz ze wzrostem ekspresji Foxp3 [49]. Transfekowane limfocyty T CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> nie były zdolne do hamowania proliferacji komórek efektorowych CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, gdy były oddzielone od nich błoną półprzepuszczalną [46, 49]. Blokada receptora dla IL-10 lub/i neutralizacja TGF- $\beta$  nie znosiły supresji. Tak więc transfekcja dziewiczych limfocytów T genem *Foxp3* wzbudza potencjał supresorowy w limfocytach T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, a wywierana *in vitro* supresja

jest niezależna od cytokin [18, 24]. Dodatkowo udowodniono, że transfekowane limfocyty T CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> zapobiegały rozwojowi chorób autoimmunizacyjnych u myszy [22, 24]. Znaczenie Foxp3 w rozwoju chorób autoimmunizacyjnych potwierdzono również u ludzi. Mutacje w tym genie występują u ludzi z ciężkimi zaburzeniami immunologicznymi IPEX [20, 47] (ang. *immunodysregulation, polyendocrinopathy enteropathy, X-linked syndrome*). Dodatkowo w przebadanej populacji Japończyków z cukrzycą typu 1, wykazano związek polimorfizmu genu *Foxp3* z rozwojem tej choroby [6]. Foxp3 pełni rolę negatywnego regulatora aktywacji limfocytów T, za czym przemawiają następujące spostrzeżenia. Limfocyty T od myszy *sf* były w stanie zaaktywowanym i były nadwrażliwe na stymulację TCR [23]. Silna aktywność transkrypcyjna NFAT skutkowałą w nadprodukcji cytokin prozapalnych u tych myszy [11]. Przeciwnie, limfocyty T od myszy z nadekspresją Foxp3 były odporne na stymulację TCR, słabo proliferowały i wydzielały niewielkie ilości IL-2 [28]. Ponadto nadekspresja Foxp3 w komórkach Jurkat powodowała zahamowanie transkrypcji IL-2 po stymulacji anti-CD3, wskazując, że ten białkowy czynnik jest represorem transkrypcji [40]. Z uwagi na fakt, że w transfekowanych limfocytach T CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> dochodziło do zwiększenia ekspresji cząsteczek powierzchniowych [22, 23, 49], może on również pełnić rolę aktywatora transkrypcji, jednak brak na to silnych dowodów.

Wyniki badań jednoznacznie pokazują, że Foxp3 pełni główną rolę w powstawaniu i funkcjonowaniu limfocytów T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, a jego ekspresja w komórkach CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> koreluje z ich zdolnością regulatorową. Można więc poszukiwać środków farmakologicznych, które przez wpływ na zwiększenie jego ekspresji, przywracałyby prawidłową funkcję Treg w wielu immunopatologiach.

## **ZNACZENIE LIMFOCYTÓW T REGULATOROWYCH CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> W ROZWOJU CHOROÓB AUTOIMMUNIZACYJNYCH**

Upośledzenie funkcji limfocytów T regulatorowych może być przyczyną rozwoju chorób o podłożu autoimmunizacyjnym. U ludzi stwierdzono zaburzenia ilościowe i jakościowe w populacji komórek Treg w przebiegu tych chorób.

U pacjentów z cukrzycą typu 1 zarówno świeżo zdiagnozowaną, jak i przewlekłą stwierdzono zmniejszony odsetek limfocytów T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> [29]. Ponadto wykazano, że Treg chorych na cukrzycę typu 1 słabiej hamowały proliferację limfocytów T efektorowych w warunkach *in vitro* [9, 50]. Limfocyty T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> wyizolowane od pacjentów cierpiących na reumatoidalne zapalenie stawów były anergiczne, zdolne do hamowania proliferacji limfocytów efektorowych, ale nie do hamowania wydzielania cytokin prozapalnych przez limfocyty efektorowe i monocyty [16]. U osób ze stwardnieniem rozsianym odsetek Treg był porównywalny z odsetkiem u osób zdrowych, jednak zdolność do hamowania proliferacji limfocytów efektorowych i wydzielania przez nie cytokin była obniżona w porównaniu z osobami zdrowymi [44].

Ehrenstein et al. [16] zastosowali terapię anti-TNF jako próbę przywrócenia prawidłowego funkcjonowania limfocytów T regulatorowych w przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów. U pacjentów odpowiadających na terapię anti-TNF odsetek limfocytów T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> zwiększył się, co pozostawało w silnej korelacji ze spadkiem poziomu białka CRP (ang. *C-reactive protein*). Przywrócona została również ich funkcja hamowania wydzielania cytokin prozapalnych przez limfocyty efektorowe i monocyty w hodowlach mieszanych.

Badania na myszach NOD (ang. *non-obese diabetic mice*) – modelu zwierzęcym cukrzycy typu 1 u człowieka pokazały, że TNF- $\alpha$  upośledza zdolność limfocytów T regulatorowych do hamowania choroby [48]. Autorzy sugerują, że endogenny poziom TNF- $\alpha$  może wywierać wpływ na funkcję i liczebność limfocytów Treg. Limfocyty T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> pozyskane z grasicy zdrowych myszy wykazują zwiększoną ekspresję receptora TNFR2 w porównaniu z limfocytami T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, co może skutkować zwiększoną wrażliwością Treg na działanie TNF- $\alpha$ . Potwierdzeniem tego są doświadczenia, w których podanie myszom NOD TNF- $\alpha$  zmniejszyło odsetek limfocytów T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> zarówno w grasicy, jak i śledzionie. Z kolei terapia anti-TNF- $\alpha$  prowadziła do zwiększenia liczby komórek CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> i regresji choroby [48]. W innych doświadczeniach poszukujących skutecznych terapii w celu przywrócenia funkcji Treg wykazano, że glikokortykosteroidy mają korzystny wpływ na funkcje Treg w przebiegu stwardnienia rozsianego [13, 37]. Na zwiększenie odsetka limfocytów T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> u chorych ze stwardnieniem rozsianym ma również wpływ zastosowanie kopolimeru-I (COP-I), który przywraca funkcje Treg przez indukcję ekspresji genu *Foxp3* w komórkach CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> [21].

## KOMÓRKI REGULATOROWE W IMMUNOTERAPII

Współczesne badania bez wątplenia potwierdzają znaczącą rolę populacji limfocytów T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> w regulowaniu odpowiedzi immunologicznej. Możliwość powstawania komórek Treg nie tylko w grasicy, ale też na obwodzie stwarza ogromne możliwości wykorzystania ich w terapii chorób o podłożu autoimmunizacyjnym, w alergiach czy transplantologii. Odkrycie czynnika transkrypcyjnego *Foxp3* jako głównego regulatora powstawania i funkcjonowania komórek Treg jest krokiem na przód w poznawaniu molekularnych mechanizmów, które nimi rządzą. Kontrola ekspresji genu *Foxp3* jest niezbędna w utrzymaniu homeostazy układu immunologicznego, a określenie sygnałów i mechanizmów prowadzących do zwiększenia lub przywrócenia jego ekspresji w niesfunkcjonalnych limfocytach T regulatorowych daje szansę na przywrócenie ich prawidłowej funkcji w przebiegu wielu chorób na podłożu immunologicznym.

Niedobór Treg może prowadzić do zaburzeń na tle autoimmunizacyjnym. Z kolei nadmierna aktywność może być przyczyną wyciszenia odpowiedzi immunologicznej, a w konsekwencji błędnego rozpoznawania własnych, zmienionych autoantygenów. Dlatego też należy pamiętać, że wszelkie próby modyfikacji tych komórek u ludzi powinny być prowadzone z zachowaniem szczególnej ostrożności.

## LITERATURA

- [1] APOSTOLOU I, SARUKHAN A, KLEIN L, von BOEHMER H. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* 2002; **3**: 756–763.
- [2] BAECHER-ALLAN C, WOLF E, HAFLER DA. Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *Clin Immunol* 2005; **115**: 10–18.
- [3] BAECHER-ALLAN C, VIGLIETTA V, HAFLER DA. Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Semin Immunol* 2004; **16**: 89–97.
- [4] BAECHER-ALLAN C, VIGELLIETTA V, HAFLER DA. Inhibition of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell function. *J Immunol* 2002; **169**: 6210–6217.
- [5] BAECHER-ALLAN C, BROWN JA, FREEMAN GJ, HAFLER DA. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001; **167**: 1245–1253.
- [6] BASSUNY WM, IHARA K, SASAKI Y, KUROMARU R, KOHNO H, MATSUURA N, HARA T. A functional polymorphism in the promoter/enhancer region of FOXP3/Scurfin gene associated with type 1 diabetes. *Immunogenetics* 2003; **55**: 149–156.
- [7] BENSINGER SJ, WALSH PT, ZHANG J, CARROLL M, PARSONS R, RATHMELL JC. Distinct IL-2 receptor signaling pattern in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol* 2004; **172**: 5287–5296.
- [8] BETTELLI E, DASTRANGE M, OUKKA M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-κB to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci* 2005; **102**: 5138–5143.
- [9] BRUSKO TM, WASSERFALL CH, CLARE-SALZLER MJ, SCHATZ DA, ATKINSON MA. Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes* 2005; **54**: 1407–1414.
- [10] CHEN WJ, JIN W, HARDEGEN N, LEI K, LI L, MARINOS N, McGRADY G, WAHL SM. Conversion of Peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Naive T Cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells by TGF-β Induction of Transcription Factor Foxp3. *J Exp Med* 2003; **198**: 1875–1886.
- [11] CHORAŻY-MASSALSKA M, KONTNY E, MAŚLIŃSKI W: Naturalne komórki regulatorowe (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>). *Post Biol Kom* 2006; **33** (1): 71–80.
- [12] COFFER PJ, BURGERING BM: Forkhead – box transcription factors and their role in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004; **4**: 889–899.
- [13] CONSTANTINESCU CS, BRAITCH M, HARIKRISHNAN S: High-dose glucocorticoid treatment for multiple sclerosis relapses enhances the proportion of circulating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *J Neurol* 2005; **252**: 39.
- [14] de la ROSA M, RUTZ S, DORMINGER H, SCHEFFOLD A. Interleukin 2 is essential for CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 2004; **34**: 2480–2488.
- [15] DIECKMANN D, BRUETT CH, PLOETTNER H, LUTZ MB, SCHULER G. Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory interleukin 10-producing, contact – independent type 1-like regulatory T cells. *J Exp Med* 2002; **196**: 247–253.
- [16] EHRENSTEIN MR, EVAN JG, SINGH A, MOORE S, WARNES G, ISENBERG DA, MAURIC. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFα therapy. *J Exp Med* 2004; **200**: 277–285.
- [17] FEHÉRVARI Z, SAKAGUCHI S. Development and function of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 2004; **16**: 203–208.
- [18] FONTENOT JD, GAVIN MA, RUDENSKY AY. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; **4**: 330–336.
- [19] FONTENOT JD, RASMUSSEN JP, GAVIN MA, RUDENSKY AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 2005; **6**: 1142–1151.
- [20] GOLEVA E, CARDONA ID, OU L, LEUNG DY. Factors that regulate naturally occurring T regulatory cell-mediated suppression. *J Allergy Clin Immunol* 2005; **116**: 1094–1100.
- [21] HONG J, NINGLI L, ZHANG X, ZHENG B, ZHANG JZ. Induction of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells by copolymer-I through activation of transcription factor Foxp3. *Proc Natl Acad Sci* 2005; **102**: 6449–6454.
- [22] HORI S, NOMURA T, SAKAGUCHI S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; **299**: 1057–1061.

- [23] HORI S, SAKAGUCHI S. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes and Infection* 2004; **6**: 745–751.
- [24] JAECKEL E, von BOEHMER H, MANNS MP. Antigen-specific FoxP3-transduced T-cells can control established type 1 diabetes. *Diabetes* 2005; **54**: 306–310.
- [25] JONULEIT H, SCHMITT E, KAKIRMAN H, STASSEN M, KNOP J, ENK AH. Infectious tolerance: human CD25<sup>+</sup> regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4<sup>+</sup> T helper cells. *J Exp Med* 2002; **196**: 255–260.
- [26] JONULEIT H, SCHMITT E, STASSEN M, TUETTENBERG A, KNOP J, ENK AH. Identification and functional characterization of human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 2001; **193**: 1285–1294.
- [27] KHATTRI R, COX T, YASAYKO S, RAMSDELL F. An essential role for scurf in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003; **4**: 337–342.
- [28] KHATTRI R, KASPROWICZ D, COX T, MORTRUD M, APPLEBY MW, BRUNKOW ME, ZIEGLER SF, RAMSDELL F. The amount of scurf protein determines peripheral T-cell number and responsiveness. *J Immunol* 2001; **167**: 6312–6320.
- [29] KUKREJA A, COST G, MARKER J, ZHANG C, SUN Z, LIN-SU K, TEN S, SANZ M, EXLEY M, WILSON B, PORCELLI S, MACLAREN N. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest* 2002; **109**: 131–140.
- [30] LIM WH, HILLSAMER P, BANHAM AH, KIM CH. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol* 2005; **175**: 4180–4183.
- [31] McHUGH RS, WHITTERS MJ, PICCIRILLO CA, YOUNG DA, SHEVACH EM, COLLINS M, BYRNE MC. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002; **16**: 311–323.
- [32] MORGAN ME, van BILSEN JHM, BAKKER AM, HEEMSKERK B, SCHILHAM MW, HARTGERS FC, ELFERING BG, van der ZANDEN L, de VRIES RRP, HUIZINGA WJ, OTTENHOFF THM, TOES REM. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T regulatory cells in humans. *Hum Immunol* 2005; **66**: 13–20.
- [33] NAKAMURA K, KITANI A, FUSS I, PEDERSEN A, HARADA N, NAWATA H, STROBER W. TGF- $\beta$  plays an important role in the mechanism of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cell activity in both human and mice. *J Immunol* 2004; **172**: 834–884
- [34] NAKAMURA K, KITANI A, STROBER W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor  $\alpha$ . *J Exp Med* 2001; **194**: 629–644.
- [35] NG WF, DUGGAN PJ, PONCHEL F, MATARESE G, LOMBARDI G, EDWARDS AG, ISAACS JD, LECHLER R. Human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* 2001; **98**: 2736–2744.
- [36] PENG Y, LAOUAR Y, LI MO, GREEN A, FLAVELL RA. TGF- $\beta$  regulates *in vivo* expansion of Foxp3-expressing CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells responsible for protection against diabetes. *Proc Natl Acad Sci* 2004; **101**: 4572–4577.
- [37] PUTHETI P, MORRIS M, STAWIARZ L, TELESHOVA N, KIVISAKK P, PASHENKOV M, KOUWENHOVEN M, WIBERG MK, BRONGE L, HUANGYM, SONDERSTORM M, HILLERT J, LINK H. Multiple sclerosis: a study of chemokine receptors and regulatory T cells in relation to MRI variables. *Eur J Neurol* 2003; **10**: 529–535.
- [38] RAMSDELL F: Foxp3 and natural regulatory T cells: Key to a cell lineage? *Immunity* 2003; **19**: 165–168.
- [39] RAMSDELL F, ZIEGLER SF. Transcription factors in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2003; **15**: 718–724.
- [40] SCHUBERT LA, JEFFERY E, ZHANG Y, RAMSDELL F, ZIEGLER SF. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem* 2001; **276**: 37672–37679.
- [41] SU L, CREUSOT RJ, CHAN SM, UTZ PJ, FATHMAN CG, ERMANN J. Murine CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells fail to undergo chromatin remodeling across the proximal promoter region of the IL-2 gene. *J Immunol* 2004; **173**: 4994–5001.
- [42] TAAMS LS, VUKAMANOVIC-STEJIC M, SMITH J, DUNNE PJ, FLETCHER JM, PLUNKETT FJ, EBELING SB, LOMBARDI G, RUSTIN MH, BIJLSMA JWJ, LAFEBER FPJG, SALMON M, AKBAR AN. Antigen-specific cell suppression by human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2002; **32**: 1621–1630.

- [43] THORNTON AM, SHEVACH EM. Suppressor effector function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 2000; **164**: 183–190.
- [44] VIGLIETTA V, BAECHER – ALLAN C, WEINER HL, HAFLE DA. Loss of functional suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004; **199**: 971 – 979.
- [45] WALKER MR, CARSON BD, NEPOM GT, ZIEGLER SF, BUCKNER JH: De novo generation of antigen-specific CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells from human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells. *Proc Natl Acad Sci* 2005; **102**: 4103–4108.
- [46] WALKER MR, KASPROWICZ DJ, GERSUK VH, BČNARD A, VAN LANDEGHEN M, BUCKNER JH, ZIEGLER SF. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *J Clin Invest* 2003; **112**: 1437–1443.
- [47] WILDIN RS, FREITAS A. IPEX and FOXP3: clinical and research perspectives. *J Autoimmun* 2005; **25**: 56–62.
- [48] WU AJ, HUA H, MUNSON SH, McDEVITT HO. Tumor necrosis factor- $\alpha$  regulation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell levels in NOD mice. *Proc Natl Acad Sci* 2002; **99**: 12287–12292.
- [49] YAGI H, NOMURA T, NAKAMURA K, YAMAZAKI S, KITAWAKI T, HORI S, MAEDA M, ONODERA M, UCHIYAMA T, FUJII S, SAKAGUCHI S. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *Int Immunol* 2004; **16**: 1643–1656.
- [50] YOU S, BELGHITH M, COBBOLD S, ALYANAKIAN MA, GOUARIN C, BARRIOT S, GARCIA C, WALDMANN H, BACH JF, CHATENOU L. Autoimmune diabetes onset results from qualitative rather than quantitative age-dependent changes in pathogenic T-cells. *Diabetes* 2005; **54**: 1415–1422.
- [51] ZHENG SG, GRAY JD, OHTSUKA K, YAMAGIWA S, HORWITZ DA. Generation *ex vivo* of TGF- $\beta$ -producing regulatory T cells from CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> precursors. *J Immunol* 2002; **169**: 4183–4189.

*Redaktor prowadzący – Barbara Płytycz*

*Otrzymano: 20.02. 2006 r.*

*Przyjęto: 01.03. 2006 r.*

*Katedra Histologii i Immunologii AM*

*80210 Gdańsk, ul. Dębinki 1*

*e-mail: akinomab@amg.gda.pl*

## BIAŁKA ns-LTP – FUNKCJONALNY POLIMORFIZM\*

### NS-LTP PROTEINS – FUNCTIONAL POLYMORPHISM

Agnieszka KIEŁBOWICZ-MATUK

Pracownia Genomiki Funkcjonalnej, Instytut Genetyki Roślin  
Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

*Streszczenie:* Niespecyficzne białka transportujące tłuszcze (ns-LTP) należą do olbrzymiej rodziny białek roślinnych, których funkcja *in vivo* wciąż pozostaje nieznana. Biorąc pod uwagę budowę, właściwości i przypuszczalnie pełnione przez nie funkcje wyodrębniono dwie klasy białek transportujących lipidy, ns-LTP1 i ns-LTP2. Cechą charakterystyczną wszystkich białek ns-LTP jest obecność czterech amfipatycznych  $\alpha$ -helis, które tworzą wewnętrzną kieszeń hydrofobową będącą miejscem wiązania cząsteczek lipidowych. W genomach roślin wyższych stwierdzono obecność wielu kopii genów dla roślinnych białek transportujących tłuszcze. Prawdopodobnie poszczególne izoformy ns-LTP należące do tej samej rodziny, ale różniące się profilem ekspresji mogą pełnić w komórce odmienne funkcje. Wykazano ich udział między innymi w tworzeniu powierzchniowej warstwy ochronnej, somatycznej embriogenezie, w sygnalizacji oraz w adaptacji roślin do różnych warunków środowiska. Ponadto, niektóre białka ns-LTP znane są jako panalergeny w żywności pochodzenia roślinnego. Ostatnie badania ujawniły, że białka transportujące lipidy mogą wiązać się do zlokalizowanych w błonie plazmatycznej miejsc, które zidentyfikowano jako receptory dla elicytyn. Wskazuje to na istotną rolę tych białek w mechanizmach obronnych roślin przeciwko patogenom.

*Słowa kluczowe:* niespecyficzne białka transportujące tłuszcze, transport lipidów, panalergeny roślinne, elicytyny.

*Summary:* Non-specific lipid transfer proteins (ns-LTPs) belong to a large family of plant proteins whose function *in vivo* remains unknown. On the basis of their structure, properties and functions two main classes of lipid transfer protein have been identified in plants, ns-LTP1 and ns-LTP2 respectively. The most interesting structural feature of the ns-LTP proteins is the presence of four amphipatic  $\alpha$ -helices which form the internal hydrophobic cavity that can bind the lipid molecules. Plants ns-LTPs are encoded by a multigenic family, therefore different isoforms may correspond to different functions. It has been implicated that plant lipid transfer proteins are involved in protecting surface layer formation, somatic embryogenesis, signaling and plant adaptation to various environmental conditions. Some of the ns-LTP proteins are also known to be panallergens of plant-derived foods. It has been recently shown that the lipid transfer proteins bind to the sites located on plasma membranes which have been identified as the elicitor receptors. It indicated important role of this proteins in plant defense mechanisms against pathogens.

*Key words:* non-specific lipid transfer proteins, lipid transfer, plant panallergens, elicitors.

\*Praca dofinansowana przez Instytut Genetyki Roślin PAN.

## WSTĘP

Z definicji lipidy (tłuszcze) są cząsteczkami biologicznymi nierozpuszczalnymi w wodzie i dobrze rozpuszczalnymi w rozpuszczalnikach organicznych. Pełnią one w organizmach roślinnych różnorodne funkcje biologiczne. W formie triglicerydów i wolnych kwasów tłuszczowych są głównym źródłem węgla i energii. Jako fosfo- i glikolipidy stanowią element strukturalny błon komórkowych. Pochodne poliestrów kwasów tłuszczowych są składnikami budulcowymi warstw na powierzchni organów roślinnych (kutyny i suberyny), które chronią tkanki przed nadmierną utratą wody i szkodliwym działaniem stresowych czynników środowiska zewnętrznego. Ponadto lipidy, a zwłaszcza ich pochodne pełnią funkcję hormonów i wtórnych cząsteczek sygnalizacyjnych. Ażeby sprostać tej mnogości zadań w komórce, tempo wymiany lipidów na poziomie komórkowym, pozakomórkowym i błonowym musi podlegać precyzyjnej regulacji. Od kilku lat wiadomo, że w błonach biologicznych występują specyficzne regiony lipidowe nazywane mikrodomenami (ang. *lipid rafts*), które odgrywają istotną rolę w obrocie lipidów i w modulacji aktywności wielu białek [61, 87].

Ze względu na hydrofobowy charakter cząsteczki, transport lipidów w komórce na duże odległości odbywa się za pomocą rozpuszczalnych makrocząsteczek bądź struktur wielocząsteczkowych. Należą do nich białka transportujące tłuszcze i pęcherzyki lipoproteinowe [64].

## 1. ROŚLINNE BIAŁKA TRANSPORTUJĄCE TŁUSZCZE

Białka transportujące tłuszcze (ang. *Lipid Transfer Protein, LTP*) stanowią rodzinę białek o bardzo zachowawczej strukturze. Występują one powszechnie w świecie organizmów żywych. Dotychczas wykryto je w komórkach ssaków, roślin, drożdży, grzybów i niektórych bakterii [49, 51]. W przeciwieństwie do roślinnych LTP, białka transportujące tłuszcze u innych organizmów charakteryzują się wysoką masą cząsteczkową w granicach od 15 kDa do 30 kDa oraz brakiem podobieństwa sekwencji pomiędzy poszczególnymi izoformami [81, 97].

Z powodu szerokiej specyficzności substratowej roślinne białka transportujące tłuszcze określa się terminem ns-LTP (ang. *non-specific Lipid Transfer Protein*) [51]. Dotychczas wyizolowano geny dla ns-LTP z marchwi (*Daucus carota*) [86], pomidora (*Lycopersicon pennellii*) [78, 90], moreli (*Prunus armeniaca*) [17], kukurydzy (*Zea mays*) [41], ryżu (*Oryza sativa*) [80], jęczmienia (*Hordeum vulgare*) [35], rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) [2], papryki (*Capsicum annuum*) [50, 69], kapusty (*Brassica napus*) [43] i wilczomlecza (*Euphorbia lagascae*) [27].



## 2. STRUKTURA ROŚLINNYCH BIAŁEK TRANSPORTUJĄCYCH TŁUSZCZE

Pod względem budowy i przypuszczalnie pełnionych przez nie funkcji roślinne białka transportujące tłuszcze stanowią bardzo zróżnicowaną grupę białek. Na podstawie powyższych kryteriów podzielono je na dwie klasy: ns-LTP1 (o masie cząsteczkowej około 9 kDa) i ns-LTP2 (o masie cząsteczkowej około 7 kDa) [1, 14, 22, 51, 58]. Najwięcej danych wskazujących na właściwości fizykochemiczne białek transportujących tłuszcze oraz ich subkomórkową lokalizację dotyczy grupy ns-LTP1. Charakteryzuje ją wysoki punkt izoelektryczny oraz obecność ośmiu zachowawczych reszt cysteiny połączonych czterema wiązaniami dwusiarczkowymi. Dodatkowo, przy końcu aminowym łańcucha polipeptydowego występuje sekwencja sygnałowa, która prawdopodobnie kieruje białko do retikulum endoplazmatycznego. Badania z wykorzystaniem krystalografii rentgenowskiej i spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego dostarczyły wielu istotnych informacji o strukturze przestrzennej białek ns-LTP u różnych organizmów roślinnych. Dotychczas udało się określić strukturę trzeciorzędową dla ns-LTP1 z jęczmienia (*Hordeum vulgare*) [42], ryżu (*Oryza sativa*) [75], pszenicy (*Triticum aestivum*) [23], kukurydzy (*Zea mays*) [41], chińskiej fasoli (*Phaseolus mungo*) [55] i tytoniu (*Nicotiana tabacum*) [19]. Ponadto, dużym osiągnięciem w ostatnich latach było poznanie przestrzennej struktury białek klasy ns-LTP2 z ryżu (*Oryza sativa*) [58, 80] i pszenicy (*Triticum aestivum*) [46]. Interesującą cechą białek transportujących tłuszcze jest obecność w cząsteczce czterech amfipatycznych  $\alpha$ -helis stabilizowanych mostkami dwusiarczkowymi oraz zlokalizowanego przy końcu karboksylowym łańcucha długiego ramienia z licznymi zwrotami  $\beta$  (ang.  $\beta$ -turns). Ścisłe upakowane  $\alpha$ -helisy tworzą olbrzymią, wewnętrzną kieszeń hydrofobową (tunel hydrofobowy), która jest miejscem wiązania mono- i diacylowanych cząsteczek lipidów włączając: kwasy tłuszczowe [24, 40], acylo CoA [53], lizo-fosfatydylocholinę [15] i fosfatydyloglicerol [82]. Porównując strukturę ns-LTP1 u różnych organizmów zaobserwowano, że hydrofobowa kieszeń charakteryzuje się dużą plastycznością, a poszczególne izoformy białek mogą różnić się jej rozmiarem [26, 88]. Badania wykazały, że w wyniku związania cząsteczki kwasu tłuszczowego przez białko ns-LTP1, objętość tunelu zwiększa się z  $\sim 400 \text{ \AA}^3$  do  $\sim 547\text{--}620 \text{ \AA}^3$  [40].

Ciekawym odkryciem było stwierdzenie, że białka ns-LTP nie mogą wiązać steroli i innych cząsteczek o sztywnym rdzeniu. Świadczy to o tym, że zarówno plastyczność tunelu, jak i elastyczność hydrofobowych cząsteczek lipidowych są niezbędne dla utworzenia kompleksu 'białko ns-LTP - lipid' [12, 23, 24, 63]. Co istotne, stwierdzono, że wiązanie lipidów wewnątrz tunelu jest dodatkowo kontrolowane przez ciśnienie błony powierzchniowej (np. zależy od stopnia upakowania jej składników). Zatem wydaje się słuszne, że w normalnym stanie fizjologicznym białka ns-LTP nie powinny wiązać i przenosić lipidów wchodzących w skład błony.

Poznanie przestrzennej struktury białek transportujących tłuszcze pozwoliło również ustalić, w jaki sposób białka te oddziałują z cząsteczkami lipidów. Obecnie znana jest struktura krystalograficzna kompleksów białek transportujących tłuszcze z 9 różnymi

cząsteczkami kwasów tłuszczowych [41]. Co więcej, określono przestrzenną strukturę kompleksów białek klasy ns-LTP1 z palmitynianem i 1-palmitylo-2-lizo-fosfatydylocholiną u kukurydzy (*Zea mays*) [37], z palmitylo-CoA u jęczmienia (*Hordeum vulgare*) [53] i z 1,2-dwumirystylofosfatydylo-glicerolem u pszenicy (*Triticum aestivum*) [82].

### 3. SUBKOMÓRKOWA I ORGANOWA LOKALIZACJA BIAŁEK ns-LTP

W genomach roślin wyższych wykazano obecność wielu kopii genów dla roślinnych białek transportujących tłuszcze [9, 47, 70, 90]. Dotychczas zidentyfikowano ponad 40 genów dla ns-LTP w genomie u *A. thaliana* [5]. Prawdopodobnie geny dla ns-LTP są zorganizowane w małe rodziny [2, 31, 72, 90]. Wykazano, że ekspresja genów dla różnych izoform białkowych należących do tej samej rodziny jest tkankowo i organowo specyficzna [16]. Dodatkowo, w obrębie różnych organów rośliny podlega ona rozwojowej i „środowiskowej” regulacji [38]. Sugeruje się, że białka ns-LTP, należące do tej samej rodziny, ale różniące się profilem ekspresji, mogą pełnić w komórce odmienne funkcje [31, 90].

Pierwotnie białka ns-LTP1 zostały wykryte w nadziemnych organach roślin, takich jak: owoce, rozwijające się kwiaty, szczytowe części pędów i liście, podczas gdy białka ns-LTP2 zlokalizowano wyłącznie w korzeniach [84]. Obecnie wiadomo, że intensywne synteza obu grup białek zachodzi również w nasionach [21, 48, 59].

Wielu autorów wskazuje, że ekspresja genów kodujących ns-LTP jest wyższa na wczesnych etapach rozwoju rośliny. Tym niemniej, obecność białek transportujących tłuszcze stwierdzono również w młodych tkankach roślin dojrzałych [90]. Analiza ekspresji genu kodującego białko transportujące tłuszcze EP2 z marchwi (*Daucus carota*) wykazała, że najsilniejsza ekspresja ma miejsce w merystemie wierzchołkowym pędu, w zawiązkach liściowych i w rozwijających się kwiatach [86]. Interesujące wyniki uzyskano również na podstawie analizy poziomu transkryptów trzech genów dla ns-LTP wyizolowanych z wilczomlecza (*Euphorbia lagascae*), (*EILTP1*, *EILTP2* i *EILTP3*). Stwierdzono, że w przypadku genów *EILTP1* i *EILTP3* maksymalna akumulacja mRNA miała miejsce w komórkach bielma i liścieniach, a ekspresja genu *EILTP2* zachodziła wyłącznie w komórkach bielma [28].

Jak już wspomniano, jedną z charakterystycznych cech roślinnych białek transportujących tłuszcze jest występowanie peptydu sygnałnego przy końcu aminowym cząsteczki. Dlatego też sugeruje się, że ns-LTP ulegają sekrecji w warunkach *in vivo*. Przykładem są wyniki badań immunolokalizacyjnych nad białkami ns-LTP: Parj1 i Parj2 u *Parietaria judaica*. Wykazano, że zawartość białek transportujących tłuszcze w ziarnie pyłku u parietarii zmienia się podczas hydratacji [94]. Pierwotnie białka ns-LTP są obecne w cytoplazmie komórki i w ciałach tłuszczowych. Okres magazynowania ns-LTP jest jednak bardzo krótki, po czym białka są kierowane na szlak sekrecyjny [89].

Aktualne dane wskazują na pozakomórkową lokalizację białek ns-LTP. Przypuszczalnie docelowym miejscem ich funkcjonowania są ściany komórek epidermalnych i epikutikularna warstwa woskowa [51].

Istnieją doniesienia wskazujące, że białka transportujące tłuszcze charakteryzują się wysoką stabilnością termiczną i proteolityczną [56]. Autorzy sugerują, że najprawdopodobniej ma to związek z występowaniem tych białek w warunkach stresowych. Dla niektórych białek transportujących tłuszcze wykazano wzrost poziomu akumulacji transkryptu w odpowiedzi na działanie czynników stresowych, takich jak: patogeny [5, 33, 62], zranienie [83], światło [10] i jony metali ciężkich [35]. Wiele danych wskazuje, że geny dla ns-LTP mogą być również aktywowane pod wpływem chłodu, suszy i zasolenia [52, 72, 79, 90, 98]. Interesującym przykładem jest gen *CALTP1* z papryki (*Capsicum annuum*), dla którego silny wzrost poziomu transkryptu zaobserwowano w liściach pod wpływem suszy i wysokiego zasolenia. Świadczy to o potencjalnej roli *CALTP1* w nabywaniu tolerancji roślin na stresy środowiskowe [50]. Ekspresja innego genu *BG-14* kodującego białko transportujące tłuszcze z stokłosa bezostnej (*Bromus inermis*) jest indukowana w odpowiedzi na suszę, zasolenie, anizomycynę i sfingozynę [98], podczas gdy silny wzrost akumulacji białka transportującego lipidy, Ha-AP10 ze słonecznika (*Helianthus annuus*) odnotowano pod wpływem stresu solnego i infekcji grzybowej [34, 77].

Ostatnie badania ujawniły również obecność w promotorach wielu genów dla białek transportujących tłuszcze, takich jak: *LpLtp1* i *LpLtp2* z pomidora (*Lycopersicon pennellii*), *Ltp2*, *3*, *4*, *6* z jęczmienia (*Hordeum vulgare*) i *Fxaltp* z truskawki (*Fragaria ananasa*) obecność cis-regulatorowych sekwencji niezbędnych do aktywacji ekspresji genów pod wpływem ABA [31, 90, 99].

#### 4. RÓŻNORODNOŚĆ FUNKCJONALNA ROŚLINNYCH BIAŁEK ns-LTP

Precyzyjna rola białek ns-LTP nie jest jeszcze dokładnie poznana. Dostępne dane pozwalają przypuszczać, że skutki ich aktywności mogą być dla komórek bardzo różnorodne (tab. 1). Pierwotne dane wskazują na rolę białek ns-LTP w transporcie wewnątrz- i zewnątrzkomórkowym. Wykazano, że białka ns-LTP w warunkach *in vitro* uczestniczą w wewnątrz błonowej wymianie fosfolipidów, na przykład w transporcie fosfatydylocholiney z liposomów do mitochondriów. W związku z tym sugerowano ich udział w przebudowie i odnowie błon tych organelli. Jakkolwiek, brak jest bezpośrednich dowodów potwierdzających funkcję ns-LTP w warunkach *in vivo* [2].

Jednym z dobrze poznanych zjawisk zachodzących podczas dostosowywania się roślin do niskich temperatur jest utrzymanie płynnej struktury błon. Temperatura krzepnięcia błon komórkowych jest związana z obecnością nienasyconych kwasów tłuszczowych w fosfo- i galaktolipidach oraz z udziałem lipidów zawierających duże grupy polarne. Próby wprowadzenia do roślin enzymów biorących udział w tworzeniu

TABELA 1. Przykłady białek ns-LTP u różnych gatunków roślin, ich lokalizacja i główne funkcje w komórce

Typ LTP	Gatunek rośliny	Lokalizacja	Potencjalna funkcja	Auto-ryzy
E2P	<i>Daucus carota</i>	merystem wierzchołkowy pędu, zawiązki liściowe, rozwijające się kwiaty	– somatyczna embriogeneza – transport monomerów kutyny	[86]
PvLTP	<i>Phaseolus vulgaris</i>	warstwa korowa korzenia	– transport monomerów suberyny	[84]
EILTP1,2	<i>Euphorbia lagascae</i>	komórki bielma, liście	– udział w obrocie lipidów w komórkach bielma – inhibitory proteaz	[28]
ns-LTP2	<i>Oryza sativa</i>	nasiona	– transport lipidów – składnik systemu obronnego roślin	[58]
CALTP1	<i>Capsicum annum</i>	komórki floemu, epiderma liści	– nabywanie tolerancji roślin na stresy środowiskowe, tj. wysokie zasolenie, suszę, atak patogenów	[50]
BG-14	<i>Bromus inermis</i>	siewki	– adaptacja roślin do warunków stresowych	[98]
Ha-AP10	<i>Helianthus annuus</i>	kiełkujące nasiona	– udział w reakcjach obronnych roślin na stres solny i atak patogenów	[34]
Fxaltp	<i>Fragaria ananasa</i>	komórki bielma, epiderma liści	– udział w odpowiedzi roślin na stres chłodu, zranienie i ABA	[99]
Vrltp 1	<i>Figna radiata</i>	nasiona, łodygi, młode liście	– udział w odpowiedzi roślin na stres dehydracyjny i zasolenie	[59]
WAX9	<i>Brassica oleraceae</i>	młode liście	– ochrona tylakoidów chloroplastów przed uszkodzeniem w temp. zamarzania (krioprotekcja)	[43, 44]
EARL1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	blona komórkowa lub ściana komórkowa	– stabilizacja błon i ściany komórkowej pod wpływem niskiej temperatury	[10]
Parj1 Parj2	<i>Parietaria judaica</i>	pierwotnie cytoplazma i ciała tłuszczowe ziarna pyłku, następnie kierowane na szlak sekrecyjny	– panalergeny roślinne – udział w procesie zapylenia i zapłodnienia	[89, 94]
ns-LTP1 (CaMBP)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	liście	– wiązanie kalmoduliny i udział w procesach przez nią stymulowanych	[96]
ns-LTP (rodzina białek R-14)	<i>Hordeum vulgare</i>	ziarna	– zdolność wiązania jonów metali ciężkich, tj. $Pb^{+2}$ , $Co^{+2}$ , $Hg^{+2}$ i $Ni^{+2}$ – hamowanie procesu fermentacji drożdży piwarskich, wpływ na tworzenie i stabilność piany	[35, 36]
ns-LTP	<i>Zea mays</i>	–	– inicjacja transdukcji sygnału apoptotycznego w mitochondriach w wątrobie u myszy	[18, 20]
ns-LTP1	<i>Hordeum vulgare</i>	dojrzałe nasiona	– inhibitor proteiny cysteinowej	[48]
ns-LTP1	Castor bean	liście	– regulacja $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych w glikosomach	[91]
LTP1	<i>Triticum aestivum</i>	–	– pośredniczy w transporcie leków	[71]

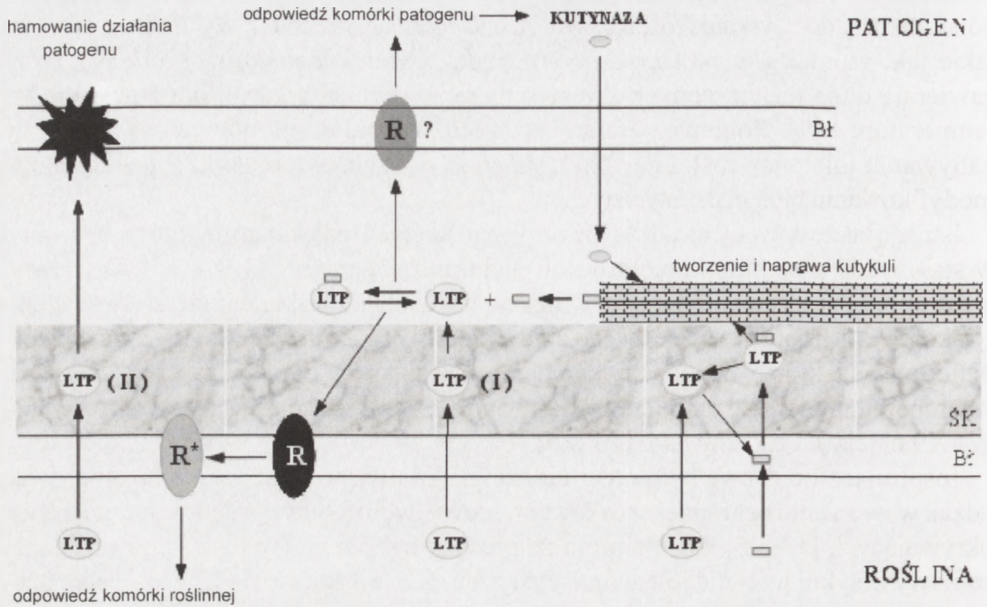
podwójnych wiązań w nasyconych lub jednonienasyconych kwasach tłuszczowych, doprowadziły do uzyskania roślin o zwiększonej tolerancji na chłód. Wykazano, że rośliny takie jak: szpinak (*Spinacea oleracea*) i rzodkiewnik (*Arabidopsis thaliana*), które zawierają dużo nienasyconych kwasów tłuszczowych są bardziej odporne na niską temperaturę [39]. Ponieważ zmiany w składzie lipidów błonowych są istotne w nabywaniu tolerancji roślin na chłód, sugeruje się, że niektóre ns-LTP pełnią rolę w modyfikowaniu błon plazmatycznych.

Istnieją także dowody na udział niektórych roślinnych białek transportujących tłuszcze w stabilizacji membran komórkowych podczas zamarzania [43, 44, 85]. Od dawna wiadomo, że strukturą najbardziej wrażliwą na działanie niskiej temperatury są błony tylakoidów. Z aklimatyzującej się do chłodu kapusty (*Brassica oleracea*) wyizolowano białko WAX9, które wiąże się z tylakoidami chloroplastów i zapobiega ich uszkodzeniu w temperaturach zamarzania. Jak stwierdzono, pełniące funkcję krioprotekcyjną białko WAX9 należy do rodziny ns-LTP1 [85].

Inspirujące i ciekawe było odkrycie, że białka transportujące tłuszcze mogą brać udział w tworzeniu ochronnej, woskowej warstwy hydrofobowej na powierzchni tkanek okrywających [13, 25, 90]. Pomimo że precyzyjna rola tych białek w powstawaniu warstwy kutykularnej nie jest znana wykazano, że białka klasy ns-LTP1 są zaangażowane w transport monomerów kutyny, podczas gdy białka klasy ns-LTP2 transportują monomery suberyny [25, 86].

W ostatnich latach wyizolowano i zidentyfikowano wiele roślinnych białek związanych z mechanizmem ogólnej reakcji komórek na infekcje bakteryjne i grzybowe. Charakteryzuje je obecność dużej liczby reszt cysteinowych. Obok  $\beta$ -1,3-glukanaz i cystatyn, do białek defenzyno-podobnych zalicza się również białka transportujące tłuszcze. O roli ns-LTP w obronie roślin przed infekcją bakteryjną i grzybową, wnioskuje się na podstawie ich lokalizacji w ścianach komórek epidermalnych oraz zwiększonego poziomu tych białek w komórkach w odpowiedzi na atak patogenu (ryc. 1) [32, 95]. Dane wielu autorów dowodzą, że białka ns-LTP wykazują wysoką homologię sekwencji do białek zasadowych o masie cząsteczkowej około 9 kDa, których udział stwierdzono podczas interakcji roślina-mikroorganizm [6]. Dowiedziono, że białka ns-LTP stanowią istotny składnik systemu obrony komórek przed patogenami, gdyż hamują działanie pewnych fitopatogenów, takich jak: *Pseudomonas solanacearum*, *Clavibacter michiganensis*, *Fusarium solani*, *Rizoctonia solani*, *Trichoderma viride* i *Cercospora beticola* [5, 33, 38, 50, 62].

Od kilku lat wiadomo, że niektórzy przedstawiciele białek ns-LTP mogą brać udział w wiązaniu jonów metali ciężkich. Przykładem jest białko ns-LTP z jęczmienia (*Hordeum vulgare*), które wiąże kationy metali dwuwartościowych, takich jak:  $Pb^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$  i  $Ni^{+2}$ . Można więc spekulować o domniemanej funkcji tych białek w procesie fitoeks-trakcji, który bazuje na zdolności roślin do hiperakumulacji metali [35]. Ocenia się, że wprowadzenie do roślin genów, kodujących białka zaangażowane w wiązanie i transport jonów metali ciężkich, może prowadzić do otrzymania roślin transgenicznych o zwiększonej zdolności do ich akumulacji.



RYCINA 1. Mechanizm ilustrujący rolę roślinnych białek transportujących tłuszcze (LTP) podczas interakcji pomiędzy patogenami grzybowymi i roślinami (wg [5], zmienione): LTP – białko transportujące lipidy; R – nieaktywny receptor; R\* – aktywny receptor; SK – ściana komórkowa; Bł – błona plazmatyczna; konstytutywna synteza enzymu kutynazy przez grzyby pasożytnicze np. *Fusarium* prowadzi do uszkodzenia kutykularnej warstwy ochronnej i uwolnienia monomerów kutyny, które następnie są wiązane przez białka LTP zlokalizowane w rejonie kutykuli (I). Powstały kompleks 'monomer kutyny-białko LTP' może wiązać się do receptorów zlokalizowanych w błonie plazmatycznej komórek roślinnych i tym samym zapoczątkowywać odpowiedź obronną organizmu. W rezultacie dochodzi do wzmożonej syntezy różnych białek transportujących tłuszcze oraz innych białek stresowych PR, które hamują wzrost i rozwój patogenu, jak również biorą udział w naprawie hydrofobowej warstwy kutykularnej (II). Alternatywnie przypuszcza się, że kompleks 'monomer kutyny-białko LTP' może wiązać się do domniemyanych receptorów w błonie plazmatycznej u grzybów i indukować nadprodukcję enzymu kutynazy

Uwzględniając dane przedstawione powyżej, świadczące o funkcji białek ns-LTP w komórkach pod wpływem stresów, pewne białka transportujące tłuszcze zaliczono do grupy białek obronnych PR-14 (ang. *Pathogenesis-Related*) [92].

Niedawno wykazano, że niektóre białka ns-LTP mogą również uczestniczyć w wiązaniu kalmoduliny [57, 96]. Na przykład białko CaMBP wyizolowane z *A. thaliana* wiąże kalmodulinę w sposób niezależny od jonów wapnia oraz pośredniczy w procesach przez nią stymulowanych. Badania potwierdziły, że CaMBP pod względem homologii sekwencji i właściwości fizykochemicznych wykazuje znaczne podobieństwo do roślinnych białek transportujących tłuszcze. 12-aminokwasowy rejon w cząsteczce CaMBP wiążący kalmodulinę zawiera trzy silnie konserwatywne motywy, których obecność stwierdzono we wszystkich znanych ns-LTP.

Istnieją także dane na temat funkcji niektórych białek transportujących tłuszcze w procesach wzrostu i rozwoju roślin [27, 28].

Niezwykle ważną choć nie do końca wyjaśnioną rolą roślinnych białek ns-LTP jest inicjacja transdukcji sygnału apoptotycznego w mitochondriach w wątrobie u myszy [18]. Wykazano, że białko transportujące tłuszcze z kukurydzy (*Zea mays*) w obecności specyficznych lipidów może indukować uwolnienie cytochromu c i innych białek apoptogennych z wnętrza mitochondriom do cytoplazmy. Jakkolwiek szczegóły tego mechanizmu nie zostały dotychczas poznane. Analiza sekwencji aminokwasowej ujawniła wysoką homologię sekwencji pomiędzy roślinnymi białkami ns-LTP a proapoptotycznym białkiem ssaków Bid należącego do rodziny Bcl-2 [20].

Znaczne zainteresowanie budzi ostatnio wśród naukowców zaklasyfikowanie białek transportujących lipidy do grupy silnych panalergenów pokarmowych pochodzenia roślinnego [3, 4, 45, 70, 76]. Pierwotnie ns-LTP zostały zidentyfikowane w skórcie owoców brzoskwini jako niskocząsteczkowe białka o właściwościach alergicznych. Ponadto ich obecność stwierdzono w owocach jabłoni, gruszy, śliwy, moreli, brzoskwini i wiśni. Udokumentowano też duże podobieństwo strukturalne między tymi białkami wymienionych owoców a odpowiednimi białkami kukurydzy. Badania wykazały, że alergia na owoce z rodziny *Rosaceae* może być związana z występowaniem pewnych reakcji krzyżowych [29, 60, 100].

Dane wielu autorów sugerują, że białka transportujące tłuszcze dzięki wysokiej stabilności termicznej mogą być wykorzystywane w procesie technologicznym produkcji piwa. Badania wykazały, że białko ns-LTP z jęczmienia (*Hordeum vulgare*) należące do grupy białek PR-14, hamuje proces fermentacji drożdży piwowskich (*Saccharomyces cerevisiae*) oraz wpływa na tworzenie i stabilność piany [36].

## 5. DIALOG POMIĘDZY ns-LTP1 A ELICITYNAM I W MECHANIZMACH OBRONNYCH ROŚLIN

Elicityny stanowią dużą rodzinę niskocząsteczkowych, bogatych w cysteinę białek zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez grzyby patogenne *Phytophthora* i *Pythium* [68]. Są one związane z aktywną odpowiedzią rośliny na zewnętrzne czynniki stresowe [74]. Ponadto, stanowią ważny element w regulacji procesów metabolicznych komórek w stanie zagrożenia zewnętrznego.

Pierwotnie elicityny zostały zidentyfikowane na podstawie ich zdolności do indukcji reakcji nadwrażliwości (ang. *Hypersensitive Response*, HR) prowadzącej do samobójczej śmierci komórek kontaktujących się z patogenem u *Nicotiana tabacum*, *Raphanus sativus* i niektórych gatunków *Brassica* [54]. Obecnie wiele danych wskazuje, że mogą one również zapoczątkowywać rozwijającą się często w następstwie HR systemiczną odporność nabytą (ang. *Systemic Acquired Resistance*, SAR) przeciwko szerokiej różnorodności patogenów grzybowych i bakteryjnych [51, 73]. Istnieją również dowody świadczące, iż białka te przemieszczają się w obrębie rośliny [73].

Pomimo że funkcja większości elicytyn nie została dotychczas poznana ostatnie doniesienia sugerują, że pewne klasy tych białek, tj. I-A i I-B, mogą wiązać cząsteczki lipidowe i sterole. Dlatego też sugeruje się funkcję elicytyn jako nośników steroli i transporterów tłuszczu [66, 67]. Ma to również związek z charakterystyczną strukturą tych białek. Badania krystalograficzne i NMR wykazały, że głównymi elementami budowy elicytyn jest obecność sześciu amfipatycznych  $\alpha$ -helis stabilizowanych przez trzy mostki dwusiarczkowe oraz motywu w kształcie „dzioba” utworzonego przez antyrównoległą strukturę  $\beta$  i pętlę  $\Omega$  [7]. Silnie pofałdowane  $\alpha$ -helisy tworzą wewnętrzną kieszeń hydrofobową, która jest miejscem wiązania steroli oraz kwasów tłuszczowych [66, 93]. Dalsze badania ujawniły, że niektóre białka elicytyno-podobne, np. kapsyceina z *Phytophthora capsici* mają aktywność fosfolipazy [65]. Ponadto wykazano, że indukcja ekspresji dwóch genów dla elicytyn z *Phytophthora infestans* zachodzi podczas kopulacji [30].

W ostatnim czasie trwają intensywne prace nad ustalaniem związku pomiędzy elicytynami a białkami ns-LTP1 w mechanizmach obronnych roślin. Badania ujawniły, że roślinne białka transportujące lipidy i elicytyny mają wspólne właściwości strukturalne i funkcjonalne. Warto zaznaczyć, że w przeciwieństwie do elicytyn białka ns-LTP1 nie mogą wiązać steroli. Dane wielu autorów wskazują, że kompleks ‘ns-LTP - lipid’ wiąże się do zlokalizowanych w błonie plazmatycznej komórki receptorów dla elicytyn [11], zapoczątkowując tym samym reakcję obronną organizmu [5]. Receptory dla elicytyn tworzą struktury oligomeryczne złożone z czterech identycznych podjednostek o łącznej masie około 193 kDa [8]. To częściowo wyjaśnia powinowactwo i współzawodnictwo egzogennych elicytyn i endogennych białek transportujących o te same sensory błonowe. Wynikiem tego współzawodnictwa może być przykładowo niska wrażliwość pewnych roślin na traktowanie elicytynami. Na przykład zaobserwowano, że poziom białek ns-LTP u tytoniu (*Nicotiana tabacum*) jest około 10 razy niższy niż u niewrażliwego na traktowanie elicytynami pomidora (*Lycopersicon esculentum*). Warto również zaznaczyć, że najprawdopodobniej sposób wiązania do receptorów jest różny dla obu grup białek. Podczas gdy wiadomo, że utworzenie kompleksu ‘sterol - elicytyna’ jest niezbędne dla jego wiązania z odpowiednim sensory komórkowym, ciągle brak dowodów na to, czy utworzenie kompleksu ‘białko ns-LTP1 - lipid’ warunkuje jego oddziaływanie z cząsteczką receptora?

Badania wykazały, że selektywne rozpoznanie cząsteczek sygnałowych (elicytyn lub białek transportujących tłuszcze) przez specyficzne receptory komórkowe, zlokalizowane na zewnętrznej stronie błony jest pierwszym etapem kaskady sygnalizacyjnej prowadzącej do końcowej odpowiedzi rośliny na działający bodziec (ryc. 1). W dalszej kolejności zostaje uruchomiony cały łańcuch zdarzeń skierowanych przeciwko patogenowi [5], obejmujący napływ jonów  $\text{Ca}^{2+}$  do komórki, depolaryzację błony cytoplazmatycznej, uwolnienie jonów  $\text{K}^+$  i równocześnie akumulację jonów  $\text{H}^+$ . Dochodzi do fosforylacji pewnych białek, zakwaszenia cytozolu, syntezy fitoaleksyn i enzymów hydrolitycznych oraz produkcji aktywnych form tlenu. W rezultacie następuje uruchomienie ekspresji określonych genów, których produkty białkowe mają na celu uniemożliwienie patogenowi dalszego rozprzestrzeniania się oraz zahamowanie jego



rozwoju. Do tej pory badacze poszukują odpowiedzi na pytanie, czy białka ns-LTP1 stymulują w roślinie odpowiedź w sposób podobny jak elicytyny prowadząc do indukcji reakcji nadwrażliwości? Czy też, co wydaje się bardziej prawdopodobne, zachowują się jak ich antagoniści?

## PODSUMOWANIE

W jakim punkcie zatem znajduje się obecna wiedza o funkcjach roślinnych białek transportujących tłuszcze? Uwaga badaczy skupia się na roli ns-LTP zarówno w fizjologii roślin, jak i w procesach technologicznych. Wskazuje się na udział tej olbrzymiej rodziny białek w wielu aspektach życia rośliny. Ciągłe jednak dużo pytań pozostaje bez odpowiedzi. Wydaje się, że poznanie przestrzennej struktury większości roślinnych białek transportujących tłuszcze oraz mechanizmów regulacji ich ekspresji pozwoli głębiej wniknąć w ogrom zadań, jakim muszą sprostać te białka w komórce.

## PODZIĘKOWANIE

*Autorka pracy dziękuje Panu doc. dr hab. Tadeuszowi Roratowi za cenne uwagi podczas redagowania niniejszej pracy.*

## LITERATURA

- [1] AIRENNE TT, KIDRON H, NYMALM Y, NYLUND M, WEST G, MATTJUS P, SALMINEN TA. Structural evidence for adaptive ligand binding of glycolipid transfer protein. *J Mol Biol* 2006; **355**: 224–236.
- [2] ARONDEL V, VERGNOLLE C, CANTREL C, KADER JC. Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 2000; **157**: 1–12.
- [3] ASERO R, MISTRELLO G, RONCAROLO D, AMATO S, VAN REE R. A case of allergy to beer showing cross-reactivity between lipid transfer proteins. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001; **87**: 65–70.
- [4] ASERO R, MISTRELLO G, RONCAROLO D, AMATO S. Relationship between peach lipid transfer protein specific IgE levels and hypersensitivity to non-Rosaceae vegetable foods in patients allergic to lipid transfer protein. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004; **92**: 268–272.
- [5] BLEIN JP, COUTOS-THEVENOT P, MARION D, PONCHET M. From elicitors to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms. *Trends Plant Sci* 2002; **7**: 293–296.
- [6] BLILOU I, OCAMPO JA, GARCIA-GARRIDO JM. Induction of Ltp (lipid transfer protein) and Pal (phenylalanine ammonia-lyase) gene expression in rice roots colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *J Exp Bot* 2000; **51**: 1969–1977.
- [7] BOISSY G. The 2.1 angstrom structure of an elicitor-ergosterol complex: a recent addition to the sterol carrier protein family. *Protein Sci* 1999; **8**: 1191–1199.
- [8] BOURQUE S, BINET MN, PONCHET M, PUGIN A, LEBRUN-GARCIA A. Characterization of the cryptogin binding sites on plant plasma membranes. *J Biol Chem* 1999; **274**: 34699–34705.
- [9] BOUTROT F, GUIRAO A, ALARY R, JOUDRIER P, GAUTIER MF. Wheat non-specific lipid transfer protein genes display a complex pattern of expression in developing seeds. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1730**: 114–125.

- [10] BUBIER J, SCHLÄPPI M. Cold induction of *EARL11*, a putative *Arabidopsis* lipid transfer protein, is light and calcium dependent. *Plant Cell Environ* 2004; **27**: 929–936.
- [11] BUHOT N, DOULIEZ JP, JACQUEMARD A, MARION D, TRAN V, MAUME BF, MILAT ML, PONCHET M, MIKES V, KADER JC, BLEIN JP. A lipid transfer protein binds to a receptor involved in the control of plant defence responses. *FEBS Lett* 2001; **509**: 27–30.
- [12] BUHOT N, GOMES E, MILAT ML, PONCHET M, MARION D, LEQUEU J, DELROT S, COUTOS-THEVENOT P, BLEIN JP. Modulation of the biological activity of a tobacco LTP1 by lipid complexation. *Mol Biol Cell* 2004; **15**: 5047–5052.
- [13] CAMERON KD, TEECE MA, SMART LB. Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves and tree tobacco. *Plant Physiol* 2006; **140**: 176–183.
- [14] CASTRO MS, GERHARDT IR, ORRU S, PUCCI P, BŁOCH CJR. Purification and characterization of a small (7.3 kDa) putative lipid transfer protein from maize seeds. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; **794**: 109–114.
- [15] CHARVOLIN D, DOULIEZ JP, MARION D, COHEN-ADDAD C, PEBAY-PEYROULA E. The crystal structure of a wheat nonspecific lipid transfer protein (ns-LTP1) complexed with two molecules of phospholipid at 2.1 Å resolution. *Eur J Biochem* 1999; **264**: 562–568.
- [16] CLARK AM, BOHNERT HJ. Cell-specific expression of genes of the lipid transfer protein family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 1999; **119**: 765–774.
- [17] CONTI A, FORTUNATO D, ORTOLANI C, GIUFFRIDA MG, PRAVETTONI V, NAPOLITANO L, FARIOLI L, PERONO GAROFFO L, TRAMBAIOLI C, PASTORELLO EA. Determination of the primary structure of two lipid transfer proteins from apricot (*Prunus armeniaca*). *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; **756**: 123–129.
- [18] CRIMI M, ASTEGNO A, ZOCCATELLI G, DEGLI ESPOSTI M. Pro-apoptotic effect of maize lipid transfer protein on mammalian mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 2006; **311**: 460–468.
- [19] DA SILVA, LANDON C, INDUSTRI B, MARAIS A, MARION D, PONCHET M, VOVELLE F. Solution structure of a tobacco lipid transfer protein exhibiting new biophysical and biological features. *Proteins* 2005; **59**: 356–367.
- [20] DEGLI ESPOSTI M. Sequence and functional similarities between pro-apoptotic Bid and plant lipid transfer proteins. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1553**: 331–340.
- [21] DIZ MSS, CARVALHO AO, GOMES VM. Purification and molecular mass determination of a lipid transfer protein exuded from *Vigna unguiculata* seeds. *J Plant Physiol* 2003; **15**: 171–175.
- [22] DOULIEZ JP, MICHON T, ELMORJANI K, MARION D. Structure, biological and technological functions of lipid transfer protein and indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels. *J Cereal Sci* 2000; **32**: 1–20.
- [23] DOULIEZ JP, MICHON T, ELMORJANI K, MARION D. Steady-state tyrosine fluorescence to study the lipid-binding properties of a wheat non-specific lipid-transfer protein (nsLTP1). *Biochim Biophys Acta* 2000; **1467**: 65–72.
- [24] DOULIEZ JP, JEGOU S, PATO C, MOLLE D, TRAN V, MARION D. Binding of two mono-acylated lipid monomers by the barley lipid transfer protein, LTP1, as viewed by fluorescence, isothermal titration calorimetry and molecular modeling. *Eur J Biochem* 2001; **268**: 384–388.
- [25] DOULIEZ JP. Cutin and suberin monomers are membrane perturbants. *J Colloid Interface Sci* 2004; **271**: 507–510.
- [26] DUBOIS L, DA SILVA P, LANDON C, HUBER JG, PONCHET M, VOVELLE F, BERTHAULT P, DESVAUX H. Probing the hydrophobic cavity of lipid transfer protein from *Nicotiana tabacum* through xenon-based NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc* 2004; **126**: 15738–15746.
- [27] EDQVIST J, FARBOS I. Characterization of germination-specific lipid transfer proteins from *Euphorbia lagascae*. *Planta* 2002; **215**: 41–50.
- [28] EKLUND DM, EDQVIST J. Localization of nonspecific lipid transfer proteins correlate with programmed cell death responses during endosperm degradation in *Euphorbia lagascae* seedlings. *Plant Physiol* 2003; **132**: 1249–1259.
- [29] ENRIQUE E, UTZ M, DE MATEO JA, CASTELLO JV, MALEK T, PINEDA F. Allergy to lipid transfer proteins: cross-reactivity among pomegranate, hazelnut and peanut. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006; **96**: 122–123.
- [30] FABRITIUS AL, CVITANICH C, JUDELSON HS. Stage-specific gene expression during sexual development in *Phytophthora infestans*. *Mol Microbiol* 2002; **45**: 1057–1066.

- [31] FEDERICO M, KAEPLER HF, SKADSEN RW. The complex developmental expression of a novel stress-responsive barley *Ltp* gene is determined by a shortened promoter sequence. *Plant Mol Biol* 2005; **57**: 35–51.
- [32] GE X, CHEN J, LI N, LIN Y, SUN C, CAO K. Resistance function of rice lipid transfer protein LTP110. *J Biochem Mol Biol* 2003; **36**: 603–607.
- [33] GOMČS E, SAGOT E, GAILLARD C, LAQUITINE L, POINSSOT B, SANEJOUAND Y-H, DEIROT S, COUTOS-THÉVENOT P. Nonspecific lipid-transfer protein genes expression in grape (*Vitis* sp.) cell in response to fungal elicitor treatments. *MPMI* 2003; **16**: 456–464.
- [34] GONORAZKY AG, REGENTE MC, DE LA CANAL L. Stress induction and antimicrobial properties of a lipid transfer protein in germinating sunflower seeds. *J Plant Physiol* 2005; **162**: 618–624.
- [35] GORJANOVIĆ S, SUŽNJEVIĆ D, BELJANSKI M, HRANISAVLJEVIĆ J. Barley lipid-transfer protein as heavy metal scavenger. *Environ Chem Lett* 2004; **2**: 113–116.
- [36] GORJANOVIĆ S, SUŽNJEVIĆ D, BELJANSKI M, OSTOJIĆ S, GORJANOVIĆ R, VRVIĆ M, HRANISAVLJEVIĆ J. Effects of lipid-transfer protein from malting barley grain on brewers yeast fermentation. *J Inst Brew* 2004; **110**: 297–302.
- [37] GUERBETTE F, GROSBOIS M, JOLLIOT-CROQUIN A, KADER JC, ZACHOWSKI A. Lipid-transfer proteins from plants: structure and binding properties. *Mol Cell Biochem* 1999; **192**: 157–161.
- [38] GUIDERDONI E, CORDERO MJ, VIGNOLS F, GARCIA-GARRIDO JM, LESCOT M, THARREAU D, MEYNARD D, FERRIERE N, NOTTEGHEM JL, DELSENY M. Inducibility by pathogen attack and developmental regulation of the rice *Ltp1* gene. *Plant Mol Biol* 2002; **49**: 683–699.
- [39] GWÓZDŹ EA. Odporność na czynniki abiotyczne. Biotechnologia roślin. Praca zbiorowa pod redakcją Stefana Malepszego 2001: 375–391.
- [40] HAMILTON JA. Fatty acid interactions with proteins: what X-ray crystal and NMR solution structure tell us. *Prog Lipid Res* 2004; **43**: 177–199.
- [41] HAN GW, LEE JY, SONG HK, CHANG C, MIN K, MOON J. Structural basis of non-specific lipid binding in maize lipid-transfer protein complexes revealed by high-resolution X-ray crystallography. *J Mol Biol* 2002; **308**: 263–278.
- [42] HEINEMANN B, ANDERSEN KV, NIELSEN PR, BECH LM, POULSEN FM. Structure in solution of a four-helix lipid binding protein. *Protein Sci* 1996; **5**: 565–577.
- [43] HINCHA DK, NEUKAMM B, SROR HAM., SIEG F, WECKWARTH W, RÜCKELS M, LULLIENPELLERIN V, SCHRÖDER W, SCHMITT JM. Cabbage cryoprotectin is a member of the nonspecific plant lipid transfer protein gene family. *Plant Physiol* 2001; **125**: 835–846.
- [44] HINCHA DK. Cryoprotectin: a plant lipid transfer protein homologue that stabilizes membranes during freezing. *Philosophical Transactions of the Royal Society (London): Biol Sci* 2002; **357**: 909–916.
- [45] HOFFMANN-SOMMERGRUBER K. Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. *Biochem Soc Trans* 2002; **30**: 930–935
- [46] HOH F, PONS J-L, GAUTIER M-F, DE LAMOTTE F, DUMAS C. Structure of a liganded type 2 non-specific lipid-transfer protein from wheat and the molecular basis of lipid binding. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2005; **61**: 397–406.
- [47] HORVATH B, BACHEM C, TRINDADE L, VISSER R. Expression analysis of a family of ns-LTP genes tissue specifically expressed throughout the plant and during tuber life cycle1. *Am Soc Plant Physiol* 2002; **129**: 1494–1506.
- [48] JONES BL, MARINAC LA. Purification and partial characterization of a second cysteine proteinase inhibitor from ungerminated barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Agric Food Chem* 2000; **48**: 257–264.
- [49] JUNG HW, HWANG BK. Isolation, partial sequencing, and expression of pathogenesis-related cDNA genes from pepper leaves infected by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Plant-Microbe Interactions* 2000; **13**: 136–142.
- [50] JUNG HK, KIM KB, HWANG BK. Identification of pathogen-responsive regions in the promoter of pepper lipid transfer protein gene (*CALTP1*) and the enhanced resistance of the *CALTP1* transgenic *Arabidopsis* against pathogen and environmental stresses. *Planta* 2005; **221**: 361–373.
- [51] KADER JC. Lipid-transfer proteins: a puzzling family of plant protein. *Trends Plant Sci* 1997; **2**: 66–70.
- [52] KERESZTESSY Z, HUGHES MA. Homology modeling and molecular dynamics aided analysis of ligand complexes demonstrates functional properties of lipid-transfer proteins encoded by the barley low-temperature inducible gene family, *blt4*. *Plant J* 1998; **14**: 523–533.
- [53] LERCHE MH, KRAGELUND BB, BECH LM, POULSEN FM. Barley lipid-transfer protein complexed with palmitoyl CoA: the structure reveals a hydrophobic binding site that can expand to fit both large and small lipid-like ligands. *Structure* 1997; **5**: 291–306.

- [54] LHERMINIER J, BENHAMOU N, LARRUE M-L, BOUDON-PADIEU E, NICOLE M, BLEIN J-P. Cytological characterization of elicitin-induced protection in tobacco plants infected by *Phytophthora parasitica* or *Phytoplasma*. *Am Phytopathol Soc* 2003; **93**: 1308–1319.
- [55] LIN KF, LIU YN, SAMUEL D, CHENG CS, BONVIN AM, LYU PC. Characterization and structural analyses of nonspecific lipid transfer protein 1 from mung bean. *Biochemistry* 2005; **44**: 5703–5712.
- [56] LINDORFF-LARSEN K, WINTHER JR. Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat and proteases. *FEBS Lett* 2001; **488**: 145–148.
- [57] LIU H, XUE L, LI C, ZHANG R, LING Q. Calmodulin-binding protein BP-10, a probable new member of plant nonspecific lipid transfer protein superfamily. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **285**: 633–638.
- [58] LIU YJ, SAMUEL D, LIN CH, LYU PC. Purification and characterization of a novel 7-kDa non-specific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **294**: 535–540.
- [59] LIU KH, LIN TY. Cloning and characterization of two novel lipid transfer protein I genes in *Vigna radiata*. *DNA Seq* 2003; **14**: 420–426.
- [60] LOMBARDEO M, GARCIA-SELLES FJ, POLO F, JIMENO L, CHAMORRO MJ, GARCIA-CASADO G, SANCHEZ-MONGE R, DIAZ-PERALES A, SALCEDO G, BARBER D. Prevalence of sensitization to Artemisia allergens Art v 1, Art v 3 and Art v 60 kDa. Cross-reactivity among Art v 3 and other relevant lipid-transfer protein allergens. *Clin Exp Allergy* 2004; **34**: 1415–1421.
- [61] MADEY E, NOWACK LM, SU L, HONG Y, HUDAK KA, THOMPSON JE. Characterization of plasma membrane domains enriched in lipid metabolites. *J Exp Bot* 2001; **52**: 669–679.
- [62] MALDONADO AM, DOERNER P, DIXON RA, LAMB CHJ, CAMERON RK. A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signaling in *Arabidopsis*. *Nature* 2002; **419**: 399–403.
- [63] MARION D, DOULIEZ JP, GAUTIER M-F, ELMORJANI K. Plant lipid transfer proteins relationships between allergenicity and structural, biological and technological properties. *Plant Food Allergy* 2004; **57**–69.
- [64] MOREAU P. Lipid trafficking in plant cell. *Prog Lipid Res* 1998; **37**: 371–391.
- [65] NESPOULOUS C, GAUDEMER O, HUET JC, PERNOLLET JC. Characterization of elicitin-like phospholipases isolated from *Phytophthora capsici* culture filtrate. *FEBS Lett* 1999; **452**: 400–406.
- [66] OSMAN H, MIKES V, MILAT ML, PONCHET M, MARION D, PRANGE T, MAUME BF, VAUTHRIN S, BLEIN JP. Fatty acids bind to the fungal elicitor cryptogeen and compete with sterols. *FEBS Lett* 2001a; **489**: 55–58.
- [67] OSMAN H, VAUTHRIN S, MIKES ML, PANABIERES F, MARAIS A, BRUNIE S, MAUME B, PONCHET M, BLEIN JP. Mediation of elicitin activity on tobacco is assumed by elicitin-sterol complexes. *Mol Biol Cell* 2001b; **12**: 2825–2834.
- [68] QUTOB D, HUITEMA E, GIJZEN M, KAMOUN S. Variation in structure and activity among elicittins from *Phytophthora sojae*. *Mol Plant Pathology* 2003; **4**: 119–124.
- [69] PARK C-J, SHIN R, PARK JM, YOU J-M, PAEK K-H. Induction of pepper cDNA encoding a lipid transfer protein during the resistance response to tobacco mosaic virus. *Plant Mol Biol* 2002; **48**: 243–254.
- [70] PASQUATO N, BERNI R, FOLLI C, FOLLONI S, CIANCI M, PANTANO S, HELLIWELL JR, ZANOTTI G. Crystal Structure of Peach Pru p 3, the Prototypic Member of the Family of Plant Non-specific Lipid Transfer Protein Pan-allergens. *J Mol Biol* 2006; **356**: 684–694.
- [71] PATO C, LE BORGNE M, LE BAUT G, LE PAPE P, MARION D, DOULIEZ JP. Potential application of plant lipid transfer proteins for drug delivery. *Biochem Pharmacol* 2001; **62**: 555–560.
- [72] PEARCE RS, HOULSTON CE, ATHERTON KM, RIXON JE, HARRISON P, HUGHES MA, DUNN MA. Localization of expression of three cold-induced genes, *blt101*, *blt4.9* and *blt14*, in different tissues of the crown and developing leaves of cold-acclimated cultivated barley. *Plant Physiol* 1998; **117**: 787–795.
- [73] PICCARD K, PONCHET M, BLEIN J-P, REY P, TIRILLY Y, BENHAMOU N. Oligandrin. A proteinaceous molecule produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum* induces resistance to *Phytophthora parasitica* infection in tomato plants. *Plant Physiol* 2000; **124**: 379–395.
- [74] PONCHET M. Are elicittins cryptograms in plant-fungi communication? A review of the plant and cell responses to elicittins treatments and analysis of signal involved. *Cell Mol Life Sci* 1999; **56**: 1020–1047.
- [75] POZNANSKI J, SODANO P, SUH SW, LEE JY, PTAK M, VOVELLE F. Solution structure of a lipid transfer protein extracted from rice seeds. Comparison with homologous proteins. *Eur J Biochem* 1999; **259**: 692–708.
- [76] VAN REE R. Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as food allergens. *Biochem Soc Trans* 2002; **30**: 910–913.

- [77] REGENTE MC, DE LA CANAL L. A cDNA encoding a putative lipid transfer protein expressed in sunflower seeds. *J Plant Physiol* 2003; **160**: 201–203.
- [78] REP M, DEKKER HL, VOSSEN JH, DE BOER AD, HOUTERMAN PM, DE KOSTER CG, CORNELISEN BJ. A tomato xylem sap protein represents a new family of small cysteine-rich proteins with structural similarity to lipid transfer proteins. *FEBS Lett* 2003; **534**: 82–86.
- [79] ROMO S, LABRADOR E, DOPICO B. Water stress-regulated gene expression in *Cicer arietinum* seedlings and plants. *Plant Physiol Biochem* 2001; **39**: 1017–1026.
- [80] SAMUEL D, LIU Y-J, CHENG CH-S, LYU P-CH. Solution structure of plant nonspecific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). *J Biol Chem* 2002; **277**: 35267–35273.
- [81] SHA B, PHILIPS SE, BANKAITIS VA, LUO M. Crystal structure of the *Saccharomyces cerevisiae* phosphatidylinositol-transfer protein. *Nature* 1998; **391**: 506–510.
- [82] SODANO P, CAILLE A, SY D, DE PERSON G, MARION D, PTAK M. H-NMR and fluorescence studies of the complexation of DMPG by wheat non-specific lipid transfer protein. Global fold of the complex. *FEBS Lett* 1997; **416**: 130–134.
- [83] SOHAL AK, PALLAS JA, JENKINS GI. The promoter of *Brassica napus* lipid transfer protein gene is active in a range of tissues and stimulated by light and viral infection in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 1999; **41**: 75–87.
- [84] SONG JY, CHOI D-W, LEE JS, KWON YM, KIM S-G. Cortical tissue-specific accumulation of the root-specific ns-LTP transcripts in the bean (*Phaseolus vulgaris*) seedlings. *Plant Mol Biol* 1998; **38**: 735–742.
- [85] SROR HAM, TISCHENDORF G, SIEG F, SCHMITT JM, HINCHA DK. Cryoprotectin protects thylakoids during a freeze-thaw cycle by a mechanism involving stable membrane binding. *Cryobiology* 2003; **47**: 191–203.
- [86] STERK P, BOOIJ H, SCHELLEKENS GA, VAN KAMMEN A, DE VRIES SC. Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell* 1991; **3**: 907–921.
- [87] STULNIG TM, HUBER J, LEITINGER N, IMRE EM, ANGELISOVA P, NOWOTNY P, WALDHAUSL W. Polyunsaturated eicosapentaenoic acid displaces proteins from membrane rafts by altering raft lipid composition. *J Biol Chem* 2001; **276**: 37335–37340.
- [88] SY D, GRAVIER Y, GOODFELLOW J, VOVELLE F. Protein stability and plasticity of the hydrophobic cavity in wheat ns-LTP. *J Biomol Struct Dyn* 2003; **21**: 15–29.
- [89] TRIDL-HOFFMANN C, KASCHE A, MENZEL A, JAKOB T, THIEL M, RING J, BEHRENDT H. Impact of pollen on human health: more than allergen carriers? *Int Arch Allergy Immunol* 2003; **131**: 1–13.
- [90] TREVINO MB, O'CONNELL MA. Three drought-responsive members of the nonspecific lipid-transfer protein gene family in *Lycopersicon pennellii* show different developmental patterns of expression. *Plant Physiol* 1998; **116**: 1461–1468.
- [91] TSUBOI S, OSAFUNE T, NISHIMURA M, YAMADA M. Nonspecific lipid transfer protein in castor bean cotyledon cells: Subcellular localization and a possible role in lipid metabolism. *J Biochem (Tokyo)* 1992; **111**: 500–508.
- [92] VAN LOON LC, VAN STERIEN EA. The family of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR1-type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* 1999; **55**: 85–97.
- [93] VAUTHRIN S, MIKES V, MILAT ML, PONCHET M, MAUME B, OSMAN H, BLEIN JP. Elicitins trap and transfer sterols from micelles, liposomes and plant plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1419**: 335–342.
- [94] VEGA-MARAY AM, FERNANDEZ-GONZALEZ D, VALENCIA-BARRERA R, POLO F, SEOANE-CAMBA JA, SUDREZ-CERVERA M. Lipid transfer proteins in *Parietaria judaica* L. pollen grains: immunocytochemical localization and function. *Eur J Cell Biol* 2004; **83**: 493–497.
- [95] WANG SY, WU JH, NG TB, YE XY, RAO PF. A non-specific lipid transfer protein with antifungal and antibacterial activities from the mung bean. *Peptides* 2004; **25**: 1235–1242.
- [96] WANG Z, XIE W, CHI F, LI C. Identification of non-specific lipid transfer protein-1 as a calmodulin-binding protein in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 2005; **579**: 1683–1687.
- [97] WEST G, NYMALM Y, AIRENNE T, KIDRON H, MATTJUS P, SALMINEN TT. Crystallization and X-ray analysis of bovine glycolipid transfer protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004; **60**: 703–705.
- [98] WU G, ROBERTSON AJ, LIU X, ZHENG P, WILEN RW, NESBITT NT, GUSTA LV. A lipid transfer protein gene *BG-14* is differentially regulated by abiotic stresses, ABA, anisomycin, and sphingosine in bromegrass (*Bromus inermis*). *J Plant Physiol* 2004; **161**: 449–458.

- [99] YUBERO-SERRANO EM, MOYANO E, MEDINA-ESCOBAR N, MUNOZ-BLANCO J, CABALLERO JL. Identification of a strawberry gene encoding a non-specific lipid transfer protein that responds to ABA, wounding and cold stress. *J Exp Bot* 2003; **54**: 1865–1877.
- [100] ZUIDMEER L, VAN LEEUWEN WA, BUDDE IK, CORNELISSEN J, BULDER I, RAFALSKA I, BESOLI NT, AKKERDAAS JH, ASERO R, RIVAS MF, MANCEBO EG, VAN REE R. Lipid transfer proteins from fruit: cloning, expression and quantification. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; **137**: 273–281.

*Redaktor prowadzący – Maria Olszewska*

*Otrzymano: 09.02. 2006 r.*

*Przyjęto: 10.05. 3006 r.*

*ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań*

*e-mail: akie@igr.poznan.pl*

## APOPTOZA W MIĘŚNIACH SZKIELETOWYCH I NERKACH PO OSTRYM I PRZEWLEKŁYM WYSIŁKU FIZYCZNYM

APOPTOSIS IN SKELETAL MUSCLES AND KIDNEY  
AFTER ACUTE AND CHRONIC EXERCISE

Marzena PODHORSKA-OKOŁÓW

Katedra Histologii i Embriologii Akademii Medycznej we Wrocławiu

*Streszczenie:* Rola apoptozy w organizmie dojrzałym polega na usuwaniu komórek zbędnych, uszkodzonych lub potencjalnie niebezpiecznych. Do czynników indukujących apoptozę należą m.in. czynniki uszkadzające DNA jądrowe, takie jak: stres oksydacyjny czy częściowe niedotlenienie komórek. Wysiłek fizyczny, zwłaszcza w nietrenowanych organizmach może prowadzić do powstania uszkodzeń w wielu narządach. Wykazano, że intensywny wysiłek fizyczny może powodować wystąpienie apoptozy w aktywnych mięśniach szkieletowych, jednak jest ona ograniczona jedynie do jąder komórkowych. Przypuszczalnie odmiennosc przebiegu apoptozy we włóknach szkieletowych wynika z obecności w każdym z nich setek jąder komórkowych, dlatego uszkodzenie pojedynczych jąder nie wpływa na ogólny metabolizm i funkcję całego włókna. W odróżnieniu od mięśni, apoptoza w nerkach po intensywnym wysiłku ma klasyczny przebieg i jest ograniczona jedynie do komórek kanalików dystalnych i cewek zbiorczych. Mechanizm powysiłkowej indukcji apoptozy w mięśniach i nerkach jest prawdopodobnie złożony. Podczas intensywnego wysiłku zarówno w bezpośrednio pracujących mięśniach szkieletowych, jak i narządach odległych, niez zaangażowanych bezpośrednio może dojść do wystąpienia stresu oksydacyjnego. W mięśniach szkieletowych stres oksydacyjny wynika ze zwiększonego zużycia tlenu, natomiast w nerce jest spowodowany zmniejszeniem przepływu krwi i częściowym niedotlenieniem komórek kanalików nerkowych, z następową ich reperfuzją po zakończeniu wysiłku. Ponadto, w kanalikach nerkowych apoptoza może być również indukowana przez specyficzne receptory angiotensyny II (Ang II), AT1 i AT2. Ich ekspresja wzrasta podczas intensywnego wysiłku w wyniku aktywacji nerkowego układu renina-angiotensyna. Regularny wysiłek fizyczny ma bardzo korzystny wpływ na utrzymanie prawidłowego funkcjonowania narządów, przez co może zapobiegać powstawaniu wielu zaburzeń i chorób. Wykazano, że stopniowe przystosowanie się do intensywnego wysiłku znacznie ogranicza uszkodzenie struktur komórkowych, a także występowanie nasilonej apoptozy zarówno w mięśniach szkieletowych, jak i nerkach. W trenowanych organizmach wykształcają się odpowiednie mechanizmy adaptacyjne. W mięśniach szkieletowych wzrasta aktywność enzymów obrony antyoksydacyjnej – dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i peroksydazy glutationowej (GPx), natomiast w nerce stopniowo zmniejsza się stężenie Ang II oraz ekspresja receptorów AT1 i AT2. Istotą treningu adaptacyj-

nego jest stopniowe przystosowywanie się całego organizmu do wzrastającego poziomu obciążenia fizycznego, co zapobiega występowaniu uszkodzeń i umożliwia utrzymanie prawidłowej funkcji wielu narządów.

*Słowa kluczowe:* apoptoza, mięśnie szkieletowe, nerki, wysiłek fizyczny.

*Summary:* Apoptosis in adult organism plays a role in removing of unnecessary, damaged or potentially dangerous cells. Apoptosis inducing factors include DNA damaging factors, such as oxidative stress or partial ischemia. Physical exercise may lead to disturbance and damage in many organs, especially in untrained organisms. It has been demonstrated that an intense exercise could finally lead to apoptosis in skeletal muscles, however apoptotic changes were restricted to single myonuclei. The reason is probably related to the presence of hundreds myonuclei in single myofiber, therefore the damage of single myonuclei is not important in overall metabolism and function of the entire myofiber. In contrast to the skeletal muscle, exercise-induced apoptosis in the kidney displayed characteristic morphological features of classical apoptotic cell death, and was confined to the distal tubules and collecting ducts. The mechanism in which post-exercise apoptosis is activated seems to be complex and may involve oxidative stress occurring not only in skeletal muscles but also in many distant organs. The oxidative stress during exercise might be a result of considerable increase in oxygen utilization in working skeletal muscles or of ischemia-reperfusion phenomenon, which could occur especially in not working organs, such as kidney. Moreover, the kidney apoptosis could be induced by angiotensin II (Ang II) receptors, AT1 and AT2, which expression increased in response to the activation of renin-angiotensin system during intense exercise. However, the moderate, regular exercise training is known to improve the physiological and functional capacity of many organs what finally may lead to prevention of a number of disorders. The moderate adaptive training was demonstrated to reduce post-exercise damage, including apoptosis in skeletal muscles as well as in kidney. In trained individuals may develop adaptive mechanisms. In working skeletal muscles increased activities of antioxidant enzymes, superoxide dismutases (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) while in kidney progressively decreased the Ang II releasing, followed by decreased expression of AT1 and AT2 receptors. The moderate, increasing activity regular training is associated with beneficial changes in metabolic functions of many organs.

*Key words:* apoptosis, skeletal muscle, kidney, physical exercise.

## APOPTOZA

W organizmach wielokomórkowych homeostaza komórek jest utrzymywana poprzez równowagę między ich proliferacją i śmiercią. W warunkach fizjologicznych procesowi powstawania nowych komórek stale towarzyszy zjawisko eliminacji komórek zbędnych lub uszkodzonych. Usuwanie tych komórek następuje w wyniku uruchomienia w nich procesu apoptozy, która jest jednym z dwóch rodzajów śmierci. W odróżnieniu od nekrozy, apoptoza jest fizjologicznym, genetycznie zaprogramowanym procesem eliminacji pojedynczych komórek. Stanowi główny mechanizm regulujący liczbę komórek i ostateczny kształt narządów podczas rozwoju osobniczego. W organizmie dojrzałym w drodze apoptozy usuwane są komórki niepotrzebne lub potencjalnie niebezpieczne. Charakteryzuje ją szereg specyficznych zmian biochemicznych i morfologicznych. Komórka umierająca wskutek apoptozy w wyniku utraty wody i elektrolitów stopniowo zmniejsza swoją objętość, co prowadzi do utraty jej połączeń z sąsiednimi komórkami i macierzą. Chromatyna jądra komórkowego ulega charakterystycznej, obwodowej kondensacji. Cytoplazma ulega zagęszczeniu, natomiast organella



komórkowe pozostają niezmienione. Błona komórkowa komórki apoptotycznej nie zostaje uszkodzona, tworzą się jedynie charakterystyczne uwypuklenia na obkurczającej się komórce. W końcowych stadiach apoptozy jądro komórkowe oraz zagęszczona cytoplazma ulegają fragmentacji. Ostatecznie cała komórka rozpada się na tzw. ciała apoptotyczne. Zawierają one fragmenty zęszczonej chromatyny jądrowej, cytoplazmy oraz niezmienione organella komórkowe. Ciała apoptotyczne otoczone są błoną komórkową, co zapobiega wydostawaniu się na zewnątrz ich zawartości i powstawaniu odczynów zapalnych. W wyniku aktywacji procesu apoptozy w błonie komórkowej dochodzi do translokacji fosfatydyloseryny z powierzchni wewnątrzkomórkowej na powierzchnię zewnątrzkomórkową, co umożliwia sąsiednim komórkom lub makrofagom natychmiastowe rozpoznanie umierającej komórki i fagocytozę ciałek apoptotycznych [44, 50].

Charakterystyczne zmiany morfologiczne zachodzące w komórce umierającej w drodze apoptozy są wynikiem uaktywnienia w niej licznych przemian biochemicznych, pozostających pod ścisłą kontrolą genetyczną. Zaprogramowana aktywacja szlaków biochemicznych doprowadza do wybiórczej proteolizy wybranych składników komórek i rozkładu DNA na nukleosomy, czyli fragmenty zawierające ok. 180–200 par zasad lub ich wielokrotności [96].

W przebiegu apoptozy wyróżnia się trzy etapy: **indukcja**, w którym podejmowana jest decyzja o śmierci, **egzekucja**, w którym dochodzi do nieodwracalnej proteolizy kluczowych białek w komórce przez proteazy, zwane kaspazami, oraz **degradacja**, w którym następuje usuwanie ciałek apoptotycznych przez sąsiednie komórki i/lub makrofagi. Faza egzekucji i degradacji przebiega podobnie w większości komórek i prowadzi do powstania charakterystycznych biochemicznych i morfologicznych zmian, natomiast faza indukcji może przebiegać różnie w zależności od czynnika wywołującego apoptozę. Rozróżnia się dwie podstawowe ścieżki indukcji apoptozy: zewnątrzpochodną, tzw. receptorową oraz wewnątrzpochodną, tzw. mitochondrialną. Indukcja apoptozy w drodze zewnątrzpochodnej zachodzi w komórkach mających na swej powierzchni receptory, zwane receptorami śmierci. Należy do nich rodzina receptorów TNF (*tumor necrosis factor*), np. TNF typu I, FAS (CD95) oraz dwa receptory dla TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*). Połączenie receptora ze specyficznym ligandem oraz cytoplazmatycznym białkiem adaptorowym prowadzi do aktywacji kaspazy 8, która z kolei powoduje uruchomienie tzw. kaskady kaspaz, prowadzącej do aktywacji kaspaz wykonawczych 3, 6 i 7 [26]. Niekiedy transdukcja sygnału apoptotycznego przez receptor TNF typu I powoduje rozkład obecnej w błonie komórkowej sfgomielininy na fosfocholinę i ceramid, który może być czynnikiem kierującym komórkę na drogę apoptozy. Indukcja apoptozy ścieżką wewnątrzpochodną, zwaną mitochondrialną, zachodzi w wyniku zadziałania na komórkę bodźców uszkadzających lub stresowych, takich jak: niedotlenienie, stres oksydacyjny, promieniowanie ultrafioletowe czy brak czynników wzrostu, prowadzących nieuchronnie do uszkodzenia DNA. W komórce z uszkodzonym DNA następuje wzrost ekspresji białka p53, zwanego „strażnikiem genomu”, co powoduje zatrzymanie komórki w fazie G1 cyklu komórkowego, pozwalając na ewentualną naprawę uszkodzeń. Jeśli uszkodzenie DNA jest zbyt duże, białko p53 indukuje ekspresję białka proapoptotycznego Bax, a także ekspresję

receptora Fas w błonie komórkowej. Białko Bax przemieszcza się do błony zewnętrznej mitochondriów, gdzie bierze udział w tworzeniu tzw. megakanałów, przez które uwalniane są do cytoplazmy z przestrzeni międzybłonowej proapoptotyczne białka, takie jak cytochrom c oraz czynnik indukujący apoptozę AIF (*apoptosis inducing factor*). Uwolniony cytochrom c wraz z cytoplazmatycznym białkiem Apaf-1 (*apoptosis protease activating factor*) i prokaspazą 9 tworzy kompleks zwany apoptosomem, w którym przy udziale energii dochodzi do powstania aktywnej kaspazy 9. Ta z kolei aktywuje kaspazy wykonawcze: 3, 6 i 7. Mitochondrialny czynnik AIF może bezpośrednio aktywować kaspazy wykonawcze oraz bierze udział w zmianach symetrii błony komórkowej (translokacja fosfatydylseryny do zewnętrznej powierzchni błony) [93].

Kaspazy wykonawcze biorą udział w degradacji białek szkieletu aktywnego komórki wpływając na powstanie uwypukleń błony komórkowej. Powodują także proteolizę enzymów naprawczych DNA, jak również białek hamujących nukleazy. To z kolei prowadzi do aktywacji nukleaz, głównie DNA-zy aktywowanej przez kaspazy, czyli CAD (*caspase activated DNA-se*). Nukleaza CAD powoduje fragmentację DNA jądrowego na fragmenty wielkości nukleosomu lub jego wielokrotności, będące biochemicznym markerem komórki apoptotycznej [96].

Klasyczna apoptoza została opisana w komórkach jednojądrzastych. W ostatnich latach ukazało się szereg doniesień na temat występowania tego procesu w wielojądrzastych włóknach mięśni szkieletowych [60]. Przebieg tego procesu w komórkach wielojądrzastych różni się morfologicznie od klasycznej apoptozy brakiem fragmentacji całej komórki na ciała apoptotyczne, zmiany są ograniczone jedynie do pojedynczych jąder komórkowych [71].

W organizmie dojrzałym apoptoza ogrywa ważną rolę w wielu procesach fizjologicznych, takich jak wymiana komórek nabłonkowych oraz w eliminacji komórek patologicznie zmienionych (zmutowanych, zainfekowanych, nowotworowych). Zaburzenia funkcjonowania apoptozy mogą być przyczyną rozwoju wielu chorób, takich jak choroby nowotworowe czy degeneracyjne [87]. W ostatnich latach wykazano również obecność apoptozy w wielu narządach po intensywnym wysiłku fizycznym, zwłaszcza w nietrenowanych organizmach [60, 67–69, 77].

## MECHANIZMY APOPTOZY W WYSIŁKU FIZYCZNYM

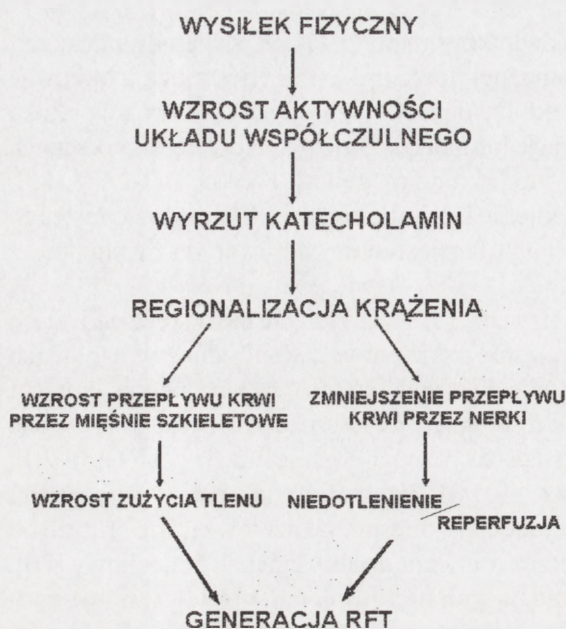
Mechanizm wystąpienia apoptozy po wysiłku fizycznym nie jest w pełni wyjaśniony. W wielu doniesieniach podkreśla się rolę stresu oksydacyjnego w indukcji apoptozy powysiłkowej [60]. Stres oksydacyjny występuje w wyniku zaburzenia równowagi między produkcją reaktywnych form tlenu (RFT) a wewnątrzkomórkowymi systemami tzw. obrony antyoksydacyjnej. W komórkach istnieje wiele systemów antyoksydacyjnych, umożliwiających obniżenie stężenia RFT [36]. Należą do nich enzymy rozkładające RFT, takie jak dysmutaza ponadtlenkowa (SOD, *superoxide dismutase*), katalaza (CAT, *catalase*) czy peroksydaza glutationowa (GPX, *glutathione peroxida-*

se), a także związki nieenzymatyczne, takie jak: metalotioneina (MT), zredukowany glutation oraz witaminy C i E [24].

RFT powodują utlenianie różnych składników komórki, takich jak: lipidy, białka czy DNA, co prowadzi do utraty ich biologicznej funkcji [28, 35]. RFT mogą indukować apoptozę bezpośrednio, w wyniku uszkodzenia DNA, z następową aktywacją białka p53 lub pośrednio, wpływając na aktywację lub hamowanie czynników transkrypcyjnych genów regulujących proces apoptozy, np. z rodziny genów TNF- $\alpha$ , Bcl-2 [28, 89]. Ponadto, wykazano, że RFT przez utlenianie kardiolipiny, fosfolipidu występującego jedynie w błonie mitochondrialnej, mogą bezpośrednio wpływać na uwalnianie z mitochondrium cytochromu c [54].

Stres oksydacyjny podczas wysiłku fizycznego może wystąpić nie tylko w narządach bezpośrednio zaangażowanych (np. mięśnie szkieletowe), ale również w narządach odległych, niebiorących bezpośrednio udziału w wysiłku (np. wątroba, nerki). W wielu doniesieniach wykazano istotną rolę stresu oksydacyjnego, jako głównego czynnika indukującego apoptozę podczas wysiłku fizycznego w mięśniach szkieletowych, komórkach krwi i tymocytach [1, 3, 48, 49, 60]. Znacznie zwiększone zużycie tlenu (nawet 100-krotnie) przez intensywnie pracujące mięśnie szkieletowe może prowadzić do zwiększonego wytwarzania RFT przez mitochondrialny łańcuch oddechowy [20]. Natomiast powstawanie RFT w niepracujących narządach odległych jest prawdopodobnie związane ze zmianami dystrybucji przepływu krwi w organizmie. W wyniku wysiłku fizycznego ulega aktywacji część współczulna układu autonomicznego, przejawiająca się wzmożonym wyrzutem katecholamin wpływających m.in. na regulację układu naczyniowego i przepływu krwi (regionalizacja krążenia, czyli wzrost przepływu przez pracujące mięśnie, zmniejszenie przepływu przez niepracujące narządy, np. nerki czy wątrobę). Z powodu zmniejszenia przepływu krwi w narządach niebiorących bezpośrednio udziału w wysiłku może dojść do częściowego niedotlenienia komórek, z następową ich reperfuzją po jego zakończeniu. Proces niedotlenienia/reperfuzji jest jednym z najczęstszych mechanizmów generujących RFT (ryc. 1) [15].

Innym czynnikiem mogącym brać udział w indukcji zmian apoptotycznych w niektórych narządach po wysiłku fizycznym jest angiotensyna II (Ang II). Wzrost aktywności układu współczulnego oraz redystrybucja krwi podczas wysiłku powodują pobudzenie układu renina-angiotensyna. Końcowy, aktywny peptyd tego układu, Ang II, powstaje w wyniku rozkładu krążącego we krwi nieaktywnego decapeptydu, Ang I, przez enzym śródbłonna naczyń płucnych, zwany konwertazą angiotensyny [14]. Zwiększone stężenie Ang II w wielu narządach może powodować uszkodzenia komórek, prowadzące nawet do ich śmierci w drodze apoptozy [7, 9, 62]. Ang II działa na komórki poprzez swoje receptory – AT1 i AT2, których aktywacja prowadzi do różnych efektów [42]. Większość znanych funkcji Ang II, takich jak: skurcz naczyń czy wydzielanie aldosteronu, a na poziomie komórkowym – proliferacja i wzrost komórek, jest związana z jej działaniem przez receptor AT1. Natomiast aktywacja receptora AT2 wpływa na rozszerzenie naczyń, a na poziomie komórkowym powoduje zahamowanie wzrostu komórek, ich różnicowanie się lub wejście na drogę apoptozy [16]. Wiele ostatnich badań wykazało jednak, że tak przeciwstawne procesy, jak apoptoza i proliferacja są wynikiem jednoczesnego współdziałania obu receptorów [12, 64, 65].



RYCINA 1. Mechanizmy prowadzące do wytwarzania RFT podczas wysiłku fizycznego. W wyniku regionalizacji krążenia w bezpośrednio zaangażowanych w wysiłek mięśniach szkieletowych następuje znaczny wzrost zużycia tlenu prowadzący do generacji RFT. W niezaangażowanych bezpośrednio w wysiłek nerkach zmniejszenie przepływu krwi, a następnie przywrócenie prawidłowego krążenia po zaprzestaniu wysiłku może przypominać mechanizm niedotlenienia/reperfuzji prowadzący do produkcji RFT

## APOPTOZA W MIĘŚNIACH SZKIELETOWYCH PO WYSIŁKU FIZYCZNYM

Normalne, dojrzałe włókno mięśniowe jest wysoce wyspecjalizowane i nie ma zdolności do podziału. Częściowa regeneracja uszkodzonych włókien mięśniowych może zachodzić jedynie dzięki obecności komórek satelitarnych, które są nieaktywnymi mioblastami, mającymi zdolność proliferacji i odtwarzania wielojądrzastych zespólni. W dojrzałym włóknie mięśniowym, będącym wielojądrzastym syncytium, występowanie apoptozy jest trudne do zdefiniowania ze względu na jego odmienność morfologiczną. Klasyczna apoptoza została opisana w komórkach jednojądrzastych, rozumiałe jest więc nieuchronne obumarcie całej komórki w wyniku uszkodzenia jej jądra. Dotychczasowe doniesienia na temat możliwości występowania apoptozy w wielojądrzastych włóknach mięśniowych są nadal kontrowersyjne. Część autorów uważa, że apoptoza, a właściwie programowana śmierć komórki, występuje jedynie podczas rozwoju mięśni regulując liczbę powstających włókien mięśniowych oraz ostateczny kształt i wielkość mięśnia, a także w niecałkowicie dojrzałych mięśniach szkieletowych noworodków z atrofią rdzeniowo-mięśniową [21, 22]. W ostatnich latach opisuje się jednak występowanie apoptozy w dojrzałych włóknach mięśni szkieletowych, w takich stanach patologicznych, jak dystrofia mięśniowa czy atrofia odnerwienna mięśni, a także w wyniku wysiłku fizycznego [77].

## Jednorazowy, intensywny wysiłek fizyczny

Wpływ wysiłku fizycznego na mięśnie szkieletowe dojrzałego organizmu jest badany już od wielu lat. Wysiłek o znacznej intensywności, zwłaszcza w organizmach nietreningowanych, może przyczynić się do uszkodzenia włókien mięśniowych. Stopień uszkodzenia zależy od rodzaju wykonywanych skurczów mięśniowych. Skurcze ekscentryczne (w których mięsień jest rozciągany) powodują większe uszkodzenie aktywnych mięśni niż skurcze izometryczne (bez zmiany długości mięśnia) czy koncentryczne (w których mięsień jest skracany) [62]. Do niedawna przypuszczano, że powysiłkowe uszkodzenie mięśni szkieletowych związane jest z wystąpieniem w nich zmian martwiczych oraz zapalnych. Jednak w ostatnim dziesięcioleciu pojawiły się doniesienia o występowaniu powysiłkowej apoptozy w mięśniach szkieletowych [60].

Dotychczasowe dane literaturowe oraz własne obserwacje [67–69] wskazują, że intensywny wysiłek fizyczny może indukować zmiany o charakterze apoptotycznym w nietreningowanych mięśniach szkieletowych. W badaniach własnych, przeprowadzonych zarówno na zdrowych, jak i dystroficznych (mdx) myszach, które spontanicznie biegały na kółku treningowym przez 16 godzin, przy użyciu metody TUNEL wykazano obecność zmian apoptotycznych w pojedynczych jądrach, z największym ich nasileniem w ciągu pierwszych sześciu godzin od zaprzestania wysiłku [68, 69]. Badania w mikroskopie elektronowym wykazały obecność zmian morfologicznych typowych dla apoptozy jedynie w pojedynczych jądrach włókien mięśniowych. Nigdy nie obserwowano zmian cytoplazmatycznych ani obecności ciałek apoptotycznych. Odmienność przebiegu apoptozy w komórkach wielojądrowych, jakimi są dojrzałe włókna mięśniowe, w porównaniu z klasyczną apoptozą, opisywaną w komórkach jednojądrzastych, wynika prawdopodobnie z różnic w morfologii włókien mięśni szkieletowych. Uszkodzenie pojedynczych jąder w komórce wielojądrowej nie prowadzi do zaburzeń jej funkcjonowania, gdyż ich utrata nie wpływa na całkowity metabolizm włókna mięśniowego. Nadal jednak nieznanym jest sposób usuwania apoptotycznych jąder.

Obecność apoptozy we włóknach mięśniowych po ostrym wysiłku została potwierdzona przy użyciu wielu metod. Za pomocą elektroforezy, stwierdzono obecność charakterystycznej dla apoptozy, regularnej fragmentacji DNA (tzw. „drabinki” DNA) [67, 69]. W pojedynczych jądrach mięśniowych wykazano powysiłkowy wzrost ekspresji białka p53, a także ubikwitinację białek jądrowych, co wskazywałoby na przeznaczenie tych jąder do degradacji [77, 78]. W sarkoplazmie, przy użyciu metody immunocytochemicznej, potwierdzonej Western Blottingiem, wykazano znaczne zmniejszenie ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl-2 oraz zwiększenie ekspresji proapoptotycznego białka Bax w pierwszych sześciu godzinach po zaprzestaniu wysiłku, kiedy obserwuje się nasilenie zmian apoptotycznych. Stosunek Bcl-2/Bax uległ odwróceniu po kilku dniach odpoczynku. Apoptoza w jądrach włókien mięśniowych po intensywnym wysiłku fizycznym jest indukowana drogą wewnątrzpochodną. Uszkodzenie DNA jądrowego powoduje wzrost ekspresji białka p53, które z kolei wpływa na zwiększenie ekspresji białka proapoptotycznego Bax. Ciekawe, że w tych samych włóknach, w których obserwowano wzrost ekspresji Bax, wykazano jednocześnie zwiększoną ekspresję receptora Fas w błonie komórkowej, również w pierwszych

sześciu godzinach od zaprzestania wysiłku, co wskazywałoby równoczesną możliwość powysiłkowej aktywacji apoptozy drogą zewnątrzpochodną [69].

Mechanizm indukcji apoptozy we włóknach mięśniowych poddanych intensywnemu wysiłkowi fizycznemu jest złożony i niedostatecznie jeszcze poznany. Podkreśla się ważną rolę stresu oksydacyjnego występującego podczas intensywnych ćwiczeń w aktywnych mięśniach szkieletowych. Zwiększony metabolizm tkanki mięśniowej i wzrost zapotrzebowania na tlen (nawet 100-krotny) powoduje, że w pracujących mięśniach dochodzi do rozszerzenia w nich tętniczek i zwieraczy przedwłośniczkowych. Wzrost zużycia tlenu może jednak prowadzić do niewydolności wewnątrzkomórkowych układów redukcyjnych, czego skutkiem jest zwiększone wytwarzanie RFT. Dodatkowo, w pracujących mięśniach szkieletowych, zwłaszcza podczas skurczów ekscentrycznych, może dochodzić również do zmian przepływu krwi przez wywołaną wysiłkiem hipoksję (niedotlenienie) i następującą po niej reperfuzję (przekrwienie). Przypomina to klasyczny mechanizm niedotlenienia/reperfuzji, mogący prowadzić do generacji RFT [51]. Ponadto, mechaniczne uszkodzenia włókien w wyniku nadmiernego wysiłku fizycznego może wywołać w nich proces zapalny, z naciekaniem neutrofilii, mających zdolność wytwarzania RFT [72].

Niezależnie od mechanizmu wytwarzania, RFT zaburzając strukturę i funkcję białek, lipidów i DNA jądrowego, oraz wpływając na aktywację lub hamowanie czynników transkrypcyjnych regulujących m.in. aktywację genów pro- i antyapoptotycznych, mogą indukować apoptozę w aktywnych włóknach mięśniowych. W większości badań stwierdzono istotny wzrost wytwarzania RFT w mięśniach szkieletowych po wysiłku fizycznym, oznaczając produkty ich reakcji ze składnikami komórkowymi, do których najczęściej należy oznaczanie stopnia nasilenia peroksydacji lipidów [23, 34, 43, 73, 94]. Metody bezpośredniego oznaczania RFT są niezwykle kosztowne i mało czułe ze względu na krótki okres półtrwania RFT, stąd najczęściej stosowaną metodą ich wykrywania jest badanie poziomu wskaźników peroksydacji lipidów, najbardziej znanego biologicznego procesu wolnorodnikowego. Najczęściej oznacza się poziom TBARS (substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym), MDA (malonydialdehydu) i 4-HDA (4-hydroksyalkenali). W pojedynczych doniesieniach nie opisano jednak zmian poziomu peroksydacji lipidów po intensywnym wysiłku fizycznym [80]. Sprzeczne rezultaty wynikają prawdopodobnie z rodzaju metody oznaczania poziomu produktów peroksydacji lipidów, a także z różnic w intensywności ćwiczeń.

W prawidłowych warunkach, w odpowiedzi na zwiększone wytwarzanie RFT w komórkach, dochodzi do wzrostu aktywności systemu obrony antyoksydacyjnej, którego zadaniem jest zneutralizowanie nadmiernej ilości RFT. Ponieważ w pracujących mięśniach szkieletowych stwierdzono w porównaniu z innymi narządami największy wzrost wytwarzania RFT, mechanizmy obrony antyoksydacyjnej powinny być w nich dobrze rozwinięte. Istotnie, wykazano w porównaniu z innymi narządami stosunkowo dużą aktywność enzymów obrony antyoksydacyjnej, jak i związków nieenzymatycznych nawet w spoczynkowych mięśniach. Zarówno u zwierząt, jaki i u ludzi stwierdzono również znaczny wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych, głównie SOD i GPX, w mięśniach szkieletowych nawet po jednorazowym, intensywnym wysiłku fizycznym

[32–34, 73, 90]. W systemie obrony antyoksydacyjnej mięśni szkieletowych istotną rolę ogrywają również związki nieenzymatyczne zarówno endo-, jak i egzogenne. Wykazano znaczny wzrost ekspresji metalotioneiny (MT) oraz jej korelację z poziomem peroksydacji lipidów w mięśniach szkieletowych w odpowiedzi na ostry wysiłek fizyczny [60]. Ponadto, stwierdzono ważną rolę witaminy E w usuwaniu RFT generowanych podczas wysiłku. Jak wykazano w licznych badaniach, brak witaminy E w diecie powoduje znaczny wzrost wytwarzania RFT w mięśniach szczurów poddanych wysiłkowi fizycznemu [25, 34, 41].

### Trening adaptacyjny

Wbrew doniesieniom o możliwości szkodliwego działania intensywnego wysiłku fizycznego nie tylko na mięśnie szkieletowe, w licznych badaniach wykazano jego korzystny wpływ na utrzymanie prawidłowego funkcjonowania narządów, a także zapobieganie powstawaniu wielu chorób [13, 18, 27, 37, 57]. Podkreśla się ogromne znaczenie stopniowego treningu adaptacyjnego w zapobieganiu występowania uszkodzeń powysiłkowych. Istotną rolę odgrywa prawdopodobnie rozwinięcie się w wielu narządach mechanizmów adaptacyjnych do zwiększonego wysiłku fizycznego.

W badaniach własnych stwierdzono znaczne zmniejszenie nasilenia apoptozy w mięśniach szkieletowych po 8-tygodniowym treningu adaptacyjnym. Przy użyciu wielu metod, w tym Western Blottingu oraz RT-PCR, Siu i wsp. [84] wykazali znaczny wzrost ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl-2 i jego m-RNA oraz białek stresowych z rodziny HSP70 (*heat shock protein*) w mięśniach szkieletowych szczurów po adaptacji wysiłkowej. Białka HSP70, produkowane w komórce w odpowiedzi na różne formy stresu, np. stres oksydacyjny czy podwyższenie temperatury, zapobiegają degradacji innych białek komórkowych oraz przyspieszają rozpad i usuwanie białek zniszczonych lub niepotrzebnych [31]. W najnowszych doniesieniach podkreśla się również antyapoptotyczne działanie białek HSP70 przez hamowanie uwalniania cytochromu c z mitochondriów [47], a także przez ich bezpośrednie wiązanie się z cytoplazmatycznym białkiem Apaf-1 i blokowaniem tworzenia się apoptosomu [5]. Ponadto, mięśnie szkieletowe po treningu adaptacyjnym wykazywały znacznie zmniejszoną ekspresję proapoptotycznego białka Bax.

Stopniowy trening zwiększa zdolność mięśni szkieletowych do wykonywania wysiłków oraz zwiększa maksymalną zdolność do pochłaniania tlenu nawet o 20%. Podczas systematycznego treningu zwiększa się ilość kapilarów (nawet o 15%), wzrasta zawartość mioglobiny, a także liczba mitochondriów i ich wydajność, co wpływa na podniesienie zdolności tkanki mięśniowej do tlenowego metabolizmu [62]. W wielu doniesieniach wykazano zmniejszenie poziomu peroksydacji lipidów w mięśniach szkieletowych poddanych treningowi adaptacyjnemu, co prawdopodobnie wiąże się ze wzrostem zdolności mięśnia szkieletowego do pochłaniania i redukcji tlenu [23, 53, 74, 90]. Ponadto, w mięśniach szkieletowych po adaptacji wysiłkowej stwierdzono znaczny wzrost aktywności enzymów obrony antyoksydacyjnej, SOD oraz GPX, co wskazuje na ich istotną rolę w mechanizmie przystosowania się tkanki mięśniowej do długotrwałego wysiłku fizycznego i związanej z nim zwiększonej generacji RFT [6, 27, 30, 34, 35, 49,

56, 70, 76, 82]. Trening adaptacyjny wywołuje też istotne zmiany w stężeniu nieenzymatycznych antyoksydantów. Zaobserwowano, że stężenie witaminy E, egzogenego antyoksydanta, w mięśniach poddanych przewlekłemu wysiłkowi ulega znacznemu obniżeniu, natomiast dostarczenie witaminy E w diecie podczas długotrwałych ćwiczeń wpływa na zmniejszenie wytwarzania RFT [41]. Postuluje się nawet możliwość przyjmowania zwiększonej ilości witaminy E przez aktywnie trenujących [46]. W badaniach Bobillier Chaumont [8] stwierdzono, że trening adaptacyjny nie wpływa na stężenie MT w mięśniach szkieletowych, co może sugerować nieistotną rolę MT w procesie adaptacyjnym mięśni szkieletowych.

## **APOPTOZA W NERKACH PO WYSIŁKU FIZYCZNYM**

Apoptoza pełni w nerkach ważną rolę nie tylko podczas ich rozwoju, ale również w organizmie dojrzałym umożliwiając wymianę niepotrzebnych komórek nabłonkowych kanalików nerkowych. W prawidłowej, dojrzałej nerce apoptozę obserwuje się w stosunkowo małym stopniu, jednak może ulec znacznemu nasileniu w uszkodzeniach lub chorobach nerek [86]. Obecność nasilonej apoptozy w kanalikach nerkowych stwierdzono w ostrej niedokrwiennej niewydolności nerek [29]. Ponadto zaburzenia w prawidłowym przebiegu apoptozy mogą doprowadzić do rozwoju wielu chorób nerek, takich jak: zapalenie śródmiąższowe czy zwłóknienie nerek [9].

### **Jednorazowy, intensywny wysiłek fizyczny**

Liczne badania z ostatnich lat wykazały, że w dojrzałej nerce najbardziej wrażliwe na uszkodzenie i śmierć w drodze apoptozy są komórki kanalików nerkowych oraz podocyty kłębków nerkowych [17, 58].

W badaniach własnych stwierdzono istotny wzrost apoptozy, badanej metodą TUNEL, w kanalikach nerkowych po intensywnym wysiłku fizycznym [66]. Zmiany apoptotyczne ograniczone są do komórek kanalików dystalnych i cewek zbiorczych, natomiast nigdy nie stwierdzono ich obecności w kanalikach proksymalnych. Obserwacja w mikroskopie elektronowym potwierdziła obecność charakterystycznych, obkurczonych komórek apoptotycznych, ze skondensowaną chromatyną, a także obecność ciałek apoptotycznych jedynie w kanalikach dystalnych oraz cewkach zbiorczych. Ciałka apoptotyczne są usuwane bezpośrednio do światła kanalika, co wydaje się prostszym sposobem niż ich fagocytoza przez makrofagi czy sąsiednie komórki. Podobnie, badania przeprowadzone na nerkach po niedotlenieniu/reperfuzji wykazały obecność apoptozy jedynie w komórkach kanalików dystalnych [55]. Co więcej, zaobserwowano silną ekspresję proapoptotycznego białka Bax w komórkach kanalików dystalnych, natomiast w komórkach kanalików proksymalnych silną ekspresję antyapoptotycznego białka Bcl-2, co może stanowić częściowe wyjaśnienie ograniczenia apoptozy jedynie do kanalików dystalnych [55, 79]. Potwierdzałyby to możliwość indukcji apoptozy w kanalikach dystalnych po intensywnym wysiłku fizycznym w drodze mechanizmu



niedotlenienie/reperfuzja. Wiadomo, że nawet nieznaczne niedotlenienie komórek kanalików nerkowych może spowodować ich uszkodzenie. Ze względu na małą zdolność produkcji ATP drogą glikolizy, komórki kanalika proksymalnego są bardziej wrażliwe na niedotlenienie niż komórki kanalika dystalnego, mające znacznie większą zdolność glikolityczną. Dlatego też niedotlenienie komórek kanalika proksymalnego prowadzi do niedoboru ATP, co powoduje ich śmierć drogą nekrozy, natomiast niedotlenienie komórek kanalika dystalnego, przy ich zdolności do beztlenowej syntezy ATP, może prowadzić do ich śmierci w drodze apoptozy [10, 58].

Ekspresja białek z rodziny Bcl-2 jest zależna od białka p53, którego aktywacja w wyniku nieodwracalnego uszkodzenia DNA może skierować komórkę na drogę apoptozy. W badaniach własnych stwierdzono silną ekspresję białka p53 w jądrach i jednocześnie zmiany apoptotyczne [65].

Pomimo że nerki nie są narządem biorącym bezpośrednio udziału w wysiłku fizycznym, wywiera on duży wpływ na ich czynność. Podczas intensywnego wysiłku dochodzi do aktywacji układu współczulnego, wzrostu stężenia katecholamin i Ang II, czego efektem jest skurcz naczyń i zmniejszenie przepływu krwi przez nerki (RBF, *renal blood flow*). Skurcz tętniczek kłębuszkowych doprowadzających i odprowadzających prowadzi do zmniejszenia filtracji kłębuszkowej (GFR, *glomerular filtration rate*) i spadku diurezy. Przy intensywnym wysiłku fizycznym RBF może zmniejszyć się nawet o 30–40% [85]. Skurcz naczyń, który w zależności od intensywności wysiłku może doprowadzić do niedotlenienia komórek kanalików nerkowych z następującym ich rozszerzeniem po zakończeniu wysiłku, przypomina mechanizm niedotlenienia/reperfuzji, będący jedną z najczęstszych przyczyn wzrostu produkcji RFT.

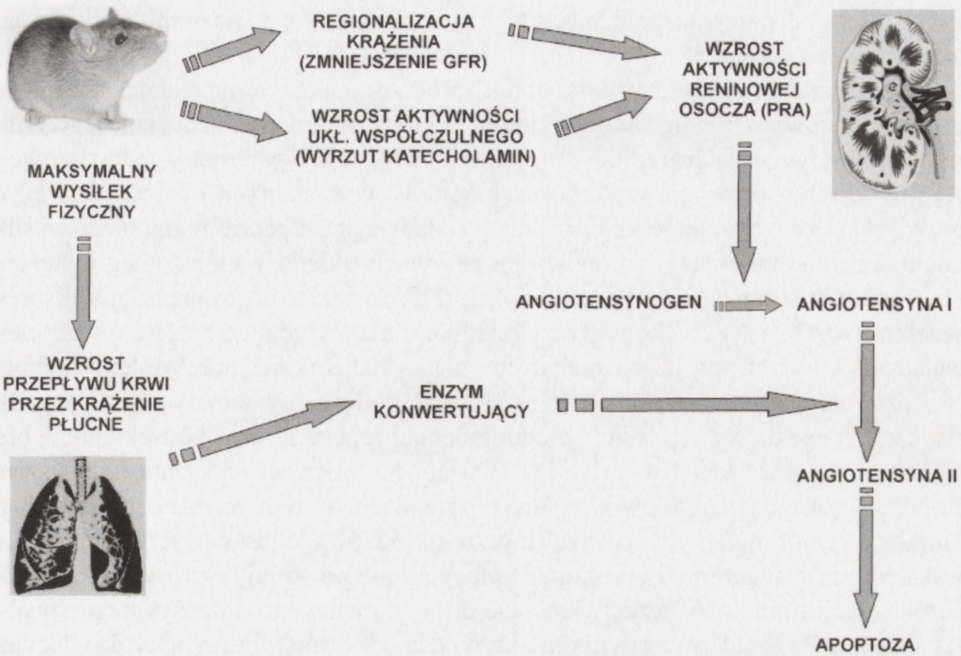
Wyniki licznych badań na temat wzrostu wytwarzania RFT w nerkach podczas wysiłku fizycznego są wciąż kontrowersyjne. Niektóre dane z piśmiennictwa [2, 27] oraz własne obserwacje wskazują, że intensywnemu wysiłkowi fizycznemu towarzyszy wzrost stężenia wskaźników peroksydacji lipidów w nerce szczura, natomiast w innych badaniach nie wykazano tych zmian [49, 81]. Różnice najprawdopodobniej wynikają z użycia różnych gatunków zwierząt, modeli ich trenowania (rodzaj i intensywność ćwiczeń), a także z zastosowania różnych metod do oznaczania wskaźników peroksydacji lipidów.

Dotychczasowe dane literaturowe oraz własne badania nie wykazały zmian w aktywności enzymów SOD, CAT czy GPx w nerkach po intensywnym wysiłku fizycznym. Przyпуска się, że endogenny system antyoksydacyjny nerki jest zdolny do efektywnego usunięcia ilości RFT generowanych podczas wysiłku i dlatego nie obserwuje się wzrostu jego aktywności [49, 81, 82].

W systemie obrony antyoksydacyjnej komórek oprócz enzymów ważną rolę pełnią również związki nieenzymatyczne, do których należy m.in. MT. Jest to niskocząsteczkowe białko ochronne komórki. Pełni funkcję detoksykacyjną, chroniąc komórkę przed działaniem metali ciężkich (np. kadm, rtęć, ołów) poprzez ich wiązanie i tworzenie nieaktywnych kompleksów [19]. Ponadto MT ma zdolność do dezaktywacji wolnych rodników tlenowych, co pozwoliło na zaliczenie jej do systemu antyoksydacyjnego komórki [92]. Wykazano również antyapoptotyczne działanie MT nie tylko poprzez dezaktywację RFT, mogących uszkodzić DNA, ale również poprzez hamowanie uwal-

niania cytochromu c z mitochondriów [11, 91]. Nerka jest narządem, w którym MT pełni szczególnie ważną rolę, chroniąc komórki kanalików proksymalnych przed działaniem zarówno toksycznym metali ciężkich, jak i uszkadzającym RFT [63]. Antyoksydacyjne oraz antyapoptotyczne właściwości MT wykazano w wielu badaniach związanych z wytwarzaniem RFT w wyniku niedotlenienia/reperfuzji w mięśniu sercowym [39, 40, 92]. Stwierdzono również znaczny wzrost ekspresji tego białka w kanalikach nerkowych podczas stresu oksydacyjnego w wyniku ich niedotlenienia i następnej reperfuzji [88]. Ponadto, MT znacznie zmniejsza nefro- i kardiotoxycyżność wielu leków przeciwnowotworowych, takich jak cisplatyna, doxorubicyna, których metabolizm generuje RFT [4, 19, 45]. Ostatnie własne badania z zastosowaniem metody immunocytochemicznej i półilościowej oceny reakcji barwnej wg skali IRS (wg Remmele i Stegnera) wykazały, że po intensywnym wysiłku ekspresja MT wzrasta w kanalikach proksymalnych nerki, natomiast nie obserwowano jej w komórkach kanalików dystalnych [63]. Antyoksydacyjna i antyapoptotyczna ochrona kanalików proksymalnych przez MT mogłaby wyjaśnić brak występowania zmian apoptotycznych w komórkach tych kanalików w odpowiedzi na generowane podczas wysiłku RFT. Natomiast pozbawione ochronnego działania MT komórki kanalików dystalnych w wyniku uszkodzenia przez RFT umierają wskutek apoptozy.

Aktywacja układu współczulnego podczas wysiłku fizycznego oraz wzrost stężenia katecholamin powoduje pobudzenie układu renina-angiotensyna w aparacie przykłębkowym nerki. Ang II, końcowy, aktywny „produkt” tego układu odgrywa ważną rolę w regulacji ciśnienia tętniczego poprzez wpływ na naczynia krwionośne, jak również w regulacji transportu jonów sodu i wody w kanalikach dystalnych oraz cewkach zbiorczych w nerce. Ponadto, wykazano, że Ang II poprzez swoiste receptory, AT1 i AT2, może bezpośrednio stymulować zarówno proliferację, jak i apoptozę komórek (ryc. 2) [83]. Do niedawna uważano, że oba receptory wywierają przeciwny efekt na poziomie komórkowym, jednak ostatnie badania oraz własne obserwacje wykazały, że współdziałanie między nimi determinuje wejście komórki na drogę proliferacji lub apoptozy [12, 65]. Apoptoza w komórce może być indukowana nie tylko w wyniku aktywacji receptora AT1, prowadzącej do wzrostu generacji RFT, lecz także przez aktywację receptora AT2 przez wytwarzanie w błonie komórkowej ceramidu [9, 94, 95]. Ponadto, stymulacja zarówno receptora AT1, jak i AT2 może prowadzić do zwiększenia w komórce ekspresji białka p53 i uruchomienia w niej procesu apoptotycznego (ryc. 3). Natomiast nieprawidłowa stymulacja receptorów może być przyczyną rozwoju wielu procesów patologicznych [38]. W badaniach własnych, z zastosowaniem metody immunocytochemicznej, potwierdzonej metodą Western Blottingu, zaobserwowano wzrost ekspresji zarówno białka receptorowego AT1, jak i AT2 w komórkach kanalika dystalnego i cewek zbiorczych po intensywnym wysiłku fizycznym [64]. Zarówno zmiany apoptotyczne, jak i ekspresja receptorów AT1 i AT2 współistnieją w tym samym rodzaju komórek, co może sugerować istotną rolę receptorów Ang II w indukcji apoptozy w komórkach kanalików dystalnych i cewek zbiorczych po wysiłku [65]. Z drugiej strony, po przewlekłej infuzji Ang II stwierdzono obecność komórek apoptotycznych w kanalikach proksymalnych, zarówno *in vitro* oraz *in vivo*



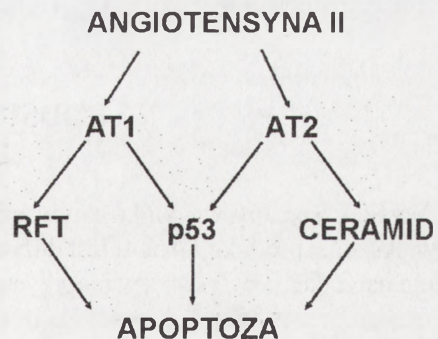
RYCINA 2. Mechanizm aktywacji układu renina-angiotensyna podczas wysiłku fizycznego. Efektem wzrostu aktywności układu współczulnego oraz redystrybucji krwi podczas wysiłku jest zmniejszenie filtracji kłębuszkowej nerek (GFR), co prowadzi do wzrostu aktywności reninowej osocza. Ang II powstaje w wyniku rozkładu przez reninę angiotensynogenu na Ang I, która z kolei pod wpływem enzymu konwertującego w naczyniach płucnych ulega przemianom w aktywny peptyd Ang II. Ang II jest czynnikiem mogącym indukować w komórkach proces apoptozy

[7, 12]. Prawdopodobnie aktywacja receptorów AT1 i AT2 w komórkach poszczególnych kanalików nerkowych zależy od stężenia Ang II.

Należy jednak podkreślić, że Ang II przez receptor AT1 może indukować wewnątrz-komórkową produkcję RFT, co mogłoby wskazywać na wspólną ścieżkę obu przy-puszczalnych mechanizmów indukcji apoptozy po wysiłku fizycznym.

### Trening adaptacyjny

Regularny wysiłek fizyczny wpływa na poprawę funkcji hemodynamicznych, hormonalnych oraz metabolicznych w wielu narządach [8]. Trening wywołuje w narzą-



RYCINA 3. Schemat przypuszczalnych mechanizmów aktywacji apoptozy poprzez receptory angiotensyny II, AT1 i AT2 (wg [9], zmodyfikowane)

dach zmiany adaptacyjne, polegające na przystosowaniu się do poziomu realizowanej aktywności fizycznej [62].

Ostatnie badania własne wykazały brak nasilenia apoptozy w kanalikach nerkowych po 8-tygodniowym treningu adaptacyjnym, mimo że parametry intensywności wysiłku w ostatnich tygodniach treningu znacznie przewyższały parametry jednorazowego wysiłku. Prawdopodobnie w komórkach kanalików dystalnych i cewek zbiorczych rozwinęły się antyapoptotyczne mechanizmy adaptacyjne. Podczas regularnego wysiłku dochodzi do stopniowego zmniejszenia aktywacji układu współczulnego, stężenia katecholamin i obniżenia wytwarzania Ang II. Prowadzi to do zmniejszenia ekspresji receptorów AT1 i AT2 w komórkach kanalików nerkowych, co zostało wykazane w badaniach własnych przy użyciu metody immunocytochemicznej oraz Western Blottingu.

Rezultatem zmniejszenia poziomu Ang II podczas systematycznego wysiłku fizycznego jest niewystępowanie niedotlenienia i reperfuzji, a w konsekwencji, brak wzrostu wytwarzania RFT w nerce [75]. W wielu doniesieniach wykazano zmniejszenie stopnia peroksydacji lipidów w różnych narządach, w tym również w nerkach po długotrwałym, regularnym wysiłku fizycznym [52, 53]. Własne obserwacje również wskazują, że 8-tygodniowy trening adaptacyjny nie powoduje wzrostu wskaźników peroksydacji lipidów, w przeciwieństwie do jednorazowego, intensywnego wysiłku fizycznego. Po regularnym treningu aktywność enzymów obrony antyoksydacyjnej SOD, CAT i GPx w nerkach nie ulega zmianie, podobnie jak po jednorazowym, intensywnym wysiłku fizycznym [30, 36, 49, 76]. W naszych badaniach stwierdzono również brak zmian ekspresji nieenzymatycznego antyoksydanta – MT, w komórkach kanalików proksymalnych po treningu adaptacyjnym. Powyższe dane wskazują na nieistotną rolę antyoksydacyjnego systemu zarówno enzymatycznego, jak i nieenzymatycznego w procesie adaptacyjnym w narządach niebiorących bezpośrednio udziału w wysiłku, takich jak nerki. Mechanizm antyapoptotycznej adaptacji komórek kanalików nerkowych po długotrwałym treningu jest związany prawdopodobnie ze zmniejszoną ekspresją receptorów Ang II, AT1 i AT2.

## PODSUMOWANIE

Wysiłek fizyczny, w wyniku aktywacji układu współczulnego, wyrzutu katecholamin i zwiększonej produkcji Ang II jest dużym stresem, mogącym doprowadzić do zmian w wielu narządach, zwłaszcza w nieprzystosowanych organizmach. Z dotychczasowych doniesień oraz z własnych obserwacji wynika, że intensywny wysiłek fizyczny może indukować apoptozę w narządach zarówno bezpośrednio zaangażowanych w wysiłek, takich jak mięśnie szkieletowe, jak i niebiorących bezpośredniego udziału, takich jak np. nerki. Proces apoptozy we włóknach mięśni szkieletowych dotyczy jedynie pojedynczych jąder, co wynika z ich odmiennej morfologii. Apoptoza w kanalikach nerkowych jest ograniczona do komórek kanalików dystalnych oraz cewek zbiorczych, a jej przebieg przypomina klasyczną apoptozę. Mechanizm indukcji apoptozy po

intensywnym wysiłku fizycznym jest prawdopodobnie złożony i różny w narządach bezpośrednio pracujących oraz niezaangażowanych bezpośrednio. W aktywnych mięśniach szkieletowych apoptoza jest indukowana stresem oksydacyjnym, natomiast w nerkach indukcja apoptozy jest bardziej złożona i przypuszczalnie jest związana zarówno z aktywacją receptorów Ang II, AT1 i AT2, jak również ze stresem oksydacyjnym. Trening adaptacyjny prowadzi do zmniejszenia nasilenia apoptozy zarówno w mięśniach szkieletowych, jak i w kanalikach nerkowych. W procesie adaptacji mięśni szkieletowych do wysiłku fizycznego odgrywa istotną rolę zwiększenie aktywności enzymów sytemu obrony antyoksydacyjnej, a także ekspresji białka antyapoptotycznego Bcl-2 oraz HSP70. Natomiast w nerkach adaptacja jest związana prawdopodobnie z fizjologicznym, stopniowym zmniejszaniem się aktywacji układu współczulnego, spadkiem stężenia katecholamin i zmniejszeniem produkcji Ang II oraz ekspresji jej receptorów, AT1 i AT2.

Istotą długotrwałego treningu wysiłkowego jest powstanie w narządach odpowiednich mechanizmów adaptacyjnych, co zapobiega powstawaniu powysiłkowych uszkodzeń oraz umożliwia wykonywanie nawet intensywnych ćwiczeń bez zaburzenia funkcji narządów.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ARSLAN S, ERDEM S, KILINC K, SIVRI A, TAN E, HASCELİK Z. Free radical changes in rat muscle tissue after exercise. *Rheumatol Int* 2001; **20**: 109–112.
- [2] AYDIN C, INCE E, KOPARAN S, CANGUL IT, NAZIROGLU M, AK F. Protective effects of long term dietary restriction on swimming exercise-induced oxidative stress in the liver, heart and kidney of rat. *Cell Biochem Funct* 2005, w druku – Epub ahead of print.
- [3] AZENABOR AA, HOFFMAN-GOETZ L. Intrathymic and intrasplenic oxidative stress mediates thymocyte and splenocyte damage in acutely exercised mice. *J Appl Physiol* 1999; **86**: 1823–1827.
- [4] BAEK SM, KWON CH, KIM JH, WOO JS, JUNG JS, KIM YK. Differential roles of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in cisplatin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells. *J Lab Clin Med* 2003; **142**: 178–186.
- [5] BEERE HM, WOLF BB, CAIN K, MOSSER DD, MAHBOUBI A, KUWANA T, TAILOR P, MORIMOTO RI, COHEN GM, GREEN DR. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2000; **2**: 469–475.
- [6] BENDERITTER M, HADJ-SAAD F, LHUISSIER M, MAUPOIL V, GUILLAND JC, ROCHETTE L. Effects of exhaustive exercise and vitamin B<sub>6</sub> deficiency on free radical oxidative process in male trained rats. *Free Radic Biol Med* 1996; **21**: 541–549.
- [7] BHASKARAN M, REDDY K, RADHAKRISHANAN N, FRANKI N, DING G, SINGHAL PC. Angiotensin II induces apoptosis in renal proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; **284**: F955–F965.
- [8] BOBILLIER CHAUMONT S, MAUPOIL V, LAHET JJ, BERTHELOT A. Effect of exercise training in metallothionein levels of hypertensive rats. *Med Sci Sport Exerc* 2001; **33**: 724–728.
- [9] BONNET F, CAO Z, COOPER ME. Apoptosis and angiotensin II: yet another renal regulatory system? *Exp Nephrol* 2001; **9**: 295–300.
- [10] BONVENTRE JV. Mechanism of ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 1993; **43**: 1160–1178.
- [11] BUTCHER HL, KENNETTE WA, COLLINS O, ZALUPS RK, KOROPATNICK J. Metallothionein mediates the level and activity of nuclear factor kappa B in murine fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; **310**: 589–598

- [12] CAO Z, KELLY DR, COX A, CASLEY D, FORBES JM, MARTINELLO P, DEAN R, GILBERT RE, COOPER ME. Angiotensin type 2 receptor is expressed in the adult rat kidney and promotes cellular proliferation and apoptosis. *Kidney Int* 2000; **58**: 2437–2451.
- [13] CHICCO AJ, HYDOCK DS, SCHNEIDER CM, HAYWARD R. Low intensity exercise training during doxorubicin treatment protects against cardiotoxicity. *J Appl Physiol* 2005; **100**: 519–527.
- [14] DI BONA GF. Peripheral and central interactions between the renin-angiotensin system and the renal sympathetic nerves in control of renal function. *Ann N Y Acad Sci* 2001; **940**: 395–406.
- [15] DI MEO S, VENDITTI P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept* 2001; **10**: 125–140.
- [16] DIMMELER S, RIPPMANN V, WEILAND U, HANDELER J, ZEIHNER AM. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. *Circ Res* 1997; **81**: 970–976.
- [17] DING, REDDY K, KAPASI AA, FRANKI N, GIBBONS N, KASINATH BS, SINGHAL PC. Angiotensin II induces apoptosis in rat glomerular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; **283**: F173–F180.
- [18] DONALDSON LJ. Sport and exercise: the public health challenge. *Br J Sports Med* 2000; **34**: 409–415.
- [19] DZIĘGIEL P, SUROWIAK P, ZABEL M. Correlation of histopathological and biochemical appraisal of anthracyclin-induced myocardium damage. *Folia Histochem Cytobiol* 2002; **40**: 127–128.
- [20] FEHRENBACH E, NORTHOFF H. Free radicals, exercise, apoptosis and heat shock proteins. *Exerc Immunol Rev* 2001, **7**: 66–89.
- [21] FIDZIAŃSKA A, GOEBEL HH, WARLO I. Acute infantile spinal muscular atrophy. *Brain* 1990; **113**: 433–445.
- [22] FIDZIAŃSKA A. Human ontogenesis. Ultrastructural characteristic of developing human muscle. *J Neuropathol Exp Neurol* 1980, **39**: 475–486.
- [23] FRANKIEWICZ-JOZKO A, FAFF J, SIERADZAN-GABELSKA B. Changes in concentration of tissue free radical marker and serum creatine kinase during the post-exercise period in rats. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1996; **74**: 470–474.
- [24] GALLE J. Oxidative stress in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transpl* 2001; **16**: 2135–2137.
- [25] GOLDFARB AH, MCINTOSH MK, BOYER BT, FATOUROS J. Vitamin E effects on indexes of lipid peroxidation in muscle from DHEA-treated and exercised rats. *J Appl Physiol* 1994; **76**: 1630–1635.
- [26] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Apoptoza i nowotwory. *Post Biol Kom* 2000; **27** Suppl: 9–43.
- [27] GUNDUZ F, SENTURK UK, KURU O, AKTEKIN B, AKTEKIN MR. The effect of one year's swimming exercise on oxidant stress and antioxidant capacity in aged rats. *Physiol Res* 2004; **53**: 171–176.
- [28] GWINNER W, GRONE HJ. Role of reactive oxygen species in glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transpl* 2000; **15**: 1127–1132.
- [29] HAUSER P, OBERBAUER R. Tubular apoptosis in the pathophysiology of renal disease. *Wien Klin Wochenschr* 2002; **114**: 671–677.
- [30] HONG H, JOHNSON P. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in exercised and hypertensive rat tissues. *Int J Biochem Cell Biol* 1995; **27**: 923–931.
- [31] JETHON Z, MURAWSKA-CIAŁOWICZ E, DZIĘGIEL P, PODHORSKA-OKOŁÓW M. Udział białek stresowych w adaptacji wysiłkowej. *Post Biol Kom* 2005; **32**: 697–706.
- [32] JI LL, FU RG. Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. *J Appl Physiol* 1992a; **72**: 549–554.
- [33] JI LL. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med Sci Sports Exerc* 1992b; **25**: 225–231.
- [34] JI LL. Antioxidants and oxidative stress. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; **222**: 283–292.
- [35] JI LL. Exercise, oxidative stress, and antioxidants. *Am J Sports Med* 1996; **24**: S20–S24.
- [36] JI LL. Exercised-induced modulation of antioxidant defense. *Ann N Y Acad Sci* 2002; **959**: 82–92.
- [37] JIN H, YANG R, LI W, LU H, RYAN AM, OGASAWARA AK, VAN PEBORGH J, PAONI NF. Effects of exercise training on cardiac function, gene expression, and apoptosis in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; **279**: H2994–H3002.
- [38] KAJSTURA J, CIGOLA E, MALHOTRA A, LI P, CHENG W, MEGGS LG, ANVERSA P. Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes *in vitro*. *J Mol Cell Cardiol* 1997; **29**: 859–870.
- [39] KANG YJ, LI G, SAARI JT. Metallothionein inhibits ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999; **276**: H993–H997.
- [40] KANG YJ, LI Y, SUN X, SUN X. Antiapoptotic effect and inhibition of ischemia/reperfusion-induced myocardial injury in metallothionein-overexpressing transgenic mice. *Am J Pathol* 2003; **163**: 1579–1586.

- [41] KANTER MM, NOLTE LA, HOLLOSZY JO. Effect of antioxidant vitamin mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise. *J Appl Physiol* 1993; **74**: 965–969.
- [42] KASCHINA E, UNGER T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press* 2003; **12**: 70–88.
- [43] KAYATEKIN BM, GONENC S, ACIKGOZ O, UYSAL N, DAYI A. Effects of sprint exercise on oxidative stress in skeletal muscle and liver. *Eur J Appl Physiol* 2002; **87**: 141–144.
- [44] KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-range implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; **26**: 239–253.
- [45] KIMURA T, FUJITA I, ITOH N, MUTO N, NAKANISHI T, TAKAHASHI K, AZUMA J, TANAKA K. Metallothionein acts as a cytoprotectant against doxorubicin toxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; **292**: 299–302.
- [46] KUMAR CT, REDDY VK, PRASAD M, THYAGARAJU K, REDDANNA P. Dietary supplementation of vitamin E protects heart tissue from exercise-induced oxidative stress. *Mol Cell Biochem* 1992; **111**: 109–115.
- [47] LI CY, LEE JS, KO YG, KIM JI, SEO JS. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem* 2000; **275**: 25665–25671.
- [48] LIN YS, KUO HL, KUO C, WANG S, YANG B, CHEN H. Antioxidant administration inhibits exercise-induced thymocyte apoptosis in rats. *Med Sci Sports Exerc* 1999; **31**: 1594–1598.
- [49] LIU J, YEO HC, OVERVIK-DOUKIE, HAGEN T, DONIGER SJ, CHYU DW, BROOKS GA, AMES BN. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J Appl Physiol* 2000; **89**: 21–28.
- [50] MAJNO G, JORIS I. Apoptosis, oncosis and necrosis. *Am J Pathol* 1995; **146**: 3–15.
- [51] MARTINEZ-CAYUELA M. Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie* 1995; **77**: 147–161.
- [52] MIYAZAKI H, OH-ISHI S, OOKAWARA T, KIZAKI T, TOSHINAI K, HA S, HAGA S, JI LL. Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol* 2001; **84**: 1–6.
- [53] NIESS AM, DICKHUTH HH, NORTHOFF H, FEHRENBACH E. Free radicals and oxidative stress in exercise – immunological aspects. *Exerc Immunol Rev* 1999; **5**: 22–56.
- [54] NOMURA K, IMAI H, KOUMURA T, KOBAYASHI T, NAKAGAWA Y. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrom c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *Biochem J* 2000; **351**: 183–193.
- [55] OBERBAUER R, SCHWARZ C, REGELE HM, HANSMANN C, MEYER TW, MEYER G. Regulation of renal tubular cell apoptosis and proliferation after ischemic injury to a solitary kidney. *J Lab Clin Med* 2001; **138**: 343–351.
- [56] OH-ISHI S, KIZAKI T, OOKAWARA T, SAKURAI T, IZAWA T, NAGATA N, OHNO H. Endurance training improves the resistance of rat diaphragm to exercise-induced oxidative stress. *Am J Crit Care Med* 1997; **156**: 1579–1585.
- [57] OZTASAN N, TAYSI S, GUMUSTEKIN K, ALTINKAYNAK K, AKTAS O, TIMUR H, SIKTAR E, KELES S, AKAR S, AKCAY F, DANE S, GUL M. Endurance training attenuates exercise-induced oxidative stress in erythrocytes in rat. *Eur J Appl Physiol* 2004; **91**: 622–627.
- [58] PADANILAM BJ. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003 **284**: F608–F627.
- [59] PENKOWA M, KELLER P, KELLER C, HIDALGO J, GIRALT M, PEDERSEN BK. Exercise-induced metallothionein expression in human skeletal muscle fibres. *Exp Physiol* 2005; **90**: 477–486.
- [60] PHANEUF S, LEEUWENBURGH C. Apoptosis and exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2000; **33**: 393–396.
- [61] PIERZCHALSKI P, REISS K, CHENG W, CIRIELLI C, KAJSTURA J, NITAHARA JA, RIZK M, CAPOGROSSI MC, ANVERSA P. p53 induces myocyte apoptosis via activation of renin-angiotensin system. *Exp Cell Res* 1997; **234**: 57–65.
- [62] PILACZYŃSKA-SZCZĘŚNIAK Ł, CELICHOWSKI J. Wpływ wysiłku fizycznego na mięśnie szkieletowe. [w] Górski J [red.]. Fizjologiczne podstawy wysiłku fizycznego. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2002: 145–152.
- [63] PODHORSKA-OKOŁÓW M, DZIEGIEL P, DOLINSKA-KRAJEWSKA B, CEGIELSKI M, DUMANSKA M, JETHON Z, ROSSINI K, CARRARO U. Expression of metallothionein in renal tubules of rats exposed to acute and endurance exercise. *Folia Histochem Cytobiol* 2006 – w druku.

- [64] PODHORSKA-OKOŁÓW M, DZIEGIEL P, GOMULKIEWICZ A, DOLINSKA-KRAJEWSKA B, MURAWSKA-CIALOWICZ E, JETHON Z, ZABEL M. The role of AT1 and AT2 angiotensin receptors in the mechanism of apoptosis in renal tubular cells after physical exercise. *Rocz Akad Med Białymst* 2004a; **49** Suppl.1: 8–10.
- [65] PODHORSKA-OKOŁÓW M, DZIEGIEL P, GOMULKIEWICZ A, KISIĘLA D, DOLINSKA-KRAJEWSKA B, JETHON Z, CARRARO U, ZABEL M. Exercise-induced apoptosis in rat kidney is mediated by both angiotensin AT1 and AT2 receptors. *Histol Histopathol* 2006; **21**: 459–466.
- [66] PODHORSKA-OKOŁÓW M, DZIEGIEL P, MURAWSKA-CIALOWICZ E, KRAJEWSKA B, CIESIELSKA U, JETHON Z, ZABEL M. Exercise-induced apoptosis in the renal tubular cells of the rat. *Folia Morphol* 2004b; **63**: 213–216.
- [67] PODHORSKA-OKOŁÓW M, KRAJEWSKA B, CARRARO U, ZABEL M. Apoptosis in mouse skeletal muscles after physical exercise. *Folia Histochem Cytobiol* 1999; **37**: 127–128.
- [68] PODHORSKA-OKOŁÓW M, SANDRI M, BRUSON A, CARRARO U, MASSIMO M L, ARSLAN P, MONTI D, COSSARIZA A, FRANCESCHI C. Apoptotic myonuclei appear in adult skeletal muscle of normal and mdx mice after a mild exercise. *Basic Appl Myol* 1995; **5**: 87–90.
- [69] PODHORSKA-OKOŁÓW M, SANDRI M, ZAMPIERI S, BRUN B, ROSSINI K, CARRARO U. Apoptosis of myofibers and satellite cells: exercise-induced damage in skeletal muscle of the mouse. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998; **24**: 518–531.
- [70] POHLMAN TH, HARLAN JM. Adaptive responses of the endothelium to stress. *J Surg Res* 2000; **89**: 85–119.
- [71] PRIMEAU AJ, ADHIHETTY PJ, HOOD DA. Apoptosis in heart and skeletal muscle. *Can J Appl Physiol* 2002; **27**: 349–395.
- [72] PYNE DB. Regulation of neutrophil function during exercise. *Sports Med* 1994; **17**: 245–258.
- [73] RADAK Z, ASANO K, INOUE M, KIZAKI T, OH-ISHI S, SUZUKI K, TANIGUCHI N, OHNO H. Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. *J Appl Physiol* 1995; **79**: 129–135.
- [74] RADAK Z, KANEKO T, TAHARA S, NAKAMOTO H, OHNO H, SASVARI M, NYAKAS C, GOTO S. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med* 1999; **27**: 69–74.
- [75] RAY CA, HUME KM. Sympathetic neural adaptation to exercise training in humans: insight from microneurography. *Med Sci Sports Exerc* 1998; **30**: 387–391.
- [76] REDDY AVULA CP, FERNANDEZ G. Modulation of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in salivary gland and other tissues in mice by moderate treadmill exercise. *Aging (Milano)* 1999; **11**: 246–252.
- [77] SANDRI M, CARRARO U, PODHORSKA-OKOŁÓW M, RIZZI C, ARSLAN P, MONTI D, FRANCESCHI C. Apoptosis, DNA damage and ubiquitin expression in normal and mdx fibers after exercise. *FEBS Lett* 1995; **373**: 291–295.
- [78] SANDRI M, PODHORSKA-OKOŁÓW M, GEROMEL V, RIZZI C, ARSLAN P, FRANCESCHI C, CARRARO U. Exercise induces myonuclear ubiquitination and apoptosis in dystrophin deficient muscle of mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; **56**: 45–57.
- [79] SCHWARZ C, HAUSER P, STEININGER R, REGELE H, HEINZE G, MAYER G, OBERBAUER R. Failure of BCL-2 up-regulation in proximal tubular epithelial cells of donor kidney biopsy specimens is associated with apoptosis and delayed graft function. *Lab Invest* 2002; **82**: 941–948.
- [80] SELMAN C, MCLAREN JS, COLLINS AR, DUTHIE GG, SPEAKMAN JR. Antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation, and DNA oxidative damage: the effects of short-term voluntary wheel running. *Arch Biochem Biophys* 2002; **401**: 255–261.
- [81] SEMIN I, ACIKGOZ O, GONENC S, UYSAL N, KAYATEKIN BM. Antioxidant enzyme levels in intestinal and renal tissues after a 60-minute exercise in untrained mice. *Acta Physiol Hung* 2001; **88**: 55–62.
- [82] SEMIN I, KAYATEKIN BM, GONENC S, ACIKGOZ O, UYSAL N, DELEN Y, GURE A. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels of intestinal, renal and muscle tissues after a 60-minute exercise in trained mice. *Indian J Physiol Pharmacol* 2000; **88**: 55–62.
- [83] SIRAGY HM. AT1 and AT2 receptor in the kidney: role in health and disease. *Semin Nephrol* 2004; **24**: 93–100.
- [84] SIU P, BRYNER RW, MARTYN JK, ALWY SE. Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. *FASEB J* 2004; **18**: 1150–1162.



- [85] SMOLEŃSKI O. Wpływ wysiłku fizycznego na czynność nerek. [w] Górski J [red.]. Fizjologiczne podstawy wysiłku fizycznego. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2002: 145–152.
- [86] SORENSON CM. Life, death and kidneys: regulation of renal programmed cell death. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998; **7**: 5–12.
- [87] STELLER H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995; **267**: 1456–1462.
- [88] TAKAHASHI T, ITANO Y, NOJI S, MATSUMOTO K, TAGA N, MIZUKAWA S, TODA S, MATSUMI M, MORITA K, HIRAKAWA M. Induction of renal metallothionein in rats with ischemic renal failure. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2001; **110**: 147–160.
- [89] TYLICKI L, RUTKOWSKI B, HORL WH. Antioxidants: a possible role in kidney protection. *Kidney Blood Press Res* 2003; **26**: 303–314.
- [90] VENDITTI P, DI MEO S. Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. *Arch Biochem Biophys* 1996; **331**: 63–68.
- [91] WANG G, KLEIN JB, KANG YJ. Metallothionein inhibits doxorubicin-induced mitochondrial cytochrome c release and caspase-3 activation in cardiomyocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2001a; **298**: 461–468.
- [92] WANG G, ZHOU Z, KLEIN JB, KANG J. Inhibition of hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in metallothionein-overexpressing cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001b; **280**: H2292–H2299.
- [93] WÓJCIK C. Apoptoza. [w] Kawiak J, Zabel M [red.]. Seminaria z cytofizjologii. Urban & Partner, Wrocław 2002: 88–101.
- [94] WOLF G. Angiotensin II as a mediator of tubulointerstitial injury. *Nephrol Dial Transplant* 2000a; **15** Suppl6: 61–63.
- [95] WOLF G. Free radical production and angiotensin. *Curr Hypertens Rep* 2000b; **2**: 167–173.
- [96] WYLLIE AH, MORRIS RG, SMITH AL, DUNLOP D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 1984; **142**: 67–77.

*Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak*

*Otrzymano: 05.04. 2006 r.*

*Przyjęto: 05.05. 2006 r.*

*ul. Chałubińskiego 6a, 50-368 Wrocław*

*e-mail: mapod@hist.am.wroc.pl*



## SYMPLASTOWY TRANSPORT BIAŁEK I RNA U ROŚLIN

### SYMPLASMIC TRANSPORT OF PROTEINS AND RNA IN PLANTS

Paulina NOWAKOWSKA, Jan KOPCEWICZ

Zakład Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin,  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

**Streszczenie:** Symplastowy transport białek i RNA jest wciąż dopiero poznawanym mechanizmem przekazywania informacji między komórkami roślin. Transport ten może zachodzić w sposób selektywny bądź też nieselektywny, w obrębie sąsiadujących komórek, tkanek lub całej rośliny. Proces ten regulowany jest podczas życia rośliny oraz w odpowiedzi na warunki środowiskowe. Wciąż zwiększa się liczba opisywanych białek i cząsteczek RNA transportowanych między komórkami przez plazmodesmy i w obrębie całej rośliny za pośrednictwem floemu. Znane są przykłady transportu mRNA genów *KN1* czy *CmNCAP1*. Ostatnio scharakteryzowano szereg małych RNA obecnych we floemie kilku gatunków roślin odpowiadających zarówno si-, jak i miRNA. Opisano także 27 kDa białko CmPSRPI wiążące specyficznie małe, jednoniciowe RNA i umożliwiające ich przenikanie przez plazmodesmy z komórek towarzyszących do komórek sitowych floemu. Coraz więcej wiadomo również o mechanizmie rozprzestrzeniania się sygnału wyciszenia w procesie systemowego PTGS (ang. *Post Transcriptional Gene Silencing*). Sygnał wyciszenia transportowany jest w postaci 21 nt siRNA amplifikowanego co 10–15 komórek i następnie przenoszono do kolejnych komórek.

**Słowa kluczowe:** transport symplastowy, NCAP (*Non-Cell-Autonomous Protein*), transport RNA.

**Summary:** The symplasmic transport of protein and RNAs has emerged as a novel mechanism of cell to cell communication in plant. This movement can occur in selective or a non-selective way between neighbouring cells, tissues or in whole plant. The symplasmic transport is under control both during plant development and in response to environmental conditions. The knowledge about RNAs and proteins that move from cell to cell through plasmodesmata and in the whole plant through phloem is still growing. The transport of mRNA such genes like *KN1* or *CmNCAP1*, has been also described. Recently, it has been shown that phloem sap of some plants species contains an endogenous population of small RNAs corresponding to si- and miRNAs. Additionally, it has been identified 27 kDa phloem protein CmPSRPI which binds selectively small, single stranded RNAs which penetrate from companion cells to sieve tubes of phloem system. Recent advances have also increased our understanding of mechanism of spreading through the plant a mobile silencing signal associated with PTGS (*Post Transcriptional Gene Silencing*). This signal is transported as 21 nt siRNA which is amplified every 10–15 cells and then delivered to neighboring cells.

*Key words:* symplasmic transport, NCAP (*Non-Cell-Autonomous Protein*), RNA transport.

## WSTĘP

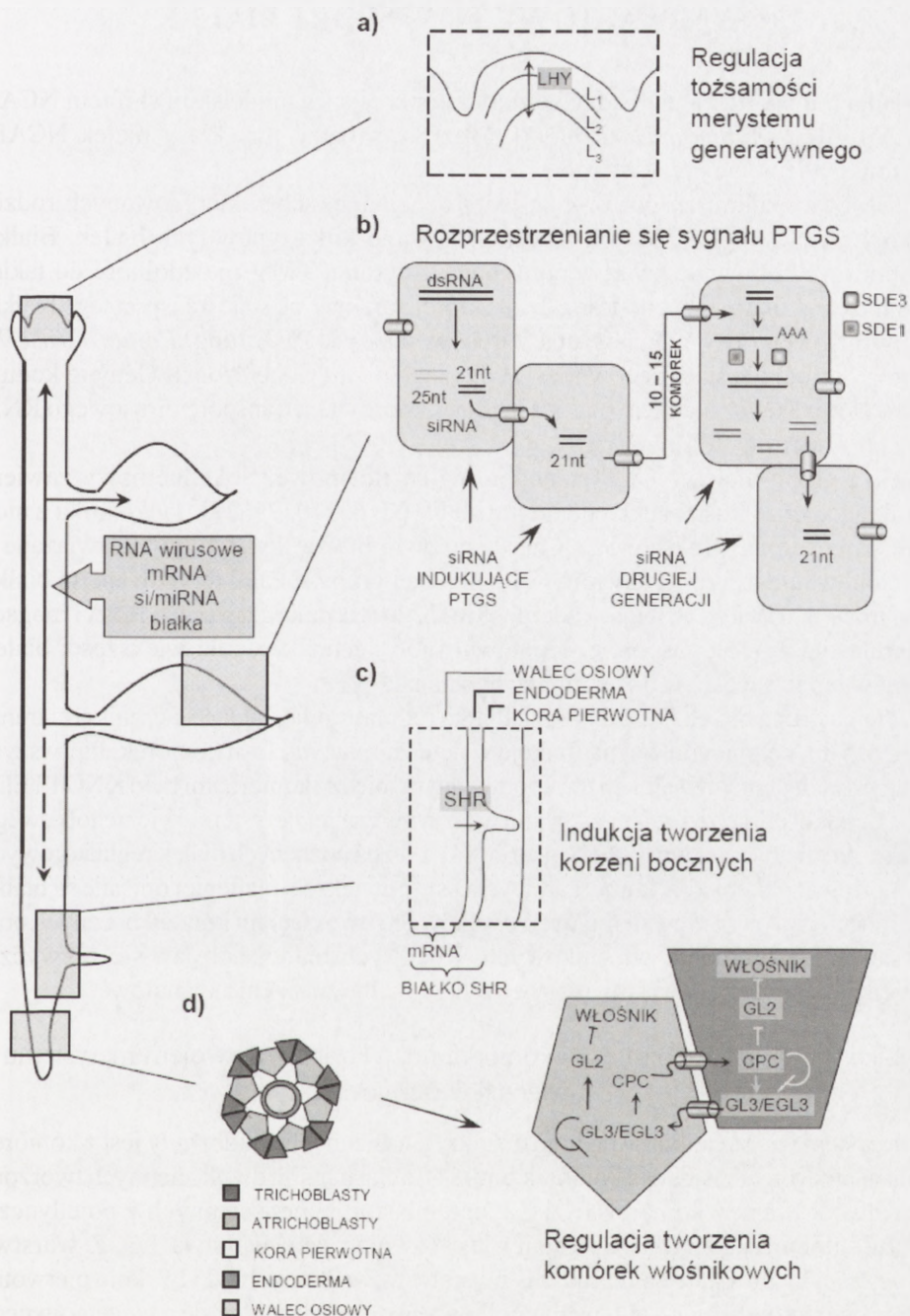
Komunikacja międzykomórkowa jest niezmiernie ważna u organizmów wielokomórkowych, dla koordynacji ekspresji genów odpowiedzialnych za podziały komórkowe i różnicowanie, a co za tym idzie właściwą morfogenezę całej rośliny i jej funkcjonowanie. W związku z tym, rośliny wytworzyły unikalną, cytoplazmatyczną (symplastową) sieć, tworzoną z komórek połączonych plazmodesmami i elementami floemu, która pozwala na bezpośrednią komunikację i transport międzykomórkowy [11, 14, 17, 46, 54, 63, 75].

Plazmodesmy (PD) są to cytoplazmatyczne połączenia międzykomórkowe otoczone plazmolemą, przechodzące w poprzek wspólnej ściany [73]. W centrum kanału PD znajduje się cylinder zespolonego retikulum endoplazmatycznego (ER), tzw. desmotubula. Na powierzchni cylindra ER ułożone są białka globularne. Desmotubula połączona jest z plazmolemą wiązkami białkowymi, a w przestrzeni, w której znajdują się wiązadła, w tzw. rękawie plazmodesmy, powstają kanały transportowe [68, 69]. Wielkość cząsteczek zdolnych do przejścia przez PD określa tzw. specyficzny przekrój czynny plazmodesm SEL (ang. *Size Exclusion Limit*). Przekrój ten nie jest stały i zależy zarówno od rodzaju komórek, stadium rozwojowego rośliny, jak i innych specyficznych czynników, takich jak: wapń (reguluje zamykanie plazmodesm przez polisacharyd – kalozę [73]), transportowe białka wirusowe MP (ang. *Movement Protein*), a także różnego rodzaju białka endogenne [69].

Kolejnym elementem organizmalnej sieci transportowej jest floem. Budują go żywe komórki rurek sitowych i ściśle do nich przylegające komórki towarzyszące. Komórki sitowe podzielone są strukturalnie na dwie części: światło, w którym przebiega transport oraz warstwę przyścienną zawierającą białka, mitochondria, plastydy i retikulum endoplazmatyczne. Dojrzałe rurki sitowe nie mają jądra komórkowego, tak więc obecne w nich białka i kwasy nukleinowe muszą być transportowane z komórek towarzyszących [71].

System symplastowy roślin służy transportowi asymilatów, hormonów i różnych metabolitów. Jednakże, plazmodesmy i floem są także miejscem transportu wielu białek, wirusowego RNA, RNA wywołującego wyciszenie genów (PTGS), a także specyficznych endogennych cząsteczek mRNA (ryc. 1) [47, 54, 61].

Ostatnimi laty pojawiło się kilka prac przeglądowych poświęconych modelom transportu, mechanizmom regulacyjnym i biologicznemu znaczeniu transportu białek i RNA przez plazmodesmy oraz floem [14, 30, 36, 40, 46, 55, 61]. Na łamach Postępów Biologii Komórki również pojawiły się publikacje o budowie i funkcjonowaniu plazmodesm [69], rurek sitowych [70] oraz o regulacji łączności symplastowej [41, 68]. Obecna praca ma na celu przybliżenie czytelnikom aktualnej wiedzy na temat białek i cząsteczek RNA transportowanych między komórkami w obrębie tkanek oraz na znaczne odległości poprzez floem, ze szczególnym uwzględnieniem krótko i długodystansowego transportu RNA.



RYCINA 1. Udział międzykomórkowego i systemowego transportu białek regulatorowych oraz RNA w rozwoju roślin. (a) Transport białka LHY w obrębie merystemu generatywnego. (b) Mechanizm rozprzestrzeniania się sygnału wyciszania pomiędzy komórkami. (c) Transport białka SHR do komórek endodermy indukuje powstawanie korzeni bocznych. (d) Transport białek CPC i GL3/EGL3 reguluje tworzenie komórek włośnikowych Szczegóły w tekście (za [30, 40] zmienione)

## 1. SYMPLASTOWY TRANSPORT BIAŁEK

Białka transportowane między komórkami określa się angielskim skrótem NCAP (ang. *Non-Cell-Autonomous Protein*). Można wyróżnić trzy klasy białek NCAP: wirusowe, floemowe i regulatorowe [30].

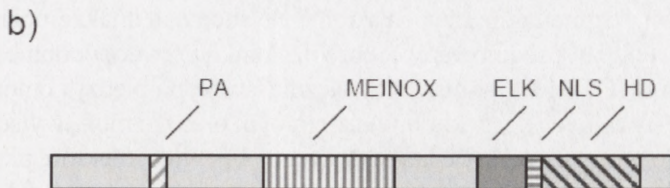
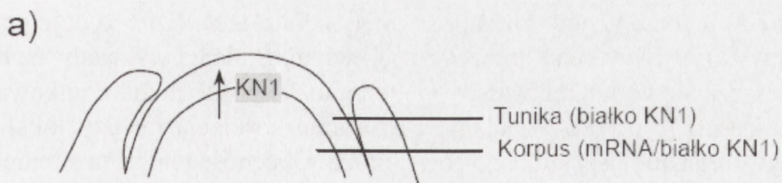
Wirusowe białka transportowe są jedną z najlepiej scharakteryzowanych rodzin białkowych NCAP [13, 78, 83]. Zidentyfikowano kilka typów tych białek. Białko transportowe kodowane przez genom mozaiki tytoniu TMV ma zdolność do takiej modyfikacji struktury plazmodesm, dzięki której możliwy się staje transport tego białka, jak i wirusowego RNA. Inna grupa wirusów, taka jak PVX (ang. *Potato Viruse X*) zawiera potrójny zestaw genów tzw. TGB (ang. *Triple Gene Block*). Geny te kodują białka, które razem z białkiem płaszczka wirusa koordynują transport wirusowego RNA przez plazmodesmy [64].

Drugą grupę białek NCAP stanowią białka floemowe. Sok floemowy zawiera zaskakująco dużą ilość białek endogennych [4, 62, 63, 70, 75, 79]. Tylko kilka z nich może wpływać na strukturę PD. Część stanowią białka konstytutywne związane z funkcjonowaniem rurek sitowych. Najlepiej z tej grupy scharakteryzowane są białka fibrylarne PP1 i PP2 [72], mające zdolność m.in. do wiązania cząsteczek RNA i mogące pośredniczyć w ich transporcie floemowym [56]. Jednakże, rola większości białek floemowych jest wciąż w dużej mierze nieznana.

Kolejną grupę białek NCAP tworzą białka regulatorowe, będące czynnikami transkrypcyjnymi, pełniącymi ważną funkcję w determinowaniu losu komórek. Pierwszym opisanym endogennym białkiem transportowanym między komórkami było KNOTTED1 (KN1), białko kukurydzy zaangażowane w utrzymywanie merystemu wierzchołkowego w stanie niezróżnicowanym [24, 28, 40, 61, 84]. Liczba poznanych białek regulatorowych transportowanych między komórkami wciąż się powiększa. Najlepiej opisane są białka związane z rozwojem merystemu wierzchołkowego, tworzeniem korzeni bocznych oraz powstawaniem komórek włosnikowych. Ruch tych białek odbywa się zazwyczaj pomiędzy kilkoma komórkami, ma więc tylko lokalne znaczenie sygnałowe.

### Białka transportowane między komórkami związane z rozwojem merystemu wierzchołkowego

Merystem wierzchołkowy pędu roślin okrytonasiennych zbudowany jest z komórek korpusu otoczonych warstwą komórek tuniki. Tunika u roślin dwuliściennych tworzona jest z dwóch warstw komórek L1 i L2, natomiast u jednoliściennych z pojedynczej warstwy komórek. Korpus określany jest również jako warstwa L3. Z warstwy zewnętrznej L1 powstaje epiderma, zaś z warstw wewnętrznych L2 i L3 kora pierwotna i walec osiowy. Gdy merystem wierzchołkowy pędu przekształca się z wegetatywnego w generatywny, powstaje płaszcz merystematyczny i trzon parenchymatyczny. Płaszcz, w skład którego wchodzi zarówno tunika, jak i zewnętrzne warstwy korpusu, daje początek podkładowym i zawiązkom kwiatów [33, 34]. Na każdym etapie rozwoju wierzchołek pędu jest specyficzną domeną symplastową, w obrębie której przemieszczają się regulatorowe białka NCAP.



PA – (ang. **P**eptide **A**ntagonist) motyw białkowy

MEINOX – podwójna domena KNOX1 i KNOX2 (*KNOTTED1*- like homeobox)

ELK – domena wymagana do lokalizacji jądrowej w białkach KNOX

NLS – sygnał lokalizacji jądrowej

HD – homeodomena

RYCINA 2. (a) Transport białka *KNOTTED1* z komórek korpusu do tuniki kontroluje utrzymanie merystemu wierzchołkowego w stanie niezróżnicowanym. (b) Schemat budowy białka *KN1*. Szczegóły w tekście (za [40, 52] zmienione)

Białko homeotypyczne kukurydzy *KN1* kontroluje utrzymanie merystemów wierzchołkowych w stanie niezróżnicowanym [24, 28]. Białko to przemieszcza się z komórek korpusu do komórek tuniki merystemu [36] (ryc. 2). Wykazano, że *KN1* ma zdolność do zwiększania SEL plazmodesm i indukuje transport kompleksu *KN1* białko - *KN1* mRNA [28, 36]. U *Arabidopsis thaliana* występują dwa białka rodziny KNOX, w której skład wchodzi białko *KN1*, a mianowicie *STM* (*Shoot Meristemless*) i *KNAT1* (*Knotted1-like homeobox protein1*) [29]. Mutantom *stm* *A. thaliana* wprowadzano geny kodujące białka fuzyjne GUS:*KN1* ( *$\beta$ -GlucUronidaSe* – białko reporterowe) pod kontrolą promotora specyficznego dla komórek L1 bądź silnego promotora 35S CMV. Okazało się, że białko fuzyjne GUS:*KN1* nie jest zdolne do ruchu ze względu na duży rozmiar i nie kompensuje mutacji *stm* (nie przywraca fenotypu typu dzikiego), niezależnie czy jego ekspresja następuje w komórkach L1, czy też w całej roślinie (użycie promotora 35S CMV). Natomiast wprowadzenie genu kodującego białko fuzyjne zdolne do ruchu GFP:*KN1* (*Green Fluorescent Protein* – białko reporterowe) powodowało zniesienie efektu mutacji. Można zatem stwierdzić, że międzykomórkowy transport *KN1* jest konieczny do właściwego funkcjonowania tego białka [29].

W fazie generatywnej roślin właściwy rozwój wierzchołka generatywnego kontrolowany jest przez inne białka NCAP.

*LEAFY (LFY)* jeden z genów tożsamości merystemu *A. thaliana* koduje czynnik transkrypcyjny aktywujący geny homeotyczne kwiatu. Badania wykazały, że białko LFY przemieszcza się w obrębie warstw merystemu w sposób nieukierunkowany w drodze dyfuzji [83] (ryc. 1a). Wskazuje na to silna korelacja między lokalizacją cytoplazmatyczną a zdolnością transportową białka. Obecność białka na terenie cytoplazmy jest niezbędna do ruchu dyfuzyjnego [12, 30, 66]. Wydaje się także, że białko LFY nie ma specyficznych motywów transportowych, ponieważ wszystkie białka fuzyjne GFP z różnymi fragmentami LFY są zdolne do ruchu. Jednakże oparty na dyfuzji ruch LFY wydaje się być regulowany w obrębie tkanki, prawdopodobnie przez PD. Na przykład, konstrukt GFP:LFY porusza się znacznie łatwiej pomiędzy komórkami w kierunkach apikalno-bazalnych niż w kierunku lateralnym oraz nie może wyjść poza merystem kwiatowy do komórek pędu kwiatostanowego. Tak więc, niektóre plazmodesmy nie pozwalają na swobodny ruch białka LFY, a jego transport zachodzi w ograniczonej przestrzeni symplastu tworzącego symplastyczną domenę merystemu kwiatowego [66, 68, 84]. Badania prowadzono również na homology białka LFY, *FLORICAULA (FLO)* u *Antirrhinum*. Białko to reguluje ekspresję genów *DEFICIENT (DEF)* i *PLENA (PLE)*. Wykazano, że ekspresja *FLO* ograniczona do komórek L1 powoduje aktywację genów *DEF* i *PLE* we wszystkich warstwach merystemu i kompensację mutacji *flo*, natomiast specyficzna ekspresja w komórkach warstw L2 i L3 nie daje takich efektów. Brak jest jednak dowodów na międzykomórkowy transport białka *FLO*, tak więc nie wiadomo, w jaki sposób wpływa ono na regulację ekspresji powyższych genów [84].

U *Antirrhinum* dwa inne czynniki transkrypcyjne, zaangażowane w rozwój kwiatu, zdolne są do przemieszczania się między komórkami. Są to *DEF* i *GLOBOSA (GLO)*. Białka te biorą udział w regulacji rozwoju płatków korony i transportowane są z komórek L3 i L2 do komórek warstwy L1. Aktywność homology białka *DEF*, tzw. *APETALA3 (AP3)* u *A. thaliana* także jest szersza niż obszar ekspresji kodującego go genu, jednakże badania immunologiczne nie wykazały transportu tego białka między komórkami. Tak więc wydaje się, że białko *AP3* działa na sąsiednie komórki w odmienny sposób [57, 84].

Przedstawione przykłady sugerują, że zdolność białek do przemieszczania się między komórkami może być cechą gatunkowo specyficzną.

### Białka transportowane między komórkami związane z rozwojem korzenia

Opisywane w literaturze białka transportowane między komórkami w korzeniu związane są z tworzeniem komórek włosnikowych oraz korzeni bocznych.

O rozwoju komórek epiblemy decyduje ich położenie w korzeniu. Komórki epiblemy umiejscowione między komórkami kory pierwotnej tworzą często komórki włosnikowe (trichoblasty). U *A. thaliana* małe 94-aminokwasowe białko Myb-podobne *CAPRICE (CPC)* jest pozytywnym regulatorem formowania komórek włosnikowych. Stwierdzono, że akumulacja mRNA *CPC* jest ograniczona do komórek epiblemy nietworzących włosników (atrichoblasty). Jednakże, białko fuzyjne *CPC:GFP* znajduje się na terenie jądra wszystkich komórek skórki, co wskazuje na transport tego białka z atrichoblastu [77].



Zidentyfikowano także dwa kolejne białka regulatorowe zaangażowane w rozwój komórek epiblemy, a mianowicie GLABRA3 (GL3) i ENHANCER OF GLABRA 3 (EGL3), zawierające domenę bHLH (ang. *basic-Helix-Loop-Helix*) charakterystyczną dla czynników transkrypcyjnych. Białka te pełnią istotną rolę w określaniu tożsamości komórek atrichoblastu. Co ciekawe, choć funkcja tych białek jest specyficzna dla komórek nietworzących włosników, ekspresja genów *GL3* i *EGL3* zachodzi w komórkach włosnikowych. Białko GL3 akumulowane jest w jądrze komórek atrichoblastu, co wskazuje na transport tego białka, jak i prawdopodobnie również EGL3, z komórek włosnikowych, gdzie zachodzi ekspresja kodujących je genów [61]. Kurata i wsp. [61] sugerują, że białko CPC transportowane jest z komórek bez włosników do trichoblastu, gdzie aktywuje ekspresję genów *GL3/EGL3* oraz hamuje aktywność kolejnego białka GL2. Białko to ogranicza tworzenie włosników. W przeciwieństwie do CPC, białka EGL3/GL3 transportowane są do komórek nietworzących włosników aktywując w nich ekspresję genów *CPC* i *GL2* [61] (ryc. 1d).

Białko SHR (*SHort-Root*) należy do rodziny czynników transkrypcyjnych GRAS (nazwa pochodzi od pierwszych opisanych białek *GAI*, *RGA*, *SCR*). Jest to niedawno scharakteryzowana grupa roślinnych czynników transkrypcyjnych, zawierających dwie domeny bogate w leucynę i kilka krótkich konserwatywnych motywów aminokwasowych o bliżej nieznanymi funkcjami. Białka GRAS biorą udział m.in. w szlaku transdukcji sygnału fitochromowego (białko *PAT1*) i giberelinowego (*GAI*, *RGA*) [7]. Białko SHR transportowane jest między komórkami korzenia, promując powstawanie korzeni bocznych [53, 65]. Immunolokalizacja białka SHR oraz badania z użyciem białek fuzyjnych SHR:GFP wykazały, że SHR przemieszcza się z komórek walca osiowego do endodermy, lecz nie przechodzi do komórek kory pierwotnej. W komórkach endodermy białko SHR indukuje podziały komórkowe i różnicowanie [53] (ryc. 1c). Co ciekawe, białko SHR jest obecne zarówno na terenie jądra, jak i cytoplazmy, jednak zablokowanie lokalizacji cytoplazmatycznej hamuje transport międzykomórkowy. Może to wskazywać na dyfuzyjny charakter ruchu białka SHR. Obecność tego białka na terenie cytoplazmy nie wystarcza jednak do transportu przez plazmodesmy. Opisano mutację punktową niezaburzającą cytoplazmatycznego umiejscowienia białka fuzyjnego SHR:GFP, jednakże prowadzącą do utraty zdolności przemieszczania się konstruktów z komórek walca osiowego do endodermy [53]. Dodatkowo transport SHR uzależniony jest od specyficznego czynnika tkankowego. Za taki uważa się białko SCR (*SCARE-CROW*) również należące do rodziny GRAS. Badania mutantów *scr* transformowanych genem fuzyjnym *SHR:GFP* pod kontrolą promotora aktywnego tylko w komórkach epidermy wykazały, że białko SHR:GFP jest zdolne do swobodnego ruchu między komórkami [65]. Można z tego wnioskować, że SCR ogranicza transport SHR tylko do specyficznych komórek.

### Mechanizm międzykomórkowego transportu białek

Proponowane są dwa modele transportu przez PD. Selektywny transport angażujący specyficzne oddziaływania między motywem sygnałowym NCAP i czynnikiem wewnętrznym powiązany ze zwiększeniem przekroju czynnego PD. Model alterna-

tywny przewiduje transport nieselektywny, oparty na dyfuzji i zależny od endogenego SEL plazmodesm [11].

Najlepiej poznanym przypadkiem selektywnego transportu jest ruch wirusowych białek transportowych, mających zdolność otwierania PD [9, 78]. Wirusowe MP współdziałają z białkami opiekuńczymi, takimi jak HSP70 (mającymi zdolność do zmiany struktury przestrzennej białka, co ułatwia ich przechodzenie przez kanał plazmodesmy), czy DNAJ (białko związane z importem białek do retikulum endoplazmatycznego, mitochondriów i peroksysomów, regulator aktywności ATP-zowej białka HSP70). Wirusowe białka transportowe współdziałają również z białkami cytoszkieletu, a także z białkiem PME (*Pectin Metyl Esterase*). PME zaangażowane jest w modyfikację pektyn ścian komórkowych i zlokalizowane jest w ścianie komórkowej blisko plazmodesm. Wiąże ono specyficzny fragment wirusowego białka transportowego TMV, a delecja tego regionu hamuje międzykomórkowy ruch wirusa. PME uważane jest więc za hipotetyczny receptor MP [10, 35, 49, 67].

Wirusowe białka transportowe wykorzystują endogenną maszynę transportową komórek roślinnych. Zidentyfikowano białko floemowe *Cucurbita maxima* CmPP16, podobne do wirusowych MP. CmPP16 może przemieszczać się samo bądź też z RNA poprzez PD [86]. Ostatnio Lee i wsp. [43] wyizolowali białko NCAPP1 (*Non Cell Autonomous Pathway Protein 1*) wiążące się z CmPP16. NCAPP1 prawdopodobnie funkcjonuje jako ruchomy receptor, który porusza się wzdłuż błony retikulum endoplazmatycznego do PD [43]. Mutacje genu *NCAPP1* wskazują na jego znaczącą rolę w rozwoju roślin. Nadekspresja niefunkcjonalnej formy białka NCAPP1 $\Delta_{1-22}$  (delecja domeny transmembranowej) bądź jego brak powoduje podobne efekty. Zahamowany zostaje międzykomórkowy transport białek CmPP16 i MP wirusa mozaiki tytoniu oraz ich zdolność do otwierania PD, a rośliny wykazują szereg zmian fenotypowych. Następuje utrata symetrii organów oraz ich zrastanie się, a także zaburzenia w różnicowaniu się komórek epidermy oraz brak podziału na miękisz palisadowy i gąbczasty w blaszkach liści. Nieprawidłowo uformowane są również kwiaty. Mutacje te nie wpływają jednak na międzykomórkowy transport oraz aktywność otwierającą plazmodesmy białek KN1 oraz MP wirusa mozaiki ogórka. Dane te potwierdzają model selektywnego transportu przez plazmodesmy i sugerują istnienie wielu czynników pośredniczących w tym ruchu [43]. NCAPP1 jest spokrewnione z białkiem GP40 (*GlycoProtein 40*), które lokalizowane jest na peryferiach jądra komórkowego i pełni rolę w imporcie białek jądrowych [19]. Tak więc, transport przez plazmodesmy może funkcjonować na podobnej zasadzie jak jądrowo-cytoplazmatyczny transport przez pory jądrowe [42].

Trwają poszukiwania motywu sygnałowego potrzebnego do efektywnego transportu międzykomórkowego. Jednak dotychczas nie zidentyfikowano tego rodzaju peptydu. Badana z użyciem Thioredoksyny H (białko floemowe związane z regulacją potencjału oksydo-redukcyjnego [70]) czy różnych wirusowych białek transportowych sugerują, że motyw sygnałowy jest tworzony przez struktury trzeciorzędowe białka lub jest kompilacją pierwszorzędowej sekwencji i trzeciorzędowej struktury [15, 23, 78]. Wiadomo, że C-koniec 99-aminokwasowej domeny białka transportowego TMV jest potrzebny do

zwiększenia przekroju czynnego plazmodesm [78]. Potencjalny sygnał został zidentyfikowany w białku dyni CmHSP70. Jednakże ten 25-aminokwasowy motyw (a przede wszystkim jego struktura) nie jest uniwersalnym sygnałem transportu międzykomórkowego i działa tylko w kontekście opiekuńczych białek HSP70. Motyw ten indukuje zwiększenie SEL plazmodesm i transport ludzkiego białka HSP70, lecz nie dotyczy innych białek, np. GFP [3]. Kim i wsp. [27] zidentyfikowali sekwencję białkową umożliwiającą międzykomórkowe przemieszczanie się białka KN1. Eksperyment ich polegał na użyciu białek fuzyjnych KN1:GL1 (*GLabral*). Białko GL1 należy do rodziny czynników transkrypcyjnych typu Myb i nie jest transportowane międzykomórkowo. Mutanty *gll* nie tworzą włosków na liściach. Transformacja tych roślin genem fuzyjnym *GL1:KN1* z promotorem aktywnym specyficznym w komórkach mezofilu powodowała kompensację mutacji *gll*. Świadczy to o transporcie białka fuzyjnego do komórek epidermy. W układzie tym białko KN1 umożliwia transport połączonego z nim GL1 do komórek epidermy, gdzie GL1 powoduje tworzenie włosków. Seria transformacji genami kodującymi białka fuzyjne zawierające fragmenty białka KN1 pozwoliła określić domenę HD (homeodomena) tego białka jako niezbędną i wystarczającą do transportu międzykomórkowego [27]. Wyniki te potwierdzają wcześniejsze dane wskazujące, że wymiana aminokwasu w obrębie prawdopodobnego sygnału lokalizacji jądrowej znajdującej się w obszarze domeny HD zaburza ruch KN1. Jednakże wykazano także niezbędną rolę motywu PA (ang. *Peptide Antagonists*), leżącego poza domeną HD, do zwiększenia SEL plazmodesm i transportu KN1 [37]. Wydaje się, że w celu jednoznacznego określenia charakteru domeny białkowej odpowiedzialnej za transport międzykomórkowy białek niezbędne są dalsze badania.

Oprócz transportu selektywnego białek, przemieszczanie się ich pomiędzy komórkami roślinnymi może być nieselektywne, oparte na procesie dyfuzji. Badania z użyciem białka GFP przyczyniły się do opisanego modelu nieselektywnego transportu międzykomórkowego [11, 22]. Ponieważ GFP nie jest endogennym białkiem roślinnym, musi poruszać się poprzez mechanizmy nieselektywne. We floemie transport GFP zachodzi razem z asymilatami przemieszczając się do tkanek docelowych [36]. W starszych liściach (stanowiących źródło asymilatów) i starszych częściach korzenia nie występuje transport białka GFP poza obręb tkanek przewodzących [36]. Wyniki te sugerują dynamiczną regulację SEL plazmodesm w czasie rozwoju roślin [22, 48]. Endogennym białkiem, które porusza się poprzez dyfuzję, jest LFY. Jednak jego ruch ograniczony jest tylko do obszaru merystemu generatywnego.

Transport białek między komórkami lub we floemie zależy również od potranslacyjnych modyfikacji. Na przykład białko CmPP36 wielkości 36 kDa, należące do rodziny białek reduktaz cytochromu b5, ulega ekspresji w komórkach towarzyszących floemu dyni. Jednak w soku floemowym można odnaleźć tylko 31 kDa białko CmPP36, krótsze na N-końcu. Mikroiniekcje wykazały, że białko pełnej długości nie wykazuje zdolności do zwiększania SEL plazmodesm ani poruszania się między komórkami. Zdolności takiej nabiera dopiero po proteolizie na N-końcu [85].

## 2. SYMPLASTOWY TRANSPORT RNA

Badania dotyczące międzykomórkowego ruchu wirusów roślinnych dostarczyły pierwszych dowodów, że plazmodesmy są zdolne do pośredniczenia w międzykomórkowym transporcie wirusowego RNA w postaci kompleksów rybonukleoproteinowych [17, 47, 64]. Dalsze badania wykazały, że wiele specyficznych endogennych RNA może również być transportowane między komórkami. Przykładami takich RNA są między innymi mRNA kukurydzowego czynnika transkrypcyjnego *KN1* [24] oraz mRNA kodujący transporter cukrów *SUT1* [38, 39]. U dyni wykryto ponad 100 rodzajów mRNA transportowanych przez floem. Niektóre z tych RNA kodują białka zaangażowane w rozwój merystemów, odpowiedzi hormonalne czy też reakcje obronne [17, 47]. mRNA jest transportowany selektywnie do specyficznych miejsc np. do wierzchołka pędu (mRNA genu *CmNACP* [62]). Kim i wsp. [31] wykazali ponadto, że proces ten jest istotnym mechanizmem zaangażowanym w regulację wzrostu roślin. Autorzy przeprowadzili szereg zabiegów transplantacji (szczepienia), wykorzystując zjawisko zdolności regeneracyjnych roślin. Kim i wsp. [31] dowiedli, że fuzyjne transkrypty homologa genu *KN1 Lycopersicon esculentum – LeT6 i PDPFK (Pyrophosphate Dependent PhosphoFructoKinase)* są długodystansowo transportowane z podkładek mutantu *Me (Mouse ear)* pomidora do zrazu tworzonego z roślin typu dzikiego, co jest skorelowane z zachodzącymi zmianami morfologicznymi. Kolejnym potwierdzeniem możliwości transportu cząsteczek RNA na dalekie dystanse dostarczają eksperymenty związane z procesem wyciszania genów. Zjawisko to określa się jako sekwencyjnie specyficzną degradację RNA rozprzestrzeniającą się systemowo w organizmach zwierząt i roślin [6, 32]. Ostatnio wykazano, że jest to być może wynik transportu siRNA długości 21 nt, który odnawiany jest w każdym kolejnych 10–15 komórkach [20].

### Przykłady mRNA transportowanego systemowo

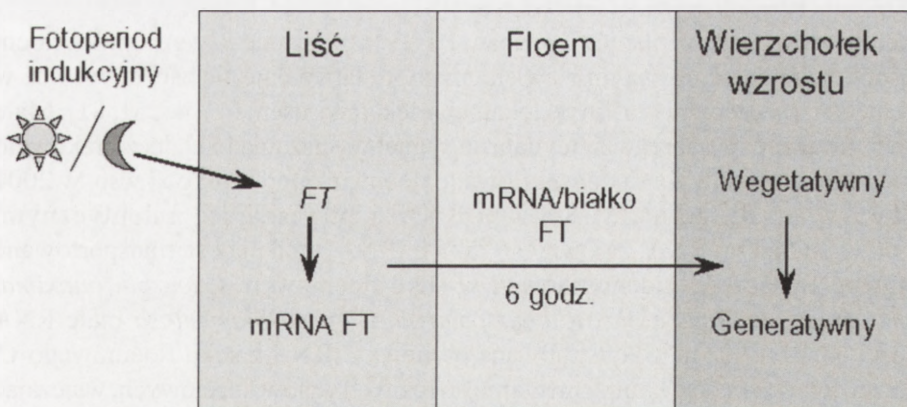
Haywood i wsp. [18] analizowali długodystansowy transport transkryptów dwóch homologicznych genów *CmGAIP Cucurbita maxima* i *GAI Arabidopsis thaliana* należących do rodziny genów *GRAS*. Oba geny kodują białka z domeną DELLA stanowiące negatywne regulatory odpowiedzi na działanie giberelin. Homologi te wybrano ze względu na już wcześniej opisaną ich obecność we floemie oraz łatwy do zaobserwowania fenotyp mutacji w genach kodujących. Wykazano, że mRNA *CmGAIP* jest transportowany floemem z dyni jako podkładki do zrazu tworzonego przez rośliny ogórka. Dodatkowo przeprowadzono doświadczenia z transformowanymi roślinami pomidora i rzodkiewnika, noszącymi zmutowane geny *Cmgaip* oraz *ΔDELLAgai* (delecja w domenie DELLA). Mutacje te są semidominujące i prowadzą do zaburzenia szlaku odpowiedzi na działanie giberelin. Rośliny transgeniczne pomidora z tą mutacją wykazują charakterystyczny karłowaty fenotyp z ciemnozielonymi i mniejszymi liśćmi. Użycie mutantów *Cmgaip* lub *ΔDELLAgai* jako podkładki powoduje pojawienie się zmian fenotypowych w częściach rośliny stanowiącej zraz typu dzikiego. Zmiany morfologii

liści pomidora są widoczne od drugiego powstającego na zrazie liścia i dotyczą kolejnych dwóch, trzech liści. Kolejne liście nie wykazują zmian morfologicznych. Zaobserwowano także wyraźną gradację zmian fenotypowych wzdłuż osi liścia złożonego pomidora. Najsilniejszy fenotyp *gai* jest widoczny na szczycie liścia, u nasady występuje morfologia prawie typu dzikiego. Autorzy tłumaczą to rozcieńczeniem ilości transgenicznego mRNA przez endogenne mRNA *GAI* obecne w komórkach zrazu. Reakcje *in situ* RT-PCR potwierdziły obecność transkryptu tego transgenu w komórkach sitowych i towarzyszących floemu liści zrazu wykazujących objawy mutacji oraz jego brak w liściach o fenotypie dzikim. Podobne wyniki otrzymano u *A. thaliana* [18].

Eksperymenty te potwierdzają istnienie specyficznego transportu RNA poprzez floem do konkretnych komórek, w tym wypadku komórek merystemu wierzchołkowego i primordiów, gdzie powodują powstanie specyficznych zmian fenotypowych. Świadczy to także, że sygnał transportu długodystansowego może być konserwatywny ewolucyjnie i funkcjonować podobnie w różnych gatunkach roślin.

Zastanawiający jest natomiast brak mRNA *gai* w tkankach owocu pomidora, które są odbiorcą asymilatów floemowych, powinny więc zawierać duże ilości transportowanego floemem RNA. Transportowane RNA są jednak albo specyficznie degradowane, lub w ogóle nie wnikają do komórek tych tkanek [18].

Transport mRNA poprzez floem jest również istotnym procesem uczestniczącym w regulacji fotoperiodycznej indukcji kwitnienia. Wiadomo, iż induktor kwitnienia zwany florigenem powstaje w liściach bądź liścieniach i następnie jest transportowany do wierzchołka pędu [1, 21]. U *Arabidopsis* odpowiedź na długość dnia zależy od aktywacji genu *FT* (*Flowering Locus T*). W 2005 r. Huang i wsp. [21] wykazali, że lokalna indukcja genu *FT* w pojedynczym liściu jest wystarczająca do zakwitnięcia rośliny. Wykazano, że mRNA genu *FT* jest transportowany do wierzchołka wzrostu, gdzie w kompleksie z czynnikiem transkrypcyjnym FD [1] aktywuje kolejne geny kwitnienia.



RYCINA 3. Transport mRNA lub białka FT z tkanki liści do wierzchołka wzrostu indukuje przekształcenie wegetatywnego merystemu wierzchołkowego *A. thaliana* w generatywny (za [21], zmienione)

Eksperyment Huang i wsp. [21] polegał na transformowaniu roślin konstruktem genu *FT* z promotorem transkrypcji genu kodującego białko szoku cieplnego HSP z soi. Podgrzanie pojedynczego liścia do temperatury 37°C powodowało aktywację promotora *HSP* i pojawienie się transkryptu genu *FT*. Sześć godzin po pojawieniu się mRNA *FT* w liściu, można było wykryć obecność transkryptu w wierzchołku pędu (ryc. 3). Potem następował dalszy wzrost poziomu mRNA *FT* zarówno w liściu, jak i wierzchołku już poprzez aktywność endogennego genu *FT*. Świadczy to o pozytywnej autoregulacji tego genu. Huang i wsp. [21] są przekonani, że mRNA jest transportowany floemem, jednakże nie można wykluczyć również transportu białka FT do wierzchołka pędu, gdzie mogłoby indukować ekspresję genu *FT*.

### Międzykomórkowy transport niskocząsteczkowych RNA

W 1993 roku pierwszy raz opisano obecność niskocząsteczkowych RNA (sRNA – ang. *small RNA*) pełniących istotną funkcję biologiczną. Te 19–25 nukleotydomowe RNA tworzone są przez dwie grupy: si- i miRNA różniące się biogenezą i funkcjami [5, 6]. miRNA regulują specyficzne geny docelowe homologiczne w obszarze wiązania miRNA, lecz o niewielkiej homologii do reszty cząsteczki prekursorowego miRNA, podczas gdy siRNA zazwyczaj działają na wysoko homologiczne geny [50, 81]. miRNA roślinne zaangażowane są w regulację morfologii liści, tożsamości organów kwiatowych, odpowiedzi stresowych, a także wiele innych procesów postulowanych na podstawie identyfikacji ich prawdopodobnych genów docelowych [2, 8, 25, 26, 80]. siRNA natomiast pełnią ważną rolę w procesie transkrypcyjnego wyciszania (TGS – ang. *Transcriptional Gene Silencing*) sekwencji powtarzających się, takich jak transpozony i powtórzenia heterochromatynowe oraz w potranskrypcyjnym wyciszaniu (PTGS – ang. *Post Transcriptional Gene Silencing*) cząsteczek RNA pochodzenia egzogenego, takich jak wirusy i transgeny [32, 44, 45, 51, 81, 82]. Ostatnio wyróżniono nową grupę sRNA *trans-acting siRNA*, które są zaangażowane w regulację procesu przejścia roślin z młodocianej do dojrzałej fazy rozwoju [81].

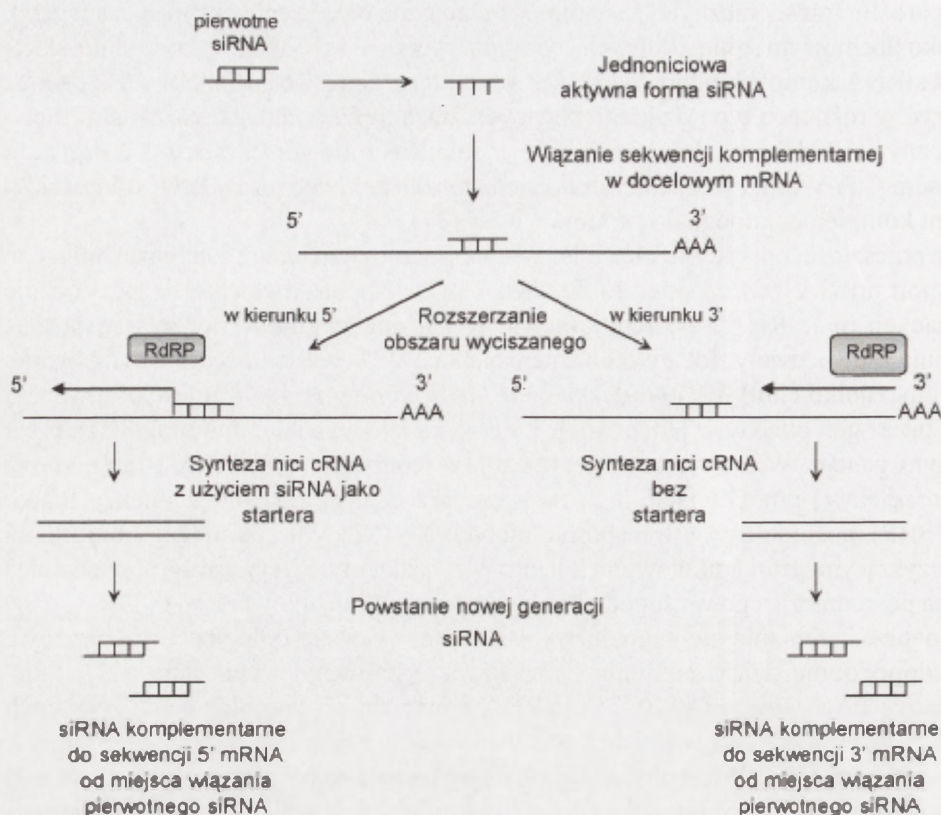
Systemowe rozprzestrzenianie się sygnału PTGS (wyciszanie RNA) poprzez floem jest stosunkowo dobrze opisanym zjawiskiem, które łatwo daje się zaobserwować w eksperymentach szczepienia roślin po lokalnej infekcji wirusem [43, 45, 51, 81]. Małe RNA były uważane za dobrego kandydata na sygnał wyciszania [51], lecz brakowało bezpośrednich dowodów, że są transportowane floemem. Dopiero Yoo i wsp. w 2004 roku [87] wykazali, że małe 18–25 nt RNA odpowiadające autentycznym, regulatorowym małym RNA, zarówno si- jak i miRNA, wnikają i są transportowane przez floem. Badacze ci zidentyfikowali w soku floemowym *Cucurbita maxima*, *Cucumis sativus*, *Lupinus albus*, *Ricinus communis*, *Yucca filamentosa* małe RNA o długości od 18 do 25 nt. Skonstruowana biblioteka sRNA z soku floemowego *C. maxima* zawiera sekwencje komplementarne do różnych genów docelowych, włączając *Transposon-like 1 (Tnl1)* i *Tnl2*, małe RNA identyczne z miRNA159 oraz komplementarne do genów kodujących dwufunkcyjną endonukleazę czy też helikazę RNA. Doświadczenia prowadzono również z użyciem linii transgenicznej *Cucurbita pepo* z ekspresją genu wirusowego kodującego białko płaszczka CP (ang. *Coat Protein*). U

części roślin transgenicznych nastąpiło spontaniczne wyciszenie ekspresji transgenu. W soku floemowym roślin, u których wystąpiło wyciszenie genu *CP*, wykryto akumulację 23 nt siRNA komplementarnego do sekwencji tego genu. Te siRNA można również wykryć w roślinach typu dzikiego będących zrazami na podkładkach z roślin transgenicznych. Podobnie udało się wykryć w soku floemowym *C. maxima* po infekcji wirusem CuYV (ang. *Cucumber Yellow closterovirus*) obecność siRNA długości 20–21 nt komplementarnego do genomu wirusa [87].

W przeszłości opisywano obecność w soku floemowym białek zaangażowanych w transport mRNA [62], co skłoniło Yoo i wsp. [87] do poszukiwań białek specyficznie wiążących małe RNA i pośredniczących w ich międzykomórkowym transporcie. Badania zaowocowały zidentyfikowaniem białka 27 kDa występującego u dyni, ogórka i łubinu. Białko CmPSRP1 (*Phloem Small RNA binding Protein 1*) jest kodowane u dyni przez gen obecny w jednej kopii i nie wykazuje wysokiej homologii z żadnym znanym genem. Wiąże się ono specyficznie z jednoniciowym ssRNA (ang. *single stranded RNA*) umożliwiając jego transport przez plazmodesmy. Jednakże białko CmPSRP1 pośredniczy w transporcie małych RNA jedynie pomiędzy komórkami towarzyszącymi a rurkami sitowymi floemu. W związku z tym wciąż trwają poszukiwania białka pośredniczącego w długodystansowym transporcie małych RNA [87].

Rozprzestrzenianie się sygnału wyciszenia na większe odległości jest możliwe prawdopodobnie dzięki istnieniu zjawiska przejściowego wyciszenia RNA (ang. *transitive RNA silencing*) [20, 76]. siRNA wiąże się do homologicznej sekwencji mRNA docelowego i prowadzi do cięcia w miejscu wiązania, wyciszając w ten sposób aktywność genu [82]. Wiele obserwacji wskazuje jednak, że wyciszenie może rozszerzać się na sekwencje nieobecne w sekwencji siRNA indukcyjnego. Przykładowo, wyciszenie transgenu *GFP* poprzez wstrzeliwanie dwuniciowych cząsteczek siRNA homologicznych do rejonu centralnego transgenu powodowało syntezę siRNA z obu 5' i 3' stron od miejsca wiązania początkowego siRNA (ryc. 4) [32]. Rozprzestrzenianie się wyciszenia poza sekwencję pierwotną nazwano przejściowym wyciszeniem RNA. Do zajścia tego procesu niezbędna jest obecność komórkowej polimerazy RNA zależnej od RNA (RdRP), używającej siRNA jako startera i homologicznego transkryptu jako matrycy do syntezy cRNA (ang. *complementary RNA*). RdRP pośredniczy w namnażaniu sygnału wyciszenia i produkcji kolejnej generacji siRNA. Użycie jako startera siRNA wyjaśnia rozszerzanie się wyciszenia w kierunku 3'–5'. Obserwacje rozchodzenia się wyciszenia w kierunku 5'–3' można tłumaczyć zdolnością roślinnej RdRP do inicjowania syntezy cRNA bez użycia starterów na 3' końcu docelowego mRNA [58]. Doświadczenia Petersena i wsp. [58] odnośnie wyciszenia transgenu *GUS* tytoniu sugerują, że rozprzestrzenianie się w kierunku 5'–3' przebiega właśnie w wyniku działalności RdRP od strony 3' końca transkryptu bez użycia siRNA jako startera. Nie udało się rozszerzyć wyciszenia endogennych genów, takich jak *Chl1* (*magnesium Chelatase subunit 1*) czy *RLIh* (*RNAse L Inhibitor homologue*) [58, 59]. Świadczy to, że proces przejściowego wyciszenia RNA może dotyczyć tylko pewnych grup genów.

Badania Hamiltona i wsp. [16] wskazały na istnienie dwu różniących się długością rodzajów siRNA pełniących różne funkcje. Sugerowano, że siRNA długości 21 nt, pośredniczy w cięciu RNA docelowego, natomiast 25 nt siRNA związane jest z metylacją



RdRP – zależna od RNA polimeraza RNA

cRNA - komplementarna nić RNA (ang. *complementary RNA*)

RYCINA 4. Mechanizm przejściowego wyciszania genów, szczegóły w tekście (na podstawie [16, 58])

DNA i transmisją sygnału wyciszania go w roślinie [16, 72]. Himber i wsp. [20] stwierdzili, że krótkodystansowy ruch sygnału wyciszania zaczyna się od niewielkiej grupy komórek i rozprzestrzenia się na niemal stałą liczbę 10–15 komórek, bez amplifikacji. W ruchu tym uczestniczą cząsteczki siRNA długości 21 nt, nie jest natomiast wymagana obecność 25-nukleotydowego siRNA. Transport na większe odległości wymaga udziału białek SDE1, domniemanej RdRP oraz SDE3, domniemanej helikazy RNA. Ten długodystansowy transport powiązany jest z syntezą nowej generacji siRNA produkowanych we wcześniej opisanym procesie przejściowego wyciszania RNA. W wyniku tego procesu powstają również 21 nt siRNA. Nowa generacja siRNA rozprzestrzenia się znowu na 10–15 komórek, gdzie ponownie następuje synteza nowych cząsteczek [20] (ryc. 1b).

Badano również transport sygnału wyciszania w obrębie całej rośliny. Infekcja roślin zmodyfikowanym wirusem obecnym tylko we flocie powodowała, że wyciszenie w



kolejnych liściach w przypadku transgenu *GFP* było całkowite, natomiast w przypadku genu *RbcS* (*Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit*) ograniczało się tylko do 10–15 komórek wokół nerwów liściowych [20]. Okazało się, że mRNA *GFP* podlega przejściowemu wyciszaniu w przeciwieństwie do *RbcS*, który z bliżej nieznanymi powodami, nie ma takiej zdolności. W związku z tym nie jest tworzona nowa generacja siRNA, która mogłaby przemieszczać się do kolejnych komórek [74]. Wyniki Himbera [20] nie wykluczają jednak uczestnictwa 25-nukleotydowego siRNA we floemowym transporcie sygnału wyciszenia, gdyż nie badali oni długości cząsteczek transportowanych przez tkankę przewodzącą. Jak już wcześniej wspomniano, we floemie roślin transgenicznych dyni charakteryzujących się spontanicznym wyciszeniem transgenu *CP* wykryto siRNA o długości 23 nt [87], tak więc możliwe jest, że długość transportowanych siRNA może być również specyficzna gatunkowo.

Biorąc pod uwagę, że nie wszystkie geny wydają się podlegać przejściowemu wyciszaniu RNA, które niezbędne jest do amplifikacji siRNA oraz fakt istnienia różnej długości cząsteczek siRNA niezbędnych do rozprzestrzeniania się PTGS, wciąż nie wiadomo, czy proponowany przez Himbera i wsp. [20] mechanizm rozprzestrzeniania sygnału wyciszenia RNA jest uniwersalny, czy dotyczy tylko pojedynczych przypadków.

### Mechanizm międzykomórkowego transportu RNA

Systemowy transport RNA wymaga przekroczenia szeregu granic komórkowych. W związku z tym powstaje pytanie, jakie czynniki decydują, czy określone RNA pozostają w obrębie danych komórek czy też są transportowane do innych oraz w jaki sposób RNA jest rozpoznawany i transportowany przez sieć symplastyczną do komórek docelowych.

Dotychczas brak danych o sekwencjach nukleotydowych biorących udział w transporcie międzykomórkowym mRNA. Jedyne doniesienia dotyczą sekwencji RNA wiroida. Wiroidy to małe, jednoniciowe, koliste cząsteczki RNA infekujące rośliny. Ich szczególną cechą jest to, że RNA nie koduje żadnych białek funkcjonalnych. Jednakże wiroidowy RNA może się replikować na terenie jądra komórek gospodarza i poruszać systemowo infekując całą roślinę. Jest to prosty model do badań nad rolą struktury i sekwencji RNA potrzebnej do transportu międzykomórkowego [60].

Qi Y i wsp. [60] poszukiwali motywu w sekwencji RNA wiroida PSTVd (ang. *Potato Spindle Tuber Viroid*) odpowiedzialnego za specyficzny transport RNA wiroida z komórek pochwy okołowiązkowej do komórek mezofilu. Eksperymenty dowiodły istotności czterech par zasad w cząsteczce wiroida niezbędnych do tego transportu. Te cztery zasady tworzą dwuczęściowy (jedna zasada znajduje się w jednej z pętli cząsteczki RNA, pozostałe w obrębie domeny infekcyjnej) sygnał transportowy. Motyw ten nie jest już natomiast potrzebny do transportu w drugą stronę – z mezofilu do komórek pochwy okołowiązkowej. Dodatkowo wykazano, że wiroid łatwiej wnika do komórek mezofilu liści starszych, co potwierdza rozwojową regulację transportu między komórkami [60].

## PODSUMOWANIE

Sieć symplastyczna jest miejscem transportu różnorodnych makromolekuł oraz małych cząsteczek sygnałnych. Transport ten może zachodzić w obrębie sąsiadujących komórek, tkanek lub zachodzić systemowo. Transportowane są białka regulatorowe, same bądź też z kodującym je mRNA (np. KN1 [24]), mRNA kodujące specyficzne białka w kompleksach z uniwersalnymi nośnikami białkowymi (np. CmPP16 [86]) oraz małe niekodujące si/miRNA regulujące aktywność określonych genów, również w kompleksach ze specyficznymi białkami [14, 61, 87]. Zarówno zdolność sieci symplastycznej do określonego transportu oraz rodzaj transportowanych molekuł podlegają kontroli w czasie ontogenezy rośliny, a także w odpowiedzi na czynniki środowiskowe [11, 25]. Funkcja tego transportu nie jest do końca poznana, jednakże ścisła korelacja między transportem a przebiegiem procesów morfologicznych świadczy o jego podstawowym znaczeniu dla realizacji określonych programów rozwojowych rośliny.

## LITERATURA

- [1] ABE M, KOBAYASHI Y, YAMAMOTO S, DAIMON Y, YAMAGUCHI A, IKEDA Y, ICHINOKI H, NOTAGUCHI M, GOTO K, ARAKI T. FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* 2005; **309**: 1052–1056.
- [2] ADAI A, JOHNSON C, MLOTSHWA S, ARCHER-EVANS S, MANOCHA V, VANCE V, SUNDARESAN V. Computational prediction of miRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res* 2005; **15**: 78–91.
- [3] AOKI K, KRAGLER F, XOCONOSTLE-CÁZARES B, LUCAS WJ. A subclass of plant heat shock cognate 70 chaperones carries a motif that facilitates trafficking through plasmodesmata. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 16342–16347.
- [4] BALACHANDRAN S, XIANG Y, SCHOBERT C, THOMPSON GA, LUCAS WJ. Phloem sap proteins from *Cucurbita maxima* and *Ricinus communis* have the capacity to traffic cell to cell through plasmodesmata. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 14150–14155.
- [5] BARTEL DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; **116**: 281–297.
- [6] BAULCOMBE D. RNA silencing in plants. *Nature* 2004; **431**: 356–363.
- [7] BOLLE C. The role of GRAS proteins in plant signaling transduction and development. *Planta* 2004; **218**: 683–692.
- [8] BONNET E, WUYTS J, ROUZE P, VAN DE PEER Y. Detection of 91 potential conserved plant microRNAs in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* identifies important target genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 11511–11516.
- [9] CARRINGTON JC, KASSCHAU KD, MAHAJAN SK, SCHAAD MC. Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *Plant Cell* 1996; **8**: 1669–1681.
- [10] CHEN MH, SHENG J, HIND G, HANDA AK, CITOVSKY V. Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and host cell pectin methylsterases is required for viral cell-to-cell movement. *EMBO J* 2000; **19**: 913–920.
- [11] CRAWFORD KM, ZAMBRYSKI PC. Non-targeted and targeted protein movement through plasmodesmata in leaves in different developmental and physiological states. *Plant Physiol* 2001; **125**: 1802–1812.
- [12] CRAWFORD KM, ZAMBRYSKI PC. Subcellular localization determines the availability of non-targeted proteins to plasmodesmatal transport. *Curr Biol* 2000; **10**: 1032–1040.
- [13] DEOM CM, OLIVER MJ, BEACHY RN. The 30-kilodalton gene product of tobacco mosaic-virus potentiates virus movement. *Science* 1987; **237**: 389–394.

- [14] DING B, ITAYA A, QI Y. Symplasmic protein and RNA traffic: regulatory points and regulatory factors. *Curr Opin Plant Biol* 2003; **6**: 596–602.
- [15] GIESMAN-COOKMEYER D, LOMMEL SA. Alanine scanning mutagenesis of a plant virus movement protein identifies three functional domains. *Plant Cell* 1993; **5**: 973–982.
- [16] HAMILTON AJ, VOINNET O, CHAPPELL L, BAULCOMBE DC. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J* 2002; **21**: 4671–4679.
- [17] HAYWOOD V, KRAGLER F, LUCAS WJ. Plasmodesmata: pathways for protein and ribonucleoprotein signaling. *Plant Cell Supplement* 2002: S303–S325.
- [18] HAYWOOD V, YU TS, HUANG NC, LUCAS WJ. Phloem long-distance trafficking of GIBBERELLIC ACID-INSENSITIVE RNA regulates leaf development. *Plant J* 2005; **42**: 49–68.
- [19] HEESE-PECK A, RAIKHEL NV. A glycoprotein modified with terminal *n*-acetylglucosamine and localized at the nuclear rim shows sequence similarity to aldose-1-epimerases. *Plant Cell* 1998; **10**: 599–612.
- [20] HIMBER C, DUNOYER P, MOISSIARD G, RITZENTHALER C, VOINNET O. Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J* 2003; **22**: 4523–4533.
- [21] HUANG T, BOHLENIUS H, ERIKSSON S, PARCY F, NILSSON O. The mRNA of the *Arabidopsis* gene *FT* moves from leaf to shoot apex and induces flowering. *Science* 2005; **309**: 1694–1696.
- [22] IMLAU A, TRUERNIT E, SAUER N. Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *Plant Cell* 1999; **11**: 309–322.
- [23] ISHIWATARI Y, FUJIWARA T, MCFARLAND KC, NEMOTO K, HAYASHI H, CHINO M, LUCAS WJ. Rice phloem thioredoxin h has the capacity to mediate its own cell-to-cell transport through plasmodesmata. *Planta* 1998; **205**: 12–22.
- [24] JACKSON D. Double labeling of *KNOTTED1* mRNA and protein reveals multiple potential sites of protein trafficking in the shoot apex. *Plant Physiol* 2002; **129**: 1423–1429.
- [25] JONES-RHOADES MW, BARTEL DP. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell* 2004; **14**: 787–799.
- [26] KIDNER CA, MARTIENSSEN RA. The developmental role of microRNA in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 38–44.
- [27] KIM JY, RIM Y, WANG J, JACKSON D. A novel cell-to-cell trafficking assay indicates that the *KNOX* homeodomain is necessary and sufficient for intercellular protein and mRNA trafficking. *Genes Dev* 2005; **19**: 788–793.
- [28] KIM JY, YUAN Z, CILIA M, KHALFAN-JAGANI Z, JACKSON D. Intercellular trafficking of a *KNOTTED1* green fluorescent protein fusion in the leaf and shoot meristem of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 4103–4108.
- [29] KIM JY, YUAN Z, JACKSON D. Developmental regulation and significance of *KNOX* protein trafficking in *Arabidopsis*. *Development* 2003; **130**: 4351–4362.
- [30] KIM JY. Regulation of short-distance transport of RNA and protein. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 45–52.
- [31] KIM M, CANIO W, KESSLER S, SINHA N. Developmental changes due to long-distance movement of a homeobox fusion transcript in tomato. *Science* 2001; **293**: 287–289.
- [32] KLAHRE U, CRETE P, LEUENBERGER SA, IGLESIAS VA, MEINS FJ. High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 11981–11986.
- [33] KOPCEWICZ J. Rozwój generatywny. [w] Kopcewicz J, Lewak S [red.] Fizjologia roślin. Warszawa, PWN 2002: 520–557.
- [34] KOPCEWICZ J. Rozwój wegetatywny. [w] Kopcewicz J, Lewak S [red.] Fizjologia roślin. Warszawa, PWN 2002: 498–520.
- [35] KRAGLER F, CURIN M, TRUTNYEVA K, GANSCH A, WAIGMANN E. MPB2C, a microtubule-associated plant protein binds to and interferes with cell-to-cell transport of tobacco mosaic virus movement protein1. *Plant Physiol* 2003; **132**: 1870–1883.
- [36] KRAGLER F, MONZER J, SHASH K, XOCONOSTLE-CAZARES B, LUCAS WJ. Cell-to-cell transport of proteins: requirement for unfolding and characterization of binding to a putative plasmodesmal receptor. *Plant J* 1998; **15**: 367–381.
- [37] KRAGLER F, MONZER J, XOCONOSTLE-CAZARES B, LUCAS WJ. Peptide antagonists of the plasmodesmal macromolecular trafficking pathway. *EMBO J* 2000; **19**: 2856–2868.
- [38] KUHN C, FRANCESCHI VR. Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve element. *Science* 1997; **275**: 1298–1300.

- [39] KUHN C, HAJIREZAEI MR, FERNIE AR, ROESSNER-TUNALI U, CZECHOWSKI T, HIRNER B, FROMMER WB. The Sucrose Transporter *StSUT1* localizes to sieve elements in potato tuber phloem and influences tuber physiology and development. *Plant Physiol* 2003; **131**:102–113.
- [40] KURATA T, OKADA K, WADA T. Intercellular movement of transcription factors. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 600–605.
- [41] KWIATKOWSKA M. Zmiany ultrastruktury i rozmieszczenia plazmodesm a proces dyferencjacji na przykładzie anterydiostanów glonów z rodziny *Chara*. *Post Biol Kom* 2004; Suplement **22**: 157–174.
- [42] LEE JY, YOO BC, LUCAS WJ. Parallels between nuclear-pore and plasmodesmal trafficking of information molecules. *Planta* 2000; **210**: 177–187.
- [43] LEE JY, YOO BC, ROJAS MR, GOMEZ-OSPINA N, STAEHELIN LA, LUCAS WJ. Selective trafficking of non-cell-autonomous proteins mediated by NtNCAPP1. *Science* 2003; **299**: 392–396.
- [44] LEHMAN P. Wyciszenie RNA: naturalny system obronny roślin przeciw infekcji wirusowej. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 75–86.
- [45] LIAVE C, KASSCHAU KD, RECTOR MA, CARRINGTON JC. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell* 2002; **14**:1605–1619.
- [46] LUCAS WJ, LEE JY. Plasmodesmata as a supracellular control network in plants. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2004; **5**: 712–726.
- [47] LUCAS WJ, YOO BC, KRAGLER F. RNA as a long-distance information macromolecule in plants. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2001; **2**: 849–857.
- [48] MARTENS HJ, HANSEN M, SCHULZ A. Caged probes: a novel tool in studying symplasmic transport in plant tissues. *Protoplasma* 2004; **223**: 63–66.
- [49] MATSUSHITA Y, DEGUCHI M, YOUNG M, NISHIGUCHI M, NYUNOYA H. The tomato mosaic tobamovirus movement protein interacts with a putative transcriptional coactivator KELP. *Mol Cells* 2001; **12**: 57–66.
- [50] MEISTER G, TUSCHL T. Mechanisms of gene silencing by doublestranded RNA. *Nature* 2004; **431**: 343–349.
- [51] MLOTSHWA S, VOINNET O, METTE MF, MATZKE M, VAUCHERET H, DING SW, PRUSS G, VANCE VB. RNA silencing and the mobile silencing signal. *Plant Cell Supplement* 2002; S289–S301.
- [52] NAGASAKI H, SAKAOTO T, SATO Y, MATSUOKA M. Functional analysis of the conserved domain of a rice KNOX homeodomain protein, OSH15. *Plant Cell* 2001; **13**: 2085–2098.
- [53] NAKAJIMA K, SENA G, NAWY T, BENFEY PN. Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* 2001; **413**: 307–311.
- [54] OPARKA KJ, CRUZ SS. The great escape: phloem transport and unloading of macromolecules. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 2000; **51**: 323–347.
- [55] OPARKA KJ. Getting the message across: how do plant cells exchange macromolecular complexes? *Trends Plant Sci* 2004; **9**: 33–41.
- [56] OWENS RA, BLACKBURN M, DING B. Possible involvement of the phloem lectin in long-distance viroid movement. *Mol Plant Microbe Interact* 2001; **14**: 905–909.
- [57] PERBAL MC, HAUGHN G, SAEDLER H, SCHWARZ-SOMMER Z. Non-cell-autonomous function of the *Antirrhinum* floral homeotic proteins DEFICIENS and GLOBOSA is exerted by their polar cell-to-cell trafficking. *Development* 1996; **122**: 3433–3441.
- [58] PETERSEN BO, ALBRECHTSEN M. Evidence implying only unprimed RdRP activity during transitive gene silencing in plants. *Plant Mol Biol* 2005; **58**: 575–583.
- [59] PETERSEN BO, JØRGENSEN B, ALBRECHTSEN M. Isolation and RNA silencing of homologues of the RNaseL inhibitor in *Nicotiana* species. *Plant Sci* 2004; **167**: 1283–1289.
- [60] QI Y, PELISSIER T, ITAYA A, HUNT E, WASENEGGER M, DING B. Direct role of a viroid RNA motif in mediating directional RNA trafficking across a specific cellular boundary. *Plant Cell* 2004; **16**:1741–52.
- [61] RUIZ-MEDRANO R, XOCONOSTLE-CÁZARES B, KRAGLER F. The plasmodesmatal transport pathway for homeotic proteins, silencing signals and viruses. *Curr Opin Plant Biol* 2004; **7**: 641–650.
- [62] RUIZ-MEDRANO R, XOCONOSTLE-CÁZARES B, LUCAS WJ. Phloem long-distance transport of CmNACP mRNA: implications for supracellular regulation in plants. *Development* 1999; **126**: 4405–4419.
- [63] RUIZ-MEDRANO R, XOCONOSTLE-CÁZARES B, LUCAS WJ. The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Curr Opin Plant Biol* 2001; **4**: 202–209.
- [64] RYABOV EV, ROBINSON DJ, TALIANSKY ME. A plant virus-encoded protein facilitates long-distance movement of heterologous viral RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 1212–1217.
- [65] SENA G, JUNG JW, BENFEY PN. A broad competence to respond to SHORT ROOT revealed by tissue-specific ectopic expression. *Development* 2004; **131**: 2817–2826.

- [66] SESSIONS A, YANOFSKY MF, WEIGEL D. Cell-cell signaling and movement by the floral transcription factors LEAFY and APETALA1. *Science* 2000; **289**: 779–782.
- [67] SOELLICK T, UHRIG JF, BUCHER GL, KELLMANN JW, SCHREIER PH. The movement protein NSm of Tomato Spotted Wilt Tospovirus (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins, *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 2373–2378.
- [68] SOKOŁOWSKA K. Regulacja łączności symplastycznej w procesie wzrostu i rozwoju roślin, *Post Biol Kom* 2005; **32**: 603–6016.
- [69] SOWIŃSKI P. Plazmodesmy, jako element systemu komunikacji w roślinach, *Post Biol Kom* 2002; **29**: 613–626.
- [70] SOWIŃSKI P. Rurki sitowe – fenomen funkcjonalności. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 619–633.
- [71] STARCK Z. Transport floemowy i dystrybucja substancji pokarmowych. [w] Kopcewicz J, Lewak S [red.] *Fizjologia roślin*. Warszawa, PWN 2002: 434–462.
- [72] TANG G, REINHART BJ, BARTEL DP, ZAMORE PD. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Develop* 2003[ **17**: 49–63.
- [73] TRETYN A. Podstawy strukturalno-funkcjonalne komórki roślinnej. [w] Kopcewicz J, Lewak S [red.] *Fizjologia roślin*. Warszawa, PWN 2002: 43–52.
- [74] VAISTIJ FE, JONES L, BAULCOMBE DC. Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. *Plant Cell* 2002; **14**: 857–867.
- [75] VAN BEL AJ, EHLERS K, KNOBLAUCH M. Sieve elements caught in the act. *Trends Plant Sci* 2002; **7**: 126–132.
- [76] VAN HOUTD H, BLEYS A, DEPICKER A. RNA target sequences promote spreading of RNA silencing. *Plant Physiol* 2003; **131**: 245–253.
- [77] WADA T, KURATA T, TOMINAGA R, KOSHINO-KIMURA Y, TACHIBANA T, GOTO K, MARKS MD, SHIMURA Y, OKADA K. Role of a positive regulator of root hair development, CAPRICE, in *Arabidopsis* root epidermal cell differentiation. *Development* 2002; **129**: 5409–5419.
- [78] WAIGMANN E, LUCAS WJ, CITOVSKY V, ZAMBRYSKI P. Direct functional assay for tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein and identification of a domain involved in increasing plasmodesmal permeability. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 1433–1437.
- [79] WALZ C, GIAVALISCO P, SCHAD M, JUENGER M, KLOSE J, KEHR J. Proteomics of curcubit phloem exudate reveals a network of defence proteins. *Phytochemistry* 2004; **65**: 1795–1804.
- [80] WANG XJ, REYES JL, CHUA NH, GAASTERLAND T. Prediction and identification of *Arabidopsis thaliana* microRNAs and their mRNA targets. *Genome Biol* 2004; **5**: 65–80.
- [81] WILLMANN MR, POETHIG RS. Time to grow up: the temporal role of small RNAs in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 548–552.
- [82] WIŚNIEWSKA A, FILIPECKI M. Wyciszenie genów jako strategia badania ich funkcji w roślinach. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 339–358.
- [83] WOLF S, DEOM CM, BEACHY RN, LUCAS WJ. Movement protein of tobacco mosaic-virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science* 1989; **246**: 377–379.
- [84] WU X, DINNENY JR, CRAWFORD KM, RHEE Y, CITOVSKY V, ZAMBRYSKI PC, WEIGEL D. Modes of intercellular transcription factor movement in the *Arabidopsis* apex. *Development* 2003; **130**: 3735–3745.
- [85] XOCONOSTLE-CÁZARES B, RUIZ-MEDRANO R, LUCAS WJ. Proteolytic processing of CmPP36, a protein from the cytochrome b5 reductase family, is required for entry into the phloem translocation pathway. *Plant J* 2000; **24**: 735–747.
- [86] XOCONOSTLE-CÁZARES B, XIANG Y, RUIZ-MEDRANO R, WANG HL, MONZER J, YOO BC, MCFARLAND KC, FRANCESCHI VR, LUCAS WJ. Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. *Science* 1999; **283**: 94–98.
- [87] YOO BC, KRAGLER F, VARKONYI-GASIC E, HAYWOOD V, ARCHER-EVANS S, LEE YM, LOUGH TJ, LUCAS WJ. A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell* 2004; **16**: 1979–2000.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 31.03.2006 r.

Przyjęto: 29.05. 2006 .

ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń,

e-mail: pnowa@uni.torun.pl



## REGULACJA KWITNIENIA PRZEZ ŚWIATŁO

### LIGHT REGULATION OF FLOWERING

Agnieszka ZIENKIEWICZ, Ewelina KOZŁOWSKA, Jan KOPCEWICZ

Zakład Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin,  
Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

**Streszczenie:** Kwitnienie roślin jest złożonym procesem fizjologicznym zależnym od wielu czynników zarówno wewnętrznych, jak i zewnętrznych. Przejście roślin ze stanu wegetatywnego do generatywnego jest u *Arabidopsis thaliana* kontrolowane przez kilka szlaków rozwojowych. U większości roślin proces zakwitania zależy od czynników środowiskowych, takich jak: temperatura oraz światło. Szlak zależny od jakości światła związany jest ze zjawiskiem zwanym syndromem zacinienia. Przyspieszenie kwitnienia podczas syndromu zacinienia jest zależne od trzech cząsteczek: PHYB, białka PFT1 oraz genu *FT*. Podczas inaktywacji fitochromu B dochodzi do odblokowania genu *PFT1*, w wyniku czego białko PFT1 wiążąc się z genem *FT* indukuje wysoki poziom transkryptu *FT*. Szlak uruchamiany przez indukcyjny fotoperiod obejmuje m.in. takie elementy, jak: fotoreceptory (fitochromy, kryptochromy, flavoproteiny z rodziny ZEITLUPE), elementy zegara biologicznego oraz geny *CO* i *FT*. Ekspresja genu *CO* uważanego za element pośredniczący pomiędzy zegarem biologicznym a indukcją kwitnienia jest regulowana przez białko FKF1 należące do rodziny białek ZEITLUPE oraz białko GIGANTEA będące również elementem zegara okołodobowego. Białko FKF1 jest odpowiedzialne za degradację białka CDF1. Białko CDF1 wiąże się z promotorem genu *CO*, w wyniku czego dochodzi do hamowania jego ekspresji rankiem. Wysoki poziom białka FKF1 po południu wpływa na szybką degradację białka CDF1, co z kolei umożliwia powstawanie wysokiego poziomu mRNA genu *CO*. Poznanie mechanizmów kontrolujących poziom mRNA oraz białka *CO* w dużym stopniu przyczyni się do poznania mechanizmów regulujących czas kwitnienia także u roślin dnia krótkiego.

**Słowa kluczowe:** *Arabidopsis thaliana*, kwitnienie, szlak zależny od jakości światła, zegar okołodobowy.

**Summary:** Flowering is a complex physiological process which depends on many internal and external factors. Transition from vegetative to generative stage in *Arabidopsis thaliana* is controlled by several developmental pathways. Among them are: gibberellin, autonomous, vernalization, light quality and photoperiod pathways. In most of plants flowering depends on light and temperature. Light quality pathway is connected with the shade-avoidance syndrome. Acceleration of flowering during shade-avoidance syndrome is controlled by three major molecules: phytochrome B, PFT1 protein and *FT* gene. Interaction of PHYB with *PFT1* gene leads to its derepression. Newly synthesized PFT1 protein activates *FT* gene transcription. Photoperiod pathway includes a.o. photoreceptors (phytochromes, cryptochromes and flavoproteins from ZEITLUPE family), circadian clock's elements, *CO* and *FT* genes. Expression of *CO* gene, which is thought to act as mediator between biological clock and induction of flowering is regulated

by FKF1 protein which belongs to ZEITLUPE proteins family and GIGANTEA protein, which also is circadian clock element. FKF1 is responsible for binding of CDF1 protein to *CO* gene promotor and repress it's activity in the morning. High level of FKF1 protein in the afternoon leads to fast CDF1 protein degradation which in turn causes increase of *CO* mRNA level. To obtain the informations about mechanisms of *CO* mRNA and protein levels control will increase the knowledge about regulation of flowering time also in short day plants.

*Key words:* *Arabidopsis thaliana*, flowering, light quality pathway, circadian clock.

## WSTĘP

W ontogenezie kwiatowej rośliny okrytozalążkowej wyróżnić można dwa główne okresy: **wegetatywny**, podczas którego następuje różnicowanie się i wzrost rośliny oraz **generatywny**, w którym roślina nabiera zdolności do rozmnażania się, wytwarza kwiaty, ulega zapłodnieniu i tworzy nasiona. Przejście roślin ze stanu wegetatywnego w generatywny jest procesem bardzo intensywnie badanym. Istnieje wiele gatunków roślin, których zakwitanie jest niezależne od warunków zewnętrznych, zatem rozwój generatywny regulowany jest u nich przez czynniki wewnętrzne, np. osiągnięcie przez roślinę określonego wieku bądź wielkości. U zdecydowanej większości gatunków proces zakwitania zależy jednakże od czynników środowiskowych, tj. światła i temperatury. Określone warunki temperaturowe i świetlne są impulsem indukcyjnym decydującym o przejściu tych roślin ze stanu wegetatywnego w generatywny [28].

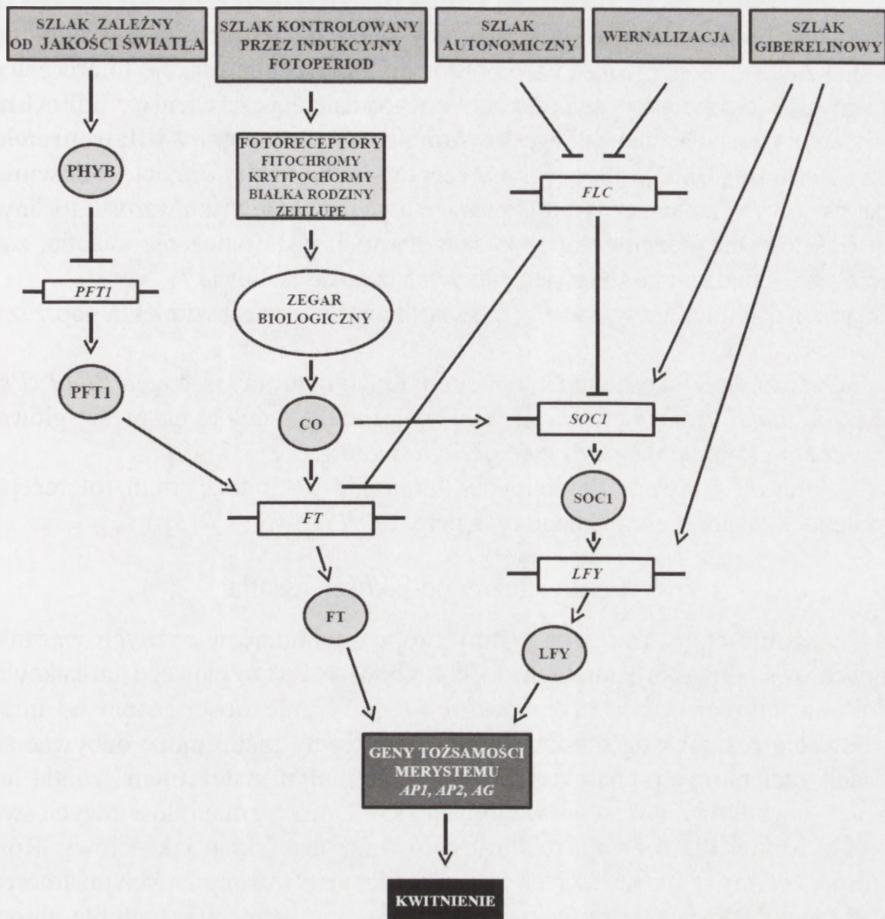
Kwitnienie roślin jest złożonym procesem kontrolowanym, jak to wykazano u *Arabidopsis thaliana*, przez kilka szlaków rozwojowych, do których należą [3] (ryc. 1):

- 1) szlak giberelinowy,
- 2) szlak autonomiczny,
- 3) szlak zależny od obniżonej temperatury (wernalizacja),
- 4) szlak kontrolowany przez indukcyjny fotoperiod,
- 5) szlak zależny od jakości światła.

Wpływ giberelin na indukcję kwitnienia opisano już w latach pięćdziesiątych ubiegłego wieku. Langride w 1957 roku wykazał, iż podawanie egzogennej gibereliny przyspiesza kwitnienie u roślin *Arabidopsis thaliana* [29]. W latach dziewięćdziesiątych uzyskano mutanty giberelinowe rzodkiewnika pospolitego m.in. *gal*, które charakteryzowały się opóźnionym zakwitaniem w warunkach dnia krótkiego [55]. Nie poznano jak dotąd pełnego mechanizmu działania giberelin w indukcji kwitnienia. Wiadomo jednak, iż gibereliny wpływają na ekspresję genu *LFY* (*LEAFY*) oraz prawdopodobnie genów *SOC1* (*Supressor of Overexpresion of CO 1*) oraz *FT* (*Flowering locus T*), których białkowe produkty indukują ekspresję kolejnych genów zaangażowanych w rozwój kwiatu [5, 36, 41].

Genami zaangażowanymi w indukcję kwitnienia są także geny współtworzące szlak autonomiczny. Szlak ten obejmuje geny, w których mutacje powodują powstawanie fenotypów charakteryzujących się opóźnionym kwitnieniem. Proces ten zachodzi niezależnie od warunków fotoperiodycznych i może być odwrócony przez zastosowanie





RYCINA 1. Schemat ilustrujący wzajemne zależności pomiędzy szlakami molekularnymi regulującymi kwitnienie u *Arabidopsis thaliana* (na podstawie [4] i [35] zmienione, szczegółowy opis w tekście)

wernalizacji. Przebieg szlaku autonomicznego jest niezależny od długości dnia [3]. Wśród genów tego szlaku wyróżnia się m.in. *LD* (*LuminiDependens*), *FLD* (*Flowering Locus D*) oraz *FLK* (*Flowering Locus K*). Białka kodowane przez wymienione geny hamują ekspresję genu *FLC* (*Flowering Locus C*) uważanego za głównego represora kwitnienia u *Arabidopsis thaliana* [4, 37].

Większość roślin wytwarza organy generatywne jedynie po zadziałaniu bodźca temperaturowego lub świetlnego. W związku z tym wyróżniono dwie grupy roślin: pierwsza obejmuje rośliny zwane ozimymi kwitnące pod wpływem niskiej temperatury, natomiast druga grupa obejmuje rośliny jare, które zakwitają w odpowiedzi na określony fotoperiod [28]. Jednakże głównym czynnikiem środowiskowym wpływającym w największym stopniu na życie rośliny jest światło. Wpływ energii świetlnej na rośliny jest wielokierunkowy. Z jednej strony warunkuje syntezę związków organicznych w procesie fotosyntezy,

z drugiej zaś wpływa na wzrost i rozwój roślin (tzw. fotomorfogeneza) [17]. Percepcja bodźca świetlnego odbywa się w liściach bądź liścieniach za pośrednictwem wyspecjalizowanych cząsteczek chromoprotein, które pełnią funkcję fotoreceptorów. Zaliczamy do nich: receptory światła czerwonego i dalekiej czerwieni czyli **fitochromy** oraz receptory światła niebieskiego **kryptochromy**, **fototropiny** i **flawoproteiny z rodziny Zeitlupe** [10, 24, 42, 50]. Fotoreceptory odbierają informację o ilościowych oraz jakościowych zmianach warunków świetlnych w środowisku wzrostu rośliny. Do zmian ilościowych możemy zaliczyć czas trwania, jak i natężenie światła, zaś do jakościowych skład widma świetlnego docierającego do rośliny [17].

Badania z ostatnich lat wykazały, iż światło reguluje czas kwitnienia poprzez dwa niezależne szlaki:

- 1) szlak zależny od jakości światła obejmujący, fitochromy oraz gen *PFT1* (*Phytochrome and Flowering Time 1*), którego produkt reguluje ekspresję głównego integratora kwitnienia, czyli genu *FT* (*Flowering Locus T*) [9],
- 2) szlak kontrolowany przez indukcyjny fotoperiod, obejmujący m.in. fotoreceptory, molekuly zegara biologicznego oraz geny *CONSTANS* i *FT* [3].

### 1. Szlak zależny od jakości światła

Poszczególne etapy rozwoju rośliny mogą zachodzić w różnych warunkach świetlnych. W środowisku naturalnym dochodzi bowiem do częściowego lub całkowitego zacienienia jednych roślin przez drugie [28]. W zależności zatem od miejsca występowania rozwój wegetatywny oraz generatywny roślin może odbywać się w miejscach zacienionych, charakteryzujących się małym natężeniem światła lub w miejscach stosunkowo dobrze oświetlonych [15]. Oprócz zmian ilościowych światła niezwykle istotny dla rozwoju roślin jest również jego skład jakościowy. Rośliny monitorują zmiany w jakości światła za pośrednictwem wspomnianych już fotoreceptorów. Barwniki fotosyntetyczne, takie jak chlorofile oraz karoteny i ksantofile, absorbują poza światłem zielonym i częścią dalekiej czerwieni prawie cały zakres promieniowania widzialnego (390–750 nm). Okrywa liści przepuszcza głównie światło w zakresie dalekiej czerwieni, pochłaniając pozostałą część widma. Ponadto liście mają zdolność wybiórczego odbijania określonych długości fal. Światło zielone odbijają bardziej skutecznie niż niebieskie i czerwone. Najistotniejsze zmiany widma świetlnego zachodzą w zakresie światła czerwonego oraz dalekiej czerwieni. Rejestrowanie tych zmian dostarcza roślinom informacji o zmianach zachodzących w środowisku wzrostu [28]. Proporcje intensywności (liczby kwantów) światła czerwonego (R) do dalekiej czerwieni (FR) określono współczynnikiem R:FR [12, 15, 16]. W zależności od typu środowiska oraz światła, współczynnik ten przyjmuje różne wartości. W przypadku światła dziennego wynosi około 1,19, natomiast o zmroku przyjmuje on wartość w zakresie od 0,7 do 0,9. Z kolei w takich ekosystemach, jak las tropikalny czy iglasty, waha się w zakresie od 0,22–0,25 do 0,76–0,77 [28, 57].

Z wielkością współczynnika R:FR związane jest zjawisko określane jako tzw. syndrom zacienienia (ang. *shade-avoidance response*). Ze zjawiskiem tym u roślin mamy do czynienia w sytuacji niskiej wartości współczynnika R:FR. Rośliny rosnące

w takich warunkach środowiskowych charakteryzują się wydłużonymi łodygami i ogonkami liściowymi, redukcją chlorofilu w komórkach miękiszowych liści oraz przyspieszeniem kwitnienia [9, 12, 15]. Fotoreceptorami zaangażowanymi w detekcję zmian w zakresie światła czerwonego oraz dalekiej czerwieni, a przez to uczestniczącymi w regulacji zjawisk występujących podczas syndromu zacienienia są fitochromy. U *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano pięć fitochromów kodowanych przez następujące geny *PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD*, *PHYE*. *PHYA* koduje labilną pulę fitochromu syntetyzowaną w ciemności i szybko degradowaną na świetle. Pula stabilna, kodowana jest przez geny *PHYB* – *PHYE*, których produkty białkowe utrzymują się na podobnym poziomie zarówno na świetle, jak i w ciemności [11]. Fitochromy występują w komórkach w dwóch formach molekularnych: Pr i Pfr [10, 38, 39].

Jak już wspomniano, jedną z cech charakterystycznych dla syndromu zacienienia jest przyspieszenie czasu kwitnienia. Powstaje zatem pytanie, w jaki sposób fitochromy uczestniczą w regulacji tego zjawiska? Wśród pięciu znanych fitochromów najprawdopodobniej najważniejszą rolę w regulacji czasu kwitnienia odgrywa *PHYB*. Badania prowadzone z wykorzystaniem mutantów *phyb Arabidopsis thaliana* wykazały, że fitochrom B hamuje kwitnienie, gdyż rośliny te charakteryzują się przyspieszonym czasem kwitnienia. W 2003 roku Cerdan i Chory [9] wykazali istnienie szlaku zależnego od jakości światła, w którym główną rolę odgrywa *PHYB* oraz nowo zidentyfikowany gen *PFT1*, który koduje białko jądrowe złożone z 836 aminokwasów. Analizy mutantów *pft1* wykazały, iż rośliny te charakteryzują się opóźnionym kwitnieniem w porównaniu z typem dzikim. W przypadku podwójnych mutantów *pft1phyb* obserwowano całkowite zahamowanie kwitnienia zarówno w warunkach dnia długiego, jak i krótkiego. Wyniki te sugerują, że białko *PFT1* wspólnie z fitochromem B stanowią istotne elementy szlaku regulującego czas kwitnienia w zależności od jakości widma świetlnego. Dalsze badania objęły poszukiwania genu, którego ekspresję mogłoby modulować białko *PFT1*. W związku z tym przeanalizowano mutanty *pft1*, *phyb* oraz *pft1phyb* pod względem poziomu ekspresji genu *FT* zaangażowanego w regulację kwitnienia. Wykazano, iż mutanty *phyb* charakteryzują się wyższym poziomem ekspresji genu *FT* aniżeli rośliny typu dzikiego *Arabidopsis thaliana*. Ponadto rośliny z mutacją genu *PFT1*, jak i podwójne mutanty *pft1phyb* wykazują niski poziom ekspresji genu *FT*. Analizowano również poziom ekspresji genów *SOC1* oraz *CO*, jednak nie wykazano bezpośrednich korelacji pomiędzy poziomem mRNA tych genów a czasem kwitnienia u mutantów *pft1* oraz *phyb*. Na podstawie powyższych wyników można wnioskować, iż w szlaku zależnym od jakości światła fitochrom B jest elementem regulującym poziom ekspresji genu *FT*. Prawdopodobnie regulacja ta zachodzi z udziałem białka *PFT1*, które w przypadku inaktywacji *PHYB* podczas syndromu zacienienia indukuje wysoki poziom ekspresji genu *FT*, co w konsekwencji prowadzi do przyspieszenia kwitnienia [9, 15] (ryc. 1 i 2).

## 2. Szlak kontrolowany przez indukcyjny fotoperiod

Fotoperiodyzm jest ewolucyjnym przystosowaniem się roślin do życia w strefach o określonym następstwie pór roku. Rośliny zakwitają zależnie od długości trwania fazy

jasnej i ciemnej w 24-godzinny cykl dobowy. Ze względu na wymagania fotoperiodyczne wyróżniono rośliny; **dnia krótkiego SDP** (ang. *Short Day Plants*), **dnia długiego LDP** (ang. *Long Day Plants*) oraz rośliny **neutralne DNP** (ang. *Day Neutral Plants*) [28].

W 1936 roku Bünning odkrył, iż mechanizmem odpowiedzialnym za mierzenie długości dnia, a w konsekwencji doprowadzającym do kwitnienia roślin jest tzw. zegar biologiczny [7, 54]. 30 lat później hipotezę tę udoskonalono tworząc „model zewnętrznej zgodności”, który zakłada, iż ekspozycja roślin na światło w określonej fazie rytmu okołodobowego indukuje lub hamuje przejście z rozwoju wegetatywnego do generatywnego [46]. Głównym mechanizmem, za którego pośrednictwem światło reguluje czas kwitnienia, jest zegar okołodobowy. Zegar biologiczny składa się z trzech zasadniczych elementów: drogi wejścia (ang. *input*), wewnętrznego oscylatora oraz drogi wyjścia (ang. *output*) [22, 44]. Droga wejścia jest to układ związany z percepcją sygnałów środowiskowych i ich transdukcją do centralnego oscylatora. Wewnętrzny oscylator działa na zasadzie pętli ujemnego sprzężenia zwrotnego generując 24-godzinne rytmy biologiczne. Z kolei droga wyjścia jest układem związanym z przekazywaniem wygenerowanego rytmu do systemów wykonawczych, kontrolujących rytmiczność określonego procesu (np. fosforylacja białek) [60]. Do elementów drogi wejścia zalicza się opisane wcześniej fitochromy, kryptochromy oraz flawoproteiny z rodziny Zeitlupe [11, 33, 50]. Za pośrednictwem tych fotoreceptorów następuje percepcja i przekazanie sygnału świetlnego do kolejnych elementów zegara biologicznego, czego końcowym wynikiem jest m.in. indukcja kwitnienia [33, 44].

Wśród fitochromów przynajmniej cztery z nich są zaangażowane w transdukcję sygnału świetlnego do oscylatora. PHYA jest odpowiedzialny za pochłanianie i transdukcję światła zarówno o niskim, jak i wysokim natężeniu. Z kolei fitochromy B, D oraz E absorbują światło o wysokim natężeniu [3, 33]. Na podstawie licznych badań wykazano, iż przekazanie bodźca świetlnego do oscylatora polega na oddziaływaniu fitochromów z innymi białkami, a interakcje te zachodzą na terenie jądra komórkowego [60]. Wykazano, iż nieaktywne formy fitochromu labilnego oraz stabilnego występują na terenie cytoplazmy i są związane z białkiem PKS1 (*Phytochrome Kinase Substrate 1*). Fotokonwersja fitochromów z formy Pr do Pfr powoduje aktywację domeny kinazowej tego fotoreceptora, co prowadzi do jego autofosforylacji, a następnie do fosforylacji białka PKS1. Oddysocjowanie cząsteczek fitochromu od PKS1 umożliwia transport fotoreceptora do jądra komórkowego [14, 39, 60]. Po przedostaniu się fitochromu B na teren jądra komórkowego wchodzi on w interakcję z białkiem PIF3 (*Phytochrome Interacting Factor 3*) [3, 35]. Białko PIF3 dzięki obecności w nim zasadowego motywu helisa-pętla-helisa ma zdolność bezpośredniego wiązania się z DNA. Posiada ono także domenę PAS, która umożliwia jego interakcje z fitochromem B [17]. Białko PIF3 jest na stałe związane z promotorami genów, których ekspresję reguluje. Zalicza się do nich m.in. dwa geny współtworzące wewnętrzny oscylator: *LHY* (*Late elongated HYpcotyl*) i *CCA1* (*Circadian Clock Associated1*) [42]. Aktywacja białka PIF3 zachodzi dopiero po połączeniu się z formą Pfr fitochromu B, co z kolei prowadzi do aktywacji ekspresji genów docelowych dla białka PIF3 [32].

W transdukcji światła do oscylatora biorą udział również kryptochromy 1 i 2, kodowane przez geny odpowiednio *CRY1* oraz *CRY2*. Kryptochromy są chromoproteinami zaangażowanymi w percepcję oraz transdukcję światła niebieskiego i bliskiego ultrafioletu do wewnętrznego oscylatora. Kryptochromy wchodzą także w interakcje z PHYA oraz PHYB, co sugeruje, że są one zaangażowane w przekazywanie bodźca świetlnego w obrębie szlaków fitochromowych [16, 31, 34].

Analiza poczwórnego mutantu *phyAphyBcry1cry2 Arabidopsis thaliana* wykazała, iż w transdukcji sygnału świetlnego do oscylatora poza fitochromami i kryptochromami uczestniczą jeszcze dodatkowe fotoreceptory. Rośliny te charakteryzowały się bowiem prawidłową wrażliwością na światło i nie wykazywały zaburzeń w rytmice okołodobowej. Istotnie, Somers i wsp. [50] zidentyfikowali białko Zeitlupe (ZTL) i wykazali, iż jest ono najprawdopodobniej receptorem światła niebieskiego zaangażowanym w transdukcję sygnału świetlnego do oscylatora. Dalsze badania przyczyniły się do scharakteryzowania kolejnych białek strukturalnie podobnych do ZTL, które określono mianem LKP2 (*Lov Kelch Protein 2*) i FKF1 (*Flavin-binding, Kelch repeat F-box1*). Wszystkie trzy białka zaliczono do jednej rodziny o wspólnej nazwie ZEITLUPE. [40, 47, 50]. Białka z tej rodziny charakteryzują się występowaniem trzech specyficznych domen, niespotykanych razem u innych białek. Na końcu N opisywanych protein znajduje się domena **LOV** będąca specyficzną klasą motywu PAS, która jest odpowiedzialna za interakcje białko-białko i wiązanie grupy chromoforowej – FMN (mononukleotyd flawinowy) [6]. W części środkowej białka te mają motyw **F-box** zaangażowany w procesy ubikwitynacji i degradacji białek [8]. Na końcu C każdego z białek ZEITLUPE znajduje się sześć powtórzeń domeny **KELCH**, która bierze udział w interakcjach białko-białko [1].

Obecność domeny LOV we wszystkich białkach ZEITLUPE sugeruje, iż mogą one funkcjonować jako flawoproteinowe receptory światła niebieskiego. Ponadto wykazano, że białka te dzięki obecności domeny F-box wiążą się z białkiem SKP1 (*S-phase Kinase associated Protein 1*, ASK u *Arabidopsis*), które jest jednym z elementów ligazy ubikwitynowej E3 typu SCF (*Skp1-Cullin-F-box*). Kompleks SCF zaangażowany jest w rozpoznawanie i wiązanie białek przeznaczonych do degradacji w proteasomach [23, 59]. Jak wykazano, białko ZTL wchodzi również w interakcje z PHYB oraz CRY2, co wskazuje na jego udział w przekazywaniu sygnału świetlnego od kryptochromów i fitochromów do wewnętrznego oscylatora [26].

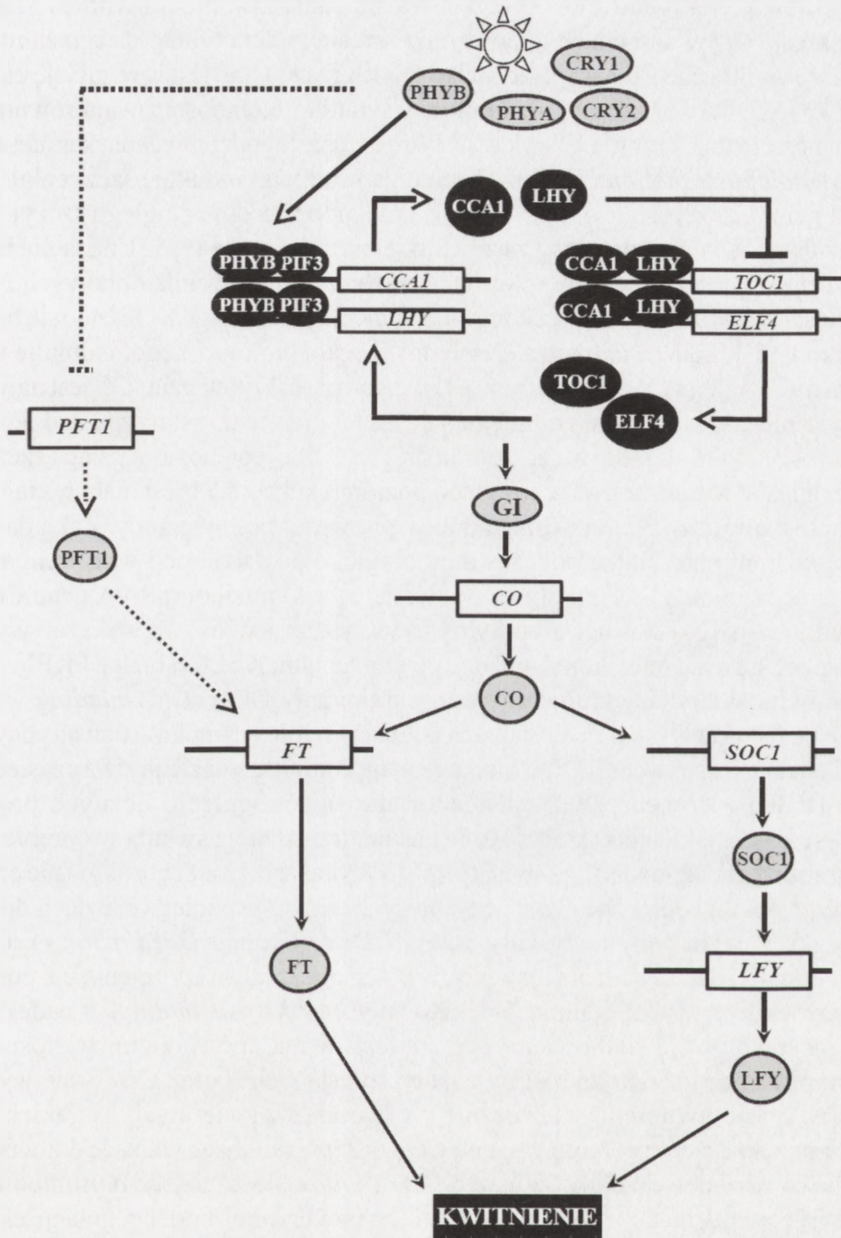
Intensywnie prowadzone badania w ostatnich latach przyczyniły się do identyfikacji kolejnych elementów wchodzących w skład drogi wejścia światła do oscylatora. Należą do nich białka: ELF3 (*Early Flowering 3*), SSR1 (*Sensitivity to Red light reduced*) oraz TIC (*Time for Coffee*). Zarówno ELF3, jak i TIC prawdopodobnie pełnią funkcję negatywnych regulatorów transdukcji bodźca świetlnego do zegara. ELF3 wchodzi bowiem w interakcje z PHYB hamując jednocześnie jego aktywność, a to z kolei prowadzi do zablokowania transdukcji światła w obrębie drogi wejścia [43]. Rola białka TIC w szlaku transdukcji światła do oscylatora nie została dotychczas poznana, jednakże wydaje się, że białko to podobnie jak ELF3, wchodzi w interakcję z PHYB hamując jego działanie [21]. Staiger i wsp. [51] wykazali natomiast, że białko SSR1 bierze udział

w przekazywaniu bodźca świetlnego do oscylatora i stanowi element szlaku fitochromowego (PHYB). Ponadto mutanty *ssr1* charakteryzowały się zaburzeniami wielu procesów wykazujących rytmy dobowe np. ruchów liści oraz ekspresji genów *LHY* oraz *CCA1*. Wyniki te wskazują, że białko SSR1 może funkcjonować poza szlakiem fitochromowym i jest elementem koniecznym do prawidłowego funkcjonowania zegara biologicznego [51].

Centralną część zegara biologicznego stanowi wewnętrzny oscylator. Oscylator jest mechanizmem odpowiedzialnym za generowanie 24-godzinnych rytmów biologicznych [60]. U rzodkiewnika pospolitego zidentyfikowano cztery geny, które formują pętlę sprzężenia napędzającą oscylator. Są to: *CCA1* (*Circadian Clock Associated 1*), *LHY* (*Late elongated HYpocotyl*), *TOC1* (*Timing Of Cab expression 1*) i *ELF4* (*Early Flowering 4*) [2, 13]. Na podstawie badań prowadzonych na *Arabidopsis thaliana* stworzono model działania oscylatora wewnętrznego. Powstająca o świetle aktywna forma fitochromu B, po przejściu do jądra komórkowego, łączy się z czynnikiem transkrypcyjnym PIF3 na stałe związanym z kasetą G-box promotorów genów *LHY* i *CCA1*. Prowadzi to do aktywacji transkrypcji tych genów, a szczyt akumulacji ich białkowych produktów w cytoplazmie ma miejsce dwie godziny po rozpoczęciu transkrypcji. Po przejściu białek *LHY* i *CCA1* do jądra, ulegają one związaniu z sekwencją EVENING ELEMENT promotora genu *TOC1* oraz promotorem genu *ELF4* i powodują hamowanie ich ekspresji w ciągu dnia. Zmniejszenie ilości białka *TOC1* oraz *ELF4* wpływa z kolei na obniżenie aktywności genów *LHY* i *CCA1*, co powoduje spadek poziomu białek przez nie kodowanych. Najniższy poziom białek *LHY* i *CCA1* obserwuje się o zmierzchu; stan ten pozwala z kolei na wznowienie transkrypcji genów *TOC1* oraz *ELF4*. Białkowy produkt genu *TOC1* akumulowany jest w ciągu nocy, po czym wchodzi w interakcje z PIF3 i PFL1 (*PIF like 1*), co umożliwia ponowną aktywację transkrypcji genów *LHY* i *CCA1* o wschodzie słońca [22, 34, 44, 60] (ryc. 2).

Zarówno białka wchodzące w skład drogi wejścia, jak i wewnętrznego oscylatora, regulują ekspresję wielu genów zaangażowanych w regulację różnorodnych procesów. Jednym z genów regulowanych przez białka zegara biologicznego jest *CONSTANS*. Gen ten koduje białko jądrowe zawierające motyw CCT i dwie kasety B typu palca cynkowego, co wskazuje, że może pełnić ono funkcję czynnika transkrypcyjnego [52]. Poziom transkryptu genu *CO* wykazuje rytm okołodobowy przy ciągłym świetle. Nadekspresja opisywanego genu nie zmienia jednakże rytmu biologicznej aktywności typowego genu pozostającego pod kontrolą zegara biologicznego – *CAB* (*Chlorophyll A/B-binding protein 2*). Wyniki te sugerują, iż białko *CO* nie wpływa w znaczący sposób na generowanie rytmów okołodobowych [30]. Z drugiej strony rośliny z nadekspresją *CO* charakteryzują się bardzo wczesnym zakwitaniem. Wskazuje to, że *CO* funkcjonuje jako gen drogi wyjścia, a jednocześnie element pośredniczący pomiędzy zegarem biologicznym i indukcją kwitnienia [22].

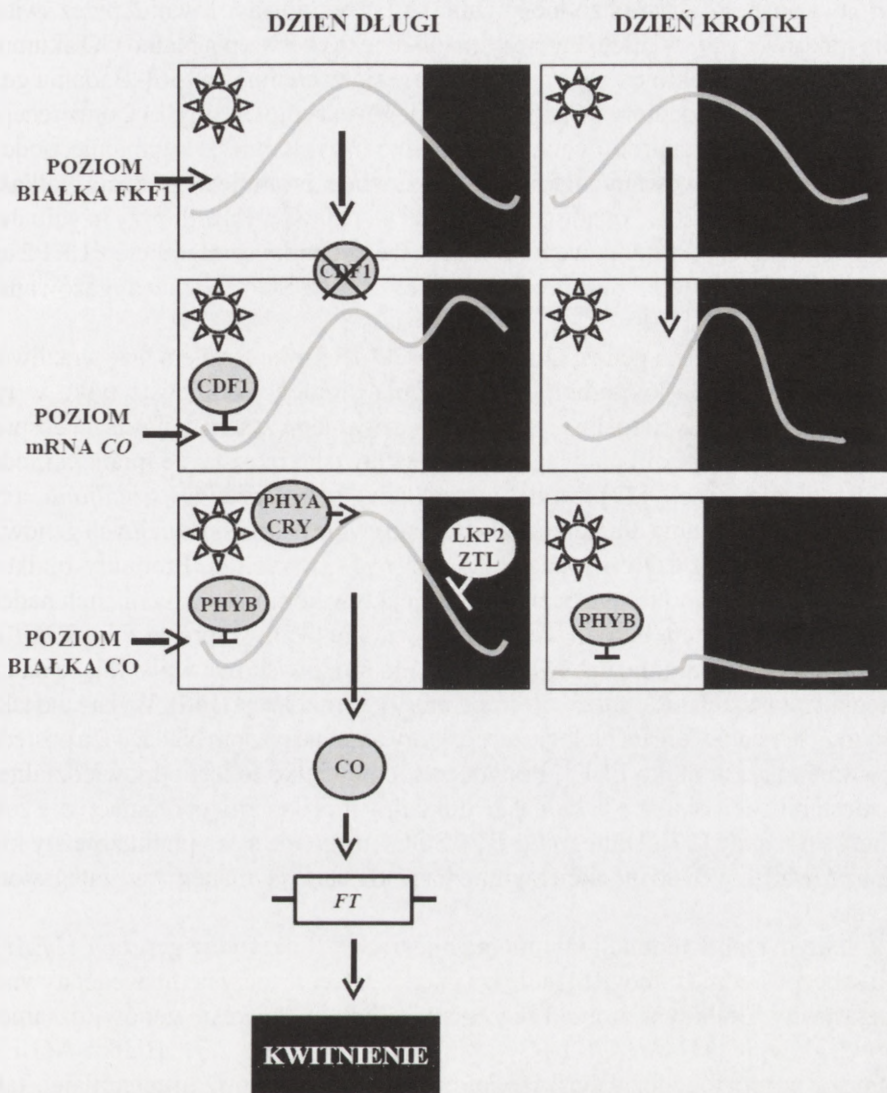
Wykazano, że ekspresja genu *CO* jest regulowana m.in. przez białko *GIGANTEA*. Wcześniejsze badania wykazały, że *GIGANTEA* jest elementem pośredniczącym pomiędzy wewnętrznym oscylatorem a genem *CO*. Mutanty *gi* wykazują bardzo niski



RYCINA 2. Uproszczony schemat ilustrujący szlak zależny od jakości światła (linia przerywana) oraz szlak kontrolowany przez indukcyjny fotoperiod. Gen *CO* jest kluczową molekułą zaangażowaną w kontrolę kwitnienia, a jego poziom regulowany jest za pośrednictwem szlaku kontrolowanego przez indukcyjny fotoperiod. Szlak ten obejmują m.in. fotoreceptory oraz elementy zegara biologicznego. Poza białkiem *CO* pośredni wpływ na promocję kwitnienia ma również białko *PFT1*, będące elementem szlaku zależnego od jakości światła (wg [4] zmienione)

poziom transkryptu genu *CO*, co przejawia się zahamowaniem kwitnienia. Z kolei nadekspresja *CO* w mutantach *gi* powoduje zniesienie fenotypu późnego zakwitania. Powyższe wyniki sugerują więc, że białko GI zaangażowane jest w regulację ekspresji genu *CO* [52]. W warunkach, kiedy okresy światła i ciemności trwają równo po 12 godzin, poziom transkryptu *CO* wykazuje rytm dwunastogodzinny. Jednak umieszczenie roślin *Arabidopsis thaliana* w warunkach dnia krótkiego indukuje szczyt akumulacji mRNA genu *CO* w trakcie długiej nocy. Z kolei podczas dnia długiego szczyt ten jest zauważalny pod koniec dnia i w czasie krótkiej nocy (ryc. 3) [46, 52]. Ostatnie badania genetyczne dostarczyły więcej informacji na temat powstawania dobowych rytmów aktywności genu *CO*, jak również kontroli kwitnienia przez ten gen. Okazało się bowiem, że białko FKF1, będące jednym z elementów zegara biologicznego, indukuje wysoki poziom mRNA genu *CO*. U mutantów *fkf1* poziom transkryptu genu *CO* jest najwyższy w nocy, a nie pod koniec dnia długiego, jak ma to miejsce u roślin typu dzikiego [22]. Białko FKF1 akumuluje się w czasie dnia długiego, zaś jego poziom osiąga szczyt pod koniec dnia. W warunkach dnia krótkiego poziom białka FKF1 jest niski w ciągu dnia, natomiast najwyższy poziom osiąga ono w pierwszej połowie nocy. Zakłada się, że wysoki poziom tego białka podczas dnia długiego powstaje pod wpływem światła. Pojawienie się białka FKF1 wpływa z kolei na wysoki poziom mRNA genu *CO* [24]. Imaizumi i wsp. [25] stosując dwu-hybrydowy system drożdżowy wykazali występowanie specyficznych interakcji pomiędzy powtórzeniami KELCH białka FKF1 a trzema białkami charakteryzującymi się obecnością domeny DOF (*DNA-binding with one finger*). Domena ta występuje w białkach pełniących rolę czynników transkrypcyjnych. Dzięki obecności sekwencji DOF białka te mają zdolność wiązania się z cząsteczkami DNA. Białka z domeną DOF zaangażowane są w regulację licznych procesów fizjologicznych, takich jak: kiełkowanie nasion, transdukcja światła w obrębie szlaku fitochromowego, odpowiedź na stres itp. [58]. Wykazano, iż zidentyfikowane czynniki transkrypcyjne są kodowane przez geny, których ekspresja podlega oscylacji dobowej, w związku z czym geny te zyskały miano *CDF1* (*Cycling Dof Factor 1*), *CDF2* i *CDF3*. Ponadto dalsze badania ujawniły, iż w regulację czasu kwitnienia bezpośrednio zaangażowane jest tylko białko *CDF1*. Rośliny *Arabidopsis thaliana* z nadekspresją *CDF1* charakteryzują się bowiem czasem kwitnienia opóźnionym w stosunku do roślin typu dzikiego. Z kolei rośliny z nadekspresją *CDF2* oraz *CDF3* nie wykazują zmian w czasie kwitnienia niezależnie od warunków świetlnych, w jakich rosną. Wykazano także, że w promotorze genu *CO* występują miejsca wiążące domenę DOF. Badania *in vitro* potwierdziły, iż białko *CDF1* wiąże się z miejscem promotorowym *CO* [24]. Na podstawie uzyskanych wyników stworzono model regulacji ekspresji genu *CO* przez białko FKF1. Najprawdopodobniej niski poziom mRNA *CO* o poranku indukowany jest przez wiązanie się czynnika transkrypcyjnego *CDF1* do promotora genu *CO*. Późnym popołudniem, kiedy poziom białka FKF1 jest wysoki, białko *CDF1* podlega szybkiej degradacji przez kompleks  $SCF^{FKF1}$ . Niski poziom białka *CDF1* umożliwia z kolei zniesienie represji genu *CO*, co prowadzi w konsekwencji do osiągnięcia wysokiego poziomu transkryptu *CO* [26].





RYCINA.3. Regulacja poziomu białka FKF1 oraz transkryptu i produktu genu *CO* u roślin *Arabidopsis thaliana* eksponowanych na różne warunki fotoperiodyczne. W warunkach dnia długiego poziom białka FKF1 osiąga szczyt pod koniec dnia, co prowadzi do szybkiej degradacji białka CDF1 – represora genu *CO*. Derepresja genu *CO* prowadzi w konsekwencji do osiągnięcia wysokiego poziomu transkryptu genu *CO*. Wysoki poziom białka *CO* regulowany jest przez fitochrom A oraz kryptochromy. Korelacja pomiędzy długością dnia oraz poziomem mRNA i białka *CO* prowadzi w rezultacie do promocji kwitnienia. W warunkach dnia krótkiego u roślin długodniowych ekspozycja roślin na światło nie pokrywa się z czasem najwyższej ekspresji genu *CO* i jego produktu białkowego, co objawia się brakiem indukcji kwitnienia (wg [4] zmienione)

Poziom, a pośrednio także stabilność białka CO są regulowane również przez światło. U roślin traktowanych światłem niebieskim lub daleką czerwiecią białko CO akumulowane jest w jądrze; efektu takiego nie obserwuje się w ciemności [56]. Badania genetyczne wskazują, że receptory światła niebieskiego – kryptochromy 1 i 2 oraz receptor dalekiej czerwieni – fitochrom A stabilizują białko CO i stymulują kwitnienie, podczas gdy fitochrom B, aktywowany przez światło czerwone, promuje degradację białka CO i opóźnia zakwitanie [20]. Ponadto Fukamatsu i wsp. [18] wykazali przy użyciu dwuhybrydowego systemu drożdżowego, iż białko CO wchodzi w interakcję z LKP2 oraz ZTL. Możliwe jest zatem, że kompleksy SCF<sup>LKP2</sup> oraz SCF<sup>ZTL</sup> są zaangażowane w degradację białka CO [18].

Wysoki poziom mRNA genu *CO* oraz białka CO determinują zatem fazę wrażliwości świetlnej oraz promują kwitnienie podczas dnia długiego, ponieważ tylko w tych warunkach czas ekspozycji roślin na światło pokrywa się z czasem najwyższej ekspresji genu *CO* i jego produktu białkowego. Opisane zjawisko określa się mianem modelu „zewnętrznej zgodności” [22]. Model ten zakłada, że u *Arabidopsis thaliana*, a być może i u innych roślin dnia długiego białko CO aktywuje ekspresję kolejnych genów *FT* i *SOC1* (*Suppressor of Overexpression of CO 1*) [45] (ryc. 2). Produkty białkowe tych genów są prawdopodobnie bezpośrednimi aktywatorami kwitnienia, ich nadekspresja powoduje bowiem bardzo wczesne zakwitanie [45]. Ekspresja *FT* i *SOC1* jest regulowana także przez inne niż światło czynniki środowiskowe wpływające na czas kwitnienia, m.in. działanie obniżonej temperatury (wernalizacja) [46]. Wykazano także, że jednym z elementów zegara biologicznego, który reguluje poziom białka FT, a pośrednio czas kwitnienia, jest białko ELF3. Prawdopodobnie białko to jest odpowiedzialne za proces destabilizacji białka FT. Jednakże dokładny mechanizm tej regulacji nie został dotychczas poznany [27]. Dlatego też FT i SOC1 uważane są za punkt zbieżny kilku szlaków prowadzących do indukcji kwitnienia i określane są mianem tzw. integratorów kwitnienia [37].

W kolejnym etapie indukcji kwitnienia białko SOC1 aktywuje gen *LFY* (*LEAFY*), który jest bezpośrednio odpowiedzialny za przekształcenie merystemu wegetatywnego w generatywny. Białkowy produkt tego genu indukuje ekspresję genów tożsamości organów; głównie *AGAMOUS* (*AG*) oraz *APETALA* (*API,2,3*). Białka AG i AP uczestniczą w morfogenezie poszczególnych części kwiatów, uruchamiając także dodatkowe geny w poszczególnych organach kwiatowych [28].

Większość badań mających na celu poznanie molekularnego mechanizmu indukcji kwitnienia przeprowadzono na modelowej roślinie dnia długiego *Arabidopsis thaliana*. Podjęto jednakże próby wyjaśnienia tego zjawiska także u roślin dnia krótkiego i roślin neutralnych. Badania te są w toku, wstępne wyniki sugerują jednak, że opisane u *Arabidopsis thaliana* molekularne mechanizmy indukcji kwitnienia mogą mieć charakter uniwersalny.

## 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] 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.
- [3] AUSIN I, ALONSO-BLANCO C, MARTINEZ-ZAPATER J-M. Environmental regulation of flowering. *Int J Dev Biol* 2005; **49**: 689–705.
- [4] AUSIN I, ALONSO-BLANCO C, JARILLO JA, RUIZ-GARCIA L, MARTINEZ-ZAPATER J-M. Regulation of flowering time by FVE, a retinoblastoma-associated protein. *Nat Genet* 2004; **36**: 162–166.
- [5] BLAZQUEZ MA, WEIGEL D. Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature* 2000; **404**: 889–892.
- [6] BRIGGS WR, CHRISTIE JM. Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci* 2002; **7**: 204–210.
- [7] BÜNNING E. Die endogene Tagesrhythmik als Grundlage der photoperiodischen Reaktion. *Ber Dtsch Bot Ges* 1936; **54**: 590–607.
- [8] CALLIS J, VIERSTRA RD. Protein degradation in signaling. *Curr Opin Plant Biol* 2000; **3**: 381–386.
- [9] CERDAN PD, CHORY J. Regulation of flowering time by light quality. *Nature* 2003; **423**: 881–885.
- [10] CHEN M, CHORY J, FANKHAUSER CH. Light signal transduction in higher plants. *Annu Rev Genet* 2004; **38**: 87–117.
- [11] DEVLIN PF. Signs of the time: environmental input to the circadian clock. *J Exp Bot* 2002; **53**: 1535–1550.
- [12] DEVLIN PF, ROBSON PR, PATEL SR, GOOSEY L, SHARROCK RA, WITHELAM GC. Phytochrome D acts in the shade-avoidance syndrome in *Arabidopsis* by controlling elongation growth and flowering time. *Plant Physiol* 1999; **119**: 909–915.
- [13] 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.
- [14] FANKHAUSER 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; **28**: 1539–1541.
- [15] FRANKLIN KA, WITHELAM GC. Phytochromes and shade-avoidance responses in plants. *Annals of Botany* 2005; **96**: 169–175.
- [16] FRANKLIN KA, LARNER VS, WITHELAM GC. The signal transducing photoreceptors of plants. *Int J Dev Biol* 2005; **49**: 653–664.
- [17] FRANKOWSKI K, KĘSY J, KOPCEWICZ J. Fitochrom i droga transdukcji światła. *Post Biochem* 2001; **47**: 184–191.
- [18] FUKAMATSU Y, MITSUIS, YASUHARA M, TOKIOKA Y, IHARA Y, IHARA N, YUJITA S, KIYOSUE. Identification of LOV KELCH PROTEIN (LKP2)-interacting factors that can recruit LKP2 to nuclear bodies. *Plant Cell Physiol* 2005; **46**: 1340–1449.
- [19] GARNER WW, ALLARD HA. Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. *J Agric Res* 1920; **83**: 553–606.
- [20] GUO HW, YANG WY, MOCKLER TC, LIN CT. Regulations of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science* 1998; **279**: 1360–1363.
- [21] HALL A, BASTOW RM, DAVIS SJ, HANANO S, McWATTERS HG, HIBBERD V, DOYLE MR, SUNG S, HALLIDAYKI, AMASINO RM. The *TIME FOR COFFEE* gene maintains the amplitude and timing of *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell* 2003; **15**: 2719–2729.
- [22] HAYAMA R, COUPLAND G. The molecular basis of diversity in the photoperiodic flowering responses of *Arabidopsis* and Rice. *Plant Physiol* 2004; **135**: 677–684.
- [23] HETMANN A, KOWALCZYK S. Roślinne receptory światła niebieskiego i UV-A pośredniczące w reakcjach fototropicznych, fotomorfogenezie i nastawianiu zegara biologicznego. *Post Biol Kom* 2004; **31**: 441–463.
- [24] IMAIZUMI T, TRAN HG, SWARTZ TE, BRIGGS WR, KAY SA. FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signaling in *Arabidopsis*. *Nature* 2003; **426**: 302–306.

- [25] IMAIZUMI T, SCHULTZ TF, HARMON FG, HO LA, KAY SA. FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of *CONSTANS* in *Arabidopsis*. *Science* 2005; **309**: 293–297.
- [26] JARILLO JA, CAPEL J, TANG RH, YANG HQ, ALONSO JR, ECKER JR, CASHMORE AR. An *Arabidopsis* circadian clock component interacts with both CRY1 and PHYB. *Nature* 2001; **410**: 487–490.
- [27] KIM W-Y, HICKS KA, SOMERS DE. Independent roles for *EARLY FLOWERING 3* and *ZEITLUPE* in the control of circadian timing hypocotyl length, and flowering time. *Plant Physiol* 2005; **139**: 1557–1569.
- [28] KOPCEWICZ J. Fizjologia roślin. PWN Warszawa 2002.
- [29] LANGRIDGE J. Effect of day-length and gibberellic acid on the flowering of *Arabidopsis*. *Nature* 1957; **180**: 36–37.
- [30] LEDGER S, STRAYER C, ASHTON F, KAY SA, PUTTERILL J. Analysis of the function of two circadian-regulated *CONSTANS*-LIKE genes. *Plant J* 2000; **26**: 15–22.
- [31] LISCIUM 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.
- [32] MARTINEZ-GARCIA JF, HUQ E, QUAIL PH. Direct targeting of light signals to a promoter element bound transcription factor. *Science* 2000; **288**: 859–863.
- [33] MAS P. Circadian clock signaling in *Arabidopsis thaliana*: from gene expression to physiology and development. *In J Dev Biol* 2005; **49**: 491–500.
- [34] MAS P, DEVLIN PF, PANDA S, KAY SA. Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. *Nature* 2000; **408**: 716–720.
- [35] MILLAR AJ. Input signals to the plant circadian clock. *J Exp Bot* 2004; **55**: 277–283.
- [36] MOON J, SUH SS, LEE H, CHOI KR, HONG CB, PAEK NC, KIM SG, LEE I. The *SOC1* MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*. *Plant J* 2003; **35**: 613–623.
- [37] MOURADOV A, CREMER F, COUPLAND G. Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. *The Plant Cell* 2002; **14**: 111–130.
- [38] MØLLER SG, INGLES PJ, WHITELAM GC. The cell biology of phytochrome signalling. *New Phytologist* 2002; **154**: 553–590.
- [39] NAGY F, SCHÄFER. Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* 2002; **53**: 329–355.
- [40] 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.
- [41] PARCY F. Flowering: a time for integration. *Int J Dev Biol* 2005; **49**: 585–593.
- [42] QUAIL PH. Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Curr Opin Cell Biol* 2002; **14**: 180–188.
- [43] 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.
- [44] SALOME PA, McCLUNG RC. The *Arabidopsis* clock. *J Biol Rhythms* 2004; **19**: 425–435.
- [45] SAMACH A, ONOUCHI H, GOLD SE, DITTA GS, SCHWARZ-SOMMER Z, YANOFSKY MF, COUPLAND G. Distinct roles of *CONSTANS* target in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science* 2000; **288**: 1613–1616.
- [46] SEARLE I, COUPLAND G. Induction of flowering by seasonal changes in photoperiod. *EMBO J* 2004; **23**: 1217–1222.
- [47] SCHULTZ TF, KIYOSUE T, YANOWSKI M, WADA M, KAY SA. A role for LKP2 in the circadian clock of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2001; **13**: 2659–2670.
- [48] SHELDON CC, CONN AB, DENNIS ES, PEACOCK WJ. Different regulatory regions are required for the vernalization-induced repression of *FLOWERING LOCUS C* and for the epigenetic maintenance of repression. *Plant Cell* 2002; **14**: 2527–2537.
- [49] SHELDON CC, FINNEGAN EJ, ROUSE DT, TADEGE M, BAGNALL DJ, HELLIWELL CHA, PEACOCK WJ, DENNIS ES. The control of flowering by vernalization. *Curr Opin Plant Biol* 2000; **3**: 418–422.
- [50] SOMERS DE, SCHULTZ TF, MILNAMOW M, KAY SA. *ZEITLUPE* encodes a novel clock associated PAS protein from *Arabidopsis*. *Cell* 2000; **101**: 319–329.
- [51] STAIGER D, ALLENBACH L, SALATHIA N, FIECHTER V, MILARR DA, CHORY J, FANKHAUSER CH. The *Arabidopsis SSR1* gene mediates phyB signaling and is required for normal circadian clock function. *Genes & Development* 2003; **17**: 256–268.

- [52] 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.
- [53] SUNG S, AMASINO RM. Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature* 2004; **427**: 159–164.
- [54] THOMAS B, VINCE-PRUE D. Photoperiodism in Plants. Academic Press, Ed 2. San Diego, CA. 1997.
- [55] WILSON RN, HECKMAN JW, SOMERVILLE CR. Giberelins is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. *Plant Physiol* 1992; **100**: 403–408.
- [56] VALVERDE F, MOURADOV A, SOPPE W, RAVENSCROFT D, SAMACH A, COUPLAND G. Photoreceptor regulation of *CONSTANS* protein and the mechanism of photoperiodic flowering. *Science* 2004; **303**: 1003–1006.
- [57] VANDENBUSSCHE F, PIERIK R, MILLENAAR FF, VOESENEK L, VAN DER STRAETEND. Reaching out of the shade. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 462–468.
- [58] YANAGISAWA S. Dof domain proteins: plant specific transcription factors associated with diverse phenomena unique to plants. *Plant Cell Physiol* 2004; **45**: 386–391.
- [59] YASUHARA M, MITSUIS, HIRANO H, TAKANABE R, TOKIOKA Y, IHARA N, KOMATSU A, SEKI M, SHINOZAKI K, KIYOSUE T. Identification of ASK and clock-associated proteins as molecular partners of LKP2 (LOV kelch protein 2) in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 2004; **55**: 2015–2027.
- [60] ZIENKIEWICZ A, TRETYN A, KOPCEWICZ J. Molekularne i fizjologiczne podstawy funkcjonowania roślinnego zegara okołodobowego. *Post Biol Kom* 2004; **31**: 607–623.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 31.03. 2006 r.

Przyjęto: 06.06, 2006 r.

ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń

e-mail: [agazet@biol.uni.torun.pl](mailto:agazet@biol.uni.torun.pl)



## ROLA CZYNNIKA CYTOSTATYCZNEGO W REGULACJI MEJOZY OOCYTÓW SSAKÓW

### THE ROLE OF CYTOSTATIC ACTIVITY IN MEIOTIC MATURATION OF MAMMALIAN OOCYTES

Karolina ARCHACKA<sup>1</sup>, Maria A. CIEMERYCH<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Cytologii i <sup>2</sup>Zakład Embriologii,  
Instytut Zoologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

*Streszczenie:* Dojrzewanie oocytów kręgowców zostaje zablokowane w stadium metafazy drugiego podziału mejotycznego. Oocyty, które osiągnęły to stadium, są owulowane, a następnie mogą być aktywowane przez wnikający plemnik lub przez działanie bodźca partenogenetycznego. Za utrzymanie bloku w stadium metafazy drugiego podziału mejotycznego odpowiedzialna jest aktywność cytostatyczna (CSF), która nie dopuszcza do inaktywacji głównego regulatora fazy M, jakim jest kinaza CDK1 – cyklina B. Zanik aktywności CSF wydaje się niezbędny do ukończenia przez oocyt drugiego podziału mejotycznego i rozpoczęcia rozwoju zarodkowego. Doświadczenia przeprowadzone na oocytach płazów doprowadziły do odkrycia czynników zaangażowanych w powstawanie aktywności cytostatycznej. Dotychczas najlepiej scharakteryzowana została rola białek szlaku kinazy MAP (ERK1/ERK2), choć ciągle nieznyany jest dokładny mechanizm działania tych kinaz jako składnika CSF. Prowadzone są również badania nad rolą innych czynników, takich jak: białka zaangażowane w regulację punktu kontrolnego wrzeczona podziałowego oraz białka z rodziny Emi. Niniejszy artykuł ma na celu przedstawienie aktualnej wiedzy na temat natury tej aktywności, jej roli w regulacji mejozy oocytów ssaków, na przykładzie myszy jako organizmu modelowego, jak również perspektyw dalszych badań.

*Słowa kluczowe:* ssaki, mysz, oocyt, mejoza, czynnik cytostatyczny.

*Summary:* Maturing vertebrate oocytes become arrested in metaphase of the second meiotic division. These oocytes are ovulated, and then can be activated by sperm or parthenogenetic stimulus. Metaphase arrest is mediated by the cytostatic activity – CSF, that prevents the inactivation of the major M-phase regulator i.e. CDK1-cyclin B kinase. CSF inactivation seems to be necessary for the completion of the second meiotic division and the initiation of the embryonic development. Analysis of amphibian oocyte maturation led to the discovery of factors crucial for the CSF activation. Among them are proteins involved in MAP kinase (ERK1/ERK2) pathway. Moreover, several studies focus on the factors regulating the function of the spindle assembly checkpoint and also members of the Emi protein family. Current review focus on mouse as a model organism. We discuss current understanding of the nature of cytostatic activity, its role in the meiotic maturation of mammalian oocytes and also present perspectives of further investigations.

*Key words:* mouse, oocyte, meiotic division, CSF.

## WPROWADZENIE

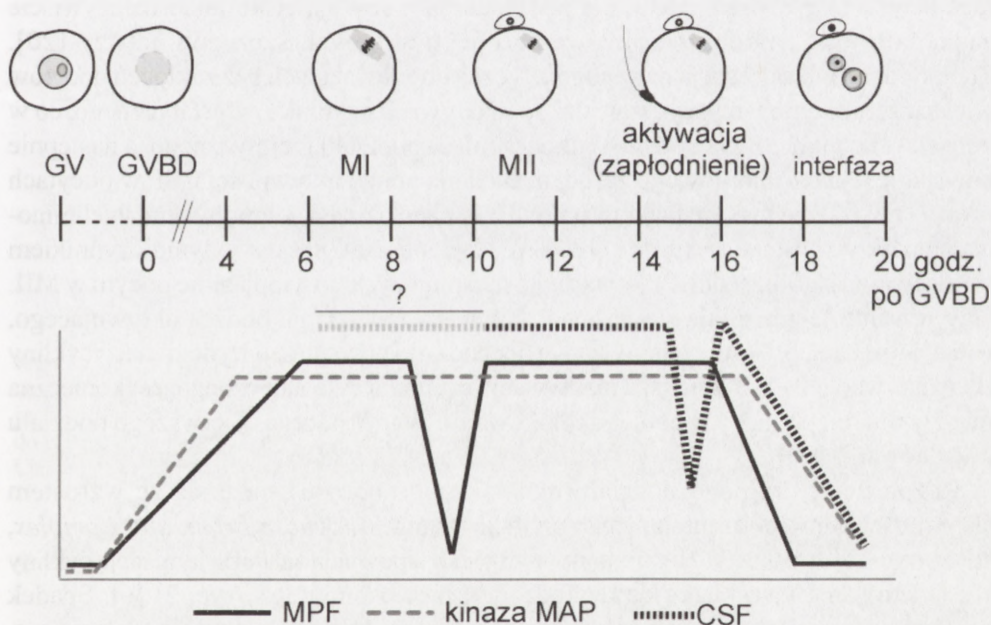
Oocyty znajdujące się w jajniku samicy myszy zablokowane są w stadium profazy pierwszego podziału mejotycznego. Oocyty te przechodzą fazę wzrostu, podczas której w ich cytoplazmie gromadzone są mRNA i białka niezbędne dla prawidłowego przebiegu dalszych etapów dojrzewania, a następnie początkowych etapów rozwoju zarodkowego. Wtedy też oocyty nabierają zdolności do wznowienia mejozy w odpowiedzi na indukcję hormonalną lub izolację z pęcherzyków jajnikowych i hodowlę *in vitro* [8]. Stadium profazy określane jest także jako stadium pęcherzyka zarodkowego, a nazwa ta pochodzi od angielskiego określenia jądra oocytu – *Germinal Vesicle* (GV). Wznowienie mejozy przebiega w oocytach pod kontrolą czynnika odkrytego w 1971 roku przez Masui'ego i Markerta oraz Smitha i Eckera podczas badań nad oocytami *Rana pipiens* i określonego mianem MPF (z ang. *Maturation Promoting Factor* lub *M-phase Promoting Factor*) [25]. Późniejsze badania wykazały, że jest to uniwersalny czynnik regulujący nie tylko podziały mejotyczne oocytów kręgowców, ale także podziały mitotyczne komórek zarodkowych i somatycznych tak różnych organizmów jak rośliny i zwierzęta, a także komórek grzybów [25]. Obecnie wiadomo, że MPF jest heterodimerem składającym się z podjednostki regulacyjnej – cykliny B oraz podjednostki katalitycznej CDK1 (z ang. *Cyclin Dependent Kinase 1*), która jest kinazą serynowo-treoninową o masie 34 kD [9]. Podstawową rolą MPF w komórce jest fosforylacja określonych białek, takich jak: laminy jądrowe czy histon H1. Procesy te są niezbędne do rozpoczęcia fazy M cyklu komórkowego.

W oocytach, które wznowiły mejozę, dochodzi do aktywacji MPF, co prowadzi do fosforylacji lamin, ich depolimeryzacji i w efekcie do zaniku otoczki jądrowej. Zjawisko to określane jest jako rozpad pęcherzyka zarodkowego (z ang. *Germinal Vesicle BreakDown*, GVBD). Równocześnie rozpoczyna się kondensacja chromatyny oraz tworzenie wrzeciona metafazy pierwszego podziału mejotycznego (metafazy I, MI) [1]. W oocytach myszy aktywność MPF rośnie stopniowo od momentu wznowienia mejozy i osiąga maksimum po około 4 godz., kiedy znajdujące się w oocycie chromosomy ułożone są w płycie równikowej, a związane z nimi mikrotubule formują wrzeciono podziałowe [1]. Stadium to zwyczajowo określa się mianem metafazy I. Wydaje się jednak, że bardziej prawidłowe byłoby stwierdzenie, że oocyty znajdują się w stadium prometafazy. Badania ostatnich lat wykazały bowiem, że w takich oocytach proces formowania prawidłowych połączeń między kinetochorami chromosomów a mikrotubulami wrzeciona podziałowego nie został jeszcze ukończony, a zatem aktywny jest punkt kontrolny wrzeciona podziałowego [1]. Obecnie przyjmuje się, że dopiero wytworzenie stabilnych połączeń między kinetochorami a mikrotubulami wrzeciona, prowadzące do inaktywacji punktu kontrolnego, wyznacza moment rozpoczęcia metafazy [26]. W dojrzewających oocytach myszy następowałoby to dopiero w 8–9 godz. od momentu wznowienia mejozy. Wtedy aparat podziałowy staje się w pełni funkcjonalny i dochodzi do ukończenia pierwszego podziału mejotycznego. Podziałowi temu towarzyszy przejściowy spadek aktywności MPF spowodowany proteolityczną degradacją cykliny



B (ryc. 1) [1, 18]. Bezpośrednio po ukończeniu podziału tworzone jest wrzeczono oraz płytką metafazy drugiego podziału mejotycznego (metafazy II, MII). Równocześnie, dzięki ciągłej syntezie cykliny B i łączeniu się jej z CDK1, aktywność MPF ponownie wzrasta (ryc. 1) [1, 18]. Oocyty pozostają zablokowane w metafazie II aż do momentu aktywacji przez plemnik lub bodziec partenogenetyczny. Blok w stadium metafazy II może być utrzymywany przez wiele godzin dzięki czynnikowi cytostatycznemu (*CytoStatic Factor*, CSF), określanemu też mianem aktywności cytostatycznej, która utrudnia inaktywację MPF w oocytach, a co za tym idzie ukończenie drugiego podziału mejotycznego.

Czynnik cytostatyczny został po raz pierwszy opisany w 1971 przez Masui'ego i Markerta jako składnik cytoplazmy oocytów *Rana pipiens* zablokowanych w stadium metafazy II [25]. Wprowadzenie cytoplazmy pobranej z takich oocytów do jednego z blastomerów dwukomórkowego zarodka doprowadziło do zablokowania podziału mitotycznego tego blastomeru. Wynik tego doświadczenia sugerował, że czynnik, który spowodował zablokowanie mitozy w dzielącym się blastomerze, odpowiadał także za naturalny blok oocytów *Rana pipiens* w stadium metafazy II [25]. Aktywność CSF w owulowanych oocytach myszy została potwierdzona po raz pierwszy dopiero w 1993 roku przez Kubiaka i współpracowników, którzy wykazali, że cytoplazma owulowanych



**RYCINA 1.** Aktywność MPF, kinazy MAP oraz CSF podczas dojrzewania mejotycznego oocytów myszy. Podziały mejotyczne oocytu zostają wznowione w momencie GVBD oznaczonym na wykresie jako 0 godz. Aktywność MPF (mierzona jako aktywność kinazy histonu H1, czyli kinazy CDK1 – cykliny B) rośnie prawie równocześnie z aktywnością kinazy MAP. Aktywny CSF wykrywany jest w stadium metafazy II podziału mejotycznego. Jaśniejsza przerywana linia oraz znak zapytania nad wykresem aktywności CSF obrazują hipotezę, że do aktywacji CSF może dochodzić już w stadium metafazy I podziału mejotycznego

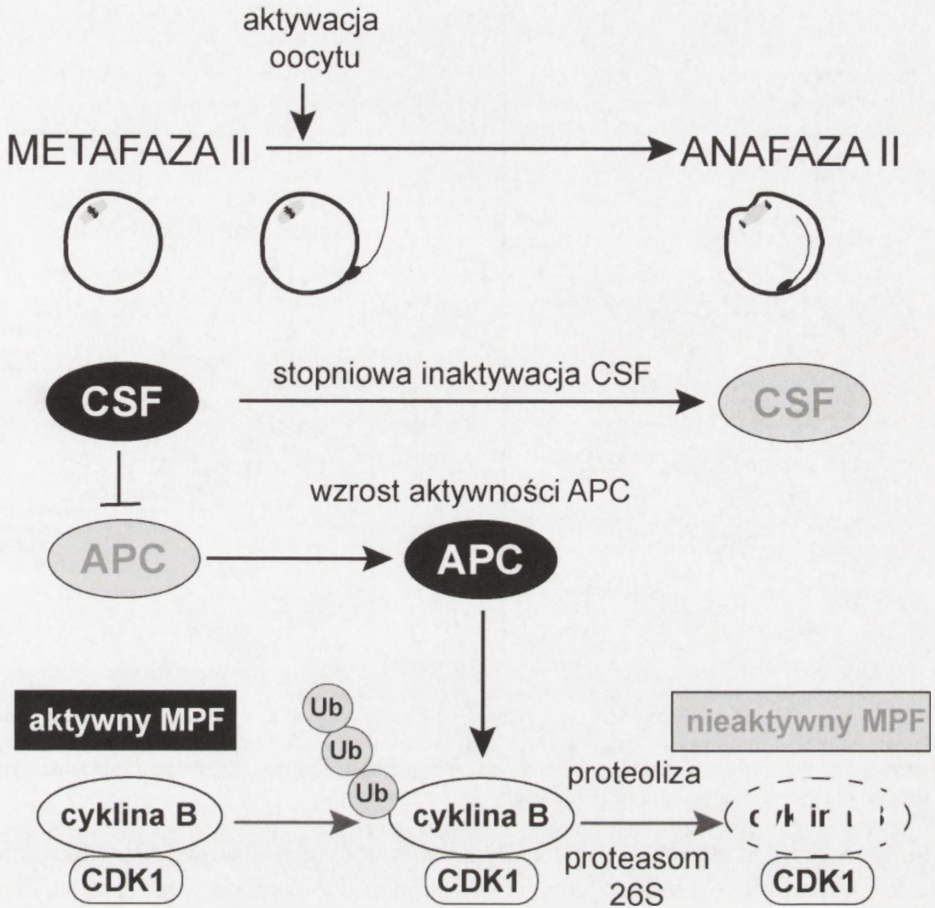
oocytów myszy zablokowanych w metafazie II jest w stanie zablokować mitozę w dzielącym się zarodku myszy [1].

Od wielu lat prowadzone są badania mające na celu określenie, jakie czynniki odpowiedzialne są za pojawienie się aktywności cytostatycznej w oocytach, które osiągnęły stadium metafazy II. Pionierskie doświadczenia dotyczyły oocytów płaza *Rana pipiens*. Obecnie głównym obiektem badań jest afrykańska żaba szponiasta *Xenopus laevis*. Wyniki wielu tych badań znalazły potwierdzenie w doświadczeniach prowadzonych z wykorzystaniem oocytów ssaków (głównie myszy). Dostępne są jednak dane sugerujące istnienie międzygatunkowych różnic w funkcjonowaniu CSF.

## 2. NATURA CZYNNIKA CYTOSTATYCZNEGO

Masui i Markert wykazali, że w cytoplazmie zablokowanych w metafazie II oocytów płazów wykrywana jest aktywność CSF [25]. W 1998 roku Ciemerych i Kubiak, analizując oocyty myszy szczepu LT/Sv, które wykazują szereg zaburzeń dojrzewania mejotycznego, postawili hipotezę, że do aktywacji CSF może dochodzić już w stadium metafazy I. Dotychczas jednak nie udowodniono, aby zjawisko takie rzeczywiście zachodziło także podczas dojrzewania oocytów innych szczepów myszy [20]. Zapłodnienie lub aktywacja partenogenetyczna dojrzewających bez zakłóceń oocytów większości szczepów myszy prowadzi do inaktywacji czynnika cytostatycznego, co w konsekwencji umożliwia oocytowi ukończenie II podziału mejotycznego, a następnie powstanie jednokomórkowego zarodka. Badania zmian aktywności CSF w oocytach myszy wykazały jednak, że inaktywacja MPF zachodzi przed definitywnym wyeliminowaniem aktywności CSF (ryc. 1) [20]. Wydaje się, że CSF jest jedynie czynnikiem sprzyjającym stabilizacji MPF w warunkach panujących w cytoplazmie oocytu w MII. Gdy warunki te zmieniają się np. pod wpływem zadziałania bodźca aktywującego, hamujący efekt CSF jest przełamany i dochodzi do przyspieszonej degradacji cykliny B i inaktywacji MPF. Późniejsza inaktywacja czynnika cytostatycznego jest konieczna między innymi po to, by zapobiec zablokowaniu zygoty podczas pierwszego podziału bruzdkowania [20].

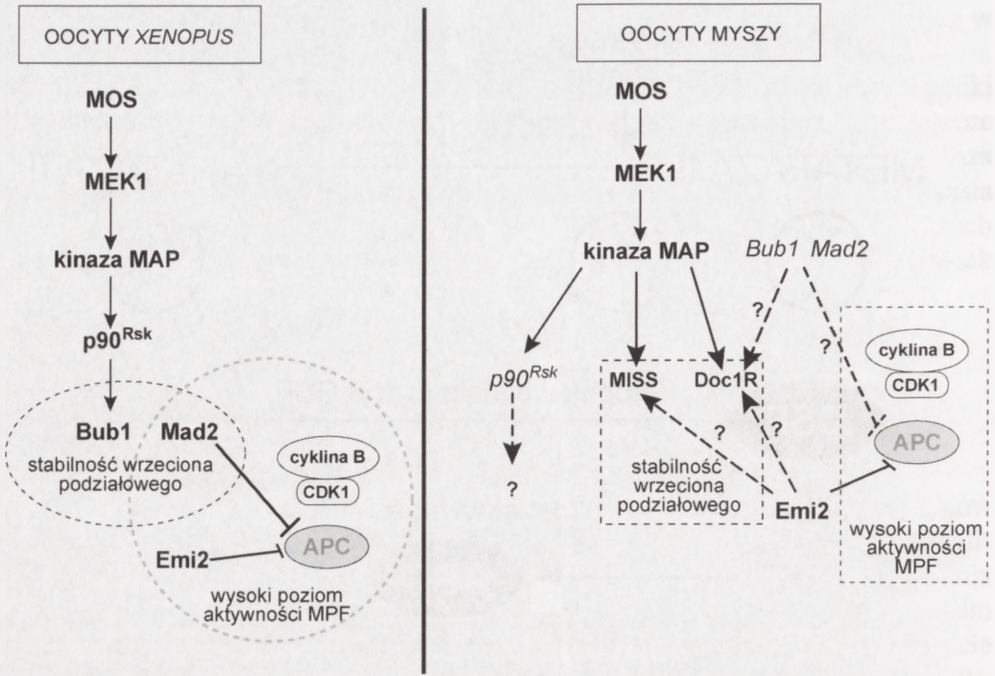
Rozpoczęcie drugiego podziału mejotycznego oocytu wiąże się ze wzrostem aktywności kompleksu inicjującego anafazę (z ang. *Anaphase Promoting Complex*, APC) (ryc. 2) [3, 49]. APC (ligaza ubikwityny E3) odpowiada za ubikwitynizację cykliny B i skierowanie tego białka do degradacji w proteasomie 26S (ryc. 2) [6]. Spadek poziomu cykliny B prowadzi do obniżenia aktywności MPF i rozpoczęcia anafazy (ryc. 2) [28]. W pobudzonych oocytach myszy aktywność APC rośnie, natomiast aktywność proteasomu 26S nie zmienia się. Sugeruje to, że podczas bloku w stadium metafazy II czynnik cytostatyczny hamuje degradację cykliny B właśnie poprzez inhibicję aktywacji APC (ryc. 2). Celem prowadzonych w chwili obecnej badań jest więc jednoznaczne określenie roli białek zaangażowanych w ten proces.



RYCINA 2. Regulacja aktywności CSF w zablokowanych w stadium metafazy II oraz w aktywowanych oocytach myszy. W oocytach zablokowanych w stadium metafazy II aktywność MPF stabilizowana jest dzięki czynnikowi CSF blokującemu kompleks inicjujący anafazę (APC). Aktywacja oocyty prowadzi do inaktywacji CSF, wzrostu aktywności APC i degradacji cykliny B, a tym samym inaktywacji MPF; Ub – ubikwityna

### 2.1. Białka szlaku kinazy MAP (ERK1/ERK2) oraz białka punktu kontrolnego wrzeciona podziałowego

Najlepiej scharakteryzowanymi „składnikami” CSF są białka ścieżki kinazy MAP (ERK1/ERK2). Czynniki te zaangażowane są w wytworzenie aktywności cytostaticznej zarówno w oocytach płazów, jak i ssaków (ryc. 3) [1, 47]. Aktywacja kinazy MAP zachodzi w wyniku szeregu procesów fosforylacji zapoczątkowanych przez produkt protoonkogenu c-mos, kinazę białkową MOS o masie 39 kDa. Kinaza MOS fosforyluje kinazę MEK1, która z kolei fosforyluje i aktywuje kinazę MAP (ryc. 3). W 1989 roku Sagata i współpracownicy wykazali, że aktywność kinazy MOS jest niezbędna



RYCINA 3. Oddziaływania między „składnikami” CSF w oocytach płazów i ssaków. Według najnowszych badań białka, których nazwy napisano kursywą, nie są istotne dla funkcjonowania czynnika cytotatycznego. Oddziaływania między białkami zaznaczone przerywaną linią oraz znakami zapytania wymagają jeszcze potwierdzenia w dalszych badaniach

do wytworzenia aktywności cytotatycznej w oocytach płazów [47]. Mikroiniekcja mRNA kodującego *c-mos* do jednego z blastomerów 2-komórkowego zarodka *Xenopus* prowadziła do zablokowania mitozy w nastrzykniętym blastomerze, podczas gdy drugi z blastomerów zarodka kontynuował podział. W 1994 roku na łamach czasopisma *Nature* zostały opublikowane wyniki badań Colledge'a i współpracowników oraz Hashimoto i współpracowników, którzy wykazali, że również u myszy białko MOS jest niezbędne do zablokowania oocytów w stadium metafazy II [1]. W przeciwieństwie do normalnie dojrzewających oocytów, oocyty myszy pozbawionych funkcjonalnego genu kodującego kinazę MOS po osiągnięciu stadium metafazy II natychmiast rozpoczynały anafazę i kończyły drugi podział mejotyczny. Ulegały one spontanicznej aktywacji lub wchodziły w kolejną fazę M (tzw. metafazę III) [1]. Ponieważ oocyty te nie były w stanie wytworzyć bloku w stadium metafazy II, stwierdzono, że aktywność kinazy MOS odgrywa kluczową rolę w wytwarzaniu aktywności cytotatycznej w oocytach myszy. Kolejne badania wykazały, że istotną rolę w powstawaniu CSF odgrywa efektor MOS – kinaza MAP (ERK1/ERK2). Aktywność kinazy MAP – podobnie jak kinazy MOS – rośnie podczas dojrzewania mejotycznego oocytu i osiąga maksimum już w oocytach, które osiągnęły stadium metafazy I (ryc. 1) [17]. O roli kinazy MAP w aktywacji CSF świadczy fakt, że oocyty myszy poddane działaniu inhibitorów tej kinazy, podobnie jak oocyty pozbawione kinazy MOS, po osiągnięciu stadium metafazy II

ulegają spontanicznej aktywacji [31]. Długotrwałe zablokowanie oocytów w stadium metafazy II wymaga istnienia sprawnych mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymanie prawidłowej struktury wrzeciona podziałowego [1]. Kinaza MAP wydaje się odgrywać ważną rolę w tym procesie, ponieważ katalizuje ona fosforylację co najmniej dwóch białek zlokalizowanych na wrzecionie podziałowym oocytów w stadium metafazy II – białka MISS (z ang. *MAP kinase-Interacting and Spindle-Stabilizing*) i białka DOC1R (z ang. *Deleted Oral Cancer 1 Related*) (ryc. 3) [21, 43]. Wyciszenie ekspresji tych białek przy użyciu technik RNAi (z ang. *RNA interference*) powodowało poważne zaburzenia w budowie wrzeciona podziałowego MII. W oocytach, w których obniżono poziom ekspresji MISS lub DOC1R, często w ogóle nie dochodziło do uformowania wrzeciona podziałowego lub też powstające wrzeciono wytwarzało tylko jeden biegun [21, 43]. Oprócz kinazy MAP za aktywację MISS i DOC1R prawdopodobnie odpowiada także MPF, co sugeruje, iż utrzymywanie prawidłowej struktury wrzeciona podziałowego metafazy II zależy od współdziałania MPF, czyli kinazy CDK1/cykлина B oraz kinazy MAP (ERK1/ERK2) [1].

Wydaje się jednak, że to nie stabilizacja wrzeciona podziałowego, ale przeciwdziałanie degradacji cykliny B poprzez hamowanie aktywności APC jest nadrzędną funkcją CSF. Do chwili obecnej nie stwierdzono, w jaki sposób białka szlaku kinazy MAP wpływają na aktywność APC w oocytach myszy. Badania przeprowadzone w 1999 roku przez Bhatta i Ferrela oraz Grossa i współpracowników wykazały, że w oocytach płazów substratem aktywowanej kinazy MAP jest białko p90<sup>Rsk</sup> (z ang. *90 kD Ribosomal protein S6 kinase*) [47]. W oocytach *Xenopus* zablokowanych w stadium metafazy II wykrywane są dwa białka z nadrodziny p90<sup>Rsk</sup> – Rsk1 i Rsk2. Jednakże, wyniki tych badań sugerują, że tylko aktywność p90<sup>Rsk2</sup> jest niezbędna do wytworzenia bloku w stadium metafazy II (ryc. 3) [47]. W oocytach myszy występują trzy białka p90<sup>Rsk</sup> – Rsk1, Rsk2 i Rsk3. W 2004 roku Paronetto i współpracownicy stwierdzili, że mikroiniekcja białka p90<sup>Rsk2</sup> do dzielących się blastomerów zarodka myszy prowadzi do zablokowania mitozy. Uzyskane wyniki sugerowały, że podobnie jak w oocytach płazów, także w oocytach ssaków białko p90<sup>Rsk2</sup> bierze udział w wytworzeniu aktywności cytostatycznej [30]. Jednak wyniki te zostały później zakwestionowane przez badania Dumonta i współpracowników [10]. Badacze ci wykazali, że w oocytach myszy, które pozbawione były genów kodujących Rsk1, Rsk2 oraz Rsk3, dochodziło do wytworzenia funkcjonalnego bloku w stadium metafazy II [10]. Tym samym udowodniono, że żadne z badanych białek Rsk nie jest zaangażowane w powstanie aktywności CSF w oocytach myszy [10]. Zdaniem Dumonta i współpracowników, różnica w funkcjonowaniu ścieżki MOS/MEK1/MAPK/p90<sup>Rsk</sup> w oocytach płazów i ssaków wynika z różnej wielkości ich oocytów. Oocyt *Xenopus* jest około tysiącrotnie większy od oocytu myszy. Istnieje więc możliwość, że w oocytach płazów efektywne przekazanie sygnału generowanego przez białka szlaku kinazy MAP wymaga aktywacji „pośrednika” – białka, którego zawartość w oocycie jest wysoka. W oocytach *Xenopus* taką rolę mogłoby pełnić p90<sup>Rsk</sup>. W znacznie mniejszych oocytach myszy sygnał ten może być skutecznie przekazywany bez dodatkowego wzmocnienia.

Podczas mitozy białka punktu kontrolnego wrzeciona podziałowego uniemożliwiają rozpoczęcie anafazy aż do momentu utworzenia stabilnych połączeń między kineto-chorami chromosomów tworzących płytkę metafazową a mikrotubulami wrzeciona podziałowego. Liczne badania prowadzone na ekstraktach cytoplazmatycznych z oocytów *Xenopus laevis* sugerują, że białka te biorą udział w powstawaniu aktywności cytotatycznej w oocytach płazów (ryc. 3) [46, 48]. W oocytach tych działanie p90<sup>Rsk2</sup> polega na aktywacji Bub1 – jednego ze składników punktu kontrolnego wrzeciona podziałowego, który z kolei odpowiada za rekrutację kolejnych białek punktu kontrolnego – Mad1 i Mad2 (ryc. 3) [38, 47]. W oocytach płazów oba te białka wydają się niezbędne do wytworzenia aktywności cytotatycznej, jednak tylko obecność Mad1 jest konieczna do utrzymania długotrwałego bloku w MII [46]. Podstawową funkcją Mad2 jest natomiast hamowanie aktywności APC poprzez wiązanie jego głównego aktywatora – białka Cdc20, co w oocycie zablokowanym w stadium metafazy II powoduje zahamowanie degradacji cykliny B i utrzymywanie wysokiego poziomu aktywności MPF (ryc. 3) [5].

Rola białek punktu kontrolnego wrzeciona podziałowego w regulacji mejozy oocytów ssaków jest jednak dyskusyjna. Wykazano, że białka te biorą udział w opóźnieniu pierwszego podziału mejotycznego [15, 44]. Dlatego sądzono, że mogą być one także zaangażowane w powstawanie aktywności cytotatycznej w oocytach myszy. Przekonanie to oparte było również na wynikach doświadczeń, które wykazały, że w oocytach myszy zablokowanych w stadium metafazy II wykrywane są aktywne białka punktu kontrolnego – Bub1 i Mad2 – zlokalizowane na kinetochorach chromosomów [2, 19]. Jednakże wyniki ostatnich badań sugerują, że Mad2 może odgrywać pewną rolę jedynie w początkowych etapach wytwarzania bloku w stadium metafazy II [40]. Ponadto, w oocytach, w których inaktywowano Bub1 lub Mad2, nie obserwuje się zaburzeń w utrzymywaniu bloku w stadium metafazy II [44].

Podsumowując, powstawanie i utrzymanie aktywności cytotatycznej w oocytach myszy pozbawionych funkcjonalnych białek Rsk1, Rsk2 i Rsk3 lub białek punktu kontrolnego, takich jak: Mad2 czy Bub1, świadczy o tym, że czynniki te nie są istotne dla funkcjonowania CSF w oocytach myszy.

## 2.2. Białka z rodziny Emi

Białka szlaku kinazy MAP bez wątplenia odgrywają kluczową rolę w powstawaniu i utrzymywaniu aktywności cytotatycznej zarówno w oocytach płazów, jak i ssaków. Jednak kinazy te są aktywne w oocytach już podczas pierwszego podziału mejotycznego, a mimo to brak jest definitywnych dowodów na to, że w tym okresie dochodzi do aktywacji CSF. Sugeruje to, że pojawienie się aktywności cytotatycznej może wymagać aktywacji dodatkowego czynnika/czynników. W 1996 roku Choi i wsp. [4] oraz Verlhac i współpracownicy wykazali, że w oocytach pozbawionych funkcjonalnego genu kodującego kinazę MOS, które pozostały zablokowane w stadium metafazy II, aktywność MPF utrzymywana była na wysokim poziomie pomimo braku aktywnej kinazy MAP [4]. Obserwacja ta sugerowała istnienie dodatkowego czynnika, który zaangażowany byłby w utrzymywanie bloku metafazowego. Jak już wspomniano, działanie czynnika cytotatycznego polega przede wszystkim na hamowaniu aktywności APC w

oocytach zablokowanych w stadium metafazy II. Wydaje się, że między oocytami w stadium metafazy I oraz metafazy II istnieją pewne różnice w sposobie regulacji aktywności APC [16, 23]. Świadczyć o tym może obserwacja, że podczas pierwszego podziału mejotycznego oocytu myszy nie dochodzi w cytoplazmie do gwałtownych zmian poziomu  $Ca^{2+}$ , które są charakterystyczne dla zapłodnienia. Pomimo to, w oocytach kończących zarówno pierwszy, jak i drugi podział mejotyczny, dochodzi do degradacji cykliny B [16, 23]. Wydaje się zatem, że w oocytach myszy, w okresie między stadium metafazy I a stadium metafazy II, pojawia się dodatkowy, wrażliwy na zmiany stężenia jonów  $Ca^{2+}$  czynnik niezbędny do aktywacji CSF. W świetle ostatnich badań najbardziej atrakcyjnymi kandydatami do roli takiego czynnika wydają się być białka z rodziny Emi.

Zainteresowanie białkami z rodziny Emi jako potencjalnymi składnikami CSF wiąże się z wynikami opublikowanej w 2001 roku pracy Reimann i współpracowników, w której białko Emi1 (z ang. *Early Mitotic Inhibitor 1*) zostało opisane jako czynnik odpowiedzialny za hamowanie aktywności APC w dzielących się mitotycznie komórkach *Xenopus* [33, 34]. Kolejne badania wykazały, że Emi1 jest także czynnikiem niezbędnym i wystarczającym do wytworzenia aktywności cytotatycznej w oocytach płazów [35]. Działanie Emi1 polega na hamowaniu aktywności APC poprzez wiązanie głównego aktywatora kompleksu, białka Cdc20 [33]. Badania przeprowadzone przez Paronetto i współpracowników wykazały, iż wytworzenie stabilnego połączenia między Emi1 i Cdc20 w oocytach myszy zablokowanych w stadium metafazy II zależy od aktywności białka p90<sup>Rsk</sup> [30]. Jednakże, jak już wspomniano wcześniej, oocyty myszy pozbawione białek Rsk1, Rsk2 i Rsk3 pozostają zablokowane w stadium metafazy II, a więc nie dochodzi w nich do inaktywacji CSF [10]. Ponadto, Oshumi i współpracownicy zakwestionowali rolę Emi1 jako składnika CSF w oocytach płazów udowadniając, że białko to nie jest wykrywane w oocytach, które osiągnęły stadium metafazy II [29]. Tym samym udział białka Emi1 w powstawaniu aktywności cytotatycznej w oocytach płazów i ssaków został poddany w wątpliwość. Badania nad rolą tego białka w bloku metafazowym oocytów *Xenopus* ciągle dostarczają sprzecznych danych, co nie pozwala jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie, w jakim stopniu białko to zaangażowane jest w proces aktywacji CSF.

W oocytach *Xenopus* zablokowanych w stadium metafazy II odkryte zostało inne białko podobne do Emi1 – Emi2/Erp1 [45]. Tung i współpracownicy wykazali, że białko Emi2/Erp1 jest stabilne w cytoplazmie oocytów *Xenopus*, które osiągnęły stadium metafazy II, oraz że ulega ono degradacji w obecności jonów wapnia uwolnionych do cytoplazmy oocytu po jego aktywacji. Również w oocytach myszy wykryte zostało białko, które jest ortologiem Emi2/Erp1 u *Xenopus* [39]. Białko to wykrywane jest w dojrzewających oocytach myszy od stadium pęcherzyka zarodkowego do stadium metafazy II, natomiast po aktywacji oocytu ulega degradacji [39]. Przez analogię do pozostałych białek z rodziny Emi białko wykryte u myszy nazwane zostało Emi2. Ze względu na rolę w regulacji dojrzewania mejotycznego oocytów, Shoji i współpracownicy zaproponowali inne rozwinięcie skrótu – **Endogenous Meiotic Inhibitor 2**. Oocyty myszy, do których wstrzyknięto siRNA (z ang. *small interfering RNA*) inaktywujący mRNA kodujące Emi2 uległy spontanicznej aktywacji. Co istotne, w oocytach tych zaobserwowano bardzo niski poziom aktywności zarówno MPF, jak i kinazy MAP

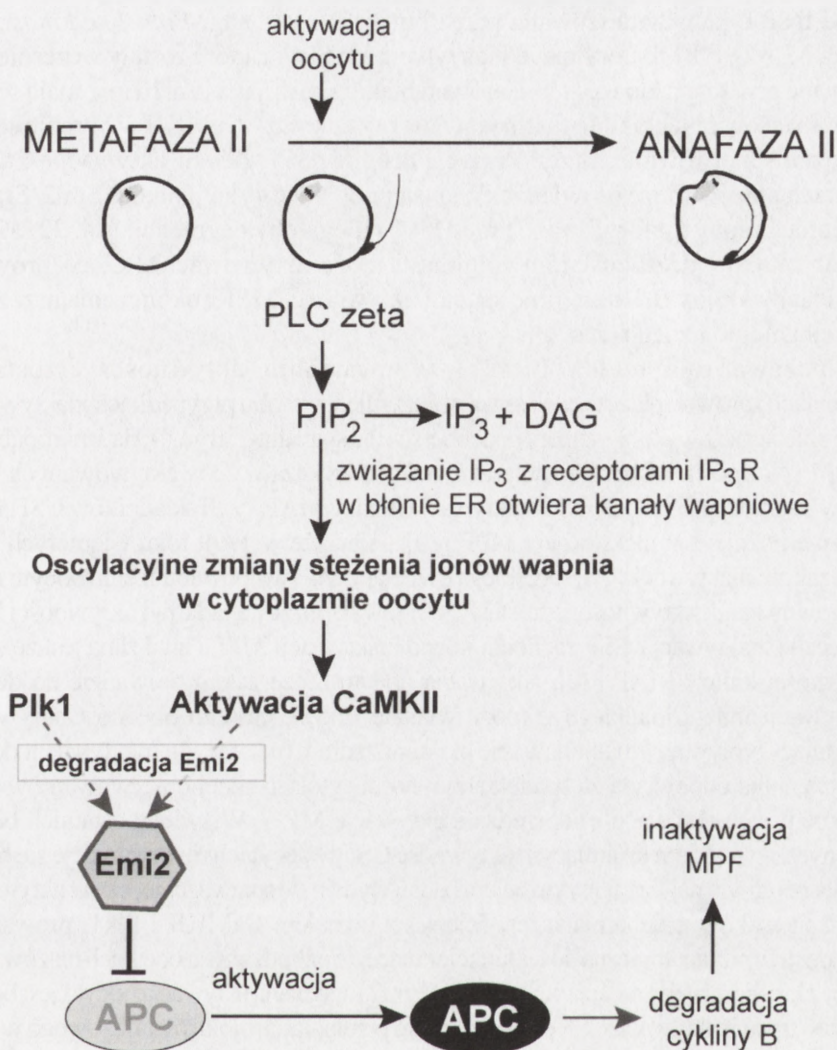
(ERK1/ERK2). Uzyskane wyniki świadczą zatem, że Emi2 jest niezbędne do wykształcenia i utrzymania aktywności cytotatycznej w oocytach myszy. Emi2 hamuje aktywność APC, wiążąc się z jego aktywatorem – białkiem Cdc20, co wykazano przez koimmunoprecypitację obu białek (ryc. 3) [39]. Ponadto, obniżenie ekspresji Cdc20 w oocytach myszy, w których uprzednio zahamowano ekspresję Emi2, prowadzi do odtworzenia bloku w stadium metafazy II [39].

Obserwacje Shoji i współpracowników sugerują, że białko Emi2, oprócz udziału w powstawaniu aktywności cytotatycznej, odgrywa także istotną rolę w regulacji cytokinezy kończącej drugi podział mejotyczny. Mniej niż połowa oocytów, które na skutek mikroiniekcji siRNA przeciwko Emi2 zostały uwolnione z bloku w stadium metafazy II, prawidłowo ukończyła drugi podział mejotyczny. Zatem, zdaniem autorów, Emi2 wraz z innymi białkami – MISS i/lub DOC1R może wpływać na dynamikę cytoszkieletu w komórce, a tym samym odpowiadać za kontrolę podziału komórkowego (ryc. 3). Oprócz wykazania roli Emi2 jako składnika CSF w oocytach myszy, praca Shoji i współpracowników dostarcza danych potwierdzających hipotezę Oshumi i współpracowników mówiącą, że białko Emil nie bierze udziału w wytwarzaniu aktywności cytotatycznej [29]. Oocyty myszy, w których wyciszono ekspresję Emil, były zdolne do wytworzenia aktywności cytotatycznej i ulegały zablokowaniu w stadium metafazy II [39].

### 3. INAKTYWACJA CSF PO ZAPŁODNIENIU LUB AKTYWACJI PARTENOGENETYCZNEJ OOCYTÓW SSAKÓW

Pierwszym objawem aktywacji oocytów wywołanej działaniem bodźca partenogenetycznego lub wniknięciem plemnika, a zarazem czynnikiem niezbędnym i wystarczającym do pobudzenia oocyty jest wzrost stężenia wolnych jonów wapnia w cytoplazmie (ryc. 4) [17]. Badania przeprowadzone w latach 80, w laboratorium Masui'ego, wykazały, że zwiększenie poziomu jonów wapnia w ekstraktach uzyskanych z oocytów *Rana pipiens*, zablokowanych w stadium metafazy II powoduje utratę aktywności CSF. Tak więc wzrost stężenia wolnych jonów wapnia okazał się „sygnałem” inicjującym inaktywację CSF i MPF (ryc. 4) [25]. Mechanizm odpowiedzialny za podwyższenie poziomu jonów wapnia w oocycie zależy od aktywności fosfolipazy C zeta, która wnoszona jest do oocyty podczas zapłodnienia przez plemnik [7, 36, 41]. Enzym ten katalizuje hydrolizę bisfosforanu fosfatydyloinozytolu ( $PIP_2$ ; ryc. 4). W wyniku tej reakcji powstają dwie cząsteczki informacyjne: trójfosforan inozytolu ( $IP_3$ ) oraz diacyloglicerol (DAG) [12]. Związanie  $IP_3$  z odpowiednimi receptorami ( $IP_3R$ ) zlokalizowanymi na błonie siateczki śródplazmatycznej powoduje otwarcie kanałów wapniowych i uwolnienie jonów wapnia zmagazynowanych w tym organellum (ryc. 4). Oscylacyjne zmiany stężenia wolnych jonów wapnia w cytoplazmie oocyty aktywują kinazę zależną od kalmoduliny II (z ang. *Calmodulin-dependent kinase II*, CaMKII; ryc. 4) [24]. Aktywacja CaMKII powoduje inaktywację CSF i wzrost aktywności





RYCINA 4. Ścieżka sygnałowa uruchamiana w oocycie po wnikięciu plemnika. Wnikający do oocytu plemnik wnosi fosfolipazę C zeta (PLCzeta), która indukuje oscylacyjne zmiany stężenia wapnia w cytoplazmie, prowadzące do aktywacji kinazy zależnej od kalmoduliny (CaMKII). Rola CaMKII oraz kinazy Polo 1 (Plk1) w inaktywacji Emi2 w oocytach myszy nie została jeszcze w pełni przebadana. Degradacja Emi2 umożliwia aktywację kompleksu inicjującego anafazę (APC), degradację cykliny B i inaktywację MPF:  $PIP_2$  – bisfosforan fosfatydyloinozytolu,  $IP_3$  – trójfosforan inozytolu

APC w oocytach myszy zablokowanych w stadium metafazy II. To z kolei prowadzi do degradacji cykliny B, a w konsekwencji do spadku aktywności MPF i rozpoczęcia przez oocyt anafazy II (ryc. 4) [16, 23, 42]. Nie wiadomo, jakie białko jest substratem dla kinazy CaMKII w oocytach myszy. Najnowsze badania przeprowadzone na oocytach *Xenopus* udowodniły, że kinaza CaMKII fosforyluje białko Emi2/Erp1, które jest inhibitorem APC (ryc. 4) [14, 32]. Pośrednio, za degradację białek z rodziny Emi odpo-

wiada fosforylacja katalizowana przez kinazę Plk1 (z ang. *Polo-like kinase 1*) (ryc. 4) [13, 27, 37]. Plk1 fosforyluje jednak tylko takie białka, które zostały wcześniej ufosforylowane przez inną kinazę [11]. Zarówno białko Emi1, jak i Emi2/Erp1 mają sekwencje aminokwasów potencjalnie fosforylowane przez kinazy CaMKII w obrębie sekwencji rozpoznawanej również przez kinazę Plk1 [35, 37]. Zatem aktywacja CaMKII w oocytach płazów może prowadzić do „wstępnej” fosforylacji białka Emi2/Erp1, które następnie byłoby fosforylowane przez Plk1 i ulegałoby degradacji [14, 22, 32]. W ten sposób białko Cdc20 zostaje uwolnione i może aktywować APC, co prowadzi do degradacji cykliny B, a następnie spadku aktywności MPF i ukończenia przez oocyt II podziału mejotycznego (ryc. 4).

Kluczowa rola białka Emi2 w wytwarzaniu aktywności cytotatycznej w oocytach zarówno płazów, jak i ssaków sugeruje, że w obu przypadkach inaktywacja CSF może przebiegać z wykorzystaniem podobnej ścieżki sygnałowej (ryc. 4). Badania opublikowane w 1991 roku przez Weber i współpracowników wykazały, że w aktywowanych oocytach myszy degradacja białka MOS i inaktywacja kinazy MAP, czyli składników CSF, następuje znacznie później niż inaktywacja MPF [20]. Jednakże w 1999 roku Ciemerych i Kubiak wykazali, że inaktywacja CSF przebiega dwuetapowo – tuż po pobudzeniu oocytu następuje gwałtowny zanik aktywności cytotatycznej towarzyszący spadkowi aktywności MPF, zaś ostateczna inaktywacja CSF zachodzi już po inaktywacji MPF i związana jest ze spadkiem aktywności kinazy MAP [20]. Aktywacja oocytu może zatem prowadzić do degradacji/inaktywacji innego białka (być może właśnie Emi2), którego obecność/aktywność ma decydujący wpływ na funkcjonowanie bloku w stadium metafazy II. Inaktywacja/degradacja tego czynnika odpowiada za spadek aktywności cytotatycznej obserwowany w oocytach wkrótce po ich aktywacji i poprzedza inaktywację MPF. W świetle ostatnich badań tym głównym czynnikiem limitującym aktywność CSF w oocytach myszy wydaje się być Emi2. W obecnej chwili najważniejszym celem badań wydaje się sprawdzenie, czy w aktywowanych oocytach ssaków uruchamiana jest ścieżka z udziałem CaMKII i Plk1, prowadząca do degradacji Emi2, analogiczna do tej funkcjonującej w pobudzonych oocytach płazów. Ponadto, należy określić, czy degradacja/inaktywacja Emi2 wywołana aktywacją oocytu jest bezpośrednią przyczyną inaktywacji CSF prowadzącą do przełamania bloku metafazowego w oocytach ssaków i jaki jest rzeczywisty udział ścieżki sygnalizacyjnej kinazy MAP w tym procesie.

#### 4. PODSUMOWANIE

Poznanie mechanizmów regulujących dojrzewanie mejotyczne oocytu, w tym również odpowiedzialnych za powstanie bloku w stadium metafazy II, jest niezwykle istotne, gdyż przedwczesne zablokowanie oocytów w stadium metafazy I, jak również samoistna aktywacja oocytów są uważane za przyczyny niepłodności. Mimo iż dwa najważniejsze czynniki odpowiedzialne za regulację dojrzewania mejotycznego oocytów, MPF i CSF, zostały odkryte 35 lat temu, do chwili obecnej wiele pytań dotyczących współdziałania obu czynników, a szczególnie udziału poszczególnych składników CSF w kontroli aktywności MPF, pozostaje bez odpowiedzi. Identyfikacja nowych białek zaangażo-

wanych w powstawanie aktywności cytostaticznej w oocytach płazów i ssaków, jak również weryfikacja roli białek, uważanych dotąd za potencjalne składniki CSF, w wytwarzaniu tej aktywności uzupełnia i zmienia nasze wyobrażenie o funkcjonowaniu aktywności cytostaticznej w oocytach obu grup zwierząt. Czynn timer cytostaticzny, którego aktywność opisali Masui i Markert, wydaje się nie być jednym tylko białkiem lub specyficznym kompleksem białkowym, lecz wydaje się zależeć od całej sieci oddziaływań molekularnych.

### Podziękowania

Dziękujemy Ewie Borsuk i Jackowi Kubiakowi za przeczytanie manuskryptu i cenne uwagi, a Darkowi Maluchnikowi za rysunki oocytów. Maria A. Ciemerych jest stypendystką Fundacji L'Oreal Polska przy wsparciu Polskiego Komitetu do Spraw UNESCO.

### LITERATURA

- [1] BRUNET S, MARO B. Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: integrating time and space. *Reproduction* 2005; **130**: 801–811.
- [2] BRUNET S, PAHLAVAN G, TAYLOR S, MARO B. Functionality of the spindle checkpoint during the first meiotic division of mammalian oocytes. *Reproduction* 2003; **126**: 443–450.
- [3] CASTRO A, BERNIE C, VIGNERON S, LABBE JC, LORCA T. The anaphase-promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle. *Oncogene* 2005; **24**: 314–325.
- [4] CHOIT, FUKASAWA K, ZHOU R, TESSAROLLO L, BORROR K, RESAU J, VANDE WOUDE G F. The Mos/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway regulates the size and degradation of the first polar body in maturing mouse oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 7032–7035.
- [5] CHUNG E, CHEN RH. Spindle checkpoint requires Mad1-bound and Mad1-free Mad2. *Mol Biol Cell* 2002; **13**: 1501–1511.
- [6] CIECHANOVER A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; **6**: 79–87.
- [7] COX IJ, LARMAN MG, SAUNDERS CM, HASHIMOTO K, SWANN K, LAI FA. Sperm phospholipase Czeta from humans and cynomolgus monkeys triggers Ca<sup>2+</sup> oscillations, activation and development of mouse oocytes. *Reproduction* 2002; **124**: 611–623.
- [8] DE LA FUENTE R. Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. *Dev Biol* 2006; **292**: 1–12.
- [9] DOREE M, HUNT T. From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *J Cell Sci* 2002; **115**: 2461–2464.
- [10] DUMONT J, UMBHAUER M, RASSINIER P, HANAUER A, VERLHAC M H. p90Rsk is not involved in cytostatic factor arrest in mouse oocytes. *J Cell Biol* 2005; **169**: 227–231.
- [11] ELIA AE, RELLOS P, HAIRE LF, CHAO JW, IVINS FJ, HOEPKER K, MOHAMMAD D, CANTLEY LC, SMERDON SJ, YAFFE MB. The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain. *Cell* 2003; **115**: 83–95.
- [12] HALET G. PKC signaling at fertilization in mammalian eggs. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1742**: 185–189.
- [13] HANSEN DV, LOKTEV AV, BAN KH, JACKSON PK. Plk1 Regulates Activation of the Anaphase Promoting Complex by Phosphorylating and Triggering SCF{beta} TrCP-dependent Destruction of the APC Inhibitor Emi1. *Mol Biol Cell* 2004; **15**: 5623–5634.
- [14] HANSEN DV, TUNG JJ, JACKSON PK. CaMKII and Polo-like kinase 1 sequentially phosphorylate the cytostatic factor Emi2/XErp1 to trigger its destruction and meiotic exit. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 608–613.

- [15] HOMER HA, MCDUGALL A, LEVASSEUR M, YALLOP K, MURDOCH AP, HERBERT M. Mad2 prevents aneuploidy and premature proteolysis of cyclin B and securin during meiosis I in mouse oocytes. *Genes Dev* 2005; **19**: 202–207.
- [16] HYSLOP LA, NIXON VL, LEVASSEUR M, CHAPMAN F, CHIBA K, MCDUGALL A, VENABLES JP, ELLIOTT DJ, JONES KT. Ca<sup>(2+)</sup>-promoted cyclin B1 degradation in mouse oocytes requires the establishment of a metaphase arrest. *Dev Biol* 2004; **269**: 206–219.
- [17] JONES KT. Mammalian egg activation: from Ca<sup>2+</sup> spiking to cell cycle progression. *Reproduction* 2005; **130**: 813–823.
- [18] JONES KT. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Mol Hum Reprod* 2004; **10**: 1–5.
- [19] KALLIO M, ERIKSSON JE, GORBSKY GJ. Differences in spindle association of the mitotic checkpoint protein Mad2 in mammalian spermatogenesis and oogenesis. *Dev Biol* 2000; **225**: 112–123.
- [20] KUBIAK JZ, CIEMERYCH MA. Cell cycle regulation in early mouse embryos. Novartis Found Symp 2001; **237**: 79–89.
- [21] LEFEBVRE C, TERRET, DZIANE A, RASSINIER P, MARO B, VERLHAC MH. Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. *J Cell Biol* 2002; **157**: 603–613.
- [22] LIU J, MALLER JL. Calcium elevation at fertilization coordinates phosphorylation of XErp1/Emi2 by Plx1 and CaMK II to release metaphase arrest by cytotstatic factor. *Curr Biol* 2005; **15**: 1458–1468.
- [23] MARANGOS P, CARROLL J. Fertilization and InsP3-induced Ca<sup>2+</sup> release stimulate a persistent increase in the rate of degradation of cyclin B1 specifically in mature mouse oocytes. *Dev Biol* 2004; **272**: 26–38.
- [24] MARKOULAKI S, MATSON S, ABBOTT AL, DUCIBELLA T. Oscillatory CaMKII activity in mouse egg activation. *Dev Biol* 2003; **258**: 464–474.
- [25] MASUI Y. From oocyte maturation to the *in vitro* cell cycle: the history of discoveries of Maturation-Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF). *Differentiation* 2001; **69**: 1–17.
- [26] MERDALI P, DRAVIAM VM, SORGER PK. Timing and checkpoints in the regulation of mitotic progression. *Dev Cell* 2004; **7**: 45–60.
- [27] MOSHE Y, BOULAIRE J, PAGANO M, HERSHKO A. Role of Polo-like kinase in the degradation of early mitotic inhibitor 1, a regulator of the anaphase promoting complex/cyclosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 7937–7942.
- [28] NIXON VL, LEVASSEUR M, MCDUGALL A, JONES KT. Ca(2+) oscillations promote APC/C-dependent cyclin B1 degradation during metaphase arrest and completion of meiosis in fertilizing mouse eggs. *Curr Biol* 2002; **12**: 746–750.
- [29] OHSUMI K, KOYANAGI A, YAMAMOTO TM, GOTOH T, KISHIMOTO T. Emi1-mediated M-phase arrest in *Xenopus* eggs is distinct from cytotstatic factor arrest. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 12531–12536.
- [30] PARONETTO MP, GIORDA E, CARSETTI R, ROSSI P, GEREMIA R, SETTE C. Functional interaction between p90(Rsk2) and Emi1 contributes to the metaphase arrest of mouse oocytes. *Embo J* 2004; **23**: 4649–4659.
- [31] PHILLIPS KP, PETRUNEWICH MA, COLLINS JL, BOOTH RA, LIU XJ, BALTZ JM. Inhibition of MEK or cdc2 kinase parthenogenetically activates mouse eggs and yields the same phenotypes as Mos(-/-) parthenogenotes. *Dev Biol* 2002; **247**: 210–223.
- [32] RAUH NR, SCHMIDT A, BORMANN J, NIGG EA, MAYER TU. Calcium triggers exit from meiosis II by targeting the APC/C inhibitor XErp1 for degradation. *Nature* 2005; **437**: 1048–1052.
- [33] REIMANN JD, FREED E, HSU JY, KRAMER ER, PETERS JM, JACKSON PK. Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex. *Cell* 2001; **105**: 645–655.
- [34] REIMANN JD, GARDNER JB, MARGOTTIN-GOGUET F, JACKSON PK. Emi1 regulates the anaphase-promoting complex by a different mechanism than Mad2 proteins. *Genes Dev* 2001; **15**: 3278–3285.
- [35] REIMANN JD, JACKSON PK. Emi1 is required for cytotstatic factor arrest in vertebrate eggs. *Nature* 2002; **416**: 850–854.
- [36] SAUNDERS CM, LARMAN MG, PARRINGTON J, COX LJ, ROYSE J, BLAYNEY LM, SWANN K, LAI FA. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. *Development* 2002; **129**: 3533–3544.
- [37] SCHMIDT A, DUNCAN PI, RAUH NR, SAUER G, FRY AM, NIGG EA, MAYER TU. *Xenopus* polo-like kinase Plx1 regulates XErp1, a novel inhibitor of APC/C activity. *Genes Dev* 2005; **19**: 502–513.

- [38] SCHWAB MS, ROBERTS BT, GROSS SD, TUNQUIST BJ, TAIEB FE, LEWELLYN AL, MALLER JL. Bub1 is activated by the protein kinase p90(Rsk) during *Xenopus* oocyte maturation. *Curr Biol* 2001; **11**: 141–150.
- [39] SHOJI S, YOSHIDA N, AMANAI M, OHGISHI M, FUKUI T, FUJIMOTO S, NAKANO Y, KAJIKAWA E, PERRY AC. Mammalian Emi2 mediates cytostatic arrest and transduces the signal for meiotic exit via Cdc20. *Embo J* 2006; **25**: 834–845.
- [40] SIKORA-POLACZEK M, HUPALOWSKA A, POLANSKI Z, KUBIAK JZ, CIEMERYCH MA. The first mitosis of the mouse embryo is prolonged by transitional metaphase arrest. *Biol Reprod* 2006; **74**: 734–743
- [41] SWANN K, LARMAN MG, SAUNDERS CM, LAI FA. The cytosolic sperm factor that triggers  $Ca^{2+}$  oscillations and egg activation in mammals is a novel phospholipase C: PLCzeta. *Reproduction* 2004; **127**: 431–439.
- [42] TATONE C, DELLE MONACHE S, IORIO R, CASERTA D, DI COLA M, COLONNA R. Possible role for  $Ca^{(2+)}$  calmodulin-dependent protein kinase II as an effector of the fertilization  $Ca^{(2+)}$  signal in mouse oocyte activation. *Mol Hum Reprod* 2002; **8**: 750–757.
- [43] TERRET ME, LEFEBVRE C, DJIANE A, RASSINIER P, MOREAU J, MARO B, VERLHAC MH. DOC1R: a MAP kinase substrate that control microtubule organization of metaphase II mouse oocytes. *Development* 2003; **130**: 5169–5177.
- [44] TSURUMI C, HOFFMANN S, GELEY S, GRAESER R, POLANSKI Z. The spindle assembly checkpoint is not essential for CSF arrest of mouse oocytes. *J Cell Biol* 2004; **167**: 1037–1050.
- [45] TUNG JJ, HANSEN DV, BAN KH, LOKTEV AV, SUMMERS MK, ADLER JR, 3rd, JACKSON PK. A role for the anaphase-promoting complex inhibitor Emi2/XErp1, a homolog of early mitotic inhibitor 1, in cytostatic factor arrest of *Xenopus* eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 4318–4323.
- [46] TUNQUIST BJ, EYERS PA, CHEN LG, LEWELLYN AL., MALLER JL. Spindle checkpoint proteins Mad1 and Mad2 are required for cytostatic factor-mediated metaphase arrest. *J Cell Biol* 2003; **163**: 1231–1242.
- [47] TUNQUIST BJ, MALLER JL. Under arrest: cytostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes Dev* 2003; **17**: 683–710.
- [48] TUNQUIST BJ, SCHWAB MS, CHEN LG, MALLER JL. The spindle checkpoint kinase bub1 and cyclin e/cdk2 both contribute to the establishment of meiotic metaphase arrest by cytostatic factor. *Curr Biol* 2002; **12**: 1027–1033.
- [49] ZACHARIAE W, NASMYTH K. Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev* 1999; **13**: 2039–2058.

Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska-Kaczmarek

Otrzymano: 21.04. 2006 r. .

Przyjęto: 30. 06. 2006 r.

ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

e-mail: ciemerych@biol.uw.edu.pl



## MITOCHONDRIA JAKO INTEGRATORY APOPTOZY\*

### MITOCHONDRIA - AN APOPTOSIS INTEGRATORS

Anna M. CZARNECKA<sup>1,2</sup>, Paweł GOLIK<sup>1,3</sup>, Ewa BARTNIK<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Zakład Genetyki, Uniwersytet Warszawski, <sup>2</sup>Studium Medycyny Molekularnej,  
<sup>3</sup>Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

**Streszczenie:** Nadliczbowe, stare lub uszkodzone komórki organizmów wielokomórkowych podlegają eliminacji w drodze apoptozy, czyli programowanej śmierci komórki. Apoptoza zachodzi w wyniku typowych przemian morfologicznych i biochemicznych. Aktywowana jest kaskada proteaz cysteinowych – kaspaz, które tną docelowe białka. Dochodzi także do aktywacji nukleaz, co razem prowadzi do degradacji białek i DNA komórki w ciągu kilku godzin. Mitochondria są organellami, w których następuje integracja sygnałów apoptotycznych z różnych szlaków, aktywowanych m.in. przez niedotlenienie, szok cieplny, czy usunięcie czynników wzrostowych. Odgrywają one podstawową rolę w koordynacji i amplifikacji sygnału do autodegradacji komórki. Regulują apoptozę m.in. poprzez zatrzymanie czynników pro- i antyapoptotycznych. Zaburzenie aktywacji i/lub przebiegu apoptozy jest jedną z głównych cech komórek nowotworowych.

**Słowa kluczowe:** mitochondria, apoptoza, nowotwór, p53, mortalina, białko szoku cieplnego.

**Abstract:** Supernumerary, old or damaged cells of multicellular organisms are eliminated by apoptosis – programmed cell death. Apoptosis is accompanied by series of characteristic morphological and biochemical events. The cell activates a cascade of cysteine proteases – caspases, that digest target proteins. Nucleases are also activated, which together leads to irreversible cell damage within few hours. Mitochondria are the cell compartment that integrates signals from different apoptotic pathways activated by ischemia, heat shock or growth hormones depletion. Mitochondria play the primary role in coordination and amplification of cell autodegradation signals. They regulate apoptosis by sequestration of pro- and antiapoptotic proteins. Perturbation of activation or execution of apoptosis is characteristic feature of cancer cells.

**Key words:** mitochondria, apoptosis, cancer, p53, mortalin, heat shock protein.

\*Manuskrypt został sfinansowany z grantu MEIN 2P04A00229.

## WSTĘP

Apoptoza, czyli programowana śmierć komórki (ang. *programmed cell death*, PCD) to proces, dzięki któremu nadliczbowe, stare lub uszkodzone komórki są eliminowane z organizmu. Stanowi ona kluczowy element homeostazy tkanki i prawidłowego rozwoju organizmu [1,2,3]. W obrazie morfologii komórki w czasie apoptozy obserwuje się obkurczanie cytoplazmy, skupianie chromatyny w zbite masy pod otoczką jądrową i rozpad jądra na mniejsze fragmenty (tzw. karioreksja), a także gęstnienie cytozolu. W końcowej fazie komórka rozpada się na szereg obłonionych, kulistych fragmentów zwanych ciałkami apoptotycznymi. Ciałka te są szybko fagocytowane przez makrofagi i sąsiadujące komórki [4,5,6].

Apoptoza podlega ścisłej kontroli. Jest regulowana na wielu poziomach. Istnieje możliwość zahamowania apoptozy nawet po zapoczątkowaniu działania kaskady kaspaz efektorowych [7,8,9]. Znaczącą rolę w hamowaniu apoptozy odgrywają m.in. mitochondria [2].

Zaburzenie mechanizmów regulujących apoptozę może prowadzić do niekontrolowanego rozplemu tak zmienionych komórek. Nadliczbowe komórki, które nie są eliminowane, rywalizują z sąsiadami o przestrzeń i składniki odżywcze. W przypadku organizmu wielokomórkowego, jakim jest człowiek, mówimy, iż powstaje nowotwór [10]. Nowotwór (ang. *neoplasm*) to masa komórek powstała z komórek prawidłowych w wyniku procesów patologicznych tzw. transformacji. Czynnikiem sprawczym transformacji są zaburzenia genetyczne i epigenetyczne [11].

## PRZEBIEG APOPTOZY

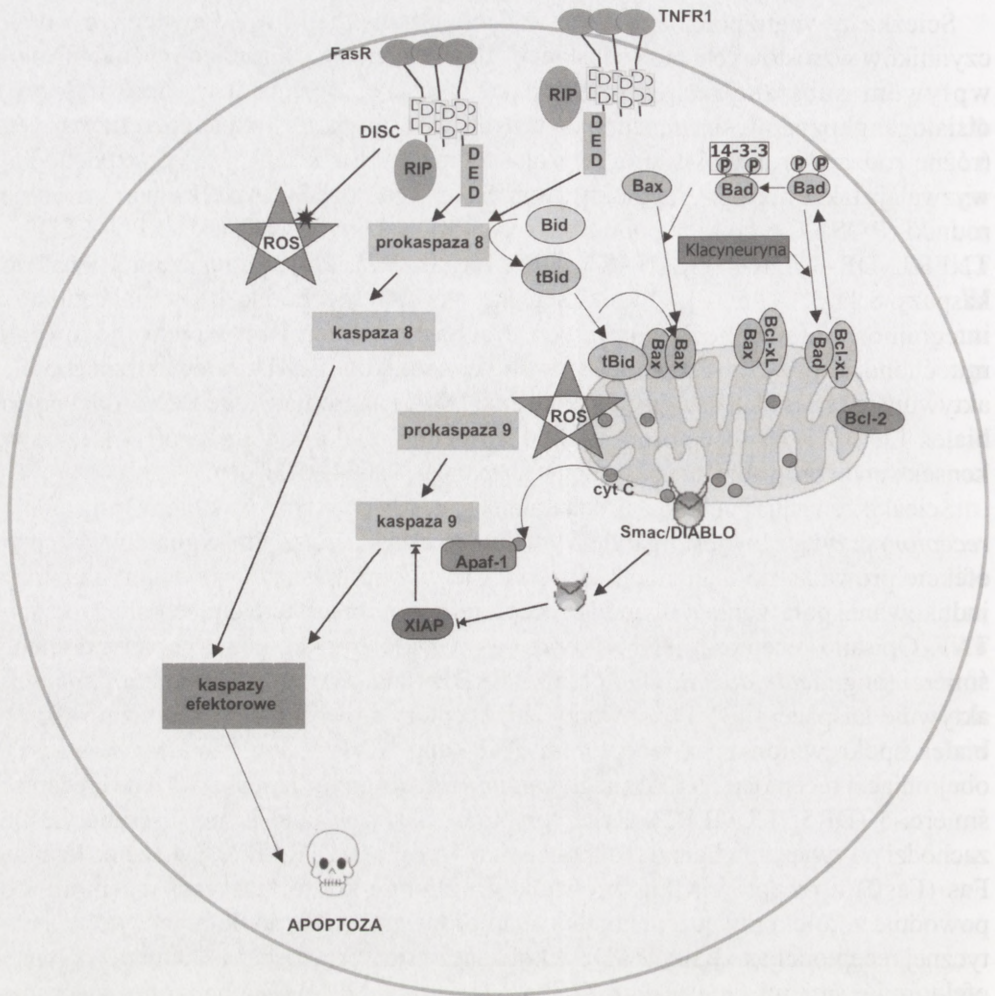
Apoptoza przebiega dwoma głównymi ścieżkami: wewnątrzpochodną (mitochondrialną) lub zewnątrzpochodną (receptorową). Bezpośrednim czynnikiem odpowiedzialnym za degradację komórki jest aktywacja kaspaz. Kaspazy to rodzina proteaz cysteinyowych tnących substrat po rozpoznaniu odpowiedniego motywu w białku, np. motyw GELE dla kaspazy-7 [12]. Cięcie przez wszystkie kaspazy następuje po kwasie asparaginowym. Kaspazy są syntetyzowane jako zymogeny (pro-kaspazy) z N-kończącą prekursorową oraz C-terminalną końcową domeną katalityczną zbudowaną z dwóch peptydów o masie ok. 20 kDa (p20) oraz ok. 10 kDa (p10). Kaspazy możemy podzielić na aktywatorowe (sygnałowe, górne; ang. *upstream, apical, signaling caspases*), do których zaliczamy kaspazy 2, 8, 9, 10, i 12 oraz efektorowe (ang. *downstream, effector, executioner*), do których zaliczamy kaspazy 3, 6, i 7. Kaspazy aktywatorowe są funkcjonalne jako dimery, natomiast efektorowe, które występują w cytozolu jako preformowane dimery, są aktywowane poprzez cięcie proteolityczne przez kaspazy aktywatorowe. Aktywne kaspazy efektorowe tną białka docelowe [13].



Ścieżka zewnątrzpochodna apoptozy jest uruchamiana w odpowiedzi na brak czynników wzrostowych, brak substancji odżywczych, po napromieniowaniu lub pod wpływem substancji chemicznych (np. leków, ceramidów, neurotoksyn, disialogangliozydów, substancji toksycznych, cytostatyków) i czynników fizycznych (różne rodzaje promieniowania, wysoka temperatura). Ścieżkę zewnątrzpochodną wyzwalają także hormony, cytokiny (m.in. FasL, TNF, Apo3L, Apo2L), wirusy, wolne rodniki (ROS). Czynniki te pobudzają receptory rodziny TNF-R (Fas/APO-1/CD95, TNFR1, DR-3, DR-4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2), które przekazują sygnał do kaspazy-8 [1,3,14,15,16]. Z kolei ścieżkę wewnątrzpochodną wyzwalają zmiany integralności błon mitochondrialnych, fluktuacje wartości potencjału błonowego mitochondriów czy wzrost produkcji wolnych rodników. Ścieżkę wewnątrzpochodną aktywują też stres oksydacyjny, uszkodzenia DNA i nagromadzenie źle sfałdowanych białek [3,13]. Rolę receptorów uszkodzeń pełni białko z domenami BH-3, co w konsekwencji prowadzi do uczynienia kaspazy 9 [1,3,14,15,16].

Ścieżka zewnątrzpochodna uruchamiana jest, gdy do receptora śmierci (ang. *death receptor*) przyłączany jest ligand. Wywołuje to aktywację szlaku sygnałowego, co w efekcie prowadzi do degradacji komórki. Pierwszym opisanym modelem apoptozy indukowanej połączeniem liganda z receptorem śmierci jest układ receptora z rodziny TNF. Opisano receptor-1 TNFR1 oraz Fas (CD95, Apo-1), gdzie poprzez domenę śmierci (ang. *death domain*, DD) białko FADD (ang. *Fas-associated death domain*) aktywuje kaspazę-8 [3]. Dziś wiemy, że receptory śmierci należą do dużej rodziny białek spokrewnionych z receptorem TNF (ang. *TNF receptor-related members*), obejmującej receptory TNFR1 (ang. *tumour necrosis factor receptor-1*), Fas i receptor śmierci-5 (DR5, TRAILR2). Receptory te są aktywne jako trimery. Trimeryzacja zachodzi po związaniu liganda (odpowiednio TNF, FasL i TRAIL). Związanie liganda Fas (FasL) z receptorem Fas prowadzi do zmiany konformacyjnej receptora, co powoduje z kolei przyłączenie białka adaptorowego FADD do domeny cytoplazmatycznej receptora Fas. Białko FADD z kolei łączy się z pro-kaspazą-8 poprzez domeny efektorowe śmierci (ang. *Death Effector Domains*, DED). Dochodzi do włączenia prokaspazy-8 w DISC (ang. *Death-Inducing Signaling Complex*), co prowadzi do jej aktywacji [13]. Przekazywanie sygnału przez szlak TNFR1 wymaga związania białka RIP do kompleksu receptorowego poprzez domenę TRADD (ang. *TNFR-associated death domain*) [3]. W przebiegu ścieżki wewnątrzpochodnej uczestniczą mitochondria oraz białka uwalniane z mitochondriów (patrz ryc. 1) [3,13].

Ścieżka wewnątrzpochodna charakteryzuje się wzrostem przepuszczalności zewnętrznej błony mitochondrialnej (ang. *mitochondrial outer membrane permeabilization MOMP*), uwolnieniem cytochromu *c* z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium (ang. *mitochondrial intermembrane space*, IMS), utworzeniem apoptosomu i aktywacją kaspaz [3,13]. Wiele typów cząsteczek uwolnionych przez mitochondria wpływa na aktywację apoptozy są to m.in. cytochrom *c*, wolne rodniki (ROS) i  $Ca^{2+}$  oraz czynnik inicjujący apoptozę (ang. *apoptosis inducing factor* – AIF), [3]. Tak jak w ścieżce zewnątrzpochodnej główną rolę odgrywała kaspaza 8, tak w ścieżce wewnątrzpochodnej jest to kaspaza 9, która aktywuje kaspazy efektorowe [4,17,18].



RYCINA 1. Udział mitochondriów w apoptozie. Pokazano ścieżkę apoptozy zewnątrzpochodną zależną od receptorów śmierci FasR (*receptor death domains – DD; the death effector domains DED*) oraz wewnątrzpochodną indukowaną przez translokację Bax lub Bad (pro-apoptotycznych białek rodziny Bcl-2) do mitochondrium. Bad jest fosforylowane (P) w odpowiedzi na czynniki wzrostowe, w apoptozie Bad jest defosforylowane przez kalcineurynę i przemieszczane do mitochondrium, gdzie wiąże Bcl-xL tworząc PTP (*permeability transition pore*). Kaspaza 8 niszczy białko Bid, którego C-terminalny fragment (tBid) przemieszcza się do mitochondrium, aktywuje Bax i pobudza uwolnienie cytochromu *c* (cyt *c*). W cytozolu, cyt *c* aktywuje kaspazę 9 przez wiązanie z Apaf-1 i dATP

Ostatnio udowodniono, iż organellem komórkowym zaangażowanym w proces apoptozy są także lizosomy. W błonie lizosomów, analogicznie jak w błonie zewnętrznej mitochondrium powstają kanały (LMP – *lysosomal-membrane permeabilization*) przepuszczające substancje zgromadzone w lizosomach. Do cytoplazmy uwalniane są więc katepsyny oraz inne hydrolazy i duża ilość protonów ( $H^+$ ). Dochodzi do zakwaszenia środowiska komórki, co wtórnie aktywuje mitochondrialną ścieżkę

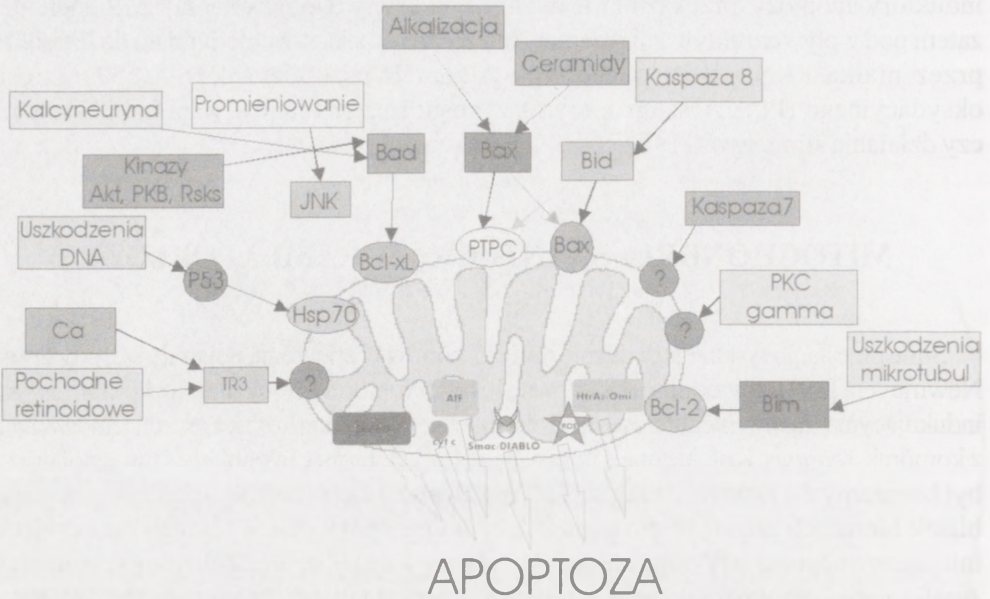
apoptozy i sprzyja powstawaniu MOMP. LMP może być indukowane przez klasyczne induktory apoptozy, przekaźniki II rzędu czy toksyny. Do powstania LMP dochodzi zatem pod wpływem aktywacji receptorów śmierci (przekazywanie sygnału do lizosomu przez białka FAN i RIP), receptorów sigma-2, uszkodzeń DNA (p53), stresu oksydacyjnego (PLA2), staurosporyny, wzrostu stężenia jonów wapnia w komórce, czy działania sfingozyny [19].

## MITOCHONDRIA SĄ INTEGRATORAMI APOPTOZY

Silne przesłanki wskazujące na rolę mitochondriów w apoptozie pojawiły się, gdy grupa Newmeyera [20] udowodniła nieodzowność mitochondriów w ekstrakcie komórkowym indukującym zmiany charakterystyczne dla apoptozy w jądrach komórkowych izolowanych z komórek *Xenopus*. Kolejne prace pokazały, że to cytochrom *c* uwalniany z mitochondriów był konieczny dla aktywacji kaspaz [11]. W kolejnych latach zidentyfikowano całą grupę białek biorących udział w programowanej śmierci komórki. Wyodrębniono czynnik inicjujący apoptozę AIF (ang. *apoptosis inducing factor*), czynnik aktywujący kaspazy Apaf-1 (ang. *apoptosis protease activating factor*), a także liczną rodzinę białek pro- i anty-apoptotycznych Bcl-2 (ang. *B-cell lymphoma protein 2*) i w końcu opisano również kolejność aktywacji kaspaz [16,21].

Mitochondria są miejscem działania białek rodziny Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub>, do której należą zarówno białka pro-, jak i antyapoptotyczne. Do probiałek stymulujących programowaną śmierć komórki należą Bax (ang. *Bcl-2-associated X protein*), Bak (ang. *Bcl-2-antagonist/killer*), Bad (ang. *Bcl-2-antagonist of cell death*), Bid (ang. *BH3 [B cell leukemia/lymphoma-2 {Bcl-2} homology domain 3] interacting domain death agonist*), Bim (ang. *Bcl-2 interacting mediator of cell death*), Bmf (ang. *Bcl-2 modifying factor*), Noxa, Puma (ang. *p53 upregulated modulator of apoptosis*), BNip3 (ang. *Bcl-2/adenovirus E1B nineteen kDa-interacting protein 3*), i Nix (*Nip3-like protein X*)/BNip3L (ang. *BNip3-like protein*). Z kolei do białek antyapoptotycznych należą białka Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub> (*Bcl-x protein long isoform*) [13,22,23,24,25]. W błonie zewnętrznej mitochondrium zakotwiczone jest białko Bcl-2, a białka Bid, Bax, Bad, Bim łączą się z błoną w czasie apoptozy. Dokładna funkcja proapoptotycznych białek nie jest jeszcze wystarczająco poznana. Wiadomo, iż białko Bax, należące do pierwszej grupy, tworzy w błonach mitochondrialnych kanały, przez które cytochrom *c* wypływa do cytoplazmy, czemu przeciwdziałają Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>. Natomiast białko Bim najprawdopodobniej promuje uwalnianie cyt *c* i EndoG i przyspiesza apoptozę. Z kolei funkcją antyapoptotycznych białek Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub> jest wiązanie czynnika Apaf-1, co uniemożliwia jego oddziaływanie z prokaspazą 9. Białka rodziny Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub> funkcjonują zatem jako system przełącznikowy uwalniania cyt *c* [4,6,14].

Ponadto mitochondria są organellami, w których następuje integracja sygnałów apoptotycznych z różnych szlaków (patrz ryc. 2). Klasyczny opis apoptozy przedstawia dwie możliwości aktywacji apoptozy – zewnątrzpochodną oraz wewnątrzpochodną



RYCINA 2. Integracja sygnałów proapoptycznych w mitochondrium. Uszkodzenia mikrotubul, kinaza białkowa C typu gamma (PKC gamma), kaspaza 8, kaspaza 7, ceramidy, alkalizacja, promieniowanie, kinazy Akt (kinaza białkowa B), Rsk (rybosomalna kinaza S6), uszkodzenia DNA, jony wapnia ( $Ca^{2+}$ ) i pochodne retinoidów oddziałują na białka z rodziny Bcl-2. Integracja sygnałów proapoptycznych w mitochondrium prowadzi do uwolnienia białek z przestrzeni mitochondrialnej (cyt c, EndoG, Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, AIF). Białka te, wraz z wolnymi rodnikami tlenowymi (ROS) aktywują apoptozę

(patrz. wyżej). Niezależnie od tego, jaki czynnik wywołuje apoptozę, mitochondria odgrywają podstawową rolę w koordynacji i amplifikacji sygnału auto-degradacji komórki [4,17]. W większości komórek kaspaza 8 jest aktywowana poprzez szlak kaspazy 9, a aktywność kaspazy 8 prowadzi do wyrzutu cytochromu *c* z mitochondriów. Kaspaza 8 najczęściej aktywuje pro-kaspazę 3 i białko Bid (ang. *BH3 [B cell leukemia/lymphoma-2 {Bcl-2} homology domain 3] interacting domain death agonist*), proapoptyczne białko z rodziny Bcl-2, co łączy szlak wewnątrz- i zewnątrzpochodny [3,13,18]. Pokazuje to, iż szlaki często uważane za dwa odrębne wzajemnie się zająbiają i potęgują swoje działanie. Miejscem w komórce, gdzie fizycznie białka ścieżki zewnątrz- i wewnątrzpochodnej oddziałują ze sobą, są właśnie mitochondria [3,26].

## MITOCHONDRIA SEKWESTRUJĄ BIAŁKA PROAPOPTOTYCZNE

Mitochondria regulują apoptozę na wiele sposobów. Jednym z nich jest akumulacja czynników apoptotycznych i ich uwolnienie, po otrzymaniu sygnału śmierci. Kilka proapoptycznych białek, takich jak: cytochrom *c*, AIF, endonukleaza G, HtrA2/Omi,

Smac/DIABLO jest zlokalizowanych w przestrzeni międzybłonowej mitochondrium. Kiedy są z niej uwalniane, dochodzi do aktywacji kaskad sygnałowych inicjujących szlak apoptozy (kaspaza 8 i 9), a także neutralizacji cytoplazmatycznych inhibitorów kaspazy i pobudzenia nukleaz [2,16,18,25,27,28,29].

Spośród mitochondrialnych białek proapoptotycznych wiele uwagi poświęcono cytochromowi *c* (cyt *c*). Najlepiej poznana jest aktywacja kaspaz przez kompleks cyt *c* - Apaf-1 w obecności ATP. Cytochrom *c* w cytozolu oddziałuje z białkiem Apaf-1, co prowadzi do oligomeryzacji Apaf-1. Oligomery Apaf-1 wiążą się z prokaspazą 9 i powstaje apoptosom, czyli kompleks aktywujący prokaspazę 9. Kaspaza 9 aktywuje z kolei prokaspazę 3, uruchamiając kaskadę kaspaz odpowiedzialną za apoptozę. Po uwolnieniu cytochromu *c* są aktywowane kaspazy: -2, -3, -6, -7, -8, i -10 [18,30]. Z kolei AIF przemieszcza się do jądra, gdzie aktywuje kondensację i cięcie chromatyny przez towarzyszącą mu nukleazę EndoG. AIF przyczynia się także do rozbicia kompleksów Apaf-1 z Bcl-X<sub>L</sub> i dzięki temu promuje tworzenie apoptosomu [1,29,31].

Kolejnymi białkami uwalnianymi z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów po indukcji apoptozy są Smac/DIABLO i HtrA2/Omi. Są to białka, które unieczynnają inhibitory kaspaz (IAP, ang. *inhibitory apoptotic proteins*). W zdrowej komórce białka IAP umożliwiają kontrolę przypadkowego przeciekania kaspaz, gdyż je dezaktywują i kierują do proteasomu [2,16,28,32].

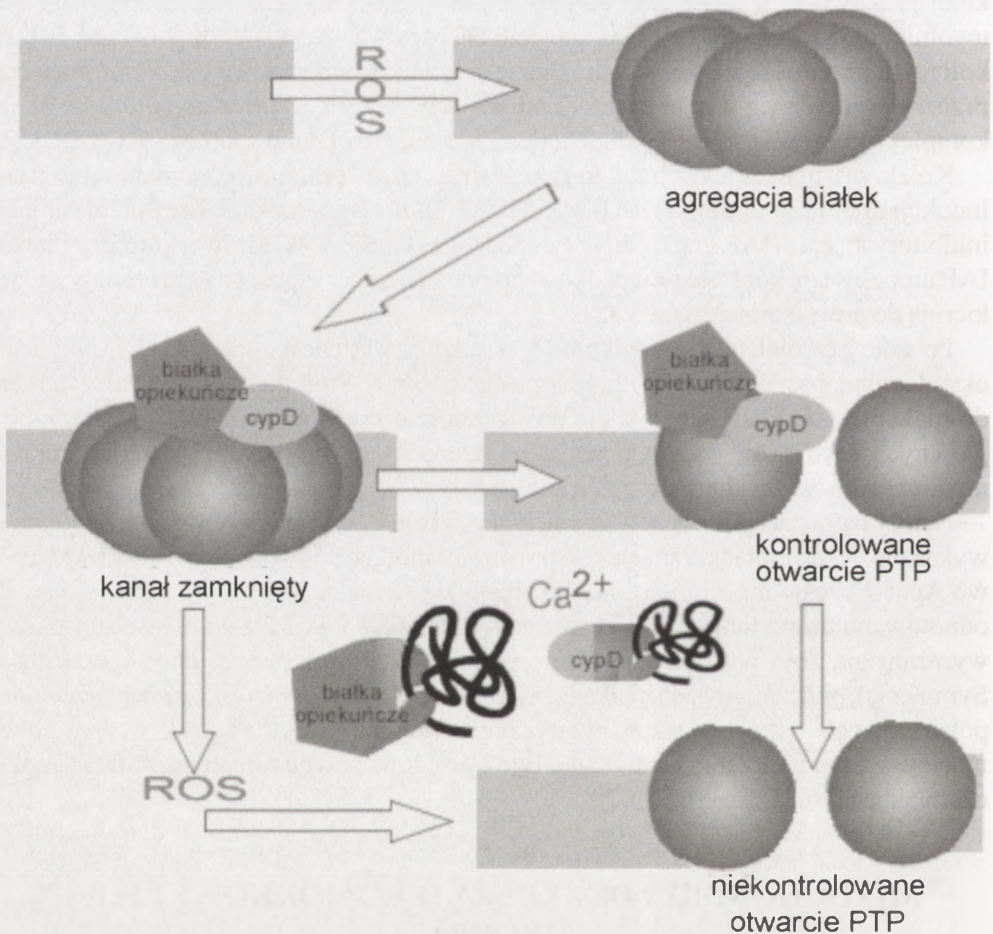
Ponadto z uwolnieniem cytochromu *c* jest często związane rozprężenie fosforylacji oksydacyjnej i spadek potencjału błonowego ( $\Delta\Psi_{mt}$ ), którego regulacja należy także do białek Bcl-2. Eksperymentalnie pokazano, iż niska wartość  $\Delta\Psi_{mt}$  jest jednym z głównych czynników decydujących o podatności komórek na apoptozę, a komórki nowotworów często charakteryzuje znacznie wyższy  $\Delta\Psi_{mt}$  [16,25,27].

Należy pamiętać, iż dla genów wymienionych białek oddziałujących z mitochondriami wykazano liczne mutacje i zmiany ekspresji w komórkach nowotworowych. Przykładowo Apaf-1 często ma zmniejszoną ekspresję w czerniakach, a w wypadku kaspazy 8 odnotowano utratę funkcji w nerwiakach niedojrzałych. Bcl-2 z kolei jest częstokroć wyrażany na zbyt wysokim poziomie w chłoniaku grudkowym (chorobie Brillia i Symmersa), podczas gdy gen białka Bax jest zmutowany w gruczolakorakach przewodu pokarmowego, ostrej białaczce limfatycznej, chłoniaku Burkitta i nowotworze trzonu macicy, a z kolei mutacje genu białka Bad opisano w nowotworach prostaty, mózgu i czerniakach [16,31,32,33].

## MITOCHONDRIA DECYDUJĄ O KOMÓRKOWEJ PULI WAPNIA

Kolejnym czynnikiem związanym z mitochondriami, a regulującym proces apoptozy są jony wapnia. Ca<sup>2+</sup> jest kluczowym regulatorem życia komórki. W odpowiedzi na czynniki patologiczne następują zmiany stężenia Ca<sup>2+</sup> w różnych kompartmentach komórki, co może indukować apoptozę. Przedłużone zmiany w stężeniu Ca<sup>2+</sup> w cytoplazmie, mitochondrium i jądrze wywołują kaskadę zdarzeń prowadzących do

śmierci komórki. Po zadziałaniu bodźca uwolnione z ER  $\text{Ca}^{2+}$  wiążą się z wieloma czynnikami, m.in. z kalpainą, lub kalcyneuryną. Kalpaina to proteaza cysteinowa, która aktywuje Bax i Bid, co z kolei promuje ich przejście do mitochondrium. Efektem tej translokacji białek Bax i Bid jest uwolnienie cytochromu *c* z mitochondrium. Również nadmiar  $\text{Ca}^{2+}$  w mitochondrium stymuluje uwolnienie białek zlokalizowanych w przestrzeni międzybłonowej: cyt *c*, Smac/Diablo, Omi/HtrA2, pro-kaspaz. Aby skomplikować sprawę, dynamika rozmieszczenia  $\text{Ca}^{2+}$  w organellach jest regulowana m.in. przez opisane wcześniej białka z rodziny Bcl-2 [3,5,15,34].

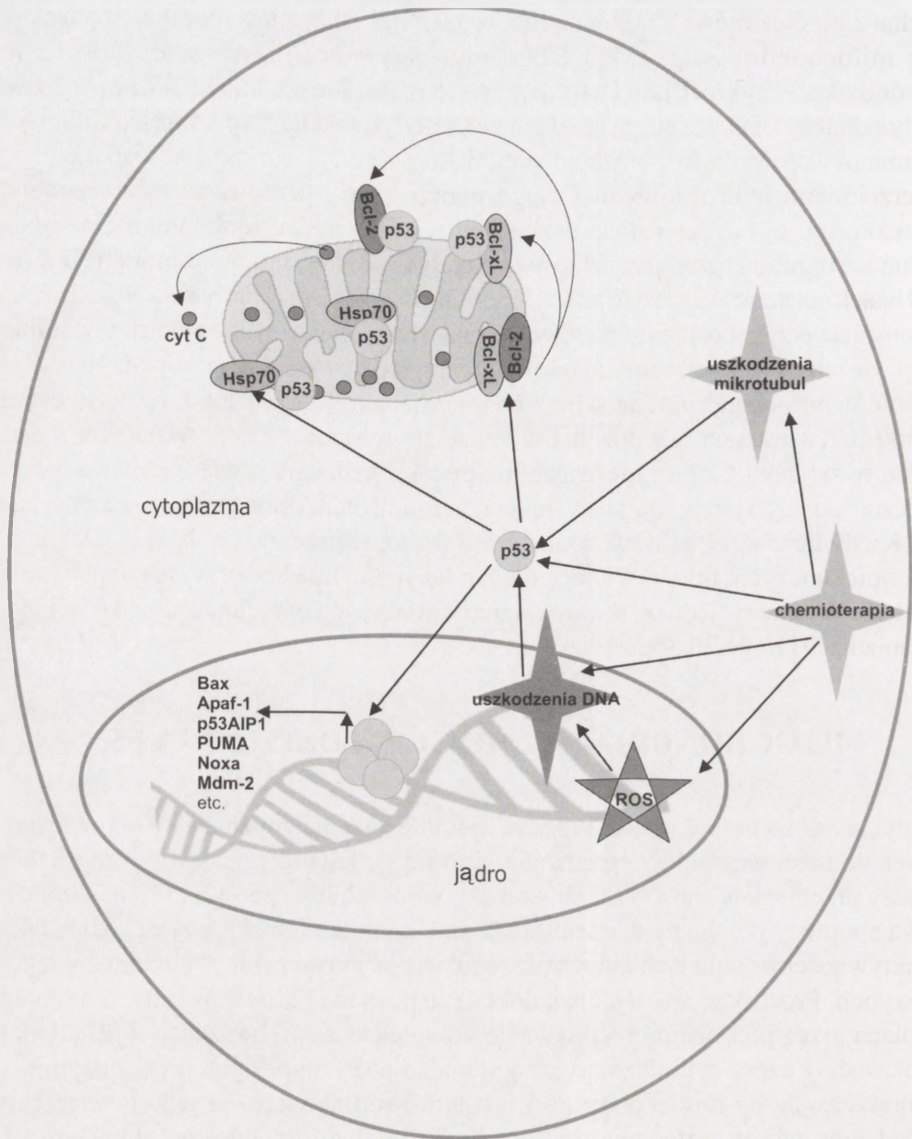


RYCINA 3. Rola jonów wapnia i cyklofilina D w apoptozie. W zależności od wapnia apoptozie podstawowa rola przypada PTP (ang. *permeability transition pore*). ROS uszkodzają błonowe białka mitochondrialne. Jeśli ilość uszkodzeń jest niewielka, cyklofilina D zamyka pory tworząc kompleks ze źle sfałdowanymi białkami. Kiedy poziom  $\text{Ca}^{2+}$  w mitochondrium wzrasta na skutek nadmiernej aktywacji, cyklofilina D wiąże się wówczas z napływającymi jonami wapnia, a więc nie wiąże białek, a kanał się otwiera

Jedną z hipotez mówi, iż główną rolę w zależnej od wapnia apoptozie wywołanej przez mitochondria odgrywają PTP (ang. *permeability transition pore*) i ich podjednostka – cyklofilina D (patrz ryc. 3). ROS uszkadzają błonowe białka mitochondrialne. Białka te ulegają rozfałdowaniu, co powoduje ekspozycję hydrofilowych reszt aminokwasowych do błony lipidowej. W konsekwencji uszkodzone białka agregują powierzchniami hydrofilowymi i mogą tworzyć pory przepuszczające niewielkie cząsteczki, np. cyt *c*. Jeśli ilość uszkodzeń jest niewielka, mitochondrialne białka opiekuńcze regulują przepuszczalność powstałych porów. Jednym z biorących w tym udział białek opiekuńczych jest właśnie cyklofilina D – izomeraza prolylowa zlokalizowana od strony macierzy mitochondrialnej. W warunkach fizjologicznych kompleks cyklofiliny i białek źle sfałdowanych zamyka por. Tak jest tylko do czasu, dopóki poziom  $\text{Ca}^{2+}$  nie wzrośnie w mitochondrium na skutek nadmiernej aktywacji, jak np. po uszkodzeniu komórki przez patogen. Cyklofilina D wiąże się wówczas z napływającymi jonami wapnia, w związku z czym nie wiąże już białek i kanał się otwiera. Alternatywnie, niezależnie od ilości jonów wapnia w mitochondrium, białka błonowe są niszczone przez ROS. Kiedy liczba źle sfałdowanych białek w błonie przewyższy liczbę dostępnych białek opiekuńczych, pory otwierają się, tak jak ma to miejsce przy mutacjach białek OXPHOS. Wydaje się jednak, iż jony wapnia wpływają na mitochondria także w innych mechanizmach [15,34,35,36,37].

## MITOCHONDRIA SĄ MIEJSCEM DZIAŁANIA p53

Dotychczas udało się opisać kilka wzajemnie zależających się szlaków prowadzących do nieodwracalnej degradacji komórki [3]. Jeden z podstawowych szlaków apoptozy przebiega w sposób zależny od aktywności białka p53 [22,38]. p53-zależna ścieżka apoptozy polega na działaniu p53 jako czynnika transkrypcyjnego, ale także jego aktywności w funkcjach innych niż regulacja ekspresji genu na poziomie inicjacji transkrypcji. Procesy te nie są jednak dokładnie poznane [22,39]. Wiemy, iż apoptoza wywołana przez p53 obejmuje aktywację kompleksu Apaf-1-kaspazy-9 [22]. Udało się pokazać, iż część cytoplazmatycznego białka p53 na początku procesu apoptozy przemieszcza się do mitochondrium i jest tam akumulowana na jego powierzchni. Gromadzenie p53 w mitochondrium zachodzi w ciągu godziny od aktywacji p53 następującej po zadziałaniu czynników toksycznych [40]. Po transporcie p53 w okolice mitochondrium dochodzi do spadku  $\Delta\Psi_m$ , uwolnienia cyt *c* i aktywacji pro-kaspazy-3 [39]. W dalszym etapie odpowiedzi komórki dochodzi do zwiększenia ekspresji białka PUMA (w ciągu 2 godzin), NOXA (w 4 godziny) i Bax (w 8 godzin) [41]. Widać zatem, iż dla zajścia apoptozy, p53 działa zarówno w jądrze – wiążąc się z DNA (promotory genów) oraz jako białko cytoplazmatyczne łącząc się z błoną mitochondrialną (patrz ryc. 4) lub po przemieszczeniu do mitochondrium. W odpowiedzi na uszkodzenie komórki p53 przemieszczane jest do mitochondrium. Część p53 pozostaje związana z zewnętrzną błoną mitochondrialną, natomiast część jest przemieszczana do matriksu mitochondrium. Dotychczas udało się zlokalizować p53 w połączeniu z Hsp70 i Hsp60



RYCINA 4. Udział p53 w apoptozie. Białko p53 w czasie apoptozy pobudza uwalnianie cytochromu c z mitochondrium. p53, które lokalizuje się w błonie zewnętrznej mitochondrium, wiąże się z białkami z rodziny Bcl-2 tworząc kompleksy p53/BclX i p53/Bcl2. W matriks mitochondrialnej wiąże się z mtHsp70, co może prowadzić do utraty funkcji czynnika transkrypcyjnego. W jądrze p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym dla białek proapoptotycznych (Bax, Apaf-1, PUMA, Noxa)

należącymi do kompleksu transportującego białka poprzez błonę mitochondrium [42,43]. Ponadto w cytoplazmie, w wyniku proteolitycznego cięcia p53 przez kaspazy powstają cztery polipeptydy, z których dwa pozbawione są sygnału lokalizacji jądrowej i pozostają w cytoplazmie. Polipeptydy te przemieszczane są do mitochondrium, co prowadzi do



depolaryzacji i obniżenia potencjału mitochondrialnego [44]. W końcu przemieszczenie p53 do mitochondrium powoduje uwolnienie cytochromu c do cytoplazmy. Jednak szczegóły mechanizmu, w którym p53 wpływa na uwalnianie cyt c z mitochondrium, są wciąż nieznanne [22]. p53, które lokalizuje się w błonie zewnętrznej mitochondrium, wiąże się z białkami z rodziny Bcl-2, które tworzą w błonie mitochondrium kanał umożliwiający wypływ cyt c. Dotychczas udało się zlokalizować kompleksy p53/Bcl<sub>X<sub>L</sub></sub> i p53/Bcl2 [40]. Wiązanie Bcl2 z p53, które następuje w odpowiedzi na uszkodzenia DNA, zachodzi dzięki rozrywaniu kompleksów Bcl2-Bax. Jest to możliwe, ponieważ p53 wiąże się z domeną FLD białka Bcl2 (ang. *flexible loop regulatory domain*, FLD). Białko p53 wpływa na wiązanie Bcl2 z Bax wiążąc się z regionem od 32 do 68 aminokwasu w regionie regulatorowym domeny FLD (ang. *negative regulatory region of the FLD*) [45].

Z kolei jako czynnik transkrypcyjny p53 podnosi ekspresję białek mitochondrialnych biorących udział w apoptozie. Należą do nich aktywator pro-kaspazy-9 – Apaf1, kilka białek pro-apoptycznych rodziny Bcl-2 [23,24], a także inne białka proapoptyczne: Bax, Bid, Asc, Apaf-1, Kaspaza-6, Fas [46,47,48], Noxa [49] i Puma [24]. Do repertuaru tego dołączają także białka receptorowe CD95 (Fas/APO-1) i Killer/DR5 oraz białko rozprzegające potencjał mitochondrialny – P53AIP1 [22,50]. Ostatnio wykazano również interakcje p53 z mitochondrialnym czynnikiem transkrypcyjnym A (mtTFA) [51] oraz polimerazą  $\gamma$  [52], które także wydają się mieć znaczenie dla homeostazy komórki i jej potencjalnego wejścia na ścieżkę apoptozy. p53 wiąże mtTFA, co 10–20-krotnie podwyższa jego wydajność w naprawianiu uszkodzenia mtDNA [51], a wiążąc mitochondrialną polimerazę DNA (Pol $\gamma$ ) wspomaga replikację [52]. Oba te oddziaływania zdają się zmniejszać ilość uszkodzeń mtDNA i co za tym idzie zmniejszać prawdopodobieństwo transformacji lub wejścia w apoptozę. Ponadto wykazano, iż p53 zlokalizowane w wewnętrznej błonie mitochondrium oddziałuje z białkami biorącymi udział w naprawie mtDNA przez wycinanie (ang. *mitochondrial base excision repair complex* – mtBER), co zwiększa ich aktywność [53].

## MITOCHONDRIALNE BIAŁKO MORTALINA MOŻE PRZYCZYNIĆ SIĘ DO TRANSFORMACJI

Od dawna wskazywano na rolę białek opiekuńczych, w tym białek szoku cieplnego, w procesie nowotworzenia. W wielu liniach nowotworowych wykazano nadekspresję białek szoku cieplnego. Do białek tych należy mortalina (mtHsp70, Pbp74, p66mot, Grp75). Molekularne podstawy nadekspresji białek opiekuńczych w nowotworach nie są poznane. Pytanie o etiologię tego stanu pozostaje w dużej mierze bez odpowiedzi, a i przyczyna nadekspresji mortaliny pozostaje do ustalenia [54,55,56,57].

mtHsp70 ulega ekspresji konstytutywnej, ale może być dodatkowo nasiloną przez brak glukozy, jonofory, analogi aminokwasów, ozon, promieniowanie jonizacyjne, nadczynność tarczycy, niedokrwienie, ale nie przez szok cieplny. Mortalina jest ekspresjonowana w każdej z 60 analizowanych pod tym kątem tkanek zdrowych i nowotworowych. Cechą charakterystyczną jest inna lokalizacja mortaliny w zdrowych

komórkach, a inna w komórkach immortalizowanych lub nowotworowych. W obrębie całej cytoplazmy jest opisywana w zdrowych liniach komórkowych zwierzęcych i ludzkich, natomiast okołojądrowe rozmieszczenie zostało zaobserwowane w materiałach z biopsji guzów nowotworowych i w immortalizowanych *in vitro* komórkach. Przesunięcie mortaliny w obszar okołojądrowy obserwowano wraz z postępującym zezłośliwieniem guza, natomiast rewersję tej lokalizacji do rozmieszczenia w całej cytoplazmie, podczas gdy komórki traciły nieśmiertelny fenotyp. Ponadto w wielu liniach komórkowych oraz materiale z biopsji guzów nowotworowych wykazano wysoki poziom ekspresji mortaliny, co może razem sugerować udział mortaliny w transformacji nowotworowej [2,54,58,59,60,61].

Nadekspresja mortaliny daje także przewagę we wzroście, co pokazano na komórkach HL60 (białaczka), gdzie udowodniono, iż jest ona przyczyną blokady ich różnicowania. Nadekspresyjowana mortalina zapewnia wydłużony czas życia komórek i powoduje immortalizację, co pokazano na przykładzie komórek HFF5 (ang. *human foreskin fibroblasts*), w których mortalina ulegała wysokiej ekspresji [54,60,61,62].

cDNA mortaliny izolowane ze zdrowych, jak i immortalizowanych komórek ludzkich ma taką samą sekwencję, co wskazuje, iż za różną dystrybucję tego białka w komórkach ludzkich są odpowiedzialne modyfikacje potranslacyjne lub oddziaływania z innymi białkami. Dynamiczna lokalizacja mortaliny i jej przynależność do grupy białek szoku cieplnego pozwala na spekulacje co do jej funkcji i mechanizmu działania. Proponowana jest rola opiekuńcza dla białek mitochondrialnych oraz udział w homeostazie  $Ca^{2+}$  w mitochondriach. Ze względu na homologię do DnaK (Hsp70 *E. coli*) proponuje się, iż może ona być zaangażowana w replikację mtDNA, gdyż dla DnaK udowodniono rolę w replikacji DNA *E. coli* [63]. Wiadomo na pewno, że inaktywacja mtHsp70 u drożdży powoduje agregację mitochondriów. Wysłunięto więc hipotezę, że mtHsp70 jest konieczne dla optymalizacji funkcji niezidentyfikowanych jeszcze termo-labilnych białek mitochondrialnych [64].

Istotny wydaje się być fakt, iż mortalina oddziałuje w komórkach ludzkich transformowanych nowotworowo z niezmutowanym p53, choć białka te nie są wykrywane razem w zdrowych komórkach (patrz ryc. 4). Dodatkowo przykuwa uwagę fakt, iż mitochondria, w których zlokalizowano p53, są położone blisko jąder komórkowych. Kolokalizację p53 i mortaliny w rejonie okołojądrowym wykazano m.in. w komórkach: HeLa (rak szyjki macicy), A2182 (rak pęcherza), U2OS (kostniako-mięsak), A172 (glejak), NT-2 (potworniak złośliwy), SY-5Y i YKG-1 (nerwiak niedojrzały) czy MCF7 (rak piersi), natomiast jej brak w zdrowych mysich fibroblastach (linia CMEF), zdrowych ludzkich fibroblastach TIG-3 czy MRC-5. Wydaje się wysoce prawdopodobne, iż mortalina funkcjonuje analogicznie do swego cytoplazmatycznego homologa. W ludzkich komórkach Hsp70 może wiązać p53 w cytoplazmie i przyczyniać się do jego sekwestracji poza jądrem, co funkcjonalnie prowadzi do utraty funkcji supresora nowotworu, gdyż zapobiega translokacji p53 do jądra, jako że C-końcowa domena lokalizacji cytoplazmatycznej p53 (ang. *cytoplasmatic sequestration domain*) jest wiązany przez mot-2 (mysi homolog mortaliny) [54,65,66]. Efektem inaktywacji p53 przez mot-2 jest obniżenie transkrypcji genów zależnych od p53, jak p21<sup>WAF-1</sup> i Mdm-2. W opisanym

mechanizmie mortalina może przyczynić się do transformacji komórek. Warto pamiętać, iż wcześniej sekwestracja p53 w cytoplazmie została udowodniona m.in. w nowotworach piersi, nerwiaku niedojrzałym, raku jelita grubego, glejaku siatkówki – i możliwe jest, iż to właśnie oddziaływanie mot-p53 miało istotną rolę w transformacji nowotworowej tych komórek [54,57,59,60,61].

Dane wskazują też na to, iż mot-2 w pewnym stopniu jest dodatkowo odpowiedzialna za obniżenie stabilnego poziomu p53. Mot-2 miałaby być zaangażowana w represję transkrypcji mRNA dla p53 lub degradację białka p53. Ponadto ekspresja p53 w komórkach transfekowanych o dużej ekspresji mortaliny jest opóźniona, a p53 zlokalizowane jest przyjądrowo w stopniu wzrastającym proporcjonalnie do nasilenia ekspresji mortaliny. W testach aktywności wykazano natomiast rozfałdowanie i inaktywację p53 przez mortalinę. Wydaje się zatem, iż mortalina reguluje aktywność p53 na wielu poziomach ekspresji jego genu [58].

Poza opisanym działaniem na czynniki transkrypcyjne wykazano, iż mortalina wiąże także inne typy białek. Należy do nich m.in. MPD (ang. *mevalonate pyrophosphate decarboxylase*). MPD przenosi grupy prenylowe w modyfikacji białek koniecznej dla ich aktywności, m.in. dla p21<sup>Ras</sup> (Ras). Z tego względu mortalina w sposób pośredni wpływa na poziom stabilnego Ras – kontrolując jego prenylację. Nadekspresja mot-2 jest przyczyną stabilizacji MPD, a co za tym idzie obniżonego poziomu Ras [61].

## PODSUMOWANIE

Procesem, w którym nadliczbowe, stare, lub uszkodzone komórki są eliminowane z organizmu, jest apoptoza. Właściwy przebieg tego procesu to podstawowy element homeostazy tkanki, i a co za tym idzie całego organizmu. Mitochondria są organellami, w których następuje integracja sygnałów apoptotycznych z różnych szlaków. Mitochondria w apoptozie, niezależnie od tego, jaka stymulacja ją wywołuje, odgrywają podstawową rolę w koordynacji sygnałów autodegradacji komórki. Każdy z elementów regulacji apoptozy może ulec zaburzeniu promując niekontrolowane podziały i immortalizację komórki, a w efekcie na poziomie organizmu rozwój nowotworu [4,5,6].

Mitochondria to organella kluczowe w fizjologii i homeostazie komórki. W ich obrębie przebiega i krzyżuje się ze sobą wiele fundamentalnych szlaków metabolicznych. Produkty reakcji przebiegających w macierzy mitochondrialnej są częstokroć konieczne dla przeżycia i/lub podziałów komórki. Integralność łańcucha transportu elektronów i jego pochodna, jaką jest wydajność fosforylacji oksydacyjnej, decydują o stanie energetycznym komórki. Ten z kolei stanowi klucz do regulacji ekspresji genów w odpowiedzi na bieżące zapotrzebowanie komórki w kontekście zmian w jej środowisku, a więc tkance czy całym organizmie. Z drugiej strony to przecież odpowiednia ekspresja genów odpowiada za modulację przemian energetycznych. Oczywiście jest, iż procesy przebiegające w komórce stanowią nierozzerwalną całość, a niebuforowalne zmiany muszą prowadzić do rozerwania tej spójnej sieci zależności. Mitochondria to właśnie

organelum integrujące lwią część procesów podstawowych dla przeżycia komórki. Niosą one swój własny niewielki genom (u człowieka mtDNA koduje 13 polipeptydów) i aparat syntezy białek (tRNA, rybosomy). Mutacje w obrębie mtDNA – jeśli skutkują w biosyntezie nieprawidłowych peptydów łańcucha transportu elektronów lub zmienionych tRNA – mogą przyczyniać się do transformacji nowotworowej. Rozprzęganie fosforylacji oksydacyjnej, rozchwianie gospodarki żelazem, wzmożona produkcja ROS to mogą być wszystko następstwa nieprawidłowej sekwencji mtDNA. Kolejnym ogniwem, które może być zaburzone w czasie biogenezy mitochondriów, jest samo fałdowanie białek. Jeśli grupa białek opiekuńczych związanych z tym organelum jest niefunkcjonalna, to skutki mogą być równie poważne jak mutacje w samych podjednostkach łańcucha. Zaburzony transport białek z cytozolu do mitochondrium, ich akumulacja w macierzy lub nadmierna degradacja, a także integracja w nieodpowiedniej proporcji, to wszystko może stać się przyczyną utraty funkcji mitochondriów. W końcu mitochondria stanowią fizycznie miejsce integracji szlaków pro- i anty-apoptycznych. Widać zatem, iż od uszkodzenia mitochondriów do transformacji nowotworowej już niedaleko, dlatego nie dziwi fakt, iż szeroko pojęta dysfunkcja mitochondriów jest jedną z najbardziej znaczących cech komórek nowotworowych. Zmiany w mitochondriach manifestują się na wielu poziomach, zarówno w ich stanie w komórce – homoplazmii *versus* heteroplazmii, ultrastrukturze – kształcie, wielkości, stanie metabolicznym – potencjale redoks, wydajności produkcji ATP, a także w ich biochemii – jako lokalizacja określonych białek (np. p53), czy statusie molekularnym – mutacje mtDNA. Aktualny stan wiedzy na temat rozwoju chorób nowotworowych jest wciąż głęboko niezadowolający. Głębsze poznanie i zrozumienie mechanizmów patogenezy chorób mitochondrialnych będzie konieczne dla ewentualnego rozwoju nowych terapii. Jako podstawę leczenia można by wykorzystać choćby odmienność biochemiczną komórek nowotworowych, polegającą na nadprodukcji wolnych rodników. Gdyby zablokować eliminację wolnych rodników i doprowadzić do ich akumulacji, mogłoby to spowodować letalne uszkodzenia komórek nowotworowych. Ingerencja w biogenezę mitochondriów i ich lokalizacji komórkowej może stanowić nowe narzędzie terapii nowotworów. Pojawiły się rozważania, iż gdyby udało się modulować ekspresję białek mtHsp70, mogłoby to pozwolić na naprawę funkcji komórek nowotworowych tam, gdzie wykazano jej zaburzenia. I choć aktualnie nie mamy możliwości modyfikowania postępów chorób mitochondrialnych, jednak wciąż rozwijane są nowe strategie, co daje nadzieje na przyszłość [2,3,6,11,28,54,67,68,-69,70,71].

## PODZIĘKOWANIA

Autorzy dziękują Panu Prof. dr hab. n. med. Andrzejowi Bieńkiewiczowi (Katedra Onkologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi), Panu Dr Tomaszowi Krawczykowi (Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, Zakład Patomorfologii Klinicznej), Panu Dr Jerzemu S. Czarniekiemu (Uniwersytet Łódzki) oraz Panu Przemysławowi Tomalskiemu (*Centre for Brain and Cognitive Development, School of Psychology, Birkbeck College, UK*) za cenne uwagi i wskazówki podczas opracowywania tekstu.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] KROEMER G. Mitochondrial control of apoptosis: An introduction. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **304**: 433–435.
- [2] PARCELLIER A, GURBUXANIS, SCHMITT E, SOLARY E, GARRIDO C. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **304**: 505–512.
- [3] LEIST M, JAATTELA M. Four deaths and a funeral: From caspases to alternative mechanism. *Nature Reviews Molecular Biology* 2001; **2**: 1–10.
- [4] EKERT PG, VAUX DL. The mitochondrial death squad: Hardened killers or innocent bystanders? *Curr Opin Cell Biol* 2005; **17**: 626–630.
- [5] BEDNAREK J, KILIANSKA ZM. Mitochondrial intermembrane space proteins in apoptosis process. *Post Biochem* 2005; **51**: 447–458.
- [6] DON AS, HOGG PJ. Mitochondria as cancer drug targets. *Trends Mol Med* 2004; **10**: 372–378.
- [7] GYRD-HANSEN M, NYLANDSTED J, JAATTELA M. Heat shock protein 70 promotes cancer cell viability by safeguarding lysosomal integrity. *Cell Cycle* 2004; **3**: 1484–1485.
- [8] JAATTELA M, CANDE C, KROEMER G. Lysosomes and mitochondria in the commitment to apoptosis: A potential role for cathepsin d and aif. *Cell Death Differ* 2004; **11**: 135–136.
- [9] JAATTELA M. Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogene* 2004; **23**: 2746–2756.
- [10] KOPACZEWSKI B, KOPACZEWSKA M, NOWAK S. Apoptosis-molecular basis in pathogenesis of selected chronic inflammatory and neoplastic diseases. *Pol Merkurisuz Lek* 2005; **18**: 329–331.
- [11] BERTRAM JS. The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine* 2001; **21**: 167–223.
- [12] ETHELL DW, BOSSY-WETZEL E, BREDESEN DE. Caspase 7 can cleave tumor necrosis factor receptor-i (p60) at a non-consensus motif, *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* 2001; **1541**: 231–238.
- [13] CROW MT, MANI K, NAM Y-J, KITSIS RN. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res* 2004; **95**: 957–970.
- [14] PAGLIARI LJ, KUWANA T, BONZON C, NEWMYER DD, TU S, BEERE HM, GREEN DR. The multidomain proapoptotic molecules bax and bak are directly activated by heat. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 17975–17980.
- [15] HAJNOCZKY G, DAVIES E, MADESH M. Calcium signaling and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **304**: 445–454.
- [16] WANG X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001; **15**: 2922–2933.
- [17] BOUCHIER-HAYES L, LARTIGUE L, NEWMYER DD. Mitochondria: Pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 2005; **115**: 2640–2647.
- [18] NALEPA G, ZUKOWSKA-SZCZECHOWSKA E. Caspases and apoptosis: Die and let live. *Wiad Lek* 2002; **55**: 100–106.
- [19] KROEMER G, JAATTELA M. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* 2005; **5**: 886–897.
- [20] VON AHSEN O, NEWMYER DD. Cell-free apoptosis in *Xenopus laevis* egg extracts. *Methods Enzymol* 2000; **322**: 183–198.
- [21] WATERHOUSE NJ, GOLDSTEIN JC, KLUCK RM, NEWMYER DD, GREEN DR. The (holey) study of mitochondria in apoptosis. *Methods Cell Biol* 2001; **66**: 365–391.
- [22] BENCHIMOL S. P53-dependent pathways of apoptosis. *Cell Death Differ* 2001; **8**: 1049–1051.
- [23] CHIPUK JE, KUWANA T, BOUCHIER-HAYES L, DROIN NM, NEWMYER DD, SCHULER M, GREEN DR. Direct activation of bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 2004; **303**: 1010–1014.
- [24] CHIPUK JE, BOUCHIER-HAYES L, KUWANA T, NEWMYER DD, GREEN DR. Puma couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science* 2005; **309**: 1732–1735.
- [25] RUPNIEWSKA Z, BOJARSKA-JUNAK A. Apoptosis: Mitochondrial membrane permeabilization and the role played by bcl-2 family proteins. *Post Hig Med Dosw (Online)* 2004; **58**: 538–547.
- [26] CHO SG, CHOI EJ. Apoptotic signaling pathways: Caspases and stress-activated protein kinases. *J Biochem Mol Biol* 2002; **35**: 24–27.
- [27] AUGENLICHT LH, HEERDT BG. Mitochondria: Integrators in tumorigenesis? *Nat Genet* 2001; **28**: 104–105.

- [28] CAREW JS, HUANG P. Mitochondrial defects in cancer. *Mol Cancer* 2002; **1**: 9.
- [29] SAELENS X, FESTJENS N, VANDE WALLE L, VAN GURP M, VAN LOO G, VANDENABEELE P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 2004; **23**: 2861–2874.
- [30] SLEE EA, HARTE MT, KLUCK RM, WOLF BB, CASIANO CA, NEWMAYER DD, WANG HG, REED JC, NICHOLSON DW, ALNEMRI ES, GREEN DR, MARTIN SJ. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: Hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 1999; **144**: 281–292.
- [31] GERHARD MC, SCHMID RM, HACKER G. Analysis of cytochrome c-dependent apoptosis apparatus in cells from human pancreatic carcinoma. *Br J Cancer* 2002; **86**: 893–898.
- [32] FERNANDEZ-CHECA JC. Redox regulation and signaling lipids in mitochondrial apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **304**: 471–479.
- [33] BIERNAT W. Podstawy genetyki molekularnej nowotworów. W: KORDEK R, JASSEM J, KRZAKO-WASKI M, JEZIORSKI A [red.] Onkologia podręcznik dla studentów i lekarzy. Gdańsk: Medical Press 2003.
- [34] NEWMAYER DD, FERGUSON-MILLER S. Mitochondria: Releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 2003; **112**: 481–490.
- [35] KIM JS, HE L, LEMASTERS JJ. Mitochondrial permeability transition: A common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **304**: 463–470.
- [36] HALESTRAP AP. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: A pore way to die. *Biochem Soc Trans* 2006; **34**: 232–237.
- [37] DEBSKA G, KICINSKA A, SKALSKA J, BEREST V, SZEWCZYK A. Mitochondrial ion channels. *Post Hig Med Dosw* 2002; **56**: 315–321.
- [38] GODEFROY N, LEMAIRE C, RENAUD F, RINCHEVAL V, PEREZ S, PARVU-FERECATU I, MIGNOTTE B, VAYSSIÈRE JL. P53 can promote mitochondrial- and caspase-independent apoptosis. *Cell Death Differ* 2004; **11**: 785–787.
- [39] MARCHENKO ND, ZAIKA A, MOLL UM. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. *J Biol Chem* 2000; **275**: 16202–16212.
- [40] ERSTER S, MOLL UM. Stress-induced p53 runs a transcription-independent death program. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **331**: 843–850.
- [41] ERSTER S, MIHARA M, KIM RH, PETRENKO O, MOLL UM. *In vivo* mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 6728–6741.
- [42] MOLL UM, WOLFF S, SPEIDEL D, DEPPERT W. Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol* 2005; **17**: 631–636.
- [43] PIEKNA-PRZYBYLSKA D, AUGUSTYNIAK H. Import of protein into mitochondria. *Post Biochem* 2002; **48**: 262–274.
- [44] SAYAN BS, SAYAN AE, KNIGHT RA, MELINO G, COHEN GM. P53 is cleaved by caspases generating fragments localizing to mitochondria 10.1074/jbc.M512467200. *J Biol Chem* 2006; **281**: 13566–13573.
- [45] DENG X, GAO F, FLAGG T, ANDERSON J, MAY WS. Bcl2's flexible loop domain regulates p53 binding and survival. *Mol Cell Biol* 2006; **26**: 4421–4434.
- [46] YU J, ZHANG L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **331**: 851–858.
- [47] ZAMZAMI N, KROEMER G. P53 in apoptosis control: An introduction. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **331**: 685–687.
- [48] FRIDMAN JS, LOWE SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 2003; **22**: 9030–9040.
- [49] ODA E, OHKI R, MURASAWA H, NEMOTO J, SHIBUE T, YAMASHITA T, TOKINO T, TANIGUCHI T, TANAKA N. Noxa, a bh3-only member of the bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 2000; **288**: 1053–1058.
- [50] MICHALAK E, VILLUNGER A, ERLACHER M, STRASSER A. Death squads enlisted by the tumour suppressor p53. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **331**: 786–798.
- [51] YOSHIDA Y, IZUMI H, TORIGOE T, ISHIGUCHI H, ITOH H, KANG D, KOHNO K. P53 physically interacts with mitochondrial transcription factor a and differentially regulates binding to damaged DNA. *Cancer Res* 2003; **63**: 3729–3734.
- [52] ACHANTA G, SASAKI R, FENG L, CAREW JS, LU W, PELICANO H, KEATING MJ, HUANG P. Novel role of p53 in maintaining mitochondrial genetic stability through interaction with DNA pol gamma. *EMBO J* 2005; **24**: 3482–3492.

- [53] CHEN D, YU Z, ZHU Z, LOPEZ CD. The p53 pathway promotes efficient mitochondrial DNA base excision repair in colorectal cancer cells. *Cancer Res* 2006; **66**: 3485–3494.
- [54] WADHWA R, TAIRA K, KAUL SC. Moratlin: A potential candidate for biotechnology and biomedicine. *Histol Histopathol* 2002; **17**: 1173–1177.
- [55] MACARIO AJ. Heat-shock proteins and molecular chaperones: Implications for pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Int J Clin Lab Res* 1995; **25**: 59–70.
- [56] XU J, XIAO HH, SARTORELLI AC. Attenuation of the induced differentiation of hl-60 leukemia cells by mitochondrial chaperone hsp70. *Oncol Res* 1999; **11**: 429–435.
- [57] ZYLICZ M, KING FW, WAWRZYŃÓW A. Hsp70 interactions with p53 tumor suppressor protein. *EMBO J* 2001; **20**: 4634–4638.
- [58] TAURIN S, SEYRANTEPE V, ORLOV SN, TREMBLAY TL, THIBAUT P, BENNETT MR, HAMET P, PSHEZHETSKY AV. Proteome analysis and functional expression identify mortalin as an antiapoptotic gene induced by elevation of [na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>/[k<sup>+</sup>]<sub>i</sub> ratio in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2002; **91**: 915–922.
- [59] WADHWA R, TAIRA K, KAUL SC. An hsp70 family chaperone, mortalin/mthsp70/pbp74/grp75: What, when and where? *Cell Stress Chaperones* 2002; **7**: 309–316.
- [60] WADHWA R, YAGUCHI T, HASAN K, MITSUI Y, REDDEL RR, KAUL SC. Hsp70 family member, mot-2/mthsp70/grp75, binds to the cytoplasmic sequestration domain of the p53 protein. *Experimental Cell Research* 2002; **274**: 246–253.
- [61] WADHWA R, YAGAUCHI T, HASAN K, TAIRA K, KAUL SC. Mortalin - mpd (mevalonate pyrophosphate decarboxylase) interactions and their role in control of cellular proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **302**: 735–742.
- [62] KAUL SC, YAGUCHI T, TAIRA K, REDDEL RR, WADHWA R. Overexpressed mortalin (mot-2)/mthsp70/grp75 and htert cooperate to extend the *in vitro* lifespan of human fibroblasts. *Exp Cell Res* 2003; **286**: 96–101.
- [63] ZYLICZ M, WAWRZYŃÓW A. Insights into the function of hsp70 chaperones. *IUBMB Life* 2001; **51**: 283–287.
- [64] WADHWA R, TAKANOS, KAUR K, AIDA S, YAGUCHI T, KAUL Z, HIRANO T, TAIRA K, KAUL SC. Identification and characterization of molecular interactions between mortalin/mthsp70 and hsp60. *Biochem J* 2005; **391**: 185–190.
- [65] CUI CW, YANG SJ, LIU YP, LIU YF. Interaction between p53 and hsp70 in human hepatocellular carcinoma tissues. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2003; **19**: 195–196.
- [66] KAUL SC, REDDEL RR, MITSUI Y, WADHWA R. An n-terminal region of mot-2 binds to p53 *in vitro*. *Neoplasia* 2001; **3**: 110–114.
- [67] CHINNERY PF, TURNBULL DM. Epidemiology and treatment of mitochondrial disorders. *Am J Med Genet (Semin. Med. Genet.)* 2001; **106**: 94–101.
- [68] POMARA G, CAPPELLO F. Re: Heat shock proteins: Their role in urological tumors – letters to the editor. *J Urol* 2003; **170**: 927–929.
- [69] BARTNIK E, LORENC A, MROCZEK K. Human mitochondria in health, disease, ageing and cancer. *J Appl Genet* 2001; **42**: 65–71.
- [70] RICHLY E, CHINNERY PF, LEISTER D. Evolutionary diversification of mitochondrial proteomes: Implications for human disease. *Trends Genet* 2003; **19**: 356–361.
- [71] PENTA JS, JOHNSON FM, WACHSMAN JT, COPELAND WC. Mitochondrial DNA in human malignancy. *Mutat Res* 2001; **488**: 119–133.

Redaktor prowadzący – Lilla Hryniewiecka

Otrzymano: 08.05.2006 r.

Przyjęto: 12.07.2006 r.

ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

anna.czarnecka@gmail.com





## ROLA REAKTYWNYCH FORM TLENU W PROCESIE ROZWOJU I KIELKOWANIA NASION\*

### FUNCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN SEED DEVELOPMENT AND GERMINATION

Łukasz WOJTYLA, Małgorzata GARNCZARSKA, Lech RATAJCZAK

Zakład Fizjologii Roślin, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Poznań

*Streszczenie:* Reaktywne formy tlenu (RFT) powstają w nasionach nie tylko w wyniku działania czynników stresowych, lecz również w procesach zachodzących w warunkach fizjologicznych. Stwierdzono, że RFT powstają w nasionach na każdym etapie ich rozwoju i kielkowania, tj. podczas rozwoju zarodka, desykcji nasion, starzenia, pęcznienia, mobilizacji substancji zapasowych, jak również w momencie przebiccia łupiny nasiennej przez oś zarodkową. RFT mogą powodować poważne uszkodzenia komórek zarodka podczas wczesnej embriogenezy oraz desykcji, uniemożliwiając wykształcenie prawidłowych nasion. W trakcie długotrwałego przechowywania nasion RFT mogą przyspieszać utratę zdolności kielkowania. RFT mogą także chronić nasiona, a szczególnie kielkujący zarodek, przed atakiem patogenów poprzez tzw. wybuch tlenowy, jaki obserwuje się w momencie przebiccia łupiny nasiennej przez oś zarodkową. W biologii nasion szczególnie istotną funkcję pełnią systemy antyoksydacyjne odpowiedzialne za regulację poziomu RFT i ich usuwanie.

*Słowa kluczowe:* antyoksydanty, enzymy antyoksydacyjne, reaktywne formy tlenu, rozwój i kielkowanie nasion.

*Summary:* Generation of reactive oxygen species (ROS) occurs in seed not only during stress conditions, but also as a result of physiological processes. ROS are produced in seed in all developmental and germination phases like embryogenesis, including desiccation, seed ageing, imbibition, mobilization of storage reserves and germination manifested in radicle protrusion. Increase in ROS level during early embryogenesis and desiccation may lead to serious damage of embryo's cells and disturb developmental processes. ROS generated during prolonged storage may promote the inability of seed to germinate. Reactive oxygen species may also protect seed and particularly the emerging seedling against attack by pathogens by oxidative burst which occurs when the expanding embryo ruptures the seed coat. In seed biology systems responsible for regulation of ROS production and scavenging play a key role.

*Keywords:* antioxidants, antioxidative enzymes, reactive oxygen species, seed development and germination.

\*Praca finansowana w ramach grantu KBN nr 2 PO6R 085 26.

*Skróty:* AOX – oksydaza alternatywna, APX – peroksydaza askorbinianowa, AsA – zredukowany askorbinian, DHA – dehydroaskorbinian, CAT – katalaza, GSSG (*glutathione disulfid*) – dwusiarczek glutationu, GSH – glutation, HSP (*Heat Shock Proteins*) – białka szoku cieplnego, LEA (*Late-Embryogenesis-Abundant*) – białka gromadzące się w czasie późnej embriogenezy, PUMP (*Plant Uncoupling Mitochondrial Protein*) – białko rozprzegające, RFT (*reactive oxygen species – ROS*) – reaktywne formy tlenu, SOD – dysmutaza ponadtlenkowa

## 1. WSTĘP

W cyklu życiowym roślin ważną rolę odgrywa nasienie. Jak definiuje Jankun w Encyklopedii Biologicznej, nasienie to twór charakterystyczny dla roślin nasiennych (*Spermatophyta*), forma przetrwalnikowa, służąca jednocześnie do rozsiewania i rozprzestrzeniania gatunku [23]. Zarówno budowa, jak i skład nasion wykazują istotne różnice w zależności od gatunku. Większość nasion w stanie dojrzałym zawiera bardzo małe ilości wody, często poniżej 10%, jedynie część gatunków (w tym wiele roślin tropikalnych, drzew i roślin wodnych) wykształca nasiona, które zamierają, gdy zawartość wody spadnie w nich poniżej 20% [3, 29, 50]. Ze względu na zawartość wody w dojrzałych nasionach wyróżnia się dwie kategorie nasion. Do tzw. nasion typu „*orthodox*” zalicza się nasiona, które w trakcie rozwoju ulegają silnemu odwodnieniu i zachowują w tym stanie zdolność do kiełkowania nawet przez wiele lat. Typ „*recalcitrant*” obejmuje nasiona, które osiągają dojrzałość w stanie uwodnionym i tracą zdolność do kiełkowania podczas poduszania nawet do stosunkowo wysokiego poziomu wody (20–30%) [43]. Reaktywne formy tlenu (RFT) powstają w nasionach na każdym etapie ich rozwoju i kiełkowania, tj. podczas rozwoju zarodka, w tym jego odwadniania, podczas starzenia nasion, w wyniku pęcznienia, mobilizacji substancji zapasowych, jak również w momencie przebiccia przez oś zarodkową łupiny nasiennej [3, 17, 26, 40, 45, 47]. Istotny wpływ na żywotność nasion mają zdolności antyoksydacyjne zapobiegające gromadzeniu się reaktywnych form tlenu. Nadmiar RFT prowadzi do stresu oksydacyjnego, uszkodzeń komórek i w konsekwencji do zaburzeń procesu kiełkowania, a nawet śmierci zarodka [3, 40, 47, 52]. RFT powodują uszkodzenia struktur wewnętrznych, degradację błon komórkowych, upośledzenie funkcji białek i enzymów, uszkodzenia kwasów nukleinowych oraz działają mutagennie [3, 26, 31]. Prawidłowe działanie systemów antyoksydacyjnych w nasionach jest zatem konieczne do właściwego przebiegu procesu kiełkowania. Proces kiełkowania jest ważnym etapem w życiu rośliny, decydującym o kondycji młodej siewki i wpływającym na dalsze etapy wzrostu i rozwoju. W tym czasie zachodzą istotne zmiany w metabolizmie nasion; z początkowo powolnego, uspionego stanu anabiozy komórki przechodzą do bardzo intensywnego metabolizmu [3].

Ostatnio coraz częściej dyskutowana jest pozytywna rola reaktywnych form tlenu w komórkach roślinnych. Postuluje się ich udział w procesach rozwojowych, w systemach transdukcji sygnału, w ochronie komórek przed atakiem patogenów, modyfikacji ścian komórkowych oraz w rozluźnianiu ich struktury, co ułatwia wzrost komórkom [3, 33, 45]. Rola jaką RFT pełnią w komórkach zależy w dużym stopniu od ich stężenia, dlatego istotny wpływ na prawidłowy przebieg procesów rozwoju i

kiełkowania nasion, a także na zachowanie zdolności do kiełkowania w trakcie przechowywania nasion mają systemy regulujące poziom RFT. Systemy antyoksydacyjne dzielimy na enzymatyczne i nieenzymatyczne. Te pierwsze wykorzystują aktywność takich enzymów, jak: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD EC 1.15.1.1), katalaza (CAT EC 1.11.1.6), a także enzymów zaangażowanych w cykl askorbinianowo-glutationowy: peroksydaza askorbinianowa (APX EC 1.11.1.11), reduktaza monodehydroaskorbinianu (MDHAR EC 1.6.5.4), reduktaza dehydroaskorbinianu (DHAR EC 1.8.5.1) oraz reduktaza glutationu (GR EC 1.6.4.2) [35]. Systemy nieenzymatycznej obrony komórek przed działaniem RFT obejmują głównie niskocząsteczkowe związki antyoksydacyjne rozpuszczalne w wodzie, takie jak: askorbinian i glutation oraz rozpuszczalny w tłuszczach  $\alpha$ -tokoferol [47].

## 2. REAKTYWNE FORMY TLENU W ROZWOJU NASION

### 2.1. Wczesna embriogeneza

W zarodkach niektórych nasion na wczesnych etapach rozwoju zachodzi proces fotosyntezy, będący jednym z głównych źródeł reaktywnych form tlenu w zielonych tkankach roślin. Proces ten jest uznawany za główne źródło tlenu singletowego oraz anionorodnika ponadtlenkowego. Również mitochondrialny łańcuch transportu elektronów jest ważnym źródłem RFT podczas rozwoju nasion, kiedy procesy oddechowe zachodzą z dużą intensywnością [3]. W normalnych warunkach w wyniku tzw. przecieku mitochondrialnego około 1% tlenu zużywanego przez rośliny w procesie oddychania mitochondrialnego ulega niepełnej redukcji stając się źródłem reaktywnych form tlenu, głównie anionorodnika ponadtlenkowego, który w wyniku dysmutacji przekształcani jest do nadtlenu wodoru [34]. Ważnym miejscem powstawania RFT są także peroksyzomy. W organellach tych wytwarzany jest w procesie fotooddychania nadtlenek wodoru oraz anionorodnik ponadtlenkowy w peroksyzomowym łańcuchu przenośników elektronów. Peroksyzomy mają także udział w procesie usuwania RFT. Organelle te zaangażowane są bowiem w cykl askorbinianowo-glutationowy, są także miejscem występowania dysmutazy ponadtlenkowej oraz katalazy uczestniczącej w rozkładzie  $H_2O_2$ . Peroksyzomy są również źródłem tlenu azotu, cząsteczki sygnałnej, która uczestniczy między innymi w procesach obrony komórki przed działaniem czynników stresowych, a ponadto moduluje odpowiedź komórkowego systemu antyoksydacyjnego [8, 18, 24]. W komórkach roślinnych źródłem reaktywnych form tlenu są także oksydazy NADPH, pH-zależne peroksydazy ściany komórkowej oraz aminooksydazy apoplastowe [1, 3, 7, 30, 32]. Ich znaczenie w biologii nasion nie zostało jeszcze w pełni poznane i wymaga dalszych badań w celu scharakteryzowania ich roli w trakcie procesu rozwoju i kiełkowania nasion.

Powstające podczas embriogenezy reaktywne formy tlenu, w tym także  $H_2O_2$ , mogą pełnić istotną rolę w prawidłowym rozwoju nasienia. Zmiany stężenia  $H_2O_2$  wpływają na poziom ekspresji niektórych genów. Stwierdzono że, w komórkach rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) wystawionych na działanie podwyższonego stężenia  $H_2O_2$  zmianie uległ poziom ekspresji 175 genów, z których część stanowiły geny kodujące enzymy uczestniczące w procesach obrony komórek przed RFT [10]. Istotną rolę w procesie embriogenezy pełni askorbinian (AsA). W początkowych etapach rozwoju zarodka, kiedy brak mu zdolności do samodzielnej syntezy, askorbinian jest w całości dostarczany przez roślinę mateczną [2]. AsA pełni ważną rolę w cyklu komórkowym poprzez pobudzanie i kontrolę podziałów komórek merystematycznych [9, 38]. W trakcie rozwoju nasion typu „*orthodox*” zawartość askorbinianu stopniowo spada, wzrasta natomiast stężenie dehydroaskorbinianu (DHA). Równocześnie spada także aktywność peroksydazy askorbinianowej [51].

## 2.2. Desykcja

Szkodliwe działanie reaktywnych form tlenu na nasiona ma miejsce w trakcie ich desykcji i przechodzenia w stan anabiozy. Nasiona, które osiągnęły dojrzałość, nie prowadzą fotosyntezy, są w stanie silnego odwodnienia i ich metabolizm jest znacznie spowolniony. Proces desykcji jest naturalnym etapem rozwoju nasion typu „*orthodox*”, w wyniku którego mogą one poprzez ograniczenie metabolizmu przetrwać długi okres w niekorzystnych warunkach, zachowując zdolność do kiełkowania. Najważniejszym źródłem RFT w dojrzałych nasionach jest mitochondrialny łańcuch transportu elektronów [3]. Spadek zawartości wody poniżej 0,25 g na gram suchej masy nasion ogranicza do minimum proces oddychania mitochondrialnego. Prawdopodobnie jest to także skuteczny sposób zmniejszenia produkcji RFT przez mitochondria [3, 4]. Nasiona typu „*orthodox*” charakteryzują się wysoką odpornością na odwodnienie poprzez unikanie negatywnych skutków działania RFT. Nasiona wrażliwe na wysuszenie („*recalcitrant*”) wraz z utratą wody tracą swoją żywotność. Dodatkowo obserwuje się w nich szereg objawów stresu oksydacyjnego, takie jak: zwiększenie stężenia tiobarbituranów, uwalnianie etanu i akumulację stabilnych form rodników organicznych [12, 21]. Uszkodzenia spowodowane deficytem wody w komórkach nasion typu „*recalcitrant*” przypisuje się zwiększonej produkcji RFT w połączeniu z obniżeniem zdolności antyoksydacyjnej systemów ochronnych [28].

Nasiona wykształciły mechanizmy obrony antyoksydacyjnej na stres oksydacyjny spowodowany deficytem wody polegające na regulacji aktywności enzymów odpowiedzialnych za usuwanie RFT, jak również na zmianach stężenia cząsteczek o właściwościach przeciwutleniających [5, 28]. Suche nasiona typu „*orthodox*”, w odróżnieniu od nasion typu „*recalcitrant*” charakteryzują się niską zawartością lub brakiem askorbinianu (AsA). Stwierdzono w nich również brak aktywności APX [51]. Istnieje również grupa nasion, które pomimo silnego odwodnienia nie są w pełni pozbawione AsA i aktywności peroksydazy askorbinianowej. Ilustrują to wyniki uzyskane w przypadku nasion buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica*), co sugeruje pośredni charakter tych nasion [40]. Głównym związkami o charakterze antyoksydacyjnym w suchych nasionach jest glutation [9, 26]. W suchych nasionach grochu (*Pisum sativum*) obserwuje się szczególnie

wysoki poziom glutationu i to zarówno jego formy zredukowanej GSH, jak i utlenionej GSSG, jednak w porównaniu ze świeżymi tkankami forma disulfidowa stanowi większy procent całkowitego glutationu [27, 52, 55]. Oprócz funkcji antyoksydacyjnej, glutation, a dokładniej stosunek GSH/GSSG, reguluje syntezę białek i wpływa na aktywność enzymów poprzez reakcje z grupami cysteinowymi białek [52]. Glutation uczestniczy także w regulacji cyklu komórkowego [38]. W suchych, dojrzałych nasionach typu „*orthodox*” obserwuje się również wysoką aktywność reduktazy glutationowej [4, 27]. Innym ważnym elementem przystosowującym nasiona do stanu silnego odwodnienia jest wzrost stężenia rozpuszczalnych cukrów w tkankach [4, 19, 39, 41]. Podobny mechanizm zaobserwowano także u roślin rezurekcyjnych („zmartwychwstających”) i porostów [22, 26]. Proces odwodnienia nasion jest związany z powstawaniem wolnych rodników i reaktywnych form tlenu. Mechanizm ich powstawania oraz aktywacji systemu antyoksydacyjnego został dokładnie opisany dla nasion typu „*recalcitrant*” poddanych odwodnieniu w warunkach laboratoryjnych [28]. Niewiele prac poświęcono roli systemu antyoksydacyjnego w nabywaniu tolerancji na desykcję podczas rozwoju nasion *in planta*. Zmiana aktywności enzymów antyoksydacyjnych zachodząca podczas dojrzewania nasion i stopniowej utraty wody wydaje się być sposobem ich przystosowania do obrony przed RFT w warunkach silnego odwodnienia. Stwierdzono, że w trakcie dojrzewania nasion niewrażliwych na desykcję spada aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, co może prowadzić do akumulacji anionorodnika ponadtlenkowego oraz wzrasta stężenie  $H_2O_2$  w tkankach zarodka [4]. Równocześnie wzrasta aktywność katalazy i spada aktywność peroksydazy askorbinianowej. W trakcie desykcji następuje stopniowe obniżenie zawartości  $H_2O_2$ , co sugeruje rolę CAT w usuwaniu nadtlenu wodoru [5]. Regulacja ekspresji form izoenzymatycznych CAT badana była w trakcie rozwoju ziaren kukurydzy. W badaniach tych wykazano czasowo i przestrzennie zróżnicowaną ekspresję różnych form katalaz [44].

Silnemu odwodnieniu nasion towarzyszy wiele komórkowych i biochemicznych przemian. Zalicza się do nich modyfikacje ultrastruktury komórkowej, takie jak waskularyzacja oraz syntezę białek LEA (*Late-Embryogenesis-Abundant*), białek szoku cieplnego (HSP – *Heat Shock Proteins*), aktywację systemów antyoksydacyjnych oraz akumulację oligosacharydów [4]. Synteza białek zaliczanych do grupy LEA (należą do nich również dehydryny) rozpoczyna się wraz z początkiem procesu desykcji. Dominującymi cząsteczkami mRNA występującymi w nasionach w stanie odwodnionym są mRNA kodujące białka LEA. Ich synteza spada stopniowo już po kilku godzinach od momentu, kiedy suche nasiona zaczynają pobierać wodę w procesie pęcznienia [22, 50]. Dehydryny, białka zaliczane do klasy 2 białek LEA, mogą być zaangażowane w proces usuwania RFT [3]. Ze względu na silnie hydrofilowy charakter białek LEA postuluje się ich udział w wiązaniu wody, co zapewnia minimalną jej ilość, niezbędną do przeżycia [22]. Odwodnienie nasion prowadzi do ograniczenia metabolizmu i zmniejszenia zużycia tlenu, nie powoduje to jednak całkowitego zatrzymania procesów metabolicznych. W celu podtrzymania metabolizmu i produkcji ATP nasiona stopniowo przechodzą na szlak oddychania beztlenowego. Aktywację torów fermentacyjnych obserwowano przy spadku zawartości wody poniżej 0,6 g na gram świeżej masy tkanki

[28], jednak aktywność dehydrogenazy alkoholowej ujawniała się już na wczesnych etapach rozwoju zarodka [15, 20].

### 2.3. Starzenie się nasion

Reaktywne formy tlenu mogą spowodować utratę przez nasiona zdolności do kiełkowania w trakcie ich długotrwałego przechowywania. Akumulacja RFT w trakcie spoczynku nasion uznawana jest za jedną z głównych przyczyn ich starzenia. RFT mogą albo reagować bezpośrednio ze składnikami komórek, powodując ich uszkodzenia, albo zostać związane w strukturach wewnątrzkomórkowych [3].

Jak już wspomniano powyżej, dojrzałe nasiona typu „*orthodox*” zawierają bardzo małe ilości wody, ale nawet bardzo niskie stężenia wody mogą podtrzymywać przebieg nieenzymatycznych procesów samoutleniania się niektórych związków, głównie lipidowych, prowadzących do powstawania wolnych rodników [53]. Powstające w tych procesach wolne rodniki mogą kumulować się w tkankach powodując ich uszkodzenia i obniżając żywotność nasion, głównie w wyniku peroksydacji lipidów. Prowadzi to do zmian w strukturze wielonienasyconych kwasów tłuszczowych obecnych w błonach komórkowych oraz w ciałach tłuszczowych nasion oleistych. Reakcje tego typu są prawdopodobnie głównym źródłem RFT w dojrzałych, suchych nasionach [3, 26]. W komórkach w stanie silnie odwodnionym aktywność enzymatyczna jest bardzo ograniczona. Również enzymy antyoksydacyjne nie są w stanie w pełni uczestniczyć w procesach obrony komórek przed działaniem RFT, dlatego funkcje ochronne pełnią wówczas niskocząsteczkowe antyoksydanty. Również warunki przechowywania nasion, takie jak: temperatura i wilgotność powietrza, mają wpływ na powstawanie RFT i aktywność enzymów antyoksydacyjnych [3, 40].

## 3. ROLA REAKTYWNYCH FORM TLENU PODCZAS KIEŁKOWANIA NASION

### 3.1. Pęcznienie

Proces pęcznienia jest pierwszym etapem kiełkowania nasion. Kiełkowanie można podzielić na trzy główne fazy. Początkowa faza charakteryzuje się gwałtownym pobieraniem wody przez nasiona, w wyniku czego szybko wzrasta masa nasion oraz zużycie tlenu przez nasiona. Faza druga określana jest jako metaboliczne plateau, jednak w tym okresie rozpoczyna się synteza kwasów nukleinowych i białek, przygotowując oś zarodkową do wzrostu. Ostatnia trzecia faza kiełkowania jest etapem charakteryzującym się ponownym wzmożonym poborem wody i tlenu przez nasiona i związana jest z wydostaniem się osi zarodkowej na zewnątrz okrywy nasiennej. Moment ten powszechnie uważa się za zakończenie procesu kiełkowania [3, 6, 17, 48]. W niektórych przypadkach, zwłaszcza w rolnictwie, za zakończenie kiełkowania uznaje się ukazanie się liścieni lub pierwszego liścia, a czasem uzyskanie przez siewkę autotrofii [29].

Intensywne pobieranie wody podczas pęcznienia suchych nasion może powodować uszkodzenia związane z gwałtownym wzrostem stężenia wody, wpływające na obniżenie efektywności kiełkowania, a nawet prowadzące do utraty tej zdolności przez część nasion. Na negatywne skutki pęcznienia narażone są głównie nasiona przechowywane przez długi czas w stanie silnie odwodnionym [48]. Podczas procesu pęcznienia następuje powrót do intensywnego metabolizmu. Również ponowne wejście na tor fosforylacji oksydacyjnej jest źródłem RFT. Istotnym źródłem RFT w pęczniących i kiełkujących nasionach mogą być uwalniane w wyniku pęcznienia i mobilizacji substancji zapasowych rodniki związane przez gromadzone w trakcie dojrzewania nasion związki [3].

### 3.2. Przebicie okrywy nasiennej

Moment przebicia okrywy nasiennej przez oś zarodkową jest najbardziej widocznym symptomem kiełkowania i rozpoczęcia wzrostu. Proces przebicia okrywy nasiennej tłumaczą trzy różne koncepcje. Pierwsza z możliwości zakłada, że początkowe etapy wzrostu osi zarodkowej są wynikiem wzrostu turgoru komórek. Pod koniec kiełkowania potencjał osmotyczny w komórkach osi zarodkowej staje się bardziej ujemny na skutek wzrostu stężenia substancji osmotycznie czynnych pochodzących z hydrolizy materiałów zapasowych zgromadzonych w komórkach osi zarodka. Prowadzi to do zwiększonego pobierania wody przez komórki i wzrostu ich objętości [6]. Według drugiej koncepcji wzrost elongacyjny komórek osi zarodkowej jest możliwy dzięki rozluźnieniu struktury ścian komórkowych i zwiększeniu ich rozciągliwości. Trzecia możliwość zakłada rozluźnienie struktur okrywy nasiennej ułatwiające przebicie osi zarodkowej na zewnątrz. Wzrost osi zachodzi przez wydłużanie się komórek spowodowane działaniem potencjału ciśnienia, który w sytuacji, kiedy wzrost komórek nie jest ograniczony poprzez otaczające struktury, jest wystarczająco wysoki [6].

Przebicie okrywy nasiennej zmienia w sposób istotny warunki, w jakich rozwija się kiełkujące nasienie. W początkowych etapach kiełkowania nasiona narażone są na stan przejściowej anaerobiozy będący wynikiem słabej przepuszczalności okrywy nasiennej dla gazów, następuje wówczas aktywacja torów fermentacyjnych [15]. Warunki te charakterystyczne są dla stanu hipoksji. Podczas hipoksji zmniejsza się wydajność mechanizmów antyoksydacyjnych [7]. Pęknięcie okrywy nasiennej i wydostanie się osi zarodkowej na zewnątrz zwiększa dopływ tlenu do komórek. Towarzyszy temu intensywny wzrost stężenia RFT określanego jako tzw. wybuch tlenowy. Obecnie postuluje się, że RFT mogą być główną przyczyną zamierania skiełkowanych nasion, które po okresie hipoksji eksponowane są na warunki tlenowe [13, 14]. RFT powstają w tym okresie głównie w mitochondriach, co jest wynikiem wzmożonej aktywności oddechowej tkanek spowodowanej zwiększoną dostępnością tlenu. Wykazano, że w nasionach grochu i łubinu wzrasta poziom wolnych rodników pochodzenia semichinonowego w momencie przebicia okrywy nasiennej przez oś zarodkową [16, 55]. Wzrost stężenia  $H_2O_2$  zaobserwowano między innymi podczas kiełkowania nasion łubinu [16], soi [17] i rzodkiewki [45]. Procesowi kiełkowania towarzyszył także wzrost poziomu rodnika hydroksylogowego i anionorodnika ponadtlenkowego [17, 45]. Sugeruje się, że głównym miejscem wytwarzania RFT w trakcie kiełkowania są: oś zarodkowa, okrywa

nasienna i warstwa aleuronowa [3, 17]. Zjawisko zwiększonej produkcji RFT zaobserwowano u roślin również w sytuacji kontaktu komórek z patogenem lub cząsteczką elisytora [54]. Schopfer i wsp. [45] wykazali gwałtowny wzrost stężenia RFT w kiełkujących nasionach rzodkiewki (*Raphanus sativus*) na krótko przed przebicciem przez oś zarodkową okrywy nasiennej i to nie tylko w tkankach, ale również w środowisku otaczającym kiełkujące nasienie. Autorzy ci postulują udział RFT w procesach obronnych przed atakiem patogenów w trakcie kiełkowania nasion. RFT uczestniczą również w procesie depozycji lignin i rozluźnieniu struktury ściany komórkowej, co ułatwia wzrost elongacyjny komórkom osi zarodkowej [3]. Stwierdzono także udział RFT w programowanej śmierci komórek warstwy aleuronowej w ziarniakach jęczmienia (*Hordeum vulgare*) w trakcie ich kiełkowania [11].

Doniesienia literaturowe z ostatnich lat wskazują na udział oksydazy alternatywnej (AOX) i białka rozprzegającego PUMP (*Plant Uncoupling Mitochondrial Protein*) w obronie komórek roślinnych przed RFT, ale dotychczas brak danych potwierdzających ich rolę w obronie przed RFT wytwarzanymi w procesach rozwoju i kiełkowania nasion [25, 49]. Większość badań poświęconych mechanizmom obrony antyoksydacyjnej uruchamianym podczas kiełkowania nasion dotyczy roli enzymów i metabolitów cyklu askorbinianowo-glutationowego. W trakcie kiełkowania obserwuje się wzrost zawartości askorbinianu. W początkowym okresie pęcznienia tłumaczy się to wzrostem aktywności reduktazy dehydroaskorbinianu, która uczestniczy w przekształcaniu DHA do askorbinianu. Gwałtowny wzrost stężenia askorbinianu w kiełkującym zarodku następuje dopiero po aktywacji szlaków biosyntezy AsA, zwłaszcza w momencie przebiccia przez oś zarodkową łupiny nasiennej [16, 36, 37, 55]. Zmianie ulega również stężenie innych substancji niskocząsteczkowych mających zdolności antyoksydacyjne między innymi  $\alpha$ -tokoferolu i  $\gamma$ -tokoferolu [46, 47]. Innym miejscem powstawania RFT są glioksysomy, będące funkcjonalną klasą peroksysomów, których główną funkcją jest katabolizm kwasów tłuszczowych. Uczestniczą one w produkcji RFT w procesie  $\beta$ -oksydacji lipidów katalizowanym przez oksydazę acylo-CoA, jak również w cyklu glioksalowym [42]. Procesy te są znaczącym źródłem RFT szczególnie w nasionach oleistych.

## PODSUMOWANIE

Nie ulega wątpliwości, że reaktywne formy tlenu pełnią istotną funkcję w biologii nasion. Pojawiają się we wszystkich stadiach życia nasion począwszy od rozwoju aż po kiełkowanie. Wytwarzanie RFT towarzyszy dramatycznym zmianom uwodnienia i aktywności metabolicznej nasion. Ostatnie lata przyniosły znaczący postęp w badaniach zarówno nad rolą RFT w fizjologii nasion, jak i systemami antyoksydacyjnymi aktywowanymi na poszczególnych etapach życia nasion. Pomimo nasilenia tych badań wiele kwestii pozostaje niewyjaśnionych. Zbyt mało jeszcze wiadomo na temat roli RFT w procesie kiełkowania. Nie mniej jednak wydaje się już niemal pewne, że wzmózonej produkcji reaktywnych form tlenu nie należy rozpatrywać wyłącznie w



kategoriach stresu oksydacyjnego, lecz jako przejaw aktywności biologicznej nasion znajdującej się pod kontrolą rozwojową. Poznanie mechanizmów leżących u podstaw oddziaływania reaktywnych form tlenu z hormonami dostarczy nowych danych na temat nabywania tolerancji na desykcję oraz przełamывania spoczynku nasion.

## LITERATURA

- [1] APEL K, HIRT H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 2004; **55**: 373–399.
- [2] ARRIGONI O, DE GARA L, TOMMASI F, LISO R. Changes in the ascorbate system during seed development of *Vicia faba* L. *Plant Physiol* 1992; **99**: 235–238.
- [3] BAILLY C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci Res* 2004; **14**: 93–107.
- [4] BAILLY C, AUDIGIER C, LADONNE F, WAGNER MH, COSTE F, CORBINEAU F, CÔME D. Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. *J Exp Bot* 2001; **52**: 701–708.
- [5] BAILLY C, LEYMARIE J, LEHNER A, ROUSSEAU S, CÔME D, CORBINEAU F. Catalase activity and expression in developing sunflower seeds as related to drying. *J Exp Bot* 2004; **55**: 475–483.
- [6] BEWLEY JD. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 1997; **9**: 1055–1066.
- [7] BLOKHINA O, VIROLAINEN E, FAGERSTEDT KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot* 2003; **91**: 179–194.
- [8] CORPAS FJ, BARROSO JB, DEL RIO LA. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trend Plant Sci* 2001; **6**: 145–150.
- [9] DE TULLIO MC, ARRIGONI O. The ascorbic acid system in seeds: to protect and to serve. *Seed Sci Res* 2003; **13**: 249–260.
- [10] DESIKAN R, A-H MACKERNESS S, HANCOCK JT, NEILL SJ. Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol* 2001; **127**: 159–172.
- [11] FATH A, BETHKE P, BELIGNI V, JONES R. Active oxygen and cell death in cereal aleurone cells. *J Exp Bot* 2002; **53**: 1273–1282.
- [12] FINCH-SAVAGE WE, BLAKE PS, CLAY HA. Desiccation stress in recalcitrant *Quercus robur* L. seeds results in lipid peroxidation and increased synthesis of jasmonates and abscisic acid. *J Exp Bot* 1996; **47**: 661–667.
- [13] GARNCZARSKA M, BEDNARSKI W. Effect of a short-term hypoxic treatment followed by re-aeration on free radicals level and antioxidative enzymes in lupine roots. *Plant Physiol Biochem* 2004; **42**: 233–240.
- [14] GARNCZARSKA M, BEDNARSKI W, MORKUNAS I. Re-aeration – induced oxidative stress and antioxidative defenses in hypoxically pretreated lupine roots. *J Plant Sci* 2004; **161**: 415–422.
- [15] GARNCZARSKA M, RATAJCZAK L. Changes in the activity and isozyme patterns of alcohol dehydrogenase in developing and germinating seeds of yellow lupine. *Acta Physiol Plant* 1993; **15**: 257–261.
- [16] GARNCZARSKA M, WOJTYLA L, BEDNARSKI W, ZALEWSKI T, JURGA S. Characterization of germinating lupine seeds by NMR imaging and EPR spectroscopy. *Biol Lett* 2005; **42**: 157.
- [17] GIDROL X, LIN WS, DÉGOUSSÉ N, YIP SF, KUSH A. Accumulation of reactive oxygen species and oxidation of cytokinin in germinating soybean seeds. *Eur J Biochem* 1994; **224**: 21–28.
- [18] GNIAZDOWSKA A. Rola tlenu azotu w metabolizmie komórki roślinnej. *Kosmos* 2004; **53**: 343–353.
- [19] GÓRECKI RJ, LAHUTA JB, HENDLY CL, JONES AD. Soluble sugars in maturing pea seeds of different isolines in relation to desiccation tolerance. W: BLACK M, BRADFORD KJ, VASQUEZ-RAMOS J [red.] *Seed Biology: Advances and Applications. CAB International* 2000: 67–74.
- [20] GÓRECKI RJ, PIOTROWICZ-CIEŚLAK A. Anaerobic respiration during yellow lupine seeds maturation. W: CÔME D, CORBINEAU F [red.] *Proceedings of the Fourth International Workshop on seeds. Basic and Applied Aspects of seed Biology. ASFIS, Paris* 1993: 73–79.
- [21] HENDRY GAF, FINCH-SAVAGE WE, THORPE PC, ATHERTON NM, BUCKLAND SM, NILSSON KA, SEEL WE. Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L. *New Phytol* 1992; **122**: 273–279.

- [22] INGRAM J, BARTELS D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1996; **47**: 377–403.
- [23] JANKUN A. Nasienie. W: Encyklopedia Biologiczna. Agencja Publicystyczno-Wydawnicza Opres Kraków 1998; VII: 146.
- [24] JIMÉNEZ A, HERNÁNDEZ JA, DEL RIO LA, SEVILLA F. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol* 1997; **114**: 275–284.
- [25] JUSZCZUK IM, RYCHTER AM. Alternative oxidase in higher plants. *Acta Biochim Pol* 2003; **50**: 1257–1271.
- [26] KRANNER I, BIRTIĆ S. A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. *Integr Comp Biol* 2005; **45**: 734–740.
- [27] KRANNER I, GRILL D. Content of low-molecular-weight thiols during the imbibition of pea seeds. *Physiol Plant* 1993; **88**: 557–562.
- [28] LEPRINCE O, BUITINK J, HOEKSTRA FA. Axes and cotyledons of recalcitrant seeds of *Castanea sativa* Mill. exhibit contrasting responses of respiration to drying in relation to desiccation sensitivity. *J Exp Bot* 1999; **50**: 1515–1524.
- [29] LEWAK S. Kielkowanie nasion. W: KOPCEWICZ J, LEWAK S [red.] Fizjologia roślin. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002: 485–497.
- [30] MAŁECKA A, TOMASZEWSKA B. Reaktywne formy tlenu w komórkach roślinnych i enzymatyczne systemy obronne. *Post Biol Kom* 2005; **32**: 311–325.
- [31] MANCINI A, BUSCHINI A, RESTIVO FM, ROSSI C, POLI P. Oxidative stress as DNA damage in different transgenic tobacco plants. *Plant Sci* 2006; **170**: 845–852.
- [32] MITTLER R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 2002; **7**: 405–410.
- [33] MITTLER R, VANDERAUWERA S, GOLLERY M, VAN BREUSEGEM F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 2004; **9**: 490–498.
- [34] MØLLER IM. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 2001; **52**: 561–591.
- [35] NOCTOR G, FOYER CH. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1998; **49**: 249–279.
- [36] PALLANCA JE, SMIRNOFF N. Ascorbic acid metabolism in pea seedlings. A comparison of D-glucosone, L-sorbosone, and L-galactono-1,4-lactone as ascorbate precursors. *Plant Physiol* 1999; **120**: 453–461.
- [37] PALLANCA JE, SMIRNOFF N. The control of ascorbic acid synthesis and turnover in pea seedlings. *J Exp Bot* 2000; **51**: 669–674.
- [38] POTTERS G, DE GARA L, ASARD H, HOREMANS N. Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiol Biochem* 2002; **40**: 537–548.
- [39] PUKACKA S, PUKACKI PM. Changes in soluble sugars in relation to desiccation tolerance and effect of dehydration on freezing characteristics of *Acer platanoides* and *Acer pseudoplatanus* seeds. *Acta Physiol Plant* 1997; **19**: 147–154.
- [40] PUKACKA S, RATAJCZAK E. Production and scavenging of reactive oxygen species in *Fagus sylvatica* seeds during storage at varied temperature and humidity. *J Plant Physiol* 2005; **162**: 873–885.
- [41] PUKACKA S, WÓJKIEWICZ E. Carbohydrate metabolism in Norway maple and sycamore seeds in relation to desiccation tolerance. *J Plant Physiol* 2002; **159**: 273–279.
- [42] RATAJCZAK L. Peroksysony. W: WOŹNY A, MICHEJDA J, RATAJCZAK L [red.] Podstawy biologii komórki roślinnej. Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań 2001: 411–430.
- [43] ROBERTS EH. Predicting the storage life of seeds. *Seed Sci Technol* 1973; **1**: 163–169.
- [44] SCANDALIOS JG, GUAN L, POLIDOROS AN. Catalases in plants: gene structure, properties, regulation and expression. W: SCANDALIOS JG [red.] Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1997: 343–406.
- [45] SCHOPFER P, PLACHY C, FRAHRY G. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. *Plant Physiol* 2001; **125**: 1591–1602.
- [46] SIMONTACCHI M, CARO A, FRAGA CG, PUNTARULO S. Oxidative stress affects  $\alpha$ -tocopherol content in soybean embryonic axes upon imbibition and following germination. *Plant Physiol* 1993; **103**: 949–953.
- [47] SIMONTACCHI M, SADOVSKY L, PUNTARULO S. Profile of antioxidant content upon developing of *Sorghum bicolor* seeds. *Plant Sci* 2003; **164**: 709–715.
- [48] SIVRITEPE HO, DOURADO AM. The effect of seed moisture content and viability on the susceptibility of pea seeds to soaking injury. *Scientia Horticulturae* 1995; **61**: 185–191.

- [49] SLUSE FE, ALMEIDA AM, JARMUSZKIEWICZ W, VERCESI AE. Free fatty acids regulate the uncoupling protein and alternative oxidase activities in plant mitochondria. *FEBS Lett* 1998; **433**: 237–240.
- [50] SOEDA Y, KONINGS MCJM, VORST O, VAN HOUWELINGEN AMML, STOOPEN GM, MALIEPARDCA, KODDE J, BINORJ, GROOT SPC, VAN DER GEEST AHM. Gene expression programs during *Brassica oleracea* seed maturation, osmopriming, and germination are indicators of progression of the germination process and the stress tolerance level. *Plant Physiol* 2005; **137**: 354–368.
- [51] TOMMASI F, PACIOLLA C, ARRIGONI O. The ascorbate system in recalcitrant and orthodox seeds. *Physiol Plant* 1999; **105**: 193–198.
- [52] TOMMASI F, PACIOLLA C, DE PINTO MC, DE GARA L. A comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea* L. seeds. *J Exp Bot* 2001; **52**: 1647–1654.
- [53] WALTERS C. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. *Seed Sci Res* 1998; **8**: 223–244.
- [54] WOJTASZEK P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J* 1997; **322**: 681–692.
- [55] WOJTYLA Ł, BEDNARSKI W, GARNCZARSKA M. Free radicals level and profile of antioxidants in germinating pea seeds. *Biol Lett* 2005; **42**: 129–130.

*Redaktor prowadzący – Maria Olszewska*

*Otrzymano: 31.05. 2006 r.*

*Przyjęto: 10.07. 2006 r.*

*Al. Niepodległości 14, 61-713 Poznań*

*e-mail: garnczar@amu.edu.pl*



## GENETYCZNA I MOLEKULARNA CHARAKTERYSTYKA MIKROSPOROGENEZY U ROŚLIN OKRYTONASIENNYCH

GENETIC AND MOLECULAR CHARACTERIZATION  
OF MICROSPOROGENESIS IN ANGIOSPERMS

Krzysztof ZIENKIEWICZ, Elżbieta BEDNARSKA

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

**Streszczenie:** Mejoza jest procesem o ogromnym znaczeniu dla rozwoju i ciągłości życia na Ziemi. U znakomitej większości organizmów żywych powstałe w wyniku mejozy komórki bezpośrednio zaangażowane są w procesy rozmnażania płciowego. Intensywny rozwój technik biologii molekularnej pozwolił na identyfikację licznych genów zaangażowanych w podział mejotyczny. Modelowe organizmy wykorzystywane w tych badaniach to przede wszystkim drożdże oraz *Caenorhabditis elegans*. Ostatnie lata przyniosły też szereg informacji dotyczących genetycznej i molekularnej regulacji mejozy u roślin, głównie u *Arabidopsis thaliana*. Molekularne podłoże mejozy u roślin, z uwagi na lepszą dostępność materiału i łatwość obserwacji fenotypowych efektów mutacji, prowadzone są przede wszystkim na komórkach męskiej linii generatywnej, tj. podczas mikrosporoogenezy. Okazało się, że większość znanych z badań u drożdży genów zaangażowanych w takie etapy podziału mejotycznego, jak: koniugacja chromosomów homologicznych czy *crossing-over*, ma swoje homologii u roślin. Wskazuje to na wysoki stopień uniwersalności molekularnych mechanizmów mejozy w komórkach eukariotycznych. Praca stanowi kompilację aktualnych wiadomości na temat genetycznej i molekularnej kontroli mikrosporoogenezy u roślin okrytonasiennych, które przedstawiono na tle informacji znanych z badań u innych organizmów, w tym szczególnie u drożdży.

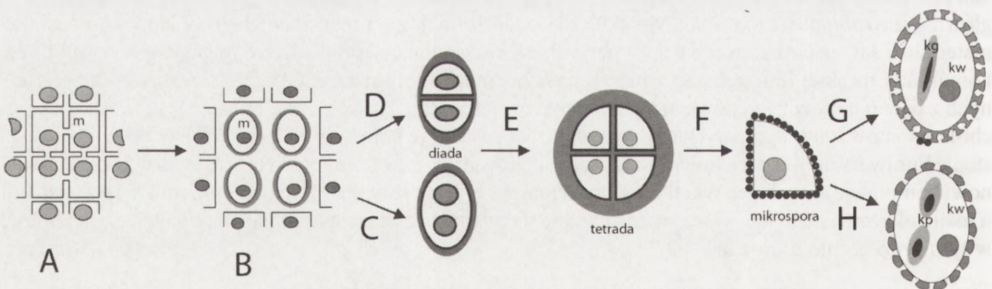
**Słowa kluczowe:** mejoza, mikrosporoogeneza, *crossing-over*, cytokineza.

**Abstract:** Meiosis is a process which have a great weight for development and continuity of life on Earth. In a great majority of organisms the cells which are made during meiosis are directly involved in sex reproduction processes. High development of molecular biology techniques makes possible an identification of numerous genes involved in meiotic division. Model organisms in these research in the first place are yeasts and *Caenorhabditis elegans*. The last years bring also many informations about genetic and molecular regulation of meiosis in plants, mainly in *Arabidopsis thaliana*. Molecular basis of meiosis in plants, because of better accessibility of the biological material and easiness of observations of the mutation phenotypical effects, is studied mainly in the male generative cells line, i.e. during microsporoogenesis. It was shown that the majority of genes known from research on yeasts which are involved in such

steps of meiotic division as homologue chromosomes conjugation or crossing-over has the homologues in plants. This indicate that there is a high degree of universality of meiosis molecular mechanisms in eucariotic cells. This work is a compilation of actual informations about genetic and molecular controll of microsporogenesis in angiosperms, which are presented in the background of the results from studies on different organisms, especially in yeasts.

**Key words:** meiosis, microsporogenesis, crossing-over, cytokinesis.

Kluczowym etapem w rozwoju zarówno męskiego, jak i żeńskiego gametofitu roślin okrytonasiennych jest podział mejotyczny, w wyniku którego powstaje haploidalne pokolenie komórek bezpośrednio zaangażowanych w rozmnażanie płciowe. Cytologiczne aspekty mejozy u roślin okrytonasiennych od dawna były przedmiotem badań biologów komórki oraz botaników i zostały dobrze poznane u wielu gatunków. Niezwykle intensywny rozwój technik biologii molekularnej w ostatnich latach przyczynił się do poznania i charakterystyki wielu genów kontrolujących proces mejozy. Dzięki temu zidentyfikowano także liczne mutanty roślinne charakteryzujące się zaburzeniami w przebiegu mejozy. Modelową rośliną wykorzystywaną w tych badaniach, z uwagi na łatwość manipulacji genetycznych i powszechne zastosowanie w badaniach molekularnych, jest *Arabidopsis thaliana* (L.). Tradycyjnie geny, których mutacja objawia się zaburzeniami przebiegu któregośkolwiek ze stadiów mejozy zarówno w linii męskiej (mikrosporogeneza), jak i żeńskiej (megasporogeneza), przyjęto określać mianem genów mejotycznych. Natomiast geny, które kontrolują prawidłowy przebieg tylko mikrosporogenezy oraz rozwoju pyłku, nazywane są genami męskosterylnymi. Znaczna większość prac dotyczących genów mejotycznych, z uwagi na lepszą dostępność materiału i łatwość obserwacji fenotypowych efektów mutacji, prowadzona jest na komórkach męskiej linii generatywnej. W związku z tym w niniejszej pracy informacje dotyczące grupy genów mejotycznych ujęte zostały głównie w aspekcie ich aktywności podczas mikrosporogenezy.



RYCINA 1. Przebieg mikrosporogenezy (mejozy pylnikowej) u roślin okrytonasiennych. A. Wczesna I profaza mejotyczna – mikrosporocyty (m) połączone szerokimi kanałami cytoplazmatycznymi. B. Pod koniec I profazy wokół mikrosporocytów syntetyzowana jest ściana kalozowa. C-D. Po I podziale mejotycznym powstaje diada nieprzedzielona ścianą komórkową (C), lub zbudowana z dwu komórek oddzielonych ścianą kalozową (D). E. Po drugim podziale mejotycznym wytwarzane są 4 zredukowane mikrospory oddzielone ścianą kalozową syntetyzowaną sukcesywnie (D-E) lub równocześnie (D-E). F. Po enzymatycznej lizie ściany kalozowej uwalniane są mikrospory, które różnicują się w dwukomórkowe (G) lub trójkomórkowe (H) ziarna pyłkowe (kg – komórka generatywna, kw – komórka wegetatywna, kp – komórki plemnikowe)

Przebieg mejozy pylnikowej jest zasadniczo wspólny dla większości roślin okrytonasiennych i nie odbiega od typowego redukcyjnego podziału mikrosporocytów (ryc. 1). Mikrosporoogeneza u roślin dzikiego typu charakteryzuje się wysokim stopniem synchroniczności, która możliwa jest dzięki licznym kanałom cytoplazmatycznym łączącym mikrosporocyty podczas wczesnych etapów podziału. Podczas dalszego przebiegu mejozy mikrosporocyty izolują się od siebie za pomocą ściany kalozowej, która oddziela także powstałe po mejozie 4 haploidalne mikrospory. Po rozpadzie ściany kalozowej z mikrospor rozwijają się dwu- lub trójkomórkowe ziarna pyłkowe. Praca stanowi kompilację aktualnych wiadomości dotyczących genetycznej kontroli mikrosporoogenezy u roślin okrytonasiennych, które przedstawiono na tle informacji znanych z badań u innych organizmów, w tym szczególnie u drożdży (tab I).

## 1. KOHEZJA SIOSTRZANYCH CHROMATYD

Jednym z etapów przygotowania do podziału komórkowego jest replikacja materiału genetycznego, która zachodzi w fazie S interfazy. W przypadku cyklu redukcyjnego nowopowstałe chromatydy siostrzane pozostają połączone ze sobą aż do anafazy II podziału mejotycznego. Trwałe połączenie obu chromatyd możliwe jest dzięki ich interakcji z wielkocząsteczkowym kompleksem specyficznych białek – kohezyn. Jak dotąd opisano dwa mutanty *Arabidopsis*, które wykazywały zaburzenia w przestrzennym związku siostrzanych chromatyd podczas wczesnych etapów podziału mejotycznego.

Pierwszym z nich jest mutant *swi1/dyad* (*switch1/dyad*). Mutacja 3 poznanych alleli genu *SWITCH1* (*SWI11*)/*DYAD* objawia się zaburzeniami związku pomiędzy chromatydami zarówno w przebiegu mega-, jak i mikrosporoogenezy. Nieprawidłowości w przestrzennych interakcjach pomiędzy chromatydami siostrzanymi tylko podczas mikrosporoogenezy wykazują natomiast rośliny, które mają zmutowany jeden z alleli tego genu, tj. o genotypie *swi1-2* [36]. W pylnikach mutantów już podczas I profazy mejotycznej obserwuje się zanik połączeń między siostrzanymi chromatydami mikrosporocytów. Efektem tych zaburzeń jest niekompletny bądź całkowicie zahamowany proces kondensacji chromosomów oraz brak wyróżnialnych stadiów leptotenu, zygotenu oraz pachytenu. Przedwczesna segregacja takich anormalnych chromatyd podczas pierwszego i drugiego podziału mejotycznego doprowadza do wytworzenia od 1 do 10 nierównocennych jąder, które następnie degenerują [33]. Jak wykazała analiza molekularna, transkrypt genu *SWI1* podlega alternatywnemu splicingowi i koduje dwa białka o długości odpowiednio 578 i 635 aminokwasów, które różnią się jedynie na końcu N. Jak dotąd nie stwierdzono homologii tych białek względem żadnych znanych sekwencji, które figurują w bazach danych [33].

Komórkowa lokalizacja białka SWI1 badana była u rzodkiewnika pospolitego przy użyciu konstruktów SWI1-GFP. Wykazano, że konstrukt ten kolokalizował z DNA wyłącznie w jądrach komórek podlegających mejozie, jest to zatem białko specyficzne dla cyklu mejotycznego. Ponadto w jądrach komórkowych białko obecne było jedynie

TABELA 1. Homologi/ortologi drożdżowych genów kontrolujących poszczególne etapy mejozy u *Arabidopsis thaliana*

GEN DROŻDZY	HOMOLOG/ ORTOLOG <i>A. thaliana</i>	FUNKCJA KODOWANEGO BIAŁKA
REKOMBINACJA MATERIAŁU GENETYCZNEGO		
SPO11	AtSPO11-1 AtSPO11-2 AtSPO11-3	Topoizomerazy typu II odpowiedzialne za inicjację dwuniciowych pęknięć DNA [26]
MRE11 RAD50	AtMRE11 AtRAD50	Tworzą kompleks odpowiedzialny za naprawę dwuniciowych pęknięć DNA [11]
RAD51	AtRAD51	Rekombinaza; wymiana fragmentów nici oraz naprawa uszkodzeń DNA [1]
RAD51C XRCC3 DMC1	At RAD51C AtXRCC3 AtDMC1	Prawdopodobnie uczestniczą w montażu i stabilizacji białka RAD51 [1,10] Identyfikacja homologii DNA między lepkiem końcem 3' a chromosomem homologicznym [40]
MND1 ATM	AtMND1 AtATM	Naprawa DSB, stabilizacja heterodupleksów [20] Kinaza białkowa aktywowana pęknięciami DNA; fosforyluje białka naprawiające pęknięcia DNA [23]
RECQ HELICASES	RecQ (sześć homologów)	Replikacja i rekombinacja DNA podczas późniejszych stadiów naprawy pęknięć dwuniciowego DNA [6]
MLH1 MEI1 (MCD1)	AtMLH1 AtMEI1	Naprawa niedopasowań po wymianie odcinków DNA [40] Uczestniczy w odpowiedzi na pęknięcia DNA i blokadę replikacji u <i>Eukariota</i> [27]
MSH4 MSH5 MER3	AtMSH4 – AtMER3	Udział w szlaku powstawania crossovers klasy I [28]
MUS81 MMS4 EME1	– – – PTD	Endonukleazy; cięcie i naprawa pęknięć DNA. U drożdży katalizują szlak powstawania crossovers klasy II [29] Rekombinacja materiału genetycznego [46]

podczas interfazy premejozycznej oraz bardzo wczesnej profazy [33]. W związku z tym autorzy sugerują, że białko SWI1 jest odpowiedzialne raczej za inicjację przestrzennego związku pomiędzy chromatydami siostrzanymi aniżeli jego utrzymywanie podczas kolejnych stadiów mejozy.

Drugi mutant charakteryzujący się nieprawidłowościami w kohezji pomiędzy chromatydami siostrzanymi opisany został przez dwie niezależne grupy badawcze. Bai i wsp. [7] oraz Bhatt i wsp. [8] wykazali, że mutacja genu *SYN1/DIF1* (*SYN1/DETERMINATE, INFERTILE1*) objawia się najpierw zaburzeniami w kondensacji chromosomów w leptotenie, a następnie ich fragmentacją w metafazie I i defektami w segregacji podczas anafazy I. Zidentyfikowano pięć mutantów genu *SYN1/DIF1*, a mutacja u każdego z nich powodowała całkowitą sterylność zarówno męską, jak i



TABELA 1, cd.

GEN DROZDZY	HOMOLOG/ ORTOLOG- <i>A. thaliana</i>	FUNKCJA KODOWANEGO BIAŁKA
<b>KOHEZJA SIOSTRZANYCH CHROMATYD</b>		
RAD21/REC8	SWI1/DYAD SYN1/DIF1	Inicjacja kohezji chromatyd siostrzanych [33] Aktywność kohezyny; formowanie połączeń między chromatydami siostrzanymi [8]
<b>KONTIGACJA CHROMOSOMÓW HOMOLOGICZNYCH</b>		
MEU13 <sup>-</sup> HOP1	SWI1/DYAD SDS  AHP2 ASY1	Formowanie elementów bocznych kompleksu synaptonemalnego [33] Cyklina typu B; decyduje o czasie rozdzielania chromosomów tworzących bivalent [5] Kontrola parowania chromosomów homologicznych [39] Interakcja między elementami osiowymi kompleksu synaptonemalnego a chromatyną chromosomów homologicznych [3,4]
<b>ORGANIZACJA WRZECIONA PODZIAŁOWEGO</b>		
	KATA/ATK1	Kinezyzna; organizacja mikrotubul wrzeciona podziałowego [17]
<b>PRZEBIEG CYTOKINEZY</b>		
	<i>STD/TES</i>	Kinezyzna; uczestniczy w powstawaniu tzw. jądrowych domen cytoplazmatycznych odpowiedzialnych za prawidłowy przebieg cytokinezy postmejozycznej [30,51]
<b>EKSPRESJA GENÓW MEJOTYCZNYCH</b>		
	<i>SPL/NZZ</i> <i>MMD1</i> <i>DUET</i> <i>MS1</i> <i>AMS1</i>	Czynnik transkrypcyjny MADS Box; przejście ze stanu wegetatywnego w generatywny [41,50] regulacja transkrypcji genów mejotycznych; remodelowanie chromatyny [52] regulacja organizacji chromatyny i ekspresji genów podczas mikrosporoogenezy [38] regulacja transkrypcji genów tapetum [47]  Czynnik transkrypcyjny z klasy MYB; regulacja rozwoju tapetum [42]
		} białka z klasy PHD-finger
<b>KONTROLA CYKLU KOMÓRKOWEGO</b>		
SKP1	ASK1  TAM1 MS5 (TMD/ POLLEN- LESS3)	Element ligaz ubikwitynowych; degradacja białek czestniczących w kolejnych procesach I profazy [53,54] Cyklina typu A - CYCA 1,2 [31, 44]  } Kontrola wyjścia z mejozy [16]

żeńską. W stadiach postpachytenowych w mikrosporocytach mutantów *syn1/dif1* obserwowano zmienione morfologicznie chromosomy, co może wskazywać na nieprawidłowości w mechanizmie kohezji siostrzanych chormatyd. Późniejsze zaburzenia w rozdzielaniu takich chormosomów prowadziły do powstawania produktów mejozy złożonych często nawet z 8 komórek o różnym kształcie, fenotypie i ploidalności [8].

Badania porównawcze ujawniły, że gen *SYN1/DIF1* jest w wysokim stopniu homologiczny do drożdżowego genu *RAD21/REC8* (**R**ADiation sensitive **21**/**d**eficient **i**n **m**eiotic **R**E**C**ombination **8**), kodujących rodzinę kohezyn zaangażowanych w formowanie połączeń pomiędzy chromatydami siostrzanymi i kondensację chromatyny podczas cyklu mitotycznego [7]. Analiza molekularna genu *SYN1/DIF1* wykazała, że jego transkrypt podlega alternatywnemu splicingowi i koduje dwa białka. Pierwsze o długości 627 reszt aminokwasowych, które syntetyzowane jest na niskim poziomie we wszystkich tkankach, oraz drugie zbudowane z 617 aminokwasów, ulegające ekspresji tylko w pąkach kwiatowych [16]. Białka te mają dwa sygnały lokalizacji jądrowej (NLS, z ang. *Nuclear Localization Signal*) i kilka domen PEST (z ang. *proline (P), glutamate (E), serine (S), and threonine (T) rich domain*), które obecne są zazwyczaj w białkach ulegających niezwykle szybkiej degradacji w komórkach eukariotycznych [7]. Kohezyjna funkcja białka SYN1/DIF1 wydaje się być bardziej powszechna. Stosując testy komplementacji [21] stwierdzili bowiem, że białko to częściowo zastępuje mitotyczną kohezynę Mcd1 u drożdży. Wskazuje to, iż białko SYN1/DIF1 może pełnić rolę kohezyny w komórkach dzielących się zarówno mejotycznie, jak i mitotycznie.

## 2. KONIUGACJA CHROMOSOMÓW HOMOLOGICZNYCH

Poza redukcją liczby chromosomów efektem każdej mejozy jest także rekombinacja materiału genetycznego, która odbywa się zazwyczaj w zygotenie w procesie *crossing-over*. Aby zaszedł *crossing-over*, chromosomy ojcowski i matczyny muszą wejść w specyficzną interakcję przestrzenną (koniugacja, synapsis), w wyniku której w zygotenie powstają struktury określane mianem bivalentów. Opisana interakcja umożliwia późniejszą reakcję wymiany odcinków pomiędzy chromatydami chromosomów homologicznych. Koniugacja chromosomów homologicznych zachodzi za pośrednictwem makromolekularnej struktury określanej mianem kompleksu synaptonemalnego (ryc. 2). Kompleks synaptonemalny zaczyna formować się już w leptotenii, kiedy chromosom ojcowski i matczyny zbliżą się do siebie na odległość mniejszą aniżeli 200 nm, a na powierzchni nici chromatynowych obu chromosomów odbywa się montaż białkowych elementów osiowych (ang. *axial elements*). Podstawowe części w pełni uformowanego kompleksu synaptonemalnego to: 1) elementy boczne, utworzone z kontaktujących się ze sobą licznych elementów osiowych, bezpośrednio związane z chromatydami chromosomów homologicznych, 2) element centralny łączący oba elementy boczne za pośrednictwem poprzecznych włókien oraz 3) grudka rekombinacyjna. Elipsoidalne grudki rekombinacyjne zbudowane są z białek uczestniczących w koniugacji i wymianie odcinków chromosomów homologicznych. W zależności od stadium I profazy mejotycznej oraz ich wyposażenia grudki rekombinacyjne dzieli się na wczesne i późne.

Wczesne grudki rekombinacyjne widoczne są już w zygotenie i zawierają białka biorące udział w inicjacji przestrzennego związku pomiędzy chromosomami homologicznymi i wczesnych etapach rekombinacji. Późne grudki rekombinacyjne pojawiają się zazwyczaj w środkowym pachytenie, są mniej liczne aniżeli grudki wczesne, a miejsca ich występowania uznaje się za tożsame z miejscami zajścia *crossing-over* [2].

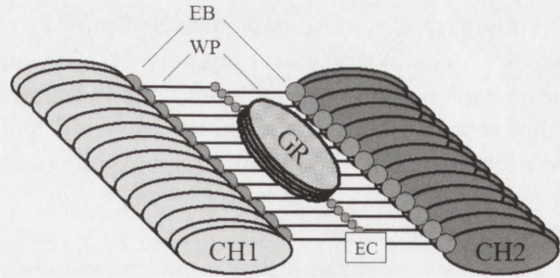
Modelowym organizmem wykorzystywanym do badań nad

genetyczną i molekularną naturą procesu koniugacji chromosomów homologicznych i *crossing-over* u *Eukaryota* są drożdże. Cechy, które decydują o wykorzystaniu tych komórek w poznawaniu molekularnych podstaw rekombinacji mejotycznej, to: mały genom, wysoka częstość rekombinacji (100 miejsc *crossing-over*/podział) oraz łatwość manipulacji genetycznych. Znakomita większość genów związanych z kontrolą profazy I podziału mejotycznego u *Eukaryota*, w tym również procesu rekombinacji, zidentyfikowana została właśnie dzięki badaniom prowadzonym na drożdżach. W ostatniej dekadzie zidentyfikowano także znaczną liczbę genów zaangażowanych w proces *crossing-over* w komórkach roślinnych, przy czym stopień homologii tych genów określano w odniesieniu do sekwencji genów drożdżowych.

Generalnie, u większości organizmów mutacje w genach kodujących białka charakterystyczne dla wczesnych grudek rekombinacyjnych objawiają się zaburzeniami koniugacji chromosomów homologicznych i wczesnych etapów *crossing-over*. Z kolei defekty genów kodujących białka obecne w późnych grudkach rekombinacyjnych nie wpływają na przestrzenny związek pomiędzy chromosomami matczynym i ojcowskim, ale zaburzają lub uniemożliwiają proces rekombinacji.

## 2.1. Geny odpowiedzialne za formowanie synapsis chromosomów homologicznych

W ciągu ostatniej dekady zidentyfikowano dużą liczbę mutantów *A. thaliana* charakteryzujących się różnorodnymi defektami w interakcjach chromosomów podczas I profazy mejotycznej. Opisane powyżej badania białka SWI1 ujawniły, że oprócz udziału w kohezji siostrzanych chromatyd, jest ono także zaangażowane w formowanie elementów bocznych kompleksu synaptonemalnego [34]. W metafazie I podziału mejotycznego u mutantów *swi1-2* nie obserwowano bowiem typowych dla rzodkiewnika pospolitego pięciu bivalentów, a 20 pojedynczych chromatyd. Ponadto brak widocznych chiasm sugeruje, że u roślin tych nie zaszedł *crossing-over*, co wskazuje na udział białka SWI1 także w procesie rekombinacji [34].



RYCINA 2. Schemat budowy kompleksu synaptonemalnego. CH1, CH2 – chromatydy niesiostrzane chromosomów homologicznych, EB – elementy boczne, EC – element centralny, WP – włókna poprzeczne, GR – grudka rekombinacyjna

Azumi i wsp. [5] opisali mutantą *solo dancers* (*sds*) wykazującego nieprawidłowości w koniugacji chromosomów podczas I profazy mejotycznej. Wszystkie rośliny o tym genotypie charakteryzowały się silnie zredukowaną płodnością. Mutanty *sds* cechowały się prawidłową kondensacją chromosomów, jednakże obserwowano, że rozwój większości mikrosporocytów zatrzymywał się w stadium zygotenu, tylko część z nich przechodziła do pachytenu. Na tej podstawie autorzy sugerują, że rośliny te mają zaburzony proces formowania bivalentów oraz *crossing-over*, co w przypadku nielicznych komórek podlegających pełnemu podziałowi mejotycznemu, prowadzi do nieuporządkowanego rozmieszczenia chromosomów podczas kolejnych stadiów mejozy i powstawania anormalnych mikrospor [5]. Analiza molekularna białkowego produktu genu *SDS* wykazała między innymi, że na C-końcu zawiera on tzw. „region rdzeniowy cyklin” (z ang. „*cyclin core region*”) – konserwatywną domenę charakterystyczną dla cyklin typu B u *Arabidopsis* [5]. Możliwe zatem, że białko SDS reprezentuje nowy typ cyklin, prawdopodobnie specyficznych dla komórek podlegających podziałowi mejotycznemu. Ponadto założono, że musi również istnieć zależna od cyklin specyficzna kinaza, która być może odgrywa kluczową rolę w regulacji interakcji pomiędzy chromosomami homologicznymi. Na tej podstawie Azumi i wsp. [5] stworzyli model, który zakłada, że białko SDS decyduje o czasie rozdzielania chromosomów tworzących bivalent poprzez fosforylację białek zaangażowanych w utrzymanie tego związku przestrzennego, przy czym możliwe, że jednym z tych białek jest opisane powyżej SWI1.

Podobnego fenotypowo do *sds* mutantą *Arabidopsis* opisali Schommer i wsp. [39]. Rośliny z mutacją genu *AHP2* (*Arabidopsis Homologue Pairing 2*) były sterylne w wyniku zaburzeń mejozy. Wykorzystując technikę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* do lokalizacji sekwencji organizatora jąderkowego (NOR) stwierdzono, że w mikrosporocytach mutantów *ahp2-1* chromosomy rozmieszczone są w sposób przypadkowy, co jest konsekwencją nie wytworzenia się bivalentów w I profazy mejotycznej [39]. Wynikiem tych zaburzeń jest nieprawidłowa segregacja chromosomów podczas anafazy I i II podziału mejotycznego. Badania molekularne ujawniły, że gen *AHP2* jest homologiem genu *meu13<sup>+</sup>*, który kontroluje parowanie chromosomów homologicznych podczas mejozy u drożdży. Na tej podstawie autorzy sugerują, że funkcja drożdżowego genu *meu13<sup>+</sup>* jest konserwowana w bardziej ewolucyjnie zaawansowanych komórkach eukariotycznych [39].

Kolejnym genem rzodkiewnika pospolitego, który kontroluje przestrzenny związek pomiędzy chromosomami homologicznymi, jest *ASY1* (*ASynaptic 1*). Mutacja tego genu objawia się całkowitym brakiem formowania bivalentów podczas I profazy mejotycznej [3]. Brak synapsis pomiędzy chromosomami homologicznymi u roślin o genotypie *asy1* powoduje, iż chromosomy pozostają uniwalentami, nie tworzą się też chiazmy. Efektem są zaburzenia w rozchodzeniu się chromosomów homologicznych podczas anafazy I podziału mejotycznego i powstanie jąder o przypadkowej liczbie i składzie chromosomów. W rezultacie po II podziale mejotycznym u mutantów *asy1* dochodzi do powstania nienaturalnych wielokomórkowych produktów mejozy, tzw. poliad, zawierających zróżnicowaną liczbę chromosomów [3].

Immunolokalizacja białka ASY1 u roślin *A. thaliana* i *Brassica oleracea* dzikiego typu wydaje się odzwierciedlać jego funkcję podczas koniugacji chromosomów

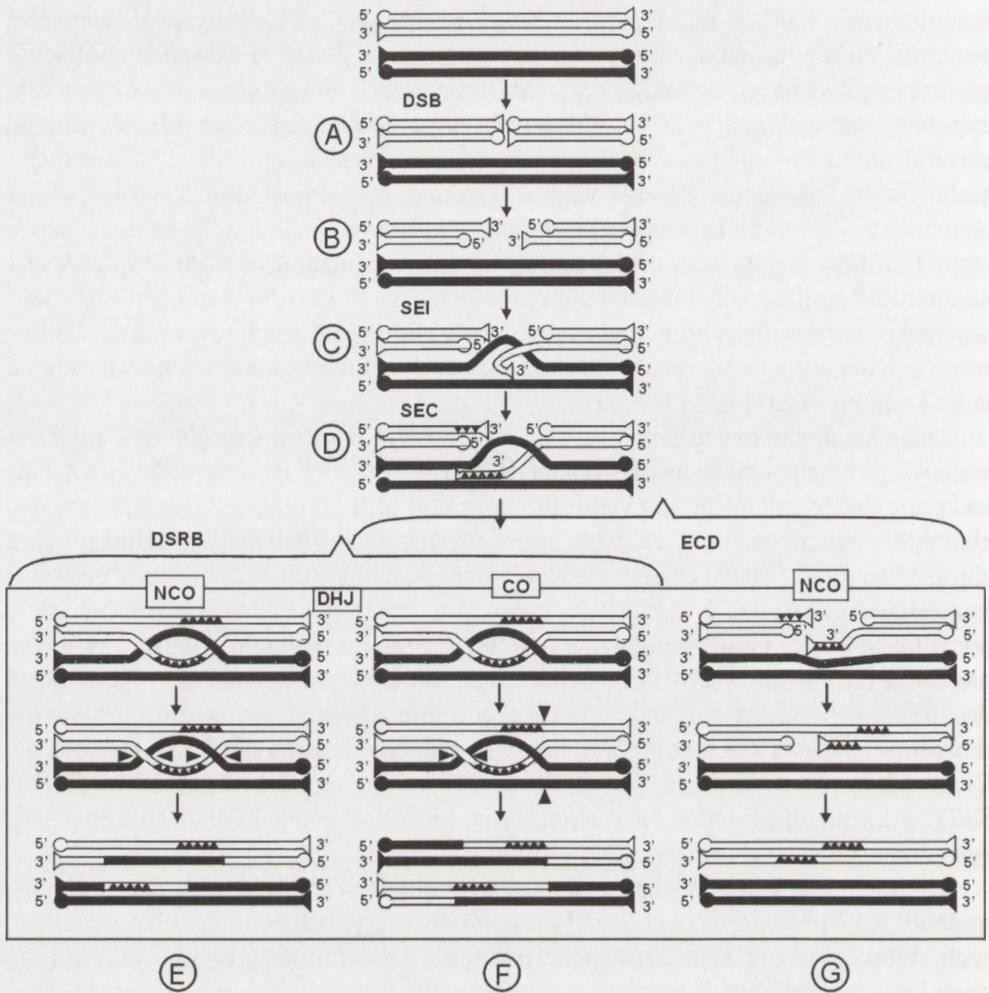
homologicznych [4]. W interfazie premejotycznej białko ASY1 występowało w postaci punktowych skupisk na terenie jąder mikrosporocytów. Z chwilą wejścia komórek w I profazę mejotyczną jego lokalizacja stawała się bardziej homogenna i w okresie leptotenygoten obserwowana była jedynie na obszarze elementów osiowych chromatyd chromosomów homologicznych. Badania na poziomie subkomórkowym wykazały, że białko ASY1 występuje jedynie wzdłuż chromatyny bezpośrednio zasocjowanej z elementami osiowymi (bocznymi) kompleksu synaptonemalnego. Podczas dalszego etapu I profazy mejotycznej następowało stopniowe obniżanie poziomu białka ASY1 na terenie kompleksu synaptonemalnego. Proces ten był skorelowany z postępującą separacją chromosomów homologicznych. W okresie późnego diplotenu białko lokalizowano jedynie w postaci nielicznych, niezwiązanych z chromatyną agregatów na terenie jądra komórkowego [4].

Badania molekularne ujawniły, że białko ASY1 wykazuje znaczącą homologię do N-końcowego odcinka drożdżowego białka HOP1 (*Homolog Of Presinilin*), które również związane jest z elementami osiowymi chromosomów [15]. Homologiczny region zawiera charakterystyczną domenę HOMA, która występuje w białkach zasocjowanych z chromatyną. Białko HOP1 charakteryzuje się także podobnym do ASY1 wzorem czasowej i przestrzennej lokalizacji komórkowej w okresie leptotenu. Badania *in vitro* ujawniły ponadto, że białko HOP1 wchodzi w interakcję z innym białkiem – RED1, które jest niezbędne do prawidłowego montażu elementów osiowych podczas mejozy w komórkach drożdży [48]. Nie wykazano jednakże podobieństw sekwencji amino-kwasów drożdżowego białka RED1 do ASY1, ani żadnego innego białka rzodkiewnika pospolitego. W związku z tym sugeruje się, że ASY1 może pełnić analogiczną rolę jak białka HOP1/RED1 u drożdży, tj. pośredniczyć w interakcji pomiędzy elementami osiowymi kompleksu synaptonemalnego i chromatyną chromosomów homologicznych [4].

Zaburzenia w łączeniu chromosomów homologicznych w pary wykazują także mutanty *dysl1* (*desynaptic 1*) i *dysl10* (*desynaptic 10*), jednakże molekularne podłoże tych fenotypów nie zostało jeszcze poznane. Oba mutanty charakteryzują się zredukowaną płodnością, wynikającą z nietrwalej asocjacji chromosomów, których separacja zachodzi już pod koniec I profazy mejotycznej. Ostatecznym efektem mejozy u roślin *dysl1* i *dysl10* są jedno- lub wielojądrowe wielokomórkowe struktury, charakteryzujące się różną ilością DNA [48].

### 3. REKOMBINACJA MATERIAŁU GENETYCZNEGO (*CROSSING-OVER*)

Aktualnie w literaturze funkcjonują dwa podstawowe modele rekombinacji materiału genetycznego u *Eukaryota* (ryc. 3). Oba stworzono na podstawie badań tego procesu głównie u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Pierwszy z nich opracowany przez Szostaka i wsp. [43] to model DSBR (*Double-Strand-Break-Repair*), zwany także modelem przerw dwuniciowych, drugi natomiast określany jest mianem ECD (*Early-Crossover-Decision*) [9]. Zasadniczo modele te różnią się czasem, w którym „podjęta

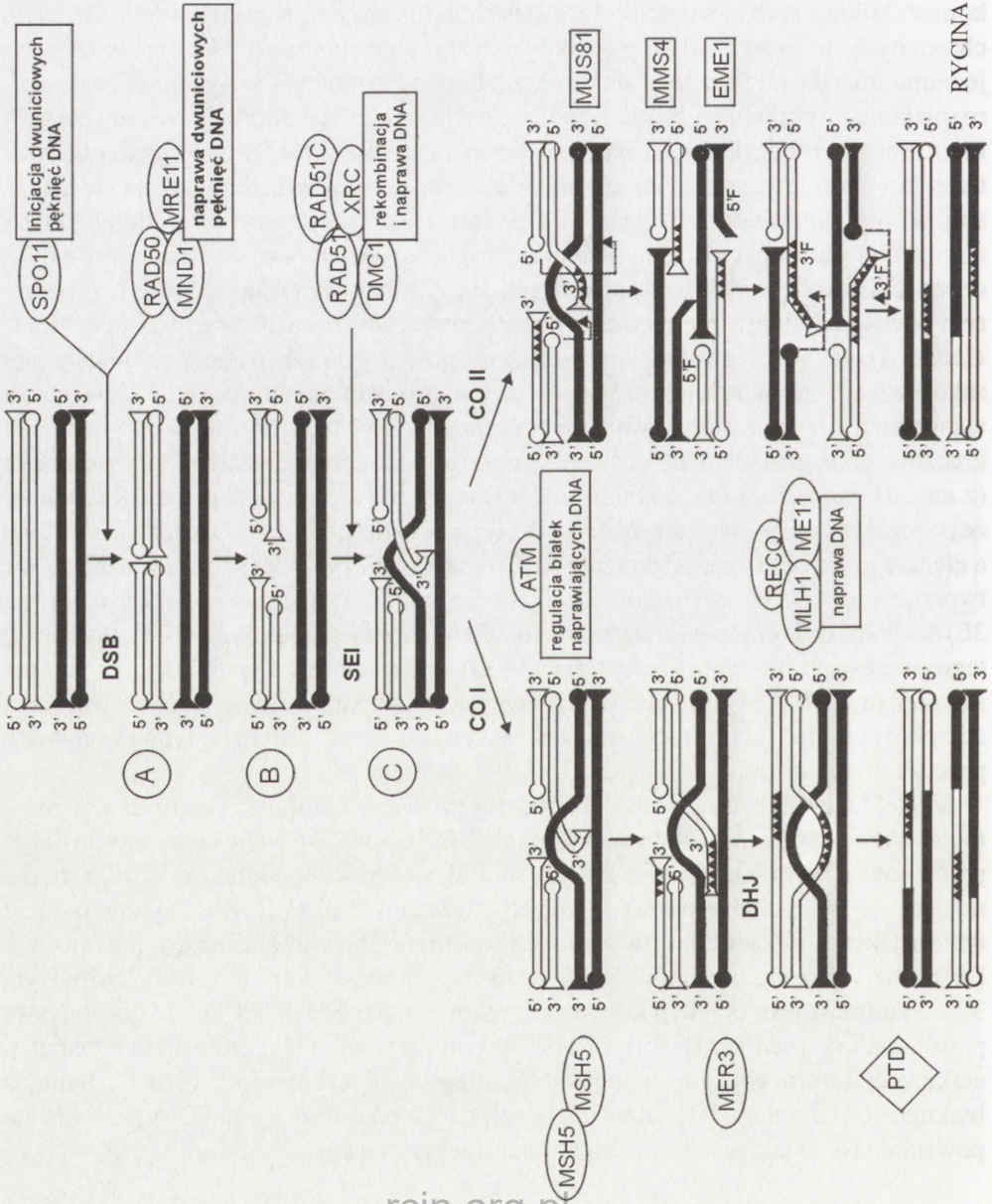


RYCINA 3. Schemat procesu rekombinacji wg modeli DSRB i ECD (kolorem białym i czarnym zaznaczono podwójne łańcuchy DNA chromatyd niesiostrzanych). Wg obu modeli proces inicjuje pęknięcie podwójnej nici DNA jednej z chromatyd chromosomów homologicznych, efektem czego jest wytworzenie tzw. intermediatu DSB (A). Po częściowej lizie końców 5' powstają fragmenty jednoniciowego DNA z lepkiymi końcami 3' (B). Atak 3' końca jednoniciowego DNA na nieprzeciętą nić DNA niesiostrzanej chromatyd powoduje powstanie intermediatu SEI z tzw. pętlą D (C). Synteza brakujących fragmentów DNA na matrycy nici DNA niesiostrzanej chromatyd prowadzi do powstania intermediatu SEC, który może podlegać różnym dalszym przemianom (D). E-F – wg modelu DSRB połączenie lepkiego końca 3' atakującej nici DNA z jej macierzystą nicią doprowadza do uformowania podwójnej struktury Hollidaya (DHJ). Nici w obrębie DHJ podlegają następnie cięciu przez specyficzne endonukleazy. Potencjalne miejsca cięcia oznaczono gwiazdkami. W zależności od miejsca cięcia nici tworzących DHJ dochodzić może do powstania dwu rodzajów produktu rekombinacji: E – NONCROSSOVER (NCO) lub F – CROSSOVER (CO) (opis w tekście). F-G – Wg modelu ECD do powstania intermediatu DHJ dochodzi jedynie w przypadku szlaku prowadzącego do CO (F). Szlak powstawania NCO obejmuje wydłużanie atakującej nici, a następnie jej wycofanie z pętli D i ponowne połączenie ze swoją macierzystą nicią (G) (wg [29], zmieniony)

zostaje decyzja” o końcowym efekcie *crossing-over* – czy będzie to tylko konwersja genu, tzn. fragmenty DNA usunięte z jednej nici DNA zostaną zastąpione przez kopie DNA z nici homologicznej (NCO – *NonCrossOver*), czy też dojdzie do rekombinacji między niesiostrzanymi chromatydami danego bivalentu (CO – *CrossOver*) [13].

Według obu modeli pierwszym etapem rekombinacji jest pęknięcie podwójnej nici DNA jednej z chromatyd chromosomu homologicznego (tzw. DSB, z ang. *Double-Strand-Breaks*), wynikiem czego jest powstanie dwu wolnych końców 3' i 5' (ryc. 3A). Po rozcięciu dochodzi do częściowej degradacji tych nici DNA, które mają wolne końce 5' (ryc. 3B). W rezultacie tworzą się jednoniciowe odcinki DNA mające 3' lepki koniec. Jedna z tych nici przemieszcza się i atakuje nieprzerwaną podwójną nić DNA chromatydy niesiostrzanej. W poszukiwaniu komplementarnych sekwencji inwazyjne jednoniciowe DNA przesuwa się wzdłuż zaatakowanej nici DNA, czemu towarzyszy rozplatanie jej podwójnej spirali. Efektem jest powstanie struktury nazywanej pętlą D, która umożliwia odnalezienie się komplementarnych odcinków DNA pomiędzy niesiostrzanymi chromatydami. Wytworzony w tym procesie intermediat określa się SEI (z ang. *Single-End-Invasion*) (ryc. 3C). W ten sposób jednoniciowe odcinki DNA nieprzeciętej chromatydy stają się matrycami do syntezy DNA i wydłużenia pojedynczych nici zakończonych lepкими końcami 3' z chromatydy niesiostrzanej. W procesie tym powstaje kolejny intermediat procesu *crossing-over* – SEC (z ang. *Second-End-Capture*) (ryc. 3D). Kowalencyjne połączenie nowosyntetyzowanego fragmentu nici zakończonej 3' z lepkiem końcem 5' zlokalizowanym po drugiej stronie pętli D oraz ligacja wszystkich nowosyntetyzowanych fragmentów DNA doprowadza do powstania kluczowego intermediatu procesu *crossing-over* – tzw. podwójnej struktury Hollidaya (z ang. *Double Holliday Junction* – **DHJ**) (ryc. 3E, F). W modelu DSBR założono, że podczas *crossing-over* zawsze dochodzi do powstania podwójnej struktury Hollidaya, a efekt tego procesu, tj. wytworzenie NCO lub CO, zależy od sposobu cięcia nici DNA tworzących DHJ. W przypadku cięcia jedynie nici DNA o tej samej polaryzacji (ryc. 3E) dochodzi do konwersji genów pomiędzy chromosomami homologicznymi, a produkty tego procesu to tzw. *NonCrossOvers* (NCO). Jeśli natomiast endonukleazy przetną również nici DNA skierowane w przeciwnym kierunku, możliwa staje się wymiana odcinków pomiędzy chromatydami niesiostrzanymi, czego efektem są typowe produkty procesu *crossing-over* – CO (ryc. 3F) [29].

Model ECD zakłada natomiast, że podczas procesu rekombinacji kierunek przemian molekularnych prowadzących do powstania CO bądź NCO zostaje określony na długo przed powstaniem podwójnej struktury Hollidaya. Prawdopodobnie „decyzja” ta ma miejsce już w leptotenie profazy I, tuż po powstaniu DSB [12]. Według tego modelu tylko szlak prowadzący do wytworzenia CO obejmuje powstanie stabilnego intermediatu DHJ oraz wymianę odcinków DNA pomiędzy chromatydami niesiostrzanymi (ryc. 3F). Natomiast jeśli efektem końcowym rekombinacji będzie NCO, nie dochodzi do powstania intermediatu HDJ (ryc. 3G). W tym przypadku po wydłużeniu przeciętej, atakującej swym końcem 3' nici DNA, ulega ona wycofaniu z pętli D. Synteza brakujących odcinków DNA oraz ich ligacja z macierzystymi nićmi DNA prowadzi do powstania NCO jako ostatecznego produktu rekombinacji.



RYCINA 4. Opis obok



Dzięki intensywnym badaniom molekularnym możliwa jest ciągła weryfikacja istniejących modeli procesu rekombinacji. Dobrym tego przykładem jest jedno z najbardziej spektakularnych odkryć ostatnich lat, dotyczące formowania CO. Wykazano bowiem, najpierw u drożdży [19], a następnie u *A. thaliana* [28], że istnieją dwie alternatywne drogi powstawania CO podczas rekombinacji mejyotycznej (ryc. 4D,E). W związku z tym wyróżniono dwie klasy produktów *crossing-over*: *crossovers* podlegające interferencji (CO I) (ryc. 4D) oraz *crossovers* niepodlegające interferencji (CO II) (ryc. 4E). Interferencja jest znanym od dawna zjawiskiem, polegającym na tym, że zajście *crossing-over* w jednym odcinku chromosomu zmniejsza prawdopodobieństwo wystąpienia drugiego *crossing-over* w jego najbliższym sąsiedztwie [22]. Ponieważ CO są niezbędne do prawidłowej segregacji chromosomów podczas pierwszego podziału mejyotycznego, defekty w interferencji mogłyby spowodować zaburzenia segregacji lub rozchodzenia chromosomów.

Obecnie zakłada się, że CO klasy I powstają w sposób opisany w modelu ECD, który obejmuje generowanie typowych intermediatów *crossing-over*: SEC oraz DHJ (ryc. 4D) Cięcie nici DNA tworzących podwójną strukturę Hollidaya prowadzi do wymiany odcinków DNA pomiędzy niesiostrzonymi chromatydami chromosomów homologicznych. Biochemiczny szlak powstawania CO niepodlegających interferencji jest odmienny i nie wymaga powstawania HDJ (ryc. 4E). Po wydłużeniu końca 3' przeciętych nici DNA następuje cięcie obydwu nici tworzących tzw. pętlę D. W efekcie w obu niciach DNA na końcach 5' mogą powstawać zarówno „przerwy” (ang. *gaps*), wynikające z braku pewnych sekwencji DNA, jak i „zakładki” (ang. *flaps*), tj. powielone

RYCINA 4. Hipotetyczny model genetycznej i molekularnej regulacji rekombinacji mejyotycznej u *A. thaliana* (kolorem białym i czarnym zaznaczono podwójne łańcuchy DNA chromatyd niesiostrzanych). A – Formowanie intermediatu DSB wymaga aktywności białek SPO11 oraz kompleksu innych białek, m.in. RAD50 i MRE11, które uczestniczą w cięciu i naprawie podwójnej nici DNA jednej z chromatyd niesiostrzanych. B – Częściowa liza 5' nici DNA. C – W przemieszczenie oraz atak lepkiego końca 3' jednoniciowego DNA na nić DNA chromatyd niesiostrzanej zaangażowane są: w kompleks białek RAD51/RAD51C/XRC oraz białko DMC1. Prowadzi to do uformowania intermediatu SEI i powstania „pętli D”. D – Wytworzenie CO klasy I (zależne od interferencji) przebiega w sposób podobny jak w modelach DSB i ECD z udziałem m.in. białek MSH4 i MSH5 oraz białka MER3. Synteza i wydłużenie lepkich końców 3' jednoniciowego DNA odbywa się na matrycy nici DNA chromatyd niesiostrzanej, co prowadzi do wytworzenia intermediatu SEC, a następnie powstania podwójnej struktury Hollidaya (DHJ). Cięcie wszystkich 4 pojedynczych nici DNA umożliwia wymianę odcinków DNA między chromatydami niesiostrzanymi. E – Produkty *crossing-over* klasy II (niezależne od interferencji) generowane są prawdopodobnie przy udziale egzonukleaz homologicznych do drożdżowych białek MUS81/EME1 i MUS81/MMS4, które przecinają nici DNA tworzące „pętlę D” (strzałki z przerywaną linią). Proces ten inicjuje powstawanie produktów *crossing-over* zawierających tzw. 5' zakładki (5'F) oraz „przerwy” (z ang. *gaps*). Izomeryzacja 5' zakładek w 3' zakładki (3'F) umożliwia drugą rundę cięcia przez kompleksy białek MUS81/EME1 i MUS81/MMS4. Synteza nowych fragmentów DNA w „przerwach” oraz ich ligacja prowadzi do powstania CO bez konieczności formowania DHJ. F – W stabilizacji powstałych podczas *crossing-over* heterodupleksów uczestniczy białko MND1. Naprawa DNA w procesie rekombinacji odbywa się z udziałem m.in. białek RECQ, MLH1, MEI1, których aktywność regulowana jest przez kinazę białkową ATM. Geny umieszczone w elipsach to zidentyfikowane u *A. thaliana* homologi genów drożdżowych, w prostokątach – geny zidentyfikowane tylko u drożdży. Gen PTD (romb), o nieznanym dotąd funkcji, nie wykazuje homologii do żadnego z genów drożdżowych, co sugeruje, że rekombinacja u roślin jest regulowana nieco odmiennymi szlakami metabolicznymi (wg [29], zmieniony).

fragmenty nici DNA. Zakładki te mogą zostać wycięte przez specyficzne 5' endonukleazy i może nastąpić ligacja lepkich końców wszystkich 4 nici DNA. Wg innej hipotezy przed ostateczną ligacją nici DNA następuje izomeryzacja „zakładek” z końca 5' na koniec 3'. W tym przypadku to zakładki 3' ulegają wycięciu. Synteza brakujących fragmentów DNA i ich ostateczne łączenie skutkowałoby powstawaniem produktów CO bez obecności intermediatu DHJ, typowego dla CO klasy I [29].

### 3.1. Geny kontrolujące proces rekombinacji mejozy

Intensywne badania molekularnej natury procesu *crossing-over* prowadzone na takich modelach badawczych, jak: drożdże, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* oraz myszy, wykazały, że geny kontrolujące proces wymiany odcinków chromatyd między chromosomami homologicznymi podczas mejozy są generalnie wysoce konserwatywne ewolucyjnie. W genomie różnych gatunków roślin okrytonasiennych zidentyfikowano dużą liczbę homologów i ortologów genów związanych z procesem rekombinacji u drożdży, *Drosophila melanogaster* czy kręgowców wyższych, w tym również człowieka. Poniżej przedstawiono informacje dotyczące większości genów bezpośrednio zaangażowanych w proces rekombinacji mejozy, z uwzględnieniem ich homologów lub ortologów znalezionych u roślin, przede wszystkim u *A. thaliana*. Pozwala to na określenie ich przypuszczalnej funkcji i skonstruowanie hipotetycznego modelu molekularnej kontroli rekombinacji u *A. thaliana* (ryc. 4).

Geny kontrolujące proces rekombinacji materiału genetycznego podczas mejozy kodują przede wszystkim enzymy uczestniczące w organizacji struktury DNA oraz cięciu i naprawie DNA.

Inicjacja pęknięć podwójnej nici DNA (DSB) jednego z chromosomów homologicznych, która rozpoczyna *crossing-over*, u drożdży znajduje się pod kontrolą genu *SPO11*. Białko SPO11 należy do rodziny topoiizomeraz typu II. U *A. thaliana* opisano homologi tego genu nazwane *AtSPO11-1*, *AtSPO11-2*, *AtSPO11-3* (ryc. 4A). Podobnie jak u drożdży, białka SPO11 rzodkiewnika mają właściwości topoiizomerazy. Rośliny *spo11-1*, zarówno w mikro- jak i megasporocytach, formują nieliczne biwalenty, co prowadzi do nieprawidłowości w rozdziale chromosomów podczas anafazy I i II podziału mejozy. Efektem tych zaburzeń w pylniku jest formowanie anormalnych wielokórkowych produktów mejozy o różnej zawartości DNA [26].

U drożdży w skład kompleksu katalizującego pęknięcie podwójnej nici DNA wchodzi dodatkowo białka, m.in. kodowane przez geny *MRE11* i *RAD50*. Ich homologi opisano również u *A. thaliana* (*AtMRE11*, *AtRAD50*). Białka MRE11 oraz RAD50 wchodzi w skład kompleksu odpowiedzialnego za naprawę dwuniciowych pęknięć DNA. U rzodkiewnika fenotypowym efektem mutacji *rad50* jest jego duża wrażliwość na działanie siarczynu metylmetanu, związku uszkadzającego DNA. Rośliny takie są całkowicie sterylne, bowiem chromosomy homologiczne są niezdolne do koniugacji, co w konsekwencji doprowadza do ich destrukcji podczas dalszych stadiów mejozy [11].

Do wytworzenia intermediatu SEI, który powstaje po usunięciu fragmentów jednoniciowych odcinków DNA jednej z chromatyd niesiostrzanych (ryc. 4B), konieczna jest ekspresja genu *RAD51* i jego paralogów *RAD51C* i *XRC* oraz genu *DMC1*. Białka

RAD51 i DMC1 są homologami bakteryjnej rekombinazy RecA, natomiast RAD51C i XRCC3 odgrywają prawdopodobnie rolę w montażu i stabilizacji białka RAD51. U drożdży białka te uczestniczą w prawidłowym parowaniu chromosomów homologicznych, oddziaływaniach pomiędzy niciami DNA, wymianie ich fragmentów oraz naprawie uszkodzeń DNA. Zgodnie z modelem ECD uważa się, że białka RAD51 i DMC1 opłaszczają wolny koniec 3' jednoniciowego DNA, powstającego po usunięciu końców 5' drugiej nici, i promują jego atak na nić DNA chromatydy niesiostrzanej (ryc. 4C). Białko DMC1, jak się sądzi, odgrywa istotną rolę w identyfikacji homologii DNA między nicią z 3' końcem a nienaruszoną nicią z chromatydy niesiostrzanej.

Homologi opisanych genów odnaleziono także u roślin, m.in. u *A. thaliana* (geny *AtRAD50*, *AtRAD51*, *AtXRCC3*, *AtDMC1*), *Oryza sativa* (gen *OsDMC1*, RiLIM15A i B oraz *Zea mays* i *Hordeum vulgare* (gen *HvDMC1*) [40]. U *A. thaliana* mutanty *rad51*, *rad51c* oraz *Xrcc3* charakteryzują się wysoką wrażliwością na czynniki uszkadzające DNA i są sterylne. Rozwój wegetatywny roślin *rad51c* oraz *xrcc3* jest normalny, jednakże ich pylniki pozbawione są ziaren pyłkowych [1,10]. Zaburzenia płodności wykazują też mutanty *dmc1*, u których nie tworzą się biwalenty, a efektem mejozy są wielokomórkowe poliady o zróżnicowanej zawartości DNA.

W 2002 roku doniesiono o identyfikacji ortologów drożdżowego genu *MND* w genomie pierwotniaków, ssaków oraz roślin, w tym *A. thaliana* [24]. Na tej podstawie autorzy sugerują, iż funkcja białka MND jest wysoce konserwatywna ewolucyjnie. Białko MND w komórkach drożdży jest zaangażowane najprawdopodobniej w proces naprawy DSB podczas pierwszych etapów procesu rekombinacji mejotycznej. Uczestniczy też w stabilizacji powstających heterodupleksów DNA. Domenichini i wsp. [20] wyizolowali mutantą rzodkiewnika pospolitego – *atmnd1-Δ1*, który charakteryzował się normalnym rozwojem wegetatywnym oraz morfogenezą kwiatu, jednakże wykazywał znaczne nieprawidłowości podczas pierwszej profazy mejotycznej. U roślin *atmnd1-Δ1* obserwowano bowiem fragmentację chromosomów, a następnie ich nierówną dystrybucję pomiędzy komórkami tworzącymi poliadę. Wysoka wrażliwość mutantów *atmnd1-Δ1* na promieniowanie  $\gamma$ , obserwowana zarówno w komórkach linii generatywnej, jak i somatycznych, zdaniem autorów świadczyć może o udziale białka MND w procesach naprawy uszkodzeń DNA także w komórkach dzielących się mitotycznie [20].

W kompleksach synaptonemalnych z białkami RAD51 i DMC1 kolokalizuje białko kodowane przez gen *RECQ HELICASES*. Jest to helikaza z rodziny RecQ, która uczestniczy w replikacji i rekombinacji DNA w późniejszych etapach naprawy pęknięć dwuniciowego DNA. U *A. thaliana* opisano 6 homologów tego genu. Roślina ze zmutowanym genem *AtRecQ14* charakteryzowała się zwiększoną wrażliwością na zniszczenia DNA oraz podwyższoną częstością rekombinacji *in planta* [6].

Do genów, które kontrolują proces naprawy DNA podczas *crossing-over* u drożdży, a których homologi odnaleziono u *A. thaliana*, należą też *MLH1*, *MEI1* oraz *ATM*. Gen *MLH1* u drożdży koduje białko odpowiedzialne za naprawę ewentualnych niedopasowań podczas wymiany odcinków chromatyd w procesie rekombinacji mejotycznej. Badania u *A. thaliana* wykazały, że mutacja w promotorowym regionie genu *AtMLH1* nie wpływa na poziom jego ekspresji, a homozygotyczne rośliny nie

wykazywały widocznych efektów fenotypowych. Natomiast mutanty *mei1* wykazują zaburzenia zarówno męskiej, jak i żeńskiej mejozy. Defekty objawiają się między innymi fragmentacją chromosomów, powstawaniem poliad oraz zredukowaną płodnością [27]. Białko MEI1 u *A. thaliana* zawiera na C-końcu pięć domen BRCA (BRCT). Domeny BRCA identyfikowano jak dotąd w białkach związanych z procesami naprawy DNA oraz molekułach kontrolujących cykl komórkowy.

W regulację czynników białkowych, bezpośrednio uczestniczących w rekombinacji DNA, zaangażowany jest produkt genu *ATM*, którego homolog występuje u *A. thaliana* (gen *AtATM*). Białko ATM jest składnikiem zarówno wczesnych, jak i późnych grudek rekombinacyjnych. Jest to kinaza białkowa, której aktywność indukują pęknięcia DNA, szczególnie podwójnych nici. Kinaza ATM fosforyluje białka biorące udział w naprawie pęknięć DNA, między innymi podczas mitozy i mejozy. Mutacje genu *AtATM* objawiały się wysoką podatnością roślin na promieniowanie gamma oraz specyficzne związki chemiczne niszczące strukturę DNA. Ponadto rośliny o genotypie *atatm* były częściowo sterylne, prawdopodobnie w wyniku nasilonej fragmentacji chromosomów i zaburzeń ich rozdziału podczas mejozy [23].

Badania u drożdży wskazują, że wytwarzanie dwu klasy produktów *crossing-over*, tj. CO I i CO II, kontrolowane jest dzięki ekspresji różnych genów. Molekułami obsługującymi szlak CO I są homologi bakteryjnego białka MutS – MSH4 (*MutS Homolog 4*) i MSH5 (*MutS Homolog 5*) (ryc. 4D). Tworzą one kompleks i razem z białkami Zip1, Zip2, Zip3 oraz MER3 zaliczane są do epistatycznej rodziny białkowej – ZMM. Mutacja genów *MSH4* i *MSH5* powoduje defekty w formowaniu synapsis chromosomów homologicznych podczas profazy I podziału mejotycznego oraz trzy- lub czterokrotną redukcję poziomu *crossing-over*. Również mutanty genu *mer3* wykazują obniżoną ilość CO, aczkolwiek mutacja ta nie wpływa na poziom formowania NCO. Ponadto opisywane mutanty nie wykazywały obecności takich intermedatów rekombinacji, jak: SEI oraz DHJ. Mazina i wsp. [32] wykazali, że białko MER3 ma aktywność helikazy i może uczestniczyć w stabilizacji molekuł uczestniczących w szlaku formowania podwójnej struktury Hollidaya (HDJ). Genetyczna analiza pozostałej grupy produktów *crossing-over* u opisanych mutantów drożdżowych wykazała ponadto, że nie podlegają one zjawisku interferencji [12].

Badania drożdży ze szczepu *Saccharomyces pombe* pozwoliły na zidentyfikowanie trzech genów, które są potencjalnie związane z generowaniem CO klasy II (ryc. 4E). Są to: *MUS81*, *MMS4* oraz *EME1*. Ich białkowe produkty wykazują aktywność endonukleazową i najprawdopodobniej są odpowiedzialne za cięcie oraz naprawę pęknięć DNA [29]. U *S. pombe* mutacja wszystkich trzech genów objawia się prawie całkowitą redukcją CO, zaburzeniami segregacji chromosomów i obniżeniem żywotności spor do zaledwie 1% w stosunku do typu dzikiego. Mutacja tych samych genów u *S. cerevisiae*, również wpływa na przebieg procesu rekombinacji i żywotność spor, ale w znacznie mniejszym stopniu aniżeli u *S. pombe* [29].

Jak dotąd wykazano, że w komórkach *Eukaryota* większość powstających CO należy do I klasy i jest zależna od interferencji, a w ich generowaniu biorą udział białka MSH4 oraz MSH5. Druga klasa CO II stanowi znacznie mniejszą grupę, nie podlega zjawisku

interferencji, a szlak jej biogenezy obsługiwany jest między innymi przez białka MUS81, MMS1 oraz EME1 [29]. Interesujący wydaje się fakt, że stosunek CO I do CO II jest różny u różnych organizmów. I tak na przykład u *S. pombe* wszystkie generowane CO wydają się należeć do II klasy CO, podczas gdy u *S. cerevisiae* większość wszystkich CO stanowią te należące do I klasy. Z kolei u *C. elegans* mutacja genów *MSH4* i *MSH5* całkowicie znosi powstawanie CO, co wskazuje, że u tych organizmów obecne są wyłącznie CO I klasy. U kręgowców sytuacja nie jest w pełni poznana, aczkolwiek u myszy i u człowieka zidentyfikowano geny należące do szlaków biochemicznych obu klas CO [35].

Intensywne badania prowadzone w ostatnich latach wykazały, że u rzodkiewnika obecne są homologi zarówno drożdżowego genu *MSH4*, jak i *MER3* [28, 35]. Analiza mutantów ujawniła ponadto, że u tego gatunku generowane są obie klasy CO, przy czym CO klasy I stanowią zdecydowaną większość. Badania Higgins i wsp. [28] pokazały, że mutacja genu *AtMSH4* nie wpływa na prawidłowy rozwój wegetatywny rośliny, ale powoduje znaczną redukcję jej płodności. Przyczyną obniżonej zdolności reprodukcyjnej tych roślin jest opóźnienie formowania synapsis chromosomów homologicznych oraz znaczny spadek ilości chiazmy – do 15% w stosunku do roślin typu dzikiego. Obniżenie liczby chiazmy (cytologiczny marker zajścia *crossing-over*) oraz nieregularny wzorec ich rozmieszczenia (marker interferencji) wskazuje, że powstałe chiazmy reprezentują niezależne od *MSH4* CO klasy II [28]. Również mutacja genu *MER3*, właściwego dla I klasy CO, powoduje podobne efekty fenotypowe jak u mutantów *atmsh4*. U roślin z genotypem *mer3* obserwowano bowiem znaczną redukcję płodności, zaburzenia mejozy, w tym silnie obniżony poziom większości, ale nie wszystkich produktów *crossing-over*. Wyniki te wskazują ponadto, że funkcja białka *MER3* jest wysoce konserwatywna ewolucyjnie [35].

Jak dotąd, nie zidentyfikowano w genomie *A. thaliana* homologów drożdżowych genów, których produkty białkowe uczestniczą w szlaku powstawania *crossovers* klasy II. Jednakże wyniki dotychczasowych badań genetycznych i molekularnych wskazują, że podczas mejozy u rzodkiewnika pospolitego występują, podobnie jak u drożdży *S. cerevisiae*, cząsteczki obsługujące oba szlaki procesu *crossing-over*.

W 2006 roku doniesiono o identyfikacji genu *PTD* (*PARTING DANCERS*), którego mutacja skutkuje bardzo podobnym fenotypem do opisanych powyżej przykładów. Rośliny *atptd* wykazują między innymi obniżoną płodność oraz redukcję liczby chiazmy w profazie I podziału mejotycznego. Nieliczne pozostałe chiazmy zajmują losową pozycję w mikrosporocytach, co wskazuje że najprawdopodobniej nie podlegają one zjawisku interferencji. Analiza molekularna genu *PTD* nie wykazała jego znaczącej homologii względem żadnego z drożdżowych genów rekombinacji. Sugeruje się zatem, że jego białkowy produkt pełni nieznaną dotąd rolę w formowaniu CO zależnych od interferencji [46].

Podsumowując, wyniki badań molekularnych wskazują, że u *A. thaliana* i prawdopodobnie także innych roślin okrytonasiennych, funkcjonują dwa niezależne szlaki formowania CO – zależnych i niezależnych od interferencji. Intensywne badania w tej dziedzinie owocują identyfikacją w genomie rzodkiewnika pospolitego homologów drożdżowych genów kontrolujących proces rekombinacji, jak również genów związanych z formowaniem CO, ale niespotykanych ani u drożdży, ani u i innych organizmów.

Niewykluczone zatem, że rośliny wykształciły nieco inny mechanizm biochemiczny rekombinacji genów podczas mejozy. Udowodnienie słuszności tej tezy wymaga jednakże dalszych badań.

#### 4. FUNKCJONOWANIE WRZECIONA KARIOKINETYCZNEGO

Odrębną funkcjonalnie grupę genów związanych z mejozą pylnikową stanowią te, których mutacja objawia się zaburzeniami w organizacji i funkcjonowaniu wrzeciona podziałowego. U mutantów tych genów procesy związane z kondensacją, koniugacją i rekombinacją chromosomów przebiegają prawidłowo. Efekty fenotypowe pojawiają się dopiero podczas segregacji chromosomów i chromatyd, co prowadzi do przypadkowego rozdzielania materiału genetycznego.

Jednym z genów kontrolujących prawidłowe funkcjonowanie wrzeciona kariokinetycznego jest *KATA/ATK1* (*Kinesin-like from Arabidopsis Thaliana A/Arabidopsis Thaliana Kinesin-like 1*). Gen ten koduje białko homologiczne do kinezyń [17]. Kinezyiny to białka motoryczne, które są strukturalnie i funkcjonalnie związane z komórkowym szkieletem mikrotubularnym. Jak powszechnie wiadomo, kinezyiny zaangażowane są w transport różnego rodzaju cargo na terenie komórki. Białka te ponadto odpowiedzialne są za wzajemną interakcję przestrzenną mikrotubul oraz być może – ich polimeryzację i depolimeryzację. Podczas podziałów komórkowych kinezyiny uczestniczą między innymi w wydłużaniu i stabilizacji wrzeciona kariokinetycznego, a także w przemieszczaniu chromosomów wzdłuż mikrotubul podczas kariokinezy [25, 37]. Mutacja genu *KATA/ATK1* u rzodkiewnika powoduje wyłącznie męskosterylność, która wynika najprawdopodobniej z zaburzeń podczas rozdziału chromosomów w dzielących się mikrosporocytach. Fenotypowe efekty mutacji *KATA/ATK1* widoczne są od metafazy I podziału mejotycznego, kiedy część chromosomów nie zajmuje prawidłowej pozycji równikowej względem wrzeciona podziałowego. W rezultacie podczas anafazy I następują zaburzenia rozchodzenia się chromosomów homologicznych, przy czym niektóre z bivalentów wcale nie ulegają rozdzieleniu [17]. Badania cytologiczne roślin *kata/atk1* ujawniły, że w porównaniu z roślinami typu dzikiego, już w metafazie I na obszarze wrzeciona dzielących się mikrosporocytów występuje mniejsza ilość tubuliny, mikrotubule wykazują znaczną dezorganizację, a bieguny wrzeciona są zdestabilizowane [17].

W genomie *A. thaliana* ta sama grupa badawcza zidentyfikowała homolog genu *KATA/ATK1* – *ATK5*, który wykazuje 95% podobieństwa do *KATA/ATK1* na poziomie sekwencji aminokwasów w białku. Dwa inne geny wykazujące homologię do genów kodujących kinezyiny u *Arabidopsis* to *KATB* i *KATC*, które charakteryzują się odpowiednio 57% i 56% podobieństwem sekwencji aminokwasowych do *KATA/ATK1*. Wymienione geny kodują prawdopodobnie inne białka z licznej rodziny kinezyń rzodkiewnika pospolitego [16].

## 5. CYTOKINEZA POSTMEJOTYCZNA

Aby podział komórki był kompletny, zarówno w mitozie jak i w mejozie, po podziale jądra komórkowego (kariokinezie) musi dojść do rozdzielenia cytoplazmy pomiędzy komórki potomne (cytokinezy). Cytokineza zachodząca po mejozie pylnikowej u roślin okrytonasiennych odróżnia się od cytokinezy mitotycznej kilkoma charakterystycznymi cechami (ryc. 1). Po pierwsze, pomiędzy nowopowstałymi haploidalnymi mikrosporami syntetyzowana jest specyficzna ściana kalozowa, zbudowana z polimeru  $\beta$ -1-3-glukanu. Ściana kalozowa przez pewien czas izoluje tetradę młodych mikrospor, a następnie ulega lizie, co doprowadza do rozpadu tetrady i uwolnienia mikrospor. Ponadto, od dawna wiadomo, że zależnie od przynależności systematycznej, wyróżnia się dwa typy cytokinezy u roślin okrytonasiennych: cytokinezę sukcesywną i równoczesną. U roślin jednoliściennych mikrosporocyty po kariokinezie przechodzą tzw. cytokinezę sukcesywną, która charakteryzuje się dwuetapowym formowaniem ściany. Ściana kalozowa syntetyzowana jest najpierw po pierwszym podziale mejotycznym pomiędzy komórkami diady, a następnie pomiędzy mikrosporami w końcowych etapach drugiego podziału mejotycznego. Z kolei większość roślin dwuliściennych przechodzi po mejozie pylnikowej cytokinezę równoczesną, podczas której synteza wszystkich ścian ma miejsce dopiero po drugim podziale mejotycznym.

Inną charakterystyczną cechą cytokinezy postmejotycznej w pylniku, odróżniającą ją od cytokinezy postmitotycznej, jest odmienna organizacja elementów cytoszkieletu, które decydują o późniejszym wzorcu podziału cytoplazmy. W większości komórek somatycznych podczas fazy  $G_2$  interfazy występuje tzw. pierścień preprofazowy (ang. *PreproPhase Band* – PPB), który dokładnie wyznacza plan przyszłej cytokinezy. Jest to struktura utworzona z połączonych ze sobą mikrotubul i mikrofilamentów, które tworzą pierścień okalający jądro komórkowe. Powstający po mitozie fragmoplast zakłada się dokładnie w tym samym miejscu dzielącej się komórki, w którym w końcowym okresie interfazy występował pierścień preprofazowy [51]. Pierścienie preprofazowe nie tworzą się jednakże w komórkach dzielących się mejotycznie. Podczas podziału mejotycznego płaszczyznę cytokinezy wyznacza inna, specyficzna organizacja cytoszkieletu. Po I i II podziale mejotycznym (cytokineza sukcesywna) lub tylko po II podziale mejotycznym (cytokineza równoczesna) jądra komórkowe przyszłych mikrospor zastają otoczone przez mikrotubule, które promieniście odchodzą od błony jądrowej. Powstają w ten sposób struktury nazywane jądrowymi domenami cytoplazmatycznymi (ang. *Nuclear Cytoplasmic Domains* – NCDs) lub też domenami sporowymi. Obszary styku takich domen wyznaczają jednocześnie przyszłe granice komórki oraz miejsce odkładania się ściany kalozowej po zakończeniu cytokinezy [13].

Rzodkiewnik należy do licznej grupy roślin, u których podczas mikrosporoogenezy występuje cytokineza równoczesna. Zaburzenia w przebiegu tego procesu zidentyfikowano wśród licznych mutantów tej rośliny. Klasycznym już przykładem są rośliny z mutacją genu *STUD/TETRASPORE* (*STD/TES*) [30]. U roślin *stud/tetraspore* kariokineza przebiega prawidłowo, w telofazie II podziału mejotycznego powstają 4 haploidalne jądra. Fenotypowy efekt mutacji genu *STUD/TETRASPORE* objawia się

natomiast częściowym lub kompletnym brakiem cytokinezy postmejotycznej. W rezultacie u roślin o genotypie *std/tetraspore* zamiast tetrady mikrospor powstaje jedna duża, czterojądrowa mikrospora („tetraspora”). Interesujące, że takie anormalne mikrospory przechodzą dalszy rozwój. Każde z haploidalnych jąder jest zdolne do całkowicie niezależnej mitozy, z cytokinezą włącznie, co wskazuje że pierwsza mitozą pyłkowa (PM I) jest procesem kontrolowanym przez czynniki wewnętrzne obecne w mikrosporze. W wielu przypadkach dochodzi też do podziału komórki generatywnej (PMII) i ostatecznie powstają duże ziarna pyłkowe zawierające cztery jądra wegetatywne i do ośmiu jąder plemnikowych. Podczas kiełkowania z ziaren tych jednakże wyrasta tylko jedna łagiewka pyłkowa [30].

W 2003 roku Yang i wsp. dokonali analizy molekularnej genu *STD/TES*, którego mutacja powoduje opisany powyżej fenotyp. Wykazano, iż gen ten koduje jedną z 61 zidentyfikowanych w genomie *A. thaliana* kinezyn – AtF7K15.60. Białko *STD/TES* zawiera na N-końcu domenę homologiczną do domeny motorycznej kinezy, natomiast na C-końcu jego sekwencja wykazuje dużą homologię do mało licznej rodziny kinezyn roślinnych, do której należą między innymi białka HINKEL (HIK) u *A. thaliana* oraz NACK1 i NACK2 u tytoniu. Białka te zaangażowane są w organizację mikrotubul podczas cytokinezy mitotycznej u opisanych gatunków [51].

Immunocytochemiczna lokalizacja mikrotubul w mikrosporocytach u roślin dzikiego typu oraz u mutantu *std/tes* wykazała, że u tego ostatniego nie dochodzi do powstania jądrowych domen cytoplazmatycznych [51]. W związku z tym autorzy sugerują, że kinezyzna kodowana przez gen *STD/TES* jest konieczna do formowania NCDs, a tym samym do prawidłowego przebiegu postmejotycznej cytokinezy w pylnikach *A. thaliana*.

## 6. REGULACJA EKSPRESJI GENÓW SPECYFICZNYCH DLA PRZEBIEGU MIKROSPOROGENEZY

Odrębną grupę molekuł odpowiedzialnych za precyzyjną koordynację wydarzeń związanych z wejściem w mejozę oraz przebieg samej mejozy stanowią czynniki transkrypcyjne oraz elementy maszynerii kontrolującej przebieg cyklu komórkowego.

Jak dotąd zidentyfikowano niewielką liczbę roślinnych czynników transkrypcyjnych specyficznych dla procesu mejozy. Większość z nich kodowana jest przez geny, których mutacja powoduje częściową lub całkowitą sterility roślin. Jednym z takich genów jest *SPOROCTELESS (SPL)/NOZZLE (NZZ)*, który został zidentyfikowany i scharakteryzowany w 1999 roku przez niezależne od siebie dwie grupy badawcze u *A. thaliana* [50, 41]. Produkt białkowy genu (*SPL*)/*NZZ* jest niezbędny do prawidłowej inicjacji sporogenezy zarówno w męskich, jak i żeńskich organach generatywnych. Podczas rozwoju pylnika mutantów *spl/nzz* obserwuje się zaburzenia w różnicowaniu komórek ściany i tkanki archesporialnej, co w efekcie objawia się brakiem wyróżnianego endotecjum, tapetum oraz mikrosporocytów [50]. Analiza molekularna genu



(*SPL*)/*NZZ* wykazała, że koduje on białko jądrowe wykazujące podobieństwo do czynników transkrypcyjnych z rodziny MADS box. W związku z tym autorzy sugerują, że białkowy produkt genu *SPL/NZZ* jest jednym z czynników transkrypcyjnych regulujących ekspresję genów zaangażowanych w przejście *A. thaliana* ze stanu wegetatywnego w generatywny [50].

Czynnikiem transkrypcyjnym *A. thaliana*, kontrolującym ekspresję genów specyficznych tylko dla mejozy pylnikowej jest białko MALE MEIOCYTE DEATH 1 (*MMD1*) [52]. Białko to jest homologiczne do czynników transkrypcyjnych należących do klasy PHD-finger (ang. *Plant Homeo Domain-finger*), tj. zawierających roślinną homeodomenę zmodyfikowanego palca cynkowego. Czynniki z tej klasy zidentyfikowano zarówno u człowieka, drożdży, jak i wielu roślin wyższych, a ich wspólną cechą jest obecność sekwencji podobnej do motywu palca cynkowego. Mutacja genu *MMD1* powoduje degenerację mejocytów już pod koniec profazy I podziału mejotycznego. Mikrosporcocyty w tym okresie wykazywały oznaki apoptozy, obserwowano w nich bowiem fragmentację chromatyny i defekty w organizacji chromosomów oraz kurczenie się cytoplazmy. Śmierć mikrosporcocytów u roślin *mmd1* następowała jeszcze przed cytokinezą postmejotyczną. Możliwe, że rola białka *MMD1* polega na regulacji ekspresji genów mejotycznych poprzez remodelowanie chromatyny i/lub udział w transkrypcji tych genów [52].

W 2003 roku Reddy i wsp. [38] u *A. thaliana* opisali innego całkowicie męskosterylnego, lecz żeńsko-płodnego mutantu, który został nazwany *duet*. Mutant charakteryzował się zaburzeniami w zachowaniu chromosomów podczas końcowych stadiów I profazy mejozy pylnikowej. W mikrosporcocytach mutantów obserwowano przedwczesną separację chromosomów, która miała miejsce już podczas pachytenu i diplotenu. Ponadto w metafazie I zamiast pojedynczych chromosomów w dzielących się komórkach widoczna była jedynie rozproszona masa DNA [38]. Analiza molekularna genu *DUET* ujawniła, że wykazuje on ekspresję tylko w mikrosporcocytach, a kodowane przez niego białko zawiera wspomnianą domenę PHD-finger. Obecność tej domeny wskazuje, iż białko *DUET* może pełnić istotną rolę w regulacji organizacji chromatyny oraz transkrypcji genów podczas mikrosporoogenezy [38].

Kolejnym zidentyfikowanym regulatorem transkrypcji, który jednakże jest specyficzny wyłącznie dla rozwoju komórek męskiej linii generatywnej, jest białko kodowane przez gen *MALE STERILITY 1* (*AtMS1*) [47]. Mutanty *ms1* są całkowicie męskosterylne, bowiem tuż po uwolnieniu z tetrady następuje degeneracja ich mikrospor. Proces ten wydaje się być efektem braku prawidłowej interakcji mikrospor z komórkami tapetum. Analiza cytologiczna mutantów ujawniła bowiem, że w komórki tapetum ulegają przedwczesnej, anormalnej wakuolizacji. Badania molekularne wykazały, że białko *MS1* jest homologiczne do czynników transkrypcyjnych należących do klasy PHD-finger. W związku z tym sugeruje się, że odgrywa ono kluczową rolę w regulacji ekspresji genów związanych przede wszystkim z rozwojem tapetum, a pośrednio także z rozwojem męskiego gametofitu u *Arabidopsis* [47].

Przedwczesną degenerację tapetum i mikrospor, tj. tuż po rozpadzie tetrad, opisano też u mutantu *aborted microspore 1* (*ams1*) [42]. Mutant charakteryzował się

całkowitą sterylnością męską – pylniki kompletnie pozbawione były żywotnych ziaren pyłku. Analiza molekularna genu *AMS1* wykazała, że ma on podstawową domenę wiążącą DNA oraz motyw helix-pętla-helix (HLH), co jest charakterystyczne dla grupy czynników transkrypcyjnych z rodziny MYB. Czynniki transkrypcyjne z rodziny MYB są fosfoproteinami o krótkim okresie półtrwania, które lokalizuje się przede wszystkim na terenie jądra komórkowego. Wykazują one dużą specyficzność względem zespołów genowych i/lub pojedynczych genów w różnych typach komórek roślin i zwierząt. Generalnie, rola czynników transkrypcyjnych z rodziny MYB polega na kontroli ekspresji genów odpowiedzialnych za takie procesy komórkowe jak przebieg cyklu komórkowego czy apoptoza. Przypuszcza się, że białko *AMS1* odgrywa zasadniczą rolę w regulacji rozwoju komórek tapetum oraz przebiegu postmejotycznych etapów cyklu życiowego mikrospor *Arabidopsis* [42].

Fenotypy odrębnej grupy mutantów rzodkiewnika pospolitego wydają się być efektem zaburzeń w regulacji cyklu komórkowego podczas mejozy lub tuż po jej zakończeniu.

Mutanty *tam1* (*tardy asynchronous meiosis 1*) są wrażliwe na temperaturę i wykazują asynchroniczność mejozy w obrębie pylnika. U roślin tych dochodzi do opóźnienia cyklu komórkowego zarówno w pachytenie, jak i w okresie drugiego podziału mejotycznego. U rośliny *tam1* po zakończeniu kariokinez i powstaniu czterech haploidalnych jąder dochodzi tylko do pojedynczej cytokinezy, w wyniku której ściana kalozowa dzieli tetradę na dwie, a nie jak w przypadku roślin typu dzikiego, na cztery komórki. Jako ostateczny produkt mejozy najczęściej powstają diady zbudowane z dwujądrowych mikrospor. W rzadkich przypadkach, kiedy dochodzi do normalnej syntezy sporodermi, wytwarzane są tzw. „diady pyłkowe”, tj. dwie dwukomórkowe struktury zamknięte we wspólnej ścianie komórkowej [31]. Gen *TAM1* koduje cyklinę typu A-CYCA1;2. W mikrosporocytach najwyższy poziom tego białka obserwowano w pachytenie, było ono natomiast niewykrywalne od końca profazy I do telofazy II. Z uwagi na efekty fenotypowe sugeruje się, że produkowane podczas profazy I białko CYCA1;2 reguluje nie tylko I podział mejotyczny, ale także – w sposób pośredni lub bezpośredni – II podział mejotyczny [44].

Istotną rolę w przebiegu mejozy u roślin prawdopodobnie odgrywa też gen *MS5/TMD1/POLLENLESS3* [16]. Jak dotąd wykazano jedynie, że gen *MS5/TMD1/POLLENLESS3* wykazuje pewną homologię do dwóch białek: 1) SCP1 będącego składnikiem kompleksu synaptonemalnego u szczura oraz 2) regulatorowej podjednostki kinazy zależnej od cyklina u *Xenopus*. Nie jest to homologia pełna, jednakże na podstawie czasowego i przestrzennego wzorca ekspresji genu *MS5/TMD1/POLLENLESS3* sugeruje się, że białko to uczestniczy w regulacji cyklu życiowego mikrosporocytów *A. thaliana*.

Mutacja genu *MS5/TMD1/POLLENLESS3* fenotypowo ujawnia się dopiero po zakończeniu mikrosporogenezy. Powstałe po mejozie haploidalne mikrospory rozpoczynają kolejny podział, który jednakże nie jest poprzedzony replikacją DNA. Do jednochromatydowych, mających 1 centromer chromosomów mogą się zatem przyczepić włókna wrzeciona kariokinetycznego z obydwu biegunów komórki. W rezultacie chromosomy są nienaturalnie „rozciągane” i pozostają przyczepione do wrzeciona bądź

są przypadkowo rozdzielane do jąder potomnych. Jeżeli dochodzi do odtworzenia jąder interfazowych, zawierają one różne liczby chromosomów (chromatyd). W opisanych przypadkach dochodzi do powstania struktur złożonych nawet z ośmiu mikrospor [16].

Zatrzymanie cyklu komórkowego większości mikrosporocytów po I podziale mejotycznym jest efektem mutacji genu *DSY10*. Wśród efektów fenotypowych mutacji tego genu opisano też: asynchroniczność mejozy w pylnikach, rozpad bivalentów pod koniec profazy I, nieprawidłowy rozdział chromosomów podczas anafazy I. Produktem mejozy u roślin z genotypem *dys10* są nieliczne tetrazy mikrospor o różnej ilości jąder komórkowych [14]. Jak dotąd nie analizowano molekularnie i genetycznie mutacji *dys10*. Na podstawie cytologicznej analizy mutantów przypuszcza się, że gen *DSY 10* pełni istotną rolę w regulacji cyklu komórkowego mikrosporocytów rzodkiewnika [14].

Wyłącznie męskosterylne są rośliny *A. thaliana* ze zmutowanym genem *ASK1* (*ARABIDOPSIS SKP1-LIKE*). U roślin tych produktem mejozy pylnikowej były wielokomórkowe „poliady”, charakteryzujące się zróżnicowaną zawartością DNA w komórkach [54]. Pierwsze zaburzenia cytologiczne w mikrosporocytach mutantów *ask1-1* mają jednakże miejsce już na przełomie leptotenu i zygotenu. W jądrach tych komórek m.in. stwierdzono defekty w przestrzennym związku pomiędzy chromosomami homologicznymi, nie obserwowano też charakterystycznej dla tego okresu wędrówki jąderka na peryferia jądra [45]. Głównym fenotypowym efektem mutacji *ask1-1* były zaburzenia w segregacji chromosomów podczas anafazy I, włącznie z tym, iż niektóre bivalenty w ogóle nie ulegały rozdziałowi. Nieprawidłowości obserwowano także podczas anafazy II, kiedy nie dochodziło do rozdziału siostrzanych chromatyd [49]. Ponadto w metafazie i anafazie I podziału mejotycznego stwierdzono wydłużenie wrzeciona kariokinetycznego mikrosporocytów. Efekty mutacji genu *ASK1* potwierdzono nie tylko w komórkach linii generatywnej. Homozygoty *ask1-1*, oprócz nieprawidłowości w budowie kwiatów, cechowały się mniejszymi rozmiarami liści rozetkowych oraz międzywęzli, co jest wynikiem mniejszej liczby komórek w tych strukturach [53].

Molekularna analiza genu *ASK1* wykazała, że jest on homologiem ludzkiego i drożdżowego genu *SKP1*. Białko SKP stanowi kluczowy element kompleksu ligazy SCF typu E3, która reguluje cykl życiowy komórek somatycznych poprzez ubikwitynację białek przeznaczonych do degradacji w proteasomach. Istotnie, białko ASK1 jest komponentem ligaz ubikwitynowych E3 typu SCF (*Skp1-Cullin-F-box*), które piętnują określone białka do degradacji w proteasomach typu 26S [45]. Jak wiadomo, profaza I podziału mejotycznego jest wypadkową zdarzeń następujących po sobie w ściśle określonej kolejności i czasie. W związku z tym sugeruje się, że białko ASK1 może być elementem maszynierii proteolitycznej, która reguluje zasobność puli białek uczestniczących w poszczególnych stadiach pierwszej profazy mejotycznej. U rzodkiewnika ekspresję konstruktu GFP-ASK1 obserwowano podczas całej profazy I podziału mejotycznego, aczkolwiek najwyższy jego poziom widoczny był w okresie od leptotenu do pachytenu. Wyniki te potwierdzają obserwacje mikrosporocytów roślin o genotypie *ask1-1*, w których pierwsze fenotypowe efekty mutacji genu *ASK1* widoczne były właśnie w tym okresie profazy I. Jest to okres koniugacji i rekombinacji chromosomów homologicznych. Wydaje się zatem, że białko ASK1 jest szczególnie zaangażowane w prawidłowy przebieg procesu rekombinacji podczas mikrosporoogenezy [45]. Biorąc

pod uwagę mnogość białek uczestniczących w *crossing-over* zakłada się, iż w mikrosporocytach istnieje precyzyjny mechanizm odpowiedzialny za degradację cząsteczek uczestniczących w jednym z etapów rekombinacji, aby umożliwić działanie białek zaangażowanych w kolejny etap tego procesu.

W genomie *A. thaliana* zidentyfikowano jak dotąd 21 genów *ASK*, przy czym najlepiej poznano opisany powyżej gen *ASK1*. Ostatnie badania Zhao i wsp. [54] wykazały, że białko, kodowane przez inny gen z rodziny *ASK* - *ASK2*, wykazuje ponad 75% homologii do *ASK1* i podobnie jak ono asocjuje z cząsteczkami uczestniczącymi w procesach proteolitycznej degradacji białek. Wzór ekspresji genów *ASK1* i *ASK2* jest zasadniczo podobny, aczkolwiek ekspresja genu *ASK2* ma nieco niższy poziom aniżeli genu *ASK1* [54]. Defekty w procesie rekombinacji u mutantów *ask1* wskazują, że poziom ekspresji genu *ASK2* jest zbyt niski, aby zniwelować efekty tej mutacji, lub też białko *ASK2* ma inne funkcje aniżeli *ASK1*. Zhao i wsp. [54] wykazali, że rzeczywiście podwyższenie poziomu ekspresji genu *ASK2* tylko częściowo znosi efekty mutacji genu *ASK1* podczas mejozy pylnikowej. W związku z tym autorzy sugerują, że białko *ASK2* pełni nieco odmienną rolę aniżeli białko *ASK1* i nie jest zdolne do jego zastąpienia podczas mejozy pylnikowej u *Arabidopsis*.

## ZAKOŃCZENIE

Mejoza jest procesem o ogromnym znaczeniu dla rozwoju życia na Ziemi. Wiele aspektów tego wyjątkowego podziału komórek jest wspólnych i silnie konserwatywnych ewolucyjnie w świecie żywym, niezależnie od pozycji systematycznej organizmów. Intensywny rozwój metod biologii molekularnej oraz powszechne zastosowanie technik uzyskiwania mutantów owocują identyfikacją licznych genów kontrolujących złożoną sieć procesów związanych z podziałem mejotycznym. Modelowe organizmy wykorzystywane w badaniach mejozy, a zwłaszcza procesu rekombinacji genetycznej, to przede wszystkim drożdże, *Caenorhabditis elegans* oraz rzodkiewnik pospolity. Dzięki wspomnianej już konserwatywności ewolucyjnej molekularnych mechanizmów podziału mejotycznego, możliwe stało się identyfikowanie i ustalanie stopnia homologii licznych genów mejotycznych. Jednoczesna analiza cytologiczna uzyskanych mutantów w ogromnym stopniu przyczynia się do precyzyjnego ustalenia wpływu mutacji na cały organizm, a dzięki temu pozwala na ustalenie potencjalnej funkcji genu. Badania genetycznego podłoża mejozy roślinnej z pewnością przyczynią się również do poszerzenia informacji na temat molekularnej kontroli procesu wytwarzania gamet, nie tylko u roślin.

## LITERATURA

- [1] ABE K, OSAKABE K, NAKAYMA S, ENDO M, TAGIRI A, TODORIKI S, ICHIKAWA H, TOKI S. *Arabidopsis RAD51C* gene is important for homologous recombination in meiosis and mitosis. *Plant Physiol* 2005; **139**: 896–908.
- [2] ANDERSON LK, STACK SM. Meiotic recombination in plants. *Curr Genomics* 2002; **3**: 507–525.
- [3] ARMSTRONG SJ, FRANKLIN FCH, JONES GH. Nucleolus-associated telomere clustering and pairing precede meiotic chromosome synapsis in *Arabidopsis thaliana*. *J Cell Sci* 2001; **114**: 4207–4217.
- [4] ARMSTRONG SJ, CARYL AP, JONES GH, FRANKLIN FCH. *Asyl*, a protein required for meiotic chromosome synapsis, localizes to axis-associated chromatin in *Arabidopsis* and *Brassica*. *J Cell Sci* 2002; **115**: 3645–3655.
- [5] AZUMI Y, LIU D, ZHAO D, LI W, WANG G, HU Y, MA H. Homolog interaction during meiotic prophase I in *Arabidopsis* requires the *SOLO DANCERS* gene encoding a novel cyclin-like protein. *EMBO J* 2002; **21**: 3081–3095.
- [6] BAGHERIEH-NAJJAR MB, DE VRIES OM, DIJKWEL PP. *Arabidopsis RecQ1A* suppresses homologous recombination and modulates DNA damage responses. *Plant J* 2005; **43**: 789–798.
- [7] BAI X, PEIRSON BN, DONG F, XUE C, MAKAROFF CA. Isolation and characterization of *SYN1*, a *RAD21*-like gene essential for meiosis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1999; **11**: 417–430.
- [8] BHATT AM, LISTER C, PAGE T, FRANSZ P, FINDLAY K, JONES GH, DICKINSON HG, DEAN C. The *DIF1* gene of *Arabidopsis* is required for meiotic chromosome segregation and belongs to the *REC8/RAD21* cohesin gene family. *Plant J* 1999; **19**: 463–472.
- [9] BISHOP DK, ZICKLER D. Early decision; meiotic crossover interference prior to stable strand exchange and synapsis. *Cell* 2004; **117**: 9–15.
- [10] BLEUYARD JY, WHITE CI. The *Arabidopsis* homologue of *Xrcc3* plays essential role in meiosis. *EMBO J* 2004; **23**: 439–449.
- [11] BLEUYARD JY, GALLEO ME, WHITE CI. Meiotic defects in the *Arabidopsis rad50* mutant point to conservation of MRX complex function in early stages of meiotic recombination. *Chromosoma* 2004; **113**: 197–203.
- [12] BÖRNER GV, KLECKNER N, HUNTER N. Crossover/noncrossover differentiation, synaptonemal complex formation, and regulatory surveillance at the leptotene/zygotene transition of meiosis. *Cell* 2004; **117**: 29–45.
- [13] BROWN RC, LEMMON BE. The cytoskeleton and spatial control of cytokinesis in the plant life cycle. *Protoplasma* 2001; **215**: 35–49.
- [14] CAI X, MAKAROFF CA. The *dsy10* mutation of *Arabidopsis* results in desynapsis and a general breakdown in meiosis. *Sex Plant Rep* 2001; **14**: 63–67.
- [15] CARYL AP, ARMSTRONG SJ, JONES GH, FRANKLIN FCH. A homologue of the yeast *HOP1* gene is inactivated in the *Arabidopsis* meiotic mutant *asyl*. *Chromosoma* 2000; **109**: 62–71.
- [16] CARYL AP, JONES GH, FRANKLIN FCH. Dissecting plant meiosis using *Arabidopsis thaliana* mutants. *J. Exp Bot* 2003; **54**: 25–38.
- [17] CHEN C, MARCUS A, LI W, HU Y, CALZADA J-PV, GROSSNIKLAUS U, CYR RJ, MA H. The *Arabidopsis ATK1* gene is required for spindle morphogenesis in male meiosis. *Development* 2002; **129**: 2401–2409.
- [18] COPENHAVER GP. Plant genetics: when not to interfere. *Curr Biol* 2005; **15**: 290–291.
- [19] DE LOS SANTOS T, HUNTER N, LEE C, LARKIN B, LOIDL J, HOLLINGSWORTH NM. The *Mus81/Mms4* endonuclease acts independently of double-Holiday junction resolution to promote a distinct subset of crossovers during meiosis in budding yeast. *Genetics* 2003; **164**: 81–84.
- [20] DOMENICHINI S, RAYNAUD C, NI DA, HENRY Y, BERGOUNIOUX C. *Atmnd1-D1* is sensitive to gamma-irradiation and defective in meiotic DNA repair. *DNA Repair* 2006; **5**: 455–464.
- [21] DONG F, CAI X, MAKAROFF CA. Cloning and characterization of two *Arabidopsis* genes that belong to the *RAD51/REC8* family of chromosome cohesin proteins. *Gene* 2001; **271**: 99–108.
- [22] GAJEWSKI W. Genetyka klasyczna i molekularna. PWN W-wa; 1983.
- [23] GARCIA V, BRUCHET H, CAMESCASSE D, GRANIER F, BOUCHEZ D, TISSIER A. *AtATM* is essential for meiosis and the somatic response to DNA damage in plants. *Plant Cell* 2003; **15**: 119–132.
- [24] GERTON JL, DeRISI JL. *Mnd1p*: an evolutionarily conserved protein required for meiotic recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 6896–6900.

- [25] GOLDSTEIN LSB. Molecular motors: from one motor many tails to one motor many tails. *Trends Cell Biol* 2001; **11**: 477–482.
- [26] GRELON M, VEZON D, GENDROT G, PELLETIER G. *AtSPO11-1* is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *EMBO J* 2001; **20**: 589–600.
- [27] GRELON M, GENDROT G, VEZON D, PELLETIER G. The *Arabidopsis MEI1* gene encodes a protein with five BRCT domains that is involved in meiosis-specific DNA repair events independent of SPO11-induced DSBs. *Plant J* 2003; **35**: 465–475.
- [28] HIGGINS JD, ARMSTRONG SJ, FRANKLIN FC, JONES GH. The *Arabidopsis* MutS homolog AtMSH4 functions at an early step in recombination: evidence for two classes of recombination in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 2004; **18**: 2557–2570.
- [29] HOLLINGSWORTH NM, BRILL SJ. The Mus81 solution to resolution: generating meiotic crossovers without Holliday junctions. *Genes Dev* 2004; **18**: 117–125.
- [30] HÜLSKAMP M, PAREKH NS, GRINI P, SCHNEITZ K, ZIMMERMANN I, LOLLE SJ, PRUITT RE. The *STUD* gene is required for male-specific cytokinesis after telophase II of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Dev Biol* 1997; **187**: 114–124.
- [31] MAGNARD JL, YANG M, CHEN YC, LEARY M, McCORMICK S. The *Arabidopsis* gene *tardy asynchronous meiosis* is required for the normal pace and synchrony of cell division during male meiosis. *Plant Physiol* 2001; **127**: 1157–1166.
- [32] MAZINA OM, MAZIN AV, NAKAGAWA T, KOLODNER RD, KOWALCZYKOWSKI SC. *Saccharomyces cerevisiae* Mer3 helicase stimulates 3'-5' heteroduplex extension by Rad51; implications for crossover control in meiotic recombination. *Cell* 2004; **117**: 47–56.
- [33] MERCIER R, VEZON D, BULLIER E, MOTAMAYOR JC, SELLIER A, LEFEVRE F, PELLETIER G, HORLOW C. Switch1 (Swi1): a novel protein required for the establishment of sister chromatid cohesion and for bivalent formation at meiosis. *Genes Dev* 2001; **15**: 1859–1871.
- [34] MERCIER R, ARMSTRONG SJ, HORLOW C, JACKSON NP, MAKAROFF CA, VEZON D, PELLETIER G, JONES GH, FRANKLIN FC. The meiotic protein SWI1 is required for axial element formation and recombination initiation in *Arabidopsis*. *Development* 2003; **130**: 3309–3318.
- [35] MERCIER R, JOLIVET S, VEZON D, HUPPE E, CHELYSHEVA L, GIOVANNI M, NOGUE F, DOUTRIAUX MP, HORLOW C, GRELON M, MEZARD C. Two meiotic crossover classes cohabit in *Arabidopsis*: one is dependent on *MER3*, whereas the other one is not. *Curr Biol* 2005; **15**: 692–701.
- [36] MOTAMAYOR JC, VEZON D, BAJON C, SAUVANET A, GRANDJEAN O, SIDDIQI I, GANESH G, GROSSNICLAUS U, SUBBIAH V. The *DYAD* gene is required for progression through female meiosis in *Arabidopsis*. *Development* 2000; **127**: 197–207.
- [37] REDDY ASN. Molecular motors and their functions in plants. *Int Rev Cytol* 2001; **204**: 97–178.
- [38] REDDY TV, KAUR J, AGASHE B, SUNDARESAN V, SIDDIQI I. The *DUET* gene is necessary for chromosome organization and progression during male meiosis in *Arabidopsis* and encodes a PHD finger protein. *Development* 2003; **130**: 5975–5987.
- [39] SCHOMMER C, BEVEN A, LAWRENSON T, SHAW P, SABLowski R. *AHP2* is required for bivalent formation and for segregation of homologous chromosomes in *Arabidopsis* meiosis. *Plant J* 2003; **36**: 1–11.
- [40] SCHWARZACHER T. Meiosis, recombination and chromosomes: a review of gene isolation and fluorescent *in situ* hybridization data in plants. *J Exp Bot* 2003; **54**: 11–23.
- [41] SCHIEFHALER U, BALASUBRAMANIAN S, SIEBER P, CHEVALIER D, WISMAN E, SCHNEITZ K. Molecular analysis of *NOZZLE*, a gene involved in pattern formation and early sporogenesis during sex organ development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 11664–11669.
- [42] SORENSEN A-M, KRÖBER S, UNTE US, HUIJSER P, DEKKER K, SAEDLER H. The *Arabidopsis* *ABORTED MICROSPORES (AMS)* gene encodes a MYC class transcription factor. *Plant J* 2003; **33**: 413–423.
- [43] SZOSTAK JW, ORR-WEAVER TL, ROTHSTEIN RJ, STAHL FW. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 1983; **33**: 25–35.
- [44] WANG Y, MAGNARD JL, McCORMICK S, YANG M. Progression through meiosis I and meiosis II in *Arabidopsis* anthers is regulated by an A-type cyclin predominately expressed in prophase I. *Plant Physiol* 2004; **136**: 4127–4135.
- [45] WANG Y, YANG M. The *ARABIDOPSIS SKP1-LIKE (ASK1)* protein acts predominately from leptotene to pachytene and repress homologous recombination in male meiosis. *Planta* 2006; **223**: 613–167.
- [46] WIJERATNE AJ, CHEN C, ZHANG W, TIMOFEJEVA L, MA H. The *Arabidopsis thaliana* *PARTING DANCERS* gene encoding a novel protein is required for normal meiotic homologous recombination. *Mol Biol Cell* 2006; **17**: 1331–1343.

- [47] WILSON ZA, MORROLL SM, DAWSON J, SWARUP R, TIGHE PJ. The *Arabidopsis* MALE STERILITY 1 (*MS1*) gene is transcriptional regulator of male gametogenesis, with homology to the PHD-finger family of transcriptional factors. *Plant J* 2001; **28**: 27–39.
- [48] WILSON ZA, YANG C. Plant gametogenesis: conservation and contrasts in development. *Reproduction* 2004; **128**: 483–492.
- [49] YANG M, HU Y, LODHI M, McCOMBIE WR, MA H. The *Arabidopsis* *SKP1-LIKE* gene is essential for male meiosis and may control homologue separation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 11416–11421.
- [50] YANG WC, YE D, XU J, SUNDARESAN V. The *SPOROCTELESS* gene of *Arabidopsis* is required for initiation of sporogenesis and encodes a novel nuclear protein. *Genes Dev* 1999; **13**: 2108–2117.
- [51] YANG C-Y, SPIELMAN M, COLES JP, LI Y, GHELANI S, BOURDON V, BROWN RC, LEMMON BE, SCOTT RJ, DICKINSON HG. *TETRASPORE* encodes a kinesin required for male meiotic cytokinesis in *Arabidopsis*. *Plant J* 2003; **34**: 229–240.
- [52] YANG X, MAKAROFF CA, MA H. The *Arabidopsis* MALE MEIOCYTE DEATH 1 gene encodes a PHD-finger protein that is required for male meiosis. *Plant Cell* 2003; **15**: 1281–1295.
- [53] ZHAO D, YANG M, SOLVA J, MA H. The *ASK1* gene regulates development and interacts with the *UFO* gene to control floral organ identity in *Arabidopsis*. *Dev Genet* 1999; **25**: 209–223.
- [54] ZHAO D, HAN T, RISSEEUW E, CROSBY WL, MA H. Conservation and divergence of *ASK1* and *ASK2* gene functions during male meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 2003; **53**: 163–173.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 23.05. 2006 r.

Przyjęto: 12.07. 2006 r.

ul. Gagarina 9, 87-100 TORUŃ

e-mail: [kzienk@biol.uni.torun.pl](mailto:kzienk@biol.uni.torun.pl)





## INFORMACJE O NOWYCH KSIĄŻKACH

Ukazał się podręcznik autorstwa Zofii Bielańskiej Osuchowskiej pt. **ZARYS ORGANOGENEZY – Różnicowanie się komórek w narządach**, wydany przez Wydawnictwo Naukowe PWN SA (Warszawa, 2004).

Jest to podręcznik embriologii szczegółowej, przystępnie napisany i bogato ilustrowany. Omówiono w nim zarówno zmiany morfologiczne, jak i molekularne procesu różnicowania się narządów u ptaków i ssaków. W książce zostały opisane:

- nowoczesne metody badań embriologicznych
- mechanizmy gastrulacji i rozwój narządów pierwotnych
- początkowy rozwój układu nerwowego
- komórki grzebienia nerwowego
- różnicowanie się i rozwój kończyn u ssaków i ptaków
- rozwój układów krwionośnego i limfatycznego
- rozwój przewodu pokarmowego
- gruczoły przewodu pokarmowego
- rozwój układu oddechowego
- jamy ciała i krezki
- narządy wydalnicze
- rozwój narządów płciowych, gruczołów dokrewnych i powłoki zewnętrznej.

Właśnie ukazał się **SŁOWNIK BIOLOGII KOMÓRKI** (red. J. Kawiak, H. Krzanowska, B. Płytycz, M. Zabel; Polska Akademia Umiejętności, Kraków 2005). Został przygotowany przez licznych Autorów, skupionych wokół Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki.

Najkorzystniej można nabyć **Słownik** wprost w Dziale Wydawnictw PAU, wysyłając list lub e-mail na adres:

**Dział Wydawnictw PAU, ul. Sławkowska 17, 31-016 Kraków**  
**e-mail: [wydawnictwo@pau.krakow.pl](mailto:wydawnictwo@pau.krakow.pl)**

Wydawnictwo wysyła fakturę z numerem konta, a po otrzymaniu przelewu wysyła na podany adres egzemplarz książki wraz z płytą CD.

Ta pięknie wydana książka, wraz z wersją elektroniczną, kupowana wprost u Wydawcy (w **Dziale Wydawnictw Polskiej Akademii Umiejętności**) kosztuje wraz z płytą CD tylko **55,- zł**.

Najkorzystniej jest dokonać zakupu dla kilku osób łącznie (lub dla biblioteki). Przy zakupie od 3 egzemplarzy wwyż Wydawnictwo stosuje 10% ulgi i pokrywa koszty wysyłki, natomiast przy odbiorze książek w Krakowie można uzyskać 15% ulgi.

## OFERTA WYDAWNICZA

### Zeszytów naukowych pod nazwą „Postępy Biologii Komórki”

Zeszyty naukowe pn. *Postępy Biologii Komórki* ukazują się od 1974 r. jako kwartalnik.

**Głównym wydawcą i dystrybutorem kwartalnika naukowego jest Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej – 01-813 Warszawa ul. Marymoncka 99,**

**tel. (022) 5693830, fax. (022) 5693712, e-mail [jkawiak@cmkp.edu.pl](mailto:jkawiak@cmkp.edu.pl)**

W „Postęпах Biologii Komórki” publikowane są artykuły omawiające najnowsze osiągnięcia z zakresu biologii komórki. Zeszyty są przeznaczone dla studentów i nauczycieli, pracowników naukowych uczelni i instytutów naukowych. Wydawanie czasopisma jest możliwe dzięki wsparciu finansowemu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

**Zapraszamy wszystkich zainteresowanych problematyką naukowo-badawczą prezentowaną w naszym kwartalniku do korzystania z zamówień zbiorowych i indywidualnych, tzn. z prenumeraty rocznej. Istnieje również możliwość zakupu pojedynczych egzemplarzy, również archiwalnych.**

W załączeniu: cennik, warunki zakupu i prenumeraty oraz formularz zamówienia.

#### Cennik:

#### WYSZCZEGÓLNIENIE

#### CENA W PLN

Prenumerata roczna dla jednostek będących osobami prawnymi	150,00
Prenumerata roczna dla osób indywidualnych	50,00
Komplet archiwalny dla jednostek będących osobami prawnymi	100,00
Komplet archiwalny dla osób indywidualnych	30,00
Zakup pojedynczego egz. dla jednostek będących osobami prawnymi	40,00
Zakup pojedynczego egz. dla osób indywidualnych	20,00

## Warunki otrzymywania czasopisma

- złożenie zamówienia: faxem, pocztą itp.
- jednoczesne dokonanie wpłaty na konto:

**Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej w Warszawie**  
**Nr konta 20 1240 1053 1111 0000 0440 9533**

- po otrzymaniu wpłaty wystawiamy fakturę VAT.

W sytuacji, kiedy wpłata nastąpi w trakcie trwania prenumeraty, wysyłamy wszystkie zeszyty (numery) czasopisma, które ukazały się w okresie objętym prenumeratą.

tu odciąć

---

### ZAMÓWIENIE

.....dnia.....

nazwa i adres zamawiającego

**Fundacja Biologii Komórki  
i Biologii Molekularnej  
ul. Marymoncka 99  
01-813 WARSZAWA**

L. Dz.....

Zamawiam/y .....egz./kmpł .....„Postępów Biologii Komórki”.  
 Kwotę .....złoty (słownie złotych .....)  
 Przekazaliśmy na Wasze konto dnia .....  
 Nasz NIP.....

Jednocześnie upoważniamy do wystawienia faktury bez potwierdzającego odbiór podpisu odbiorcy.

(pieczętka imienna i podpis zamawiającego)

**KOMUNIKATY****KOMITET ORGANIZACYJNY****XXII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów**

uprzejmie informuje o organizowanym w dniach **6–9 września 2007 roku w Warszawie XXII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów.**

*Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Warzocha  
Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego  
XXII Zjazdu PTHiT*

**Adres Komitetu:**

*Instytut Hematologii i Transfuzjologii  
ul. Chocimska 5, 00-957 Warszawa, tel/fax (022) 849-85-07*

---

**KOMUNIKAT****Zarządów Oddziałów Warszawskich  
Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i  
Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki****Szanowni Państwo,**

Celem większej integracji warszawskiego środowiska naukowego biologii eksperymentalnej proponujemy organizowanie wspólnych **mini-sympozjów**. Planujemy organizować je w soboty, 3–4 razy w roku akademickim 2006/2007.

Prosimy o zgłaszanie sugestii tematycznych i/lub chęci wygłoszenia wykładów. Liczymy na współpracę z Państwa strony.

Z pozdrowieniami, w imieniu Zarządu:

*Hanna Fabczak PTBK  
email <ptbk@nencki.gov.pl>*

*Barbara Zablocka, PTBiochem  
<zablocka@cmdik.pan.pl>*

**Polskie Towarzystwo Biologii Komórki Oddział Warszawski**

Prezes: prof. dr hab. Jerzy Moraczewski – Uniwersytet Warszawski  
Vice-prezes: dr hab. Anna Wasik – Instytut Biologii Doświadczalnej  
Skarbnik: dr hab. Olga Olszowska – Akademia Medyczna  
Sekretarz: dr hab. Hanna Fabczak – Instytut Biologii Doświadczalnej

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN,  
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa  
faks (22)822 53 42, tel.(22) 58 92 317, e-mail: PTBK@nencki.gov.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 lub płycie. Powinny to być albo mapy bitowe (TIF, JPG), albo pliki z Corela, wersja 9,0 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. Na zdjęciach konieczne jest umieszczanie podziałki wskazującej powiększenie obiektów, a nie podawanie powiększeń w podpisach, gdyż zdjęcia ulegają zmniejszeniu do formatu B<sub>5</sub>.

Prosimy Autorów o podawanie adresów e-mail.

### Cennik dla Autorów w 2006 r.

	odbitek prac			pdf	barwne ryciny	str. druku (ponad 15)
Liczba odbitek	50	100	200	–	1 szt.	1 str.
Cena zł	100,00	120,00	150,00	100,00	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 2006 pod adresem:  
 FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,  
 ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; tel. (022) 5693830, fax. (022) 5693712,  
 email: [jkawiak@cmkp.edu.pl](mailto: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 2006
dla instytucji (bibliotek) wynosi	150 zł
dla odbiorców indywidualnych	50 zł

#### ***Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2006***

should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of  
 POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland,  
 tel. (022) 5693830, fax. (022) 5693712, email: [jkawiak@cmkp.edu.pl](mailto: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.

Wzrost i rozwój dziecka w pierwszych trzech latach życia jest procesem dynamicznym i wielowymiarowym. Wzrost fizyczny obejmuje zmiany w masie ciała, długości ciała i obwodzie głowy. Rozwój natomiast dotyczy sfer intelektualnej, emocjonalnej i społecznej. Wzrost fizyczny jest najbardziej widoczny w pierwszym roku życia, kiedy to dziecko zwiększa swoją masę ciała o około 2-3 razy i swoją długość o około 50%. Wzrost emocjonalny i społeczny przebiega stopniowo, z wykształcaniem więzi z rodzicami i otoczeniem.

Wzrost i rozwój dziecka w pierwszych trzech latach życia jest procesem dynamicznym i wielowymiarowym. Wzrost fizyczny obejmuje zmiany w masie ciała, długości ciała i obwodzie głowy. Rozwój natomiast dotyczy sfer intelektualnej, emocjonalnej i społecznej. Wzrost fizyczny jest najbardziej widoczny w pierwszym roku życia, kiedy to dziecko zwiększa swoją masę ciała o około 2-3 razy i swoją długość o około 50%. Wzrost emocjonalny i społeczny przebiega stopniowo, z wykształcaniem więzi z rodzicami i otoczeniem.

Wzrost i rozwój dziecka w pierwszych trzech latach życia jest procesem dynamicznym i wielowymiarowym. Wzrost fizyczny obejmuje zmiany w masie ciała, długości ciała i obwodzie głowy. Rozwój natomiast dotyczy sfer intelektualnej, emocjonalnej i społecznej. Wzrost fizyczny jest najbardziej widoczny w pierwszym roku życia, kiedy to dziecko zwiększa swoją masę ciała o około 2-3 razy i swoją długość o około 50%. Wzrost emocjonalny i społeczny przebiega stopniowo, z wykształcaniem więzi z rodzicami i otoczeniem.

Wzrost i rozwój dziecka w pierwszych trzech latach życia jest procesem dynamicznym i wielowymiarowym. Wzrost fizyczny obejmuje zmiany w masie ciała, długości ciała i obwodzie głowy. Rozwój natomiast dotyczy sfer intelektualnej, emocjonalnej i społecznej. Wzrost fizyczny jest najbardziej widoczny w pierwszym roku życia, kiedy to dziecko zwiększa swoją masę ciała o około 2-3 razy i swoją długość o około 50%. Wzrost emocjonalny i społeczny przebiega stopniowo, z wykształcaniem więzi z rodzicami i otoczeniem.

Wzrost i rozwój dziecka w pierwszych trzech latach życia jest procesem dynamicznym i wielowymiarowym. Wzrost fizyczny obejmuje zmiany w masie ciała, długości ciała i obwodzie głowy. Rozwój natomiast dotyczy sfer intelektualnej, emocjonalnej i społecznej. Wzrost fizyczny jest najbardziej widoczny w pierwszym roku życia, kiedy to dziecko zwiększa swoją masę ciała o około 2-3 razy i swoją długość o około 50%. Wzrost emocjonalny i społeczny przebiega stopniowo, z wykształcaniem więzi z rodzicami i otoczeniem.

Wzrost i rozwój dziecka w pierwszych trzech latach życia jest procesem dynamicznym i wielowymiarowym. Wzrost fizyczny obejmuje zmiany w masie ciała, długości ciała i obwodzie głowy. Rozwój natomiast dotyczy sfer intelektualnej, emocjonalnej i społecznej. Wzrost fizyczny jest najbardziej widoczny w pierwszym roku życia, kiedy to dziecko zwiększa swoją masę ciała o około 2-3 razy i swoją długość o około 50%. Wzrost emocjonalny i społeczny przebiega stopniowo, z wykształcaniem więzi z rodzicami i otoczeniem.

## INFORMACJE DLA AUTORÓW

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

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają

1) artykuły przeglądowe nie przekraczające 15 stron druku i do 100 pozycji bibliograficznych koniecznie z ostatnich 5 lat (natomiast wcześniejsze prace mogą być pracami przeglądowymi); 2) doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach druku z kilkoma pozycjami bibliograficznymi z ostatniego roku (licząc od daty wystania 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.354) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nienumerowana przeznaczona dla redakcji winna zawierać: imiona, nazwiska, tytuły naukowe autorów i adresy: w pracy, domowy wraz z telefonem i e-mail, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rycin. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następną stroną powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 1 str.) oraz słowa kluczowe 3 do 10 słów zgodnych z terminami w *Medical Subject Headings (Index Medicus)*, o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rycin, a jedynie zaznaczyć ówłówek na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, ryc. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według *Index Medicus* (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawzić 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 zmienionej formie. Wszystkie załączniki, np. wykaz skrótów, muszą mieć na odwrocie nazwisko 1. autora i oznaczenie góry i dołu ilustracji. Jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu doby. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą oraz mogą zamówić odbitki odpłatnie odsyłając korektę. Poprawioną po recenzji wersję pracy należy zwrócić do redakcji koniecznie w ciągu 30 dni. Redakcja zrezygnuje z publikacji maszynopisu, którego autorzy do 30 dni nie odpowiedzą na list redaktora. Od stycznia 2003 r. Redakcja wprowadza **odpłatność 300,- zł za artykuł** nie przekraczający 15 str. druku.

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

Dołączono 2 kopie maszynopisu, tabel

Treść pracy nie była uprzednio publikowana,

i rycin

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

Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę

**tak nie** Dołączono kopie pracy wraz z rycinami na dyskietce z

Jest zgodna osoba, których informacje nie-

podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego

publikowane są zamieszczone w tekście

**tak nie** z komputera IBM **tak nie**

Odpowiadam za całość pracy opisanej 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*

## SPIS TREŚCI

W tym Zeszytcie	425
RYBA M., MYŚLIWSKA J.: Biologia naturalnych limfocytów regulatorowych CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Biology of naturally arising CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> regulatory T cells	427
KIEŁBOWICZ-MATUK A.: Białka ns-LTP – funkcjonalny polimorfizm ns-LTP proteins – functional polymorphism	437
PODHORSKA-OKOŁÓW M.: Apoptoza w mięśniach szkieletowych i nerkach po ostrym i przewlekłym wysiłku fizycznym Apoptosis in skeletal muscles and kidney after acute and chronic exercise	453
NOWAKOWSKA P., KOPCEWICZ J.: Symplastowy transport białek i RNA u roślin Symplasmic transport of proteins and RNA in plants	473
ZIENKIEWICZ A., KOZŁOWSKA E., KOPCEWICZ J.: Regulacja kwitnienia przez światło – Light regulation of flowering	493
ARCHACKA K., CIEMERYCH M. A.: Rola czynnika cytotatycznego w regulacji mejozy oocytów ssaków The role of cytostatic activity in meiotic maturation of mammalian oocytes	509
CZARNECKA A. M., GOLIK P, BARTNIK E.: Mitochondria jako integratory apoptozy Mitochondria – an apoptosis integrators	525
WOJTYŁA Ł., GARNCZARSKA M., RATAJCZAK L.: Rola reaktywnych form tlenu w procesie rozwoju i kiełkowania nasion Function of reactive oxygen species in seed development and germination	543
ZIENKIEWICZ K., BEDNARSKA E.: Genetyczna i molekularna charakterystyka mikrosporogenezy u roślin okrytonasiennych Genetic and molecular characterization of microsporogenesis in angiosperms	555
Informacje o nowych książkach	583
Oferta wydawnicza	584
Komunikaty	586
Wskazówki i warunki prenumeraty	587