



Analiza genów rodziny 14-3-3

Jan Szopa, Tadeusz Czuj, Marcin Łukaszewicz

Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej oraz Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław

The analysis of 14-3-3 gene family

Summary

The 14-3-3s constitute a family of highly homologous proteins, first discovered in brain tissue and now thought to be present in all eukaryotic cells. Recently, thirteen cDNAs in *Arabidopsis*, seven in human cells and six in potato plant were found, all encoding highly homologous 14-3-3 protein isoforms.

While there is substantial progress in the identification of diverse partners of 14-3-3 in recent years, at least two important questions need to be answered. Is there any specificity within 14-3-3 isoforms in the binding of diverse partners? Does this binding affect plant metabolism or physiology *in vivo*?

The significance of 14-3-3 protein in potato metabolism has been shown by the use of transgenic plants in which 14-3-3 protein has been either increased by the expression of a *Cucurbita pepo* cDNA or decreased by an antisense RNA method. It was thus proposed that 14-3-3 protein affect the carbohydrate metabolism in potato *via* the regulation of catecholamine synthesis.

To answer the question on isoform specificity, the isoforms gene promoters were first analysed for specific domains content by the comparison with the known sequences accumulated in database. Then, the promoter characteristic was studied in transgenic plants transformed with reporter GUS gene under the control of the 14-3-3 promoter. The data obtained strongly suggest that the function of particular isoform at least partially derives from promoter specificity.

Key words

14-3-3 gene, 14-3-3 promoter, transgenic potato, *Arabidopsis thaliana*, human cells.

Adres do korespondencji

Jan Szopa,
Instytut Biochemii
i Biologii Molekularnej,
Uniwersytet Wrocławski,
ul. Przybyszewskiego 63/77,
51-147 Wrocław.

1. Wstęp

Białka rodziny 14-3-3 są szeroko rozpowszechnione i wykazują zdolność interakcji z onkogenami i regulatorami cyklu komórkowego takimi jak kinaza Raf, antygen T, kinaza PI 3, fosfa-

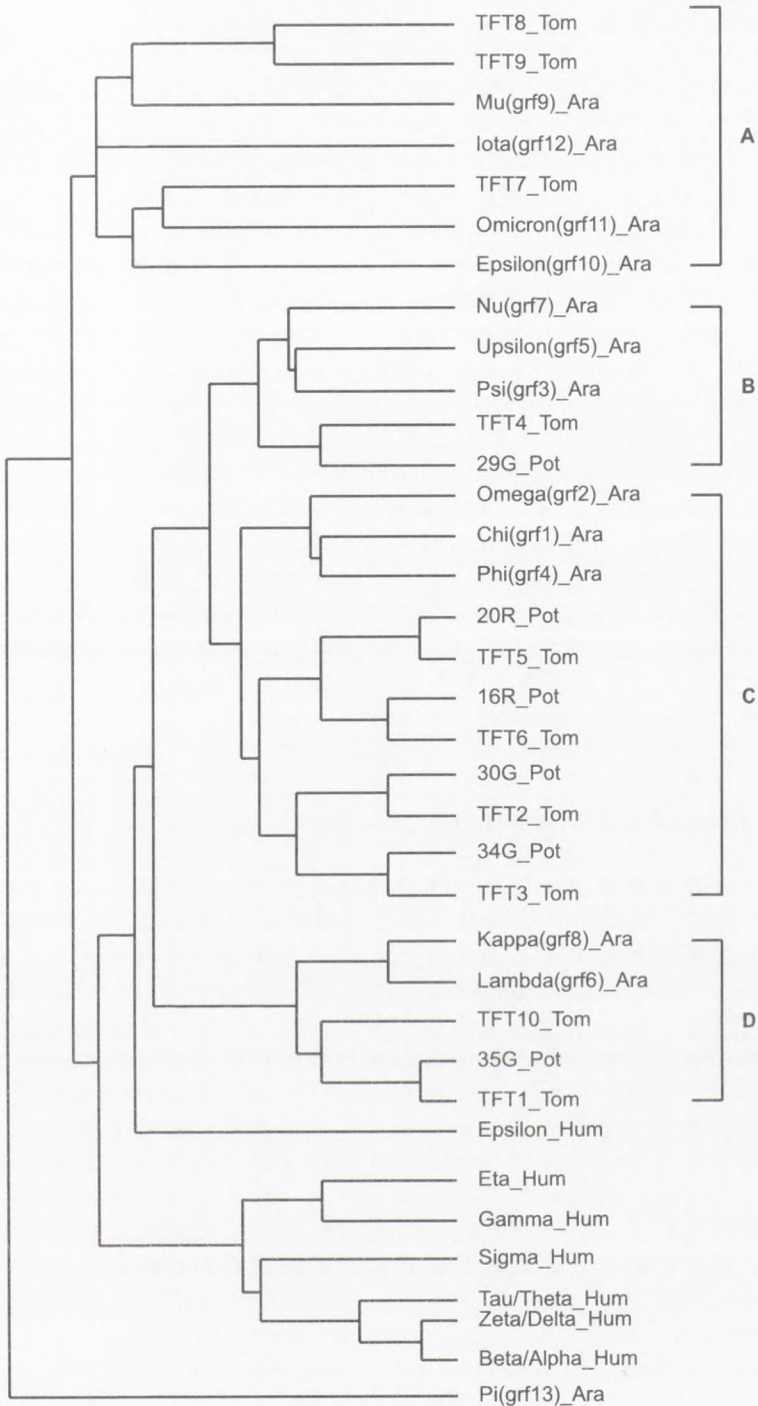
taza cdc25 (1) co sprawia, że są przedmiotem coraz szerszego zainteresowania jako potencjalny czynnik w wewnątrzkomórkowym przenoszeniu sygnałów. Na specjalną uwagę zasługuje interakcja białek 14-3-3 z enzymami metabolizmu cukrów jak syntaza fosfosacharozy (2), syntaza trehalozo-6-fosforanu (3,4) oraz udział w syntezie neurotransmiterów (katecholamin, serotoniny) przez aktywację hydroksylazy tyrozyny i tryptofanu, co sugeruje uczestnictwo białka 14-3-3 w regulacji metabolizmu cukrów (5). Biorąc to pod uwagę oraz ich funkcję w regulacji reduktazy azotanowej, białka 14-3-3 jawią się jako potencjalny koordynator syntezy związków organicznych biorących swój początek z cukrów prostych i azotu amonowego.

2. Sekwencje kodujące izoformy białka 14-3-3

Z danych literaturowych wynika, że wszystkie dotąd badane wielokomórkowe organizmy eukariotyczne charakteryzuje duża ilość izoform białka 14-3-3 (6). W komórkach *Arabidopsis thaliana* wykazano obecność 13 izoform, u pomidora 10, natomiast w komórkach ludzkich zidentyfikowano 7 izoform.

W 1993 r. przygotowano bibliotekę cDNA z kielków dyni *Cucurbita pepo* i wyizolowano kompletną sekwencję kodującą białko rodziny 14-3-3. Następnie używając jej jako sondy wydzielono i zsekwencionowano wszystkie dotychczas poznane, homologiczne cDNA z trzech ziemniaczanych bibliotek: liściowej, korzeniowej i epidermalnej. Uzyskano sześć różnych cDNA kodujących izoformy białka 14-3-3 o homologii od 60 do 90% (7,5).

Na rysunku przedstawiono drzewo filogenetyczne sekwencji aminokwasowych izoform 14-3-3 zidentyfikowanych w komórkach ludzkich, *A. thaliana*, pomidora i ziemniaka. Izofornie roślinne (z wyjątkiem Pi rzodkiewnika) tworzą cztery grupy oznaczone na A, B, C i D w obrębie których izofornie są blisko spokrewnione. Geny wyizolowane z ziemniaka znajdują się tylko w grupach B i C co tłumaczyć można tym, że nie wszystkie izofornie zostały dotychczas sklonowane. Ogromna ilość izoform sugeruje możliwą ich swoistość tkankową lub swoistość w kontroli wewnątrzkomórkowych procesów.



Rys. Drzewko filogenetyczne genów kodujących białka rodziny 14-3-3.

3. Analiza funkcji białek 14-3-3 z ziemniaków

W ciągu ostatnich lat przeprowadzono wiele badań, w których technikami northern i western blotów wykazano, że wszystkie izoformy występują w każdym organie ziemniaków. W eksperymentach *in vitro* ustalono, że białka 14-3-3 regulują aktywności enzymów takich jak reduktaza azotanowa (NR), syntaza fosfosacharozowa (SPS), hydroksylaza tyrozyny (TH) i syntaza skrobi (SS) (2,8). Białka 14-3-3 hamują aktywność tych podstawowych enzymów w przyswajaniu azotanów i regulacji metabolizmu węglowodanów. Wyszliśmy dwa przypuszczenia o istnieniu swoistości izoform w regulacji enzymów oraz możliwej manipulacji metabolizmem przez zmianę poziomu białek 14-3-3 w komórkach ziemniaka. W tym celu dokonaliśmy represji syntezy pojedynczych izoform techniką antysensu. Jako pierwsi zademonstrowaliśmy regulatorowy wpływ białek 14-3-3 na wymienione aktywności enzymatyczne w warunkach *in vivo* oraz odkryliśmy nową pochodną katecholamin w roślinach (normetanefrynę). Ponadto udokumentowaliśmy, podobny jak w komórkach ludzkich, mechanizm wpływu katecholamin na polimer glukozy. W analizie uzyskanych roślin transgeniczných wykazano, że aktywność wspomnianych enzymów jest odwrotnie proporcjonalna do ilości białka 14-3-3 (9,10). W dalszym ciągu pozostaje zatem aktualne pytanie o sens istnienia wielu izoform białka 14-3-3 w komórkach roślin (11,12). Zmierając do wyjaśnienia tego problemu zwróciliśmy się w kierunku analizi organizacji promotorów różnych izoform.

4. Analiza promotorów genów 14-3-3

Pod względem funkcjonalnym gen składa się z dwóch elementów: z sekwencji kodującej, obejmującej nukleotydy niosące informację o budowie białka, oraz sekwencji regulatorowej, której zasadniczym elementem jest promotor. Sekwencja promotorowa jest nośnikiem informacji dotyczącej ekspresji genu i determinuje czy gen będzie ekspresjonowany, a jeśli tak, to z jaką intensywnością. Ponadto informacje zakodowane w sekwencji nukleotydów promotora określają czas i miejsce ekspresji genu. Promotory wyposażone są w domeny, które odbierają sygnały ze środowiska zewnętrznego, determinujące aktywację genu, np. w okresie suszy, bądź po infekcji patogenu. Należy podkreślić, że promotory ze względu na sposób kontroli ekspresji genu podzielić można na słabe i mocne takie, które zapewniają konstytutywną ekspresję kontrolowanego genu oraz takie, które determinują ekspresję swoistą tkankowo. Promotory wrażliwe na działanie czynników zewnętrznych mogą być stymulowane bądź hamowane różnymi czynnikami środowiskowymi, a m.in. takimi jak promieniowanie UV, chłód, susza, zasolenie, itp.

Porównanie sekwencji nukleotydowej promotorów genów kodujących różne izoformy białek 14-3-3 z komórek ludzkich, *A. thaliana* i ziemniaków, identyfikacja domen regulatorowych występujących w obrębie tych sekwencji oraz weryfikacja

funkcji domen przez analizę ekspresji genu reporterowego *uidA* (13,14) kierowaną przez promotory genów 14-3-3 może nas zbliżyć do zrozumienia sensu istnienia tak wielu izoform w każdym organizmie.

5. Promotory genów z ziemniaka

Z użyciem cDNA 16R i 20R kodujących różne izoformy wyizolowaliśmy z biblioteki genomowej DNA ziemniaka dwa kompletne geny i po zsekwencjonowaniu dokonaliśmy analizy porównawczej ich sekwencji pod względem swoistości wiązania czynników transkrypcyjnych w oparciu na bazie danych TRANSFAC.

Znaleziono wiele motywów sekwencyjnych wspierających hipotezę o tkankowo-swoistej i regulowanej w rozwoju, ekspresji genów. Najliczniej reprezentowanymi sekwencjami są te rozpoznawane przez czynnik transkrypcyjny Dof oraz sekwencje E/ABRE regulowane przez kwas abscysynowy (ABA). Z analizy innych genów wynika, że czynniki transkrypcyjne Dof są aktywatorami transkrypcji w warunkach *in vivo* (15). Ustalono również, że w promotorze genu β -fazeoliny (β -phaseolin), E-boksy są zlokalizowane w wielu miejscach i działają synergistycznie w regulacji ekspresji genu (16). Sugestię tę potwierdzono w badaniach promotora genu swoistego dla nasion *napA*, gdzie skutkiem delekcji E-sekwencji był kompletny brak ekspresji genu napinowego (17). E-sekwencja wiąże również czynnik transkrypcyjny Myc, który uczestniczy w reakcjach indukowanych przez kwas abscysynowy. Wykazano, że E-sekwencja wiąże białko homologiczne do czynnika Myc indukowanego w odpowiedzi rośliny na stres suszy (18).

Obecność dodatkowo miejsc wiązania czynników Myb (-553, -438) i Myc (-878) w promotorze 16R, w połączeniu z silną indukcją tych czynników w stresie wodnym sugeruje udział białek 14-3-3 w odpowiedzi na ten stres w reakcji regulowanej przez ABA. Analiza ekspresji β -glukuronidazy pod kontrolą promotora 16R wykazuje, że kwas abscysynowy zwiększa aktywność promotora. Znaleziono w analizowanym promotorze liczne sekwencje AGAAA, których obecność sugeruje, że geny znajdujące się pod ich kontrolą są regulowane w rozwoju (19). Na podstawie analizy western blot potwierdzono ekspresję izoformy 16R zależną od etapu rozwoju liścia ziemniaka (20). W promotorze 16R zidentyfikowano tzw. element-300 (-206, TGHAARK), charakterystyczny dla genów kodujących hordeinę, gliadynę i gluteninę, gdzie pełni rolę wzmacniacza. Czynnik transkrypcyjny JUN i GCN4 wiążą się do tego elementu (21). Obecność w promotorze miejsca wiązania ARF sugeruje jego regulację przez auksynę. Potwierdziliśmy silną indukcję przez IAA reportera *uidA* znajdującego się pod kontrolą promotora 16R.

Wykazano obecność wielu sekwencji, które są wymagane dla silnej, regulowanej światłem i tkankowo-swoistej ekspresji, a wśród nich sekwencje GATA, I-domeny i sekwencje GT1. Te ostatnie mogą pełnić funkcję stabilizacji kompleksów transkrypcyjnych TFIIA-TBP-DNA.

Obecność w promotorze 16R miejsc wiążących SEF4 sugeruje, że element ten działa jako wzmacniacz ekspresji podobnie, jak to ma miejsce w genach kodujących białka zapasowe w soi (22), obecność natomiast sekwencji E1RE w promotorze sugeruje udział białek 14-3-3 w złożonym mechanizmie odpowiedzi roślin na infekcję patogenu i kwasu salicylowego.

Wykazaliśmy, że aktywność genu GUS pod kontrolą promotora 16R jest ponad dwukrotnie wyższa już po sześciu godzinach od infekcji wirusowej ziemniaka. Ogromna ilość kopii białka 14-3-3 w tkankach eukariontów może być wynikiem obecności w promotorze sekwencji SAR/MAR, które kotwiczą DNA w błonie jądrowej i pełnią funkcję wzmacniacza ekspresji. Obecność motywu sekwencyjnego AATAGAAAA (-717), wysoce konserwowanego w genach regulowanych sacharozą jest bardzo ważna dla aktywności promotora. Sugeruje to, że promotor 16R jest stymulowany sacharozą, co następnie udokumentowaliśmy przez pomiar aktywności GUS kontrolowanego przez 16R.

W przeprowadzonej analizie ekspresji genu 16R metodami northern i western blot wykazaliśmy, że ta izoforma 14-3-3 ekspresjonuje się w ziemniakach w sposób zależny od wieku tkanki. Najwyższą ekspresję zaobserwowano w tkankach najmłodszych, a w szczególności w najmłodszych częściach liści i łodyg. Taką swoistość ekspresji genu kontrolowanego przez promotor 16R uzyskano również dla genu reporterowego. Najwyższą ekspresję genu GUS zaobserwowano nie tylko dla komórek merystematycznych, ale również dla tkanek przewodzących. Swoista ekspresja w tkankach przewodzących, jak również fakt, że promotor 16R jest indukowany sacharozą, sugeruje możliwość udziału białek 14-3-3 w ładowaniu lub/i rozładowywaniu floemu. Obserwacje te czynią promotor 16R potencjalnie przydatnym w modyfikacji genów charakterystycznych dla wiązek przewodzących.

Reasumując wszystkie ważne dla aktywności promotora elementy jego sekwencji zidentyfikowane za pośrednictwem bazy danych TRANSFAC znalazły potwierdzenie w analizie eksperymentalnej (23).

5.1. Analiza porównawcza promotorów dwóch izoform (16R, 20R) ziemniaczanych

Obecność sześciu różnych izoform 14-3-3 w roślinie ziemniaka sugeruje swoistość ich ekspresji. Jednakże podczas analizy roślin transgenicznych z nadekspresją i represją tych białek nie uzyskano stosownych dowodów. Dlatego porównano charakterystyczne elementy promotorów, wyznaczone eksperymentalnie przez pomiar aktywności GUS, dwóch izoform 16R i 20R, poszukując potencjalnych różnic w ich indukowalności (dane dotyczące promotora 20R są przygotowywane do publikacji). Oba promotory posiadają liczne sekwencje rozpoznawane przez czynnik transkrypcyjny Dof, sekwencje E/ABRE regulowane przez ABA oraz światłem (GATA i GT1 sekwencje). Promotory poza wspólnymi motywami rozpoznawanymi przez czynniki

transkrypcyjne zawierają szereg motywów, które je różnicują. Sekwencja TATCCAT lokalizuje się w promotorze 20R w -977 pozycji i jest nazywana motywem amylazowym (*amylase box*). Sekwencja ta została zidentyfikowana w 5'-końcu genu alfa-amylazy ryżu, pszenicy i jęczmienia i jest wymagana dla represji genu przez sacharozę w ryżowym genie *Ramy3D* kodującym alfa-amylazę (24). Element ten jest nieobecny w promotorze 16R, który ma jednak inną sekwencję (AATAGAAAA (-717)), konserwowaną i obecną w licznych genach regulowanych sacharozą.

Również nieobecna w promotorze 16R jest sekwencja CTCCCAC znajdująca się w -379 pozycji 20R, która jest znana jako C motyw i pierwotnie zidentyfikowana w genie syntetazy asparaginowej (*AS1*) z grochu, *AS1* jest negatywnie regulowana światłem. Motyw C i czynniki jądrowe rozpoznające tę sekwencję zidentyfikowano w wielu genach tytoniu i rzodkiewnika, których transkrypcja jest hamowana przez światło (25).

Zidentyfikowaliśmy dwa inne elementy unikatowe dla promotora 20R, w -1028 pozycji znajduje się element odpowiedzi na etylen i w pozycji -755 element odpowiedzi na metale. Sekwencja AWTTCAAA została zidentyfikowana jako region odpowiedzi na etylen w promotorze genu dojrzewania owoców i jako wzmacniacz w ekspresji genów senescencji u goździka oraz wzmacniacz w genie transferazy glutationu w pomidorach (26). Metale stanowią ważne cząsteczki efektorowe regulujące ekspresję genów. Sekwencja TGRCNC w -755 pozycji promotora 20R była wcześniej rozpoznana jako element regulowany metalami (*MRE, metal-regulated element*) w genie *mysim* kodującym gen metalotioneiny (*metallothionein-I*). Metale ciężkie efektywnie indukują transkrypcję genu metalotioneiny, która jest zależna od obecności elementu *MRE*. Wykazano, że czynnik transkrypcyjny *SP1* i indukowany cynkiem czynnik *MTF-1* wiążą się do elementu *MRE* wzmacniając transkrypcję *in vitro* (27).

Inne dwie sekwencje nieobecne w promotorze 20R wymagają podkreślenia, a mianowicie TTGACC (-430 w 16R) i TTWTWTTWTT (-259 w 16R). Pierwsza z nich jest sekwencją korową elementu odpowiedzi elisitora (*EIRE*), niezbędnego sygnału w obronności roślin przed patogenem (28). Druga sekwencja nazywana T-boksem jest charakterystyczna dla sekwencji *SAR/MAR*. Obecność sekwencji *EIRE* w promotorze 16R sugeruje udział białek 14-3-3 w mechanizmie obronnym roślin przed infekcją patogenną i stanowi element odpowiedzi na kwas salicylowy. Obecność licznych białek 14-3-3 w wielu tkankach jest najprawdopodobniej wynikiem istnienia sekwencji *SAR/MAR* w promotorze. Przypuszcza się, że geny posiadające tę sekwencję wiążą się z macierzą jądrową i są wysoce aktywne transkrypcyjnie.

6. Promotory genów 14-3-3 z *A. thaliana*

Sekwencję nukleotydową promotorów trzynastu izoform rzodkiewnika pozyskano z publicznej bazy danych Tair (The Arabidopsis Information Resource, www.arabidopsis.org) (29). Analizę domenową sekwencji przeprowadzono na bazie danych

TRANSFAC dla roślinnych czynników transkrypcyjnych. Wynik tej analizy przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Czynniki transkrypcyjne wiążące swoiste domeny w promotorach genów 14-3-3 z *A. thaliana* i ziemniaka

Izoformy <i>A. thaliana</i> i ziemniaka	Dof	E/ABRE	GATA	GT1	AGAAA	ARF	Etylen	EIRE	Sacharoza	MRE	Domena amylazowa
Epsilon	10	3	7	2	8	2	0	0	0	0	0
Iota	6	5	5	5	4	0	1	0	0	0	0
Kappa	9	9	6	5	4	2	4	2	0	0	0
Lambda	17	6	7	5	5	0	0	1	0	0	0
Nu	5	5	13	4	2	1	1	1	0	0	0
Pi	4	6	13	3	0	1	1	0	1	0	0
Psi	5	5	9	2	2	0	1	0	0	0	0
Upsilon	9	4	8	2	2	0	1	1	0	0	0
Omega	9	2	6	5	5	1	0	2	0	1	0
Omicron	6	5	6	6	5	2	3	0	0	0	0
Phi	6	2	7	3	3	1	3	0	0	0	0
Chi	10	5	7	5	4	0	1	1	1	0	0
Mu	7	2	9	7	4	0	1	0	0	0	0
20R	17	8	4	3	0	2	1	0	0	2	2
16R	12	8	5	5	7	2	0	1	1	0	0

We wszystkich promotorach znaleziono liczne sekwencje wiążące czynnik transkrypcyjny Dof oraz sekwencje E/ABRE regulowane przez kwas abscysynowy. Podobnie do promotorów genów ziemniaczanych liczne są również sekwencje GATA i GT1 we wszystkich genach izoform z *Arabidopsis*. Analogicznie również do promotorów ziemniaczanych, promotory genów z *Arabidopsis* różnicują się pod względem zawartości domen odpowiedzi na sacharozę, kwas salicylowy, etylen, auksynę oraz sekwencji reagującej na jony metali. Tak też tylko jedna izoforma pi nie posiada motywu AGAAA charakterystycznego dla pyłku, a izoformy iota, lambda, psi, upsilon, chi i mu nie posiadają motywów ARF regulowanych przez auksynę. Izoformy epsilon, lambda i omega nie zawierają motywu regulacji etylenem, a izoformy epsilon, iota, pi, psi, omicron, phi i mu nie posiadają motywu EIRE niezbędnego dla odpowiedzi na atak patogena. Tylko dwie izoformy są potencjalnie regulowane sacharozą, a mianowicie pi i chi. Jedna zaledwie izoforma omega posiada element MRE odpowiedzi na metale i żadna izoforma nie posiada motywu amylazowego, którego obecność wykazano dla ziemniaczanego promotora 20R.

Takie zróżnicowanie sugeruje, że zasadniczym powodem istnienia wielu izoform genów 14-3-3 jest odpowiedź na warunki środowiskowe. W dotychczasowej literaturze jest tylko jedno opracowanie dotyczące analizy sekwencji regulatorowych genów 14-3-3 z *A. thaliana*. Ustalono, że promotor izoformy chi zawiera sekwencje determinujące swoistość ekspresji w korzeniach i pąkach kwiatowych (30).

7. Promotory ludzkich genów 14-3-3

Sekwencję nukleotydową promotorów siedmiu poznanych izoform pozyskano z publicznej bazy danych NCBI. Analizę domenową sekwencji dla kregowców przeprowadzono na bazie danych TRANSFAC (MatInspector V2.2, <http://transfac.gbf.de/cgi-bin/matSearch/matsearch.pl>) (31). Wynik tej analizy przedstawiono w tabeli 2. Znalezione liczne we wszystkich promotorach sekwencje wiążące czynnik transkrypcyjny IK2, generalne czynniki transkrypcyjne SP1 i AP1 oraz domeny GATA1 i domeny GC. We wszystkich promotorach obecne są również sekwencje swoistości tkankowej (MYOD, LMO2COM) oraz indukowane glukozą (Ins1 i Ins2). W promotorach znajdują się sekwencje różnicujące poszczególne geny i tak domeny wiążące czynnik CREBP indukowane przez nadtlenuk wodoru i UV są charakterystyczne dla izoform eta, tau/teta i w mniejszym stopniu gamma, natomiast miejsca wiążące ER odpowiadające na indukcję estrogenami są tylko w promotorze izoform sigma i zeta/delta. Tylko promotory beta/alfa, eta i sigma zawierają miejsca wiązania czynnika IRF regulowanego przez interferon, co oznacza, że geny są indukowane w procesie infekcji. Jedynie promotory genów beta/alfa i zeta/delta nie posiadają domeny AHRARNT indukowanej w procesie niedotlenienia. Dla promotorów izoform beta/alfa i sigma są miejsca wiążące surowicze czynniki SRF (*serum response factor*). Najwięcej miejsc wiążących dla aktywatorów transkrypcji GATA1 posiada promotor genu izoformy epsilon natomiast czynnik JUN, charakterystyczny dla onkogenów, posiada tylko jedno miejsce wiązania i tylko w promotorze genu izoformy eta. Na podstawie uzyskanych danych przypuszcza się, że poziom ekspresji poszczególnych izoform 14-3-3 jest regulowany podażą odpowiednich czynników transkrypcyjnych, jak również, że przypuszczalnie bez znaczenia są różnice w sekwencji kodującej genu. Natomiast muszą być spełnione określone warunki otoczenia (czynniki transkrypcyjne) dla indukcji syntezy 14-3-3, a są one określone w sekwencji promotora genów izoform.

Tabela 2

Czynniki transkrypcyjne rozpoznające domeny w promotorach ludzkich genów 14-3-3

	Oznaczenie czynnika	Beta/Alpha	Epsilon	Eta	Gamma	Sigma	Tau/Theta	Zeta/delta
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	IK2	20	—	17	19	18	22	5
2	SP1	9	1	16	15	4	23	—
3	AP1	6	3	3	5	7	3	10
3	AP2	2	—	4	8	1	10	4
3	AP4	5	2	8	14	4	11	—
4	GATA1_02	1	5	—	—	1	—	9
4	GATA1_03	—	5	—	—	—	—	—
4	GATA1_04	—	5	—	—	—	—	—
4	GATA1_05	—	22	—	—	—	—	—
4	GATA2_02	1	2	—	—	2	1	6

1	2	3	4	5	6	7	8	9
4	GATA3_02	3	4	–	1	4	2	9
4	GATA_C		5	–		1		9
5	GC	10	1	10	14	3	17	
6	MYOD	1	–	1	1	4	–	4
7	LMO2COM_01	2	–	2	3	4	–	7
7	LMO2COM_02	–	5	–	–	1	–	9
8	Ins1	3	4	5	1	9	3	7
8	Ins2	6	3	8	15	16	1	6
9	CREBP1CJUN_01	–		1	–	–	1	
10	ER_Q6	–	–	–	–	1	–	2
11	IRF1_01	2	–	–	–	1	–	–
11	IRF2_01	–	–	1		1	–	–
12	AHRARNT	–	2	2	1	1	2	–
13	SRF_01	1	–	–	–	–	–	–
13	SRF_Q6	–	–	–	–	2	–	–
14	VJUN_01	–	–	1	–	–	–	–

Uzyskane dane dotyczą głównie licznych czynników transkrypcyjnych zidentyfikowanych w komórkach nieroślinnych i trudne jest ich odniesienie do organizmów roślinnych. Jednak gdy te same sekwencje potraktowano jako roślinne i przeszukano roślinną bazę czynników transkrypcyjnych to okazało się, że podobnie do genów roślinnych, najliczniej reprezentowane są sekwencje rozpoznawane przez czynniki transkrypcyjne Dof, licznie reprezentowane są też sekwencje GT1 i domeny G (tab. 3). Obok podobieństw zaznaczają się też swoiste różnice i tak, tylko beta/alfa zawiera domenę SRF indukowaną czynnikami surowicy, promotor izoformy zeta/delta posiada miejsce wiązania czynnika ATHB1 odpowiadającego w roślinach za rozwój liści natomiast izoforma epsilon posiada najwięcej miejsc wiążących czynniki SEF, charakterystycznych wzmacniaczy ekspresji genów kodujących białka zapasowe roślin. Interesujące jest, że promotor izoformy beta/alfa posiada domenę CHS, a wszystkie izoformy z wyjątkiem zeta/delta posiadają domeny PAL, co sugeruje, że geny mogą być indukowane promieniami UV oraz w odpowiedzi na infekcję patogenną. Domeny te są obecne w genach syntezy flawonoidów u roślin. Niedawno stwierdzono, że w ziemniakach białka 14-3-3 regulują poziom syntezy flawonoidów (10).

Tabela 3

Czynniki transkrypcyjne roślinne rozpoznające swoiste domeny w promotorach genów 14-3-3 ludzkich

Nazwa	Beta-Alpha	Epsilon	Eta	Gamma	Sigma	Tau-Theta	Zeta-Delta
Dof	12	8	4	3	16	6	18
SRF	1	0	0	0	0	0	0
ATHB1	0	0	0	0	0	0	1
SEF	2	12	1	0	1	0	7
CG1	1	0	0	0	0	0	0
PAL	1	3	2	2	3	2	0

8. Podsumowanie

Wysoka homologia sekwencji aminokwasowej izoform 14-3-3 wskazuje na ich identyczną funkcję, co potwierdzono w licznych badaniach właściwości organizmów transgenicznych z nadekspresją i represją izoform 14-3-3. Postawiono pytanie o sens istnienia wielu izoform tych białek w organizmach eukariotycznych.

W przeprowadzonej analizie promotorów genów kodujących izoformy białek 14-3-3 wykazano, że wszystkie zawierają sekwencje rozpoznawane przez czynniki transkrypcyjne Dof oraz sekwencje (GATA, GT, G) odpowiedzi na różne warunki środowiskowe. Obok znaczącego podobieństwa, promotory różni obecność swoistych domen odbierających sygnały środowiskowe. Pośród nich są takie jak odpowiedzi na infekcję patogena, etylen, metale, światło, sacharozę, glukozę i sekwencje determinujące swoistość tkankową oraz regulujące ekspresję genu w rozwoju organizmu.

Obecność i różnorodność swoistych dla danego promotora motywów sekwencyjnych genów 14-3-3 nasuwa przypuszczenie, że pełniona przez te wysoce homologiczne białka funkcja jest zbliżona natomiast pojawienie się izoform jest wynikiem indukcji swoistej domeny promotorowej.

Literatura

1. Wilczyński G., Kulma A., Markiewicz E., Szopa J., (1998), *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2, 239-241.
2. Toroser D., Athwal G. S., Huber S. C., (1998), *FEBS Lett.*, 435, 110-114.
3. McKintosh C., (1998), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1, 224-229.
4. McKintosh C., (1998), *New Phytol.*, 139, 153-159.
5. Szopa J., (2002), *Biochem. Soc. Trans.*, 30, 405-410.
6. Finnie C., Borch J., Collinge D. B., (1999), *Plant Mol. Biol.*, 40, 545-554.
7. Wilczyński G., Kulma A., Szopa J., (1998), *J. Plant Physiol.*, 153, 118-126.
8. Szopa J., Wróbel M., Matysiak-Kata I., Świądrych A., (2001), *Plant Sci.*, 161, 1075-1082.
9. Szopa J., Wilczyński G., Fiehn O., Wenczel A., Willmitzer L., (2001), *Phytochemistry*, 58, 315-320.
10. Łukaszewicz M., Matysiak-Kata I., Aksamit A., Oszmiański J., Szopa J., (2002), *Plant Sci.*, 163, 125-130.
11. Rosenquist M., Sehnke P. C., Ferl R. J., Sommarin M., Larsson C., (2000), *J. Mol. Evol.*, 51, 446-458.
12. Sehnke P. C., Rosenquist M., Alsterfjord M., DeLille J., Sommarin M., Larsson C., Ferl R. J., (2002), *Plant Mol. Biol.*, 50, 1011-1018.
13. Jefferson R. A., (1987), *Plant Mol. Biol. Rep.*, 5, 387-405.
14. Jefferson R. A., Kavanagh T. A., Bevan M. W., (1987), *EMBO J.*, 6, 3901-3907.
15. Yanagisawa S., (1997), *Eur. J. Biochem.*, 250, 403-410.
16. Kawagoe Y., Campell B. R., Murai N., (1994), *Plant J.*, 5, 885-890.
17. Stalberg K., Ellerstrom M., Ezcurra I., Ablöv S., Rask L., (1996), *Planta*, 199, 515-519.
18. Busk P. K., Pages M., (1998), *Plant Mol. Biol.*, 37, 425-435.
19. Bate N., Twell D., (1998), *Plant Mol. Biol.*, 37, 859-869.
20. Wilczyński G., Kulma A., Szopa J., (1998), *J. Plant Physiol.*, 153, 118-126.
21. Kim S. Y., Wu R., (1990), *Nucl. Acids Res.*, 18, 6845-6852.
22. Lessard P. A., Allen R. D., Bernier F., Crispino J. D., Fujiwara T., Beachy R. N., (1991), *Plant Mol. Biol.*, 16, 397-413.
23. Szopa J., Łukaszewicz M., Aksamit A., Alina Korobczak A., Kwiatkowska D., (2003), *Plant Physiol. Biochem.*, 41, 417-423.

24. Toyofuku K., Umemura T., Yamaguchi J., (1998), *FEBS Lett.*, 428, 275-280.
25. Ngai N., Tsai F. Y., Coruzzi G., (1997), *Plant J.*, 12, 1021-1034.
26. Itzhaki H., Maxson J. M., Woodson W. R., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 8925-8929.
27. Thiele D. J., (1992), *Nucl. Acids Res.*, 20, 1183-1191.
28. Chen C., Chen Z., (2000), *Plant Mol. Biol.*, 42, 387-396.
29. Huala E., Dickerman, A., Garcia-Hernandez M., Weems D., Reiser L., LaFond F., Hanley D., Kiphart D., Zhuang J., Huang W., Mueller L., Bhattacharyya D., Bhaya D., Sobral B., Beavis B., Somerville C., Rhee S. Y., (2001), *Nucl. Acids Res.*, 29, 102-105.
30. Daugherty C. J., Rooney M. F., Miller P. W., Ferl R. J., (1996), *Plant Cell*, 8, 1239-1248.
31. Quandt K., Frech K., Karas H., Wingender E., Werner T., (1995), *Nucleic Acids Research*, 23, 4878-4884.