

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE

**TOM 20-NR 1'93**  
(1 – 132)

# Postepy Biologii Komórki

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego oraz Polskiej Sieci UNSCO wydawany z częściową pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych.

Redaguje Kolegium:

Szczepan BILIŃSKI, Jerzy KAWIAK, Maciej KAWALEC, Wincenty KILARSKI,  
Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA, Maciej ZABEL

Rada Redakcyjna:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA,  
Antoni HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI,  
Olgierd NARKIEWICZ, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA,  
Lech WOJTCZAK

*Adres Redakcji: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego ul. Marymoncka 99,  
01-813 Warszawa*

Artykuły nadesłane do Redakcji i zamieszczone w roczniku 1992 Postępów  
Biologii Komórki recenzowali:

prof. dr Zofia Bielańska-Osuchowska

prof. dr Szczepan M. Biliński

prof. dr Jerzy Kawiak

dr Maciej Kawalec

prof. dr Wanda M. Krajewska

prof. dr Jan Michejda

prof. dr Urszula Radwańska

dr Tomasz Sakowicz

prof. dr Joanna Strosznajder

prof. dr Stanisław Więckowski

prof. dr Maciej Zabel

Za tę społecznie wykonaną pracę i miłą współpracę serdecznie dziękujemy.

**Fundacja •Rozwój SGGW-AR•**

Ark. wyd. 11,8. Ark. druk. 8,25. Oddano do składu w styczniu 1993 r. Podpisano do druku w marcu 1993 r. Druk ukończono w kwietniu 1993 r.

***W tym zeszycie • Postępów Biologii Komórki •***

- W artykule na str. 35 przedstawione są nowe dane dotyczące budowy najmniej konserwatywnego, pozanukleosomowego histonu H1 oraz jego roli w regulacji transkrypcji.
- W artykule na str. 45 przedstawiono molekularne mechanizmy fotoinhibicji – zjawiska obniżenia aktywności fotosyntetycznej spowodowanego silnym światłem.
- Artykuł na str. 67 zawiera przegląd najnowszej literatury dotyczącej metabolizmu cukrów w roślinach, ze szczególnym uwzględnieniem fruktozo2,6-bisfosforanu – niedawno odkrytego nowego efektora metabolizmu cukrów i pirofosforanu.
- Na stronie 87 przypomniano niektóre zasługi Edwina G. Krebsa i Edmonda H. Fischera laureatów z 1992 r. nagrody Nobla z zakresu medycyny.
- Zmiany w błonie komórkowej towarzyszące osobniczemu starzeniu się organizmu zajmują uwagę wielu badaczy. Zmiany takie mogą mieć poważny wpływ na fizjologiczną wydolność komórki. Problem ten jest omówiony przez jednego z ekspertów w tej dziedzinie – dra hab. J. Witkowskiego w artykule na stronie 111.



## Z KRONIKI

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Histo- i Cytochemików i Polskiego Towarzystwa Anatomicznego oraz Redakcja Postępów Biologii Komórki zorganizowały doroczną XXII konferencję szkoleniową z zakresu biologii komórki na temat: ZASTOSOWANIA METOD BIOLOGII KOMÓRKOWEJ I MOLEKULARNEJ w dniu 14 listopada (sobota) 1992 r. w Warszawie. Obrady odbyły się w sali wykładowej im. L. Paszkiewicza w Anatomicum Akademii Medycznej przy ul. Chałubińskiego 5.

Program Konferencji:

prof. dr hab. Winicjusz DOMAGAŁA: *Metody cytochemiczne w diagnostyce nowotworów*

dr Stanisław ZAJĄCZEK i dr Jacek PODOLSKI: *Badania molekularnogenetyczne w diagnostyce nowotworów*

dr Paweł POMORSKI: *Mikroskop konfokalny – zastosowania w biologii komórki*  
przerwa

prof. dr hab. Aleksandra STIOJAŁOWSKA: *Cytofotometria przepływowa w diagnostyce*

prof. dr hab. Jerzy KAWIAK: *Cytofotometria przepływowa – problemy metodyczne w diagnostyce białaczek*

Organizatorzy

# ZNACZENIE METYLACJI DNA U EUKARYONTÓW

## THE SIGNIFICANCE OF DNA METHYLATION IN EUKARYOTES

Cezary WÓJCIK

Zakład Histologii i Embriologii AM w Warszawie

*Streszczenie.* Niedługo uznawana za ciekawostkę biologiczną metylacja DNA zajmuje obecnie kluczowe miejsce w wielu działach badań biomedycznych. Badano jej rolę w regulacji ekspresji genów oraz wpływ na strukturę chromatyny dzięki odkryciu odpowiednich enzymów restrykcyjnych oraz blokerów metylotransferazy, takich jak 5-azacytydina. Poznano wpływ metylacji DNA na oddziaływanie białka-DNA, inaktywację chromosomu X, *imprinting* genowy, rozwój zarodkowy i powstawanie nowotworów.

*Słowa kluczowe:* metylacja DNA, metylotransferaza DNA, ekspresja genów, struktura chromatyny, 5-azacytydina, inaktywacja X, *imprinting* genowy, rozwój zarodkowy, powstanie nowotworów.

*Summary.* The DNA methylation was considered a biological curiosity some time ago. Now it is recognized as a very important phenomenon. It participates in the regulation of gene expression, and modifies the chromatin structure. The basic tools used to study its role are the restriction enzymes, and methyltransferase blockers, such as 5-azacytidine. The DNA methylation also takes part in protein-DNA interactions, X inactivation, genome imprinting, embryonic development, and carcinogenesis.

*Key words:* DNA methylation, DNA methyltransferase, gene expression, chromatin structure, 5-azacytidin, X inactivation, genome imprinting, embryonic development, carcinogenesis.

### WSTĘP

Od ponad czterdziestu lat wiadomo, iż poza czterema podstawowymi zasadami w DNA mogą znajdować się zasady nietypowe, zwłaszcza w DNA pochodzącym od organizmów prokariotycznych. Zasady takie spotyka się jednak także i u eukaryotów, przy czym jest to prawie wyłącznie 5-metylocytozyna (5-mC), choć stwierdzono również występowanie 4-metylocytozyny i 6-metyladeniny [1].

Odmienne rzecz się ma co do 5-mC, stanowiącej u kręgowców od 3 do 6% wszystkiej cytozyny genomu. U niższych zwierząt procent ten jest o wiele niższy, nie wykryto na przykład w ogóle 5-mC w DNA pochodzącym od *Drosophila melanogaster* lub od drożdży. Z tego

powodu swego czasu twierdzono, iż metylacja DNA nie może odgrywać żadnej kluczowej roli w życiu komórek eukariotycznych i, że jest swego rodzaju ciekawostką biologiczną. Jednakże brak metylacji w niektórych organizmów nie oznacza, iż nie jest ona ważna w tych, u których występuje [90]. Dla porównania, u wyższych roślin do 30% cytozyn w DNA może występować w stanie zmetylowanym [1].

Obecnie przyjmuje się, iż metylacja jest rzadkim zjawiskiem wśród organizmów o genomie mniejszym niż  $10^8$  bp, a bardzo powszechnym u organizmów o genomie większym.

Występowanie 5-mC jako piątej zasady w nici DNA wydatnie zwiększa zawartość informacji na odcinku o tej samej długości, co daje ewidentne korzyści w przypadku złożonych organizmów eukariotycznych. Metylacja DNA jest ponadto mutageniczna, gdyż z dużą frekwencją zachodzi spontaniczna deaminacja 5-mC do T, mogąca zresztą zachodzić również enzymatycznie. Jeżeli tak powstałe tyminy nie ulegną wycięciu i wymianie na cytozyny, to po replikacji powstanie punktowa mutacja. W związku z powyższym, prawdopodobieństwo wytrzymania presji ewolucyjnej przez metylację byłoby znikome, gdyby nie służyła ona pożytecznym celom, przewyższającym niekorzystne efekty mutacji [90].

Co się tyczy wpływu na strukturę DNA, to podczas gdy 6-metyloadenina destabilizuje podwójną helisę, to 5-mC przyczynia się do jej stabilizacji. Efektem metylacji cytozyny jest również większe prawdopodobieństwo lokalnego przejścia DNA w formę Z, czyli w helisę lewoskrętną [1]. Grupa metylowa 5-mC leży w dużej bruzdzie DNA, co może służyć do osłabienia lub wzmacniania wiązania się białek jądrowych [5, 64].

Obecnie kładzie się nacisk na występowanie zależności pomiędzy stanem metylacji genów a ich ekspresją, zwłaszcza podczas rozwoju ontogenetycznego i różnicowania. Zaraz po replikacji DNA, 5-mC znajduje się wyłącznie w starej nici, co pozwala rozpoznać ją jako właściwą w procesie naprawy DNA. Metylacja wydaje się być również odpowiedzialna za występowanie zjawiska *imprintingu* genowego, umożliwiającego różnicową identyfikację materiału genetycznego pochodzącego od ojca lub od matki, a także dziedziczenie defektów epigenetycznych (epimutacje, funkcjonalna hemizygotyczność) [110]. Zaburzenia prawidłowego wzoru metylacji genomu prawdopodobnie leżą u podstaw rozwoju nowotworów lub przynajmniej są z tym zjawiskiem w ścisłej współzależności [3, 87]. Postuluje się także rolę metylacji DNA w inaktywacji chromosomu X u kręgowców [65, 67]. Również proces starzenia się komórek *in vivo* i *in vitro* wykazuje zależność od poziomu 5-mC w genomie [33]. Wreszcie metylacja DNA stanowić może podstawę szeroko pojętej pamięci komórkowej, pozwalającej zróżnicowanej komórce odtworzyć po podziale wzór aktywnych i nieaktywnych domen genomu, związanych z wyższego rzędu strukturą chromatyny, fałdowaniem chromosomów i koordynacją czasową replikacji [81].

Wszystkie te role metylacji sprowadzają się do wspomaganie transmisji wolnej od błędów informacji do komórek potomnych, co nie miałyby większej roli np. u *D. melanogaster*, w ciągu rozwoju której zachodzi jedynie ok. 20 mitoz, a komórki dorosłego osobnika, poza linią płciową, nie dzielą się. Dla porównania, u człowieka zachodzi na sekundę  $10^6$  mitoz, co daje przeciętnie  $10^{16}$  mitoz w ciągu życia osobniczego. Przy takiej ilości podziałów, łatwo może dojść do zakłócenia wierności przekazywanej informacji, co jest zjawiskiem bardzo niebezpiecznym u wyższych organizmów [81].

Enzymy restrykcyjne rozpoznające specyficzne sekwencje w zależności od ich stanu metylacji stały się pierwszym i wciąż bardzo użytecznym narzędziem umożliwiającym badanie metylacji genomu eukariotycznego. Określanie stanu metylacji za ich pomocą jest jednak tylko przybliżeniem, gdyż zaledwie od 5 do 15% dubletów CpG znajduje się w obrębie

sekwencji rozpoznawanych przez takie enzymy restrykcyjne, jak Xho I, Msp I, Hha I, Sal I czy Hpa II. Wnioskowanie o stanie metylacji genomu jedynie z danych uzyskanych za ich pomocą może okazać się bardzo złudne [85]. Aby poznać stan metylacji wszystkich CpG w danym odcinku DNA, należy uciec się do techniki sekwencjonowania genomowego [110].

W badaniach używa się najczęściej pary izoschizomerów Hpa II / Msp I, rozpoznających sekwencję CCGG. Enzymy te różnią się jednak tym, że podczas gdy Msp I rozpoznaje tę sekwencję bez względu na stan metylacji wewnętrznej cytozyny, to Hpa II jedynie wtedy, gdy jest ona niezmetylowana [37, 103].

## WYSTĘPOWANIE ZMETYLOWANYCH ZASAD

Zmetylowane zasady nie występują przypadkowo w genomie eukariontów, lecz zwykle w krótkich palindromowych sekwencjach [1], takich jak:



Ponad 90% 5-mC występuje u zwierząt w sekwencji CpG, podczas gdy u roślin również w sekwencji CpNpG.

W komórkach somatycznych kręgowców zwykle ok. 70% wszystkich dinukleotydów CpG zawiera cytozynę w formie zmetylowanej [44]. Dinukleotydy CpG można znaleźć w całym genomie, jednak charakterystyczne jest ich wysokie zagęszczenie co ok. 100 kb. Regiony te nazywa się wyspami CpG i w wielu przypadkach znajdują się one w kierunku 5' od początku genów, w regionie szeroko pojętego promotora [81, 110].

Sekwencje CpG mogą znajdować się w trzech różnych stanach: niezmetylowanym, zmetylowanym na obydwu niciach DNA oraz zmetylowanym tylko na jednej nici, czyli hemimetylowanym. Ten ostatni stan wydaje się być in vivo niestabilny i może występować tylko przejściowo po replikacji (z powodu działania tzw. metylazy utrzymującej) lub w czasie aktywacji uprzednio nieczynnych genów. Niestabilność hemimetylowanego DNA jest podstawą dziedziczenia wzorów metylacji DNA w sposób semikonserwatywny z pokolenia na pokolenie, gdyż metylaza utrzymująca odtwarza na nowo powstałej nici DNA wzór obecny na starej nici, podążając za widelkami replikacyjnymi w czasie trwania fazy S. Okres, przez który DNA pozostaje hemimetylowane, wydaje się jednak niezbędny dla ekspresji niektórych genów, naprawy DNA i segregacji chromosomów. Jeżeli w jakiś sposób uniemożliwi się zadziałanie metylazy utrzymującej, to nastąpi pasywna demetylacja ulegająca następnie dziedziczeniu. Niekiedy zachodzi proces odwrotny, a mianowicie metylacja de novo [1, 103].

Pewne regiony genomu są zawsze wolne od metylacji, inne zawsze zmetylowane, wreszcie jeszcze inne tylko w pewnych tkankach lub w pewnych warunkach środowiska. Wydaje się jednak, że metylacja koreluje z "nadmiarem" DNA w genomie. W komórkach somatycznych kręgowców w stanie zmetylowanym występuje np. polirepetytywny oraz satelitarny DNA [90]. Regiony o zwiększonej metylacji wybarwiają się zwykle w chromosomach mitotycznych jako prążki G [74] lub R [78]. Również wysoko zmetylowany jest nieaktywny X w komórkach pochodzących od organizmów ssaków płci żeńskiej.

W celu odpowiedzi na pytanie, co determinuje, które dinukleotydy CpG ulegają przede wszystkim metylacji, wykonano następujące doświadczenie na *Neurospora crassa*. Jej genom zawiera jedynie od 1 do 2% zmetylowanych cytozyn.

Z biblioteki cDNA wyizolowano region tandemowy  $\xi$ - $\eta$ , składający się z licznych powtórzeń segmentu o długości ok. 0,8 kb, który, jak można się było spodziewać, występuje u *N. crassa* w stanie silnie zmetylowanym. Region ten pasażowano wielokrotnie na *E. coli*, wobec czego utracił on całkowicie 5-mC. Następnie wprowadzono go ponownie do komórek pleśni, gdzie został zmetylowany według tego samego wzoru co oryginalnie, pomimo różnorodności miejsc, w których nastąpiła jego integracja z genomem. Wynika z tego, iż region  $\xi$ - $\eta$  sam kieruje swoją metylacją poprzez jakąś specyficzną sekwencję albo nie zawiera sekwencji zapobiegającej metylacji. Wydaje się trafniejsze to drugie rozwiązanie, gdyż po pierwsze, podzielone przypadkowo endonukleazami fragmenty regionu  $\xi$ - $\eta$  również ulegały metylacji, a po drugie obcy DNA wprowadzony do komórki grzyba jest bardziej podatny na metylację niż sekwencje natywne [90].

Skomplikowany proces genetyczny wykryty ostatnio u *N. crassa*, tzw. RIP (*repeated induced point mutation*), metylujący dotychczas niezmetylowane domeny chromosomowe również wskazuje na stałą gotowość metylacyjną mikrośrodowiska jądrowego. Sekwencje DNA niezmetylowane muszą się przed nią jakoś ochraniać [15].

Najwięcej tego typu sekwencji w komórkach somatycznych stanowią wyspy CpG wolne od metylacji, tzw. MFI (*methylation free islands*), długości od 0,5 do 3,0 kb. Występują one stosunkowo często w regionie 5' promotora genów funkcyjnych (*housekeeping genes*), natomiast są z reguły nieobecne lub o wiele uboższe w dublety CpG w regionach promotora genów tkankowo specyficznych [3].

Dla przykładu, spośród trzech izozymów anhidrazy węglanowej u człowieka (CA), CA II jest rozpowszechniony, CA III specyficzny dla włókien mięśniowych, a CA I dla erytrocytów. Gen CA II ma wyspę bogatszą w CpG niż wyspa genu CA III, podczas gdy gen CA I w ogóle nie ma tego typu sekwencji [25].

Rozproszone w genomie, niezgrupowane dublety CpG są w komórkach somatycznych z reguły wysoko zmetylowane w odróżnieniu od wysp MFI [3].

## EUKARIOTYCZNA METYLOTRANSFERAZA

Znamy już obecnie całą sekwencję eukariotycznej metylotransferazy DNA pochodzącej z komórek ssaków [EC 2.1.1.37], dzięki sklonowaniu jej z biblioteki cDNA przy użyciu jako sondy jednej z bakteryjnych metylaz. U człowieka gen tego enzymu zlokalizowany jest na chromosomie 19.

Uderza wysoka homologia sekwencji między restrykcyjnymi metylazami bakteryjnymi a regionem C-terminalnym 570 aminokwasów ssacej metylotransferazy. Pozostałych 1000 N-terminalnych aminokwasów nie wykazuje homologii do znanych genów i wydaje się spełniać funkcję regulacyjną. Występuje tam region bogaty w cysteinę, podobny do palca cynkowego.

Taka budowa genu metylotransferazy sugeruje, iż powstał on prawdopodobnie wskutek fuzji genu prokariotycznej restrykcyjnej metylotransferazy z innym genem o nieznannej funkcji. Na podstawie tego wysunięto hipotezę, iż system metylacji DNA u wyższych eukaryontów może pochodzić od bakterii poprzez pośrednika, który selektywnie metylował *de novo* egzogenny DNA i przekazywał zmetylowane sekwencje przyłączone do swojego genomu potomstwu [3, 10].



Metylotransferaza DNA ssaków selektywnie metyluje cytozynę w dublecie CpG występującym zwykle w parze z komplementarnym, przeciwrównoległym GpC. Enzym ten rozpoznaje jednak mającą ulec metylacji cytozynę także w przypadku występowania w tym podwójnym dublecie innych zasad. I tak, pierwszym nukleotydem dubletu może być guanozyna lub inozyna, jego komplementarną zasadą cytozyna lub 5-mC, natomiast miejsce guanozyny komplementarnej do mającej ulec metylacji cytozyny może zająć inozyna, O<sup>6</sup>-metyloguanozyna, cytozyna, adenozyzna, miejsce puste lub koniec 3'OH łańcucha. We wszystkich tych przypadkach, metylotransferaza wykazuje większe powinowactwo niż w przypadku typowej sekwencji [93].

Ponieważ 5-mC jest w genomie o wiele częstsza niż inne nietypowe zasady, wynika z tego praktyczny wniosek, iż metylotransferaza lepiej i szybciej wiąże się z hemimetylowanym DNA niż z niemetylowanym. In vivo potwierdza się to tym, że metylacja de novo odbywa się 10 do 30 razy wolniej niż metylacja utrzymująca. In vitro enzym ten metyluje prawie każdą sekwencję DNA zawierającą CpG, nie ma natomiast w ogóle powinowactwa do RNA. Najszybciej ulega metylacji sztuczny polidezoksyrybonukleotyd poli [dIdC]\*poli [dIdC] przy użyciu metylotransferazy uzyskanej z komórek HeLa lub mysiej linii MEL (erytroleukemicznych). Szybkość reakcji w tym przypadku jest prawie stukrotnie większa w porównaniu z natywnym, niemetylowanym DNA [110].

Na podstawie badań nad obecnością metylotransferazy oraz jej mRNA w komórkach BALB/c 3T3 wykazano, iż ich poziomy wzrastają w czasie wejścia w fazę S, przy czym poziom mRNA wraca do poziomu spoczynkowego jeszcze przed końcem fazy S, podczas gdy wygaśnięcie aktywności enzymu przeciąga się do przejścia G2/M. Poza tym obserwuje się mały pik aktywności metylotransferazy we wczesnej fazie G1, o niewyjaśnionej roli. Być może odpowiada on za metylację DNA centromerowego. Transkrypcja genu metylotransferazy zachodzi nawet w komórkach zahamowanych we wzroście, wobec czego jego ekspresja ulega prawdopodobnie regulacji posttranskrypcyjnej. Metylotransferaza lokuje się w czasie fazy S in vivo tuż za widełkami replikacyjnymi oraz w odcinkach, gdzie zachodzi naprawa [1, 96].

Metylotransferaza prawdopodobnie rozpoczyna swoje działanie od ataku nukleofilowego na C-6 pierścienia cytozyny z wytworzeniem pośredniego związku, jakim jest 5,6-dihydropirimidyna. Powoduje to wysycenie podwójnego wiązania C-5-C-6 i aktywację C-5, do którego następnie przyłącza się grupa metylowa pochodząca zwykle z S-adenozylometioniny. Wysokoenergetyczny związek pośredni daje ostatecznie 5-mC, gdy odłącza się enzym i znika podwójne wiązanie C-5-C-6. Taki scenariusz działania metylotransferazy implikuje czasowe rozerwanie podwójnej helisy DNA w miejscu katalizy, gdyż wprowadzenie czterech różnokierunkowych wiązań węglów 5 i 6 powoduje odkształcenie pierścienia cytozyny i utratę jego aromatyczności, przez co nie pasuje on do przestrzennej struktury helisy DNA. Atak nukleofilowy metylotransferazy na C-6 cytozyny jest ułatwiony, gdy rośnie ładunek cząstkowy zlokalizowany na tym węglu, co ma miejsce w przypadku osobliwych, tj. niezgodnych z modelem Watsona-Cricka struktur DNA, takich jak potrójna czy poczwórna helisa. Struktury takie mogą in vivo występować w sytuacjach, takich jak: inicjacja replikacji, naprawa i rekombinacja DNA [93].

Normalnym donorem reszt metylowych niezbędnych w procesie metylacji jest S-adenozylometionina, istnieje jednak możliwość, iż donorem tym może też być metylokobalamina [77].

## 5-AZACYTYDYNA

Aktywność metylotransferazy można zablokować lub obniżyć poprzez użycie rozmaitych środków, takich jak: tworzący potrójne nici poli [rA] \* poli [rU] [110], różne karcynogeny w rodzaju benzopirenu czy musztardy azotowej [44], alkohol etylowy [29], prokainamid [88], L-asparaginaza czy metanosulfonat etylowy [114], jednak najbardziej efektywnym związkiem jest analog cytozyny – 5-azacytydyna (5-azaC).

Ulega ona wbudowaniu do DNA podczas replikacji i ponieważ w pozycji C-5 zawiera grupę azową, nie może ulec metylacji, co po następnej replikacji prowadzi do powstania miejsc niemetylowanych. Ponieważ jednak 5-azaC ulega wbudowaniu tylko w dość nielicznych miejscach w DNA, których ilość nie koreluje z rozległością wywołanej przez nią demetylacji, nie jest to główny mechanizm odpowiedzialny za jej efekt. 5-azaC zachowuje się jak niekompetencyjny inhibitor metylotransferazy, powodując jej trwałe unieczynnienie poprzez związanie się z nią wiązaniem kowalencyjnym. W ten sposób aktywność metylazowa komórki ulega znacznemu obniżeniu do czasu, gdy zostaną zsyntetyzowane nowe cząsteczki enzymu [44].

Dodana do hodowli ustalonych linii komórkowych (np. GH12C1, C3H, 10T1, 3T3 itd.) 5-azaC wywołuje dramatyczne zmiany w fenotypie komórek, przy czym zmiany te są utrwalone przez wiele pasaży po usunięciu 5-azaC z pożywki. Nisko zróżnicowane komórki fibroblastyczne różnicują się po zadziałaniu 5-azaC w kierunku komórek chrzęstnych, tłuszczowych czy też mioblastów [44, 74]. Komórki nowotworowe, zwłaszcza nowotworów zarodkowych, hamują swoją proliferację i przyjmują formy bardziej dojrzałe pod wpływem 5azaC. W wielu przypadkach następuje utrata ich zdolności do tworzenia guzów *in vivo* [105]. Zmianom fenotypowym towarzyszy ekspresja większej liczby genów i co jest najciekawsze, zjawisko to występuje także u organizmów pozbawionych całkowicie 5-mC [17, 18].

Z drugiej strony, w niektórych modelach doświadczalnych, związek ten okazywał się karcynogeny, powodował transformację nowotworową zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*, a nawet indukował wzrost złośliwości nowotworów już istniejących [43].

Pomimo takich dwuznacznych właściwości, użyto jednak 5-azaC w klinicznych próbach leczenia pacjentów chorujących na  $\beta$ -talasemię [55] lub na anemię sierpowatokomórkową [24] z dość dobrymi wynikami.

Ostatnio wykryto, iż podanie tego związku komórkom linii V79A03 24 h przed ekspozycją na promieniowanie  $\gamma$ , zwiększa prawie dwukrotnie ich tolerancję i przeżycie [46].

Poza wykrywalną biochemicznie demetylacją DNA 5-azaC wywołuje też szereg zmian morfologicznych w jądrze komórkowym. Następują zjawiska, takie jak: dekondensacja obszarów odpowiadających prążkom G, wymiana siostrzanych chromatyd, endoreduplikacja i asocjacja "koniec do końca" pomiędzy chromosomami. Zwiększa się występowanie włókien łączących pola skondensowanej chromatyny, następuje wydłużenie centromerów i telomerów, a także zmiana w czasie replikacji heterochromatyny konstytutywnej z późnej do wczesnej fazy S. Jeszcze w 5 tygodni po zadziałaniu 24 h pulsem 5-azaC obraz chromosomów nie był w pełni porównywalny z kontrolą, choć poziom metylacji DNA po osiągnięciu minimum w 1 tydzień po pulsie wracał już do normy.

W ciągu 2–3 tygodni po zadziałaniu 5-azaC zwiększył się stosunek syntezy DNA do syntezy białek, po czym również powoli wrócił do poziomu kontrolnego. Jedynie nowe fenotypy komórek okazują się trwałą konsekwencją zadziałania 5-azaC.

Optymalnym stężeniem 5-azaC używanym w doświadczeniach na hodowlach komórkowych jest poziom 2,5–3,0  $\mu\text{M}$ . Stężenia wyższe są coraz to bardziej toksyczne, a stężenia powyżej 15  $\mu\text{M}$  nie przeżywa już żadna komórka [74].

## METYLACJA A EKSPRESJA GENÓW

Wyniki wielu badań doświadczalnych wskazują na to, iż istnieje ścisły związek pomiędzy stanem metylacji DNA a ekspresją genów u eukariontów. W przytłaczającej większości przypadków wzrost metylacji koreluje z inaktywacją danego genu, podczas gdy demetylacja koreluje z jego aktywacją. Wymienić tu można dla przykładu: syntetazę asparaginianową [114], mysią albuminę [91], szczurzą  $\gamma$ -krystallinę [75], szczurze CYP2D3 i CYP2D5 [60], szczurzą hydroksylazę tyrozynową [48], ludzkie pepsynogeny A i C [41], ludzką kinazę tymidynową [22], ludzką proenkefalinę [20], szczurzą  $\gamma$ -glutamylotranspeptydazę [2], pro- $\alpha$ -1-[I] kolagen [99], pro- $\alpha$ -1-[IV] kolagen [14] itd.

Podobną zależność obserwuje się w przypadku szeregu genów wyizolowanych z różnych wirusów, wykorzystujących maszynę genetyczną komórek eukariotycznych, np. lentiwirusów [92], HIV-1 [89], SV-40 [32], HSV [6] czy adenowirusów [23, 72, 104].

Nie jest to jednak regułą wszechobowiązującą, gdyż np. nie stwierdzono żadnej korelacji pomiędzy stanem metylacji poszczególnych dinukleotydów CpG w regionie promotora genu kurzego lizozymu a jego ekspresją [113], a w przypadku genu ludzkiej prolaktyny, stwierdzono, iż hipermetylacja jednego z miejsc Msp I w obrębie drugiego egzonu, wywołana za pomocą 1-D-arabinofuranozylcytozyny wywołuje jego wysoką ekspresję w liniach komórek B-limfoblastoidalnych IM-9-P [30].

Na unieczynnienie drogą metylacji zdają się być najwrażliwsze geny, których transkrypcja odbywa się za pomocą RNA polimerazy II, choć opisano także inaktywację dla genów transkrybowanych przez RNA polimerazę III [9, 45], a także prawdopodobnie przez RNA polimerazę I [58].

Krytyczne miejsca, których metylacja ma bezpośredni wpływ na ekspresję danego genu, zlokalizowane są w regionie 5' bądź też rzadziej w pierwszych egzonach lub intronach. Metylacja w obrębie sekwencji transkrybowanych wywiera jednak z reguły o wiele mniejszy efekt, co sugeruje, iż metylacja blokuje inicjację transkrypcji, a nie elongację [64].

Z aktywacją wyciszonych genów związana jest natomiast demetylacja, którą w warunkach doświadczalnych można wywołać za pomocą 5-azaC, natomiast w przyrodzie stanowi ona prawdopodobnie efekt końcowy kaskady reakcji. I tak, aktywację genu dla prokolagenu  $\alpha$ -1-[IV] w komórkach linii F9 potworniakoraka wywołać można po zadziałaniu cAMP lub kwasem retinowym, przy czym stwierdza się wówczas demetylację w regionie 5' flankującym tego genu. Taki sam efekt uzyskuje się po zadziałaniu 5-azaC, jednak demetylacji w tym regionie towarzyszy demetylacja innych sekwencji w całym genomie [14].

Wydaje się jednak, że demetylacja nie jest procesem warunkującym aktywację, lecz jej konsekwencją lub zjawiskiem towarzyszącym, podobnie jak metylacja nie jest warunkiem sine qua non inaktywacji genów. Na przykład działanie LPS na komórki limfoidalne pre-B powoduje ekspresję genu  $\kappa$ , lecz stosowny promotor ulega demetylacji dopiero w jakiś czas po rozpoczęciu produkcji tego łańcucha polipeptydowego przez aktywne limfoblasty [18].

Aktywacja genów tkankowo specyficznych ze stanu uogólnionej represji musi najpierw obejmować rozpoznanie genów w stanie wciąż zmetylowanym, co zapoczątkowuje transkrypcję i demetylację. Gdy geny te są już zdemetylowane, wówczas są stale dostępne dla maszynarii transkrypcyjnej komórki [17]. Poznaną rolę procesów metylacji/demetylacji w ekspresji genów najlepiej jest przedstawić na klasycznych przykładach genu kurzej witellogeniny II i mysiej  $\beta$ -globiny (maj) [109, 110].

Gen witellogeniny II zawiera w regionie 5' flankującym cztery dinukleotydy CpG oznaczone kolejno: A w pozycji -525 (licząc od początku transkrypcji), B w pozycji -587, C w pozycji -612 i D w pozycji -618. W regionie tym znajduje się sekwencja wiążąca glukokortykoidy oraz sekwencja wiążąca 17 $\beta$ -estradiol, przy czym ta ostatnia obejmuje miejsca C i D. Wraz z miejscem B tworzą one wyspę o długości 32 nukleotydów (od -587 do -616).

W DNA pochodzącym z erytrocytów kurczęcia wszystkie te miejsca CpG są w pełni zmetylowane, podczas gdy w DNA z jego hepatocytów miejsce B występuje w stanie hemimetylowanym. Po podaniu estradiolu, w ciągu 24 h wszystkie cztery miejsca CpG w DNA wątrobowym stają się hemimetylowane, co zbiega się w czasie z pojawieniem się mRNA witellogeniny II. Dopiero w ciągu następnych 24 h następuje demetylacja cytozyn na komplementarnej nici DNA [85, 86].

Pierwotnie przypuszczano, że demetylacja jest procesem pasywnym i wymagającym replikacji przy zablokowanej aktywności metylotransferazy na danym odcinku. Szybka demetylacja genów dla witellogeniny II czy też dla  $\delta$ -krystalliny, zachodząca bez replikacji w czasie rozwoju osobniczego, podobnie jak demetylacja wprowadzonego sztucznie do mioblastów genu dla  $\alpha$ -aktyny, sugerują jednak istnienie procesu enzymatycznego, choć nie udało się jeszcze wyizolować tej hipotetycznej demetylasy. Innego dowodu na jej istnienie dostarcza masywna demetylacja całego genomu komórek erytroleukemii mysiej, zachodząca po indukcji HMBA w czasie zbyt krótkim, aby to wytłumaczyć mechanizmem pasywnym. Co więcej pomimo braku replikacji zachodzi wówczas inkorporacja radioaktywnej dezoksytydyny do DNA, co sugeruje wycięcie i wymianę 5-mC na cytozynę przez nieznaną enzym lub enzymy [18].

Najbardziej przekonujące jest jednak doświadczenie, w którym pasażowano na *E. coli* kilkanaście razy plazmid zawierający gen APRT (fosforybozylotransferazy adeninowej), a zawierał on we wszystkich miejscach GATC zmetylowaną adeninę. Następnie plazmid ten zmetylowano również na wszystkich miejscach CpG, wprowadzono do komórek eukariotycznych, po czym zabito je i stwierdzono występowanie zdemetylowanych CpG na tych samych łańcuchach, gdzie była zmetylowana adenina, co dowodzi, iż demetylacja zaszła bez syntezy DNA [28].

Niezależnie od mechanizmu demetylacji *in vivo* doświadczenia wskazują, iż jest to proces o wysokiej specyficzności zarówno w stosunku do sekwencji, jak i do nici DNA, podobnie jak to się ma z metylacją. Każdy rodzaj komórek somatycznych ma właściwość demetylowania tylko tych genów, które ulegają w nich ekspresji, a więc genów funkcyjnych i tkankowo dla nich specyficznych.

Mysi gen dla  $\beta$ -globiny zawiera w regionie 5' flankującym o długości 364 bp *TATA box*, *CCAAT box* oraz promotorowe sekwencje CACCC i TTATTTGCAT. Występują w nim trzy dinukleotydy CpG, jeden odosobniony w pozycji -88 i dwa zablokowane w pozycjach -225 i -238, tuż przed *CCAAT box*. W komórkach wykazujących ekspresję genu  $\beta$ -globiny żaden z tych dubletów nie jest zmetylowany. Wyizolowane z nich DNA można poddać działaniu eukariotycznej metylotransferazy, w wyniku czego cytozyna w pozycji -88 nie ulega metyla-

cji, w pozycji -225 ~~zostaje~~ całkowicie zmetylowana, a w pozycji -238 hemimetylowana. Stan taki wiąże się z brakiem aktywności tego genu.

Natomiast w nieindukowanych komórkach erytroleukemii mysiej miejsce -238 jest hemimetylowane, podczas gdy pozostałe dwa miejsca są niezmetylowane, co mogło by się wiązać z potencją ekspresji tego genu w razie dotarcia specyficznego bodźca powodującego demetylację [110].

Na tych dwóch przykładach wyraźnie widać specyficzność procesu metylacji i demetylacji w zależności od sekwencji i od nici DNA, co wiązać się musi z istnieniem w komórkach rozbudowanych systemów czynników trans-działających i wiążących się z odpowiednimi sekwencjami zasad w DNA w zależności od stanu ich zmetylowania. Czynniki te odpowiednio aktywowałyby lub blokowały transkrypcję.

## WPLYW METYLACJI NA ODDZIAŁYWANIA BIAŁKA-DNA

Inhibicja transkrypcji poprzez metylację może odbywać się w sposób pośredni przez upakowanie zmetylowanych regionów DNA w nieaktywną chromatynę niedostępną dla większości czynników transkrypcyjnych lub w sposób bezpośredni poprzez uniemożliwienie wiązania odpowiednich czynników transkrypcyjnych rozpoznających zmetylowane zasady. Niekiedy ten sam gen można inaktywować przez metylację na obydwie sposoby, jak ma to miejsce dla kinazy tymidynowej u chomika [22].

Zbadano wpływ metylacji w obrębie sekwencji rozpoznawczej na wiązanie się z nią szeregu białek jądrowych (tab. 1). W badaniach tych oprócz techniki sekwencjonowania genomowego wykorzystano tzw. *footprinting* genomowy, wykrywający "odciski" białek na nici DNA, np. poprzez próbę dwumetylosiarczanową na chronioną przed trawieniem nukleazami guanozynę genomowego DNA [108].

TABELA 1. Wpływ metylacji DNA na wiązanie się czynników białkowych z odpowiednimi sekwencjami DNA

Białko	Sekwencja wiążąca	Wpływ metylacji	Źródło
E2F	TTTCGCGC	hamuje wiązanie	[52]
MLTF	CCACGTGA	hamuje wiązanie	[107]
Sp1	GGGCGG	brak efektu	[6, 36, 39]
Czynnik TAT	..GCGC..	hamuje wiązanie	[4]
Czynnik RF	AAGCGATA	wymagana do wiązania	[84]
MDBP	..CGRCG..	wymagana do wiązania	[106]
Myn/myc	GACCACGTGGTC	hamuje wiązanie	[79]
MIB-1	TGACGTCA	hamuje wiązanie	[42]

Wyizolowany z komórek HeLa czynnik MLTF wiąże się z promotorami szeregu różnych genów, np. mysiej metalotioneiny I, szczurzego  $\gamma$ -fibrynogenu, hGH, N-ras oraz z późnym, dużym promotorem adenowirusa AdMLP (*Adenovirus Major Late Promoter*). Zawierają one podobną sekwencję wiążącą, charakteryzującą się występowaniem w jej obrębie dubletu CpG. Metylacja tej cytozyny występuje w pozycji -58 w przypadku AdMLP. Powoduje to zahamowanie wiązania MLTF oraz transkrypcji in vitro fragmentu AdMLP. Metylacja sąsiadującego dubletu w pozycji -52 nie wywiera natomiast żadnego efektu. Hemimetylacja w pozycji -58

wywiera efekt pośredni, gdyż DNA wciąż wiąże MLTF, jednak z mniejszym powinowactwem [101, 107].

Metylacja oddziałuje na wiązanie się czynnika MLTF oraz podobnych czynników białkowych albo poprzez interferencję z sekwencjami rozpoznawczymi w dużej bruzdzie helisy albo poprzez zakłócenie lokalnej geometrii DNA. Jak by nie było, efektem końcowym jest osłabienie wiązania białko-DNA [64].

Podobnie umożliwiającą przyłączenie się demetylacja miejsca wiązania białka TAT, zlokalizowanego ok. 1000 bp w górę od miejsca inicjacji transkrypcji genu szczurzej aminotransferazy tyrozynowej koreluje z początkiem jego transkrypcji [4]. Tymczasem, tzw. czynnik koguci RF (*rooster factor*), wiąże się zaraz za miejscem inicjacji transkrypcji genu witellogeniny w przypadku, gdy znajdujący się tam dinukleotyd CpG jest zmetylowany, co koreluje z nieaktywną postacią genu, podczas gdy białko NHP 4 wiąże się z tym samym miejscem niezależnie od stanu metylacji. Co więcej RF występuje w wątrobie wyłącznie u kogutów, pozbawionych ekspresji witellogeniny, natomiast brak go u kur, co wskazuje na kolejny poziom regulacji ekspresji genów [84].

W świetle tych badań łatwo zrozumieć specyficzność demetylacji DNA, np. w przypadku genu witellogeniny II w pobliżu receptorów dla glikokortykoidów i estradiolu. Zależy ona prawdopodobnie od działania białek wiążących się ze specyficznymi sekwencjami niezależnie od tego, czy demetylacja zachodzi jako proces pasywny czy też za pomocą demetylazy.

Model interakcji tego typu można przedstawić na przykładzie MLTF. Miejsce wiążące ten czynnik w stanie zmetylowanym ma do niego małe powinowactwo, ale w jakiś czas po replikacji, nim zadziała metylaza utrzymująca lub niezależnie – wskutek działania demetylazy miejsce to może być hemimetylowane, a więc o pośrednim powinowactwie. Jeżeli w komórce MLTF występuje w dużym stężeniu, wiąże się ze swoją sekwencją rozpoznawczą i osłania ją przed działaniem metylotransferazy. Po następnej rundzie replikacji powstaje demetylacja całkowita, a więc miejsce o wysokim powinowactwie.

W przypadku czynników transkrypcyjnych nieczułych na stan metylacji sekwencji rozpoznawczej, np. Sp 1, determinacja tego, czy promotor danego genu będzie aktywny i/lub zdemetylowany, może zależeć wyłącznie od współzawodnictwa między wiązaniem tego białka a zmianą konformacji chromatyny w nieaktywną [53, 64].

Efekt ten może zależeć także od wiązania się ze zmetylowanymi sekwencjami białek blokujących transkrypcję, takich jak MDBP, MeCP-1 lub niedawno odkrytego MeCP-2.

Wyizolowane z ludzkiego łożyska białko MDBP (*methylated DNA binding protein*) rozpoznaje wiele sekwencji, przy czym niektóre z nich muszą być zmetylowane, a inne nie. Na przykład, MDBP wiąże się niezależnie od stopnia metylacji z dwoma miejscami w sekwencji wzmacniającej mysiego wirusa z grupy polyoma i po jednym miejscu w sekwencji wzmacniającej HBV i w LTR (*Long Terminal Repeat*) prowirusa końskiej niedokrwiłości zakaźnej. Natomiast większe powinowactwo do sekwencji zmetylowanych wykazuje MDBP w przypadku promotorów następujących genów ludzkich: fosforybozylotransferazy hypokantynowej,  $\alpha$ -galaktozydazy A, HLA-A2, HLA-A3 i HLA-25 [106, 115].

W odróżnieniu od MDBP, białko MeCP-1 (*methyl-CpG binding protein*) wiąże się praktycznie z każdą sekwencją zawierającą zmetylowane dublety CpG, jednak dla pełnego wiązania musi być ich co najmniej 12 zlokalizowanych blisko siebie [11, 13]. Natomiast białko MeCP-2 o masie 84 kd ściśle wiąże się z sekwencjami zawierającymi nawet pojedyncze zmetylowane dublety CpG [11].

Obecność tych białek stwierdzono w wielu różnych liniach komórkowych i tkankach pochodzących od różnych gatunków. Komórki ubogie w MeCP wykazują tylko niewielką zależność ekspresji genów od stopnia metylacji promotorów, co sugeruje, iż białka te, a zwłaszcza MeCP-2, mogłyby być odpowiedzialne za efekty metylacji DNA, takie jak zahamowanie transkrypcji i zmiana struktury chromatyny [12, 54, 61].

Za pomocą znakowanych fluorochromem przeciwciał anti-MeCP-2 barwią się silnie regiony chromosomów bogate w 5-mC, takie jak centromery i satelitarny DNA. Potwierdza to, iż białko to uczestniczy w oddziaływaniach ze zmetylowanym DNA również *in vivo* [11].

## METYLACJA DNA A STRUKTURA CHROMATYNY

Wykrycie wpływu metylacji reszt cytozynowych w dubletach CpG na oddziaływania białka-DNA pozwala przenieść rozważania nad metylacją z kategorii biochemicznych na kategorie morfologiczne. Modyfikacja DNA służy jako swego rodzaju marker umożliwiając upakowywanie nieaktywnych transkrypcyjnie genów w nieaktywną konformację chromatyny bez potrzeby specyficznych czynników *trans-* lub *cis-* działających [28].

Wykazano, że po połączeniu *in vitro* zmetylowanego odcinka DNA z histonem H1 część miejsc uprzednio wrażliwych na działanie MspI ulega zamaskowaniu i nie podlega przecięciu pod wpływem tego enzymu [37].

W celu ustalenia zależności struktury nukleosomalnej od stanu metylacji badano gen aminotransferazy tyrozynowej (TAT) myszy. W komórkach wykazujących ekspresję TAT region promotora zawiera "odciski" (*footprints*) różnych czynników białkowych, podczas gdy nie wykryto ich w przypadkach promotorów pochodzących z komórek nie wykazujących ekspresji tego genu, mimo iż zawierają one wszystkie niezbędne białka. W tej ostatniej klasie komórek omawiany region jest niewrażliwy na działanie DNAazy I, a jego CpG znajdują się w stanie zmetylowanym.

Szczegółowo zbadano miejsce wiązania białka CREB (*cAMP Responsive Element Binding Protein*) do miejsca CRE położonego 3,6 kb w górę od miejsca inicjacji transkrypcji genu TAT, które zawiera dublet CpG. *In vitro*, CREB wiąże się silnie do niezmetylowanego CRE, słabiej do hemimetylowanego, a nie wiąże się wcale do zmetylowanego CRE. *In vivo*, w niektórych przypadkach po zadziaaniu 5-azaC badany region ulega demetylacji, a jednak nie wiąże CREB. Wykonano trawienie nukleazą mikrokokalną, tnącą jedynie odcinki DNA położone pomiędzy nukleosomami, a następnie odpowiednie *blottings*. Okazało się, że regiony wiązania białek w promotorze TAT są nawinięte wokół nukleosomów i w ten sposób chronione *in vivo* przed przyłączeniem czynników białkowych w komórkach nie wykazujących ekspresji. Sugeruje to, iż metylacja może uczestniczyć w ustanawianiu pewnej niedostępnej, "zamkniętej" konfiguracji chromatyny, lecz nie jest niezbędna do jej utrzymania [108].

Zmetylowane dublety CpG zlokalizowane są głównie w obrębie nukleosomów zawierających H1, podczas gdy regiony niezmetylowanych wysp CpG są bardzo ubogie w H1 w porównaniu z resztą chromatyny. Natomiast zawarte w ich obrębie histony H3 i H4 są silnie zacetylowane. Za różnicę w strukturze chromatyny być może odpowiadają białka MeCP [98, 108]. Regiony wysoko zmetylowane ulegają późniejszej replikacji w czasie fazy S niż regiony w pełni aktywnej euchromatyny. Opóźniona replikacja w pobliżu zmetylowanych wysp CpG koreluje z łatwiejszym łamaniem się i rekombinacją chromosomów w ich pobliżu [3].

Metylacja początków replikonów może odpowiadać nie tylko za koordynację czasową replikacji poszczególnych odcinków DNA, lecz także za wyższego rzędu strukturę chromaty. Białka pokrewne strukturalnie bakteryjnym enzymom restrykcyjnym typu I, ale bez aktywności endonukleazy wiążą się ze specyficznymi miejscami w DNA (tzw. *folding elements*). Miejsca te rozmieszczone są co 50 do 100 kb i zbliżają się do siebie zapoczątkowując tworzenie się pętli, u których podstaw powstaje białkowy szkielet. Przy zetknięciu się ok. 1000 takich podstaw pętli szkielet taki osiągnąłby długość 5  $\mu$ m, odpowiadającą przeciętnej długości chromosomu mitotycznego [81].

Uwzględnienie wszystkich zebranych do tej pory danych pozwoliło sformułować model wyjaśniający wyniki wielu doświadczeń. Chromatyna występować by miała w dwóch zasadniczych formach, oznaczonych I i II. Forma I nie ulegałaby metylacji po replikacji w odróżnieniu od formy II. Gdy do DNA wiążą się różne białka niehistonowe, fragment ten przybiera konfigurację otwartą, czyli formę I, której prawdopodobnie odpowiada 10 nm włókienko chromatynowe. Natomiast brak wiązania białek niehistonowych na odcinku długości minimum 1–2 kb powoduje spontaniczną przemianę chromatyny w formę II, o strukturze włókienka 30 nm lub wyższej. Zamiana tak powstałego regionu w formę I jest trudna i wymaga udziału specyficznych czynników białkowych. Przed replikacją region ten znajduje się w stanie niezmetylowanym, jednak w jej trakcie ulega netylacji *de novo*. Wyklucza to wiązanie się czynników białkowych do ich sekwencji rozpoznawczych, poza niewielką grupą czynników mogących się wiązać ze zmetylowaną formą II. Przyłączenie się takiego czynnika do specyficznej sekwencji inicjuje przemianę danego regionu w formę I, a następnie jego demetylację czynną bądź bierną.

Zgodnie z tym modelem nie jest możliwe bezpośrednie przejście z niezmetylowanej do zmetylowanej formy I. Ta ostatnia występuje jedynie jako forma pośrednia w czasie procesu aktywacji genów. Natomiast przejście ze zmetylowanej do niezmetylowanej formy II nie występuje co prawda w naturze, ale można je wywołać za pomocą 5-azaC.

Model ten pozwala wnioskować, iż metylacja jest raczej zjawiskiem wtórnym do braku ekspresji genów, pozwalającym na bardzo dokładną pamięć komórkową co do tego, które regiony chromatyny mają ulegać ekspresji, a które nie, oraz zapobiegającym ich przypadkowej aktywacji [90].

## METYLACJA A INAKTYWACJA CHROMOSOMU X

Przykładem masowej inaktywacji genów zlokalizowanych na jednym chromosomie jest występująca we wczesnym okresie zarodkowym ssaków inaktywacja chromosomów X u samic lub osobników o nieprawidłowym genotypie, zawierającym dodatkowe X.

U torbaczy inaktywowany jest preferencyjnie X pochodzący od ojca. U łożyskowców taki proces zachodzi w trofoblaście, podczas gdy w ciele zarodka tuż przed gastrulacją następuje zupełnie przypadkowa inaktywacja jednego z dwóch X obecnych w komórce. Nieaktywny stan chromosomu X jest bardzo stabilny, gdyż zaobserwowano tylko bardzo rzadkie przypadki derepresji jego niewielkich regionów, pomimo użycia całej plejady różnorodnych środków. Wyjątkiem jest 5-azaC, która wywołuje reaktywację wielu genów "niemego" X. Pozwoliło to sformułować hipotezę, iż to właśnie metylacja odgrywa znaczącą rolę w procesie inaktywacji chromosomu X [82].



Pierwsza grupa dowodów popierających tę tezę pochodzi z badań nad transformacją komórek za pomocą genu fosforybozylotransferazy hypoksantyny (HPRT) zlokalizowanego na chromosomie X. DNA izolowane z komórek pochodzących ze zmutowanych myszy zawierających dziki allel na nieaktywnym X nie powoduje transformacji komórek HPRT-, w odróżnieniu od linii zawierającej dziki allel na aktywnym X. Jednakże gdy zreaktywuje się gen dla HPRT za pomocą 5-azaC, DNA z nieaktywnego X zyskuje zdolność transformacji komórek HPRT-. Ekspresja tego genu jest u reaktywantów na różnym poziomie, co być może wskazuje na wpływ różnych stopni demetylacji [56].

Podobne wyniki otrzymano w badaniach nad ludzkim genem kinazy fosfoglicerynianowej (PGK 1). Otrzymano hybrydy pomiędzy komórkami człowieka i chomika, zawierające ludzki nieaktywny X, poddano je działaniu 5-azaC, a następnie badano ekspresję PGK 1. Klony komórkowe wykazujące ekspresję poddano analizie molekularnej i stwierdzono, że bogaty w dublety CpG region długości 400 bp zlokalizowany w górę od miejsca inicjacji transkrypcji genu PGK1 występuje w stanie niezmetylowanym, podczas gdy w klonach nie wykazujących ekspresji region ten jest albo całkowicie zmetylowany, albo występują w nim naprzemiennie odcinki zmetylowane i niezmetylowane. Strefa ta jest prawdopodobnie promotorem niezbędnym dla inicjacji transkrypcji. Analogiczne wyniki otrzymano dla genów HPRT i G6PDH [35].

Sprawa inaktywacji X nie jest jednak tak prosta, jak by się mogło wydawać, gdyż gen HPRT znajdujący się na preferencyjnie inaktywowanym X w tkankach pozazarodkowych myszy zachowuje zdolność transformowania komórek HPRT- podobnie jak pojedynczy X izolowany z plemników. Sugeruje to, iż molekularna podstawa procesu inaktywacji w tkankach somatycznych różni się od tego, co zachodzi w tkankach pozazarodkowych i w czasie spermatogenezy.

Wzór metylacji wysp CpG w pobliżu genów funkcyjnych na aktywnym X jest podobny jak na autosomach, podczas gdy są one wysoko zmetylowane w przypadku nieaktywnego X w tkankach somatycznych. Jednakże, pomimo iż te wyspy są nisko zmetylowane w plemniku i w nieaktywnych X pochodzących z łożyska, są tam nieaktywne, a z drugiej strony inne geny na nieaktywnym X są nieaktywne, pomimo iż nie mają one w pobliżu wysp CpG [67].

Wydaje się więc, że metylacja jest zjawiskiem wtórnym, powodującym utrwalenie nieaktywnego stanu X i dodatkowe zabezpieczenie przed jego reaktywacją. Udowodniono, że np. w przypadku genu HPRT jego metylacja zachodzi dopiero po inaktywacji [57].

Wzór metylacji nieaktywnego X jest wyjątkowo stabilny i nie ulega zmianie wraz z wiekiem osobniczym, jak wykazano na przykładzie genów G6PDH i GdX, porównując ich stan metylacji w leukocytach pochodzących od grupy młodych (5–20 lat) i starych (85–95 lat) kobiet [73].

Wszystkie te dane pozwoliły sformułować pełny model inaktywacji X, mogący mieć zastosowanie także do nieaktywnych odcinków autosomów. Składają się na niego cztery zjawiska, niekoniecznie zachodzące w opisanej kolejności. Po pierwsze, musi nastąpić wybór aktywnego X, mogący polegać na specyficznej lokalizacji tzw. centrum aktywacyjnego lub jego powiązaniu z błoną jądrową. Po drugie, następuje metylacja kluczowych miejsc, powodująca inaktywację *en block*, co odzwierciedla sytuację we wczesnym rozwoju lub w komórkach EC. Etap ten może być w całości odwracalny przy użyciu 5-azaC. Po trzecie, następuje zmiana konformacji chromatyny, która dzieli inaktywowany chromosom na segmenty inaktywacyjne. Zjawisko to występuje w czasie różnicowania się pluripotencjalnych komórek w kierunku linii rozwojowych o mniejszym potencjale i może odpowiadać za wyodrębnianie się

regionów heterochromatyny. Taka demarkacja segmentów tłumaczy to, iż 5-azaC wywołuje tylko ograniczoną reaktywność. Na tym etapie niektóre geny (np. HPRT) są wciąż niezmetylowane i utrzymują zdolność do transformacji. Stan ten odpowiada stopniu inaktywacji X w endodermie pęcherzyka żółtkowego lub trofektodermie łożyska. Wreszcie czwartym, ostatnim etapem występującym w komórkach ulegających różnicowaniu terminalnemu (ale z pominięciem pierwotnych komórek płciowych) jest ostateczna metylacja genów na nieaktywnym X, prawdopodobnie występująca jako integralna część mechanizmów różnicującej metylacji genomu, inaktywującej wszystkie wyspecjalizowane geny niepotrzebne w funkcjonowaniu konkretnej komórki [67].

Obecnie wiadomo, że spośród wielu genów nieaktywnego X, pewna niewielka część nie ulega inaktywacji. Są to przeważnie geny mające mniej lub bardziej homologiczne odpowiedniki na chromosomie Y, takie jak MIC2, ZFX czy RPS4X. Pozostaje do sprawdzenia ich stopień metylacji [26].

Ostatni z tych genów leży kuriozalnie w pobliżu tajemniczego centrum inaktywacyjnego (XIC – X inactivation center) zlokalizowanego na długim ramieniu X.

Pozostaje do rozstrzygnięcia, jaką naturę ma wyzwalany w pierwszym etapie inaktywacji sygnał. Jako jedno z możliwych tłumaczeń tego procesu proponuje się model *enhancer-way-station*, zakładający interakcję specyficznych białek ze zlokalizowanymi co jakiś czas wzdłuż X sekwencjami. Być może na większości autosomów istnieją sekwencje zapobiegające temu procesowi. Jak na razie jedynym kandydatem na sekwencje cis-regulujące ten proces są wyspy CpG chromosomu X [83].

## IMPRINTING GENOWY

Stwierdzenie faktu, że u łożyskowców ulega inaktywacji preferencyjnie X ojcowski w tkankach pozazarodkowych, pozwala stwierdzić, iż musi mieć on jakiś wyznacznik, na którego podstawie komórka odróżnia, czy jest on pochodzenia ojcowskiego, czy też matczyne. Wyznacznik taki zwie się *imprintem* genowym. Co więcej, w tkankach zarodka *imprint* taki musi ulec zupełnemu wymazaniu we wczesnych etapach rozwoju, co determinuje przypadkową inaktywację X [69].

Można zdefiniować *imprinting* genowy jako różnicującą modyfikację materiału genetycznego zygoty w zależności od tego, czy pochodzi od ojca czy od matki, która prowadzi do zróżnicowanej ekspresji alleli rodzicielskich podczas rozwoju i u dorosłego osobnika [66].

Owa różnicująca modyfikacja jest niezbędna dla prawidłowego rozwoju zarodka, gdyż zarówno zarodki gynogenetyczne, jak i androgenetyczne nie rozwijają się prawidłowo. W pierwszym przypadku dobrze rozwijają się struktury własne zarodka, natomiast struktury pozazarodkowe są niedorozwinięte, podczas gdy w drugim zachodzi odwrotna sytuacja [66, 95].

Ma to swój odpowiednik w patologii ludzkiej, gdyż w potworniakach jajników (struktury zarodkowe) występuje diploidalny garnitur chromosomów matczynych, natomiast w zaśniadzie groniastym (struktury pozazarodkowe) występuje dispermia lub duplikacja haploidalnego garnituru chromosomów ojcowskich przy eliminacji chromosomów matczynych [8].

Chromosomy matczyne wydają się ważniejsze w okresie, gdy komórki zarodka są totipotencjalne lub pluripotencjalne, podczas gdy chromosomy ojcowskie są wybiórczo wymagane

do proliferacji zróżnicowanych tkanek, zarówno wewnątrz jak i zewnątrz zarodkowych [94]. Takie komplementarne zachowanie się genomów rodzicielskich w czasie rozwoju wydaje się być spowodowane tym, iż w rzeczywistości *imprinting* genowy powoduje wykluczenie jednego z alleli genów regulacyjnych. Takie wykluczanie alleli wywołuje zjawisko funkcjonalnej haploidalności genów [38].

Jako molekularną podstawę *imprintingu* zaproponowano metylację DNA, opierając się początkowo na różnicach w stopniu metylacji pomiędzy gametami. Oocyt u myszy charakteryzuje się niską zawartością 5-mC, DNA plemników zaś jest wysoko zmetylowane [66].

Hipoteza ta została potwierdzona w badaniach nad dziedziczeniem transgenów, gdyż stwierdzono, że w ok. 20% przypadków poziom ich ekspresji zależy od tego, od którego z rodziców zostały odziedziczone. Ulegające *imprintingowi* transgeny transmitowane przez samce ulegają we wszystkich znanych przypadkach ekspresji, co koreluje z ich hypometylacją u potomstwa. Natomiast transgeny transmitowane przez samice wykazują zniesioną lub obniżoną ekspresję, czemu towarzyszy ich znaczna hypermetylacja. Wydaje się jednak, że przynajmniej w niektórych przypadkach zależność ta powinna ulec odwróceniu.

Wyniki te doskonale zgadzają się z obserwacją, że disomie chromosomów matczynych prowadzą do zespołów niedoborowych, podczas gdy disomie chromosomów ojcowskich do zespołów nadmiarowych.

Uważa się, że ok. 10% genomu ulega w warunkach normalnych *imprintingowi*, co kontrastuje ze zwiększoną częstością *imprintingu* wśród transgenów, zważywszy, iż ulegają one wbudowaniu do genomu w sposób przypadkowy. Być może, odpowiedź na ten dylemat tkwi w tym, że *imprinting* na poziomie molekularnym obejmuje o wiele większą część genomu niż na poziomie fenotypowym [80, 94]. *Imprint* dziadków ulega zwykle wymazaniu przy wejściu do następnego pokolenia, jednak na przykład w przypadku ekspresji genu antygeny powierzchniowego *hepatitis B* u transgenicznej myszy, występuje powstawanie trwałego *imprintu* pod postacią zmiany wzoru metylacji po przejściu transgeny przez samicę [34].

Natomiast w przypadku transgeny TK 2751, wykryto kumulacyjny efekt epigenetycznych modyfikacji w zależności od sukcesywnej transmisji przez linię żeńską lub męską, podobnie jak ma to miejsce w dziedziczeniu płasawicy Huntingtona. Zaczyna się ona we wczesnym wieku przy transmisji od dziadka do ojca w odróżnieniu od transmisji od dziadka do matki [94].

Zjawiska *imprintingu* odgrywają także rolę w występowaniu dziedzicznych form guza Wilmsa i mięsaka kostniakowego [7, 18, 87, 100] oraz zespołu upośledzenia umysłowego FraX, czyli kruchego chromosomu C [47].

Mimo dokładnego opisanie sekwencji ulegających metylacji w przypadku *imprintowanych* transgenów, wciąż nie zidentyfikowano bezbłędnie endogennych genów *imprintowanych* w ten sposób. Odpowiednimi kandydatami wydają się m.in. geny dla czynników wzrostu i ich receptorów [94].

## ROLA METYLACJI W ROZWOJU

W czasie rozwoju ontogenetycznego i różnicowania się poszczególnych komórek zachodzą drastyczne zmiany w poziomie metylacji ich genomu.

Jak już wspomniałem, DNA zygoty pochodzące od ojca jest generalnie hypermetylowane, podczas gdy pochodzące od matki hypometylowane. Zaraz po zapłodnieniu następuje krótki rzut metylacji *de novo*, obejmującej przede wszystkim genom matczyny. Genom ojcowski jest nań o wiele mniej podatny, ze względu na wysoki stopień kondensacji chromatyny [94].

Do stadium blastocysty następuje globalny spadek metylacji DNA, co wykazano zarówno u królika [59], jak i u myszy [66]. W czasie gastrulacji następuje duża fala metylacji *de novo* w epiblaście, nie dotyczy ona jednak tkanek pozazarodkowych, gdzie proces ten zachodzi wolniej i według innego wzoru.

Pierwotne komórki płciowe wykazują bardzo niski stopień metylacji, prawdopodobnie dlatego, iż wyodrębniają się z epiblastu przed tą falą metylacyjną [68, 94].

Podczas dalszego różnicowania się pierwotnych komórek płciowych ulega wymazaniu większość *imprintów* rodzicielskich [19], w odróżnieniu od tkanek somatycznych, które pomimo wahań w poziomie metylacji zachowują informację epigenetyczną [66]. Ustalenie się ostatecznego wzoru metylacji DNA gamet zachodzi prawdopodobnie w czasie profazy I podziału mejotycznego [102].

Podczas dalszego rozwoju w pewnych grupach komórek i zespołach tkankowych często zdarzają się masywne zmiany wzoru metylacji [18], który ustala się ostatecznie w tkankach terminalnie zróżnicowanych [27]. Zmiany poziomu metylacji DNA zachodzą wciąż w okresie dojrzewania u myszy, a poziom 5-mC jest wówczas wysoki w grasicy, śledzionie i mózgu, średni w płucu, a niski w wątrobie [97].

W przypadku człowieka wzór metylacji charakterystyczny dla dorosłych ustala się poprzez demetylację już w okresie 6–14 tygodnia życia płodowego [63].

Stabilność tego wzoru badano dla genów TNF  $\alpha$  i  $\beta$  w DNA pochodzącym z limfocytów, granulocytów i plemników pobranych od różnych ludzi. Wykazano, iż był on taki sam w przypadku tych samych komórek od różnych ludzi, a odmienny w przypadku różnych rodzajów komórek od tego samego człowieka [51].

Podczas starzenia się organizmu lub izolowanych linii komórkowych następuje powolny spadek globalnego poziomu metylacji [31, 111, 112], choć w przypadku poszczególnych genów metylacja może spadać, rosnąć lub pozostawać bez zmian [16].

Poziom globalnej metylacji pozostaje w wyraźnej korelacji z liczbą przeżytych mitoz, gdyż np. ludzkie diploidalne fibroblasty zahamowane w hodowli przez 52 tygodnie tracą 8% 5-mC w kontraście do tego, że te same komórki szybko dzielące się tracą w ciągu 20 tygodni aż 50% 5-mC w genomie [16].

Szybkość, z jaką następuje utrata 5-mC i obniżenie się stopnia metylacji genomu, zależy od długości życia danego gatunku i jest mniejsza np. u człowieka niż u myszy [71].

Demetylujące działanie 5-azaC powoduje skrócenie okresu życia linii komórkowych [40], choć nie hamuje ich zdolności do proliferacji, mimo tego iż poziom 5-mC w tych komórkach może być wyjściowo niższy niż jest osiągnięty pod koniec normalnego życia hodowli [33].

Można to tłumaczyć tym, iż w genomie istnieje miejsca całkowicie odporne na działanie 5-azaC, ponieważ ich demetylacja może być letalna [62]. W tych loci są prawdopodobnie zlokalizowane geny odpowiedzialne za starzenie się komórek [49].

W odróżnieniu od diploidalnych, starzejących się linii komórkowych linie transformowane lub pochodzące z guzów nowotworowych wykazują stały poziom 5-mC nie ulegający zmianie mimo wielokrotnych podziałów. Nabycie przez komórkę zdolności do utrzymywania stałego poziomu 5-mC prowadzi do powstania linii nieśmiertelnej [16].

## METYLACJA A ONKOGENEZA

Odkrycie tego ostatniego faktu zwróciło uwagę na zmiany wzoru oraz stopnia globalnej metylacji w komórkach nowotworowych. I tak, okazało się, że potworniakoraki charakteryzują się uogólnioną hipermetylacją DNA, podczas gdy nasieniaki są hypometylowane, przy czym stopień utraty 5-mC idzie w parze ze wzrostem złośliwości nowotworu [76]. Podobną zależność zaobserwowano również w przypadku innych nowotworów złośliwych, gdyż stopień metylacji jest z reguły niższy w przerzutach [43]. Zaburzenia metylacji obserwowano także w białaczkach [50] oraz w przypadku indukowanych guzów wątroby u myszy, gdzie zwraca uwagę demetylacja promotora i wzmożona ekspresja genu *c-myc* [70].

Obecnie zwraca się uwagę na to, iż w przypadku wielu nowotworów uogólnionej demetylacji towarzyszy lokalne hipermetylacja wysp CpG. To ostatnie zjawisko odpowiadać by mogło za zaburzenia ekspresji genów tkankowo specyficznych, prowadzące do anaplazji. Wyspy ulegające hipermetylacji nie są przypadkowe, w przypadku raka płuc i jelita grubego są najczęściej zlokalizowane na krótkich ramionach chromosomów 11 i 17, podczas gdy na krótkim ramieniu chromosomu 3 jedynie w przypadku raka płuc [3].

Zaburzeniom metylacji w tkance nowotworowej towarzyszy też często wzrost aktywności metylotransferazy. W stosunku do pacjentów bez zmian nowotworowych poziom jej aktywności w śluzówce jelita grubego u pacjentów z łagodnymi polipami okrężnicy zwiększony jest o 15 razy, u pacjentów z gruczolakami o 60 razy, a u pacjentów z rakiem okrężnicy o ponad 200 razy [21].

## ZAKOŃCZENIE

Na przykładzie badań nad metylacją DNA można zaobserwować, jak przeoczano przez długi okres znaczenie tego zjawiska, uważając je za swego rodzaju ciekawostkę biologiczną. Obecnie wiadomo już, że odgrywa ono kluczową rolę w funkcjonowaniu organizmów eukariotycznych, przede wszystkim poprzez regulację ekspresji genów. Z tego powodu badania nad metylacją stanowią nierozdzielny składnik wielu gałęzi nauk biomedycznych, od biologii komórki, poprzez genetykę, wirusologię i embriologię po nauki kliniczne.

Poznano już rolę, jaką odgrywa 5-mC w genomie, lecz daleko jeszcze jesteśmy od pełnego wyjaśnienia mechanizmów regulujących i odczytujących metylację DNA. Laboratoria i instytuty naukowe na całym świecie prowadzą w tej dziedzinie intensywne badania i rośnie literatura dotycząca tego zagadnienia. Należy przypuszczać, iż najbliższe lata przyniosą wiele ciekawych odkryć, które przyczynią się do pełniejszego zrozumienia tego problemu.

## LITERATURA

- [1] ADAMS RLP. DNA methylation. The effect of minor bases on DNA-protein interactions. *Biochem J* 1990; **265**: 309–320.
- [2] BAIK JH et al. DNA methylation patterns of the rat  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase gene in embryonic, adult and neoplastic liver. *Carcinogenesis* 1991; **12**: 1035–1039.

- [3] BAYLIN SB et al. Abnormal patterns of DNA methylation in human neoplasia: potential consequences for tumor progression. *Cancer Cells* 1991; **3**: 383–390.
- [4] BECKER PB, RUPPERT S, SCHUTZ G. Genomic footprinting reveals cell type-specific DNA binding of ubiquitous factors. *Cell* 1987; **51**: 435–443.
- [5] BEHE M, FELSENFELD G. Effects of methylation on a synthetic polynucleotide: the B-Z transition in poly (dG-m<sup>5</sup>dC). poly (dG-m<sup>5</sup>dC). *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 1619–1623.
- [6] BEN-HATTAR J, JIRICNY J. Methylation of single CpG dinucleotides within a promoter element of the herpes simplex virus Tk gene reduces its transcription in vivo. *Gene* 1988; **65**: 219–227.
- [7] BERRY CL. Embryonal tumours and genomic imprinting. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1991; **419**: 449–450.
- [8] BERRY CL. Genomic imprinting for pathologists. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1991; **419**: 363–364.
- [9] BESSER D. et al. DNA methylation inhibits transcription by RNA polymerase III of a tRNA gene, but not of a 5S rRNA gene. *FEBS Lett* 1990; **269**: 358–362.
- [10] BESTOR TH. DNA methylation: evolution of a bacterial immune function into a regulator of gene expression and genome structure in higher eukaryotes. *Philos Trans R Soc Lond Biol* 1990; **326**: 178–187.
- [11] BIRD A. Proteins that bind to methylated DNA. Referat wygłoszony na Joint Spring Meeting of the British Society for Cell Biology and British Society for Developmental Biology w Brighton. 1992.
- [12] BOYES J, BIRD A. DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell* 1991; **64**: 1123–1134.
- [13] BOYES J, BIRD A. Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *EMBO J* 1992; **11**: 327–333.
- [14] BURBELO PD, HORIKOSHI S, YAMADA Y. DNA methylation and collagen IV gene expression in F9 teratocarcinoma cells. *J Biol Chem* 1990; **265**: 4839–4843.
- [15] CAMBARERI EB, SINGER MJ, SELKER EU. Recurrence of Repeat-Induced Point Mutation in *Neurospora crassa*. *Genetics* 1991; **127**: 699–710.
- [16] CATANIA J, FAIREWEATHER DS. DNA methylation and cellular ageing. *Mutation Res* 1991; **256**: 283–293.
- [17] CEDAR H. DNA methylation and gene activity. *Cell* 1988; **53**: 3–46.
- [18] CEDAR H, RAZIN A. DNA methylation and development. *Bioch Bioph Acta* 1990; **1049**: 1–8.
- [19] CHAILLET JR et al. Parental-specific methylation of an imprinted transgene is established during gametogenesis and progressively changes during embryogenesis. *Cell* 1991; **66**: 77–83.
- [20] COMB M, GOODMAN HM. CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of transcription factor AP-2. *Nucl Acids Res* 1990; **18**: 3975–3982.
- [21] DEIRY WS et al. High expression of the DNA methyltransferase gene characterizes human neoplastic cells and progression stages of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 3470–3474.
- [22] DOBROVIC A et al. DNA methylation and genetic inactivation at thymidine kinase locus: two different mechanisms for silencing autosomal genes. *Som Cell Mol Gen* 1988; **14**: 55–68.
- [23] DOERFLER W. The significance of DNA methylation patterns: promoter inhibition by sequence-specific methylation is one functional consequence. *Philos Trans R Soc Lond Biol* 1990; **326**: 253–265.
- [24] DOVER GJ, CARACHE S. Increasing fetal hemoglobin production in sickle cell disease: results of clinical trials. *Prog Clin Biol Res* 1987; **251**: 455–466.
- [25] EDWARDS YH. CpG islands in genes showing tissue specific expression. *Philos Trans R Soc Lond Biol* 1990; **326**: 207–215.
- [26] FISHER EMC et al. Homologous ribosomal protein genes on the human C and Y chromosomes: escape from X inactivation and possible implications for Turner syndrome. *Cell* 1990; **63**: 1205–1218.
- [27] FRANK D et al. Demethylation of CpG islands in embryonic cells. *Nature* 1991; **351**: 239–241.
- [28] FRANK D et al. Demethylation of genes in animal cells. *Philos Trans R Soc Lond Biol* 1990; **326**: 241–251.
- [29] GARRO AJ et al. Ethanol consumption inhibits fetal DNA methylation in mice: implication for the fetal alcohol syndrome. *Alcohol Clin Exp Res* 1991; **15**: 395–398.
- [30] GELLERSEN B, KEMPF R. Human prolactin gene expression: positive correlation between site-specific methylation and gene activity in a set of human lymphoid cell lines. *Mol Endocrinol* 1990; **4**: 1874–1886.
- [31] GLOBUS J, PALELLA TD, RICHARDSON BC. Quantitative changes in T cell DNA methylation occur during differentiation and ageing. *Eur J Immunol* 1990; **20**: 1869–1872.
- [32] GOTZ F et al. Transcription inhibition of SV40 by in vitro DNA methylation. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1087**: 323–329.
- [33] GRAY MD, JESCH SA, STEIN GH. 5-Azacytidine-induced demethylation of DNA to senescent level does not block proliferation of human fibroblasts. *J Cell Physiol* 1991; **149**: 477–484.
- [34] HADCHOUEL M et al. Maternal inhibition of hepatitis B surface antigen gene expression in transgenic mice correlates with de novo methylation. *Nature* 1987; **329**: 454–456.

- [35] HANSEN RS, GARTLER SM. 5-Azacytidine induced reactivation of the human X chromosome linked PGK1 gene is associated with a large region of cytosine demethylation in the 5' CpG island. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 4174–4178.
- [36] HARRINGTON MA et al. Cytosine methylation does not affect binding of transcription factor Sp1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 2066–2070.
- [37] HIGURASHI M, COLE RD. The combination of DNA methylation and H1 histone binding inhibits the action of restriction nuclease on plasmid DNA. *J Biol Chem* 1991; **266**: 8619–8625.
- [38] HOLLIDAY R. Genomic imprinting and allelic exclusion. *Development* 1990; Suppl: 125–129.
- [39] HOLLER M et al. Sp1 transcription factor binds DNA and activates transcription even when the binding site is CpG methylated. *Gen Devel* 1988; **2**: 1127–1135.
- [40] HONDA S, MATSUO M. 5-azacytidine shortens the in vitro lifespan of human diploid cells. *Cell Biol Rep* 1987; **11**: 141.
- [41] ICHINOSE M et al. Methylation and expression of human pepsinogen genes in normal tissues and their alterations in stomach cancer. *Japan J Cancer Res* 1991; **82**: 686–692.
- [42] INAMDAR NM, EHRLICH KC, EHRLICH M. CpG methylation inhibits binding of several sequence-specific DNA-binding proteins from pea, wheat, soybean and cauliflower. *Plant Mol Biol* 1991; **17**: 111–123.
- [43] JONES PA. DNA methylation and cancer. *Cancer Res* 1986; **46**: 461–466.
- [44] JONES PA, TAYLOR SM, WILSON V. DNA modification, differentiation, and transformation. *J Exp Zool* 1983; **228**: 287–295.
- [45] JUTTERMAN R et al. Adenovirus type 2 VAI RNA transcription by polymerase III is blocked by sequence-specific methylation. *J Virol* 1991; **65**: 1735–1742.
- [46] KALINICH JF, CATRAVAS GN, SNYDER SL. Radioprotective properties of DNA methylation-disrupting agents. *Int J Radiat Biol* 1991; **59**: 1217–1226.
- [47] KHALIFA MM, REISS AL, MIGEON BR. Methylation status of genes flanking the fragile site in males with the fragile X syndrome: a test for the imprinting hypothesis. *Am J Hum Genet* 1990; **46**: 744–753.
- [48] KILBOURNE EJ, OSAKA H, SABBAN EL. Hypomethylation of the rat tyrosine hydroxylase gene correlates with its expression in several cell types. *Brain Res* 1991; **58**: 143–146.
- [49] KLEIN CB. Senescence of nickel-transformed cells by an X chromosome: possible epigenetic control. *Science* 1991; **251**: 706–799.
- [50] KOCHANEK S et al. DNA methylation profiles in the human genes for TNF  $\alpha$  and  $\beta$  in subpopulations of leukocytes and leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 5759–5763.
- [51] KOCHANEK S et al. Interindividual concordance of methylation profiles in human genes for TNF  $\alpha$  and  $\beta$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 8830–8834.
- [52] KOVESDI I, REICHEL R, NEVINS JR. Role of adenovirus E2 promoter binding factor on E1A-mediated coordinate gene control. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 2180–2184.
- [53] LEVINE A, CANTONI GL, RAZIN A. Inhibition of promoter activity by methylation: possible involvement of protein mediators. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 6515–6518.
- [54] LEVIS J, BIRD A. DNA methylation and chromatin structure. *FEBS Lett* 1991; **285**: 155–159.
- [55] LEY TJ et al. 5-azacytidine selectively increases  $\beta$ -globin synthesis in patient with  $\beta$ -thalassemia. *New Engl J Med* 1982; **307**: 1469–1475.
- [56] LISKAY RM, EVANS RJ. Inactive X chromosome DNA does not function in DNA-mediated cell transformation for the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; **77**: 4895–4898.
- [57] LOCK LF, TAKAGI N, MARTIN GR. Methylation of the Hprt gene on the inactive X occurs after chromosome inactivation. *Cell* 1987; **48**: 39–46.
- [58] LOPEZ-LEON MD, CABRERO J, CAMACHO JPM. A nucleous organizer region in a B chromosome inactivated by DNA methylation. *Chromosoma* 1991; **100**: 134–138.
- [59] MANES C, MENZEL P. Demethylation of CpG sites in DNA of early rabbit trophoblast. *Nature* 1981; **293**: 589–590.
- [60] MATSUNAGA E, GONZALES FJ. Specific cytosine demethylations within the first exons of the rat CYP2D3 and CYP2D5 genes are associated with activation of hepatic gene expression during development. *DNA Cell Biol* 1990; **9**: 443–452.
- [61] MEEHAN R et al. A nuclear protein that binds preferentially to methylated DNA in vitro may play a role in the inaccessibility of methylated CpGs in mammalian nuclei. *Philos Trans R Soc Lond Biol* 1990; **326**: 199–205.
- [62] MICHALOWSKY LA, JONES PA. Gene structure and transcription in mouse cells with extensively demethylated DNA. *Mol Cell Biol* 1989; **9**: 885–892.
- [63] MIGEON BR et al. Programmed demethylation in CpG islands during human fetal development. *Somat Cell Mol Genet* 1991; **17**: 159–168.

- [64] MOLLOY PL, WATT F. DNA methylation and specific protein-DNA interactions. *Philos Trans R Soc Lond Biol* 1990; **326**: 267–275.
- [65] MONK M. Changes in DNA methylation during mouse embryonic development in relation to X-chromosome activity and imprinting. *Philos Trans R Soc Lond Biol* 1990; **326**: 299–312.
- [66] MONK M. Genomic imprinting. *Genes Develop* 1988; **2**: 921–925.
- [67] MONK M. Methylation and the X chromosome. *BioEssays* 1986; **4**: 204–208.
- [68] MONK M, BOUBELIK M, LEHNERT S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development* 1987; **99**: 371–382.
- [69] MONK M, GRANT M. Preferential X-chromosome inactivation. *Development* 1990; Suppl: 55–62.
- [70] MUNZEL PA et al. Site-specific hypomethylation of c-myc protooncogene in liver nodules and inhibition of DNA methylation by N-nitrosomorpholine. *Biochem Pharmacol* 1991; **42**: 365–371.
- [71] ONO T et al. Comparison of age-associated changes of c-myc gene methylation in liver between man and mouse. *Mutat Res* 1990; **237**: 239–246.
- [72] OREND G, KUHLMAN I, DOERFLER W. Spreading of DNA methylation across integrated foreign adenovirus type 12 genomes in mammalian cells. *J Virol* 1991; **65**: 4301–4308.
- [73] PAGANI F, TONIOLO D, VERGANI C. Stability of DNA methylation of X-chromosome genes during ageing. *Somat Cell Mol Genet* 1990; **16**: 79–84.
- [74] PARROW VC, ALESTRÖMP, GAUTVIK KM. 5-azacytidine-induced alterations in the GH1ZC1 cells: effects on cellular morphology, chromosome structures, DNA and protein synthesis. *J Cell Sci* 1989; **93**: 533–543.
- [75] PEEK R et al. DNA methylation as a regulatory mechanism in rat gamma-crystallin gene expression. *Nucleic Acids Res* 1991; **19**: 77–83.
- [76] PELTOMAKI P. DNA methylation changes in human testicular cancer. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1096**: 183–196.
- [77] PFOHL-LESZKOWICZ A, KEITH G, DIRHEIMER G. Effect of cobalamin on in vitro enzymatic DNA methylation: methylcobalamin can act as a methyl donor. *Biochemistry* 1991; **30**: 8045–8051.
- [78] PRANTERA G, FERRARO M. Analysis of methylation and distribution of CpG sequences on human active and inactive X-chromosomes by in situ nick translation. *Chromosoma* 1990; **99**: 18–23.
- [79] PRENDERGAST GC, LAWE D, ZIFF EB. Association of Myn, the murine homolog of max, with c-myc, stimulates methylation sensitive DNA binding and ras conformation. *Cell* 1991; **65**: 395–407.
- [80] REIK W, HOWLETT SK, SURANI MA. Imprinting by DNA methylation: from transgenes to endogenous gene sequences. *Development* 1990; Suppl: 99–106.
- [81] RIGGS AD. DNA methylation and late replication probably aid cell memory and type I DNA reeling could aid chromosome folding and enhancer function. *Philos Trans R Soc Lond Biol* 1990; **326**: 285–297.
- [82] RIGGS AD. X inactivation, differentiation and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* 1975; **14**: 9–25.
- [83] RIGGS AD, SINGERSAM J, KEITH DH. Methylation of the PGK promoter region and an enhancer-way station model for X-chromosome inactivation. [w]: *Biochemistry and Biology of DNA Methylation*. London, New York: Alan R.Liss 1985: 211–222.
- [84] SALUZ HP et al. Genomic sequencing and in vivo footprinting of an expression-specific DNase I-hypersensitive site of avian vitellogenin II promoter reveal a demethylation of a mCpG and a change on specific interaction of proteins with DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 6697–6700.
- [85] SALUZ HP et al. Studying DNA methylation and protein-DNA interaction sites in vivo. [w]: *Nucleic Acid Methylation*. London, New York, Alan R.Liss 1990: 299–311.
- [86] SALUZ HP, JIRICNY J, JOST JP. Genomic sequencing reveals a positive correlation between the kinetics of strand-specific DNA-demethylation of the overlapping estradiol/glucocorticoid receptor binding sites and the rate of avian vitellogenin mRNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 7167–7171.
- [87] SAPIENZA C. Genome imprinting and carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1072**: 51–61.
- [88] SCHEINBART LS et al. Procainamide inhibits DNA methyltransferase in a human T cell line. *J Rheumatol* 1991; **18**: 530–534.
- [89] SCHULZE-FOSTER K et al. Transcription of HIV1 is inhibited by DNA Methylation. *Biochem Biophys Res Comm* 1990; **168**: 141–147.
- [90] SELKER EU. DNA methylation and chromatine structure: a view from below. *Trends Biol Sci* 1990; **15**: 103–107.
- [91] SELLEM CH, WEISS MC, CASSIO D. Activation of a silet gene is accompanied by its demethylation. *J Mol Biol* 1985; **181**: 363–371.
- [92] SHPAER EG, MULLINS JI. Selection against CpG dinucleotides in lentiviral genes: a possible role of methylation in regulation of viral expression. *Nucl Acids Res* 1990; **18**: 5793–5797.
- [93] SMITH SS et al. Recognition of unusual DNA structures by human DNA (cytosine-5) methyltransferase. *J Mol Biol* 1991; **217**: 39–51.



- [94] SURANI MA et al. Developmental consequences of imprinting parental chromosomes by DNA methylation. *Philos Trans R Soc Lond Biol* 1990; **326**: 313–327.
- [95] SURANI MAH, BARTON SC, NORRIS ML. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 1984; **308**: 548–550.
- [96] SZYF M, BOZOVIC V, TANIGAWA G. Growth regulation of mouse DNA methyltransferase gene expression. *J Biol Chem* 1991; **266**: 10027–10030.
- [97] TAWA R et al. Changes of DNA methylation level during pre- and postnatal period in mice. *Differentiation* 1990; **45**: 44–48.
- [98] TAZI J, BIRD A. Alternative chromatin structure at CpG islands. *Cell* 1990; **60**: 909–920.
- [99] THOMPSON JP. In vitro methylation of the promoter and enhancer of pro alpha 1(I) collagen gene leads to its transcriptional inactivation. *J Biol Chem* 1991; **266**: 2549–2556.
- [100] TOGUCHIDA J et al. Preferential mutation of parentally derived RB gene as the initial event in sporadic osteosarcoma. *Nature* 1989; **338**: 156–158.
- [101] TOTH M, MULLER U, DOERFLER W. Establishment of de novo methylation patterns. Transcription factor binding and deoxycytidine methylation at CpG and non-CpG sequences in an integrated adenovirus promoter. *J Mol Biol* 1990; **214**: 673–683.
- [102] TRASLER JM et al. DNA methylation and demethylation events during meiotic prophase in the mouse testis. *Mol Cell Biol* 1990; **10**: 1828–1834.
- [103] TURKER MS, MUMMANENI P, BISHOP PL. Region- and cell type-specific de novo DNA methylation in cultured mammalian cells. *Som Cell Molec Genet* 1991; **17**: 151–157.
- [104] VARDIMON L et al. The expression of a cloned adenovirus gene is inhibited by in vitro methylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79**: 1073–1077.
- [105] WALKER C, MATTHEWS AM, SHAY JW. Suppression of tumorigenicity mediated by 5-azacytidine and associated with increased chromosome number. *J Natl Canc Inst* 1987; **78**: 695–700.
- [106] WANG RYH et al. Methylated DNA-binding protein from human placenta recognizes specific methylated sites on several prokaryotic DNAs. *Nucl Acids Res* 1986; **14**: 9843–9860.
- [107] WATT F, MOLLOY PL. Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Develop* 1988; **2**: 1136–1143.
- [108] WEIH F et al. Analysis of CpG methylation and genomic footprinting at the tyrosine aminotransferase gene: DNA methylation alone is not sufficient to prevent protein binding in vivo. *EMBO J* 1991; **10**: 2559–2567.
- [109] WEISSBACH A. Eukaryotic DNA methylation and demethylation – sequence and strand specificity. *BioEssays* 1987; **7**: 273–274.
- [110] WEISSBACH A, WARD C, BOLDEN A. Eukaryotic DNA methylation and gene expression. *Curr Top Cell-Reg* 1989; **30**: 1–21.
- [111] WILSON V et al. Genomic 5-methylcytosine decreases with age. *J Biol Chem* 1987; **262**: 9948–9951.
- [112] WILSON VL, JONES PA. DNA methylation decreases in ageing but not in immortal cells. *Science* 1983; **220**: 1055–1057.
- [113] WOLFL S, SCHRADER M, WITTIG B. Lack of correlation between DNA methylation and transcriptional inactivation: the chicken lysozyme gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 271–275.
- [114] WORTON KS, KERBEL RS, ANDRULIS IL. Hypomethylation and reactivation of the asparagine synthetase gene induced by L-asparaginase and ethyl methanesulphonate. *Canc Res* 1991; **51**: 985–989.
- [115] ZHANG XY et al. Binding sites in mammalian genes and viral gene regulatory regions recognized by methylated DNA-binding protein. *Nucl Acids Res* 1990; **18**: 6253–6260.

Otrzymano: 01.09.1992 r.

Przyjęto: 23.10.1992 r.

Adres Autora: 02-004 Warszawa, ul. Chałubińskiego 5



# OOGENEZA OWADÓW

## INSECT OOGENESIS

Maria KSIAŹKIEWICZ-KAPRALSKA

Zakład Zoologii Systematycznej i Zoogeografii, Instytut Zoologii,  
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

*Streszczenie.* W artykule przedstawiono przebieg procesu oogenezy w różnych typach jajników owadów oraz jego hormonalną kontrolę. W okresie prewitelogenezy w jajnikach panoistycznych źródłem RNA jest aktywność syntetyczna jądra oocyty związana z pojawieniem się chromosomów szczoteczkowych oraz z amplifikacją rDNA. Z kolei, w jajnikach meroistycznych funkcję syntezy RNA przejmują komórki odżywcze ulegające poliploidyzacji. Proces witelogenezy u owadów przebiega podobnie; u większości gatunków białka żółtka – witelogeniny są syntetyzowane w ciele tłuszczowym i pobierane z hemolimfy przez oocyt w drodze pinocytozy. Somatyczne komórki folikularne, otaczające wzrastające oocyty, zaangażowane są przede wszystkim w wytwarzanie osłon jajowych: błony żółtkowej i chorionu. Hormonalna kontrola procesu oogenezy przebiega u owadów rozmaicie. Proces syntezy witelogeniny w ciele tłuszczowym reguluje hormon juvenilny lub ekdyson.

*Słowa kluczowe:* prewitelogeneza, witelogeneza, tworzenie osłon, hormonalna kontrola.

*Summary.* The process of oogenesis in various types of insect ovaries and its hormonal control is discussed. During previtellogenesis, in the panoistic type of ovary, the oocyte nucleus is active in rRNA synthesis and this process is connected with the amplification of rDNA. The synthesis of other forms of RNA is carried out on the lampbrush chromosomes. In contrast to this, in the meroistic type of ovaries, the RNA synthetic activity is taken over by the nurse cells which become polyploid. The process of vitellogenesis is similar in insects, and in most species the oocytes incorporate, by way of the receptor mediated-endocytosis, substances synthesized in the fat body cells. The somatic follicular cells surrounding the growing oocytes are mainly engaged in the egg envelopes formation i.e. the vitelline envelope and the chorion. The hormonal control of the process of oogenesis is differentiated among insect species and juvenile hormone or ecdyson are involved in the regulation of vitellogenin synthesis in the fat body cells.

*Key words:* previtellogenesis, vitellogenesis, egg envelopes formation, hormonal control.

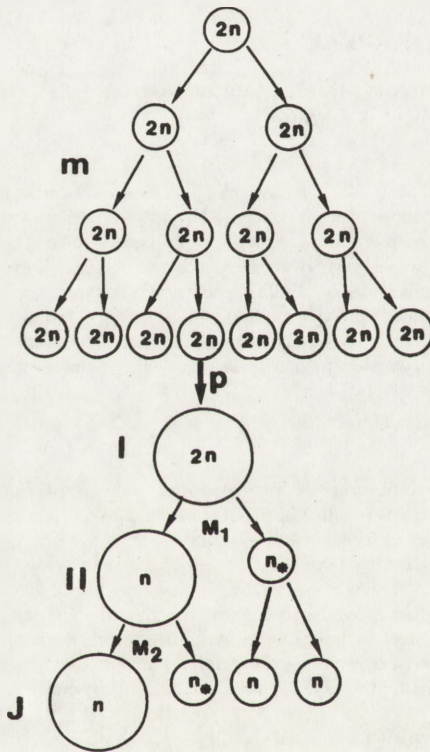
Oogeneza jest procesem prowadzącym do powstania dojrzałych komórek jajowych. W obrębie organizmów wielokomórkowych, z pewnymi tylko wyjątkami, komórki rozrodcze proces ten przechodzą w gonadach żeńskich – jajnikach, w których z macierzystych (pierwotnych) komórek płciowych, drogą podziałów mitotycznych, powstają oogonia (rys. 1). Komórki te przez pewien okres namnażają się, a następnie wzrastają i stają się oocytami I rzędu. W jądrach oocytów w interfazie, przed rozpoczęciem podziału mejotycznego (charakterystycz-

nego jedynie dla komórek linii płciowej w czasie wytwarzania gamet) zachodzi podwojenie ilości DNA z diploidalnej (2C DNA) do tetraploidalnej zawartości (4C DNA) (rys. 1). Profaza pierwszego podziału meiotycznego jest najdłuższym trwającym okresem oogenezy, w którym zarówno w jądrze oocyty, jak i w cytoplazmie zachodzą liczne, fundamentalne dla rozwijającej się komórki jajowej, procesy. Ze względu na morfologię i zachowanie się chromosomów w okresie profazy wyróżnia się pięć stadiów: leptoten, zygoten, pachyten, diploten i diakineza. W stadium zygotenu, homologiczne chromosomy (tzn. takie, z których jeden pochodzi od matki, a drugi od ojca) łączą się w pary, a w stadium pachyten zachodzi wymiana odcinków chromatyd pomiędzy homologicznymi chromosomami. Jest to zjawisko crossing-over, które

stanowi, obok losowego rozchodzenia się chromosomów w czasie tworzenia gamet, podstawę rekombinacji genetycznej, czyli mieszania się genów pochodzących od ojca i od matki.

Następnie, w okresie diplotenu postępuje proces mejozy ulega zatrzymaniu, a oocyt podlega wzrostowi i w cytoplazmie magazynowana jest informacja rozwojowa w postaci RNA (okres prewitelogenezy) oraz materiały zapasowe (okres witelogenezy) zużywane w okresie rozwoju embrionalnego. Podczas prewitelogenezy syntetyzowany jest głównie rRNA. Proces ten umożliwia wytworzenie i zmagazynowanie w cytoplazmie oocyty dużej ilości rybosomów, co umożliwia w początkowej fazie embriogenezy szybką syntezę białek, dopóki zarodek nie osiągnie stadium rozwojowego, w którym podejmowane są syntezы własnego rRNA. U niektórych bezkręgowców specjalne komórki pomocnicze – komórki odżywcze (trofocyty) wspomagają wzrastający oocyt w procesie syntezы kwasów rybonukleinowych [3, 11]. Z pewnymi tylko wyjątkami, komórki te pochodzą z linii płciowej i są siostrzane w stosunku do oocyty, tzn. pochodzą z podziału tej samej komórki oogonjalnej [3, 11, 16].

Oprócz gromadzenia różnych rodzajów RNA, u większości zwierząt, z wyjątkiem form żyworodnych (głównie ssaki), cytoplazma oocyty zostaje wyposażona w substancje zapasowe w postaci otoczonych błoną plazmatyczną kul żółtka, kropeł lipidów oraz glikogenu. Procesy te zachodzą w fazie tzw. witelogenezy. Materiały zapasowe w oocycie mogą powstawać w drodze syntetyzowania żółtka przez sam oocyt (autosyntetyczna witelogeneza), i tak jest u wielu niższych bezkręgowców lub materiał



Rys. 1. Schemat przebiegu podziału meiotycznego podczas oogenezy: m – mitotyczne podziały komórek oogonjalnych, p – profaza pierwszej fazy podziału meiotycznego,  $M_1$  – pierwsza faza podziału meiotycznego,  $M_2$  – druga faza podziału meiotycznego, I – oocyt pierwszego rzędu, o liczbie  $2n$  chromosomów i zawartości 4C DNA, II – oocyt drugiego rzędu, o liczbie  $n$  chromosomów i zawartości 2C DNA, J – komórka jajowa o liczbie  $n$  chromosomów i zawartości 1C DNA, gwiazdki – pierwsze i drugie ciało kierunkowe

przeznaczony na żółtko jest syntetyzowany poza jajnikiem (egzogenna, heterosyntetyczna witelogeneza) [1, 15] (np. ciało tłuszczowe u owadów, wątroba u kręgowców). U niektórych gatunków część materiałów zapasowych jest gromadzona w oocycie w wyniku autosyntezy, a część w wyniku heterosyntezy. Taki typ witelogenezy nazywamy mieszanym [1].

Pod koniec procesu witelogenezy wzrastająca komórka jajowa zostaje otoczona przez osłony, w których wytwarzaniu, u wielu gatunków zwierząt, uczestniczą somatyczne komórki folikularne. Po zakończeniu tych procesów, jądro oocyty podejmuje dalsze etapy pierwszej fazy podziału mejotycznego; liczba chromosomów zostaje zredukowana do połowy (homologiczne zreplikowane chromosomy rozchodzą się do przeciwległych biegunów), a zawartość DNA zmniejszona z 4C DNA do 2C DNA (rys. 1). Podział cytoplazmy jest nierównomierny i powstaje jedna duża komórka – oocyt II rzędu o liczbie  $n$  chromosomów i ilości 2C DNA oraz komórka o niewielkiej ilości cytoplazmy – pierwsze ciało kierunkowe (rys. 1). Przed drugą fazą podziału mejotycznego nie ma podwojenia ilości DNA i w anafazie chromatydy rozdzielają się do przeciwległych biegunów, liczba chromosomów nie ulega zmianie, a zawartość DNA spada do 1C DNA. Powstaje jedna duża komórka jajowa i drugie ciało kierunkowe (często pierwsze ciało kierunkowe dzieli się również) (rys. 1). Tak więc w wyniku podziału mejotycznego, powstaje jedna funkcjonalna komórka jajowa i trzy lub dwa ciała kierunkowe szybko degenerujące.

Jako materiał ilustrujący proces oogenezy zostały wybrane owady, gdyż w tej, najliczniejszej grupie świata zwierząt, proces prowadzący do powstania jaj przebiega niezwykle różnorodnie. Czytelnik zostanie zapoznany z typami jajników u owadów, ze sposobami syntezy RNA (bez i z udziałem komórek odżywczych) w okresie prewitelogenezy, z heterosyntetyczną witelogenezą występującą u większości owadów, formowaniem osłon jajowych oraz hormonalną kontrolą procesu oogenezy w tej grupie stawonogów.

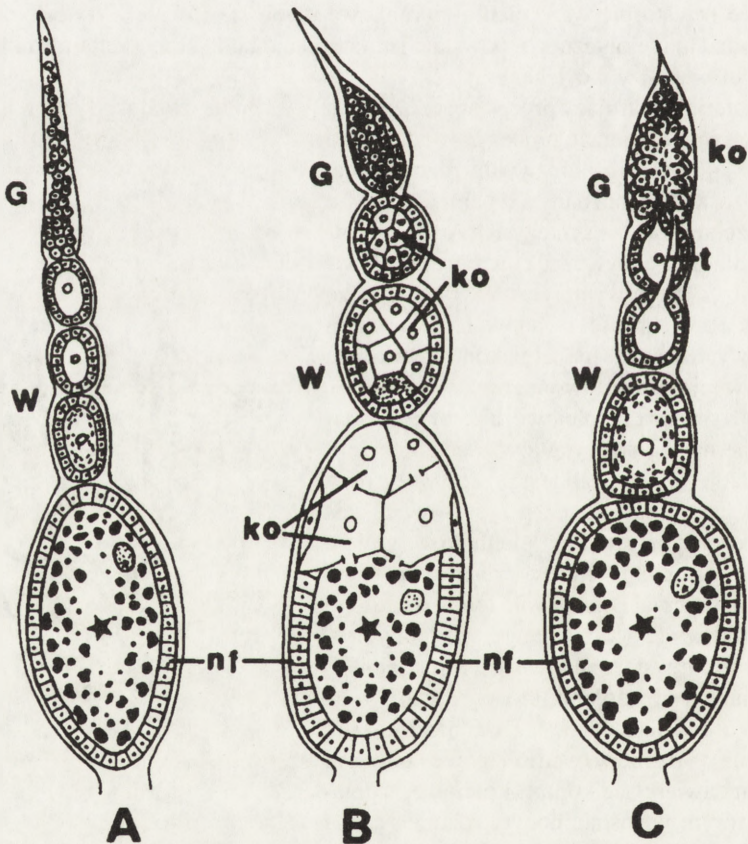
Owady są rozdzielnopłciowe, a gatunki hermafrodytyczne należą do wyjątków. Zadaniem żeńskiego układu rozrodczego jest przede wszystkim produkcja jaj, ale układ ten przystosowany jest również do przechowywania plemników, gdyż u owadów zaplemnienie bardzo często wyprzedza proces zapłodnienia. Budowa układu rozrodczego jest różnorodna, ale ogólny plan jest podobny (rys. 2). Jajniki są parzyste, zbudowane z rurek jajnikowych, zwanych owariolami, których liczba waha się od kilku do kilku tysięcy. Zasadnicze części, które można wyróżnić w owarioli to: nić końcowa, germarium zawierające komórki płciowe, witelarium, w którym wzrastają oocyty rozmieszczone pojedynczo wzdłuż długiej osi owarioli, oraz nóżka owarialna, która uchodzi do bocznego jajowodu. Owariolę otacza niekomórkowa blaszka podstawna (*tunica propria*). Na zewnątrz od niej znajduje się



Rys. 2. Schemat żeńskiego układu rozrodczego: J – parzyste jajniki, ow – owariole, bj – boczny jajowód, sj – środkowy jajowód, gwiazdka – zbiornik nasieni (spermateka), gs – gruczoł spermatekalny, gd – gruczoł dodatkowy, p – pochwa

zewnątrzną osłoną owarialną zawierającą mięśnie i tchawki. Jajowody boczne są parzyste i łączą się w nieparzysty jajowód środkowy, otwierający się do komory płciowej tworzącej pochwę. Zbiornik nasienny (spermateka), z którym często związane są gruczoły spermatekalne, uchodzi do komory płciowej. Często do pochwy otwierają się także gruczoły dodatkowe, związane najczęściej z produkcją wydzieliny umożliwiającej przymocowanie składanych jaj do podłoża (rys. 2).

Owariole owadów mają zróżnicowaną strukturę i ze względu na brak lub obecność komórek odżywczych, wyróżnia się owariole panoistyczne i meroistyczne. W owarioli panoistycznej germarium zawiera oogonia różnicujące się w oocyty (rys. 3A). U podstawy germarium w tym typie jajnika rozmieszczone są komórki somatyczne (mezodermalne), tzw. komórki prefolikularne. Poniżej strefy germarialnej leży witelarium, do którego przechodzą oocyty, będące w stadium diplotenu. Wzrastające oocyty są rozmieszczone pojedynczo wzdłuż długiej osi owarioli i otoczone całkowicie przez jedną warstwę komórek nabłonka



Rys. 3. Typy owarioli: A – owarioła panoistyczna, B – owarioła politroficzna, C – owarioła telotroficzna, G – germarium, W – witelarium, ko – komórki odżywcze, gwiazdki – oocyty w stadium zaawansowanej witelogenezy, ko – komórki odżywcze, t – sznury odżywcze, nf – nabłonek folikularny

folikularnego. Jajniki panoistyczne występują u szczeciogonków, jętek, ważek, karaczanów, prostoskrzydłych, widelnic, patyczaków, termitów i pcheł.

W owariolach meroistycznych poza oogoniami i młodymi oocytami w germarium występują też tzw. komórki odżywcze (trofocyty). Powstają one w drodze niecałkowitych cytokinez i są siostrzane w stosunku do oocytu, tzn. pochodzą one z tej samej komórki oogonialnej na skutek jej niekompletnego podziału. Podobnie jak w poprzednim typie jajnika oprócz komórek płciowych w germarium znajdują się też komórki prefolikularne. Jajniki meroistyczne występują u przeważającej większości owadów (patrz niżej). Ze względu na lokalizację komórek odżywczych Gross w 1903 r. [7] wyróżnił odpowiednio u motyli i pluskwiaków jajnik politroficzny i telotroficzny.

W jajniku politroficznym (rys. 3B) każda wzrastająca komórka jajowa ma swoją własną grupę komórek odżywczych, połączonych między sobą i z nią za pomocą mostków cytoplazmatycznych. Zespół taki powstaje drogą synchronicznych, niecałkowitych podziałów oogonialnej komórki wyjściowej. Wśród komórek zespołu jedna staje się oocytom, a reszta trofocytami. Liczbę komórek w gronie określa wzór  $N = 2^n$  ( $n$  oznacza gatunkowo specyficzną liczbę podziałów mitotycznych). I tak np. w jajniku *Drosophila* na skutek czterech synchronicznych podziałów komórki wyjściowej powstaje grono zawierające jeden oocyt i 15 komórek odżywczych. W podstawowej części germarium komórki folikularne otaczają rozmieszczone wzdłuż długiej osi owarioli zespoły połączonych ze sobą komórek płciowych. Zespoły te przemieszczają się następnie do witelarium. Jajniki politroficzne występują u gryzków, wszołców, chrząszczy drapieżnych, wojsiłek, sieciarek, muchówek, motyli i błonkówek.

W jajniku telotroficznym w czasie rozwoju komórki odżywcze pozostają na szczycie owarioli i tworzą jedną, wspólną dla wzrastających oocytów komorę odżywczą. Jej łączność z oocytami utrzymana jest za pośrednictwem sznurów (rys. 3C) troficznych, będących rozciągniętymi mostkami cytoplazmatycznymi, szczególnie dobrze rozwiniętymi w jajnikach pluskwiaków [10, 13, 16]. Jajnik telotroficzny występuje w czterech grupach owadów: u pluskwiaków, chrząszczy wielożernych, wielbłądek i wielkoskrzydłych.

## PREWITELOGENEZA, SYNTEZA RNA

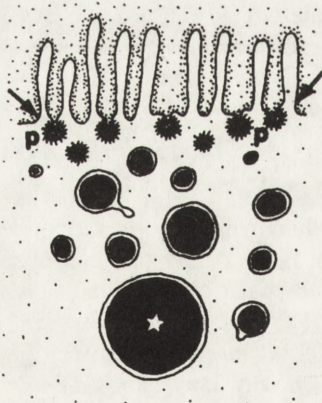
Okres prewitelogenezy charakteryzuje przede wszystkim synteza RNA, która przebiega odmiennie w jajnikach panoistycznych i meroistycznych. W jajniku panoistycznym źródłem RNA jest synteza w jądrze oocytu. Chromosomy przyjmują postać chromosomów szczoteczkowych i syntetyzują długożyjący, matrycowy mRNA [14]. Poza RNA matrycowym, w jądrze oocytu powstaje też duża ilość rRNA umożliwiającą powstanie rybosomów, które będą wykorzystane w okresie embriogenezy [14]. W jądrze oocytu zawierającym 4C DNA, wzmożona synteza RNA możliwa jest dzięki wybiórczej replikacji genów – amplifikacji genów rybosomalnych (rDNA) leżących w obrębie organizatora jąderkowego. Amplifikacja rDNA zachodzi w oocytach u większości owadów o panoistycznym typie jajnika [5] i często morfologicznym obrazem ukończenia tego procesu jest obecność w jądrze oocytu pozachromosomalnego DNA, czyli rDNA odłączonego od chromosomu. Wokół pozachromosomalnego DNA tworzą się setki jąderek lub powstaje jedno duże jąderko. Amplifikacja rDNA nie jest zjawiskiem odosobnionym u owadów i zachodzi u wielu gatunków zwierząt w czasie

oogenezy. Po raz pierwszy odkryto ją w oocytach płazów [4, 5]. Obliczono, że gdyby oocyty u *Xenopus laevis* wzrastały przy normalnej, somatycznej zawartości rDNA, proces oogenezy trwałby ok. 400 lat. Tysiąckrotne zwiększenie liczby genów kodujących rDNA powoduje skrócenie tego procesu do 4–5 miesięcy [4].

W jajnikach meroistycznych funkcję syntezy RNA przejmują komórki odżywcze [11, 14, 16], tylko u nielicznych gatunków jądro oocytu również syntetyzuje rRNA (zjawisko to jest związane z obecnością pozachromosomalnego DNA w jądrze oocytu) [3, 5]. Aby podołać masowej produkcji rRNA, komórki odżywcze ulegają poliploidyzacji [11, 16]. Niekiedy jednak endoreduplikacja (poliploidyzacja) całości genomu nie jest wystarczająca, wtedy w trofocytach zachodzi "dodatkowa" amplifikacja rDNA. Procesy takie opisano w jajniku politroficznym [5] i telotroficznym [6]. Niezależnie od typu jajnika, cechy morfologiczne komórek odżywczych są bardzo podobne. Charakteryzuje je obecność poliploidalnego jądra. Osłonka jądrowa zawiera liczne pory, przez które do cytoplazmy przedostają się syntetyzowane w jądrze rybonukleoproteidy (RNP). W pobliżu osłonki jądrowej od strony cytoplazmatycznej, RNP tworzą charakterystyczne skupienia elektronowo gęstego, ziarnistego materiału, blisko których występują mitochondria. Głównym składnikiem cytoplazmy trofocytów są wolne rybosomy, które następnie poprzez mostki cytoplazmatyczne (owariola politroficzna) lub sznury odżywcze (owariola telotroficzna) przekazywane są do wzrastających oocytów.

## WITELOGENEZA

Żółtko w oocytach większości owadów powstaje w drodze heterosyntetycznej witelogenezy. Miejscem syntezy białek żółtka – witelogenin u większości owadów jest ciało tłuszczowe (wyjątkowo tylko komórki nabłonka folikularnego) [1, 17]. Głównym białkiem specyficznym dla samic, syntetyzowanym i uwalnianym przez komórki ciała tłuszczowego jest witelogenina pobierana następnie z hemolimfy przez wzrastające oocyty i akumulowana jako witelina. Różnica pomiędzy witelogeniną a witeliną jest niewielka i dotyczy głównie rozpuszczalności. Białka wytworzone w ciele tłuszczowym uwalniane są do hemolimfy, następnie przenikają przez blaszkę podstawną owarioli i poprzez przestrzeń pomiędzy komórkami folikularnymi przedostają się do powierzchni oocytu, gdzie ulegają zagęszczeniu, a następnie pobierane są przez oocyt w drodze pinocytozy. Pęcherzyki mikropinocytotyczne zawierające egzogeny materiał zlewają się ze sobą i dają otoczone błoną cytoplazmatyczną kule żółtka (rys. 4), które pod koniec procesu witelogenezy gęsto wy-



Rys. 4. Schemat obrazujący heterosyntetyczną witelogenezę: p – opłaszczony pinocytotyczny pęcherzyk zawierający egzogeny materiał – witelogeninę (kropki) zlewając się tworzą otoczone błoną kule żółtka – biała gwiazdka, błona cytoplazmatyczna oocytu – strzałki



pełnią cytoplazmę oocytu (rys. 3A,B,C). Równocześnie z pobieraniem żółtka w cytoplazmie pojawiają się krople lipidów i glikogen.

## ROLA KOMÓREK FOLIKULARNYCH

W witelarium owarioli panoistycznej i telotroficznej komórki folikularne w postaci jedno-warstwowego nabłonka otaczają wzrastające oocyty, a w owarioli politroficznej oocyty wraz z towarzyszącymi komórkami odżywczymi. W miarę postępującego procesu witelogenezy komórki folikularne podlegają wyraźnym morfologicznym i fizjologicznym zmianom związanym z ich funkcją [2]. W okresie prewitelogenezy komórki folikularne o kształcie kubicznym szczelnie do siebie przylegają; pomiędzy komórkami występują połączenia przegrodowe. Na początku witelogenezy połączenia te zanikają i pojawiają się przestrzenie między komórkami folikularnymi, jak i pomiędzy komórkami folikularnymi a oocytem. Tego typu zmiany umożliwiają przenikanie witelogeniny do powierzchni oocytu. Tylko w nielicznych przypadkach w okresie witelogenezy komórki folikularne uczestniczą w syntezie białek. Po ukończeniu procesu witelogenezy połączenia przegrodowe pomiędzy komórkami nabłonka są odtwarzane; w taki sposób nabłonek folikularny "decyduje" o zakończeniu procesu witelogenezy. W tym czasie komórki nabłonka folikularnego rozpoczynają syntezę osłon jajowych: osłonki żółtkowej i chorionu. W cytoplazmie komórek folikularnych obserwuje się rozbudowę szorstkiej siateczki śródplazmatycznej oraz kompleksów Golgiego. Materiał przeznaczony na osłony syntetyzowany jest przez RER i zagęszczany w aparacie Golgiego. Odłączające się od aparatu Golgiego wakuole sekrecyjne wydzielają swoją zawartość do przestrzeni pomiędzy oocytem a nabłonkiem folikularnym w drodze egzocytozy. Najpierw powstaje osłonka żółtkowa, potem chorion o zróżnicowanej strukturze, zawierający u wielu gatunków owadów specjalny obszar, tzw. mikropyle, przez które do cytoplazmy oocytu dostaje się plemnik.

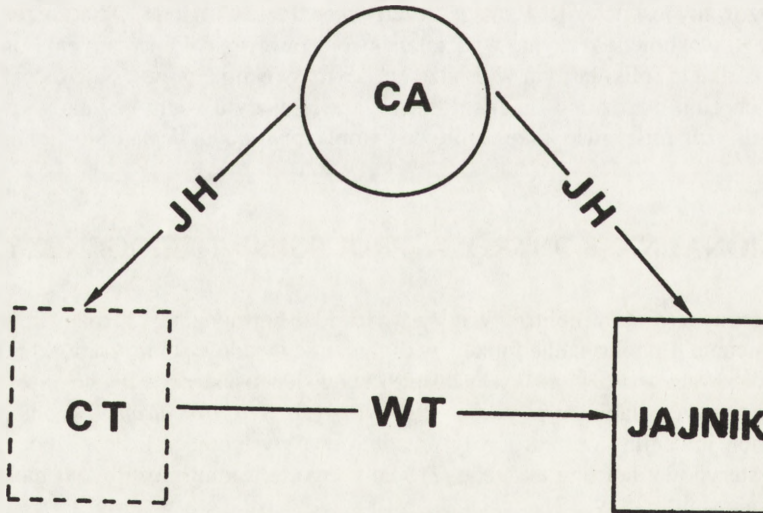
## HORMONALNA KONTROLA PROCESU WITELOGENEZY

Proces oogenezy u owadów kontrolowany jest w drodze hormonalnej i w różnych grupach przebiega odmiennie. Endokrynalne funkcje w organizmie owadów pełnią komórki neurosekrecyjne zlokalizowane w mózgu i w zwojach brzuszego łańcuszka nerwowego oraz gruczoły wewnętrznego wydzielania w postaci ciał przyległych (*corpora allata*) produkujących lipidowy hormon juvenilny oraz gruczoły przedtułowia występujące u larw i poczwerek, syntetyzujące steroidowy hormon ekdyzon. Źródłem tego hormonu może być u niektórych gatunków również jajnik [8, 9, 12].

Pierwsze doświadczenia dostarczające dowodów, że rozwój jaj regulowany jest hormonalnie dostarczyły badania prowadzone nad pluskwiakiem *Rhodnius prolixus* [12]. Jeżeli samica zostanie pozbawiona ciał przyległych, to nie dochodzi do wzrostu jaj w jajniku. Dalsze badania potwierdziły, że u niektórych owadów hormon juvenilny konieczny jest do prawidłowego przebiegu procesu oogenezy [12, 15], zaś kontrola witelogenezy u innych owadów zależna jest od ekdyzonu wydzielanego przez jajnik [9, 15].

## ROLA HORMONU JUWENILNEGO W OKRESIE WITELOGENEZY

Liczne badania wykazały, że hormon juwenilny wydzielany przez ciała przyległe stymuluje syntezę witelogeniny w ciele tłuszczowym i ułatwia jej akumulację przez wzrastający oocyt (rys. 5). Taką rolę w czasie oogenezy odgrywa u karaczanów, szarańczaków, chrząszczy i niektórych gatunków spośród łuskoskrzydłych [15]. Hormon ten w organizmie samicy działa bezpośrednio na komórki ciała tłuszczowego inicjując syntezę odpowiedniego dla witelogeniny mRNA. Komórki ciała tłuszczowego na stymulację hormonem juwenilnym odpowiadają rozbudową RER i kompleksów Golgiego. Wzrasta poziom syntezy DNA, RNA, a zwłaszcza związanego z syntezą witelogeniny odpowiedniego mRNA (Vg mRNA). Hormon juwenilny ponadto u wielu gatunków owadów konieczny jest do regulacji procesu pobierania witelogeniny przez wzrastający oocyt oddziałując na komórki folikularne. Podczas przebiegu tego procesu hormon juwenilny wpływa na morfologię i procesy biochemiczne zachodzące w nabłonku folikularnym. Na stymulację hormonem komórki odpowiadają pojawieniem się przestworów umożliwiających przechodzenie witelogeniny do powierzchni oocytu oraz poliploidyzacją jąder i rozbudową RER, co związane jest z przygotowaniem do przyszłej syntezy chorionu [12]. Sugeruje się, że oprócz zwiększenia przepuszczalności komórek folikularnych, JH indukuje też pojawienie się specyficznych receptorów dla witelogeniny na powierzchni oocytu [15].

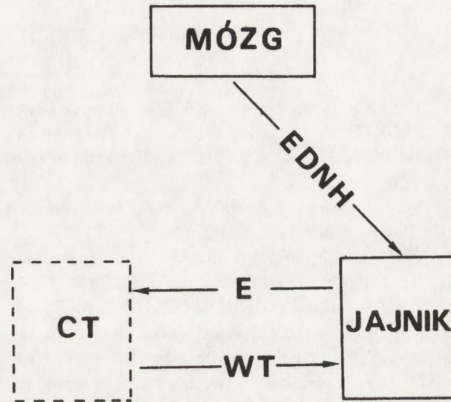


Rys. 5. Rola hormonu juwenilnego w okresie oogenezy: CA – ciała przyległe (*corpora allata*) wydzielają hormon juwenilny JH oddziałujący na ciało tłuszczowe (CT), powoduje stymulację syntezy witelogeniny WT, JH wpływając na jajniki umożliwia pobieranie witelogeniny przez wzrastające oocyty

## ROLA EKDYZONU W OKRESIE WITELOGENEZY

Zupełnie inny typ regulacji hormonalnej procesu oogenezy występuje u niższych muchówek. Dogodnym materiałem do badań stał się komar *Aedes aegypti*. U tego gatunku doszło do ścisłej korelacji pomiędzy procesem oogenezy a pobraniem krwi. W efekcie tylko odżywione krwią samice zdolne są do szybkiej produkcji jaj. Synteza witelogeniny w ciele tłuszczowym zachodzi tylko przy obecności jajnika. Okazało się, że gonada żeńska syntetyzuje ekdyzon, który po przejściu w 20-HE (20-hydroksyekdyzon) stymuluje syntezę witelogeniny w ciele tłuszczowym, a w konsekwencji wzrost jaj. Zaproponowany model przedstawia się następująco [8, 12, 15]. Przejście z postaci poczwarki do stadium dorosłego stanowi bodziec dla rozwoju oocytów do pewnego okresu, w którym pozostają aż do momentu pobrania krwi przez samicę. Okres ten znajduje się pod kontrolą hormonu juvenilnego, który przygotowuje ciało tłuszczowe do odpowiedzi na działanie ekdyzonu, a oocyty do przyszłego pobierania materiału egzogenego (powstanie licznych pęcherzyków opłaszczonych, mikrokosmków i receptorów dla witelogenin) [15]. Odżywianie się krwią jest bodźcem powodującym wydzielenie przez komórki neurosekrecyjne mózgu (rys. 6) peptydowego neurohormonu EDNH (*egg development neurosecretory hormone*), który wpływa z kolei na wydzielanie ekdyzonu przez jajnik. Hormon ten po przejściu w 20-HE (hydroksyekdyzon) działa na komórki ciała tłuszczowego stymulując je do syntezy i wydzielania witelogeniny.

Nieco odmiennie przedstawia się kontrola procesu witelogenezy u wyższych muchówek, u których część żółtka pochodzi z aktywności syntetycznej komórek folikularnych. Przypuszcza się, że u *Drosophila* w regulację syntezy witelogeniny w ciele tłuszczowym zaangażowany jest ekdyzon, a hormon juvenilny działa na jajnik [15].



Rys. 6. Rola ekdyzonu w procesie oogenezy – pod wpływem pobrania krwi komórki neurosekrecyjne mózgu wydzielają EDNH oddziałujący na jajnik, który z kolei wydziela ekdyzon (E) stymulujący syntezę witelogeniny (WT) w ciele tłuszczowym (CT)

## DOKOŃCZENIE PODZIAŁU MEJOTYCZNEGO

Podział mejotyczny w czasie oogenezy owadów zatrzymany został w okresie profazy pierwszego etapu podziału mejotycznego, w diplotenie. W tej fazie zarówno w jądrze oocytu, jak i w cytoplazmie zachodzą bardzo ważne procesy (prewitelogeneza, witelogeneza, tworzenie osłon) umożliwiające przyszły rozwój zarodka. Oocyty "przygotowane" do dalszego rozwoju przechodząc w pobliżu zbiornika nasiennego wchodzą w kontakt z plemnikiem, które

wnikają do ooplazmy poprzez mikropyle (patrz wyżej). W tym momencie stymulowane jest zakończenie podziału mejotycznego; w konsekwencji jądro oocytu staje się haploidalnym przedjądrem żeńskim, które z kolei łączy się z przedjądrem męskim (kariogamia) tworząc jądro zygotyczne.

## LITERATURA

- [1] BILIŃSKI S. Powstawanie żółtka w oogenezie bezkręgowców. *Post Biol Kom* 1979; **6**: 249–266.
- [2] BILIŃSKI S. Różnicowanie nabłonka foliularnego w jajnikach owadów. *Zesz Nauk UJ* 1990; **18**: 149–161.
- [3] BILIŃSKI S, KSIĄŻKIEWICZ M. Komórki odżywcze. Ultrastruktura i pochodzenie. *Post Biol Kom* 1980; **4**: 287–304.
- [4] CAVE MD. Absence of rDNA amplification in the uninucleolate oocyte of the cockroach *Blattella germanica* (Orthoptera; Blattellidae). *J Cell Biol* 1976; **71**: 49–58.
- [5] CAVE MD. Morphological manifestation of ribosome DNA amplification during insect oogenesis. [w] King RC, Akai H. [eds.] *Insect Ultrastructure*. New York, Plenum Press 1982; 1: 86–117.
- [6] DITTMANN F, STEIBRUCK G, MUNZ A. Amplification of tropharium rDNA in the telotrophic ovariole of the bug, *Dysdercus intermedius*. *Invertebr Reprod Develop* 1990; **17**: 9–18.
- [7] GROSS W. Untersuchungen über die Histologie des Insectenovariums. *Zool Jb Abt Anat Ontog* 1903; **18**: 71–186.
- [8] HAGEDORN HH. Ecdysone, a gonadal hormone in insects. [w] *Advances in Invertebrate Reproduction*, Clarck jr WH, Adams TS [eds]. Elsevier North Holland. 1980; 97–104.
- [9] HOFFMANN JA, LAGUEUX M, HETRU CH, CHARLET M, GOLTZENE F. Ecdysone in reproductively competent female adults and in embryos of insects. [w] *Progress in Ecdysone Research*. Hoffmann JA [ed]. Elsevier North-Holland Biomedical Press. 1980: 431–465.
- [10] HUEBNER E. The ultrastructure and development of the telotrophic ovary. [w] *Insect Ultrastructure*. King RC, Akai H [eds]. New York, Plenum Press 1984; 2: 3–48.
- [11] KING RC, BUNING J. The origin and functioning of insect oocytes and nurse cells. [w] *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Kerkut GA, Gilbert LI [eds] 1.: Embryogenesis and Reproduction. Oxford, Pergamon Press 1985; 37–82.
- [12] KSIĄŻKIEWICZ-KAPRALSKA M, ROŚCISZEWSKA E. Hormonalna kontrola oogenezy u owadów. *Przeł Zool* 1982; **26**: 345–357.
- [13] KSIĄŻKIEWICZ-KAPRALSKA M. Sznury odżywcze w telotroficznym jajniku. *Przeł Zool* 1991; **35**: 199–208.
- [14] MAHOWALD AP. Oogenesis. [w] *Developmental Systems: Insects*. Counce SJ, Waddington CH [eds] New York, Academic Press 1972; 1–47.
- [15] POSTLETHWAIT JH, GIORGI F. Vitellogenesis in insects. [w] *Developmental Biology, A Comprehensive Synthesis*. Browder LW [ed]. Plenum Publ 1985; 1: Oogenesis: 85–126.
- [16] TELFER WH. Development and physiology of the nurse-cell syncytium. *Adv Insect Physiol* 1975; **11**: 223–319.
- [17] TELFER WH, HUEBNER E, SMITH DS. The cell biology of vitellogenic follicles in *Hyalophora* and *Rhodnius*. [w] *Insect Ultrastructure*. King RC, Akai H [eds]. New York, Plenum Press 1982; 1: 118–149.

Otrzymano: 10.09.1992 r.

Przyjęto: 27.10.1992 r.

Adres autora: Instytut Zoologii UJ, Kraków

# BUDOWA I ROLA HISTONU H1

## STRUCTURE AND FUNCTION OF H1 HISTONE

Elżbieta HRABEC, Andrzej PŁUCIENNICZAK

Zakład Biochemii Instytutu Fizjologii i Biochemii AM Łódź, Centrum Mikrobiologii i Wirusologii PAN, Łódź

*Streszczenie.* W przeciwieństwie do konserwatywnego sekwencyjnie histonu H4, cząsteczki H1 wykazują zmienność strukturalną, nawet w obrębie organizmów czy tkanek, z których zostały wyizolowane. Białka te zbudowane są z trzech odrębnych strukturalnie domen ("nos", "głowa", "ogon"), które spełniają różne funkcje w strukturze chromatyny. Histony H1 zlokalizowane są poza cząstką rdzeniową i są niezbędne w formowaniu wyższego rzędu struktury chromatyny. Wiele danych wskazuje na obecność cząsteczek H1 zarówno w aktywnej transkrypcyjnie, jak i nieaktywnej chromatynie. Wyniki prowadzonych badań sugerują udział histonu H1 w blokowaniu ekspresji genów poprzez kondensowanie włókien chromatynowych, a także poprzez bezpośrednie lub pośrednie blokowanie wiązania czynników transkrypcyjnych. Cząsteczki H1 wykazują znaczne podobieństwo strukturalne do GTPaz i według Oikarinena mogą pośredniczyć w działaniu jądrowych receptorów.

*Słowa kluczowe:* Histon H1, domeny H1, nukleosom, chromatyna, wiązanie z DNA, transkrypcja.

*Summary.* In contrast to sequentially conservative H4 histone the H1 molecules have been reported to vary considerably in their stucture even within the organisms and tissues from which they were isolated. These proteins consist of three structural domains (nose, head and tail) that play different roles in the structure of chromatin fibre. H1 histones are located externally to the nucleosome core and are essential for higher-order chromatin organization. At present, there is evidence pointing to the presence of H1 in both transcriptionally active and inactive genes. Numerous studies have shown that H1 proteins are proposed to serve as general repressors of gene expression by inducing the formation of a compact chromatin structure and by directly or indirectly preventing the binding of transcription factors. H1 molecular structure displays considerable similarity to that of GTPases and Oikarinen suggest that these proteins may be involved in mediating the action of nuclear receptors.

Key words: histone H1, H1 domains, nucleosome, chromatin, DNA binding, transcription.

## WSTĘP

Histony stanowią grupę białek powszechnie występujących w jądrach komórek eukariotycznych, charakteryzującą się znaczną stabilnością ewolucyjną. Spośród wszystkich histonów

najmniej zmienny jest histon H4 [51], natomiast H1 wykazuje największą heterogenność zarówno gatunkową, jak i tkankową [4, 29, 30, 51].

Końcowym efektem interakcji histonów rdzeniowych (H2A, H2B, H3, H4) jest utworzenie kompleksu oktamerycznego, zawierającego po dwie cząsteczki każdego z czterech rodzajów histonów, na który nawinięty jest łańcuch DNA [48]. Taka podstawowa jednostka strukturalna nosi nazwę nukleosomu. Histon H1 nie bierze udziału w tworzeniu struktury nukleosomalnej. Uważa się, że jest on odpowiedzialny za tworzenie i stabilizację struktur wyższego rzędu. Prawdopodobnie najważniejszą cechą histonów bogatych w lizynę jest ich zdolność do indukowania kondensacji włókien polinukleosomowych. Z funkcjonalnego punktu widzenia kondensacja zależna od histonu H1 może wpływać na regulację ekspresji genów i pojawił się już szereg dowodów podtrzymujących tę hipotezę [7, 13, 16, 28, 52].

Zważywszy, że cząsteczki H1 pełnią tak ważną funkcję w genomie komórkowym, wydaje się zaskakujące, jak niewiele do tej pory wiadomo na temat mechanizmu hamowania transkrypcji przez te białka. Nie w pełni jasny jest także mechanizm, dzięki któremu cząsteczki H1 indukują konformacyjne zmiany chromatyny, konieczne do utworzenia struktur wyższego rzędu.

## UDZIAŁ HISTONÓW H1 W STRUKTURZE I FUNKCJI CHROMATYNY

### BUDOWA HISTONÓW H1 SSAKÓW

Typowy somatyczny histon H1 ssaków, spośród których najlepiej do tej pory został zbadany histon H1 z grasicy cielęcia, jest białkiem o masie cząsteczkowej wynoszącej średnio 20 500 daltonów i zawiera ok. 27 mol% lizyny, 24 mol% alaniny, 9 mol% proliny i jedynie ok. 2 mol% argininy. Aminokwasem N-końcowym jest acetyloseryna [4, 30], natomiast C-końcowym lizyna [29, 30]. Jest białkiem ubogim w aminokwasy aromatyczne i praktycznie nie ma w jego składzie aminokwasów zawierających siarkę. Aminokwasy aromatyczne występują w konserwatywnych pozycjach odpowiadających sekwencyjnie 72 reszcie tyrozyny oraz 106 reszcie fenyloalaniny subfrakcji RTL-3 z grasicy królika. Mimo że u różnych gatunków można zaobserwować spore różnice w składzie aminokwasowym oraz masie cząsteczkowej, wszystkie histony H1 mają wspólny plan budowy. Można w nich wyróżnić trzy odrębne domeny [33]: silnie zasadowy, nie mający uporządkowanej struktury drugorzędowej odcinek N-końcowy, obejmujący ok. 36 reszt aminokwasowych, domenę globularną, obejmującą ok. 80 reszt aminokwasowych, skupiającą większość aminokwasów hydrofobowych i wykazującą typowy dla białek globularnych skład aminokwasowy oraz długą silnie zasadową domenę C-końcową bogatą w lizynę, alaninę i prolinę. Domena C-końcowa skupia aż 80% wymienionych aminokwasów.

Uzeregowanie sekwencji różnych histonów H1 na podstawie maksimum zgodności powtarzających się reszt prolilowych wskazuje, że w domenie N-końcowej można wyodrębnić dwie subdomeny [4]. Hydrofobowy, prolilowo-alanylowy segment różni się strukturalnie od dodatnio naładowanego regionu skupiającego 90% zasadowych reszt tej domeny. W subfrakcji CTL-1 z grasicy cielęcia zasadowa subdomena obejmuje reszty 20–33 i w tym odcinku można wyróżnić trzy bloki reszt zasadowych, znajdujące się w pozycjach: 20–22, 25–26 oraz 31–33. Środkowy blok jest mniej stabilny ewolucyjnie od bloków skrajnych [4].

Domena globularna jest najbardziej konserwatywnym elementem struktury histonów H1 [1, 10], natomiast powszechnie przyjmuje się, że obszary N- i C-końcowe wykazują znaczną zmienność strukturalną [35]. Zgodnie jednak z wynikami uzyskanymi po uporządkowaniu domen N-końcowych różnych histonów H1 na podstawie maksimum zgodności reszt proliny, opisywana wysoka zmienność sekwencyjna tej domeny może być jednak poważnym uproszczeniem. Uporządkowanie takie wskazuje w gruncie rzeczy na znaczny stopień konserwatywności tego regionu [4].

Najdłuższa ze wszystkich, domena C-końcowa, u ssaków obejmuje ok. 100 aminokwasów, aczkolwiek długość tego regionu jest bardzo zmienna u *Eukaryota*. Dominującymi aminokwasami są: lizyna (40 mol%), alanina (30 mol%) i prolina (12 mol%). Stosunkowo duży jest też udział seryny i treoniny (łącznie 3–5 mol%). Aminokwasy aromatyczne nie występują w tej domenie. Jest to najbardziej zasadowy fragment, zawierający ok. 66% wszystkich reszt lizyny cząsteczki H1. Pod względem składu aminokwasowego domena C-końcowa do pewnego stopnia przypomina domenę N-końcową, ale rozmieszczenie dominujących reszt aminokwasowych jest zupełnie inne. Podczas gdy w domenie N-końcowej można odnaleźć bloki reszt zasadowych i region bogaty w prolinę i alaninę, taka segregacja aminokwasów nie występuje w domenie C-końcowej. Wyniki badań Maedera i Böhma [22] oraz Subirany [45] wskazują jednak, że rozmieszczenie trzech dominujących w tym regionie aminokwasów nie jest przypadkowe. Analiza komputerowa dostępnych sekwencji wykazała, że reszty alanylowe występują często po dwie obok siebie lub w odległości 3–5 aminokwasów. Takie rozmieszczenie reszt alanylowych jest niezgodne ze statystycznym rozkładem tych reszt dla peptydu o identycznym składzie aminokwasowym. Z kolei reszty lizyny znacznie rzadziej występują w dubletach, niż wynikałoby z rozkładu statystycznego. Odstępy między nimi wynoszą najczęściej 1–6 aminokwasów i rozkład ładunków w tej domenie jest stosunkowo równomierny [22, 45]. Prolina zawsze występuje pojedynczo, w odstępach co 3–6 i 11–14 reszt aminokwasowych.

W roztworze domena C-końcowa jest niezestrukturalizowana. Ze względu na brak oddziaływań wewnętrznych ta część łańcucha jest niezwykle elastyczna i mobilna. W chromatynie natomiast, kiedy zostaną zneutralizowane odpychające oddziaływania między dodatnio naładowanymi resztami lizyny bardzo prawdopodobne jest tworzenie krótkich odcinków  $\alpha$ -helikalnych pomiędzy resztami prolinowymi [22]]. Tak więc pomimo znacznych różnic w długości i sekwencji aminokwasowej domeny C-końcowej histonów H1 u *Eukaryota*, jest to w istocie region konserwatywny strukturalnie. Jego konserwatywność wynika z podobnego u wszystkich organizmów składu aminokwasowego oraz z pewnej regularności w rozmieszczeniu reszt aminokwasowych, co ma znaczenie w tworzeniu struktury  $\alpha$ -helikalnej. Domeny C-końcowe histonów H1 po związaniu się z DNA występują w formie rozwiniętej i zawierają hydrofobowe, powtarzające się odcinki helikalne, przy czym ich liczba i długość może być różna w różnych histonach H1 [22].

Jaką funkcję spełniają poszczególne domeny? Eksperymenty rekonstrukcyjne z zastosowaniem fragmentów H1 wskazują, że domena globularna praktycznie nie wykazuje zdolności do kondensowania DNA, a przypuszczalnie odpowiedzialna jest za prawidłowe osadzenie cząsteczek H1 na nukleosomie i zajmuje centralne miejsce w tej strukturze, spinając wchodzący i schodzący z nukleosomu łańcuch DNA [1, 2]. Chromatyna zrekonstruowana z domeną C-końcową zdolna jest do kondensacji, ale w znacznie mniejszym stopniu niż zrekonstruowana z H1. Stosując natomiast w eksperymentach rekonstrukcyjnych fragmenty H1 zawierające domenę globularną i C-końcową (GC-H1), obserwowano pełen efekt kondensacyjny. Suge-

ruje to, że w istocie do indukowania struktur wyższego rzędu niezbędna jest domena C-końcowa, ale ujawnienie jej skutecznego działania wymaga, aby została osadzona na nukleosomie przez domenę globularną [1, 2]. Szczegółowe badania wykazały, że w prawidłowym ułożeniu cząsteczek H1 uczestniczy także domena N-końcowa, a ściślej, jej zasadowa subdomena [1, 2]. Funkcja bloku prolinowo-alaninowego nadal pozostaje niejasna.

W ocenie wyników tego rodzaju eksperymentów należy jednak wziąć pod uwagę fakt, że chromatyna rekonstruowana nie odpowiada w pełni natywnej chromatynie. Wykazano, że histon łącznikowy może zmieniać układ oktamerów histonów rdzeniowych lub odstęp między nukleosomami (ang. *nucleosome positioning*) [18, 44]. Przy braku histonu H1 odstęp między nukleosomami zrekonstruowanymi *in vitro* są regularne, a nukleosomy są zdolne do "ślizgania się" wzdłuż nici DNA [43], natomiast histon H1 powoduje ustalanie nukleosomów w określonych pozycjach oraz zanik regularności w odstępach między nukleosomami [39]. Może to być wynikiem wiązania się cząsteczek H1 ze specyficznymi sekwencjami DNA. Taka możliwość jest rozważana przez wielu autorów [11, 13, 23, 37, 38, 42, 46]; zwłaszcza dobrze udokumentowana jest zdolność cząsteczek H1 do wiązania się w regionie DNA bogatym w pary AT [11, 13, 46]. Przypuszczalnie w rozpoznawaniu tego regionu uczestniczy domena C-końcowa, a ściślej fragmenty o sekwencji SPKK. Fosforylacja reszt serylowych w tych motywach sekwencyjnych osłabia wiązanie H1 z DNA, co może mieć znaczenie regulacyjne.

#### UDZIAŁ HISTONÓW H1 W REGULACJI TRANSKRYPCJI

Caron i Thomas [5] stosując fragmenty uzyskane w wyniku trawienia chromatyny nukleazą ze *Staphylococcus aureus* stwierdzili, że w obecności 70 mM NaCl następowało bardzo szybkie i całkowite zrównoważenie cząsteczek H1 pomiędzy fragmentami chromatyny. Sugerowało to, że w warunkach fizjologicznej siły jonowej (w 150 mM NaCl) również będzie miała miejsce całkowita i szybka wymiana histonów H1 w chromatynie.

Przemieszczanie się cząsteczek H1 w obrębie chromatyny było także obserwowane podczas eksperymentów Wu i wsp. [50], którzy przeprowadzili fuzję komórek HeLa z fibroblastami myszy. Wymiana cząsteczek H1 między jądrami w heterokarionie zachodziła w niewielkim stopniu, ale po fuzji jąder i mitozie następowało zrównoważenie H1 między chromatyną ludzką i mysią. (W podobnych badaniach fuzyjnych wykazano, że histony rdzeniowe H3 i H4 nie przemieszczają się pomiędzy jądrami w obrębie heterokarionu, ani też nie przechodzą z ludzkich do mysich chromosomów w obrębie nowo utworzonych hybrydowych jąder komórkowych [25]). Stwierdzono także, że w przeciwieństwie do histonów H3 i H4, które są odkładane na DNA w sposób konserwatywny, nowo syntetyzowane cząsteczki H1 można odnaleźć zarówno na uprzednio istniejącej, jak i na potomnej nici DNA. Sugeruje to, że nowo powstałe histony H1 wymieniają się ze "starymi" cząsteczkami. Zjawisko to może zachodzić spontanicznie lub może być ułatwione np. destabilizacją interakcji DNA-histon w wyniku przemieszczania się polimerazy RNA wzdłuż łańcucha DNA. Jednakże fakt, iż wielu autorów uważa, że sposób rozmieszczenia H1 w różnych regionach chromatyny może mieć znaczenie funkcjonalne [8, 10, 14, 20, 40, 41, 49], jest trudny do pogodzenia z koncepcją swobodnego przemieszczania się cząsteczek H1.

Jeden z kontrowersyjnych problemów, skupiających ostatnio wiele uwagi, dotyczył obecności histonów H1 w obszarach chromatyny aktywnej transkrypcyjnie. Cechą charakterystyczną chromatyny aktywnej transkrypcyjnie poza zmniejszeniem gęstości nukleosomów przypadających na jednostkę długości DNA jest brak struktury solenoidowej i wydaje się, że



rozwinięcie zwartej struktury 30 nm włókna grubego jest prawdopodobnie warunkiem wstępnym, umożliwiającym transkrypcję [9, 36]. Skoro główną funkcją histonu H1 jest kondensacja chromatyny, można założyć, że różnice w stopniu skondensowania związane są z regionalnymi różnicami (jakościowymi i ilościowymi) w zawartości histonu H1. Wykazano, że obecność stabilnego, aktywnego kompleksu transkrypcyjnego chroni geny 5S RNA u *Xenopus laevis* przed wiązaniem pośredniczących w represji cząsteczek H1 [41]. Z kolei, frakcjonowanie chromatyny erytrocytów ptasich daje w wyniku odrębne supramolekularne cząstki bogate w nieaktywne geny i sugeruje się, że strukturę tych cząstek utrzymują histony H1 [49]. Stawiając więc hipotezę, w myśl której struktura chromatyny wraz z sekwencją DNA byłaby odpowiedzialna za determinację komórek, należałoby przyjąć, że histony H1 są zdolne do utrzymania stopnia skondensowania poszczególnych regionów chromatyny podczas kolejnych podziałów komórkowych. Badając rozmieszczenie tego białka w różnych regionach chromatyny wykazano, że histon H1 jest odnajdywany w stechiometrycznych ilościach w nukleosomach zawierających 5-metylocytozynę – zmodyfikowaną zasadę, o której wiadomo, że występuje w nieczynnych fragmentach genomu [3]. Jednakże wiele danych wskazuje na obecność cząsteczek H1 także w regionach aktywnych transkrypcyjnie. Rozdział elektroforetyczny fragmentów chromatyny łagodnie trawionych nukleazą ujawnił, że histon H1 wiąże się z łańcuchami polinukleosomowymi pochodzącymi z regionów aktywnych transkrypcyjnie. Wykazano jednak, że związany on był w sposób, który nie prowadził do powstawania struktur wyższego rzędu [49]. Potwierdzają to również ostatnio przeprowadzone eksperymenty z zastosowaniem związków sprzęgających. Wskazują one na obecność cząsteczek H1 w obszarach chromatyny zarówno nieaktywnej, jak i aktywnej transkrypcyjnie, ale w tej ostatniej mają one być związane w inny sposób [28]. Także prace prowadzone przez Kamakakę i Thomasa [16] dostarczają przekonujących dowodów na obecność histonów H1 we frakcji chromatyny aktywnej transkrypcyjnie, aczkolwiek w zmniejszonej o 20 do 40% ilości. Autorzy sugerują, że brak pojedynczej cząsteczki H1 w dowolnym punkcie łańcucha polinukleosomowego może być powodem zaniku kooperatywnych oddziaływań stabilizujących *in vivo* formowanie 30 nm włókna, co prowadzi do utworzenia bardziej otwartej konformacji chromatyny.

Poza tym, w kontekście udziału H1 w regulacji transkrypcji nie bez znaczenia jest duża heterogenność charakterystyczna dla tej klasy białek. Daneholt i Grossbach [7], podobnie jak i Zlatanova [52] stwierdzili, że warianty H1 nie są rozmieszczone w chromatynie w sposób przypadkowy. U *Chironomus thummi* specyficzny wariant H1 związany jest z obszarami skondensowanej chromatyny, które obejmują powtarzające się sekwencje, późno replikującego DNA. Struktura tego wariantu znacznie różni się od struktury innych wariantów H1 w tej samej komórce. Przyjmując zatem dynamiczny model, zgodnie z którym dochodziłoby do wymiany cząsteczek H1 w chromatynie, wymiana taka mogłaby mieć miejsce jedynie między takimi samymi subfrakcjami.

Wydaje się, że nowo syntetyzowany histon H1 jest odkładany na DNA w sposób niekonserwatywny, ale cząsteczki H1 nie wiążą się z DNA w sposób przypadkowy i ułożenie to utrzymuje się podczas wielu podziałów komórkowych [20]. Badania prowadzone przez Huangą i Cole'a [10] również wykazały stabilne, nierównomierne rozmieszczenie histonów H1 w chromatynie. Klasa chromatyny rozpuszczalnej była uboga w cząsteczki H1 w przeciwieństwie do klasy chromatyny nierozpuszczalnej. Ponadto, jak wykazano [10], histon H1 nie wymieniał się między tymi dwoma klasami chromatyny.

Podstawa odrębności między klasami chromatyny nie jest w pełni wyjaśniona i różnice w wiązaniu histonów H1 mogą stanowić właściwą podstawę regulacji ekspresji genów. W

świetle przytoczonych poglądów rola histonu H1 w stabilizacji chromatyny i utrzymywaniu stopnia skondensowania poszczególnych jej regionów przez następujące po sobie podziały komórkowe może być porównana do roli mostków dwusiarczkowych w stabilizacji struktury białek [10].

Ciekawy model opisujący udział histonu H1 w regulacji ekspresji genów zaproponował Oikarinen [31]. Autor podejmuje próbę połączenia w logiczną całość kilku elementów wpływających na transkrypcję, takich jak: histony H1, białkowe aktywatory transkrypcji (CTF/NF-I i AP-1) i wreszcie receptory jądrowe. Nim przejdziemy do omawiania założeń tego modelu, Czytelnikowi należy się parę słów wprowadzenia, charakteryzujących poszczególne jego elementy. Otóż koncepcja ta mogła powstać dopiero po odkryciu faktu, że histony H1 są białkami wiążącymi nukleotydy [24, 37]. Przypuszczenie takie wysunięto badając homologię sekwencyjną pomiędzy domeną wiążącą nukleotydy w podjednostce katalitycznej kinazy A oraz cząsteczkami H1 [37]. W świetle ostatnich danych wydaje się, że domeny wiążące nukleotydy w cząsteczkach H1 preferencyjnie oddziałują z GDP/GTP i ADP/ATP [24, 31, 32] i że nukleotydy te wpływają na wiązanie cząsteczek H1 z DNA [24, 31]. Przypuszczalnie dwufosforany nukleozydów stabilizują stan, w którym H1 wykazuje większe powinowactwo do DNA, podczas gdy trójfosforany nukleozydów osłabiają to wiązanie [32]. Według Oikarineny histony H1 wykazują również zdolność do hydrolizowania trójfosforanów nukleozydów do dwufosforanów, a także wbudowywania reszty fosforanowej do egzogennych białek [24, 31]. Zatem cząsteczki H1 ujawniają podobieństwo funkcjonalne do GTPaz i mogą zdaniem autora pośredniczyć w działaniu receptorów jądrowych [24, 31].

CTF/NF-I jest eukariotycznym białkiem wiążącym się z DNA, które uczestniczy zarówno w procesie replikacji DNA, jak i w transkrypcji genów [15, 26]. Białko to rozpoznaje preferencyjnie sekwencję 5'-TTGGCAnnnTGCCAA-3' (*consensus*) i wydaje się, że ten sam motyw sekwencyjny lub jego część może być rozpoznawana przez cząsteczki H1 [23]. Mechanizm działania CTF/NF-I jest jak dotąd nieznan, wiadomo jednak, że białko to przeciwdziała kondensacji DNA. Z funkcjonalnego punktu widzenia doniosłą rolę odgrywa domena N-końcowa, wiążąca się z DNA i odpowiedzialna za aktywację replikacji oraz bogata w prolinę domena C-końcowa uczestnicząca w procesie transkrypcji [26].

AP-1 - heterodimerski kompleks produktów ekspresji genów *c-fos* i *c-jun* jest białkowym aktywatorem transkrypcji pośredniczącym w działaniu takich efektorów, jak estry forbolu i TGF- $\beta$  (przepływ informacji zależny od aktywacji kinazy C) [17, 27]. Niezwykle homologiczne domeny różnych form *Fos/Jun* wiążąc się z DNA, rozpoznają sekwencję: 5'-TGA(C/G)TCA-3' (*consensus*). AP-1 bierze udział w regulacji ekspresji genów związanych z proliferacją komórek, takich jak geny dla niektórych wewnątrzkomórkowych proteinaz. W chorobach nowotworowych wzrasta poziom syntezy kolagenazy i Fos oraz Jun są zdolne do indukcji syntezy tych enzymów i transformacji komórek, w sytuacji, kiedy są syntetyzowane w nadmiarze. Zwiększony poziom ekspresji genów kolagenazy w transformowanych komórkach, a także indukcja tych genów podczas normalnych podziałów komórkowych blokowana jest za pośrednictwem hormonów sterydowych, aczkolwiek mechanizm inhibicji pozostaje nadal niewyjaśniony [17].

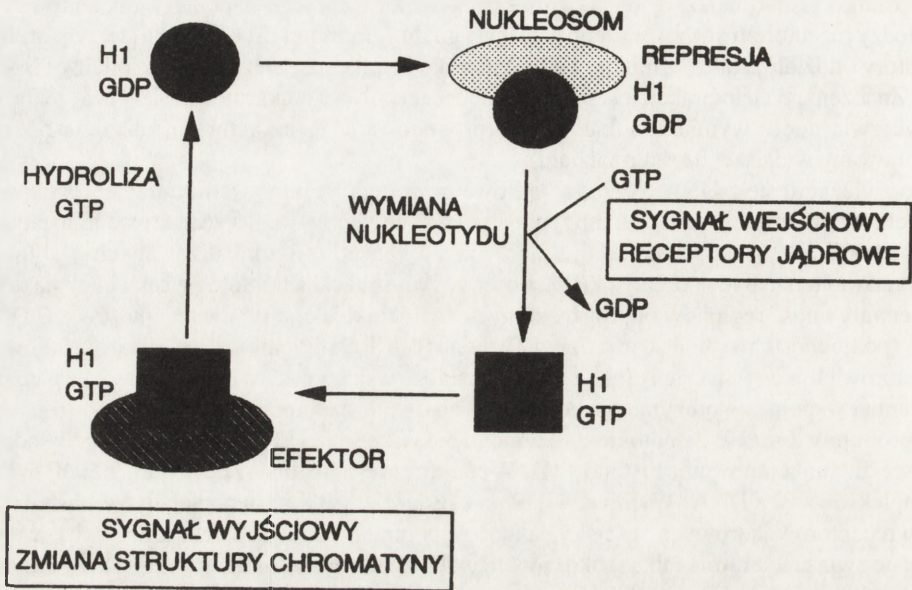
W jaki sposób działają receptory jądrowe? Mechanizm molekularny pozostaje nadal nieznan, aczkolwiek przyjmuje się, że powodują stabilizację kompleksu inicjującego transkrypcję. Interakcja z DNA może nastąpić dopiero po związaniu z receptorem takich ligandów, jak hormony sterydowe, kwas retinowy czy 1,25-dihydroksycholekalcyferol. Wymienione ligandy powodują uwolnienie receptora z kompleksu z białkiem Hsp90 i jego dimeryzację

[21]. Białko Hsp90 należące do rodziny białek szoku cieplnego zapobiega oddziaływaniu pomiędzy receptorem a DNA w nieobecności sygnału – hormonu [21]. Wydaje się, że jądrowe receptory oddziałują także z innymi białkami szoku cieplnego, należącymi do rodziny Hsp70 [31]. Znaczenie tych interakcji jest niewyjaśnione, aczkolwiek Oikarinen [31] uważa, że może to być związane z wymianą nukleotydów (proponowany przez autora mechanizm będzie dyskutowany w dalszej części rozdziału).

Po związaniu się z DNA receptory jądrowe powodują zmiany w strukturze chromatyny, których wynikiem jest indukcja lub represja pewnych genów [6, 34]. Sugerowano ostatnio, że mechanizm działania receptorów jądrowych i receptorów zlokalizowanych w błonie komórkowej może być podobny [47]. Zaobserwowano znaczną homologię sekwencyjną oraz konserwatywność regionów odpowiedzialnych za interakcję obu typów receptorów z GTPazami (podjednostka  $\alpha$  białek z rodziny G, będących łącznikiem w transmisji sygnałów z receptorów błonowych na ich efekторы [19]), co może wskazywać na analogiczny mechanizm działania i wspólne ewolucyjne pochodzenie tych dwu rodzin receptorów [31].

Spróbujmy teraz iść dalej tokiem rozumowania Oikarinena [31] i znaleźć w tym układzie miejsce dla funkcjonowania histonów H1. W stanie represji histon H1 połączony z GDP byłby skompleksowany z DNA. Wymiana GDP na cząsteczkę GTP następowałaby za pośrednictwem receptorów jądrowych, a ściślej, jak już wspomniano powyżej, uczestniczyłyby w tym procesie związane z nimi białka szoku cieplnego. Po związaniu z GTP histon H1 traci zdolność do interakcji z DNA i może łączyć się z innymi białkami efektorowymi (być może dyskutowanymi aktywatorami transkrypcji). Biorąc pod uwagę fakt, że cząsteczki H1 wykazują aktywność GTPazową, istnieje możliwość przzerwania sygnału zapoczątkowanego połączeniem receptora jądrowego z hormonem i powrót cząsteczek H1 do stanu wyjściowego, w którym wykazują wysokie powinowactwo do DNA (w połączeniu z GDP). Zaproponowany powyżej mechanizm obrazuje rysunek 1.

Wykazano, że obecność miejsca wiążącego CTF/NF-I jest warunkiem koniecznym dla działania hormonów sterydowych w przypadku niektórych genów indukowanych za pośrednictwem receptorów jądrowych [6, 34]. Miejsce to jest zlokalizowane w łącznikowym regionie nukleosomu i odpowiada miejscu wiązania cząsteczek H1. Jakie znaczenie może mieć ten fakt? Oikarinen [31] postuluje, że aktywatory transkrypcji (CTF/NF-I i *Fos/Jun*) wiążą się po przeciwnej stronie podwójnej helisy DNA niż H1 (oddziałują z większą bruzdą). Pozwala to na jednoczesne wiązanie H1 i jednego z tych aktywatorów. Mogłoby zatem dochodzić do oddziaływań między nimi, prowadzących na przykład do aktywacji CTF/NF-I przez H1 [31]. Z drugiej strony, wiadomo, że jądrowe receptory w wielu przypadkach przeciwdziałają aktywującemu wpływowi AP-1 na transkrypcję, mimo że wiążą się w innym regionie DNA. Mechanizm tego zjawiska pozostaje niewyjaśniony, tym niemniej Oikarinen wysunął koncepcję, zgodnie z którą fosforylacja seryny w AP-1 występującej w układzie aminokwasów SPKK mogłaby osłabiać jego zdolność do interakcji z DNA, podobnie jak ma to miejsce w przypadku histonów H1. Modyfikacja taka mogłaby być przeprowadzona za pośrednictwem H1, gdyż jak wspomniano wcześniej, według Oikarinena [31] cząsteczki tego histonu zdolne są do hydrolizy ATP i przeniesienia reszty fosforanowej na inne białko. Ponadto, jeśli istotnie H1 rozpoznaje tę samą sekwencję DNA co CTF/NF-I (lub jej fragment) [38], wymiana nukleotydów za pośrednictwem receptorów jądrowych prowadząca do osłabienia powinowactwa histonu H1 do DNA pozwoliłaby aktywatorom transkrypcji zająć jego miejsce. W tej chwili trudno ocenić, jak dalece spekulatywną jest hipoteza Oikarinena, ponieważ wiele prac oryginalnych, na które powołuje się autor, jest w druku.



Rys. 1. Schemat obrazujący działanie histonu H1 jako GTPazy (wg Oikarinena [31], zmieniony): w stanie represji histon H1 związany z GDP wykazuje wysokie powinowactwo do DNA; receptory jądrowe ułatwiają wymianę GDP na GTP, co prowadzi do obniżenia powinowactwa H1 do DNA; uwolnione cząsteczki H1 mogą oddziaływać z białkami efektorowymi; przerwanie sygnału następuje w wyniku hydrolizy GTP do GDP przebiegającej przy udziale histonu H1, co ponownie prowadzi do stanu represji

Konkurencję o miejsce wiązania z DNA pomiędzy histonem H1 a czynnikami transkrypcyjnymi można wyobrazić sobie bez udziału pośredniczących receptorów jądrowych. Fosforylacja cząsteczek H1 bez wątpienia przyczynia się do osłabienia jego oddziaływań z DNA i być może w takich przypadkach aktywatory transkrypcji "wygrywają" konkurencję o miejsce wiązania z DNA [12, 41].

Zaprezentowany przegląd informacji o histonach H1 może wydawać się Czytelnikom niedostatecznie spójny, mimo to jest odzwierciedleniem obecnego stanu wiedzy na ten temat. Oczywiście nie wszystkie problemy związane ze strukturą i funkcją H1 zostały omówione w wyczerpujący sposób. Heterogenność oraz modyfikacje postsyntetyczne histonów H1 będą przedmiotem odrębnego opracowania.

## LITERATURA

- [1] ALLAN J, HARTMAN PG, CRANE-ROBINSON C, AVILES FX. The structure of histone H1 and its location in chromatin. *Nature* 1980; **288**: 675–679.
- [2] ALLAN J, MITCHELL T, HARBORNE N, BÖHM L, CRANE-ROBINSON C. Roles of H1 domain in determining high order chromatin structure and H1 location. *J Mol Biol* 1986; **187**: 591–601.
- [3] BALL DJ, GROSS DS, GARRARD WT. 5-methylcytosine is localized in nucleosomes contain histone H1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 5490–5494.

- [4] BÖHM L, MITCHELL TC. Sequence conservation in the N-terminal domain of histone H1. *FEBS Lett* 1985; **193**: 1–4.
- [5] CARON F, THOMAS JO. Exchange of histone H1 between segments of chromatin. *J Mol Biol* 1981; **146**: 513–537.
- [6] CORDINGLEY MG, RIEGEL AT, HAGER GL. Steroid dependent interaction of transcription factor with the inducible promoter of mouse mammary tumor virus in vivo. *Cell* 1987; **48**: 261–270.
- [7] DANEHOLT B, GROSSBACH U. Histone H1 and transcription. *TIBS* 1990; **15**: 463.
- [8] DELABAR JM. Nonrandom location of H1-H1 histones on chromatin of mouse liver and brain. *J Biol Chem* 1985; **260**: 12622–12628.
- [9] GROSS DS, GARRARD WT. Poising chromatin for transcription. *Trends Biochem Sci* 1987; **12**: 293–297.
- [10] HUANG HC, COLE RD. The distribution of H1 histone is nonuniform and correlates with different degrees of condensation. *J Biol Chem* 1984; **259**: 14237–14242.
- [11] IZAURRALDE E, KÁS E, LAEMMLI UK. Highly preferential nucleation of histone H1 assembly on scaffold-associated regions. *J Mol Biol* 1989; **210**: 573–585.
- [12] JERZMANOWSKI A. Wpływ postsyntetycznych fosforylacji na strukturę histonu H1 i jego funkcję w chromosomach. *Post Bioch* 1989; **35**: 321–328.
- [13] JERZMANOWSKI A, COLE RD. Flanking sequences of *Xenopus* 5S RNA determine differential inhibition of transcription by H1 histone in vitro. *J Biol Chem* 1990; **265**: 10726–10732.
- [14] JIN Y, COLE RD. Histone H1 is distributed unlike H1 in chromatin aggregation. *FEBS Lett* 1985; **182**: 455–458.
- [15] JONES KA, KADONAGA JT, ROSENFELD PJ, KELLY TJ, TJIAN R. A cellular DNA-binding protein that activates eukaryotic transcription and DNA replication. *Cell* 1987; **48**: 79–89.
- [16] KAMAKAKA RT, THOMAS JO. Chromatin structure of transcriptionally competent and repressed genes. *EMBO J* 1990; **9**: 3997–4006.
- [17] KERR LD, MILLER DB, MATRISIAN LM. TGF- $\beta$ 1 inhibition of transin/stromelysin gene expression is mediated through a *Fos* binding sequence. *Cell* 1990; **61**: 267–278.
- [18] KUNZLER P, STEIN A. Histone H5 can increase the inter nucleosome spacing in dinucleosomes to native like values. *Biochemistry* 1983; **22**: 1783–1789.
- [19] KWIATKOWSKA J. Białka G jako "uniwersalny łącznik" w transmisji sygnałów z receptorów błonowych na ich efekторы. *Post Bioch* 1989; **35**: 321–328.
- [20] LEFFAK M, TREMPPE JP. Histone H1 and HMG 17 are deposited nonrandomly in the nucleus. *Nucl Acids Res* 1985; **13**: 4853–4869.
- [21] LIPIŃSKA B. Rola białek szoku termicznego. *Post Bioch* 1990; **36**: 32–42.
- [22] MAEDER DL, BÖHM L. The C-domain in H1 histone is structurally conserved. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1076**: 233–238.
- [23] MANNERMAA R-M, OIKARINEN J. The histone H1-*lacZ'* fusion protein produced in *Escherichia coli* binds to the 5'-TTGGCA-nnTGCCAA-3' motif on DNA. *FEBS Lett* 1991; **278**: 115–119.
- [24] MANNERMAA R-M, OIKARINEN J. Nucleoside triphosphate binding and hydrolysis by histone H1. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **182**: 309–317.
- [25] MANSER T, ACHER T, RECHSTEINER M. Arginine-rich histones do not exchange between human and mouse chromosomes in hybrid cells. *Cell* 1980; **19**: 993–1003.
- [26] MERMOD N, O'NEILL EA, KELLY TJ, TJIAN R. The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-I is distinct from the replication and DNA-binding domain. *Cell* 1989; **58**: 741–753.
- [27] MITCHELL PJ, TJIAN R. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 1989; **245**: 371–378.
- [28] NACHEVA GA, GUSCHIN DY, PREOBRAZHENSAYA OV, KARPOV VL, EBRALIDSE KK, MIRZABEKOV AD. Change in the pattern of histone binding to DNA upon transcriptional activation. *Cell* 1989; **58**: 27–36.
- [29] NEUBERGER A, VAN DEENEN LLM. Protein metabolism. Comprehensive Biochemistry Academic Press, New York 1982; **19B**, Cz.II; 507–573.
- [30] OHE Y, HAYASHI H, IWAI K. Human spleen histone H1. Isolation and amino acid sequence of a main variant, H1B. *J Biochem* 1986; **100**: 359–368.
- [31] OIKARINEN J. Histone H1 and the regulation of transcription by nuclear receptors. *FEBS Lett* 1991; **294**: 6–10.
- [32] OIKARINEN J, MANNERMAA R-M, TARKKA T, YLI-MÄYRY N, MAJAMAA K. Interference of AIF-4 with nucleotide and DNA binding of rat histone H1 in vitro – implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1991; **132**: 171–174.
- [33] PEDERSEN C, THOMA F, SIMPSON RT. Core particle, fiber, and transcriptionally active chromatin structure. *Ann Rev Cell Biol* 1986; **2**: 117–147.

- [34] PIŃA B, BRÜGGEMEIER U, BEATO M. Nucleosome positioning modulates accessibility of regulatory proteins to the mouse mammary tumor virus promoter. *Cell* 1990; **60**: 719–731.
- [35] RALL SC, COLE RD. Amino acid sequence and sequence variability of the amino-terminal regions of lysine-rich histones. *J Biol Chem* 1971; **246**: 7175–7190.
- [36] REEVES R. Transcriptionally active chromatin. *Biochim Biophys Acta* 1984; **782**: 343–393.
- [37] RISTINIEMI J, OIKARINEN J. Homology of histone H1 variants with adenine nucleotide-binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; **153**: 783–791.
- [38] RISTINIEMI J, OIKARINEN J. Histone H1 binds to the putative nuclear factor I recognition sequence in the mouse  $\alpha_1$ (I) collagen promoter. *J Biol Chem* 1989; **264**: 2164–2174.
- [39] RODRÍGUES-CAMPOS A, SHIMAMURA A, WORCEL A. Assembly and properties of chromatin containing histone H1. *J Mol Biol* 1989; **209**: 135–150.
- [40] ROSE SM, GARRARD WF. Differentiation-dependent chromatin alterations precede and accompany transcription of immunoglobulin light chain genes. *J Biol Chem* 1984; **259**: 8534–8544.
- [41] SCHLISSEL MS, BROWN DD. The transcriptional regulation of *Xenopus* 5s RNA genes in chromatin: the roles of active stable transcription complexes and histone H1. *Cell* 1984; **37**: 903–913.
- [42] SEVAL JS. High-resolution analysis of histone binding site in a rat albumin gene. *Biochemistry* 1988; **27**: 5038–5044.
- [43] SHIMAMURA A, WORCEL A. The assembly of regularly spaced nucleosomes in *Xenopus* oocyte S-150 extract is accompanied by deacetylation of histone H4. *J Biol Chem* 1989; **264**: 14524–14530.
- [44] STEIN A, KUNZLER P. Histone H5 can correctly align randomly arranged nucleosomes in a defined in vitro system. *Nature (London)* 1983; **302**: 548–550.
- [45] SUBIRANA JA. Analysis of the charge distribution in the C-terminal region of histone H1 as related to its interaction with DNA. *Biopolymers* 1990; **29**: 1351–1357.
- [46] SUZUKI M. SPKK, a new nucleic acid-binding unit of protein found in histone. *EMBO J* 1989; **8**: 797–804.
- [47] TAYLOR CW. The role of G-proteins in transmembrane signalling. *Biochem J* 1990; **272**: 1–13.
- [48] THOMAS J, KORNBERG R. An octamer of histones in chromatin and free in solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; **72**: 2626–2630.
- [49] WEINTRAUB H. Histone H1-dependent chromatin superstructure and the suppression of gene activity. *Cell* 1984; **38**: 17–27.
- [50] WU LH, KUEHL L, LECHSTEINER M. Dynamic behavior of histone H1 microinjected into HeLa cells. *J Cell Biol* 1986; **103**: 465–474.
- [51] WU RS, PANUSZ HT, HATCH CL, BONNER WM. Histones and their modifications. *CRC Critical Rev Biochem* 1986; **20**: 201–263.
- [52] ZLATANOVA J. Histone H1 and the regulation of transcription of eukaryotic genes. *Trends Biochem Sci* 1990; **15**: 273–276.

Otrzymano: 02.07.1992 r.

Przyjęto: 27.10.1992 r.

Adresy autorów: 92-507 Łódź ul. Gorkiego 1 m 41 oraz 98-200 Sieradz, ul. Sikorskiego 5 m32

# MOLEKULARNY MECHANIZM FOTOINHIBICJI

## MOLECULAR MECHANISM OF PHOTOINHIBITION

Violetta SĄCZYŃSKA

Zakład Enzymatyki, Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski

*Streszczenie.* Silne światło powoduje obniżenie aktywności fotosyntetycznej tlenowych organizmów fotosyntetyzujących, czyli fotoinhibicję. Przyczyną tego zjawiska jest specyficzne uszkodzenie centrów reakcji II układu fotosyntezy (rozdz. 2). W pierwszej fazie fotoinhibicji obserwuje się hamowanie transportu elektronów po akceptorowej stronie PSII (rozdz. 3.1 i 3.2). Kontrowersje budzi to, który z akceptorów chinonowych bierze udział w tym procesie (rozdz. 3.3). Fotoinhibicja tylakoidów z uszkodzonym kompleksem utleniającym H<sub>2</sub>O polega na hamowaniu reakcji po donorowej stronie PSII (rozdz. 3.4). Przepuszczalnie przebieg inaktywacji PSII może różnić się w zależności od warunków wywoływania fotoinhibicji (rozdz. 3.5). Zakłóceniom reakcji fotochemicznych towarzyszy uszkodzenie białka wchodzącego w skład centrum reakcji, tzw. białka D1. Zmodyfikowane białko jest następnie degradowane przez podjednostkę kompleksu rdzeniowego PSII (rozdz. 4). Sugeruje się, że rozpad białka D1 może być procesem autoproteolitycznym. Degradacja/synteza de novo białka D1 oraz przemieszczanie się kompleksu rdzeniowego i jego podjednostek między różnymi regionami błon tylakoidów są elementami cyklu naprawiającego uszkodzenia PSII. Procesy biorące udział w rozpraszaniu energii wzbudzenia i adaptacji aparatu fotosyntezy do światła o zwiększonej intensywności, a także reaktywacja PSII spełniają ważną rolę w utrzymaniu aktywności fotosyntetycznej roślin w warunkach nadmiernego oświetlenia (rozdz. 5). Podatność roślin na fotoinhibicję jest zdeterminowana genetycznie, a ponadto zależy od przystosowania roślin do wzrostu w określonych warunkach świetlnych (rozdz. 6). Światło i stesy środowiskowe wywierają synergistyczny wpływ na proces fotoinhibicji.

*Summary.* Strong illumination of oxygenic photosynthetic organisms results in the decrease of their photosynthetic activity, i.e. photoinhibition. This phenomenon is due to specific damage to the PSII reaction centers (Section 2). Inhibition of electron transport at the acceptor side of PSII is the first stage of photoinhibition (Sections 3.1 and 3.2). The controversial issue is which quinone acceptor is involved in this process (Section 3.3). In thylakoid membranes impaired in H<sub>2</sub>O oxidation strong light causes the inhibition of reactions at PSII donor side (Section 3.4). Presumably the course of PSII inactivation may vary according to conditions of photoinhibition induction (Section 3.5). The disturbances of photochemical reactions are accompanied by damage to reaction center protein – D1 protein. Modified protein is subsequently degraded by the PSII core subunit (Section 4). Possibly the breakdown of D1 protein is an autoproteolytic process. Degradation/de novo synthesis of D1 protein as well as migration of the core complex and its subunits between the two thylakoid regions are the parts of PSII repair cycle following photoinhibition. Processes involved in dissipation of excitation energy and light acclimation to enhanced light intensities as well as reactivation of PSII play an important role in sustaining photosynthetic activity in plants illuminated excessively (Section 5). Susceptibility of plants to photoinhibition is determined by genetic factors and depends on their acclimation to definite light conditions (Section 6). Light and environmental stresses have a synergistic effect on the process of photoinhibition.

Wykaz stosowanych skrótów: PSI (PSII) – I (II) układ fotosyntezy; P<sub>680</sub> (P<sub>680</sub><sup>+</sup>) – zredukowana (utleniona) forma chlorofilu centrum reakcji PSII, pierwotnego donora elektronów w PSII; Tyr<sub>z</sub> (Tyr<sub>z</sub><sup>+</sup>) – zredukowana (utleniona) forma reszty tyrozyny-161 białka D1, bezpośredniego donora elektronów dla P<sub>680</sub>, dawniej oznaczanego jako Z (Z<sup>+</sup>), Y<sub>z</sub> (Y<sub>z</sub><sup>ox</sup>); Pheo (Pheo<sup>-</sup>) – utleniona (zredukowana) forma feofityny, pierwotnego akceptora elektronów w PSII; Q<sub>A</sub> (Q<sub>A</sub><sup>-</sup>) – utleniona (zredukowana) forma pierwszego chinonowego akceptora elektronów w PSII; Q<sub>B</sub> (Q<sub>B</sub><sup>-</sup>, Q<sub>B</sub><sup>2-</sup>) – utleniona (zredukowana, podwójnie zredukowana) forma drugiego chinonowego akceptora elektronów w PSII; PQ – plastochinon; PQH<sub>2</sub> – plastochinol; CP 43 – zbierający światło kompleks chlorofil a - białko występujący w kompleksie rdzeniowym PSII; LHCII – zbierający światło kompleks chlorofil a/b-białko związany z PSII; ATP – adenosynotrifosforan; ADP – adenosynodifosforan; NADP<sup>+</sup> (NADPH) – utleniona (zredukowana) forma dinukleotydu nikotynamido-adeninowego; DPC – 1,5-difenylkarbazyd; DCIP – 2,6-dichlorofenolindofenol; DCMU – 3-(3,4-dichlorofenyl)-1,1-dimetylomocznik; DBMIB – 2,5-dibromo-3-metylo-6-izopropyl-p-benzochinon; EPR – elektronowy rezonans paramagnetyczny.

## WPROWADZENIE

Niekorzystny wpływ silnego światła na aktywność fotosyntetyczną zaobserwowano najpierw w kulturach komórkowych glonów, nieco później u roślin wyższych [37]. Obserwowano ponadto, że wyizolowane błony tylakoidów tracą zdolność do transportu elektronów pod wpływem światła, co stanowiło poważny problem w badaniach aktywności fotochemicznej *in vitro*. Pierwsze systematyczne doświadczenia dotyczące szkodliwego wpływu światła na rośliny zielone przeprowadzono w latach siedemdziesiątych [37]. Początkowo zajmowano się głównie fizjologicznymi aspektami tego zjawiska [48]. Natomiast obecnie trwają intensywne prace mające na celu wyjaśnienie molekularnego mechanizmu fotoinhibicji [3].

Już pionierskie eksperymenty przeprowadzone przez Myersa i Burra [41] na glonie *Chlorella*, przez Trebsta [62] oraz Jonesa i Koka [28] na wyizolowanych chloroplastach wykazały, że uszkodzenie aparatu fotosyntetycznego przez światło przebiega w 2 etapach. W pierwszym z nich obserwuje się hamowanie aktywności fotosyntetycznej, któremu nie towarzyszy degradacja barwników fotosyntetycznych. Z kolei dominującym procesem drugiego etapu jest destrukcja pigmentów. W celu opisanego pierwszego etapu przyjęto termin "fotoinhibicja", natomiast zjawiska następujące po długotrwałym działaniu światła określa się mianem "fotooksydacja". Badania ujawniły, że wrażliwość na światło o wysokim natężeniu dotyczy sinic, glonów i roślin wyższych [3, 38, 48].

### DOŚWIADCZALNE WYWOŁYWANIE FOTIINHIBICJI

W laboratoriach stosuje się 2 zasadnicze sposoby wywoływania fotoinhibicji, tj. w warunkach *in vivo* lub *in vitro* [17, 38]. Silne oświetlenie całych liści prowadzi do osłabienia światła przez kolejne warstwy komórek, stąd chloroplasty komórek leżących bliżej powierzchni oświetlanej będą ulegały większemu uszkodzeniu niż chloroplasty komórek leżących dalej od powierzchni oświetlanej [13, 17, 33, 38]. Natomiast oświetlenie mieszającej się zawiesiny komórek glonów lub preparatów uzyskanych z liści, tj. protoplastów, chloroplastów czy tylakoidów umożliwia jednolitą inaktywację błon fotosyntetycznych [17, 38], a także pozwala na ścisłą kontrolę stężenia CO<sub>2</sub> i O<sub>2</sub> [38]. Ponadto indukowanie fotoinhibicji w mniej złożonych układach eliminuje procesy reaktywacji, które w innym wypadku maskują pierwotne zjawiska fotoinhibicji, a przez to utrudniają ich badanie [17]. Tak więc interpretacja wyników badań w warunkach *in vitro* jest łatwiejsza, jednakże wymaga uwzględnienia sztucznego charakteru izolowanych układów [17, 38].



Do wywoływania fotoinhibicji w warunkach laboratoryjnych stosuje się światło białe o natężeniu od 750 do 7500  $\mu\text{moli fotonów} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$  [4, 8, 9, 13, 15, 16, 18, 19, 27, 29, 33, 35, 36, 42, 55, 57, 58, 60, 61, 63, 65, 67, 68, 71]. Należy jednak zwrócić uwagę na to, że efekt działania światła o określonym natężeniu zależy od warunków świetlnych wzrostu roślin, czy hodowli glonów [45], jak również od sposobu wywoływania fotoinhibicji. Wyizolowane chloroplasty lub błony tylakoidów są bardziej podatne na fotoinhibicję niż nienaruszone liście [38].

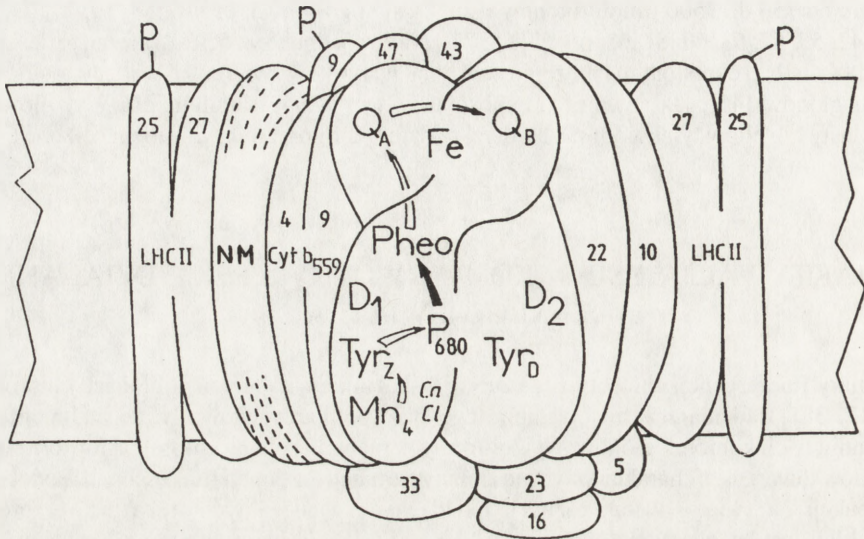
## 2. INAKTYWACJA PSII JAKO PIERWOTNY EFEKT DZIAŁANIA SILNEGO ŚWIATŁA

Pomiary fluorescencji chlorofilu są czułym wskaźnikiem zaburzeń w błonach chloroplastów [17, 38]. Badania z zastosowaniem tego typu pomiarów ujawniły, że nadmiernemu oświetlaniu liści, komórek glonów, wyizolowanych nienaruszonych chloroplastów oraz błon tylakoidów towarzyszą charakterystyczne zmiany parametrów emisji fluorescencji. Podobieństwo reakcji na światło w tak różnych układach doświadczalnych wskazuje, że proces fotoinhibicji jest bezpośrednio związany z błonami tylakoidów, w których występują I i II układ fotosyntezy (PSI i PSII). Dalsze badania nad fotoinhibicją pozwoliły stwierdzić, że głównym obiektem szkodliwego oddziaływania światła jest PSII [17, 24, 38, 45, 46, 48, 70].

Wpływ nadmiernego oświetlenia na I i II układ fotosyntezy można badać dokonując pomiarów fluorescencji w temperaturze ciekłego azotu [17, 38, 48]. Fluorescencja rejestrowana w temperaturze pokojowej pochodzi głównie z PSII. Dopiero schłodzenie liści, zawiesiny chloroplastów, czy błon tylakoidów do temperatury 77 K pozwala na uzyskanie widm emisji fluorescencji obu fotoukładów z maksimum o długości fali 735 nm w przypadku PSI oraz 685 i 695 nm w przypadku PSII. Inną metodą pozwalającą na lokalizację uszkodzenia przez światło są pomiary aktywności transportu elektronów PSI lub PSII wyizolowanych błon tylakoidów w obecności sztucznych donorów i akceptorów elektronów [17, 38, 48]. Natomiast określenie względnych zmian aktywności PSI i PSII w nienaruszonych liściach stało się możliwe dzięki zastosowaniu technik fotoakustycznych [24].

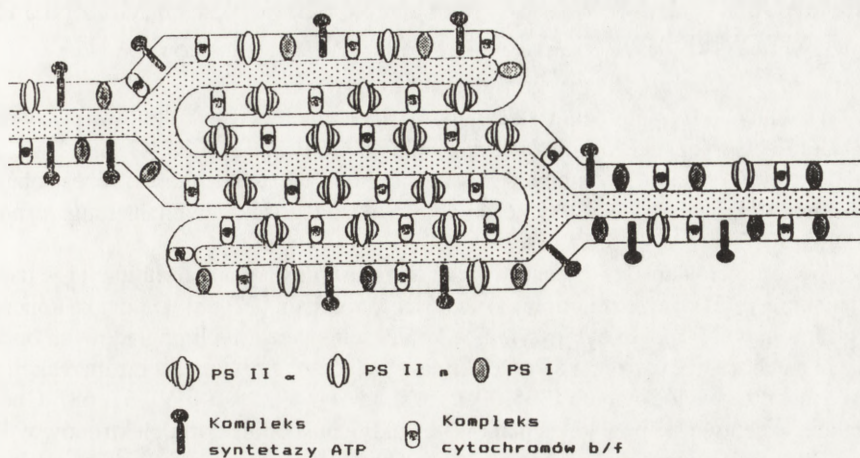
Rysunek 1 przedstawia model struktury PSII uwzględniający reakcje przenoszenia elektronów. Cząsteczki barwników zewnętrznych i wewnętrznych kompleksów antenowych PSII absorbują światło, a następnie kierują energię wzbudzenia do centrum reakcji, co inicjuje transport elektronów. W warunkach silnego oświetlenia szybkość przenoszenia energii z kompleksów chlorofilowo-białkowych do centrum reakcji przekracza szybkość jej wykorzystania w reakcjach transportu elektronów ze względu na ograniczoną aktywność procesów regenerujących NADP<sup>+</sup> i ADP [31, 45, 48]. W ten sposób powstaje w centrum reakcji destrukcyjny stan "nadmiaru energii wzbudzenia". Uszkodzenie centrum reakcji jako pierwotny efekt nadmiernego oświetlenia jest dobrze udokumentowane [6, 15, 17, 45, 46, 48].

Pula II układu fotosyntezy nie jest jednorodna (rys. 2). Główną jej część stanowią tzw.  $\alpha$ -centra, które występują wyłącznie w ściśnionych (ang. *appressed*) regionach błon tylakoidów. Natomiast tzw.  $\beta$ -centra PSII zlokalizowane są w nieściśnionych (ang. *nonappressed*) regionach błon. Badania wykazały, że podczas fotoinhibicji uszkodzeniu ulegają głównie  $\alpha$ -centra, które związane są z bardziej rozbudowanymi kompleksami antenowymi niż  $\beta$ -centra [33, 46].



Rys. 1. Model II układu fotosyntezy (PSII) [3]: schemat przedstawia podjednostki białkowe z ich masami cząsteczkowymi w kDa (NM – białko o niskiej masie cząsteczkowej) albo nazwami: LHCII – kompleks chlorofil a/b-białko zbierający energię; cyt  $b_{559}$  – cytochrom b-559; centrum reakcji PSII tworzy heterodimer białek D1 i D2 oraz związane z nim przenośniki elektronów:  $P_{680}$  – chlorofil centrum reakcji, pierwotny donator elektronów; Pheo – feofityna, pierwotny akceptor elektronów;  $Q_A$  ( $Q_B$ ) – pierwszy (drugi) chinonowy akceptor elektronów; Tyr<sub>Z</sub> (Tyr<sub>D</sub>) – reszta tyrozyny-161 białka D1 (D2); Tyr<sub>Z</sub> – bezpośredni donator elektronów dla  $P_{680}$ ; biorące udział w utlenianiu wody: kompleks manganowy ( $Mn_4$ ) oraz kofaktory ( $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$ ) związane są z białkiem D1; położenie Tyr<sub>Z</sub>, Tyr<sub>D</sub>,  $Q_A$ ,  $Q_B$  i Fe (niechemowy jon  $Fe^{2+}$ ) na schemacie odpowiada w przybliżeniu ich lokalizacji w heterodimerze białkowym D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub>;  $\uparrow$  – symbolizuje reakcję rozdzielenia ładunku między  $P_{680}$  i Pheo,  $\uparrow\uparrow$  – symbolizuje wtórne reakcje transportu elektronu biorące udział w stabilizacji ładunków

Wpływ warunków stresowych na II układ fotosyntezy może być badany przy użyciu technik spektroskopii fluorescencyjnej [7, 11, 17, 32, 33, 54]. Pomiar sygnału indukowanej fluorescencji ujawnił, że nadmiernie oświetlane liście [11, 32, 33], protoplasty czy nienaruszone chloroplasty [7, 33] emitują fluorescencję o niższej intensywności w porównaniu z próbami kontrolnymi. Prawidłowość ta dotyczy fluorescencji maksymalnej ( $F_M$ ), zmiennej ( $F_V = F_M - F_O$ ) [7, 11, 32–34, 54], jak również poziomu fluorescencji pikowej ( $F_P$ ) i stanu stacjonarnego ( $F_T$ ) [7]. Natomiast charakter zmian poziomu minimalnej fluorescencji ( $F_O$ ) przypuszczalnie zależy od gatunku i warunków wzrostu roślin, a także od sposobu wywoływania fotoinhibicji [11]. Tak więc silne światło może powodować wyraźny wzrost, spadek albo tylko niewielkie zmiany natężenia minimalnej fluorescencji [7, 11, 32–34]. Wielkość fotoinhibicji najlepiej odzwierciedla stosunek fluorescencji zmiennej do maksymalnej ( $F_V/F_M$ ) [7, 11, 34]. Parametr ten jest miarą potencjalnej wydajności pierwotnych reakcji fotochemicznych PSII, a jego wartość wyznaczona dla różnych gatunków roślin okazała się być w nieznanym stopniu zróżnicowana [7, 11, 32, 34]. Badania ujawniły, że fotoinhibicji towarzyszy obniżenie wartości  $F_V/F_M$  [7, 11, 32, 33]. Ponadto okazało się, że zmiany wartości  $F_V/F_M$  są zwykle liniowo skorelowane ze zmianami wartości innych parametrów charakteryzujących stan



Rys. 2. Model organizacji tylakoidów [3]: błony gran przylegające do innych błon, tj. lamele gran, tworzą regiony ściśnięte, natomiast pozostałe błony tylakoidów, czyli tzw. lamele stromy, regiony nieściśnięte tylakoidów; schemat ilustruje lateralną heterogenność rozmieszczenia kompleksów białkowych w błonach tylakoidów; PSII $\alpha$  (PSII $\beta$ ) –  $\alpha$ -centra ( $\beta$ -centra) II układu fotosyntezy; PSI – I układ fotosyntezy

aparatu fotosyntetycznego, takich jak maksymalna wydajność kwantowa fotosyntezy [11, 32, 34] czy aktywność transportu elektronów wyizolowanych tylakoidów [33, 34].

Pomiary indukowanej fluorescencji poszerzone o analizy jej wygaszania wykazały, że procesy odpowiedzialne za obniżanie (wygaszanie) fluorescencji nadmiernie oświetlanych liści reprezentują specyficzny dla fotoinhibicji mechanizm niefotochemicznego wygaszania fluorescencji [7, 34, 54]. Wygaszanie fluorescencji związane z fotoinhibicją oraz dominujący w warunkach fizjologicznych mechanizm niefotochemicznego wygaszania fluorescencji związany ze stanem wysokoenergetycznym błon tylakoidów różni się kinetyką tworzenia podczas indukcji fluorescencji [34], a także kinetyką i wielkością relaksacji w ciemności [34, 54]. Zaproponowano wiele koncepcji wyjaśniających mechanizm wygaszania fluorescencji towarzyszący fotoinhibicji [7, 11, 17, 33, 34]. Obecnie rozpatrywane są dwie hipotezy dotyczące tego zagadnienia [34]. Jedna z nich zakłada, że przyczyną obniżenia intensywności fluorescencji jest zwiększenie termicznego rozpraszania energii wzbudzenia w kompleksach antenowych PSII spowodowane tworzeniem zeaksantyny z wiołaksantyny w cyklu ksantofilowym. Druga hipoteza zakłada, że w warunkach silnego oświetlenia część centrów reakcji traci aktywność fotochemiczną, ale jednocześnie ma zdolność wyłapywania energii wzbudzenia i przekształcania jej w ciepło (tzw. wygaszacz fluorescencji), część centrów ulega całkowitej inaktywacji wskutek rozpadu białka D1, natomiast pozostała frakcja centrów reakcji zachowuje niezmienną aktywność fotochemiczną. Przypuszcza się, że obydwa przedstawione mechanizmy mogą być odpowiedzialne za wzrost termicznego rozpraszania energii wzbudzenia w nadmiernie oświetlanych liściach.

### 3. MECHANIZM HAMOWANIA AKTYWNOŚCI FOTOCHEMICZNEJ PSII I MODYFIKACJI BIAŁKA D1 POD WPŁYWEM ŚWIATŁA

Wyniki badań nad fotoinhibicją wskazują, że działaniu silnego światła towarzyszy utrata aktywności fotochemicznej PS II oraz degradacja białka D1 [3, 8, 15, 38, 67, 68]. Natomiast wskaźnikiem występowania fotoinhibicji *in vivo* może być wzrost szybkości procesu obejmującego zarówno degradację, jak i syntezę białka, a określanego jako wymiana (ang. *turnover*) białka D1 [3, 17, 29, 38, 44, 55, 66, 70].

Początkowo sugerowano, że degradacja białka D1 jest przyczyną fotoinhibicji i że usunięcie tego białka z PS II poprzedza utratę aktywności fotoukładu [17, 38]. O ile taka koncepcja przebiegu fotoinhibicji mogła być przyjęta w kontekście ówczesnych poglądów na budowę PS II, o tyle nie może być uznana w świetle aktualnej wiedzy o strukturze centrum reakcji oraz licznych danych doświadczalnych [3, 5, 8, 15, 17, 42, 44, 49, 55, 58, 60, 67, 68]. Obecnie powszechnie akceptuje się pogląd, że hamowanie aktywności transportu elektronów w PS II jest pierwszym zjawiskiem podczas fotoinhibicji, natomiast degradacja białka jest konsekwencją a nie pierwotną przyczyną utraty aktywności fotochemicznej.

#### 3.1. HAMOWANIE AKTYWNOŚCI FOTOCHEMICZNEJ NA POZIOMIE $Q_B$

Pogląd, że pierwszym efektem działania silnego światła jest hamowanie aktywności transportu elektronów na poziomie  $Q_B$ , wywodzi się głównie z badań przeprowadzonych na glonie *Chlamydomonas reinhardtii* [17, 36], ale także na wyizolowanych tylakoidach roślin wyższych [38, 49].

W badaniach porównywano wielkość zmian aktywności transportu zależnego od  $Q_A$  i  $Q_B$  w PS II pod wpływem nadmiernego oświetlenia, stosując przy tym różne specyficzne akceptory elektronów dla  $Q_B^-$  oraz SiMo jako akceptor elektronów dla  $Q_A^-$  [17, 36, 38, 49]. Wyniki eksperymentów z zastosowaniem SiMo nie są w pełni wiarygodne w świetle doniesień o niskiej specyficzności SiMo jako akceptora elektronów na poziomie  $Q_A$  [12, 22]. Jednakże wnioski, jakie wyciągnięto na ich podstawie, potwierdziły badania z użyciem technik fluorescencyjnych [36, 49], a ponadto wyniki oznaczeń liczby miejsc wiążących atrazynę, które są wskaźnikiem funkcjonalnej integralności miejsca wiążącego  $Q_B$  w białku D1 (tzw. miejsca  $Q_B$ ) [36]. Zastosowanie atrazyny, czy diuronu [35, 36, 38] – inhibitorów przepływu elektronów w PSII wiążących się z białkiem D1 oraz DBMIB [36] – inhibitora przepływu elektronów przez kompleks cytochromów b/f, przyczyniło się do wyjaśnienia mechanizmu uszkodzenia białka D1 a jednocześnie hamowania aktywności fotochemicznej PS II na poziomie  $Q_B$ . Wykazano mianowicie, że diuron lub atrazyna obecne podczas wywoływania fotoinhibicji u *Chlamydomonas reinhardtii* [36] oraz we fragmentach błon PSII [35] wyizolowanych z *Chenopodium album* częściowo chronią błony chloroplastów przed fotoinhibicją, co wyraża się zmniejszeniem stopnia inaktywacji PSII w komórkach glonu i hamowaniem degradacji białka D1 w preparatach błon tylakoidów. Ponadto badania przeprowadzone na *Chlamydomonas reinhardtii* [36] i biotypie *Chenopodium* [35] odpornych na atrazynę wykazały, że zdolność wiązania tego herbicydu jest niezbędna dla ochrony przed fotoinhibicją. Natomiast u *Chlamydomonas* zaobserwowano przyspieszoną utratę aktywności fotochemicznej w obecności DBMIB [36].

Przypuszcza się, że nadmierne oświetlenie powoduje znaczną redukcję puli PQ [36], a przez to akumulację rodników chinonowych, tj.  $Q_B^-$  [3, 35, 38] lub  $Q_B^{2-}$  [36] w miejscu  $Q_B$  białka D1. Aniony  $Q_B^-$  [35, 38] lub  $Q_B^{2-}$  [36] mogłyby kowalencyjnie modyfikować białko [35, 36, 38], ale bardziej prawdopodobne jest, że aniony semichinonowe [3, 38] lub chinonowe [36] ulegają autooksydacji w obecności  $O_2$  z wytworzeniem anionu ponadtlenkowego ( $O_2^-$ ). Przypuszcza się, że lokalny wzrost stężenia  $O_2^-$  indukuje reakcje wtórne, w których powstają rodniki hydroksylowe [6, 38]. Przedstawiona koncepcja zakłada, że rodniki tlenu [3, 35, 36] lub rodniki hydroksylowe [3, 35, 38] są odpowiedzialne za uszkodzenie białka D1, a w konsekwencji za jego degradację.

Możliwość takiego przebiegu zjawisk podczas fotoinhibicji potwierdzają badania, w których powstawanie rodników chinonowych w błonach tylakoidów indukowano światłem UV [3] albo przedłużano obecność semichinonu w centrach reakcji PSII *Chlamydomonas reinhardtii* przez zastosowanie błysków światła zamiast ciągłego oświetlenia [38]. Wpływ rodników semichinonowych na białko D1 objawiał się zwiększoną degradacją [3] albo wymianą [38] białka D1.

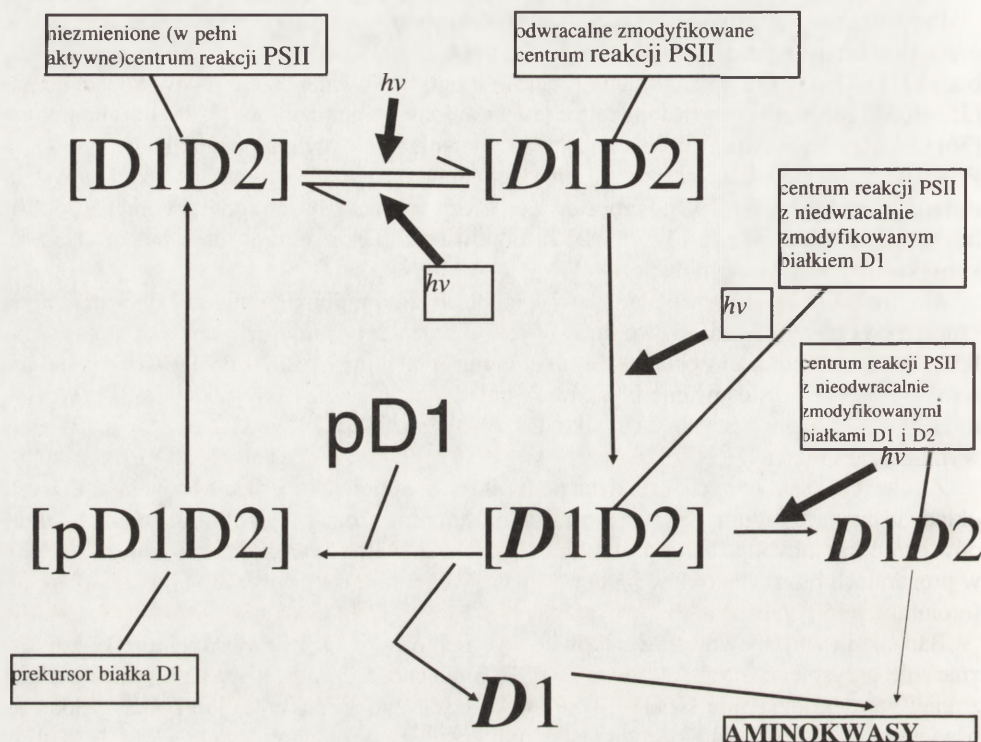
Z kolei udział aktywnych form tlenu podczas fotoinhibicji potwierdzają badania, w których układy usuwające rodniki tlenowe w znacznym stopniu chroniły wyizolowane błony tylakoidów przed fotoinhibicją, natomiast rodniki hydroksylowe wytwarzane przez sztuczne układy w preparatach błon tylakoidów inkubowanych w ciemności wywoływały efekt podobny do fotoinhibicji [50].

Badania *in vitro* ujawniły, że całkowite wyeliminowanie  $O_2$  z zawiesiny błon tylakoidów znacznie przyspiesza utratę aktywności PSII, a obecność  $O_2$  nawet w śladowych ilościach zmniejsza efekt działania światła [4]. Ponadto tzw. szybką inaktywację uzyskano podczas oświetlania cząstek PSII w środowisku redukującym pozbawionym  $O_2$  [3, 42]. Wpływ obecności  $O_2$  na przebieg fotoinhibicji w wyizolowanych błonach tylakoidów należy jednak uznać za kwestię nierozstrzygniętą, bowiem oprócz doniesień wskazujących na przyspieszenie fotoinhibicji w warunkach anaerobowych [8, 17, 31] istnieją prace nie potwierdzające tej zależności [17, 35]. Obecnie przyjmuje się, że mechanizmy fotoinhibicji w warunkach tlenowych i beztlenowych są różne [4, 8, 31], a zatem nie można wykluczyć udziału rodników tlenowych i hydroksylowych w procesie uszkodzenia białka D1 podczas fotoinhibicji indukowanej w obecności  $O_2$ .

Inny mechanizm utraty aktywności PSII zaproponowali Ohad i wsp. [44].

Dane przedstawione przez Ohada i wsp. [44] wskazują na dwufazowy przebieg fotoinhibicji u *Chlamydomonas reinhardtii*. Pierwszą fazę charakteryzuje ujawniona w pomiarach termoluminescencji destabilizacja miejsca wiążącego  $Q_B^-$  w białku D1, która może być odpowiedzialna za hamowanie aktywności transportu elektronów w PSII na poziomie  $Q_B$ . Obniżenie natężenia światła po indukcji pierwszej fazy fotoinhibicji pozwala na przywrócenie pierwotnego stanu miejsca  $Q_B$  w białku D1, natomiast wydłużenie czasu nadmiernego oświetlania komórek glonu prowadzi do nieodwracalnej modyfikacji białka D1, co przejawia się występowaniem fragmentu polipeptydowego odpornego na trawienie trypsyną.

Wyniki badań nad fotoinhibicją u *Chlamydomonas reinhardtii* stały się podstawą koncepcji (rys. 3), wg której światło powoduje odwracalne zmiany konformacyjne centrów reakcji PSII wpływające na miejsce wiązania  $Q_B^-$  w białku D1. Przypuszcza się, że przedłużone oświetlanie prowadzi do dalszych konformacyjnych zmian centrów reakcji i tworzenia rodników ( $Q_B^-$ ,  $P_{680}^+$  lub  $Z^+$ ), które bezpośrednio modyfikują białko albo przyczyniają się do jego modyfikacji przez udział w wytwarzaniu rodników tlenowych czy hydroksylowych. Te



Rys. 3. Schemat przebiegu fotoinhibicji in vivo wg Ohada i wsp. [44]

nieodwracalne zmiany w białku D1 prawdopodobnie indukują jego degradację, natomiast reaktywacja kompleksu PSII wymaga włączenia nowo zsyntetyzowanej cząsteczki białka. W przypadku długotrwałego oddziaływania silnego światła na aparat fotosyntetyczny roślin może także dochodzić do degradacji białka D2.

### 3.2 HAMOWANIE AKTYWNOŚCI TRANSPORTU ELEKTRONÓW NA POZIOMIE $Q_A$

Ostatnie prace dotyczące fotoinhibicji wywoływanej w warunkach in vitro wskazują, że silne światło powoduje również zaburzenie aktywności fotochemicznej PSII na poziomie  $Q_A$  [3, 16, 19, 42, 60, 67, 68].

Badania fotoinhibicji wyizolowanych błon tylakoidów ujawniły istnienie korelacji między zmniejszeniem ilości zredukowanych w warunkach pomiaru spektroskopowego  $Q_A$  a hamowaniem aktywności wytwarzania  $O_2$ , co wskazuje, że pod wpływem światła centra reakcji tracą zdolność do stabilnego rozdziału ładunku [60, 67, 68], czyli osiągania stanu składników redoks opisanego jako  $P_{680}^+ \times Pheo \times Q_A^-$ . Wniosek ten potwierdziły również spektroskopowe pomiary utleniania  $P_{680}$  w inaktywowanych przez światło preparatach PSII [19]. Ponadto wykazano, że zmniejszenie ilości Pheo ulagającej redukcji w warunkach pomiaru spektroskopii EPR jest o wiele wolniejsze niż hamowanie aktywności wytwarzania  $O_2$ , czy zdolności do redukcji  $Q_A$  [60].

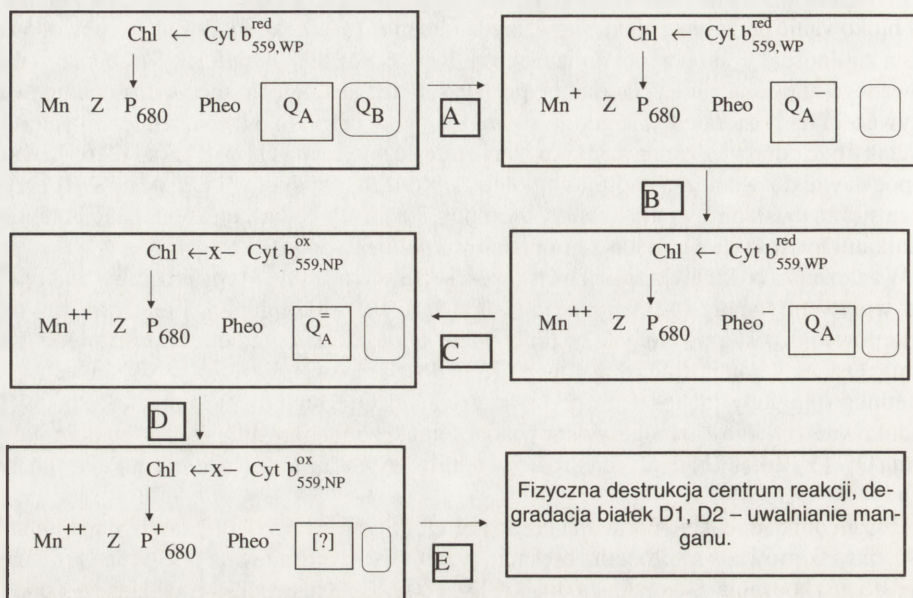
Przedstawiono dane świadczące o tym, że pierwotnym zjawiskiem w procesie fotoinhibicji jest blokowanie przepływu elektronów między Pheo i  $Q_A$ , co z kolei może być spowodowane utratą zdolności  $Q_A$  do przenoszenia elektronów w centrum reakcji PSII. Mechanizm obserwowanego zjawiska nie jest dokładnie poznany. Przez analogię do mechanizmu hamowania aktywności na poziomie  $Q_B$  sugeruje się, że akumulacja rodników semichinonowych ( $Q_A^-$ ) mogłaby być odpowiedzialna za uszkodzenie miejsca wiązania  $Q_A$  w białku D2 [65]. Z kolei na podstawie doświadczeń nad fotoinhibicją w błonach tylakoidów i cząstkach PSII przypuszcza się, że działaniu światła towarzyszy modyfikacja  $Q_A$  będąca efektem reakcji chinonu z rodnikami hydroksyloowymi lub z grupą tiolową polipeptydu [16].

W zależności od kinetyki zmian właściwości PSII wyróżniono 3 typy procesów inaktywacji pod wpływem światła [42], czy też 3 kinetyczne fazy fotoinhibicji [43, 56], przy czym występowanie tzw. powolnej fazy próbowano wyjaśnić tworzeniem anormalnie stabilnej formy  $Q_A^-$ . Natomiast Styring i wsp. [60] doszli do wniosku, że w warunkach stresu świetlnego mogłoby dochodzić do podwójnej redukcji  $Q_A$ . Sugeruje się ponadto, że podwójnie zredukowany  $Q_A$  ( $Q_A^{2-}$ ) mógłby odpowiadać temu, co inni określili jako anormalnie stabilna forma  $Q_A^-$  [3]. Z kolei badania *in vitro* udowodniły, że w warunkach silnie redukujących może tworzyć się  $Q_A^{2-}$  [30, 51, 64].

Uwzględniając reakcję podwójnej redukcji  $Q_A$ , Styring i wsp. [60] zaproponowali kolejność zjawisk prowadzących do hamowania przepływu elektronów na poziomie  $Q_A$ , a następnie do uszkodzenia i degradacji białka D1 (rys. 4). Koncepcja ta zakłada, że podczas nadmiernego oświetlenia, kiedy szybkość redukcji puli PQ jest większa niż szybkość jej reoksydacji, zredukowany  $Q_B$  przemieszcza się do puli PQ, a jego miejsce z braku dostępnego plastochinonu pozostaje "niezajęte" (rys. 4A). Oświetlanie takich centrów reakcji w dalszym ciągu indukuje reakcje pierwotnego rozdziału ładunku, tj. tworzenie pary rodnikowej  $P_{680}^+ \text{Pheo}^-$ , która w obecności  $Q_A^-$  może rekombinować. Przyjmuje się jednak, że reakcja przeniesienia elektronu z Z (Tyr<sub>Z</sub>) do  $P_{680}^+$  jest wystarczająco szybka, aby zredukować  $P_{680}^+$  pozostawiając tym samym zredukowaną Pheo ( $\text{Pheo}^-$ ) (rys. 4B).  $\text{Pheo}^-$  jest silnym reduktorem ( $E_m \approx -610$  mV), stąd istnieje prawdopodobieństwo, że zredukuje  $Q_A^-$  (rys. 4C). Los  $Q_A^{2-}$  nie jest wyjaśniony. Gdyby obniżyło się natężenie światła,  $Q_A^{2-}$  mogłoby być częściowo reoksydowane przez plastochinon. Jednakże w wypadku dalszego oświetlenia w ten sposób zmodyfikowanych centrów reakcji, prawdopodobnym jest, że  $Q_A^{2-}$  lub  $Q_A\text{H}_2$  opuszcza centrum reakcji (rys. 4D). Zakłada się ponadto, że uszkodzenie białka D1 prowadzące do jego degradacji (rys. 4E) jest wynikiem zakłócenia reakcji pierwotnego rozdziału ładunku lub reakcji po stronie donorowej PSII w centrach pozbawionych akceptorów chinonowych. Ostatnio rozważa się możliwość udziału singletowego tlenu w reakcjach prowadzących do rozpadu białka D1 [10].

Należy przypuszczać, że w centrach reakcji niezawierających akceptorów chinonowych dochodzi do rekombinacji pary rodnikowej  $P_{680}^+ \text{Pheo}^-$  z wytworzeniem tripletowego stanu chlorofilu  $P_{680}$ , który jest następnie wygaszany w interakcji z  $O_2$  [10]. Sugeruje się, że powstający w ten sposób singletowy tlen bierze udział we wtórnych procesach fotoinhibicji. Wykazano bowiem, że destrukcja cząsteczek chlorofilu  $P_{680}$  spowodowana przez singletowy tlen poprzedza degradację białka D1 w nadmiernie oświetlanych wyizolowanych centrach reakcji.

Badania Styringa i wsp. [60] ujawniły, że fotoinhibicji towarzyszą konformacyjne zmiany centrum reakcji PSII, a dowodem na to jest przekształcanie formy cytochromu b-559 o wysokim potencjale do formy o niskim potencjale (rys. 4C). Zmiany potencjału cytochromu



Rys. 4. Schemat przebiegu fotoinhibicji wg Strynga i wsp. [60]: Z, P<sub>680</sub>, Q<sub>A</sub>, Q<sub>B</sub> – przenośniki elektronów w PSII; Mn, Mn<sup>+</sup>, Mn<sup>2+</sup> – równoważniki utleniające kompleksu manganowego; Chl – monomeryczny chlorofil centrum reakcji PSII; cyt b<sub>559,WP</sub> (cyt b<sub>559,NP</sub>) – forma cytochromu b-559 o wysokim (niskim) potencjale

b-559 w początkowej fazie fotoinhibicji mogą ponadto świadczyć o tym, że cykliczny transport elektronów w PSII ma ograniczoną zdolność ochrony centrum reakcji przed szkodliwym działaniem światła.

### 3.3. UDZIAŁ Q<sub>A</sub> I Q<sub>B</sub> W HAMOWANIU AKTYWNOŚCI FOTOCHEMICZNEJ PSII

Koncepcja, wg której Q<sub>B</sub> jest pierwotnym miejscem hamowania aktywności transportu elektronów, jest atrakcyjna, ponieważ łączy hamowanie aktywności z uszkodzeniem białka D1, które jak wiadomo ulega szybkiej wymianie na świetle. Z drugiej strony trudno jest wyjaśnić mechanizm fotoinhibicji z udziałem rodników semichinonowych i chinonowych ze względu na krótki czas trwania podwójnie zredukowanego Q<sub>B</sub> w białku D1 [66] a także ze względu na to, że znaczna część centrów reakcji roślin zaadaptowanych do ciemności zawiera Q<sub>B</sub><sup>-</sup> [3, 66], co nie pociąga za sobą uszkodzenia PSII. Nie można jednak zlekceważyć danych potwierdzających tę koncepcję [38, 49].

Wyniki pomiarów termoluminescencji (analogicznie do uprzednio przeprowadzonych w badaniach fotoinhibicji u *Chlamydomonas* [4, 44]) oraz opóźnionej luminescencji w inaktywowanych przez światło wyizolowanych błonach tylakoidów wykazały równoległe obniżenie się zdolności do redukcji Q<sub>A</sub> i Q<sub>B</sub> w trakcie fotoinhibicji, co może być interpretowane albo jako zakłócenie reakcji przeniesienia elektronu na Q<sub>A</sub>, albo też jako jednoczesne hamowanie aktywności na poziomie Q<sub>A</sub> i Q<sub>B</sub> [65]. Ponadto badania przeprowadzone na błonach tylakoidów wykazały, że fotoinhibicji wywołanej w temp. 20°C towarzyszy zmniejszenie zarówno



zależnej, jak i niezależnej od  $Q_B$  aktywności transportu elektronów, natomiast w przypadku fotoinhibicji indukowanej w temp.  $0^\circ\text{C}$  znaczne zmiany aktywności dotyczyły tylko transportu elektronów z udziałem  $Q_B$  [49]. Z kolei wyniki kinetycznych badań uszkodzenia aktywności PSII w nienaruszonych komórkach glonów i tylakoidach roślin wyższych, zestawione przez Kyle [38], wskazują, że niezależnie od sposobu indukowania fotoinhibicji (in vivo/in vitro) utrata zależnej od  $Q_B$  aktywności transportu elektronów poprzedza utratę aktywności zależnej od  $Q_A$ .

Rozbieżności wyników badań nad miejscem hamowania aktywności fotochemicznej mogą być przynajmniej częściowo rezultatem sposobu wywoływania fotoinhibicji. Wiadomo bowiem, że poddawane działaniu światła wyizolowane błony tylakoidów pozbawione są funkcjonujących in vivo akceptorów elektronów [38, 44, 65] oraz układów usuwających wolne rodniki [44]. W związku z tym sugeruje się, że mechanizm fotoinhibicji izolowanych błon chloroplastów może być różny od tego, jaki występuje in vivo.

### 3.4. FOTAINHIBICJA W BŁONACH TYLAKOIDÓW Z NARUSZONYM KOMPLEKSEM UTLENIAJĄCYM $\text{H}_2\text{O}$

Badania wykazały, że preparaty błon tylakoidów z selektywnie uszkodzonym kompleksem rozszczepiającym  $\text{H}_2\text{O}$  są o wiele bardziej podatne na fotoinhibicję niż tylakoidy zdolne do utleniania wody [3, 19, 61, 71]. Okazało się ponadto, że modyfikacja kompleksu utleniającego  $\text{H}_2\text{O}$  implikuje specyficzny przebieg fotoinhibicji [3, 17, 19, 61, 71].

Wpływ światła na tylakoidy z uszkodzonym kompleksem rozszczepiającym  $\text{H}_2\text{O}$  przejawia się tym, że w porównaniu do prób kontrolnych, tj. inkubowanych w ciemności, oświetlane preparaty wykazują obniżoną aktywność transportu elektronów w obecności sztucznych akceptorów elektronów oraz donorów elektronów, takich jak DPC czy  $\text{MnCl}_2$  [61, 71]. Ponadto wykazano, że fotoinhibicji zmodyfikowanych fragmentów błon PSII towarzyszą zmiany kinetyki utleniania  $P_{680}$  w obecności DPC świadczące o znacznym hamowaniu redukcji  $P_{680}^+$  [19]. Na tej podstawie postuluje się, że fotoinhibicja tylakoidów z inaktywowanym kompleksem utleniającym  $\text{H}_2\text{O}$  polega na blokowaniu transportu elektronów między  $\text{Tyr}_z$  ( $Z$ ,  $Y_z$ ) a  $P_{680}$  [17, 19, 61]. Przypuszcza się, że zjawisko to jest związane z akumulacją silnie utleniających rodników, takich jak  $P_{680}^+$  i/lub  $\text{Tyr}_z^+$  [3, 19, 58, 66, 71].

Sugestie dotyczące mechanizmu hamowania transportu elektronów po stronie donorowej PSII pochodzą z badań, w których stosowano inhibitory transportu elektronów [61], sztuczne akceptory [19] lub donory [19, 71] elektronów podczas indukowania fotoinhibicji w zmodyfikowanych błonach tylakoidów. Stwierdzono, że DCIP (akceptor elektronów z PSII) nie chroni PSII przed fotoinhibicją [19], natomiast DCMU (inhibitor reakcji przeniesienia elektronu z  $Q_A^-$  do PQ) [61], jak również DPC lub  $\text{MnCl}_2$  [19] zmniejszają stopień uszkodzenia PSII. Ponadto wykazano, że ditionit - reduktor  $P_{680}^+$  pozwala na reaktywację fluorescencji zmniejszonej wskutek wywołanego światłem zablokowania transportu elektronów między  $Z$  ( $\text{Tyr}_z$ ) a  $P_{680}$  [61].

Początkowo sugerowano, że wywołana przez światło inaktywacja błon tylakoidów z naruszonym kompleksem utleniającym  $\text{H}_2\text{O}$  oraz fotoinhibicja są tym samym procesem [61]. Obecnie podkreśla się, że hamowanie aktywności fotochemicznej po stronie donorowej PSII jest jednym z możliwych mechanizmów fotoinhibicji [3]. Pogląd ten popierają wyniki badań przeprowadzonych na fragmentach błon PSII z aktywnym i selektywnie inaktywowanym kompleksem utleniającym  $\text{H}_2\text{O}$  [19]. Wykazano mianowicie występowanie dwóch miejsc w

PSII ulegających uszkodzeniu pod wpływem światła: I – między  $P_{680}$  a  $Q_A$  oraz II – między  $Y_z$  ( $Tyr_z$ ) a  $P_{680}$ . Przedstawiono również dane wskazujące na to, że w procesie fotoinhibicji preparatów zdolnych do wytwarzania  $O_2$  dominującą rolę odgrywa uszkodzenie między  $P_{680}$  a  $Q_A$ , natomiast w przypadku preparatów z uszkodzonym kompleksem utleniającym  $H_2O$  między  $Y_z$  a  $P_{680}$ .

### 3.5. CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA PRZEBIEG FOTONHIBICJI

Wyniki dotychczas przeprowadzonych badań ujawniły, że zjawisko fotoinhibicji nie może być scharakteryzowane przez wskazanie jednego, określonego miejsca w centrum reakcji PSII, od którego rozpoczyna się proces hamowania aktywności fotochemicznej, ani też opisane jako jeden mechanizm [3, 19].

Przebieg fotoinhibicji w wyizolowanych błonach tylakoidów może być inny niż w nienaruszonych liściach czy komórkach glonów [38, 44, 65]. Ponadto udział poszczególnych mechanizmów w procesie inaktywacji II układu fotosyntezy może zależeć od intensywności i czasu oświetlenia [19], a także od stężenia  $O_2$  [17, 31, 45]. Uwzględniając dane dotyczące tzw. aerobowej i anaerobowej fotoinhibicji należy oczekiwać, że sposób oddziaływania  $O_2$  na przebieg fotoinhibicji może zależeć zarówno od rodzaju badanego materiału (liście, nienaruszone chloroplasty, błony tylakoidów), jak i od równoczesnej obecności  $CO_2$ .

Kolejność zjawisk podczas fotoinhibicji jest również uwarunkowana stanem funkcjonalnym PSII, co w wypadku badań *in vitro* oznacza, że jakość preparatu może mieć wpływ na uzyskane wyniki [19]. Natomiast rozpatrując fotoinhibicję w warunkach naturalnych należałoby uwzględnić dodatkowo heterogenność kompleksu PSII [3, 33, 46] oraz warunków świetlnych [13, 19, 33, 38] w komórce i liściu. Poza tym inne niż światło czynniki środowiskowe mogą determinować przebieg fotoinhibicji. I tak w warunkach stresu niskiej czy wysokiej temperatury, które powodują uszkodzenie kompleksu utleniającego  $H_2O$ , przebieg fotoinhibicji może być zdominowany przez mechanizm opisany dla błon tylakoidów pozbawionych zdolności utleniania  $H_2O$  [61].

## 4. DEGRADACJA BIAŁKA D1

Dotychczas uzyskane wyniki sugerują występowanie dwóch mechanizmów uszkodzenia białka a zarazem wywoływania jego degradacji [3]. Jeden z nich związany jest z nadmierną redukcją akceptorowej strony PSII oraz reakcjami z udziałem rodników tlenowych lub hydroksylowych, drugi natomiast z obecnością rodników utleniających, takich jak  $Tyr_z^+$  lub  $P_{680}^+$  po donorowej stronie PSII. Badania nad fotoinhibicją wywoływaną *in vivo* [29, 44] potwierdziły wcześniejsze przypuszczenia, że modyfikacja białka D1 poprzedza jego rozpad, jednakże problemem otwartym pozostaje nadal to, w jaki sposób uszkodzenie białka indukuje procesy degradacji [3, 66].

Degradacja białka D1 jest procesem zależnym od temperatury [3, 5, 15, 46, 49]. Wskazują na to m.in. wyniki badań *in vitro* nad mechanizmem fotoinhibicji indukowanej w 20°C oraz 0°C lub 2°C [5, 49]. Światło wywoływało degradację białka D1 tylko wtedy, gdy preparaty oświetlano w 20°C. Okazało się jednak, że podwyższenie temperatury inkubacji błon tylakoidów uprzednio poddawanych nadmiernemu oświetleniu w temp. 2°C stymuluje degradację

białka i to w sposób niezależny od światła [5]. Dane te świadczą o enzymatycznym charakterze degradacji białka D1 [3, 5].

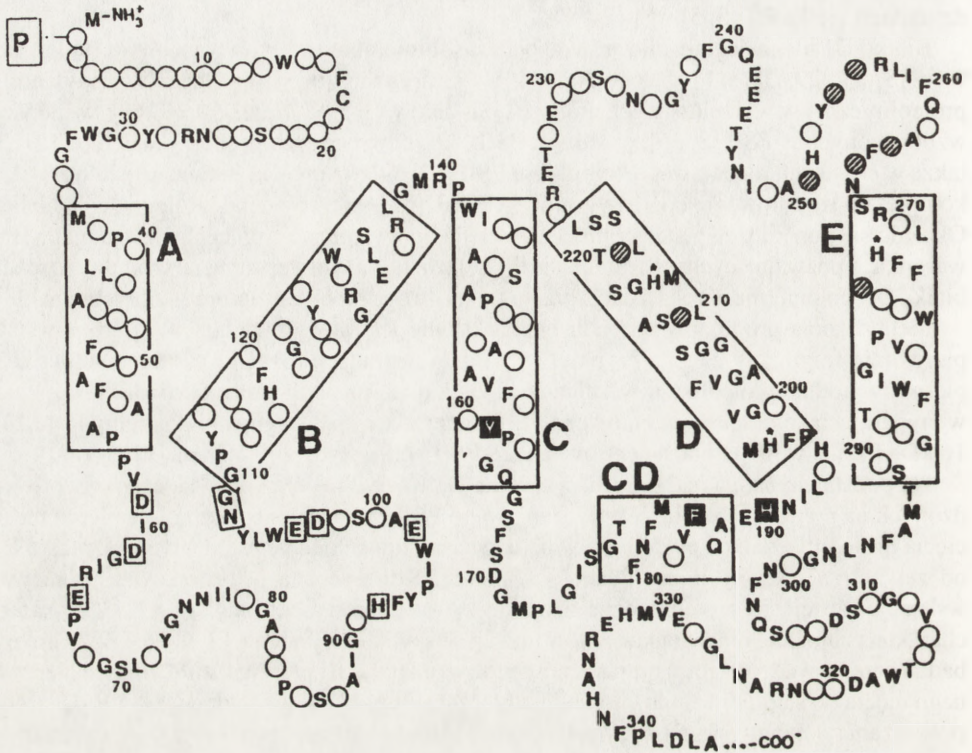
Białko D1 ulega degradacji zarówno podczas fotoinhibicji wywoływanej w warunkach *in vivo* [3, 17, 29, 38, 44, 55, 66, 70], jak i w warunkach *in vitro*. Obecność aktywności proteolitycznej w wyizolowanych błonach tylakoidów [3, 5, 8, 27, 49, 50, 67, 68], w błonach wzbogaconych w PSII [3, 35], cząstkach PSII [42], odwróconych pęcherzykach błon [27], a także w cząstkach rdzeniowego kompleksu PSII [52, 69] przemawia za tym, że jedno z białek kompleksu rdzeniowego PSII, być może CP 43 [52], bierze udział w degradacji białka. Okazało się ponadto, że podczas silnego oświetlenia wyizolowanych centrów reakcji PSII w warunkach pozwalających na akumulację  $P_{680}^+$  powstają charakterystyczne produkty rozpadu białka D1, co sugeruje, że degradacja białka D1 może być procesem autoproteolitycznym [58].

Identyfikacja produktów rozpadu białka D1 nie jest łatwym zadaniem, gdyż powstałe pierwotnie fragmenty ulegają szybkiej i wydajnej degradacji [3]. Udało się jednak wykryć pierwszy produkt proteolizy w warunkach *in vivo*, tj. polipeptyd o m.c. 23,5 kDa [3]. Z kolei w preparatach kompleksu rdzeniowego PSII zidentyfikowano fragmenty polipeptydowe 23 i 16 kDa [52], a w preparatach centrów reakcji PSII polipeptydy 24 i 10 kDa [9].

Na podstawie badań nad degradacją białka D1 *in vivo* [3] oraz doświadczeń przeprowadzonych na preparatach kompleksu rdzeniowego PSII [52] ustalono, że miejsce pierwotnego cięcia proteolitycznego znajduje się w pętli łączącej transbłonowe segmenty D i E białka D1 od zewnętrznej strony błony tylakoidu (rys. 5). Koncepcja ta jest atrakcyjna, ponieważ wskazuje, że cięcie proteolityczne znajduje się w pobliżu sekwencji PEST [3, 9], która charakteryzuje inne białka eukariontów ulegające szybkiej wymianie [3, 9, 58, 66]. Z kolei z badań przeprowadzonych na preparatach centrów reakcji PSII [9] wynika, że miejsce pierwotnego cięcia występuje w hydrofilowej pętli łączącej transbłonowe segmenty A i B od strony przestrzeni tylakoidu (rys. 5). Przypuszcza się, że przebieg degradacji białka D1 może zależeć od tego, czy proces ten jest wywołany przez zjawiska po akceptorowej czy też po donorowej stronie PSII [10, 52]. Rozbieżności wyników badań mogłyby być również wyjaśnione przyjmując, że dwie proteazy biorą udział w degradacji białka [52].

Kwestią nierozstrzygniętą pozostaje rola  $O_2$  w procesie degradacji białka D1. Badania nad fotoinhibicją wywołowaną w cząstkach PSII [35] oraz w wyizolowanych błonach tylakoidów [8] w środowisku aerobowym lub anaerobowym wskazują, że obecność tlenu cząsteczkowego jest niezbędna [35] albo sprzyja [8] procesowi degradacji białka. Z kolei z doświadczeń, w których wprowadzono do preparatów błon tylakoidów systemy usuwające rodniki tlenowe lub wytwarzające rodniki hydroksylowe wynika, że aktywne formy tlenu biorą udział w rozpadzie białka D1 [50]. Odmienne wnioski pochodzą z badań degradacji białka D1 w inaktywowanych przez światło preparatach centrów reakcji PSII [58]. W tym wypadku wykazano, że obecność  $O_2$  nie ma wpływu na rodzaj powstających produktów degradacji. Natomiast w pracy dotyczącej C-końcowych produktów degradacji białka przedstawiono dane wskazujące, że pierwszy etap procesu degradacji jest niezależny, natomiast drugi zależy od obecności  $O_2$  [8]. Ponadto wykazano, że rodniki tlenowe są odpowiedzialne za pełny rozpad białka D1. Sugeruje się, że wywołana przez rodniki tlenowe degradacja białka D1 może pełnić funkcję "bezpiecznika", ponieważ proces ten zapobiegałby dalszemu wytwarzaniu aktywnych form tlenu a przez to rozprzestrzenianiu się uszkodzenia w błonie tylakoidu [50].

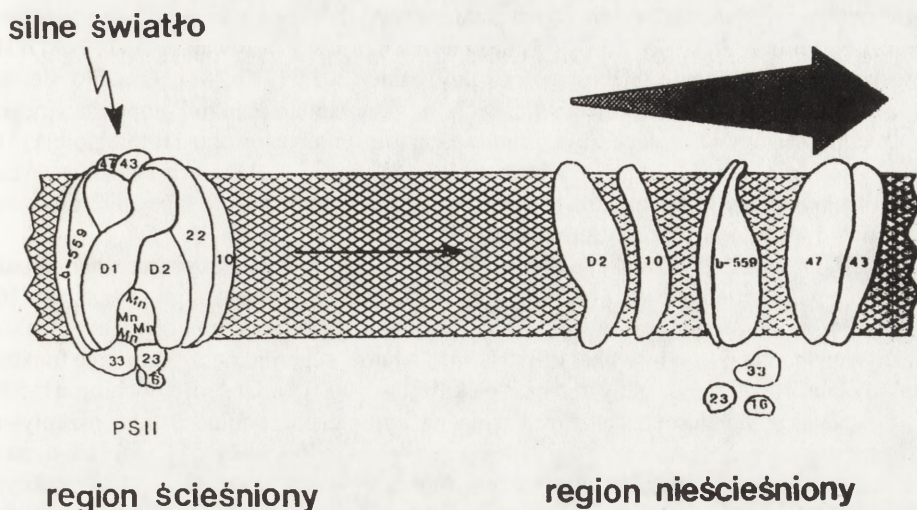
Białko D2 tworzące razem z białkiem D1 apoproteinę centrum reakcji PSII również ulega wymianie (*in vivo*) i degradacji (*in vitro*) pod wpływem światła, jednakże przemiany tego białka są o wiele wolniejsze niż w przypadku białka D1 [3, 58, 66-68]. Badania nad



Rys. 5. Model struktury białka D1 [3]; reszty aminokwasowe reprezentowane są przez "o" lub przez symbole 1-literowe; zakreślone fragmenty polipeptydowe, oznaczone: A, B, C, D, E, CD mają strukturę  $\alpha$ -helisy, przy czym odcinki A-E tworzą segmenty transbłonowe białka, a odcinek helikalny CD przebiega w przybliżeniu równoległe do płaszczyzny błony oraz znajduje się w pętli łączącej helisy C i D

fotoinhibicją w wyizolowanych centrach reakcji PSII wskazują, że proces degradacji białka D2, podobnie jak białka D1, może mieć charakter autoproteolityczny [58].

Mając na uwadze strukturalną i funkcjonalną rolę białka D1 w PSII należy oczekiwać, że jego degradacja nie pozostaje bez wpływu na organizację całego kompleksu. Badania fotoinhibicji indukowanej w wyizolowanych błonach tylakoidów wykazały, że degradacja białka D1 jest skorelowana z uwalnianiem jonów Mn z błon tylakoidów (4 jony Mn/1 cząsteczkę zdegradowanego białka D1) [27, 67, 68]. Procesowi temu towarzyszy także uwalnianie peryferycznych białek PSII – 33, 23 i 16 kDa do wewnętrznej przestrzeni tylakoidu [27]. Z kolei subfrakcjonowanie błon tylakoidów poddawanych uprzednio działaniu światła ujawniło obniżenie poziomu białka D1 w regionach ścięśnionych oraz wzrost ilości niektórych białek kompleksu rdzeniowego PSII w lamelach stromy, przy czym okazało się, że zmiany poziomu poszczególnych podjednostek w regionach nieścięśnionych nie są jednakowe [27]. Na podstawie tych danych zaproponowano [3, 27], że degradacja białka D1 w  $\alpha$ -centrach PSII powoduje częściowy rozpad rdzeniowego kompleksu PSII, a następnie indywidualną migrację niektórych podjednostek kompleksu do nieścięśnionego regionu błon tylakoidów (rys. 6). Na



Rys. 6. Rozpad PSII i lateralna migracja polipeptydów po degradacji białka D1 [27]: liczby odpowiadają masom cząsteczkowym poszczególnych podjednostek białkowych (w kDa); b-559 – cytochrom b-559

podstawie badań nad fotoinhibicją wywołaną w komórkach *Chlamydomonas reinhardtii* [1] oraz liściach dyni [29] również sugeruje się występowanie migracji między regionami błon tylakoidów, tym razem jednak zjawisko to miałyby dotyczyć kompleksu rdzeniowego PSII ze zmienionym pod wpływem światła białkiem D1. Tak więc obie przedstawione koncepcje uznają odmienne regiony błon tylakoidów za miejsca, w których dochodzi do degradacji białka. Natomiast badania nad lokalizacją C-końcowych produktów degradacji białka D1 wskazują, że białko to jest częściowo degradowane w ścięśnionych regionach gran, po czym powstałe polipeptydy przemieszczają się do nieścięśnionych regionów, gdzie są dalej metabolizowane [8].

Przypuszcza się, że lateralny ruch podjednostek PSII ze ścięśnionych do nieścięśnionych regionów błon tylakoidów jest elementem cyklu naprawiającego uszkodzenia PSII wywołane działaniem silnego światła [3, 27]. Wiadomo bowiem, że prekursor białka D1 o m.c. 33,5 kDa – produkt chloroplastowego genu *psbA* – jest włączany w błony lameli, gdzie ulega przekształceniu w formę dojrzałą [3, 38]. Sugeruje się ponadto, że w chloroplastach występuje szybszy mechanizm wymiany uszkodzonych przez światło centrów reakcji PSII [3, 27]. Polegałby on na przemieszczaniu się nieuszkodzonych  $\beta$ -centrów PSII do ścięśnionych regionów błon i przejmowaniu przez nie funkcji nieaktywnych  $\alpha$ -centrów.

## 5. MECHANIZMY OBRONY ROŚLIN PRZED FOTAINHIBICJĄ

Przy natężeniu światła nie dużo wyższym od nasycającego fotosyntezę wydajność kwantowa wiązania  $\text{CO}_2$  jest niska, a mimo tego nie obserwuje się u roślin objawów fotoinhibicji [31]. Można więc przypuszczać, że istnieją mechanizmy zapobiegające powstawaniu w

centrach reakcji stanu "nadmiernego wzbudzenia" (s. 45). Obecnie wiadomo, że ochronę centrów reakcji przed uszkodzeniem zapewniają procesy, dzięki którym energia wzbudzenia ulega rozproszeniu [17, 31, 45, 48, 70]. Należą do nich procesy zużywające ATP, NADPH, tj. fotosyntetyczne wiązanie  $\text{CO}_2$  oraz fotooddychanie [17, 31, 45, 48]. Okazało się, że minimalna aktywność przemian metabolicznych, tj. na poziomie punktu kompensacyjnego, jest niezbędna, ale i wystarczająca, aby chronić aparat fotosyntetyczny przed fotoinhibicją [31, 45, 48]. Wiadomo jednak, że przy nasycających fotosyntezę natężeniach światła zużycie energii fotochemicznej w procesach metabolicznych jest zbyt niskie, aby zapewnić całkowitą ochronę przed szkodliwym działaniem światła [31, 45].

Redukcja  $\text{O}_2$  przez PSI (reakcja Mehlera) przy sprawnie działających mechanizmach usuwających rodniki tlenowe jest korzystnym sposobem rozpraszania energii wzbudzenia [6, 31, 48, 70], ponieważ stymuluje niecykliczny transport elektronów i prawdopodobnie także cykliczny transport elektronów wokół PSI [31, 45]. Ostatnio sugeruje się, że ochronną funkcję mógłby spełniać również cykliczny transport elektronów w PSII z udziałem cytochromu b-559 [38, 58], jednakże niektóre badania wskazują na ograniczoną zdolność tego przepływu elektronów do ochrony centrum reakcji przed uszkodzeniem [60, 68, s. 51]. Obecnie uznaje się, że największa ilość energii świetlnej zaabsorbowanej w nadmiarze ulega niedestrukcyj-nemu rozproszeniu w kompleksach antenowych głównie w postaci ciepła, ale także fluorescencji [31, 70]. Wzrost termicznego rozpraszania energii w antenach pod wpływem nadmiernego oświetlenia jest związany z ultrastrukturalnymi zmianami w błonach tylakoidów, które towarzyszą budowaniu gradientu  $\text{H}^+$  w poprzek błony tylakoidów [31, 70].

Intensywne oświetlenie sprzyja tworzeniu aktywnych form tlenu ( $\text{O}_2^-$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), które biorą udział w reakcjach oksydacyjnych [6, 45], a być może także w procesie fotoinhibicji (s. 49 i 55). Jednakże chloroplasty zawierają przeciwutleniacze (karotenoidy, glutation, askorbinian) oraz układy enzymatyczne (dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza) usuwające szkodliwe rodniki [48], a pośrednie dowody wskazują na dużą sprawność działania tych mechanizmów [31].

Rośliny reagują na wzrost natężenia światła zmniejszeniem oświetlanej powierzchni, czemu służą ruchy liści i chloroplastów [6, 48]. Zdolność przystosowania roślin do zmiennego natężenia światła jest także związana z dynamicznymi właściwościami błon tylakoidów [2, 3, 20, 31]. Szybkie zmiany intensywności światła uruchamiają mechanizm regulacji rozdziału energii wzbudzenia między PSI i PSII, w którym biorą udział reakcje fosforylacji/defosforylacji zewnętrznej puli LHCII i jej migracja między układami fotosyntezy [3, 20, 31]. W przypadku silnego oświetlenia fosforylacja LHCII powoduje wzrost przekazywania energii wzbudzenia na korzyść I układu fotosyntezy, który jest mniej wrażliwy na nadmierne oświetlenie niż PSII. Z kolei długotrwałe zmiany warunków świetlnych wywołują u roślin procesy adaptacyjne polegające na zmianie składu, organizacji i struktury błon tylakoidów [3].

Mechanizmy chroniące rośliny przed fotoinhibicją nie są w pełni efektywne, dlatego też aktywność układu wymieniającego uszkodzone na nowo zsyntetyzowane białko D1 odgrywa ważną rolę w utrzymaniu aktywności fotosyntetycznej roślin [2, 3]. Wymiana białka D1 zachodzi z szybkością proporcjonalną do natężenia światła, natomiast zjawisko poprzedzające proces wymiany, tj. inaktywacja PSII, może być obserwowane dopiero przy intensywnościach światła przekraczających pewną graniczną wartość [44]. Odmienna zależność tych dwóch ściśle ze sobą sprzężonych zjawisk od intensywności światła jest prawdopodobnie pozorna i wynika z ograniczonej zdolności wykrywania pierwotnych zjawisk fotoinhibicji w niewielkiej

frakcji centrów reakcji ulegających uszkodzeniu i reaktywacji przy niższych od progowego natężeniach światła.

Biorąc pod uwagę zdolność roślin do obrony przed szkodliwym działaniem światła można przypuszczać, że fizjologiczny objaw fotoinhibicji, tj. obniżenie aktywności fotosyntetycznej wystąpi wtedy, gdy spełnione będą następujące warunki:

1. Szybkość zmian natężenia światła przekracza szybkość aklimatyzacji [2].
2. Nadmiar energii wzbudzenia w stosunku do tej, która może być wykorzystana w procesach biochemicznych [31, 37, 38, 45] i "bezpiecznie rozproszona" [31, 48].
3. Szybkość inaktywowania PSII (uszkodzenia białka D1) przekracza szybkość jego reaktywacji (wymiany białka D1) [31, 37, 38].

## 6. PODATNOŚĆ ROŚLIN NA FOTOINHIBICJE

W warunkach naturalnych występują dzienne i sezonowe zmiany natężenia światła [2], a pojawiające się wysokie jego poziomy mogą powodować fotoinhibicję roślin [48]. Wiadomo, że podatność na działanie silnego światła jest zdeterminowana genetycznie, a ponadto zależy od przystosowania roślin do wzrostu w określonych warunkach świetlnych [2, 3, 45, 48]. Rośliny rosnące przy słabym oświetleniu ulegają silniejszej fotoinhibicji pod wpływem nagłego wzrostu natężenia światła niż rośliny rosnące w pełnym oświetleniu słonecznym [2, 3, 45, 48]. Rośliny te wyposażone są bowiem w bardziej rozbudowane układy zbierające światło [2, 3, 45], a przy tym często wykazują niższą aktywność ciemniowych procesów fotosyntezy [45, 70]. Ponadto niewielki udział regionów niecieńnionych w budowie błon tylakoidów roślin zaadaptowanych do warunków cienia może utrudniać proces reaktywacji angażujący przemieszczanie się białek między różnymi regionami błon [29]. Wiadomo, że gatunki ceniolubne są bardziej wrażliwe na działanie silnego oświetlenia w porównaniu ze światłolubnymi, co związane jest zarówno ze strukturą aparatu fotosyntetycznego [2, 3], jak i ograniczoną zdolnością adaptacji tych roślin do warunków pełnego oświetlenia [48].

Rośliny często są narażone na równoczesne działanie stresu świetlnego oraz innych stresów środowiskowych [14, 40, 46, 48, 57]. Wykazano, że światło i takie czynniki, jak: chłód [17, 21, 25, 45–48, 63], mróz [45, 46], wysoka temperatura [40, 48], susza [14, 48], zasolenie gleby [57] czy niedobór  $\text{CO}_2$  ( $\text{O}_2$ ) w atmosferze [31, 45, 48], działają synergistycznie w procesie fotoinhibicji. Tak więc w obecności dodatkowanego czynnika stresowego intensywność światła potrzebna do wywołania fotoinhibicji jest niższa niż w jego nieobecności [17, 38], a pojawienie się niekorzystnych warunków środowiskowych przy danej intensywności światła zwiększa jego szkodliwe działanie [40].

Oświetlaniu roślin w niskiej temperaturze towarzyszy hamowanie transportu elektronów między I i II układem fotosyntezy [63], zaburzenie mechanizmów aktywacji fruktozo-1,6-bisfosfatazy [53]. W warunkach niskiej [38, 46] lub wysokiej [40] temperatury można spodziewać się obniżenia aktywności enzymów lub ich inaktywacji. Z kolei stres suszy powoduje konformacyjne zmiany kompleksu syntetazy ATP [14, 38] oraz zamknięcie aparatów szparkowych [14, 38, 40, 48]. Przedstawione zjawiska prowadzą do hamowania procesów wykorzystujących energię wzbudzenia, tj. asymilacji  $\text{CO}_2$  i fotooddychania, a przez to stwarzają warunki do wystąpienia fotoinhibicji [14, 40, 45, 46]. Ponadto czynniki stresowe mogą sprzyjać fotoinhibicji wywierając wpływ na działanie mechanizmów zapobiegających temu

procesowi. Wiadomo np., że niska temperatura powoduje obniżenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy [46], jak również zmniejsza płynność błony, przez co ogranicza szybkość migracji ufosforylowanego LHCII [3].

Warunki stresowe obniżają szybkość procesu naprawy uszkodzeń wywołanych przez światło, co w przypadku niskiej temperatury może być wynikiem zarówno hamowania degradacji i usuwania uszkodzonego białka D1 [5, 46], jak i syntezy [17, 46] oraz włączania nowo zsyntetyzowanego białka do lameli stromy [46]. Ograniczenie szybkości procesu reaktywacji w niskiej temperaturze może być również efektem zmniejszenia płynności błony [5, 38, 46].

Rośliny różnią się pod względem podatności na fotoinhibicję w warunkach stresowych [14, 25, 46]. Wykazano, że gatunki chłodoodporne lub rośliny poddawane hartowaniu są mniej wrażliwe na działanie światła w niskiej temperaturze niż gatunki chłodowrażliwe czy rośliny niehartowane [25, 39, 46, 59]. Stwierdzono jednak, że podatność na fotoinhibicję w niskiej temperaturze nie jest bezpośrednio związana z wrażliwością na chłód [25].

Przyjmuje się, że głównym miejscem szkodliwego oddziaływania światła w warunkach stresowych jest II układ fotosyntezy [25, 45, 46, 48, 57, 59, 63], co potwierdzają wyniki badań nad działaniem światła w niskiej temperaturze [25, 46, 59, 63]. Nie jest to jednak regułą, bowiem niektóre badania wykluczają uszkodzenie PSII jako przyczynę obniżenia aktywności fotosyntetycznej roślin chłodowrażliwych pod wpływem działania światła o umiarkowanym natężeniu w niskiej temperaturze [26].

Wzrost intensywności światła w warunkach polowych, szczególnie kiedy towarzyszą mu niekorzystne czynniki środowiskowe, takie jak niska temperatura, może powodować zmniejszenie szybkości fotosyntezy, a w konsekwencji obniżenie plonów [38, 48]. Ze względu jednak na to, że dodatkowe czynniki stresowe mają również bezpośredni wpływ na fotosyntezę trudno jest ocenić, w jakim stopniu fotoinhibicja przyczynia się do obniżenia produktywności [38, 48].

## PODZIĘKOWANIE

Pragnę podziękować Prof. Zbigniewowi Kaniudze za zachęcenie mnie do napisania niniejszej pracy oraz pomoc w jej przygotowaniu.

## LITERATURA

- [1] ADIR N, SHOCHAT S, OHADI I. Light-dependent D1 protein synthesis and translocation is regulated by reaction center II. *J Biol Chem* 1990; **265**: 12563–12568.
- [2] ANDERSON JM, OSMOND CB. Sun-shade responses: compromises between acclimation and photoinhibition. [w] Barber J. [red.] *Topics in Photosynthesis*, t.9. Amsterdam, New York, Oxford, Elsevier 1987: 1–38.
- [3] ANDERSSON B, STYRING S. Photosystem II: Molecular organization, function, and acclimation. [w] Lee CP, [red.] *Current Topics in Bioenergetics* t. 16. New York, Academic Press 1991: 2–81.
- [4] ARNTZ B, TREBST A. On the role of the  $Q_B$  protein of PSII in photoinhibition. *FEBS Lett* 1986; **194**: 43–49.
- [5] ARO E-M, HUNDAL T, CARLBERG I, ANDERSSON B. In vitro studies on light-induced inhibition of PSII and D1-protein degradation at low temperatures. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1019**: 269–275.
- [6] ASADA K, TAKSAHASHI M. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. [w] Barber J. [red.] *Topics in Photosynthesis*, t.9. Amsterdam, New York, Oxford, Elsevier 1987: 227–287.
- [7] BAKER NR, HORTON P. Chlorophyll fluorescence quenching during photoinhibition. [w] Barber J. [red.] *Topics in Photosynthesis*, t.9. Amsterdam, New York, Oxford, Elsevier 1987: 145–167.



- [8] BARBATO R, FRISO G, GIARDI MT, RIGONI F, GIACOMETT GM. Breakdown of the photosystem II reaction center D1 protein under photoinhibitory conditions: Identification and localisation of the C-terminal degradation products. *Biochemistry* 1991; **30**: 10220–10226.
- [9] BARBATO R, SHIPTON CA, GIACOMETT GM, BARBER J. New evidence suggests that the initial photoinduced cleavage of the D1-protein may not occur near the PEST sequence. *FEBS Lett* 1991; **290**: 162–166.
- [10] BARBER J, ANDERSSON B. Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *TIBS* 1992; **17**: 61–66.
- [11] BJÖRKMÄN O. Lowtemperature chlorophyll fluorescence in leaves and its relation to photon yield of photosynthesis in photoinhibition. [w] Barber J. [red.] Topics in Photosynthesis. t.9. Amsterdam, New York, Oxford Elsevier 1987: 123–144.
- [12] BÖGER P. Replacement of photosynthetic electron transport inhibitors by silicomolybdate. *Physiol Plant* 1982; **54**: 221–224.
- [13] BONGI G, LORETO F. In broad leaved evergreens variations in Fv/Fm induced by photoinhibition are coupled to reductions in PSII RC unit size. [w] Barber J, Malkin R. [red.] Techniques and New Developments in Photosynthesis Research. New York, London. Plenum Press 1989: 555–559.
- [14] BOYER JS, ARMOND PA, SHARP RE. Light stress and leaf water relations. [w] Barber J. [red.] Topics in Photosynthesis, t.9. Amsterdam, New York, Oxford. Elsevier 1987: 111–222.
- [15] CHOW WS, OSMOND CB, KUANG LK. Photosystem II function and herbicide binding sites during photoinhibition of spinach chloroplasts in-vivo and in-vitro. *Photosynth Res* 1989; **21**: 17–26.
- [16] CLELAND RE, CRITCHLEY C. Studies on the mechanism of photoinhibition in higher plants II. Inactivation by high light of photosystem II reaction center function in isolated spinach thylakoids and O<sub>2</sub> evolving particles. *Photobiochem Photobiophys* 1985; **10**: 83–92.
- [17] CRITCHLEY C. The molecular mechanism of photoinhibition – facts and fiction. *Aust J Plant Physiol* 1988; **15**: 27–41.
- [18] DEMETER S, NEALE PJ, MELIS A. Photoinhibition: Impairment of the primary charge separation between P-680 and pheophytin in photosystem II of chloroplasts. *FEBS Lett* 1987; **214**: 370–374.
- [19] ECKERT H-J, GEIKEN B, BERNARDING J, NAPIWOTZKI A, EICHLER H-J, RENGER G. Two sites of photoinhibition of electron transfer in oxygen evolving and Tris-treated PSII membrane fragments from spinach. *Photosynth Res* 1991; **27**: 97–108.
- [20] GEMEL J. Rola fosforylacji i defosforylacji białek w regulacji aktywności metabolicznej chloroplastów. *Post Biochem* 1987; **33**: 7–28.
- [21] GONG H, NILSEN S. Effect of temperature on photoinhibition of photosynthesis, recover, and turnover of the 32 kD chloroplast protein in Lemna gibba. *J Plant Physiol* 1989; **135**: 9–14.
- [22] GRAANT T. The interaction of silicomolybdate with photosystem II herbicide-binding site. *FEBS Lett* 1986; **206**: 9–14.
- [23] GREER DH, BERRY JA, BJÖRKMÄN O. Photoinhibition of photosynthesis in intact bean leaves: role of light and temperature, and requirement for chloroplast-protein synthesis during recovery. *Planta* 1986; **168**: 253–260.
- [24] HAVAUX M, EYLETTERS M. Is the in vivo photosystem I function resistant to photoinhibition? An answer from photoacoustic and far-red absorbance measurements in intact leaves. *Z Naturforsch* 1991; **46c**: 1038–1044.
- [25] HETHERINGTON SE, HE J, SMILLER M. Photoinhibition at low temperature in chilling-sensitive and -resistant plants. *Plant Physiol* 1989; **90**: 1609–1615.
- [26] HODGSON RAJ, RAISON JK. Inhibition of photosynthesis by chilling in moderate light: a comparison of plant sensitive and insensitive to chilling. *Planta* 1989; **178**: 545–552.
- [27] HUNDAL T, VIRGIN I, STYRING S, ANDERSSON B. Changes in organisation of photosystem II following light-induced D1-protein degradation. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1017**: 235–241.
- [28] JONES LW, KOK B. Photoinhibition of chloroplast reaction I. Kinetics and action spectra. *Plant Physiol* 1966; **41**: 1037–1043.
- [29] KETTUNEN R, TYYSTJÄRVIE, ARO E-M. D1 protein degradation during photoinhibition of intact leaves. A modification of the D1 protein precedes degradation. *FEBS Lett* 1991; **290**: 153–156.
- [30] KLIMOV VV, DOLAN E, KE B. EPR properties of an intermediary electron acceptor (pheophytin) in photosystem-II reaction centers at cryogenic temperatures. *FEBS Lett* 1980; **112**: 97–100.
- [31] KRAUSE GH, CORNIC G. CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> interaction in photoinhibition. [w] Barber J [red.] Topics in Photosynthesis, t.9. Amsterdam, New York, Oxford, Elsevier 1987: 169–196.
- [32] KRAUSE GH, SOMERSALO S. Fluorescence as a tool in photosynthesis research: application in studies of photoinhibition, cold acclimation and freezing stress. *Phil Trans R Soc Lond B* 1989; **323**: 281–293.

- [33] KRAUSE GH, SOMERSALOS, ZUMBUSH E, WEYERS B, LAASCH H. On the mechanism of photoinhibition in chloroplasts. Relationship between changes in fluorescence and activity of photosystem II. *J Plant Physiol* 1990; **136**: 472–479.
- [34] KRAUSE GH. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1991; **42**: 313–349.
- [35] KUHN M, BÖGER P. Studies on the light-induced loss of D1 protein in photosystem-II membrane fragments. *Photosynth Res* 1990; **23**: 291–296.
- [36] KYLE DJ, OHAD I, ARNTZEN CJ. Membrane protein damage and repair: Selective loss of a quinone-protein function in chloroplast membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 4070–4074.
- [37] KYLE DJ, OSMOND CB, ARNTZEN CJ. Preface. [w] Barber J [red.] Topics in photosynthesis, t.9. Amsterdam, New York, Oxford, Elsevier 1987.
- [38] KYLE DJ. The biochemical basis for photoinhibition of photosystem II. [w] Barber J [red.] Topics in Photosynthesis, t.9. Amsterdam, New York, Oxford, Elsevier 1987: 197–226.
- [39] LAPOINTE L, HUNER NPA, CARPENTIER R, OTTANDER C. Resistance to low temperature photoinhibition is not associated with isolated thylakoid membrane of winter rye. *Plant Physiol* 1991; **97**: 804–810.
- [40] LUDLOW MM. Light stress at high temperature. [w] Barber J [red.] Topics in Photosynthesis, t.9. Amsterdam, New York, Oxford, Elsevier 1987: 89–109.
- [41] MYERS J, BURR G. Studies on photosynthesis. Some effects of light of high intensity on *Chlorella*. *J Gen Physiol* 1940; **24**: 45–67.
- [42] NEDBAL L, MASOJIDEK J. Damaging processes in the reaction center and on its acceptor side during photoinactivation of PSII particles. [w] Barber J, Malkin R. [red.] Techniques and New Developments in Photosynthesis Research. New York, London, Plenum Press 1989: 539–542.
- [43] NEDBAL L, MASOJIDEK J, KOMENDA J, PRASIL O, SETLIK I. Three types of photosystem II photoinactivation 2. Slow processes. *Photosynth Res* 1990; **24**: 89–97.
- [44] OHAD I, ADIR N, KOIKE H, KYLE DJ, INOUE Y. Mechanism of photoinhibition in vivo. A reversible light-induced conformational change of reaction center II is related to an irreversible modification of D1 protein. *J Biol Chem* 199; **265**: 1972–1979.
- [45] OSMOND CB. Photorespiration and photoinhibition. Some implications for energetics of photosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 1981; **639**: 77–98.
- [46] ÖQUIST G, GREER H, ÖGREN E. Light stress at low temperature. [w] Barber J [red.] Topics in Photosynthesis, t.9. Amsterdam, New York, Oxford, Elsevier 1987: 67–87.
- [47] POWLES SB, BERRY JA, BJÖRKMAN O. Interaction between light and chilling temperature on inhibition of photosynthesis in chilling-sensitive plants. *Plant Cell Environ* 1983; **6**: 117–123.
- [48] POWLES SB. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annu Rev Physiol* 1984; **35**: 15–44.
- [49] RICHTER M, RÜHLE W, WILD A. Studies on the mechanism of photosystem II photoinhibition I. A two-step degradation of D1 protein. *Photosynth Res* 1990; **24**: 229–235.
- [50] RICHTER M, RÜHLE W, WILD A. Studies on the mechanism of photosystem II photoinhibition II. The involvement of toxic oxygen species. *Photosynth Res* 1990; **24**: 237–243.
- [51] RUTHERFORD AW, ZIMMERMAN J-L. A new EPR signal attributed to the primary plastosemiquinone acceptor in photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1984; **767**: 168–175.
- [52] SALTER AH, VIRGIN I, HAGMAN A, ANDERSSON B. On the molecular mechanism of light-induced D1 protein degradation in photosystem II core particles. *Biochemistry* 1992; **31**: 3990–3998.
- [53] SASSENATH GF, ORT DR, PORTIS AR. The primary limitation to photosynthesis following low temperature stress under high light. [w] Barber J, Malkin R [red.] Techniques and New Developments in Photosynthesis Research. New York, London, Plenum Press 1989: 561–565.
- [54] SCHREIBER U, BILGER W. Rapid assessment of stress effects on plant leaves by chlorophyll fluorescence measurements. Presented at Nato Advanced Research Workshop, Sesimbra, Portugal, October 1985.
- [55] SCHUSTER G, SHOCHAT S, ADIR N, OHAD I. Inactivation of photosystem II and turnover of the D1-protein by light and heat stress. [w] Barber J, Malkin R [red.] Techniques and New Developments in Photosynthesis Research. New York, London, Plenum Press 1989: 499–509.
- [56] SETLIK I, ALLAKVERDIEV SI, NEDBAL L, SETLIKOVA E, KLIMOV VV. Three types of photosystem II photoinactivation 1. Damaging processes on acceptor side. *Photosynth Res* 1990; **23**: 39–48.
- [57] SHARMA PK, HALL DO. The effect of salinity, photoinhibition and interaction of both on photosynthesis in barley. [w] Barber J, Malkin R [red.] Techniques and New Developments in Photosynthesis Research. New York, London, Plenum Press 1989: 571–577.

- [58] SHIPTON CA, BARBER J. Photoinduced degradation of the D1 polypeptide in isolated reaction centers of photosystem II: Evidence for an autoproteolytic process triggered by the oxidizing side of the photosystem. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 6691–6695.
- [59] SOMERSALO S, KRAUSE GH. Reversible photoinhibition of unhardened and cold-acclimated spinach leaves at chilling temperatures. *Planta* 1990; **180**: 181–187.
- [60] STYRING S, VIRGIN I, EHRENBERG A, ANDERSSON B. Strong light photoinhibition of electron transport in photosystem II. Impairment of the function of the first quinone acceptor,  $Q_A$ . *Biochim Biophys Acta* 1990; **1015**: 269–278.
- [61] THEG SM, FILAR LJ, DILLEY RA. Photoinactivation of chloroplasts already inhibited on the oxidizing side of photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1986; **849**: 104–111.
- [62] TREBST A. Lichtinaktivierung der  $O_2$  – Entwicklung in der Photosynthese. *Z Naturforsch Sect B* 1962; **17**: 660–663.
- [63] TYSTJÄRVI E, OVASKA J, ARO E-M, KARUNEN P. Comparison of chill-induced and room temperature photoinhibition. [w] Barber J, Malkin R [red.] *Techniques and New Developments in Photosynthesis Research*. New York, London, Plenum Press 1989: 567–570.
- [64] VAN MIEGHEM F, NITSHE W, MATHIS P, RUTHERFORD AW. The influence of the quinone-iron electron acceptor complex on the reaction centre photochemistry of photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1989; **977**: 207–214.
- [65] VASS I, MOHANTY N, DEMETER S. Photoinhibition of electron transport activity in isolated thylakoids studied by thermoluminescence and delayed luminescence. [w] Barber J, Malkin R [red.] *Techniques and New Development in Photosynthesis Research*. New York, London, Plenum Press 1989: 547–550.
- [66] VERMAAS W. The structure and function of photosystem II. [w] Barber J, Malkin R [red.] *Techniques and New Developments in Photosynthesis Research*. New York, London, Plenum Press 1989: 35–59.
- [67] VIRGIN I, STYRING S, ANDERSSON B. Photosystem II disorganisation and manganese release after photoinhibition of isolated spinach thylakoid membranes. *FEBS Lett* 1988; **233**: 408–412.
- [68] VIRGIN I, HUNDAL T, STYRING S, ANDERSSON B. Disassembly of photosystem II following photoinhibition. [w] Barber J, Malkin R [red.] *Techniques and New Developments in Photosynthesis Research*. New York, London, Plenum Press 1989: 535–538.
- [69] VIRGIN I, GHANOTAKIS DF, ANDERSSON B. Light-induced D1-protein degradation in isolated photosystem II core complexes. *FEBS Lett* 1990; **269**: 45–48.
- [70] WALKER D. Photoinhibition. [w] *The Use of the Oxygen Electrode and Fluorescence Probes in Simple Measurement of Photosynthesis*. Sheffield, Oxygraphics Limited 1990: 89–95.
- [71] WANG W, CHAPMAN DJ, BARBER J. Photoinhibition of reaction centre activity in photosystem two preparation with reduced of water oxidation. [w] Barber J, Malkin R [red.] *Techniques and New Developments in Photosynthesis Research*. New York, London, Plenum Press 1989: 543–546.

Otrzymano: 10.07.1992 r.

Przyjęto: 04.11.1992 r.

Adres autorki: 02-017 Warszawa, Al. Jerozolimskie 119A/86



## FRUKTOZO 2,6-BISFOSFORAN – EFEKTOR INTEGRUJĄCY METABOLIZM CUKRÓW I PIROFOSFORANU W PRZEDZIAŁACH SUBKOMÓRKOWYCH ROŚLIN

### FRUCTOSE 2,6-BISPHOSPHATE – EFFECTOR INTEGRATING CARBOHYDRATES AND PYROPHOSPHATE METABOLISM IN SUBCELLULAR COMPARTMENTS OF PLANTS

Stanisław KOWALCZYK

Zakład Biochemii, Instytut Biologii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń

*Streszczenie.* Nasza wiedza na temat metabolizmu cukrów w roślinach została w ostatnim dziesięcioleciu wzbogacona o trzy ważne odkrycia. Po pierwsze, w tkankach roślinnych zidentyfikowano fruktozo 2,6-bisfosforan – nowy efektor metabolizmu cukrów i pirofosforanu oraz częściowo scharakteryzowano enzym syntetyzujący i degradujący ten metabolit. Po wtóre, odkryto i opisano podstawowe właściwości zależnej od pirofosforanu fosfofruktokinazy – enzymu katalizującego odwracalną reakcję fosforylacji fruktozo 6-fosforanu z udziałem pirofosforanu jako dawcy reszty fosforanowej. Po trzecie, potwierdzono rolę pirofosforanu jako nośnika energii w tkankach roślinnych. Celem tej pracy jest podsumowanie wyników badań dotyczących tego nowego układu regulacyjnego i przedyskutowanie jego roli w kontekście dotychczasowych poglądów na temat roślinnego metabolizmu cukrów. W artykule przedstawiono krótką charakterystykę enzymów odpowiedzialnych za kontrolę stężenia fruktozo 2,6-bisfosforanu. W kolejnych rozdziałach opisano aktualny stan badań na temat enzymów, których aktywność jest modyfikowana przez fruktozo 2,6-bisfosforan. Dyskutowana jest również rola Fru-2,6-P<sub>2</sub> w regulacji podziału metabolitów trójwęglowych służących do syntezy skrobi lub sacharozy oraz udział PP<sub>i</sub>-fosfofruktokinazy w cytoplazmatycznej glikolizie, glukoneogenezie i metabolizmie pirofosforanu.

*Słowa kluczowe:* fruktozo 2,6-bisfosforan, metabolizm węglowodanów, PP<sub>i</sub>-fosfofruktokinaza, pirofosforan.

*Summary.* Within the past ten years, three major discoveries have been made which modify our knowledge of plant carbohydrate metabolism. In the first place, fructose 2,6-bisphosphate has been identified in plant tissues. Secondly, a novel enzyme, called pyrophosphate-dependent phosphofruktokinase catalysing a reversible phosphorylation of fructose 6-phosphate using pyrophosphate as phosphoryl donor has been discovered and characterized. Thirdly, the unusual role of pyrophosphate as an energy donor in the cytosol of plant has been recognized. The aim of this review is to outline how the study of this new regulatory system resolved a series of basic problems in plant metabolism. In the first section, I summarize the *in vitro* properties of the enzymes responsible for the control of fructose 2,6-bisphosphate concentration. Next, I describe how this effector acts on its target enzymes, namely PP<sub>i</sub>-phosphofruktokinase and fructose 1,6-bisphosphatase. In the last section I discuss how fructose 2,6-bisphosphate regulates sucrose synthesis and controls carbon partitioning between sucrose and starch. In addition, the evidence supporting

that  $PP_i$ -phosphofructokinase could be involved in glycolysis, gluconeogenesis or in regulation of the cytosolic pyrophosphate concentration are discussed.

**Key words:** fructose 2,6-bisphosphate, carbohydrate metabolism,  $PP_i$ -phosphofructokinase, pyrophosphate.

**Wykaz stosowanych skrótów:** ATP-PFK – 1-fosfotransferaza ATP-fruktozo 6-fosforan, E.C.2.7.1.11; DHAP – fosfodihydroksyaceton; FBPaza – fruktozobisfosfataza, E.C.3.1.3.11; Fru-6-P – fruktozo 6-fosforan; Fru-1,6-P<sub>2</sub> – fruktozo 1,6-bisfosforan; Fru-2,6-P<sub>2</sub> – fruktozo 2,6-bisfosforan; PFK-2 – 2-fosfotransferaza ATP-fruktozo 6-fosforan, E.C.2.7.1.; 3-PGA – 3-fosfoglicerynian;  $PP_i$  – pirofosforan nieorganiczny;  $PP_i$ -PFK – 1-fosfotransferaza pirofosforan- fruktozo 6-fosforan, E.C.2.7.1.90; SPS – syntaza sacharozofosforanowa, E.C.2.4.1.14

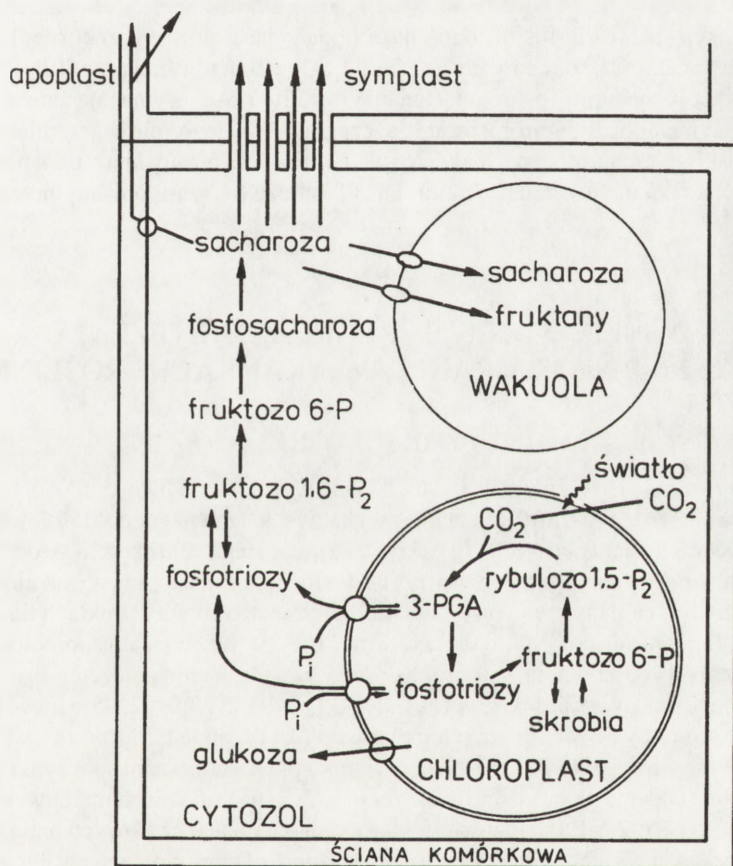
## 1. WSTĘP

W procesie fotosyntezy redukcja dwutlenku węgla w chloroplastach prowadzi w pierwszym etapie do utworzenia 3-fosfoglicerynianu (3-PGA), który następnie zostaje zredukowany do fosfotrioz. W warunkach świetlnych 3-PGA i fosfotriozy częściowo usuwane są do cytoplazmy, w przeważającej zaś ilości w szlaku glukoneogenezy zostają przekształcone w fosfoheksozy i magazynowane w chloroplastach w formie skrobi. W ciemności skrobia rozkładana jest do heksoz i fosfotrioz, które są transportowane do cytoplazmy przez odpowiednie translokazy [38]. Transport glukozy odbywa się z udziałem specyficznej translokazy glukozy [77], natomiast fosfotriozy transportowane są przez translokazę fosforanową na zasadzie kotransportu z fosforanem [30]. Obecnie wiadomo, że podstawowym intermedyatem usuwanym z chloroplastów w warunkach świetlnych jest fosfodihydroksyaceton (DHAP). W ciemności, na skutek obniżenia się pH stromy w większym stopniu może być transportowany również 3-PGA [29]. Transport metabolitów z udziałem translokazy fosforanowej charakteryzuje się kinetyką typu wysyceniowego. Fosfotriozy usuwane do cytoplazmy wykorzystywane są częściowo w procesach glikolizy, głównie jednak w szlaku glukoneogenezy służą do syntezy sacharozy (rys. 1). U większości roślin sacharoza jest podstawową formą transportową, rzadziej zapasową cukrów. Niektóre rośliny zwłaszcza z rodziny *Compositae* i *Graminae* oprócz sacharozy syntetyzują i magazynują w wakuolach fruktany, np. inulinę. Transport sacharozy do wnętrza wakuoli odbywa się w drodze antyportu dzięki gradientowi protonowemu, generowanemu przez tonoplastową  $H^+$ -ATPazę i  $H^+$ -pirofosfatazę lub w wyniku translokacji zależnej od UDP-glukozy [37, 74, 98]. Sacharoza syntetyzowana w liściach transportowana jest do innych tkanek systemem symplastu i apoplastu. Aktywny transport sacharozy do floemu, określanymi jako "ładowanie floemu", prowadzi do dużego zagęszczenia sacharozy w tej tkance i umożliwia jej transport do tkanek niefotosyntetyzujących [58].

Problem regulacji metabolizmu cukrów oraz jego integracja w przedziałach subkomórkowych jest jednym z bardziej złożonych problemów z zakresu regulacji szlaków metabolicznych. Od pewnego czasu wiadomo już, że podstawowym czynnikiem regulującym metabolizm cukrów w chloroplastach jest światło [13]. Reakcje świetlne nie tylko dostarczają ATP i NADPH zużywane w cyklu Calvina, ale poprzez układ ferredoksyna/tioredoksyna, światło wpływa na aktywność wielu enzymów. W ten sposób aktywowane są enzymy szlaku glukoneogenezy (fruktozobisfosfataza) i regeneracji rybulozo 1,5-bisfosforanu (fosfataza sedoheptulozo 1,7-bisfosforanowa, dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego i fosforybulokinaza). Enzymem chloroplastowym hamowanym przez światło jest dehydrogenaza glukozy 6-fosforanowa uczestnicząca w degradacji cukrów [13]. Oprócz światła i czynników

będących efektem reakcji świetlnej, takich jak zmiany pH i stężenia jonów magnezowych w stromie, w regulacji syntezy skrobi uczestniczą niektóre metabolity. Kluczowym miejscem regulacji metabolicznej jest pirofosforylaza ADP-glukozy – aktywowana przez 3-PGA i hamowana przez fosforan [72].

Hydrolityczna degradacja skrobi z udziałem amylaz oraz reakcje fosforolizy skrobi i maltozy prowadzą do powstawania heksoz i fosfoheksoz, które w ograniczonym zakresie transportowane są do cytoplazmy. Zasadnicza pula fosfoheksoz jest w chloroplastach przekształcana w fosfotriozy, które po przetransportowaniu do cytoplazmy służą do syntezy sacharozy.



Rys.1. Schemat wiązania  $\text{CO}_2$ , transportu metabolitów przez błony chloroplastu, syntezy i transportu sacharozy

Do niedawna uważano, że kluczowym enzymem regulującym ciąg reakcji prowadzących do syntezy sacharozy jest cytoplazmatyczna fruktozobisfosfataza (FBPaza). Przeciwna reakcja fosforylacji fruktozo 6-fosforanu (Fru-6-P) przez fosfofruktokinazę (ATP-PFK) uważana jest za jedno z kluczowych miejsc regulacji szlaku glikolizy. W wyniku odkrycia  $\text{PP}_i$ -fosfofruktokinazy ( $\text{PP}_i$ -PFK), nowego enzymu katalizującego odwracalną reakcję fosforylacji

Fru-6-P z udziałem pirofosforanu ( $PP_i$ ) zamiast ATP, poglądy na temat regulacji przemiany fosfoheksoz są obecnie rewidowane [14, 50]. Odkrycie alternatywnego szlaku przemiany Fru-6-P/Fru-1,6- $P_2$  zbiegło się w czasie z odkryciem fruktozo 2,6-bisfosforanu (Fru-2,6- $P_2$ ) – nowego efektora metabolizmu cukrów.

Rola Fru-2,6- $P_2$  w regulacji glikolizy i glukoneogenezy w tkankach zwierzęcych została już stosunkowo dobrze poznana [27, 43]. W piśmiennictwie polskim przeglądowe prace na ten temat ukazały się w "Postęпах Biochemii" i "Postęпах Biologii Komórki" [54, 57]. Analogiczna rola Fru-2,6- $P_2$  w regulacji glikolizy i glukoneogenezy w tkankach roślinnych nie została potwierdzona. Wynika to z odmienności metabolizmu cukrów w roślinach, która uwarunkowana jest głównie możliwością fotosyntetycznej asymilacji  $CO_2$  oraz odmienną przedziałowością przemian. W roślinnym metabolizmie cukrów ważną, chociaż nie w pełni wyjaśnioną funkcję pełni  $PP_i$ -fosfofruktokinaza podlegająca allosterycznej regulacji przez Fru-2,6- $P_2$ . Odwracalność przemiany Fru-6-P/Fru-1,6- $P_2$  katalizowanej przez  $PP_i$ -PFK wiąże się ściśle z metabolizmem pirofosforanu. Badania roli Fru-2,6- $P_2$  wymagają zatem skoordynowanych badań metabolizmu pirofosforanu, szczególnie zaś jego roli w przemianach energetycznych. Taki cel mają obecne badania roli błonowych pirofosforataz transportujących protony [49] oraz badania przemian, w których ATP może być zastępowany przez  $PP_i$  [64, 71, 108].

## 2. WYSTĘPOWANIE I REGULACJA STĘŻENIA FRUKTOZO 2,6-BISFOSFORANU W TKANKACH ROŚLINNYCH

### 2.1. IDENTYFIKACJA FRU-2,6- $P_2$

Stwierdzona po raz pierwszy w 1981 r. niezwykle wysoka wrażliwość  $PP_i$ -fosfofruktokinazy na aktywację przez Fru-2,6- $P_2$  pozwoliła wykorzystać ten enzym do ilościowej analizy Fru-2,6- $P_2$  w ekstraktach tkankowych [76]. Używana jest do tego celu częściowo oczyszczona  $PP_i$ -PFK, która w porównaniu z wątrobową ATP-fosfofruktokinazą [43] wykazuje znacznie mniejszą wrażliwość na hamujący wpływ składników zawartych w ekstraktach tkankowych [44, 45, 101]. Enzym ten pozwala oznaczać Fru-2,6- $P_2$  w stężeniach nanomolowych bez konieczności jego wyodrębniania z ekstraktu. Oznaczane tą metodą stężenie Fru-2,6- $P_2$  w tkankach roślinnych na ogół mieści się w zakresie od 1 do 10  $\mu M$  [40, 82, 95] i może podlegać dużym wahaniom pod wpływem różnych czynników. I tak, ponad 250-krotny wzrost jego stężenia obserwowano w bulwach karczocha w wyniku przerwania stanu spoczynku zimowego [100]. Podobne badania prowadzone w naszej pracowni na korzeniach marchwi wykazały, że zmiany poziomu Fru-2,6- $P_2$  analizowane w krótkich odcinkach czasowych mają charakter szybkich zmian oscylacyjnych [47]. Etylen, znany hormon roślinny wpływający intensyfikująco na szybkość oddychania, powoduje również kilkakrotny wzrost stężenia Fru-2,6- $P_2$  w korzeniach marchwi i owocach banana [5, 67, 87].

W dotychczasowych badaniach najwięcej uwagi poświęcono śledzeniu zmian poziomu Fru-2,6- $P_2$  w zielonych liściach w różnych warunkach asymilacji  $CO_2$ . Wyniki te, omawiane szerzej w następnych rozdziałach, dostarczyły wielu informacji na temat roli Fru-2,6- $P_2$  w integracji przemian węgla w komórkach roślinnych.



Badania lokalizacji Fru-2,6-P<sub>2</sub> metodą frakcjonowania struktur subkomórkowych w środowisku bezwodnym oraz frakcjonowanie homogenatów protoplastów metodą kolejnych sączeń przez membrany o zróżnicowanej średnicy por wykazały jednoznacznie, że Fru-2,6-P<sub>2</sub> zawarty jest w cytoplazmie [82, 88]. Stwierdzone doświadczalnie bardzo wolne przenikanie Fru-2,6-P<sub>2</sub> przez błony chloroplastów nie wpływało istotnie na szybkość wiązania CO<sub>2</sub> [78].

## 2.2. REGULACJA SYNTEZY I DEGRADACJI FRU-2,6-P<sub>2</sub>

W reakcji syntezy i hydrolizy Fru-2,6-P<sub>2</sub> w tkankach zwierzęcych uczestniczy dwufunkcyjny enzym – 6-fosfofrukto 2-kinaza/ fruktozo-2,6-bisfosfataza podlegający skomplikowanej regulacji hormonalnej [27, 43, 54, 57].

Obecnie wiadomo już, że podobnie jak u zwierząt również w komórkach roślinnych synteza i hydroliza Fru-2,6-P<sub>2</sub> katalizowana jest przez 6-fosfofrukto 2-kinazę i fosfatazę fruktozo 2,6-bisfosforanową zgodnie z równaniami:

1.  $\text{ATP} + \text{Fru-6-P} \rightarrow \text{Fru-2,6-P}_2 + \text{ADP}$
2.  $\text{Fru-2,6-P}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Fru-6-P} + \text{P}_i$

6-Fosfofrukto 2-kinaza (PFK-2), zidentyfikowana po raz pierwszy w liściach szpinaku, jest enzymem wysoce specyficznym względem Fru-6-P i ATP zlokalizowanym w cytoplazmie [17]. Synteza Fru-2,6-P<sub>2</sub> jest silnie aktywowana przez ortofosforan powodujący prawie 10-krotny wzrost powinowactwa enzymu do Fru-6-P i 5-krotny wzrost względem ATP. Ortofosforan ponadto zmienia kinetykę reakcji z sigmoidalnej na hiperboliczną w odniesieniu do Fru-6-P [3, 52, 80]. Próby oczyszczenia PFK-2 napotykały na poważne trudności związane z wyjątkowo wysoką labilnością enzymu. Problemy związane z preparatyką utrudniają uzyskanie jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, czy enzym ten, podobnie jak u zwierząt, jest enzymem dwufunkcyjnym, czy też PFK-2 i fosfataza fruktozo 2,6-bisfosforanowa są dwoma różnymi białkami. Wysokooczyszczone dwie formy PFK-2 z liści szpinaku o masie cząsteczkowej 390 i 132 kDa wykazują aktywność kinazy i fosfatazy w stosunku 8:1 i 1:1 [55]. Wyniki wskazujące na dwufunkcyjność enzymu uzyskali też inni autorzy sugerując jednocześnie, że jedna z form podlega aktywacji w drodze fosforylacji [4, 102, 103]. Odmienne wyniki przedstawiono w ostatnim czasie w zespole MacDonalda, które stwierdzają, że PFK-2 i fosfataza fruktozo 2,6-bisfosforanowa są dwoma różnymi białkami [59, 61].

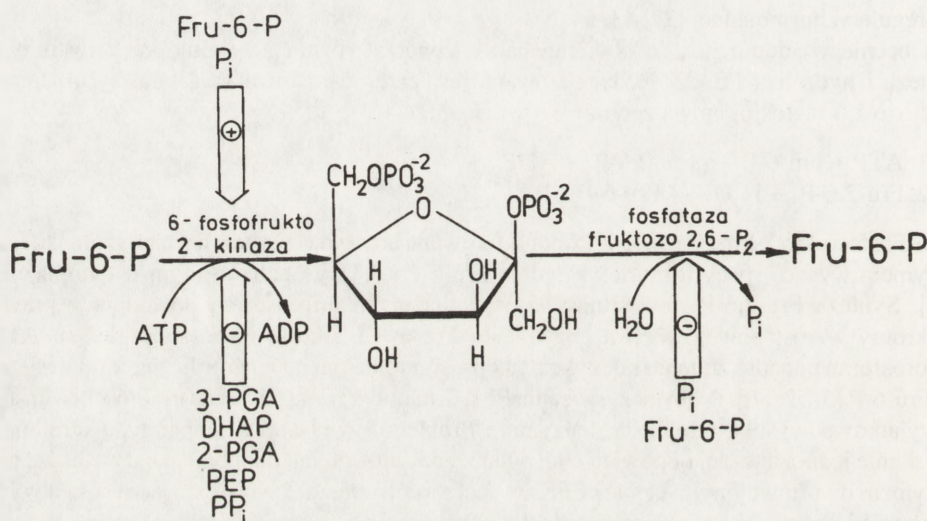
PFK-2, niezależnie od tego czy wykazywała właściwości enzymu dwufunkcyjnego, czy jednofunkcyjnego, jest silnie hamowana przez trójwęglowe intermedyaty, takie jak 3-fosfoglicerynian, 2-fosfoglicerynian, 3-fosfoenolopirogronian i fosfodihydroksyaceton. Z wyjątkiem fosfodihydroksyacetonu wszystkie pozostałe metabolity działają antagonistycznie w stosunku do fosforanu. Mimo że wartości K<sub>i</sub> względem tych metabolitów są do siebie zbliżone, to przewaga stężenia 3-PGA w komórce pozwala przypuszczać, że jest on najbardziej efektywnym inhibitorem *in vivo* [17, 55, 67, 85, 86]. Drugim obok 3-PGA silnym inhibitorem, który hamuje aktywność PFK-2 tylko w obecności fosforanu, jest DHAP [85, 86]. PFK-2 jest również silnie hamowana przez PP<sub>i</sub>, który działa kompetycyjnie względem ATP i indukuje kinetykę sigmoidalną [55, 61].

Reakcja hydroliz fruktozo-2,6-bisfosforanu katalizowana przez wysokooczyszczony dwufunkcyjny enzym z liści szpinaku jest silnie hamowana przez ortofosforan i w mniejszym stopniu przez fruktozo 6-fosforan [18]. Dwufunkcyjny enzym wykazuje wyższe powinowac-

two względem Fru-2,6-P<sub>2</sub> i jest wrażliwy na hamowanie przez Fru-6-P. Jednofunkcyjna fosfataza jest natomiast silnie hamowana przez fosforan i tylko nieznacznie przez Fru-6-P [60].

Na rysunku 2 przedstawiono reakcje syntezy i hydrolizy Fru-2,6-P<sub>2</sub> oraz wpływ niektórych metabolitów na aktywność enzymów regulujących jego stężenie.

Zróżnicowanie molekularne PFK-2 i fosfatazy fruktozo 2,6-bisfosforanowej sugeruje, że enzymy te mogą być w pewnych warunkach zasocjowane tworząc dwufunkcyjne kompleksy lub mogą funkcjonować oddzielnie [56]. Jak dotąd, warunki ich asocjacji lub dysocjacji nie są jeszcze poznane.



Rys.2. Regulacja aktywności 6-fosfofrukto,2-kinazy i fosfatazy fruktozo 2,6-bisfosforanowej przez metabolity

### 3. ENZYMY PODLEGAJĄCE REGULACJI PRZEZ FRU-2,6-P<sub>2</sub>

W komórkach roślinnych Fru-2,6-P<sub>2</sub> reguluje aktywność co najmniej dwóch enzymów. Pierwszym z nich jest 1-fosfotransferaza PP<sub>i</sub>-fruktozo 6-fosforanowa (PP<sub>i</sub>-PFK) – podlegająca zróżnicowanej aktywacji przez ten efektor. Drugim enzymem, którego aktywność jest hamowana przez Fru-2,6-P<sub>2</sub>, jest fosfataza fruktozo 1,6-bisfosforanowa (FBPaza) analogiczna do hamowanego również przez Fru-2,6-P<sub>2</sub> enzymu zwierzęcego. Niektóre właściwości fizykochemiczne tych dwóch enzymów są przedstawione szerzej w następujących dwóch podrzdziałach.

W ostatnich latach doniesiono, że oprócz regulowania aktywności wymienionych dwóch enzymów, Fru-2,6-P<sub>2</sub> może aktywować fosforylaze UDPG, pirofosforylaze ATP, fosfoglukomutaze [40], cytoplazmatyczną reduktaze fosfodihydroksyacetonu [33] i utlenioną formę chloroplastowej fruktozo 1,6-bisfosfatazy [81]. Pojawiły się również doniesienia o hamującym działaniu Fru-2,6-P<sub>2</sub> na aktywność dehydrogenazy fosfoglukonianowej i fosforylazy

trehalozy [40]. Są to obecnie pojedyncze, niepotwierdzone jeszcze doniesienia, które jednakże mogą sugerować, że rola Fru-2,6-P<sub>2</sub> jest znacznie szersza, niż to się obecnie uważa.

### 3.1. 1-FOSFOTRANSFERAZA PP<sub>i</sub>-FRUKTOZO 6-FOSFORANOWA

Zależną od PP<sub>i</sub> fosfofruktokinazę odkryto u ameby *Entamoeba histolytica* i niektórych bakterii [65, 108]. Z czasem okazało się, że PP<sub>i</sub>-PFK występuje powszechnie w tkankach roślinnych [14, 56]. Enzym ten w obecności jonów Mg<sup>+2</sup> katalizuje odwracalną reakcję ufosforylowania Fru-6-P zgodnie z równaniem:



Już wstępne badania roślinnej PP<sub>i</sub>-fosfofruktokinazy wykazały, że enzym ten w odróżnieniu od enzymu prokariotów jest aktywowany przez Fru-2,6-P<sub>2</sub> [76]. Nieallosteryczny enzym z bakterii i pierwotniaków o masie cząsteczkowej 95 kDa charakteryzuje się wysokim powinowactwem względem Fru-6-P, Fru-1,6-P<sub>2</sub> i PP<sub>i</sub>. Wartości K<sub>m</sub> względem tych substratów mieszczą się w zakresie stężeń 10<sup>-5</sup> M, a względem ortofosforanu 10<sup>-4</sup> M [108]. Niższe o rząd wielkości powinowactwo względem Fru-6-P, allosterycznej PP<sub>i</sub>-fosfofruktokinazy z roślin wzrasta 10–20-krotnie w obecności Fru-2,6-P<sub>2</sub>. Mikromolowe stężenie Fru-2,6-P<sub>2</sub> powoduje również 2–6-krotny wzrost powinowactwa względem PP<sub>i</sub> i znosi hamowanie enzymu przez wyższe stężenie tego substratu [6, 10, 11, 12, 28, 46, 48, 62, 110]. Oprócz wzrostu powinowactwa enzymu względem substratów, Fru-2,6-P<sub>2</sub> powoduje wzrost szybkości maksymalnej reakcji w prawą stronę. Wielkość tego efektu zależy od stężenia Fru-6-P [6, 10, 11, 12, 44, 46, 48, 62, 76, 101]. Fru-2,6-P<sub>2</sub> aktywuje PP<sub>i</sub>-PFK również w reakcji defosforylacji Fru-1,6-P<sub>2</sub>. Efekt ten jest nieznaczny w warunkach, gdy stężenie Fru-1,6-P<sub>2</sub> w środowisku reakcyjnym jest wysokie [6, 11, 12, 46, 48, 50, 75, 96, 101]. Tak więc pozorny brak aktywacji enzymu w reakcji defosforylacji Fru-1,6-P<sub>2</sub> in vitro jest wynikiem niespecyficznego aktywacji enzymu przez wysokie stężenie Fru-1,6-P<sub>2</sub> [75]. Zastąpienie Fru-2,6-P<sub>2</sub> przez jego fosfoniowe analogi pozwoliło stwierdzić, że enzym ma jedno miejsce wiążące aktyuator, co dodatkowo potwierdza symetryczną aktywację enzymu [96].

Próby oczyszczania oraz badania kinetyczne wykazały, że enzym izolowany z różnych tkanek roślinnych różni się pod względem właściwości fizykochemicznych. Podstawowe różnice dotyczą jego podatności na aktywację [2, 44, 109]. W badaniach własnych wykazaliśmy, że aktywność enzymu w kielkach fasoli we wczesnej fazie wzrostu roślin w obecności Fru-2,6-P<sub>2</sub> 10–24-krotnie, podczas gdy w 3- i 6-dniowych liściach zaledwie ok. 2-krotnie [44]. Wyjątkowo niską wrażliwość na aktywację wykazuje enzym izolowany z liści niektórych roślin gruboszowatych, np. ananasa i *Sansevieria trifasciata* [14, 48].

Zróznicowanie enzymu pod względem wrażliwości na Fru-2,6-P<sub>2</sub> skłoniło badaczy do poszukiwań różnic w budowie molekularnej. W badaniach tych stwierdzono, że enzym izolowany z różnych gatunków roślin i różnych tkanek różni się pod względem budowy podjednostkowej [6, 15, 28, 106]. Wykazano też, że stosunek ilościowy poszczególnych podjednostek może ulegać zmianom w czasie rozwoju rośliny [7, 8, 107]. Wydaje się, że różnice w składzie podjednostkowym enzymu determinują duże zróznicowanie powinowactwa względem Fru-2,6-P<sub>2</sub>. Wartości K<sub>a</sub> na ogół mieszczą się w zakresie stężeń od 5 x 10<sup>-9</sup> M do 10<sup>-6</sup> M [6, 11, 12, 28, 46, 76, 101, 110]. Powinowactwo względem Fru-2,6-P<sub>2</sub> zależy też od składu środowiska reakcyjnego, zwłaszcza od stężenia Fru-6-P i fosforanu [46, 84, 101]. Wyższe stężenie Fru-6-P powoduje wzrost powinowactwa enzymu względem Fru-2,6-P<sub>2</sub> w

przeciwnie do fosforanu działającego antagonistycznie. Tak więc zmiany stężenia Fru-6-P i fosforanu pełnią istotną rolę w mechanizmie regulacji  $PP_1$ -PFK *in vivo*.

### 3.2. FOSFATAZA FRUKTOZO 1,6-BISFOSFORANOWA

Cytoplazmatyczna FBPaza, odrębna od enzymu chloroplastowego, została wyizolowana i oczyszczona po raz pierwszy przez Zimmermanna [112]. Enzym ten, chociaż podobny pod względem masy cząsteczkowej do badanego wcześniej enzymu chloroplastowego [111], wykazuje szereg odrębnych właściwości. Enzym cytoplazmatyczny nie jest regulowany przez zależny od światła układ ferredoksyna/tioredoksyna [63], natomiast jest silnie hamowany przez Fru-2,6- $P_2$ . Efektor ten obniża szybkość maksymalną i powinowactwo enzymu względem substratu oraz zmienia krzywą kinetyczną z hiperbolicznej na sigmoidalną [39, 51, 70, 104]. Cytoplazmatyczna FBPaza różni się od enzymu chloroplastowego również tym, że podlega hamowaniu przez AMP, który działa synergistycznie z Fru-2,6- $P_2$  [39, 91, 93]. Hamowanie enzymu przez Fru-2,6- $P_2$  znoszone jest częściowo przez UDP-glukozę, która pojedynczo nie wpływa na aktywność enzymu [70].

## 4. ROLA FRU-2,6- $P_2$ W REGULACJI PODZIAŁU METABOLITÓW TRÓJWĘGLOWYCH MIĘDZY REAKCJE PROWADZĄCE DO SYNTEZY SKROBI LUB SACHAROZY

Ciągłe zmiany warunków środowiska, jakim poddawane są rośliny, wymagają złożonych mechanizmów regulacji fotosyntezy i akumulacji węgla. Jednym z elementów takiego mechanizmu jest synteza skrobi w chloroplastach, która pełni funkcję "buforu" metabolitów trójwęglowych. Asymilacji  $CO_2$  w chloroplastach towarzyszy wiązanie fosforanu w formie estrów trioz, z których jest on uwalniany w cytoplazmie w szlaku prowadzącym do syntezy sacharozy. Z tego względu szybkość wiązania  $CO_2$  musi być skoordynowana z syntezą skrobi i sacharozy. Cykl przemian fosforanu musi zapewniać ciągłość fotosyntezy bez obniżania puli fosfortrioz poniżej poziomu, który umożliwi regenerację rybulozo 1,5-bisfosforanu. Z drugiej strony, przemiany prowadzące do syntezy skrobi i sacharozy muszą być regulowane ze względu na wspólny substrat, jakim jest 3-PGA.

Mechanizm regulacji przemian węgla od 3-PGA do skrobi w chloroplastach bądź sacharozy w cytoplazmie oparty jest na kontroli aktywności enzymów metabolizujących Fru-2,6- $P_2$ . Na podstawie badań nad regulacją syntezy i hydrolizy Fru-2,6- $P_2$  *in vitro* można było założyć, że Fru-2,6- $P_2$  jest sygnałem informującym o stężeniu w cytoplazmie DHAP, 3-PGA, Fru-6-P, ortofosforanu i pirofosforanu. W badaniach *in vivo* poświęconych analizie zmian stężenia metabolitów w różnych warunkach oświetlenia stwierdzono, że przeniesieniu liści z ciemności do światła towarzyszy natychmiastowy znaczny wzrost poziomu DHAP i 3-PGA w cytoplazmie i gwałtowny spadek stężenia Fru-2,6- $P_2$  jako efekt zahamowania PFK-2. Zmianom tym towarzyszy wzrost aktywności syntazy fosfosacharozy oraz wzrost cytoplazmatycznego i wakuolarnego poziomu sacharozy [92]. Dłuższe pozostawienie liści na świetle powoduje obniżenie aktywności syntazy sacharozofosforanowej (SPS) i wzrost stężenia fosfoheksoz, co w efekcie prowadzi do aktywacji PFK-2 i wzrostu stężenia Fru-2,6- $P_2$  [85, 94]. Tak więc wzrost stężenia Fru-2,6- $P_2$  hamuje syntezę sacharozy i regenerację fosforanu, co z kolei

pociąga zahamowanie transportu fosfotrioz z chloroplastów i otwiera szlak prowadzący do syntezy skrobi. Jak już wspomniano wcześniej, chloroplastowy szlak glukoneogenezy aktywowany jest przez światło, natomiast pirofosforylaza ADP-glukozy – kluczowy enzym w regulacji syntezy skrobi – kontrolowany jest przez stosunek stężenia 3-PGA-ortofosforan [83, 90]. Wzrost stężenia 3-PGA w chloroplastach w wyniku zahamowania transportu trioz do cytoplazmy prowadzi zatem do aktywacji pirofosforylasy ADP-glukozy i wzmożonej syntezy skrobi [72].

Na marginesie tych badań stwierdzono, że synteza skrobi zachodzi w warunkach, gdy zewnątrzchloroplastowe stężenie fosforanu jest niższe od 0,3 mM [90], co wskazywałoby, że stężenie fosforanu w cytoplazmie podczas fotosyntezy nie powinno przekraczać tej wartości.

#### 4.1. REGULACJA SYNTEZY I DEGRADACJI SACHAROZY

Cytoplazmatyczna FBPaza jest kluczowym enzymem regulatorowym szlaku glukoneogenezy prowadzącego do syntezy sacharozy. Aktywność FBPazy jest efektywnie hamowana przez fizjologiczne stężenia Fru-2,6-P<sub>2</sub>, a ponadto przez AMP i fosforan. W badaniach nad syntezą sacharozy eksperymentalnie wykazano, że jej synteza może być zapoczątkowana w warunkach przekroczenia pewnego progowego stężenia metabolitów trójwęglowych w cytoplazmie. Poniżej tego krytycznego stężenia aktywność FBPazy jest całkowicie zahamowana przez Fru-2,6-P<sub>2</sub>. Minimalny wzrost stężenia fosfotrioz powyżej progowej wartości powoduje zahamowanie syntezy Fru-2,6-P<sub>2</sub> i w efekcie odblokowanie aktywności FBPazy. Aktywność FBPazy rośnie bardzo gwałtownie w wyniku zmiany kinetyki enzymu z sigmoidalnej na hiperboliczną będącej efektem obniżenia się stężenia Fru-2,6-P<sub>2</sub> oraz wzrostu stężenia Fru-1,6-P<sub>2</sub> [89, 91, 97, 99]. W warunkach długotrwałej lub intensywnie zachodzącej fotosyntezy do regulacji syntezy sacharozy zostaje włączony mechanizm sprzężenia zwrotnego. W mechanizmie tym istotną rolę gra syntaza sacharozofosforanowa współdziałająca z fosfatazą sacharozową. Enzymy te uczestniczą bezpośrednio w syntezie sacharozy zgodnie z równaniami:

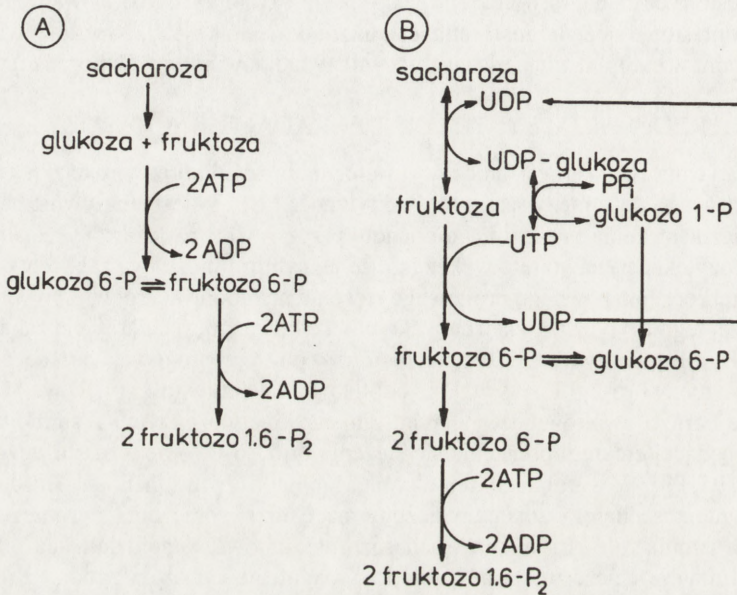
1.  $\text{UDP-glu} + \text{Fru-6-P} \rightleftharpoons \text{fosfosacharoza} + \text{UDP}$
2.  $\text{fosfosacharoza} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{sacharoza} + \text{P}_i$

SPS jest regulowana przez glukozę 6-fosforan, fosforan i sacharozę, a ponadto aktywność jej podlega modyfikacji kowalencyjnej w drodze fosforylacji i defosforylacji białka [22, 42]. Zahamowaniu aktywności SPS towarzyszy wzrost stężenia Fru-6-P prowadzący do znoszenia hamowania aktywności PFK-2 przez metabolity trójwęglowe i wzrostu stężenia Fru-2,6-P<sub>2</sub>. W tych warunkach synteza sacharozy zostaje zahamowana i wzrasta szybkość produkcji skrobi.

Sacharoza magazynowana jest w wakuolach lub jest transportowana z liści do tkanek niefotosyntetyzujących i tkanek spichrzowych, gdzie jest źródłem węgla lub energii. Włączenie sacharozy do metabolizmu komórkowego polegające na jej degradacji może się odbywać dwiema drogami (rys. 3). Pierwszy szlak (rys. 3A) rozpoczyna się od hydrolitycznego roszczępienia sacharozy katalizowanego przez cytoplazmatyczną obojętną inwertazę lub kwaśną inwertazę zlokalizowaną w wakuoli i ścianie komórkowej. Alternatywny szlak degradacji (rys. 3B) rozpoczyna się od reakcji katalizowanej przez syntazę sacharozy, której produktem obok fruktozy jest UDP-glukoza ( $\text{sacharoza} + \text{UDP} \rightleftharpoons \text{fruktoza} + \text{UDP-glukoza}$ ). Ten szlak jest energetycznie korzystniejszy, bowiem dostarcza "aktywnej glukozy" lub w

wyniku zależnej od  $PP_i$  reakcji pirofosforylacji ( $PP_i + \text{UDP-glu} \rightleftharpoons \text{glu-1-P} + \text{UTP}$ ) produkuje glukozę 1-fosforan i UTP.

Właściwości kinetyczne syntazy sacharozy, a zwłaszcza stosunkowo wysokie powinowactwo do sacharozy nasuwa przypuszczenia, że ten szlak funkcjonuje w warunkach niższego stężenia sacharozy, bądź w tkankach, w których zachodzi intensywny metabolizm towarzyszący wczesnym stadiom wzrostu i rozwoju rośliny [41].



Rys.3. Degradacja sacharozy przez inwertazę (A) lub syntazę sacharozy (B) oraz reakcje włączenia produktów degradacji do szlaku metabolizmu fosfoheksoz

## 5. UDZIAŁ $PP_i$ -FOSFOFRUKTOKINAZY W METABOLIZMIE CUKRÓW I PIROFOSFORANU

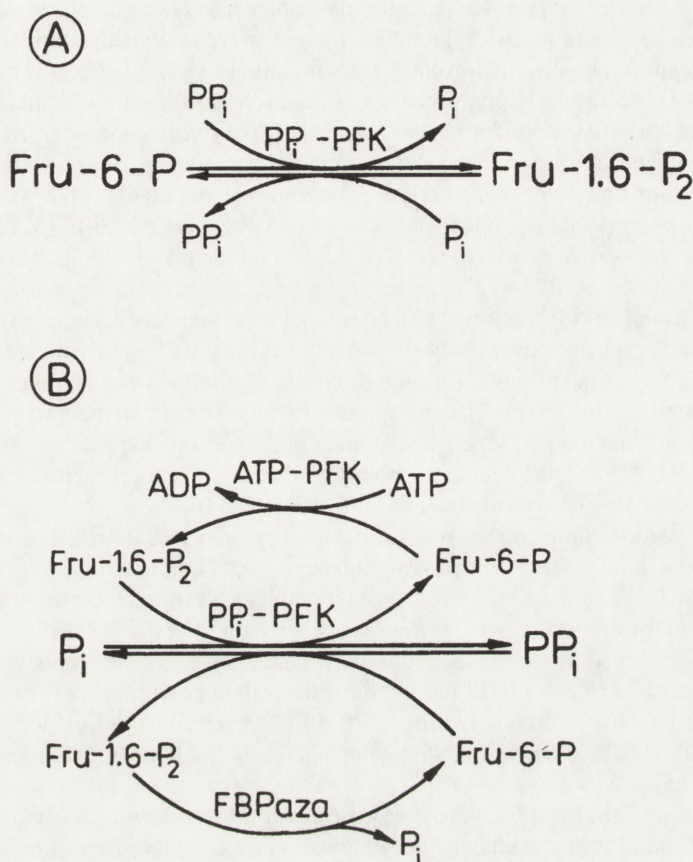
Właściwości  $PP_i$ -fosfofruktokinazy badane *in vitro* pozwalały przypuszczać, że może ona funkcjonować zarówno w reakcjach fosforylacji Fru-6-P i defosforylacji Fru-1,6-P<sub>2</sub>, jak też w przemianach typu fosforan  $\rightleftharpoons$  pirofosforan, zgodnie z reakcjami przedstawionymi schematycznie na rysunku 4.

W pierwszym przypadku (rys. 4A)  $PP_i$ -PFK pełni funkcję enzymu wspomagającego lub zastępującego ATP-fosfofruktokinazę w glikolizie bądź FBPazę w glukoneogenezie.

W drugim przypadku (rys. 4B)  $PP_i$ -PFK współdziałając z ATP-PFK i FBPazą funkcjonuje w jałowym cyklu przemiany Fru-6-P/Fru-1,6-P<sub>2</sub>, którego rolą jest przemiana



regulująca stężenie  $PP_i$  lub ortofosforanu w cytoplazmie [20, 21, 23, 24, 25, 41, 69, 73, 105].



Rys.4. Udział  $PP_i$ -fosfofruktokinazy w przemianie Fru-6-P  $\leftrightarrow$  Fru-1,6-P<sub>2</sub> (A) lub w przemianie  $P_i \leftrightarrow PP_i$  (B)

### 5.1. ALTERNATYWNY SZLAK PRZEMIANY FRU-6-P $\leftrightarrow$ FRU-1,6-P<sub>2</sub>

Tkanki roślinne zarówno zielone, jak też nefotosyntetyzujące obok  $PP_i$ -PFK zawierają cytoplazmatyczną ATP-fosfofruktokinazę [36] odrębną od izoenzymu chloroplastowego (plastydowego) [21, 31, 32]. Obydwa izoenzymy ATP-fosfofruktokinazy nie są aktywowane przez Fru-2,6-P<sub>2</sub>, czym różnią się od fosfofruktokinazy z tkanek zwierzęcych i z drożdży. Cytoplazmatyczna ATP-PFK z roślin jest silnie hamowana przez fosfoenolopirogronian i 3-PGA. Hamowanie znoszone jest przez ortofosforan, wykazujący dodatkowo w niektórych przypadkach silny efekt aktywacji. Godnym podkreślenia jest fakt, że roślinna ATP-PFK w odróżnieniu od enzymu zwierzęcego zasadniczo regulowana jest przez stosunek stężenia fosfoenolopirogronianu do fosforanu, a nie przez stosunek ATP/ADP [21].

Mimo że obecność ATP-PFK stwierdzana jest powszechnie u roślin, to w niektórych tkankach lub gatunkach aktywność jej jest od kilku do kilkudziesięciu razy niższa niż aktywność  $PP_i$ -fosfofruktokinazy [14]. Aktywacja  $PP_i$ -PFK przez Fru-2,6-P<sub>2</sub>, a ponadto

stosunkowo wysoka jej aktywność w niektórych tkankach nasuwa przypuszczenie, że podstawowym dawcą fosforanu w fosforylacji Fru-6-P jest w tych przypadkach  $PP_i$ , nie zaś ATP. Stosunek aktywności obydwu fosfofruktokinaz zmienia się w czasie wzrostu i rozwoju rośliny i na ogół aktywność  $PP_i$ -PFK przeważa w kiełkujących nasionach i w tkankach, w których zachodzi intensywny metabolizm [2, 10, 44, 53]. Glikolityczny kierunek reakcji sugerują również badania zmian poziomu Fru-2,6- $P_2$  towarzyszące intensyfikacji reakcji katabolicznych. I tak, wzmożone oddychanie będące efektem zranienia tkanki, przzerwania stanu spoczynkowego, czy też działania etylenu indukuje wzrost stężenia Fru-2,6- $P_2$  [5, 48, 67, 87, 100]. Również znaczący wzrost powinowactwa enzymu względem Fru-6-P, jaki towarzyszy jego aktywacji przez Fru-2,6- $P_2$ , oraz rosące powinowactwo enzymu do Fru-2,6- $P_2$  wraz ze wzrostem stężenia Fru-6-P wskazuje na jego rolę jako enzymu fosforylującego Fru-6-P.

Według niektórych autorów Fru-2,6- $P_2$  nie tylko aktywuje  $PP_i$ -PFK, ale indukuje powstawanie formy dimerycznej (oligomerycznej) preferującej glikolityczny kierunek reakcji [109]. Mimo że dimeryzacja nie jest powszechnie potwierdzanym mechanizmem regulacji  $PP_i$ -PFK, to zróżnicowanie enzymu pod względem stopnia podatności na aktywację jest powszechnie stwierdzane [10, 14, 48]. Molekularne podstawy zróżnicowanej wrażliwości  $PP_i$ -PFK na Fru-2,6- $P_2$  są obecnie intensywnie badane [7, 8, 15, 107, 110].

Jak dotąd bezpośrednim potwierdzeniem glikolitycznej roli  $PP_i$ -PFK są wyniki badań dotyczących zmian stężenia  $PP_i$  i Fru-6-P w cudzożywnych komórkach *Chenopodium rubrum*. Stwierdzono w nich, że na skutek rozprężenia oddychania następuje wzrost poziomu Fru-2,6- $P_2$ , któremu towarzyszy równoczesny spadek stężenia  $PP_i$  i Fru-6-P [35].

W korzeniach ryżu w warunkach glikolizy beztlenowej stwierdzono wzrost stężenia Fru-2,6- $P_2$  i wzrost syntezy  $PP_i$ -PFK przy niezmiennym poziomie ATP-PFK [66]. Na tej podstawie Mertens rozważa możliwość, że  $PP_i$ -PFK bierze udział w fosforylacji Fru-6-P w warunkach glikolizy beztlenowej, a więc w sytuacji gdy źródłem ATP nie jest fosforylacja oksydacyjna [65].

Warunkiem udziału  $PP_i$ -PFK w fosforylacji Fru-6-P jest obecność w cytoplazmie odpowiedniego stężenia  $PP_i$ . Do niedawna przyjmowano powszechnie, że pirofosforan produkowany w wielu reakcjach biosyntezy jest natychmiast hydrolizowany przez pirofosfatazę, co w efekcie sprawia, że reakcje te stają się nieodwracalne. Obecnie wiadomo, że pirofosfataza w komórkach roślinnych zlokalizowana jest głównie w chloroplastach (plastydach), gdzie hydrolizuje  $PP_i$  powstający w dużych ilościach w czasie syntezy skrobi [34, 105]. Oprócz enzymu plastydowego tkanki roślinne zawierają pirofosfatazę związaną z błonami plazmatycznymi [74] i z wewnętrzną błoną mitochondrialną [49]. Subkomórkowa przedziałowość metabolizmu  $PP_i$  umożliwia utrzymywanie stężenia  $PP_i$  w cytoplazmie na poziomie 1–10 tys. razy wyższym od przewidywanego na podstawie wartości stałej równowagi reakcji hydrolizy  $PP_i$  i mieści się w zakresie od 70 do 400  $\mu\text{M}$  [19, 20, 24, 26, 44, 69, 79, 105]. Ponieważ ok. 90% komórkowej puli  $PP_i$  zlokalizowane jest w cytoplazmie, zatem stężenie jego znacznie przewyższa wyznaczone wartości  $K_m$   $PP_i$ -fosfofruktokinazy względem tego substratu.

Defosforylacja Fru-1,6- $P_2$  przez  $PP_i$ -PFK związana z produkcją  $PP_i$  aktywowana jest również przez Fru-2,6- $P_2$ , czym różni się od hamowanej przez ten efektor hydrolizy katalizowanej przez FBPazę. Biorąc pod uwagę cytoplazmatyczną lokalizację obu enzymów [10, 50, 53, 112] wydaje się mało prawdopodobne, aby silnie aktywowana  $PP_i$ -fosfofruktokinaza mogła in vivo funkcjonować w defosforylacji Fru-1,6- $P_2$ . Aczkolwiek możliwość taka powinna być brana pod uwagę, jeżeli się założy, że reakcja ta ma na celu produkowanie  $PP_i$ .



## 5.2. ROLA $PP_i$ -PFK W CYTOPLAZMATYCZNYM METABOLIZMIE PIROFOSFORANU

Stosunkowo wysokie i względnie stałe stężenie  $PP_i$  w cytoplazmie w różnych warunkach doświadczalnych [1, 20, 23] sugeruje, że  $PP_i$ -PFK współdziałając z ATP-PFK i FBPazą uczestniczy w przemianie  $P_i \leftrightarrow PP_i$  zgodnie ze schematem zamieszczonym na rysunku 4B [20, 21, 23, 24, 25, 41, 69, 73, 105].

W poprzednich rozdziałach podkreślano w wielu miejscach, że metabolizm fosforanu przebiega w ścisłym związku z metabolizmem cukrów. Fosforan jest ponadto jednym z kluczowych metabolitów funkcjonujących w regulacji aktywności wielu enzymów, chociaż jego udział w tych procesach *in vivo* jest obecnie trudny do określenia. Można jednakże zakładać, że nawet niewielkie zmiany stężenia fosforanu lub stosunku fosforanu do pirofosforanu ma w wielu przemianach ważne znaczenie regulacyjne.

Źródłem  $PP_i$  w cytoplazmie obok licznych reakcji biosyntezy mogą być reakcje produkujące  $PP_i$  w chloroplastach i mitochondriach, skąd może on być transportowany do cytoplazmy za pośrednictwem translokaz nukleotydowych [38, 49]. W metabolizmie  $PP_i$  w cytoplazmie obok  $PP_i$ -PFK uczestniczy transportująca protony pirofosfataza ( $H^+$ -PPaza) zlokalizowana w błonach plazmatycznych oraz pirofosforylaza UDP-glukozy.  $H^+$ -PPaza hydrolizując  $PP_i$  generuje transbłonowy gradient protonowy. Jednakże faktyczna rola tego enzymu *in vivo* pozostaje niewyjaśniona, ponieważ może on również syntetyzować  $PP_i$  na koszt błonowego potencjału jonowego [74]. Funkcjonowanie  $PP_i$ -PFK i pirofosforylasy UDP-glukozy pozostaje w ścisłym związku z metabolizmem cukrów. Wartości stałej równowagi reakcji katalizowanych przez te enzymy wskazują, że reakcje *in vivo* będą zbliżone do stanu równowagi termodynamicznej [25, 105]. Tak więc w każdej z tych reakcji może być produkowany lub zużywany pirofosforan, a kierunek reakcji będzie zależał od aktualnego stężenia pozostałych substratów i produktów reakcji.

Rola  $PP_i$ -PFK w przemianie  $P_i \leftrightarrow PP_i$  jest przypuszczalnie bezpośrednio związana z syntezą lub degradacją sacharozy i polega na usuwaniu lub produkowaniu  $PP_i$ . Pirofosforan uwalniany w reakcji tworzenia UDP-glukozy ogranicza syntezę sacharozy. W usuwaniu  $PP_i$  może uczestniczyć  $PP_i$ -PFK zachowując część energii wiązania bezwodnikowego  $PP_i$  w formie Fru-1,6- $P_2$  lub  $H^+$ -PPaza sprzęgająca hydrolizę  $PP_i$  z transportem protonów przez błonę [16, 73].

Komórki roślinne mogą zatem wykorzystywać więcej możliwości energooszczędnego usuwania  $PP_i$ , a o wyborze właściwej drogi przypuszczalnie decyduje poziom Fru-2,6- $P_2$ .

Obecnie coraz więcej wyników zdaje się potwierdzać rolę  $PP_i$ -PFK polegającą na produkowaniu  $PP_i$ . Sugestie te opierają się na badaniach zmian aktywności  $PP_i$ -PFK, które w kiełkujących nasionach grochu, rosnących bulwach ziemniaka i hodowlach komórkowych skorelowane są ze zmianami aktywności syntazy sacharozy i pirofosforylasy UDP-glukozy [9, 25, 68]. Tak więc szlak degradacji sacharozy rozpoczynający się od syntazy sacharozy (rys. 3B) i obejmujący również przemianę  $UDP \rightarrow UTP$  korzysta przypuszczalnie z reakcji defosforylacji Fru-1,6- $P_2$  jako źródła  $PP_i$ . Powstający w tym szlaku UTP może być wykorzystywany do fosforylacji fruktozy przez UTP-fruktokinazę (rys. 3B) [21, 41].

## 6. UWAGI KOŃCOWE

Właściwości kinetyczne 6-fosfofrukto 2-kinazy i fosfatazy fruktozo 2,6-bisfosforanowej sugerowały, że Fru-2,6-P<sub>2</sub> funkcjonuje jako cytoplazmatyczny przekaźnik informujący o poziomie intermediatów trójwęglowych i fosfoheksoz, jak również o puli metabolicznie czynnego fosforanu i pirofosforanu. Wyniki dotychczasowych badań potwierdziły zakładany mechanizm regulacji stężenia Fru-2,6-P<sub>2</sub> in vivo oraz częściowo już wyjaśniły rolę, jaką ten efektor gra w komórkach roślinnych. Stosunkowo dobrze została poznana rola Fru-2,6-P<sub>2</sub> w mechanizmie integracji przemian węgla prowadzących do syntezy skrobi i syntezy sacharozy. W badaniach tych wykazano, że wzrost stosunku stężenia metabolitów trójwęglowych do fosforanu w cytoplazmie, jaki ma miejsce np. w pierwszych minutach po oświetleniu liści, powoduje hamowanie aktywności PFK-2 i aktywację fosfatazy fruktozo 2,6-bisfosforanowej. Efektem tych zmian jest spadek stężenia Fru-2,6-P<sub>2</sub> oraz wzmożona synteza sacharozy.

Zmiany stężenia Fru-2,6-P<sub>2</sub> towarzyszące intensyfikacji oddychania są przypuszczalnie wynikiem zmian stężenia 3-PGA będących efektem modyfikacji aktywności kinazy pirogronianowej lub karboksylazy fosfoenolopirogronianowej.

Regulacja syntezy Fru-2,6-P<sub>2</sub> przez 3-PGA i DHAP zależy od stężenia fosforanu, bowiem fosforan nie tylko bezpośrednio aktywuje PFK-2, ale w zależności od aktualnego stężenia wpływa na efektywność poszczególnych metabolitów trójwęglowych w regulacji aktywności enzymu. Mechanizmy regulujące stężenie fosforanu w cytoplazmie nie są dostatecznie poznane. Przede wszystkim nadal nie wiadomo, w jakim stopniu na poziom "czynnego" fosforanu wpływa fosforan zmagazynowany w wakuoli.

Hamowanie aktywności PFK-2 przez metabolity trójwęglowe zależy również od stężenia Fru-6-P działającego antagonistycznie w stosunku do DHAP i 3-PGA i znoszącego hamowanie syntezy Fru-2,6-P<sub>2</sub>. Synteza Fru-2,6-P<sub>2</sub> może być ponadto modyfikowana przez fizjologiczne stężenia PP<sub>i</sub>, który hamując aktywność PFK-2 działa przeciwnie w stosunku do ortofosforanu.

Powszechnie potwierdzanymi miejscami efektorowymi dla Fru-2,6-P<sub>2</sub> jest reakcja hydrolizy Fru-1,6-P<sub>2</sub> oraz reakcja transfosforylacji katalizowana przez PP<sub>i</sub>-PFK. O ile funkcja cytoplazmatycznej FBPazy jest dostatecznie jasna, to rola PP<sub>i</sub>-PFK jest nadal kontrowersyjna. Wbrew pierwotnym przypuszczeniom, które wiązały funkcję tego enzymu wyłącznie z glikolizą, obecnie zaczyna przeważać pogląd, że PP<sub>i</sub>-fosfofruktokinaza reguluje w cytoplazmie stężenie PP<sub>i</sub>. Przemiany PP<sub>i</sub> mają z jednej strony ścisły związek z metabolizmem sacharozy, z drugiej zaś z przemianami energetycznymi zachodzącymi w roślinach. W moim przekonaniu, dodatkowy szlak przemiany Fru-6-P/Fru-1,6-P<sub>2</sub> oraz szersze wykorzystanie PP<sub>i</sub> u roślin wiąże się tu z przewagą aktywności anabolicznej, która pociąga konieczność dostarczania większej ilości metabolitów do syntez niż do metabolizmu energetycznego w mitochondriach.

Przedstawione w pracy informacje prowadzą do wniosku, że zarówno rola Fru-2,6-P<sub>2</sub>, jak też problem metabolizmu PP<sub>i</sub> w roślinach są nadal otwarte i wymagają dalszych szczegółowych badań.

## LITERATURA

- [1] AP REES T, GREEN JH, WILSON PM. Pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and glycolysis in non-photosynthetic tissues of higher plants. *Biochem J* 1985; **227**: 299–304.
- [2] ASHIHARA H, STUPAVSKA S. Comparison of activities and properties of pyrophosphate- and adenosine triphosphate-dependent phosphofructokinases of black gram (*Phaseolus mungo*) seeds. *J Plant Physiol* 1984; **116**: 241–252.
- [3] AVIGAD G, BOHRER PJ. 6-phosphofructo-2-kinase and D-fructose-2,6-bisphosphatase activities in mung bean seedlings. *Biochim Biophys Acta* 1984; **798**: 317–324.
- [4] BAYSDORFER C. Purification of spinach leaf fructose-6-phosphate,2-kinase. *Plant Physiol* 1986; **80**: s. 204.
- [5] BEAUDRY RM, SEVERSON RF, BLACK CC, KAYS SJ. Banana ripening: implications of changes in glycolytic intermediate concentrations, glycolytic and glucogenic carbon flux, and fructose 2,6-bisphosphate concentration. *Plant Physiol* 1989; **91**: 1436–1444.
- [6] BERTAGNOLLI BL, YOUNATHAN ES, VOLL RJ, COOK PF. Kinetic studies on the activation of pyrophosphate-dependent phosphofructokinase from mung bean by fructose 2,6-bisphosphate and related compounds. *Biochemistry* 1986; **25**: 4682–4687.
- [7] BOTHA A-M, BOTHA FC. Effect of anoxia on the expression and molecular form of the pyrophosphate dependent phosphofructokinase. *Plant Cell Physiol* 1991; **32**: 1299–1302.
- [8] BOTHA A-M, BOTHA FC. Pyrophosphate dependent phosphofructokinase of *Citrullus lanatus*: molecular forms and expression of subunits. *Plant Physiol* 1991; **96**: 1185–1192.
- [9] BOTHA FC, OKENNEDY MM, DU PLESSIS S. Activity of key enzymes involved in carbohydrate metabolism in *Phaseolus vulgaris* cell suspension culture. *Plant Cell Physiol* 1992; **33**: 477–483.
- [10] BOTHA FC, SMALL JGC. Comparison of the activities and some properties of pyrophosphate and ATP dependent fructose- 6-phosphate 1-phosphotransferases of *Phaseolus vulgaris* seeds. *Plant Physiol* 1987; **83**: 772–777.
- [11] BOTHA FC, SMALL JGC, BURGER AL. Characterisation of pyrophosphate dependent phosphofructokinase from germinating bean seeds. *Plant Science* 1987; **51**: 151–157.
- [12] BOTHA FC, SMALL JGC, DE VRIES C. Isolation and characterization of pyrophosphate: D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase from cucumber seeds. *Plant Cell Physiol* 1986; **27**: 1285–1295.
- [13] BUCHANAN BB. Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Ann Rev Plant Physiol* 1980; **31**: 341–374.
- [14] CARNAL NW, BLACK CC. Phosphofructokinase activities in photosynthetic organisms. The occurrence of pyrophosphate- dependent 6-phosphofructokinase in plants and algae. *Plant Physiol* 1983; **71**: 150–155.
- [15] CHENG H-F, TAO M. Differential proteolysis of the subunits of pyrophosphate-dependent 6-phosphofructo-1-phosphotransferase. *J Biol Chem* 1990; **265**: 2173–2177.
- [16] CLAASSEN PAM, BUDDE MAW, DE RUYTER HJ, VAN CALKER MH, VAN ES A. Potential role of pyrophosphate: fructose 6-phosphate phosphotransferase in carbohydrate metabolism of cold stored tubers of *Solanum tuberosum* cv Bintje. *Plant Physiol* 1991; **95**: 1243–1249.
- [17] CSÉKE C, BUCHANAN BB. An enzyme synthesizing fructose 2,6-bisphosphate occurs in leaves and is regulated by metabolite effectors. *FEBS Lett* 1983; **155**: 139–142.
- [18] CSÉKE C, STITT M, BALOGH A, BUCHANAN BB. A product-regulated fructose 2,6-bisphosphatase occurs in green leaves. *FEBS Lett* 1983; **162**: 103–106.
- [19] DANCER JE, AP REES T. Phosphoribosyl pyrophosphate and the measurement of inorganic pyrophosphate in plant tissues. *Planta* 1989; **177**: 261–264.
- [20] DANCER JE, AP REES T. Effects of 2,4-dinitrophenol and anoxia on the inorganic-pyrophosphate content of the spadix of *Arum maculatum* and the root apices of *Pisum sativum*. *Planta* 1989; **178**: 421–424.
- [21] DENNIS DT, GREYSON MF. Fructose 6-phosphate metabolism in plants. *Physiol Plant* 1987; **69**: 395–404.
- [22] DOEHLERT DC, HUBER SC. Regulation of spinach leaf sucrose phosphate synthase by glucose-6-phosphate, inorganic phosphate and pH. *Plant Physiol* 1984; **73**: 989–994.
- [23] DUFF SM, MOORHEAD GBG, LEFEBVRE DD, PLAXTON WC. Phosphate starvation inducible "bypasses" of adenylate and phosphate dependent glycolytic enzymes in *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiol* 1989; **90**: 1275–1278.
- [24] EBERL D, PREISSLER M, STEINGRABER M, HAMPP R. Subcellular compartmentation of pyrophosphate and dark/light kinetics in comparison to fructose 2,6-bisphosphate. *Physiol Plant* 1992; **84**: 13–20.
- [25] EDWARDS J, AP REES T. Metabolism of UDP-glucose by developing embryos of round and wrinkled varieties of *Pisum sativum*. *Phytochemistry* 1986; **25**: 2033–2039.

- [26] EDWARDS J, APREES T, WILSON PM, MORRELL S. Measurement of the inorganic pyrophosphate in tissue of *Pisum sativum* L. *Planta* 1984; **162**: 188–191.
- [27] EL-MAGHRABI MR, PILKIS SJ. Rat liver 6-phosphofructo 2-kinase fructose 2,6-bisphosphatase: A review of relationships between the two activities of the enzyme. *J Cell Biochem* 1984; **26**: 1–17.
- [28] ENOMOTO T, OHYAMA H, KODAMA M. Purification and characterization of pyrophosphate: D-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase from rice seedlings. *Biosci Biotech Biochem* 1992; **56**: 251–255.
- [29] FLÜGGE UI, GERBER J, HELDT HW. Regulation of the reconstituted chloroplast phosphate translocator by an  $H^+$  gradient. *Biochim Biophys Acta* 1983; **725**: 229–237.
- [30] FLÜGGE U-I, HELDT HW. The phosphate translocator of the chloroplast envelope. Isolation of the carrier protein and reconstitution of transport. *Biochim Biophys Acta* 1981; **638**: 296–304.
- [31] GARLAND WJ, DENNIS DT. Plastid and cytosolic phosphofructokinases from the developing endosperm of *Ricinus communis*. I. Separation, purification and initial characterization of the isozymes. *Arch Biochem Biophys* 1980; **204**: 302–309.
- [32] GARLAND WJ, DENNIS DT. Plastid and cytosolic phosphofructokinases from the developing endosperm of *Ricinus communis*. II. Comparison of the kinetic and regulatory properties of the isoenzymes. *Arch Biochem Biophys* 1980; **204**: 310–317.
- [33] GEE RW, BYERRUM RU, GERBER DW, TOLBERT NE. Differential inhibition and activation of two leaf dihydroxyacetone phosphate reductases. Role of fructose 2,6-bisphosphate. *Plant Physiol* 1988; **87**: 379–383.
- [34] GROSS P, AP REES T. Alkaline inorganic pyrophosphatase and starch synthesis in amyloplasts. *Planta* 1986; **167**: 140–145.
- [35] HATZFELD W-D, DANCER J, STITT M. Direct evidence that pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase can act as a glycolytic enzyme in plants. *FEBS Lett* 1989; **254**: 215–218.
- [36] HÄUSLER R, LATZKO E. Cytosolic phosphofructokinase from spinach leaves. I. Purification, characterization and regulation. *Plant Physiol* 1989; **90**: 1498–1505.
- [37] HAWKER JS. Sucrose. [w] Dey PM, Dixon RA [red.] *Biochemistry of storage carbohydrates in green plants*. New York: Academic Press 1985; 1–51.
- [38] HEBER U, HELDT HW. The chloroplast envelope: structure, function, and role in leaf metabolism. *Ann Rev Plant Physiol* 1981; **32**: 139–168.
- [39] HERZOG B, STITT M, HELDT HW. Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose 2,6-bisphosphate. III. Properties of the cytosolic fructose 1,6-bisphosphatase. *Plant Physiol* 1984; **75**: 561–565.
- [40] HUBER SC. Fructose 2,6-bisphosphate as a regulatory metabolite in plants. *Ann Rev Plant Physiol* 1986; **37**: 233–246.
- [41] HUBER SC, AKAZAWA T. A novel sucrose synthase pathway for sucrose degradation in cultured sycamore cells. *Plant Physiol* 1986; **81**: 1008–1013.
- [42] HUBER SC, HUBER JL. In vitro phosphorylation and inactivation of spinach leaf sucrose-phosphate synthase by an endogenous protein kinase. *Biochem Biophys Acta* 1990; **1091**: 393–400.
- [43] HUEL, RIDER MH. Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues. *Biochem J* 1987; **245**: 313–324.
- [44] KEŚY J, KOWALCZYK S. Comparison of the activity of the enzymes participating in fructose-6-phosphate/fructose-1,6-bisphosphate interconversion during early stages of mung bean (*Phaseolus coccineus* L.) development. Measurement of pyrophosphate and fructose-2,6-bisphosphate content. *J Plant Physiol* 1987; **127**: 411–421.
- [45] KOMBRINK E, KRUGER NJ. Inhibition by metabolic intermediates of pyrophosphate: fructose 6-phosphate phosphotransferase from germinating castor bean endosperm. *Z Pflanzenphysiol* 1984; **114**: 443–453.
- [46] KOMBRINK E, KRUGER NJ, BEEVERS H. Kinetic properties of pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase from germinating castor bean endosperm. *Plant Physiol* 1984; **74**: 395–401.
- [47] KOWALCZYK S. Rapid oscillation of fructose 2,6-bisphosphate levels in plant storage tissues as a result of resumption of metabolic activity. *Biochem Physiol Pflanzen* 1989; **184**: 371–376.
- [48] KOWALCZYK S. The characteristic of pyrophosphate: D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferases from *Sansevieria trifasciata* leaves and *Phaseolus coccineus* stems. *Acta Biochim Polon* 1987; **34**: 253–268.
- [49] KOWALCZYK S. Błonowe pirofosfatazy transportujące protony. *Post Biochem – w druku*.
- [50] KOWALCZYK S, JANUSZEWSKA B, CYMERSKA E, MASŁOWSKI P. The occurrence of inorganic pyrophosphate: D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase in higher plants. I. Initial characterization of partially purified enzyme from *Sansevieria trifasciata* leaves. *Physiol Plant* 1984; **60**: 31–37.
- [51] KRUGER NJ, BEEVERS H. Effect of fructose 2,6-bisphosphate on the kinetic properties of cytoplasmic fructose 1,6-bisphosphatase from germinating castor bean endosperm. *Plant Physiol* 1984; **76**: 49–54.
- [52] KRUGER NJ, BEEVERS H. Synthesis and degradation of fructose 2,6-bisphosphate in endosperm of castor bean seedlings. *Plant Physiol* 1985; **77**: 358–364.

- [53] KRUGER NJ, KOMBRINK E, BEEVERS H. Pyrophosphate: fructose 6-phosphate phosphotransferase in germinating castor bean seedlings. *FEBS Lett* 1983; **153**: 409–412.
- [54] KWIATKOWSKA J. Fruktozo-2,6-bisfosforan, nowy efektor przemiany glukozy. *Post Biochem* 1982; **28**: 401–412.
- [55] LARONDELLE Y, MERTENS E, VAN SCHAFTINGEN E, HERS H-G. Purification and properties of spinach leaf phosphofructokinase 2/fructose 2,6-bisphosphatase. *Eur J Biochem* 1986; **161**: 351–357.
- [56] LARONDELLE Y, MERTENS E, VAN SCHAFTINGEN E, HERS H-G. Fructose 2,6-bisphosphate hydrolyzing enzymes in higher plants. *Plant Physiol* 1989; **90**: 827–834.
- [57] LESICKI A, KASPRZYK A. Regulacja metabolizmu węglowodanowego w hepatocytach przy udziale fruktozo-2,6-bisfosforanu, nowo odkrytego metabolitu. *Post Biol Kom* 1984; **11**: 1–16.
- [58] LUCAS WJ, MADORE MA. Recent advances in sugar transport. [w] Preiss J [red.] *The Biochemistry of Plants*, vol. 14, Carbohydrates. New York: Academic Press 1988: 35–84.
- [59] MACDONALD FD, CHOU Q, BUCHANAN BB. Ion-exchange chromatography separates activities synthesizing and degrading fructose 2,6-bisphosphate from C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> leaves but not from rat liver. *Plant Physiol* 1987; **85**: 13–16.
- [60] MACDONALD FD, CHOU Q, BUCHANAN BB, STITT M. Purification and characterization of fructose-2,6-bisphosphatase, a substrate-specific cytosolic enzyme from leaves. *J Biol Chem* 1989; **264**: 5540–5544.
- [61] MACDONALD FD, CSÉKE C, CHOU Q, BUCHANAN BB. Activities synthesizing and degrading fructose 2,6-bisphosphate in spinach leaves reside on different proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 2742–2746.
- [62] MAHAJAN R, SINGH R. Properties of pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase from endosperm of developing wheat (*Triticum aestivum* L.) grains. *Plant Physiol* 1989; **91**: 421–426.
- [63] MARCUS F, MOBERLY L, LATSHAW SP. Comparative amino acid sequence of fructose-1,6-bisphosphatases: Identification of a region unique to the light-regulated chloroplast enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 5379–5383.
- [64] MASŁOWSKI P, KOWALCZYK S. Rola nieorganicznego pirofosforanu w bioenergetyce komórki. *Post Biochem* 1981; **27**: 147–156.
- [65] MERTENS E. Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase, an anerobic glycolytic enzyme? *FEBS Lett* 1991; **258**: 1–5.
- [66] MERTENS E, LARONDELLE Y, HERS H-G. Induction of pyrophosphate: fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase by anoxia in rice seedlings. *Plant Physiol* 1990; **93**: 584–587.
- [67] MERTENS E, MARCELLIN P, VAN SCHAFTINGEN E, HERS H-G. Effect of ethylene treatment on the concentration of fructose-2,6-bisphosphate and on the activity of phosphofructokinase 2/fructose-2,6-bisphosphate in banana. *Eur J Biochem* 1987; **167**: 579–583.
- [68] MORRELL S, APREES T. Sugar metabolism in developing tubers of *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* 1986; **25**: 1579–1585.
- [69] NEUHAUS HE, KRAUSE K-P, STITT M. Comparing of pyrophosphate turnover and the maximum catalytic activity of pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferases in leaves. *Phytochemistry* 1990; **29**: 3411–3415.
- [70] PHARR DM, HUBER SC. Resolution and characterization of multiple cytosolic phosphatases capable of hydrolyzing fructose 1,6-bisphosphate in spinach and soybean leaves. *Physiol Plant* 1984; **60**: 577–582.
- [71] PRAMANIK AM, BINGSMARK S, LINDAHL M, BALTSCHJEFFSKY H, BALTSCHJEFFSKY M, ANDERSSON B. Inorganic-pyrophosphate-dependent phosphorylation of spinach thylakoid proteins. *Eur J Biochem* 1991; **198**: 183–186.
- [72] PREISS J, ROBINSON N, SPILATRO S, MCNAMARA K. Starch synthesis and its regulation. [w] Heath RL, Preiss J [red.] *Regulation of Carbon Partitioning in Photosynthetic Tissue*. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologist 1985: 1–26.
- [73] QUICK P, NEUHAUS E, FEIL R, STITT M. Fluoride leads to an increase of inorganic pyrophosphate and an inhibition of photosynthetic sucrose synthesis in spinach leaves. *Biochim Biophys Acta* 1989; **973**: 263–271.
- [74] REA PA, SANDERS P. Tonoplast energization: Two H<sup>+</sup> pumps, one membrane. *Physiol Plant* 1987; **71**: 131–141.
- [75] SABULARSE DC, ANDERSON RL. Inorganic pyrophosphate: D-Fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase in mung beans and its activation by D-fructose 1,6-bisphosphate and D-glucose 1,6-bisphosphate. *Biochem Biophys Res Commun* 1981; **100**: 1423–1429.
- [76] SABULARSE DC, ANDERSON RL. D-fructose 2,6-bisphosphate: a naturally occurring activator for inorganic pyrophosphate: D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase in plants. *Biochem Biophys Res Commun* 1981; **103**: 848–855.

- [77] SCHÄFER G, HEBER U, HELDT HW. Glucose transport into spinach chloroplasts. *Plant Physiol* 1977; **60**: 286–289.
- [78] SMEEKENS S, MACDONALD FD, BUCHANAN BB. Studies on the entry of fructose-2,6-bisphosphate into chloroplasts. *Plant Physiol* 1989; **89**: 1270–1274.
- [79] SMYTH DA, BLACK CC. Measurement of the pyrophosphate content of plant tissues. *Plant Physiol* 1984; **75**: 862–864.
- [80] SOLL J, WOTZEL C, BUCHANAN BB. Enzyme regulation in  $C_4$  photosynthesis. Identification and localization of activities catalyzing the synthesis and hydrolysis of fructose-2,6-bisphosphate in corn leaves. *Plant Physiol* 1985; **77**: 999–1003.
- [81] SOULIÉ J-M, RIVIERE M, BALDET P, RICARD J. Kinetics of the conformational transition of the spinach chloroplast fructose 1,6-bisphosphatase induced by fructose 2,6-bisphosphate. *Eur J Biochem* 1991; **195**: 671–678.
- [82] STEINGRABER M, OUTLAW WH, HAMPP R. Subcellular compartmentation of fructose 2,6-bisphosphate in oat mesophyll cells. *Planta* 1988; **175**: 204–208.
- [83] STEUP M, PEAVEY DG, GIBBS M. The regulation of starch metabolism by inorganic phosphate. *Biochem Biophys Res Comm* 1976; **72**: 1554–1561.
- [84] STITT M. Product inhibition of potato tuber pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase by phosphate and pyrophosphate. *Plant Physiol* 1989; **89**: 628–633.
- [85] STITT M, CSÉKE C, BUCHANAN BB. Regulation of fructose 2,6-bisphosphate concentration in spinach leaves. *Eur J Biochem* 1984; **143**: 89–93.
- [86] STITT M, CSÉKE C, BUCHANAN BB. Occurrence of a metabolite-regulated enzyme synthesizing fructose 2,6-bisphosphate in plant sinks. *Physiol Veg* 1985; **23**: 819–827.
- [87] STITT M, CSÉKE C, BUCHANAN B. Ethylene-induced increase in fructose-2,6-bisphosphate in plant storage tissues. *Plant Physiol* 1986; **80**: 246–248.
- [88] STITT M, GERHARDT R, KÜRZEL B, HELDT HW. A role for fructose 2,6-bisphosphate in the regulation of sucrose synthesis in spinach leaves. *Plant Physiol* 1983; **72**: 1139–1141.
- [89] STITT M, GERHARDT R, WILKE I, HELDT HW. The contribution of fructose 2,6-bisphosphate to the regulation of sucrose synthesis during photosynthesis. *Physiol Plant* 1987; **69**: 377–386.
- [90] STITT M, HELDT HW. Simultaneous synthesis and degradation of starch in spinach chloroplasts in the light. *Biochim Biophys Acta* 1981; **638**: 1–11.
- [91] STITT M, HELDT HW. Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose 2,6-bisphosphate. VI. Regulation of the cytosolic fructose 1,6-bisphosphate in spinach leaves by an interaction between metabolic intermediates and fructose 2,6-bisphosphate. *Plant Physiol* 1985; **79**: 599–608.
- [92] STITT M, HERZOG B, HELDT HW. Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose 2,6-bisphosphate. I. Coordination of  $CO_2$  fixation and sucrose synthesis. *Plant Physiol* 1984; **75**: 548–553.
- [93] STITT M, HERZOG B, HELDT HW. Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose 2,6-bisphosphate. V. Modulation of the spinach leaf cytosolic fructose 1,6-bisphosphatase activity in vitro by substrate, products, pH, magnesium, fructose 2,6-bisphosphate, adenosine monophosphate, and dihydroxyacetone phosphate. *Plant Physiol* 1985; **79**: 590–598.
- [94] STITT M, KÜRZEL B, HELDT HW. Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose 2,6-bisphosphate. II. Partitioning between sucrose and starch. *Plant Physiol* 1984; **75**: 554–560.
- [95] STITT M, MIESKES G, SOLING H-D, HELDT H-W. On a possible role of fructose 2,6-bisphosphate in regulating photosynthetic metabolism in leaves. *FEBS Lett* 1982; **145**: 217–222.
- [96] STITT M, VASELLA A. Biological action of phosphate analogs of fructose 2,6-bisphosphate on enzyme from higher plants. *FEBS Lett* 1988; **228**: 60–64.
- [97] STITT M, WIRTZ W, HELDT HW. Regulation of sucrose synthesis by cytoplasmic fructosebisphosphatase and sucrose phosphate synthase during photosynthesis in varying light and carbon dioxide. *Plant Physiol* 1983; **72**: 767–774.
- [98] THOM M, LEIGH RA, MARETZKI A. Evidence for the involvement of a UDP-glucose-dependent group translocator in sucrose uptake into vacuoles of storage roots of red beet. *Planta* 1986; **167**: 410–413.
- [99] USUDA H, KALT-TORRES W, KERR PS, HUBER SC. Diurnal changes in maize leaf photosynthesis. II. Levels of metabolic intermediates of sucrose synthesis and the regulatory metabolite fructose 2,6-bisphosphate. *Plant Physiol* 1987; **83**: 289–293.
- [100] VAN SCHAFTINGEN E, HERS H-G. Fructose 2,6-bisphosphate in relation with the resumption of metabolic activity in slices of Jerusalem artichoke tubers. *FEBS Lett* 1983; **164**: 195–200.

- [101] VAN SCHAFTINGEN E, LEDERER B, BARTRONS R, HERS H-G. A kinetic study of pyrophosphate: fructose -6-phosphate phosphotransferase from potato tubers. Application to a microassay of fructose 2,6-bisphosphate. *Eur J Biochem* 1982; **129**: 191-195.
- [102] WALKER GH, HUBER SC. ATP-dependent activation of a new form of spinach leaf 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase. *Arch Biochem Biophys* 1987; **258**: 58-64.
- [103] WALKER GH, HUBER SC. Spinach leaf 6-phosphofructo-2-kinase. Isolation of a new enzyme form that undergoes ATP-dependent modification. *FEBS Lett* 1987; **213**: 375-380.
- [104] WEEDEN NF, CSÉKE C, BUCHANAN BB. Inhibition of leaf cytosolic fructose bisphosphatase by fructose-2,6-bisphosphate. *Plant Physiol* 1982; **169**: 60.
- [105] WEINER H, STITT M, HELDT HW. Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves. *Biochim Biophys Acta* 1987; **893**: 13-21.
- [106] WONG JH, KANG T, BUCHANAN BB. A novel pyrophosphate fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase from carrot roots. *FEBS Lett* 1988; **238**: 405-410.
- [107] WONG JH, KISS F, WU M-X, BUCHANAN BB. Pyrophosphate fructose 6-P 1-phosphotransferase from tomato fruit. Evidence for change during ripening. *Plant Physiol* 1990; **94**: 499-506.
- [108] WOOD HG. Some reactions in which inorganic pyrophosphate replaces ATP and serves as a source of energy. *Federation Proc* 1977; **36**: 2197-2205.
- [109] WU M-X, SMYTH DA, BLACK CC. Regulation of pea seed pyrophosphate-dependent phosphofructokinase: Evidence for interconversion of two molecular forms as a glycolytic regulatory mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 5051-5055.
- [110] YAN T-FJ, TAO M. Multiple forms of pyrophosphate: D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase from wheat seedlings. Regulation by fructose 2,6-bisphosphate. *J Biol Chem* 1984; **259**: 5087-5092.
- [111] ZIMMERMANN G, KELLY GJ, LATZKO E. Efficient purification and molecular properties of spinach chloroplast fructose 1,6-bisphosphatase. *Eur J Biochem* 1976; **70**: 361-367.
- [112] ZIMMERMANN G, KELLY GJ, LATZKO E. Purification and properties of spinach leaf cytoplasmic fructose-1,6-bisphosphatase. *J Biol Chem* 1978; **253**: 5952-5956.

Otrzymano: 05.11.1992 r.

Przyjęto: 22.01.1993 r.

Adres autora: 87-100 Toruń, ul. Wąska 8B/16





## NIEKTÓRE FUNKCJE KINAZ BIAŁKOWYCH I FOSFATAZ BIAŁKOWYCH ZWIĄZANE Z REGULACJĄ CYKLU KOMÓRKOWEGO I RÓŻNICOWANIEM KOMÓREK\*

### SOME FUNCTIONS OF PROTEIN KINASES AND PROTEIN PHOSPHATASES IN REGULATION OF CELL CYCLE AND DIFFERENTIATION OF CELLS\*

Jerzy KAWIAK, Marek JAKÓBISIAK

Zakład Cytologii Klinicznej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego i Zakład  
Immunologii Instytutu Biostruktury AM w Warszawie

*Streszczenie.* Kinazy białkowe i fosfatazy białkowe są odpowiedzialne za fosforylację i defosforylację białek. Regulują one m.in. takie procesy, jak proliferacja i różnicowanie komórek. Łańcuch reakcji fosforylacji i defosforylacji może być uruchomiony przez czynnik wzrostu działający na odpowiednią komórkę lub przez antygen oddziałujący z właściwym limfocytom. Receptory dla czynników wzrostu wykazują często aktywność kinaz białkowych lub są związane z tymi enzymami. Jednym z końcowych etapów tych reakcji jest aktywacja czynnika transkrypcyjnego bezpośrednio oddziałującego z DNA w okolicy odpowiednich genów. Wypaczona funkcja kinaz białkowych może prowadzić do transformacji nowotworowej komórki.

*Summary.* Protein kinases and phosphatases are responsible for phosphorylation and dephosphorylation of proteins. They are engaged, among others, in regulation of proliferation and differentiation of cells. The chain of reactions of phosphorylation and dephosphorylation can be initiated by growth factors acting on the target cells or by antigen acting on the specific lymphocyte. Receptors for growth have intrinsic activity of protein kinase or are associated with such an enzyme activity. One of the last steps in these reactions is activation of the transcription factor directly interacting with DNA-region of an appropriate gene. The disturbed function of protein kinase may cause neoplastic transformation of the cell.

E.G. Krebs i E.H. Fischer współpracują ze sobą od ponad 30 lat i zajmują się badaniem kinaz białkowych i fosfataz białkowych. Enzymy te biorą udział w regulacjach wielu procesów komórkowych. Kinazy białkowe serynowo-treoninowe katalizują wprowadzanie grupy fosforanowej do reszt seryny (Ser) ew. treoniny (Thr) białek, a tyrozynowe do reszt tyrozyny (Tyr). Opisano również kinazy białkowe, które wprowadzają grupy fosforanowe do reszt Ser/Thr

\*W związku z nagrodą Nobla z 1992 r. z zakresu Medycyny dla Edwina G. Krebsa oraz Edmonda H. Fischera – For memory of Nobel Prize 1992 in Medicine for Edwin G. Krebs and Edmond H. Fischer

oraz Tyr [3]. Również fosfatazy białkowe są Ser/Thr oraz Tyr zależnie od reszty aminokwasowej fosforylowanej w białku, z którego grupa fosforanowa jest usuwana przy udziale enzymu. Opisano jednak fosfatazy białkowe, które mają swoistość do Ser/Thr i Tyr, np. fosfataza VH1 z wirusa krowianki (*vaccinia*) [16] czy fosfataza białkowa 2A [19]. Lista niektórych kinaz białkowych i fosfataz białkowych jest przedstawiona w Tabeli.

Sekwencje substratu (*consensus sequence*) rozpoznawane przez kinazy białkowe są stosunkowo krótkie, zbudowane z kilku reszt aminokwasów [9]. Fosfatazy białkowe rozpoznają dłuższe sekwencje, kilkunastoaminokwasowe [5]. Przymuszczalnie większa długość rozpoznawanej sekwencji w przypadku fosfataz białkowych wiąże się z tworzeniem struktur wyższego rzędu między enzymem a jego substratem. Jeżeli tak byłoby, to podstawowy mechanizm fosforylacji byłby odmienny od mechanizmu defosforylacji białek.

TABELA. Lista niektórych kinaz i fosfataz białkowych (wg [9,16])

Kinazy białkowe	Fosfatazy białkowe
Kinaza białkowa cAMP-zależna	fosfataza białkowa tyrozynowa CD45
Kinaza białkowa cGMP-zależna	fosfataza kinazy pyrogronianowej
Kinaza białkowa C (PKC)	fosfataza białkowa 2A
Kinaza białkowa AMP-aktywowana	kalcineuryna
p34 <sup>cdc2</sup>	białko cdc25
Kinaza kazeiny II	białko VH1 wirusa krowianki
Kinaza S6 rybosomowa	
Kinazy łańcuchów (L i H) miozyny	
Kinaza białkowa II Ca/kalmodulino zależna	

## KASKADY KINAZ BIAŁKOWYCH

Peptydowe czynniki wzrostu wywołują falę fosforylacji wielu białek komórkowych. Dzieje się tak dlatego, ponieważ receptory dla tych czynników mają często aktywność kinaz białkowych. Kinazy białkowe często działają w układach kaskadowych. Poniżej przedstawiono takie układy aktywowane czynnikami wzrostu.

Wzrost aktywności kinazy białkowej kazeinowej II (CKII) zachodzi w komórkach pod wpływem insuliny, insulino-podobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1, *Insulin-like Growth Factor-1*), naskórkowego czynnika wzrostu (EGF), surowicy [12]. CKII jest kinazą Ser/Thr o słabo poznanych funkcjach. Można sugerować, że enzym bierze udział w zjawisku proliferacji komórek, ponieważ jest substratem kinazy białkowej p34<sup>cdc2</sup>. Oczyszczona z jaj jeżowca kinaza białkowa p34<sup>cdc2</sup> in vitro fosforyluje i zwiększa aktywność CKII od 1,5 do 5 razy. Kinaza białkowa kazeinowa II, podobnie jak kinaza p34<sup>cdc2</sup>, jest zlokalizowana w jądrze komórkowym i cytoplazmie. Potencjalnie CKII mogłaby przekazywać sygnały do jądra komórkowego. Substratami dla CKII są niektóre regulatorowe białka jądrowe, takie jak c-Myc [14] i c-Myb [13] kodowane przez onkogeny i zlokalizowane w jądrze. W białku c-Myb jest fosforylowana Ser/Tre blisko N-końca łańcucha, w pobliżu miejsca wiązania się c-Myb z DNA. Fosforylacja blokuje wiązanie c-Myb z DNA. W komórkach transformowanych nowotworowo białko c-Myb jest pozbawione fosforylowanego odcinka blisko N-końca. Stąd wiązanie c-Myb z DNA nie podlega regulacji przez CKII, a komórki transformowane proliferują w sposób niezależny od regulacji białkami c-Myb. Antyonkogen – białko p53 [21]



aktywność kinazowa jest całkiem inaktywowana przez fosfatazę białkową 2A i częściowo przez fosfatazę białkową CD45.

Kinazy MAP mają aktywność kinaz białkowych Ser/Thr, ale same są aktywowane przez fosforylację na Tyr i Thr. Wcześniejszym składnikiem tej kaskady jest aktywator kinaz MAP. Zauważono [18], że dobrze oczyszczone preparaty ERK1 i ERK2 mogą się autofosforylować na Tyr i Thr. Proces ten przebiega jednak powoli w porównaniu z aktywacją w obecności aktywatora kinaz MAP. Przypuszczalnie aktywator kinaz MAP wiąże się z kinazami MAP zwiększając ich zdolność do autofosforylacji, ale sam nie jest kinazą. Sugerowano też, że wcześniejszymi składnikami opisywanej kaskady są: kinaza kinazy MAP, której przedstawicielem jest białko MEK (od *MAP kinase* or *ERK kinase*) [3] oraz jeszcze wcześniejszy stopień tej kaskady reprezentowany przez białko Raf-1 [10].

Wyrażono przekonanie, że kinazy MAP są ważnymi regulatorami podczas przejścia komórki z Go do fazy G1 cyklu komórkowego. Kinazy MAP mogą jednak również być aktywowane bez związku z proliferacją np. w komórkach układu nerwowego przez neurotransmitery i peptydy, takie jak NGF.

## SKUTKI AKTYWACJI KINAZ BIAŁKOWYCH W LIMFOCYTACH

Dobrze jest prześledzić wspomniany proces na przykładzie komórkowym. Podczas aktywacji limfocytów przez antygen poprzedzającej ich proliferację i różnicowanie w komórki efektorowe odpowiedzi immunologicznej obserwuje się kilka zachodzących kolejno procesów, w których bardzo istotną funkcję pełnią kinazy i fosfatazy białkowe. Jednym z najwcześniej obserwowanych w limfocytach zjawisk po ich pobudzeniu przez antygen jest aktywacja kinaz białkowych tyrozynowych. Zachodzi ona już w kilka sekund po związaniu antygeny.

Następnie aktywowane są kinazy białkowe Ser/Thr, a w kolejnym etapie czynniki transkrypcyjne uruchamiające transkrypcję określonych genów, których aktywacja jest niezbędna do proliferacji limfocytów i do przekształcenia się ich w komórki efektorowe. Niektóre kinazy białkowe tyrozynowe są bezpośrednio związane z receptorem immunoglobulinowym limfocytu B, np. kinaza Lyn, albo z receptorem rozpoznającym antygen limfocytu T, np. kinaza p56<sup>lck</sup> kodowana protoonkogenem *lck*. Kinaza p56<sup>lck</sup> bierze udział w transdukcji sygnałów w limfocycie T fosforylując i aktywując wspomniane już (rys. 1) kinazy MAP [4]. Informacyjny RNA protoonkogenu *lck* ma na końcu 5' sekwencję znacznie ograniczającą wydajność translacji białka p56<sup>lck</sup> in vivo. Tej regulatorowej sekwencji-5' nie mają mRNA białka p56<sup>lck</sup> komórek pewnego chłoniaka, co powoduje nadmierną ekspresję tej kinazy białkowej i może być jedną z przyczyn podtrzymania aktywności podziałowej komórek chłoniaka [15].

Jak już wspomniano, droga wiodąca od aktywacji kinaz białkowych Tyr do aktywacji kinaz białkowych Ser/Thr nie jest do końca poznana. Wiadomo, że ogniwem pośrednim jest aktywacja fosfolipazy C $\gamma$ 1 i C $\gamma$ 2. Sugerowano, że dochodzi do tego w wyniku bezpośredniej fosforylacji reszt tyrozynowych tej fosfolipazy, a według innych przypuszczeń kinazy białkowe tyrozynowe aktywują jedno z białek G przez fosforylację białka stymulującego aktywność GTPazową (*GTPase Activating Protein* – GAP). Dopiero białko G uwolnione z hamującego jego aktywność białka GAP aktywowałoby fosfolipazę C. Fosfolipaza C katalizuje hydrolizę difosforanu fosfatydyloinozytolu i uwalnia jego produkty: diacyloglicerol i trifosforan inozytolu. Diacyloglicerol aktywuje kinazę C (Ser/Thr), która z kolei aktywuje czynniki transkry-

pcyjne, m.in. czynnik NF-kB. Aktywacja NF-kB zachodzi w wyniku fosforylacji przez kinazę białkową C jego inhibitora I-kB. Fosforylacja ta powoduje odłączenie się inhibitora I-kB od czynnika NF-kB [1].

Wydaje się, że w trakcie aktywacji limfocytów istotną funkcję pełnią również fosfatazy białkowe, np. fosfataza CD45 [5,7]. W procesie aktywacji limfocyty T oddziałuje ona na kinazę białkową Lck usuwając grupę fosforanową Tyr w pozycji 505. Ta defosforylacja zwiększa aktywność kinazową kinazy Lck.

## KINAZY I FOSFATAZY BIAŁKOWE W REGULACJI CYKLU KOMÓRKOWEGO

Kinazy i fosfatazy białkowe prawdopodobnie biorą udział w regulacji cyklu komórkowego. W jednej z prac Krebs i Fischer nawiązują do klasycznych doświadczeń Masui i Markerta, w których autorzy ci wywoływali dojrzewanie oocytów żaby (mejozę) wstrzyknięciem cytoplazmy pobranej od oocytów pobudzonych progesteronem. Początkowo nieznaną czynnik cytoplazmatyczny, którym można było pobudzić dojrzewanie, nazwano MPF (*Maturation Promoting Factor*). Dzisiaj wiadomo, że czynnikiem tym jest kompleks kinazy białkowej p34<sup>cdc2</sup> i cykliny B [6, 8, 22] oraz że taki aktywny kompleks pojawia się podczas każdego podziału (nie tylko mejotycznego) i jest obecny również w komórkach człowieka [11].

Krebs i Fischer [20] pobudzali dojrzewanie oocytów żaby (gat. *Xenopus*) insuliną. Dojrzewanie to można było zahamować na kilka godzin wstrzyknięciem do oocytu fosfatazy białkowej tyrozynowej izolowanej i oczyszczonej z łożyska ludzkiego. Obserwację tę można było interpretować jako dowód istotnego znaczenia procesów fosforylacji i defosforylacji białek w dojrzewaniu oocytu, co wynika zresztą również z prac innych autorów. Krebs i Fischer stwierdzili, że wstrzyknięta fosfataza białkowa tyrozynowa była w oocytach w stężeniu ok. 10 x wyższym niż w kontroli i była stabilna co najmniej przez 18 godz. Jej rozmieszczenie w komórce było podobne jak w kontrolnych oocytach, tj. na biegunie animalnym. Hamowanie dojrzewania zachodziło również wtedy, gdy fosfatazę białkową wstrzyknięto do oocytu w 2–4 godz. po pobudzeniu insuliną. Hamowanie wstrzyknięciem fosfatazy białkowej można było obserwować również po pobudzeniu dojrzewania oocytu progesteronem bądź MPF, które nie działają przez receptor insulinowy. Wnioskowano, że fosfataza proteinowa tyrozynowa hamuje dojrzewanie oocytu przez wpływ na miejsce leżące daleko za receptorem insuliny (w błonie komórkowej) w kaskadzie kinaz białkowych, prawdopodobnie w związku z MPF (w cytoplazmie i jądrze komórkowym).

Nagrodę Nobla otrzymują zwykle osoby, które pracowały przez wiele lat nad rozwiązaniem problemów naukowych, a ich odkrycia zostały potwierdzone w wielu laboratoriach. Badania E.G. Krebsa i E.H. Fischera tworzą solidny pomost łączący dość dobrze poznane procesy transdukcji sygnałów przez błonę komórkową oraz słabiej poznane procesy zachodzące w jądrze komórkowym prowadzące do ekspresji genów i regulacji wielu procesów komórkowych, w tym również proliferacji i różnicowania komórek.

## LITERATURA

- [1] BAUERLE PA, BALTIMORE D. Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF- $\kappa$ B transcription factor. *Cell* 1988; **53**: 211–217.
- [2] BOULTON TG, YANCOPOULOS GD, GREGORY JS, SLAUGHTER C, MOOMAW C, HSU J, COBB MH. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* 1990; **249**: 64–67.
- [3] CREWS CM, ALESSANDRINI A, ERIKSON RL. The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the *ERK* gene product. *Science* 1992; **258**: 478–480.
- [4] ETTEHADIEH E, SANGHERA JS, PELECH SL, HESS-BIENZ D, WATTS J, SHASTRI N, AEBERSOLD R. Tyrosyl phosphorylation and activation of MAP kinases by p56<sup>lck</sup>. *Science* 1992; **255**: 853–855.
- [5] FISCHER EH, CHARBONNEAU H, TONKS NK. Protein tyrosine phosphatases: A diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science* 1991; **253**: 401–406.
- [6] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Regulacja cyklu komórkowego – historii i komplikacji ciąg dalszy. *Post Biochemii* 1992; **38**: 98–107.
- [7] JANEWAY CA, GOLSTEIN P. Lymphocyte activation and effector functions. *Curr Opin Immunol* 1992; **4**: 241–245.
- [8] KAWIAK J. Regulacja cyklu komórkowego. *Post Biol Kom* 1990; **17**: 325–333.
- [9] KENNELLY PJ, KREBS EG. Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* 1991; **266** (24): 15555–15558.
- [10] KYRIAKIS JM, APP H, ZHANG X, BANERJEE P, BRAUTIGAN DZ, RAPP UR, AVRUCH J. Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 1992; **358**: 417–421.
- [11] LEE MG, NURSE P. Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature* 1987; **327**: 31–35.
- [12] LICHTFIELD DW, LOZEMAN FJ, CICIRELLI MF, HARRYLOCK M, ERICSSON LH, PIENING CJ, KREBS EG. Phosphorylation of the  $\beta$  subunit of casein kinase II in human A431 cells. Identification of the autophosphorylation site and a site phosphorylated by p34<sup>cdc2</sup>. *J Biol Chem* 1991; **266**: 20380–89.
- [13] LUSCHER B, CHRISTENSEN E, LICHTFIELD DW, KREBS EG, EISENMAN RN. Myb DNA binding inhibited by phosphorylation at site deleted during oncogenic activation. *Nature* 1990; **344**: 517–522.
- [14] LUSCHER B, KUENZEL EA, KREBS EG, EISENMAN RN. Myc oncoproteins are phosphorylated by casein kinase II. *EMBO J* 1989; **8**: 1111–1119.
- [15] MARTH JD, OVERELL RW, MEIER KE, KREBS EG, PERLMUTTER RM. Translational activation of the *lck* proto-oncogene. *Nature* 1988; **332**: 171–173.
- [16] MORENO S, NURSE P. Clues to action of *cdc25* protein. *Nature* 1991; **351**: 194.
- [17] RATAJCZAK MZ, KANT JA, LUGER SM, HIJIYA N, ZHANG J, ZON G, GERWITZ AM. In vivo treatment of human leukemia in a scid mouse model with *c-myb* antisense oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci* 1992; **89**: 11823–11827.
- [18] SEGER R, AHN NG, BOULTON TG, YANCOPOULOS GD, PANAYOTATOS N, RADZIEJOWSKA E, ERICSSON L, BRATLIEN RL, COBB MH, KREBS EG. Microtubule-associated protein 2 kinases, ERK1 and ERK2, undergo autophosphorylation on both tyrosine and threonine residues: Implications for their mechanism of activation. *Proc Natl Acad Sci* 1991; **88**: 6142–6146.
- [19] STURGILL TW, WU J. Recent progress in characterization of protein kinase cascades for phosphorylation of ribosomal protein S6. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1092**: 350–357.
- [20] TONKS NK, CICIRELLI MF, DILTZ CD, KREBS EG, FISCHER EH. Effect of microinjection of a low-Mr human placenta protein tyrosine phosphatase on induction of meiotic cell division in *Xenopus* oocytes. *Mol Cell Biol* 1990; **10**: 458–463.
- [21] WEINBERG RA. Tumor suppressor genes. *Science* 1991; **254**: 1138–1146.
- [22] WÓJCIK C. Współczesne poglądy na temat regulacji cyklu komórkowego. *Post Biol Kom* 1991; **18**: 153–167.

Otrzymano: 20.01.1993 r.

Przyjęto: 02.02.1993 r.

Adres autorów: 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99

## SZKIELET BŁONY ERYTROCYTU\*

### ERYTHROCYTE MEMBRANE SKELETON

Aleksander F. SIKORSKI\*, Witold DIAKOWSKI \*, Marian KUCZEK\*\*

\*Uniwersytet Wrocławski, Instytut Biochemii; \*\*Katedra Chemii, WSOIW, Wrocław

*Streszczenie.* Funkcje szkieletu komórkowego w erytrocycie ssaków pełni sieć peryferyjnych białek błony (głównie spektryna, aktyna oraz białko 4.1) określanych szkieletem błonowym. Uzyskanie obrazów wewnętrznej powierzchni błony erytrocytu barwionych negatywowo dało bezpośredni wgląd w strukturę szkieletu. Dominującym składnikiem szkieletu są tetramery spektryny o długości maksymalnej ok. 200 nm. Spektryna wiąże się ze zębem hydrofobowym błony poprzez ankiryne (miejsce o wysokim powinowactwie), białko 4.1 oraz poprzez fosfolipidy błony. Przedstawiono dane dotyczące struktury, izoform, występowania oraz funkcji poszczególnych, niespektrynowych elementów szkieletu błony, takich jak ankiryna, białko 4.1, adducyna, tropomiozyna oraz dematyna i tropomodulina.

*Słowa kluczowe:* Szkielet błony erytrocytu, spektryna, aktyna, ankiryna, białko 4.1, adducyna

*Summary.* A network of peripheral membrane proteins (mainly spectrin, actin and protein 4.1) plays a role of cytoskeleton in mammalian erythrocytes. Direct electron microscopic observations of negatively stained preparations of inner surface of erythrocyte membrane gave detailed information on the structure of membrane skeleton. Major component of the erythrocyte membrane skeleton is spectrin tetramer of maximal length of 200 nm. Spectrin is linked to the hydrophobic domain of the membrane via ankyrin (high affinity binding site), via protein 4.1 and/or via interaction with membrane phospholipids. Data concerning structure, isoforms, occurrence and known and possible functions of particular nonspectrin membrane skeleton elements as ankyrin, protein 4.1, adducin, tropomyosin, dematin and tropomodulin are presented.

*Key words:* Erythrocyte membrane skeleton, spectrin, actin, ankyrin, protein 4.1, adducin

*Wykaz stosowanych skrótów:* BPA – białko przenoszące aniony, kDa – kilodalton,  $K_D$  – stała dysocjacji, przegl. – artykuł przeglądowy

## 1. SZKIELET BŁONY ERYTROCYTU

### 1.1 BIAŁKA PERYFERYJNE – ELEMENTY SZKIELETU BŁONOWEGO

Funkcje szkieletu komórkowego w erytrocycie pełni sieć peryferyjnych białek błony określanych przez coraz większą liczbę autorów szkieletem błonowym. W literaturze spotyka się jeszcze ciągle określenie "szkielet komórkowy" będące niezbyt precyzyjnym, gdyż struktura ta nie odpowiada szkieletowi komórkowemu innych komórek. Szkielet błony erytrocytu

TABELA. Białkowe składniki szkieletu błony erythrocytu oraz białka wiążące szkielet ze zębem hydrofobowym

Nazwa białka	Pasmo elektroforetyczne *podjednostka	M <sub>r</sub> [kDa]	Liczba kopii x 10 <sup>-5</sup>	Stopień oligomerizacji	Funkcja
Spektryna	1 (α) 2(β)	280 247	2,2 2,2	(αβ) <sub>2</sub> tetramer	główny składnik budżetu błony
Ankiryna	2.1 -2.6	206	1,1	monomer	łączy spektrynę z białkiem przenoszącym aniony
Białko 4.2	4.2	72*	2,3	trimer	wzmacnia oddziaływanie ankiryny z BPA
Aktyna	5	43	5,1	oligomer 12-13 monomerów	protofilament, oś kompleksu węzłowego
Białko 4.1	4.1	66	2,3	monomer	aktywuje tworzenie kompleksu spektryny z aktyną
Adducyna	(α) ~3 (β)	103 ' 97	0,3	(αβ) heterodimer	aktywuje tworzenie kompleksu spektryny z aktyną
Dematyna	4.9	48* 29*	1,0 0,6	trimer heterodimer	nieznana stabilizuje protofilament
Tropomiozyna	7.0	27*	0,6	dimer	aktynowy
Tropomodulina	5	43*	0,3	monomer	stabilizuje oddziaływanie tropomiozyny z aktyną
Białko przenoszące aniony	3	93	12	tetramer	transport anionów, wiązanie kompleksu ankiry-na-spektryna
Glikonektyna (glikoforyna C)		25	0,5	bd*	miejsce wiązania białka 4.1

\*Wyznaczono na podstawie ruchliwości w elektroforezie w żelu poliakryloamidowym w obecności SDS, \*\*bd – brak danych.

jest gęstą, włóknistą strukturą utworzoną w głównej mierze przez białka peryferyjne błony: spektrynę, aktynę, ankirynę oraz białko 4.1 [przeł.80]. Potraktowanie błon (cieni) erythrocytów lub erythrocytów roztworem detergentu niejonowego, takiego jak Triton X-100, pozwala na solubilizację lipidów oraz większości białek integralnych (zręb hydrofobowy błony [80]), a szkielet błony w postaci tzw. muszelek (*shells*) pozostaje nierozpuszczony. Struktury te, o tych samych rozmiarach i tym samym kształcie co erythrocyty, zawierają bardzo mało lipidów (1-2%). Minimalny skład białkowy, przy którym szkielet zachowuje jeszcze integralność, to: spektryna, aktyna oraz białko 4.1. W zależności od siły jonowej roztworu ekstrahującego struktury te zawierają ankirynę, białko przenoszące aniony oraz białka pasm 4.2 i 4.9 [78]. Czynniki, które wywołują zmiany kształtu erythrocytów, takie jak pH lub zmienne stężenia kationów, powodują również zmiany kształtu "szkieletów".

Do najważniejszych funkcji szkieletu błony należą:

(1) utrzymywanie "integralności" błony – ekstrakcja cieni roztworem o niskiej sile jonowej usuwającym białka peryferyjne, przede wszystkim spektrynę i aktynę powoduje dużą podatność błony na fragmentację i odwrócenie; powstają pęcherzyki o średnicy 50-150 nm;

(2) regulacja ruchliwości i rozmieszczenia białek integralnych (kanałów jonowych i receptorów powierzchniowych) – szybkość dyfuzji bocznej białek integralnych (w komórce:  $10196^{15} \text{ m}^2/\text{s}$ ) wzrasta stokrotnie po ekstrakcji białek peryferyjnych z błony [98];

(3) właściwości mechaniczne krwinki – krwinka czerwona (średnica 8 μm) podlega znacznym deformacjom w trakcie krążenia przeciskając się przez kapilary o średnicy 2 μm.



Krwinki anemicznych myszy z defektem genetycznym polegającym na braku zdolności syntezy spektryny są bardzo wrażliwe na hemolizę. U osobników homozygotycznych krwinki czerwone ulegają hemolizie zaraz po wejściu do krążenia [przeł. 80]. Echinocyty powstałe z erytrocytów w nieobecności źródeł energii, a także erytrocyty pacjentów z żółtaczką konstytucyjną<sup>1</sup> (sferocytozą) uwalniają pęcherzyki błonowe, które nie zawierają białek szkieletu, ale zawierają białka integralne. Najnowsze dane uzyskane przy pomocy mikroskopu elektronowego [55] dowodzą separacji szkieletu błonowego i zrębu hydrofobowego w "wypustkach" (kolcach) echinocyty.

(4) Wyizolowane poprzez ekstrakcję erytrocytów lub ich cieni detergentem niejonowym "szkielety" mogą stanowić podporę dla rekonstytucji. Wiązą one mianowicie fosfolipidy [Sikorski, AF, Zieliński, B. – dane niepublikowane], utrwalone zaś aldehydem glutarowym rekonstruuja dwumolekularną warstwę lipidową tworząc nieprzepuszczalne, wielkie pęcherzyki nazwane erytrosomami [42].

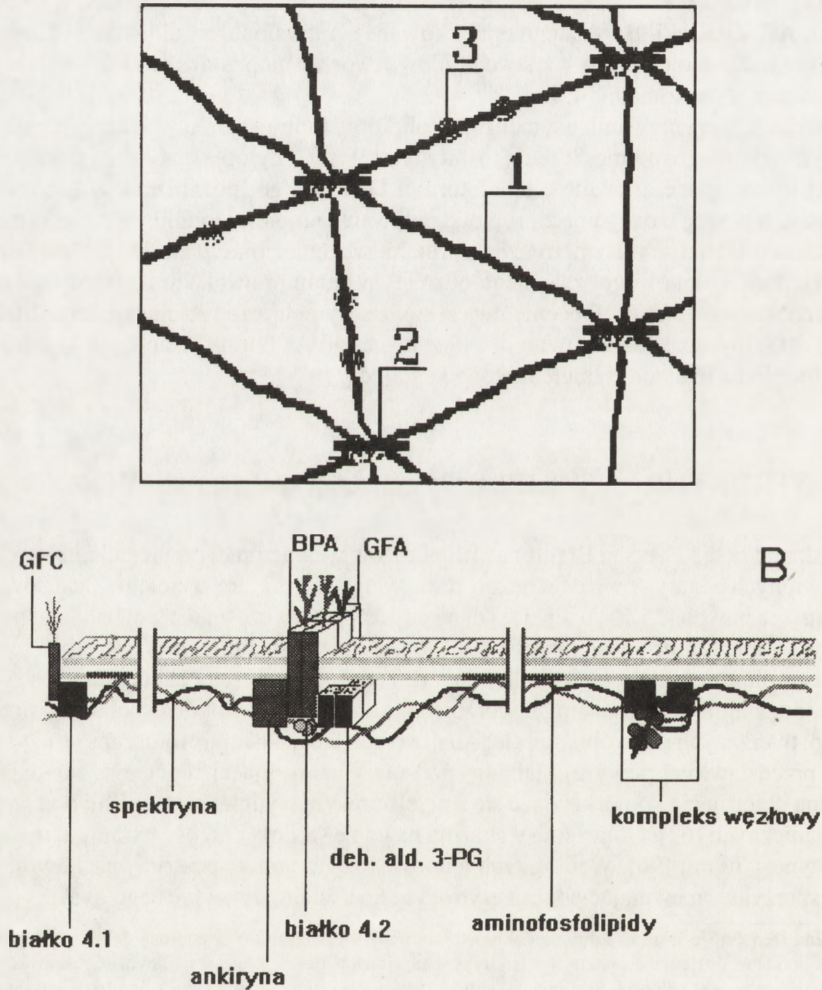
(5) udział w utrzymywaniu asymetrii fosfolipidów błonowych, a w szczególności całkowicie asymetrycznego rozmieszczenia fosfatydyloseryny w cytoplazmatycznej monowarstwie lipidowej błony. Prace, głównie z laboratorium Deuticke'go [por. przeł. 80], zdawały się potwierdzać hipotezę o decydującej roli oddziaływania aminofosfolipidów z białkami szkieletu w kształtowaniu ich asymetrycznego rozmieszczenia. Inne dane [26,32] wskazują na istnienie jednokierunkowego, zależnego od ATP systemu translokacji fosfatydyloseryny do wewnętrznej monowarstwy. Obecnie uważa się, że asymetryczne rozmieszczenie fosfatydyloseryny utrzymywane jest zarówno dzięki zależnej od ATP translokacji, jak i od interakcji tego fosfolipidu z białkami szkieletu błonowego [65].

## 1.2. STRUKTURA SZKIELETU BŁONOWEGO ERYTROCYTU.

Uzyskanie przez Byersa i Brantona [12] obrazów wewnętrznej powierzchni błony erytrocytu barwionych negatywowo dało bezpośredni wgląd w strukturę szkieletu. Zastosowanie tej techniki przez innych [25,55] uzupełnia dane uzyskane we wcześniejszych badaniach biochemicznych i ultrastrukturalnych [przeł. 80]. Dominującym składnikiem szkieletu są tetramery spektryny o długości maksymalnej ok. 200 nm. Tetramer spektryny zbudowany jest z dwóch dimerów oddziałujących końcami, utworzonych z nawiniętych wokół wspólnej osi podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$ , tworzących podwójną spiralę. Analiza fourierowska mikrofotogramów uzyskanych metodą przedstawioną powyżej stała się podstawą interesującej hipotezy zakładającej, że elastyczna deformacja komórki wiąże się z przejściowym wydłużaniem spirali pod wpływem sił mechanicznych [62]. Obliczenia wskazują na to, że średnia długość tetrameru w natywnej błonie wynosi 70 nm [96]. Według tych autorów [62] tetramer spektryny zachowuje się jak miękka sprężyna zapewniając powrót erytrocytu do kształtu dwuwklęsłego dysku.

<sup>1</sup>Dziedziczna sferocytoza jest pospolitą niedokrwistością hemolityczną, u której podłoża, jak się przypuszcza, są: częściowy brak lub dysfunkcja spektryny, ankiryiny bądź innych białek błony erytrocytu. Częściowe obniżenie zawartości spektryny jest najpospolitszym defektem w dziedzicznej sferocytozie. U niektórych pacjentów obniżenie zawartości spektryny może być wtórnym w stosunku do braku lub dysfunkcji ankiryiny. Innym schorzeniem charakteryzującym się obniżoną zawartością spektryny jest dziedziczna pyropoikilocytoza. Krwinki pacjentów z tym schorzeniem zawierają "zmutowaną" spektrynę charakteryzującą się obniżoną zdolnością tworzenia tetramerów. Podobny defekt charakteryzuje spektrynę krwinek osób z dziedziczną eliptocytozą. Krwinki jednak zawierają normalne lub prawie normalne ilości spektryny.

Spektryna wiąże się ze zrebem hydrofobowym błony poprzez ankiryne (miejsce o wysokim powinowactwie), białko 4.1 oraz poprzez fosfolipidy błony [przeł. 80]. Na mikro-fotogramach wewnętrznej powierzchni błony erythrocytu lub rozciągniętych szkieletów błonowych ankiryne lub raczej, kompleks ankiryne i białka przenoszącego aniony (BPA) widoczny jest jako struktura globularna o średnicy 9–12 nm [78]. Niektóre tetramery spektryny wiążą dwie takie struktury położone symetrycznie w odległości ok. 25 nm od środka tetrameru. Inne wiążą jedną, a pozostałe nie wiążą tych struktur w ogóle [12]. Miejsca wiązania ankiryne, aktyny oraz białka 4.1 znajdują się w podjednostce  $\beta$  spektryny. Ankiryne wiąże tetramery lub oligomery spektryny z około dziesięciokrotnie większym powinowactwem w porównaniu



Rys. 1. A – Struktura "rozciągniętego" szkieletu błony erythrocytu; schematyczny obraz cytoplazmatycznej powierzchni błony erythrocytu na podstawie danych Byersa i Brantona [12]: 1 – tetramer spektryny, 2 – krótki filament aktynowy, 3 – globularny kompleks białka przenoszącego aniony i ankiryne; B – schemat struktury błony erythrocytu w płaszczyźnie poprzecznej

do dimerów tego białka. Co więcej, oddziaływanie to aktywuje tworzenie tetramerów i wyższych oligomerów [15]. Fosforylacja ankiryiny obniża znacznie powinowactwo ankiryiny do spektryny oligomerycznej (w tym tetramerycznej), ale nie zmienia zdolności do wiązania dimerów spektryny [15]. Fosforylacja ankiryiny obniża także zdolność wiązania BPA. In vitro, nawet 7 reszt treoniny lub seryny ulega fosforylacji za pomocą niezależnej od cAMP, erytrocytarnej kinazy białkowej I.

Ankiryna wiąże spektrynę ze zrębem hydrofobowym błony poprzez swoiste oddziaływanie z cytoplazmatycznym odcinkiem BPA. Izolowany, cytoplazmatyczny fragment tego białka tworzy z ankiryną kompleks o stechiometrii 1:1 i  $K_D \sim 5 \times 10^{196} \text{ M}$  [przeł. 80]. Znakowana izotopem jodu ankiryna wiąże pozbawione jej pęcherzyki błonowe dwufazowo: faza pierwsza, będąca wiązaniem ankiryiny do miejsc o niskim powinowactwie, zależna od pH ( $K_D \sim 130 \text{ nM}$ ) oraz druga polegająca na przejściu miejsc o niskim w miejsca o wysokim powinowactwie ( $K_D \sim 13 \text{ nM}$ ). Wiązanie to jest niezależne od pH i przebiega znacznie wolniej [24,94]. Pomimo poznanej struktury pierwszorzędowej BPA, dane dotyczące miejsca wiązania ankiryiny są sprzeczne.

BPA występuje w błonie erythrocytu w liczbie kopii ponad dziesięciokrotnie większej niż ankiryna. Jest to duży nadmiar, nawet jeśli weźmie się pod uwagę fakt występowania tego białka w formie tetrameru. Wyizolowane, niezwiązane BPA, w formie zarówno rozpuszczalnej jak i wbudowanej do liposomów, ma zdolność wiązania ankiryiny. Pewną rolę w stabilizacji kompleksu ankiryiny z BPA może pełnić białko 4.2 o masie cząsteczkowej 72 kDa, występujące w postaci trimeru, o niepoznanej jak dotąd funkcji [47,48]. Białko to współizuluje się z kompleksem BPA-ankiryna. Miejsca wiązania białka 4.2 i ankiryiny w cytoplazmatycznej domenie BPA są różne [47]. Wrodzony brak białka 4.2 wiąże się z umiarkowaną sferocytozą [39]. Ankiryna takich erythrocytów w przeciwieństwie do krwinek normalnych ekstrahuje się z błon roztworem o niskiej sile jonowej.

Interesujący jest fakt, że niektóre tetramery spektryny nie wiążą ankiryiny w ogóle. Może to wskazywać na to, że wiązania spektryny i ankiryiny wykazują kooperatywność. Uproszczone są zatem modele przedstawiające jedną cząsteczkę ankiryiny związaną przez każdy tetramer spektryny.

Istnieje też sporo dowodów na to, że spektryna główny element szkieletu oddziałuje także z fosfolipidami błony [por. przeł. 80]. Wczesne badania w tej dziedzinie sugerowały swoistość oddziaływań spektryny w stosunku do fosfolipidów anionowych, takich jak fosfatydyloseryna, fosfatydyloglicerol czy kardiolipina [np. 67]. Powinowactwo spektryny do pęcherzyków fosfolipidowych jest znacznie, bo w przybliżeniu o jeden rząd wielkości mniejsze od powinowactwa do ankiryiny. Oddziaływanie spektryny z pęcherzykami fosfolipidowymi powoduje wygaszanie wewnętrznej, tryptofanowej fluorescencji spektryny [64,86]. Największy wpływ wykazują pęcherzyki fosfolipidowe sporządzone z fosfatydyloetanoloaminy i jej mieszanin z innymi fosfolipidami. Swoistość w stosunku do fosfatydyloseryny obserwowana przez cytowanych wyżej autorów [67] nie potwierdziła się w naszych badaniach [86], jak również w badaniach innych [10]. Liposomy fosfolipidowe wpływają na strukturę spektryny w roztworze zmieniając jej podatność na proteolizę oraz stabilizując natężenie fluorescencji spektryny wobec wzrastającej siły jonowej oraz temperatury [64, 86]. Oddziaływanie spektryny, głównego elementu szkieletu błony, z fosfolipidami wykazano także w erythrocytach. Za hydrofobową naturą tych oddziaływań przemawia fakt znakowania spektryny w erythrocytach hydrofobowymi aryloizotiocyanianami [84, 85], oddziaływanie spektryny



zących (BPA) [33]. Rolę fosforylacji za pomocą kinazy białkowej I, niezależnej od cAMP przedstawiono powyżej. Także kinaza II podobna do kinazy kazeinowej oraz zależne od cAMP kinazy obecne w erytrocytach mogą fosforylować ankiryne.

Ankiryna ulega acylacji przy pomocy reszty kwasu palmitynowego. Szybki "obrót" tej reszty sugeruje rolę regulacyjną acylacji [88].

Interesującą cechą struktury pierwszorzędowej ankiryiny jest występowanie w domenie "89K" powtarzającego się motywu. Odcinek pomiędzy resztami 44 i 765 składa się z 22 powtarzających się odcinków złożonych z 33 reszt aminokwasowych. Każdy segment (33 reszty) zawiera 13–15 identyczne reszty aminokwasowe. Występowanie podobnych sekwencji stwierdzono w białkach *Drosophila melanogaster* (produkt genu Notch), *Caenorhabditis elegans* (produkty genów lin 12 i glp 1) oraz białkach wirusa krowianki. Interesujący jest fakt, że białka drożdży i bezkręgowców zawierające tę domenę(y) są zaangażowane w regulację cyklu komórkowego tych organizmów [57].

Większość przypadków sferocytozy wiąże się z ubytkiem lub nawet całkowitym brakiem spektryny erytrocytarnej. U kilku rodzin wykazano także genetyczny związek pomiędzy typową, dominującą sferocytozą a delecją krótkiego ramienia chromosomu 8, w którym zlokalizowano ostatnio gen kodujący ankiryne [52,58,70]. Związek pomiędzy typową, dominującą sferocytozą a genem kodującym ankiryne został statystycznie udowodniony [21]. Nienormalną akumulację ankiryiny w błonie erytrocytu spowodowaną skróceniem łańcucha polipeptydowego zaobserwowano także u myszy z recesywną sferocytozą [97].

## 2.2. ANKIRYNA NIEERYTROCYTARNA

Ankiryna została wykryta technikami immunochemicznymi w wielu komórkach ssaków, w tym w komórkach mózgu, nerek i komórkach endotelialnych. Wykryto ją w wielu liniach komórkowych. Również u ptaków białko podobne do ankiryiny (zwane gobliną) wykryto w mięśniach szkieletowym i sercowym [przeł. 7,8].

Najlepiej jak dotąd, poznana ankiryna mózgowa została oczyszczona. W jej skład wchodzi dwa prawie identyczne peptydy o masach cz. 210 i 220 kDa, które wykazują wiele cech podobnych do ankiryiny erytrocytarnej, m.in. podobną strukturę domenową oraz zdolność wiązania  $\beta$  spektryny erytrocytarnej i mózgowej (preferencyjnie). To monomeryczne białko wiąże, podobnie jak ankiryna erytrocytarna, cytoplazmatyczną domenę białka przenoszącego aniony oraz tubulinę. Ogólnie rzecz biorąc rozmieszczenie ankiryiny nieerytrocytarnej jest podobne do rozmieszczenia spektryny.

Ankiryna, zarówno erytrocytarna jak i mózgowa, wiąże mikrotubule oraz dimery ( $\alpha\beta$ ) niespolimeryzowanej tubuliny. Miejsce wiązania tubuliny znajduje się w tym samym fragmencie proteolitycznym co miejsce wiązania białka przenoszącego aniony, co umożliwia może tworzenie kompleksu spektryna-ankiryna-mikrotubule [przeł. 7,8].

Ankiryny erytrocytarna i mózgowa są produktami różnych genów i stanowią blisko spokrewnione izoformy [46,51]. Podobnie jak w przypadku spektryny obydwie dają początek dwu rodzinom ankiryń różniących się lokalizacją w komórkach [45,46]. Ankiryny<sub>R</sub> (*restricted*) lepiej reagują z przeciwciałami skierowanymi przeciw ankiryinie erytrocytarnej, występują w ograniczonej liczbie komórek (szczególnie dużo w regionie bazolatelarnym komórek tubuli dystalnej oraz komórek interkalowanych przewodu zbierającego nerki [8,44]). Występuje ona w dużych ilościach w przewężeniach Ranviera, obecna jest w ciałach neuronów i dendrytach i aksonach nieosłoniętych mieliną [4,46]. Ankiryny<sub>B</sub> (*broadly distributed*) wystę-

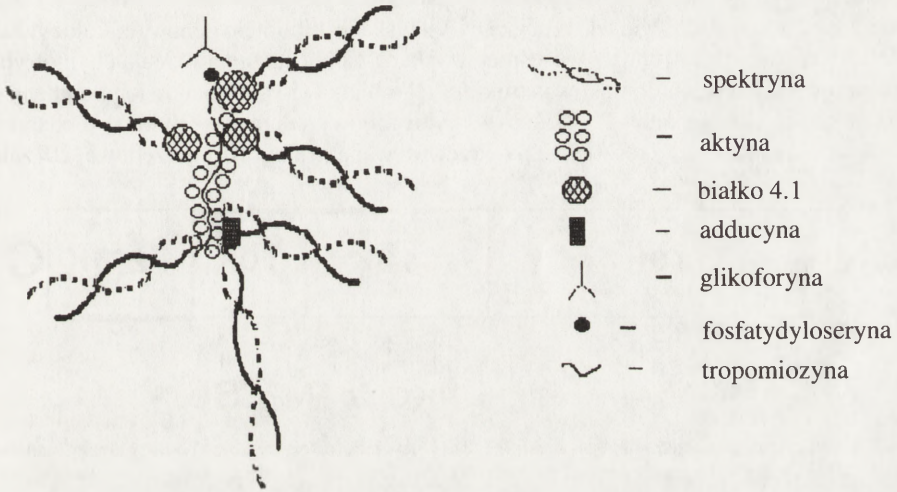
puje w większości komórek nerki [4, 23], neuronach i komórkach glejowych, a tylko w niewielkich ilościach w przewężeniach Ranviera. Ankiryna oddziałuje z receptorami białkowymi w błonach komórek mózgu oraz mikrokosmków nerek uprzednio pozbawionych białek peryferyjnych ( $K_D \sim 50\text{--}100\text{ nM}$  [22]). Aktywność ta jest hamowana przez izolowaną cytoplazmatyczną domenę białka przenoszącego aniony erytrocytów. Powszechne w komórkach nieerytrocytarnych białko homologiczne z białkiem przenoszącym aniony erytrocytów sklonowano i wyznaczono jego sekwencję. Białko to nie zostało jednak scharakteryzowane [1] i nie wiadomo, czy oddziałuje z ankiryną. Białko o właściwościach znacznie zbliżonych do białka przenoszącego aniony erytrocytów wykryto tylko w niektórych komrkach nerek. Oprócz tego białka zdolność wiązania ankiryny (i kompleksu ankiryna-spektryna) wykazują także podjednostka  $\alpha$  ATP-azy zależnej od jonów  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  błon niektórych komórek nerek [69] oraz kanał sodowy wrażliwy na zmiany potencjału (*voltage-sensitive*) [8]. Powyższe białka współwystępują z podtypem R ankiryny zarówno w nerkach ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP-aza), w domenie bazolateralnej komórek tubuli dystalnej oraz komórek interkalowanych przewodu zbierającego (białko przenoszące aniony zbliżone do erytrocytarnego), jak i w mózgu, w przewężeniach Ranviera (kanał sodowy) [45]. Współwystępowanie kanałów sodowych i ankiryny obserwuje się także w przypadku połączeń nerwowo-mięśniowych [28]. Uważa się, że oddziaływanie ankiryny z ATP-azą oraz spektryną nieerytrocytarną ma znaczenie w regulacji rozmieszczenia ATP-azy w komórkach charakteryzujących się polarnością (np. komórkach nabłonka nerek) [69], a także w regulacji rozmieszczenia kanałów sodowych w osłoniętych mieliną aksonach [4]. Białkami, które jak się wydaje są receptorami ankiryny<sub>B</sub> są: glikoproteina o masie cząsteczkowej 205 kDa izolowana z mózgu [95] oraz białko o masie cząsteczkowej 85 kDa z komórek limfoma [43]. Ankiryny B i R oddziałują z wieloma różnymi, ale strukturalnie podobnymi białkami integralnymi. Swoistość oddziaływania nie jest absolutna, ale dotyczy 2,5- do 10-krotnych różnic w powinowactwie do określonego podtypu ankiryny [22]. Jak dotąd wśród poznanych białek wiążących ankirynę nie wykazano podobieństw struktury pierwszorzędowej, aczkolwiek homologia konformacyjna jest możliwa.

### 3. KOMPLEKS WĘZŁOWY

Końce 5-6 tetramerów spektryny tkwią w kompleksach węzłowych (*junctional complexes*) [12], których osią jest krótki (37 nm) filament aktynowy złożony z 12–13 monomerów. Izolowane zarówno z ekstraktów błon erytrocytów do roztworu o niskiej sile jonowej, jak i z nierozpuszczalnych w detergencie szkieletów błonowych kompleksy charakteryzowały się stałą sedimentacji 26–30 S i następującym składem białkowym: 1 mol dimeru spektryny, 2–3 moli aktyny, 1 mol białka 4.1 i 0.1–0.5 mola białka 4.9 [61]. Poza tym w skład kompleksów węzłowych wchodzi tropomiozyna, tropomodulina oraz adducyna. Należy dodać, że wiele danych eksperymentalnych wskazuje na istnienie połączenia końców tetramerów spektrynowych ze zębem hydrofobowym błony poprzez białko 4.1 i niezdefiniowany, jak dotąd, receptor.

Badania nad ultrastrukturą "rozciągniętych" szkieletów czerwonych krwinek pacjentów z żółtaczką konstytucyjną (dziedziczna sferocytoza) charakteryzujących się obniżoną zawartością spektryny wykazały, że szkielet krwinek tych pacjentów wykazywał tylko niewielkie zaburzenia w porównaniu do szkieletu krwinek normalnych, z tym że mniej filamentów

spektrynowych przypada na każdy kompleks węzłowy (średnio: 3.3–5.0, w krwinkach normalnych 5.0–5.5) [55]. Obniżenie liczby filamentów spektrynowych przypadających na kompleks węzłowy miało także miejsce w przypadkach homozygotycznej eliptycytozy charakteryzującej się spektryną z defektem w obrębie domeny  $\alpha 1$  [55], w którym to schorzeniu nie obserwuje się obniżonej zawartości spektryny. Całkowitą utratę normalnej struktury szkieletu błony erythrocytu obserwuje się w najostrejszych przypadkach sferocytozy z największym ubytkiem spektryny i w przypadkach pyropoikilocytozy charakteryzujących się umiarkowanym ubytkiem oraz występowaniem wariantów spektryny  $\alpha 1^{74}$  i  $\alpha 1^{46}$  [55].



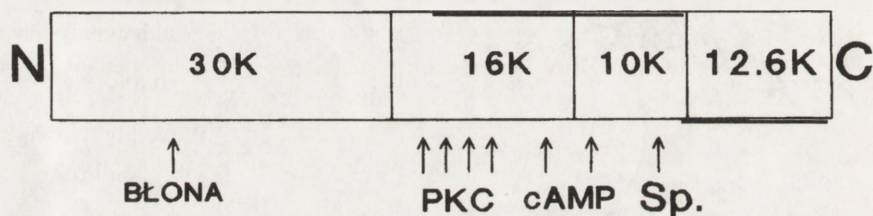
Rys. 3. Schemat struktury kompleksu węzłowego

### 3.1. AKTYNA

Aktyna erythrocytów (400–500 tys. kopii na komórkę) zbliżona jest swoimi własnościami do aktyn innych komórek. W erythrocytach występuje tylko izoforma  $\beta$ , podczas gdy w innych komórkach występują mieszaniny jej izoform. Jak już wspomniano, aktyna jest uorganizowana w krótkie protofilamenty o długości 33–37 nm i średnicy 7–8 nm, złożone z 12–13 monomerów [przeł. 80]. Uważa się, że powoli rosnący (*pointed*) koniec protofilamentu aktynowego jest zablokowany. Zdolność blokowania powoli rosnącego końca (*capping*) wykazują kompleksy spektryny i białka 4.1 [71]. Należy jednak zaznaczyć, że DNA-aza I zastosowana jako sonda dla tego końca aktyny wiąże się z błoną erythrocytu w ilości zbliżonej do liczby filamentów aktynowych, co może wskazywać na to, że koniec ten jest wolny [72]. In vitro w kompleksie, w warunkach nasycenia jedna cząsteczka spektryny przypada na jeden monomer aktyny [17]. Miejsce wiązania spektryny w cząsteczce aktyny pozostaje niepoznane. Długość filamentu określana jest, jak się uważa, przez tropomiozynę, której właściwości przedstawiono poniżej. Spektryna nie zmienia krytycznego stężenia polimeryzacji aktyny, nie oddziałuje też z monomerami aktyny wpływając na jej polimeryzację.

### 3.2. BIAŁKO 4.1.

Jak wspomniano wyżej, białko 4.1 jest ważnym elementem kompleksu "węzłowego". Białko to występujące w liczbie 200 000 kopii w komórce jest w rozcieńczonych roztworach monomerem składającym się w rzeczywistości z kilku łańcuchów polipeptydowych (główne dwa pasma o masach cz. 80 i 78 kDa) będących elementami całej rodziny białek. U ptaków białko 4.1 również syntetyzowane jest w postaci wielu form o masach sięgających 175 kDa zmieniających się w miarę różnicowania erythrocytu [przepl. 31]. Odcinek DNA kodujący białko 4.1 jest bardzo długi (100 kb), zlokalizowany w chromosomie 1p3.2->pter koduje wiele różnej długości (ok. 5.6 kb) [93] mRNA, które powstają prawdopodobnie na skutek różnicowanej, regulowanej w rozwoju obróbki. Struktura pierwszorzędowa białka 4.1 została wydedukowana na podstawie sekwencji cDNA uzyskanej biblioteki genów retikulocytów [20, 93]. Sekwencja ta jest zgodna z wcześniej uzyskaną na podstawie trawienia chymotrypsyną w łagodnych warunkach domenową strukturą tego białka [53], a mianowicie: domenę pierwszą, wiążącą błonę, stanowi N-końcowy, hydrofobowy odcinek (~30 kDa) o charakterze zasadowym, zawierający 7 reszt cysteiny. Przewidywana struktura drugorzędowa [20] zakłada



Rys. 4. Schemat struktury białka 4.1: Sp – spektryna, PKC – miejsca fosforylacji przy pomocy kinazy białkowej C, cAMP – miejsca fosforylacji przy pomocy zależnej od cAMP kinazy białkowej, Sp – miejsce wiązania spektryny, N – koniec aminowy, C – koniec karboksylowy

występowanie amfipatycznych helis oraz odcinków struktury  $\beta$ . Domena druga o masie cz. ok. 16 kDa jest hydrofilna, o dużej zawartości proliny (9,3%), strukturze w większości  $\alpha$ -helikalnej i zawierającej miejsca (maksymalnie 4) fosforylacji dla kinazy białkowej C oraz jedno miejsce fosforylacji za pomocą zależnej od cAMP kinazy białkowej [27, 36]. Trzecia domena o masie cz. ok. 10 kDa zawiera ok. 46% aminokwasów obdarzonych ładunkiem. Charakteryzuje ją duże prawdopodobieństwo struktury długiej helisy [20]. Zawiera miejsce fosforylacji dla kinazy białkowej zależnej od cAMP [27, 36] oraz miejsce wiązania spektryny. Fragment ten bowiem aktywuje wiązanie spektryny z aktywną z powinowactwem prawie równym natywnemu białku 4.1 [34]. Domenę czwartą stanowi fragment zawierający 117 reszt karboksylowego końca tego białka. Jego masa cząsteczkowa wyliczona z sekwencji [20] wynosi 12,6 kDa i jest znacznie mniejsza od wyznaczanej w elektroforezie w obecności SDS 22–24 kDa. Podobnie masa całej cząsteczki białka 4.1 wyznaczona na podstawie sekwencji (66,3 kDa) jest mniejsza od wyznaczonej poprzednio wartości 78–80 kDa. Fosforylacja białka 4.1 przy pomocy zależnej od cAMP kinazy białkowej oraz kinazy białkowej C powoduje znaczne obniżenie jego powinowactwa do spektryny oraz znaczne, bo 50–80% obniżenie jego zdolności do aktywacji wiązania spektryny z aktywną [14,54]. Metabolit erythrocytów, 2,3-difosfoglicerynian hamuje fosforylację białek szkieletu błonowego, w tym również białka



4.1 przez endogenne kinazy, kazeinową oraz zależną od cAMP kinazę białkową. Natomiast aktywuje on fosforylację białka 4.1 przy udziale kinazy białkowej C [13]. Białko 4.1 oddziałuje z kalmoduliną ( $K_D \sim 5.5 \times 10^{19} \text{ M}^{-1}$ ) i oddziaływanie to reguluje interakcję spektryny z aktyną [92].

Retikulocyty ludzkie zawierają transkrypty genu białka 4.1 kodujące cztery łańcuchy polipeptydowe o sekwencjach różniących się obecnością bądź nieobecnością 21 reszt w domenie wiążącej spektrynę i aktyne oraz występowaniem odcinka 43 lub 34 reszt aminokwasowych w pobliżu końca karboksylowego [19]. Wykazano także, że ten sam gen może kodować białko 4.1 limfocytów ludzkich (zawierające zmienioną, nieaktywną domenę o masie cz. 10 kDa powstające również na skutek alternatywnej, swoistej tkankowo, obróbki mRNA [93]).

Dane z badań biochemicznych i genetycznych wskazują na związek białka 4.1 z etiologią niektórych przypadków dziedzicznej eliptycytozy [np. 60,63]. Ostatnio zostały dokładnie opisane dwa strukturalne warianty tego białka [18,60]. Erythrocyty zawierające białko 4.1 o masie cz. 95 kDa wykazywały stabilność mechaniczną podobną do erythrocytów osobników normalnych, podczas gdy erythrocyty zawierające białko 4.1 (o masach cząsteczkowych 68 i 65 kDa) były znacznie mniej odporne mechanicznie. Analiza tych mutacji wykazała, że dotyczą one duplikacji bądź delecji w obrębie domeny wiążącej spektrynę: mRNA białka 4.1<sup>68/65</sup> charakteryzuje się delecją odcinka kodującego 80 reszt aminokwasowych pomiędzy Lys<sup>407</sup> a Gly<sup>486</sup> (stanowiącego prawie dokładnie domenę wiążącą spektrynę). Białko 4.1<sup>95</sup> zawiera dodatkowo 123 reszty aminokwasowe – zduplikowaną domenę wiążącą spektrynę [18].

Izoformy reaktywne z przeciwciałami skierowanymi przeciw białku 4.1 występują w wielu rodzajach komórek nieerythrocytarnych, jak np. fibroblastach, płytkach krwi i granulocytach, komórkach nabłonka, soczewce oka, neuronach [przeł. 31]. Te ostatnie komórki zawierają dwa białka uważane za analogi białka 4.1 – amelinę [50] oraz synapsynę I [5]. Amelina jest białkiem o masie cz. 93 kDa, reagującym z przeciwciałami skierowanymi przeciw białku 4.1, wykazującym ok. 50% homologii z białkiem 4.1. Amelinę zlokalizowano w ciele neuronu oraz dendrytach, a także w niektórych komórkach glejowych. Białko to wykazuje zdolność wiązania izolowanej spektryny mózgowej [50].

Synapsyna I – dobrze scharakteryzowane ufosforylowane białko występujące na cytoplazmatycznej powierzchni małych (średnica 40–60 nm) pęcherzyków synaptycznych zawierających neurotransmitter [89]. Synapsyna jest mieszaniną czterech polipeptydów (synapsyna Ia i Ib oraz IIa i IIb) o masach cząsteczkowych 76, 70, 55 i 50 kDa (706, 670, 586 i 479 reszt aminokwasowych) będących izoformami obróbki mRNA [89]. Szczegółowe badania wykazały, że strukturalnie synapsyna jest różna od białka 4.1. Defosforylowana synapsyna wiąże spektrynę mózgową, cechy zaś tego kompleksu zbliżone są do cech kompleksu białka 4.1 ze spektryną ( $K_D$ , stechiometria, lokalizacja miejsc wiązania w tetramerze spektryny). Wykazano też, że synapsyna aktywuje wiązanie spektryny z f-aktyną podobnie jak białko 4.1 [49]. Można zatem przyjąć, że synapsyna jest funkcjonalnym analogiem białka 4.1.

Miejsce wiązania białka 4.1 z błoną erythrocytu nie zostało w pełni zidentyfikowane. Większość białka 4.1 pozostaje zasocjowana z błoną erythrocytu po ekstrakcji spektryny i aktyny. Związane z błoną białko 4.1 zachowuje zdolność aktywacji tworzenia kompleksu spektryny z aktyną – stanowić może zatem miejsce przyczepu kompleksu spektryny z aktyną do zrębu hydrofobowego błony erythrocytu. Trzeba dodać, że pęcherzyki selektywnie pozbawione białka 4.1, ale mające normalną ilość ankiryne wiążą spektrynę z takim samym powinowactwem i w takiej samej maksymalnej ilości jak mające białko 4.1. Liczba miejsc

wiązających białko 4.1 odpowiada ilości kopii białka 4.1 w pojedynczym erytrocycie, to jest 200 000, a stała dysocjacji kompleksu 4.1 z błoną erytrocytu wynosi 42–50 nM [31]. Rolę receptora tego białka przypisywano już: glikoforynie A [2], kompleksom glikoforyny A z polifosfoinozytydami [3], glikoforynie C (lub  $\beta$ ), zwanej też glikonektyną [68], glikoforynie- $\gamma$  o masie cz. 30 000, a także białku przenoszącemu aniony oraz fosfatydyloserynie, lipidowi charakterystycznemu dla wewnętrznej monowarstwy lipidowej błony erytrocytu [przełg. 6]. Glikoforyna A oraz białko przenoszące aniony raczej nie spełniają tej roli, gdyż ludzie nie mający glikoforyny A i spokrewnionej z nią glikoforyny B mają erytrocyty normalne, nie wykazując zmian w mechanicznej stabilności. Białko 4.1 wciąż wiąże błony erytrocytów pozbawione na skutek potraktowania proteazami cytoplazmatycznej domeny białka przenoszącego aniony, która *in vitro* wiąże białko 4.1. Glikoforyna C i spokrewniona z nią glikoforyna  $\gamma$  są jak wykazano miejscami asocjacji białka 4.1 z błoną erytrocytu. Pozostają one związane ze szkieletem po ekstrakcji błony detergentem niejonowym [68], podczas gdy pozostałe glikoforyny ulegają całkowitej ekstrakcji. Pacjenci z wrodzonym brakiem białka 4.1 wykazują także 70% obniżenie zawartości glikonektyny. Erytrocyty nie zawierające glikoforyny C i  $\gamma$  wykazują obniżoną odporność mechaniczną, a także obniżoną zawartość białka 4.1 [74]. Należy pamiętać, że glikonektyna obecna jest w błonie erytrocytu tylko w liczbie 50 000 kopii, stąd istnienie innego receptora białkowego, a w szczególności lipidowego, jest wielce prawdopodobne. Izolowane białko 4.1 oddziałuje z liposomami lub monowarstwami lipidowymi wykazując największe powinowactwo do błon zawierających fosfatydyloserynę ( $K_D \sim 3.3 \times 10^{196} \text{ M}$ ) [16,75,77,79]. Wiązanie białka 4.1 przez odwrócone pęcherzyki błon erytrocytów uprzednio pozbawione tego białka zmniejsza się po potraktowaniu błon dekarboksylazą fosfatydyloseryny, a także w obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$  [76]. Wiązanie białka 4.1 do pęcherzyków lipidowych powodowało uwalnianie zamkniętych w nich substancji, a także zmniejszenie ruchliwości węglowodorowych łańcuchów acylowych fosfolipidów [76,79]. Erytrocyty pacjentów z dziedziczną eliptocytozą (HE[4.1<sup>0</sup>]), które nie zawierają białka 4.1 mają zaburzoną asymetrię fosfatydyloseryny, tzn. ok. 10% tego fosfolipidu jest dostępne dla fosfolipazy działającej na zewnątrz komórki [75]. Hydrofobowa, zasadowa domena o masie 30 kDa została zidentyfikowana jako miejsce wiążące fosfatydyloserynę [16]. Ostatnio wykazano, że odległość pomiędzy białkiem 4.1 a dwumolekularną warstwą lipidową w pęcherzykach błonowych pochodzących z erytrocytów wynosiła 7,5, a w liposomach ok. 5,0 nm [77]. Nie wiadomo, czy różnica ta wynika z obecności różnych receptorów w obu układach.

Erytrocytarne białko 4.1 wykazuje zdolność wiązania miozyny [73], która jak wiadomo, występuje w erytrocycie [przełg. 80] w 6000 kopii zarówno w formie rozpuszczalnej, jak i związanej z błoną. Łańcuch ciężki o masie 210 kDa przypomina ciężki łańcuch miozyny płytek krwi, a dwa łańcuchy lekkie o masach 25 i 19,5 kDa przypominają łańcuchy lekkie miozyny mięśni szkieletowych lub mięśnia sercowego. Izolowane białko 4.1 wiąże się z immobilizowaną miozyną mięśnia szkieletowego ( $K_D \sim 140 \times 10^{196} \text{ M}$ ). Ciężka meromiozyna hamuje konkurencyjnie tworzenie tego kompleksu, podczas gdy fragmenty s1 hamują to oddziaływanie mniej efektywnie. Białko 4.1 hamuje także aktywowaną za pomocą aktywny aktywność ATP-azy zależnej od jonów  $\text{Mg}^{+2}$ . Interakcja białka 4.1 z miozyną może mieć związek z zależnymi od ATP i jonów  $\text{Mg}^{+2}$  zmianami kształtu krwinek.

### 3.3. ADDUCYNA

Istotnym elementem kompleksu węzłowego jest adducyna, heterodimeryczne białko o masie cząsteczkowej 200 kDa (103 kDa, podjednostka  $\alpha$  i 97 kDa, podjednostka  $\beta$ ), występujące w liczbie 30 000 kopii w komórce, oddziałujące z aktyną i kompleksem aktyny ze spektryną [30, 66], powodujące "dodawanie" nowych tetramerów spektryny, którego aktywność jest hamowana przez jony  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmodulinę. Kalmodulina wiąże się z podjednostką  $\beta$  w obecności jonów wapnia ( $K_D \sim 2 \times 10196^7 \text{ M}$  [66]. Oddziaływanie adducyny z aktyną w nieobecności spektryny zachodzi ze stechiometrią 1 cząsteczka adducyny na 7 podjednostek aktynowych i ma charakter kooperatywny:  $K_D = 2-4 \times 10196^6 \text{ M}$  w obecności 100 nM adducyny i  $0.3 \times 10196^6 \text{ M}$  w obecności 800 nM adducyny [66]. Adducyna w niskich stężeniach wykazuje ok. dziesięciokrotnie większe powinowactwo do kompleksu spektryny z aktyną niż do samej f-aktyny [30]. Należy pamiętać, że adducyna wiąże spektrynę bardzo słabo. Stosunek ilościowy spektryny i adducyny w kompleksie spektryna-adducyna-aktyna (2 mole spektryny: 1 mol adducyny) wskazuje na możliwość wiązania dwóch tetramerów spektrynowych w tym samym miejscu filamentu aktynowego [9]. Została opisana także mózgowia izoforma adducyny [9] o własnościach zbliżonych do erytrocytarnej. Obydwie izoformy są substratami kinazy białkowej C oraz zależnej od cAMP kinazy białkowej [30,40]. Nieznana jest, jak dotąd, funkcja fosforylacji. Ostatnio oznaczono strukturę pierwszorzędową adducyny [41]. Obydwie podjednostki ( $\alpha - 737$  i  $\beta - 726$  reszt aminokwasowych) wykazują wysoki poziom identyczności sekwencji (49%), co wskazuje na ewolucję tych białek poprzez duplikację genu pierwotnego. Charakteryzują się one występowaniem 3 domen: globularnej, N-końcowej "główki" o masie cząsteczkowej 39 kDa, odpornej na proteazy, domeny "łącznikowej" o masie 9 kDa oraz wrażliwego na proteazy wysoce hydrofilowego "ogona" (33 kDa) [40,41]. Globularna "główka" obydwu podjednostek wykazuje ograniczone podobieństwo sekwencji do domen wiążących aktynę obecnych w białkach nadrodziny spektryny- $\alpha$ -aktyniny-dystrofiny oraz innych białek wiążących aktynę.

Zarówno adducyna, jak i białko 4.1 aktywują formowanie kompleksów spektryny i aktyny wchodząc w ich skład. Różnią się jednak tym, że białko 4.1 oddziałuje z izolowaną spektryną, ale nie wiąże się z f-aktyną, adducyna natomiast oddziałuje ze spektryną słabo, ale wiąże się z f-aktyną. Oba białka prawdopodobnie zajmują to samo miejsce w kompleksie, gdyż białko 4.1 hamuje wiązanie adducyny do szkieletów błonowych [6]. Funkcjonalna współzależność obu białek pozostaje przedmiotem dalszych badań i dyskusji.

### 3.4. DEMATYNA (BIAŁKO 4.9)

Trimeryczne białko o masie 145 kDa jest substratem dla związanej z błoną, zależnej od cAMP kinazy białkowej, kinazy zależnej od  $\text{Ca}^{2+}$  oraz kinazy białkowej C [35]. Białko to tworzą dwa polipeptydy o masach 48–52 kDa [37]. Dematyna nie oddziałuje ze spektryną, ale wiąże i tworzy wiązki filamentów aktynowych [37]; z tą aktywnością wiąże się jej nazwa. Fosforylacja za pomocą zależnej od cAMP kinazy białkowej eliminuje zdolność tego białka do tworzenia wiązek filamentów aktynowych [38]. Należy zaznaczyć jednak, że rola tego białka pozostaje niepoznana, gdyż jak dotąd nie stwierdzono występowania wiązek filamentów aktynowych w błonie erytrocytów .

### 3.5. TROPOMIOZYNA I TROPOMODULINA

Erytrocyt zawiera 70–80 tys. kopii tropomiozyny, białka o masie cząsteczkowej ~60 kDa złożonego z dwóch podjednostek o masach 29 i 27 kDa [29]. Mapy peptydowe tropomiozyny

erytrocytarnej są prawie identyczne z mapami tropomiozyny mięśnia sercowego królika [59]. Oddziałuje ona wysoce kooperatywnie z f-aktyną przy stechiometrii jeden dimer na 6–7 monomerów aktyny. Tropomiozyna erytrocytów różni się od innych tropomiozyn tym, że oddziałuje z aktyną, ale nie tworzy długich, liniowych polimerów (głowa-ogon) [59]. Mięśniowa wykazuje obydwie cechy: oddziałuje z aktyną i tworzy długie, liniowe polimery, podczas gdy tropomiozyny niemięśniowe, w tym tropomiozyna płytek krwi, wiążą aktynę słabo i nie polimeryzują. Erytrocytarna tropomiozyna jest prawdopodobnie hybrydą sekwencji mięśniowej i niemięśniowej powstającą w wyniku alternatywnej obróbki mRNA. Uważa się, że tropomiozyna erytrocytarna oddziałuje z f-aktyną podobnie jak w układzie mięśniowym: wzdłuż filamentu, w obu szczelinach helisy filamentu aktynowego. Ponieważ tropomiozyna erytrocytarna nie tworzy liniowych polimerów, uważa się, że stabilizuje ona długość filamentu aktynowego w krwince czerwonej [7]. Oprócz tego, tropomiozyna może regulować oddziaływanie spektryny z aktyną, ponieważ filamenty aktynowe w kompleksie z tym białkiem wiążą spektrynę z obniżonym powinowactwem [59].

Błony erytrocytów zawierają białko o masie cząsteczkowej 43 kDa (30 000 kopii na komórkę) wiążące tropomiozynę, zwane także tropomoduliną. Białko to w roztworze jest monomerem o promieniu Stokesa 3,9 nm i współczynniku sedymentacji 2,8 S. Oddziałuje ono z tropomiozyną ( $K_D \sim 5 \times 10^{-7}$  M) na obu jej końcach [90, 91]. Prawdopodobną funkcją tropomoduliny jest stabilizacja lub regulacja oddziaływania tropomiozyny z aktyną. Wykazuje ona właściwości podobne do troponiny T z mięśni poprzecznie prążkowanych i mięśnia sercowego. Należy zauważyć, że erytrocyty zawierają komplet białek podobnych do troponin a mianowicie: kalmodulina – analog troponiny C, białko podobne do troponiny I oraz omówiona powyżej tropomodulina – białko podobne do troponiny T. Sugeruje to możliwość udziału jonów  $Ca^{2+}$  w regulacji oddziaływania spektryny z filamentami aktynowymi zasocjowanymi z tropomiozyną [8].

Pomimo znacznego postępu w badaniach nad strukturą białek szkieletu błony erytrocytu oraz komórek nieerytrocytarnych, wiele jeszcze pytań dotyczących ich funkcji pozostaje bez odpowiedzi.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ALPER S, KOPITOFF RR, LIBRESCO SM, LODISH S. Cloning and characterization of murine band 3-related cDNA from kidney and from lymphoid cell line. *J Biol Chem* 1988; **263**: 17092–17099.
- [2] ANDERSON RA, LOVRIEN RE. Glycophorin is linked by band 4.1 protein to the human erythrocyte membrane skeleton. *Nature* 1984; **307**: 655–658.
- [3] ANDERSON RA, MARCHESI VT. Regulation of the association of membrane skeletal protein 4.1 with glycophorin by phosphoinositide. *Nature* 1985; **318**: 285–298.
- [4] BAINES AJ. Ankyrin and the node of Ranvier. *TINS* 1990; **13**: 119–121.

- [5] BAINES AJ, BENNETT V. Synapsin I is a spectrin binding protein immunologically related to erythrocyte protein 4.1. *Nature* 1985; **315**: 410–413.
- [6] BENNETT V. The spectrin-actin junction of erythrocyte membrane skeletons. *Biochim Biophys Acta* 1989; **988**: 107–121.
- [7] BENNETT V. Ankyrins. Adaptors between diverse plasma membrane proteins and the cytoplasm. *J Biol Chem* 1992; **267**(13): 8703–8706.
- [8] BENNETT V. Spectrin-based mambrane skeleton: a multipotential adaptor between plasma membrane and cytoplasm. *Physiol Rev* 1990; **70**: 1029–1065.
- [9] BENNETT V, GARDNER K, STEINER J. Brain adducin: a protein kinase C substrate that may mediate site-directed assembly at the spectrin-actin junction. *J Biol Chem* 1988; **263**: 5560–5569.
- [10] BITBOL M, DEMPSEY C, WATTS A, DEVAUX PF. Weak interaction of spectrin with phosphatidylcholine-phosphatidylserine multibilayers: A<sup>2</sup>H and <sup>31</sup>PMNR study. *FEBS Lett* 1989; **244**: 217–222.
- [11] BOIVIN P, GALAND C, DHERMY D. In vitro digestion of spectrin, protein 4.1 and ankyrin by erythrocyte calcium-dependent neutral protease (calpain I). *Int J Biochem* 1990; **22**: 1479–1489.
- [12] BYERS TJ, BRANTON D. Visualization of the protein associations in the erythrocyte membrane skeleton. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 6153–6157.
- [13] CHAO T-S, TAO M. Effect of 2,3-diphosphoglycerate on the phosphorylation of protein 4.1 by protein kinase C. *Arch Biochem Biophys* 1991; **285**: 221–226.
- [14] CHAO TS, TAO M. Modulation of protein 4.1 binding to inside-out membrane vesicles by phosphorylation. *Biochemistry* 1991; **30**: 10529–10535.
- [15] CIANCI CD, GIORGI M, MORROW JS. Phosphorylation of ankyrin down-regulates its cooperative interaction with spectrin and protein 3. *J Cell Biochem* 1988; **37**: 301–315.
- [16] COHEN AM, LIU SC, LAWLER J, DERICK L, PALEK J. Identification of the protein 4.1 binding site to phosphatidylserine vesicles. *Biochemistry* 1988; **27**: 614–619.
- [17] COHEN CM. The molecular organization of the red cell membrane skeleton. *Semin Hematol* 1983; **20**: 141–158.
- [18] CONBOY J, MARCHESI S, KIM R, AGRE P, KAN YW, MOHANDAS N. Molecular analysis of insertion/deletion mutations in protein 4.1 in elliptocytosis. II. Determination of molecular genetic origins of rearrangements. *J Clin Invest* 1990; **86**: 524–530.
- [19] CONBOY JG, CHAN J, MOHANDAS N, KAN Y. Multiple protein 4.1 isoforms produced by alternative splicing in human erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 9062–9065.
- [20] CONBOY JG, CHAN JY, CHASIS, JA, KAN YW, MOHANDAS N. Tissue and development-specific alternative RNA splicing regulates expression of multiple isoforms of erythroid membrane protein 4.1. *J Biol Chem* 1991; **266**: 8273–8280.
- [21] COSTA FF, AGRE P, WATKINS JP, WINKELMAN JC, TANG TK, JOHN KM, LUX SE, FORGET BG. Linkage of dominant hereditary spherocytosis to the gene for the erythrocyte membrane- skeleton protein ankyrin. *N Engl J Med* 1990; **323**: 1046–1050.
- [22] DAVIS J, DAVIS L, BENNETT V. Diversity of membrane binding sites of ankyrins: brain ankyrin, erythrocyte ankyrin and processed erythrocyte ankyrin associate with distinct sites in kidney membranes. *J Biol Chem* 1989; **264**: 6417–6426.
- [23] DAVIS LH, DAVIS JQ, BENNETT V. Ankyrin regulation – an alternatively spliced segment of the regulatory domain functions as an intramolecular modulator. *J Biol Chem* 1992; **267**(26): 18966–18972.
- [24] DAVIS L, OTTO E, BENNETT V. Specific 33-residue repeat(s) of erythrocyte ankyrin associate with the anion exchanger. *J Biol Chem* 1991; **266**: 11163–11169.
- [25] DERICK LH, LIU SC, CHISHTI AH, PALEK J. Protein immunolocalization in the spread erythrocyte membrane skeleton. *Europ J Cell Biol* 1992; **57**(2): 317–320.
- [26] DEVAUX PF. Protein involvement in transmembrane lipid asymmetry. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1992; **21**: 417–439.
- [27] FAQUIN WC, CHAHWULA SB, CANTLEY LC, BRANTON D. Protein kinase of human erythrocytes phosphorylates band 4.1 and 4.9. *Biochim Biophys Acta* 1986; **887**: 142–149.
- [28] FLUCHER B, DANIELS M. Distribution of Na<sup>+</sup> channels and ankyrin in neuromuscular junctions is complementary to that of acetylcholine receptors and the 43 kD protein. *Neuron* 1989; **3**: 163–175.
- [29] FOWLER VM, BENNETT V. Erythrocyte membrane tropomyosin. Purification and properties. *J Biol Chem* 1984; **259**: 5978–5989.
- [30] GARDNER K, BENNETT V. Modulation of spectrin-actin assembly by erythrocyte adducin. *Nature* 1987; **328**: 359–362.
- [31] GOODMAN SR, KREBS KE, WHITFIELD CF, RIEDERER BM, ZAGON IS. Spectrin and related molecules. *CRC Crit Rev Biochem* 1988; **23**: 171–234.

- [32] GUDI SRP, KUMAR A, BHAKUNI V, GOKHALE SM, GUPTA CM. Membrane skeleton-membrane interaction is not the major determinant of membrane phospholipid asymetry in human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1023**: 63–72.
- [33] HALL TG, BENNETT V. Regulatory domains of human erythrocyte ankyrin. *J Biol Chem* 1987; **262**: 10537–10545.
- [34] HORNE W, LETO T, MARCHESI VT. Differential phosphorylation of multiple sites in protein 4.1 and protein 4.9 by phorbol ester-activated and cyclic AMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem* 1985; **260**: 9073–9075.
- [35] HORNE WC, MIETTINEN H, MARCHESI VT. Erythrocyte membrane skeleton phosphoproteins: identification of two unrelated phosphoproteins in band 4.9. *Biochim Biophys Acta* 1988; **944**: 135–143.
- [36] HORNE WC, PRINZ WC, TANG EK-Y. Identification of two cAMP- dependent phosphorylation sites on erythrocyte protein 4.1. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1055**: 87–92.
- [37] HUSAIN-CHISHTI A, FAQUIN W, WU C-C, BRANTON D. Purification of erythrocyte dematin (protein 4.9) reveals an endogenous protein kinase that modulates actin bundling activity. *J Biol Chem* 1989; **264**: 8985–8991.
- [38] HUSAIN-CHISHTI A, LEVIN A, BRANTON D. Abolition of actin- bundling by phosphorylation of human erythrocyte protein 4.9. *Nature* 1988; **334**: 718–721.
- [39] JAROLIM P, PALEK J, RUBIN HL, PRCHAL JT, KORSGREN C, COHEN CM. Band-3 Tuscaloosa - Pro(327)-Arg(327) substitution in the cytoplasmic domain of erythrocyte band-3 protein associated with spherocytic hemolytic anemia and partial deficiency of protein-4.2. *Blood* 1992; **80**: 523–529.
- [40] JOSHI R, BENNETT V. Mapping the domain structure of erythrocyte adducin. *J Biol Chem* 1990; **265**: 13130–13136.
- [41] JOSHI R, GILLIGAN DM, OTTO E, MCLAUGHLIN T, BENNETT V. Primary structure and domain organization of human alpha and beta adducin. *J Cell Biol* 1991; **115**: 665–675.
- [42] JUNG YC. Erythrocytes: Erythrocyte cytoskeletons coated with exogenous phospholipid as an encapsulating system. *Methods in Enzymol* 1987; **149**: 217–221.
- [43] KALOMIRIS EL, BOURGIGNON LY, Mouse T-lymphoma cells contain a transmembrane glycoprotein (GP85) that binds ankyrin. *J Cell Biol* 1988; **106**: 319–327.
- [44] KOOB R, ZIMMERMANN M, SCHONER W, DRENCKHAHN D, Colocalization and coprecipitation of ankyrin and Na,K-ATPase in kidney epithelial cells. *Eur J Cell Biol* 1987; **45**: 230–237.
- [45] KORDELI E, BENNETT V. Distinct ankyrin isoforms at neuron cell bodies and nodes of Ranvier resolved using erythrocyte ankyrin-deficient mice. *J Cell Biol* 1991; **114**: 1243–1259.
- [46] KORDELI E, DAVIS J, TRAPP B, BENNETT V. An isoform of ankyrin is localized at nodes of Ranvier in myelinated axons of central and peripheral nerves. *J Cell Biol* 1990; **110**: 1341–1352.
- [47] KORSGREEN C, COHEN CM. Association of human erythrocyte band 4.2. Binding to ankyrin and to the cytoplasmic domain of band 3. *J Biol Chem* 1988; **263**: 10212–10218.
- [48] KORSGREN C, LAWLER J, LAMBERT S, SPEICHER DW, COHEN CM. Complete amino acid sequences and homologies of human erythrocyte membrane protein band 4.2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 613–617.
- [49] KREBS KE, PROUTY SM, ZAGON IS, GOODMAN SR. The structural and functional relationship of erythrocyte band 4.1 protein to the neuron specific phosphoprotein synapsin I. *Am J Physiol* 1987; **22**: C500–C505.
- [50] KREBS KE, ZAGON IS, GOODMAN SR. Amelin: a 4.1 related spectrin binding protein found in neuronal cell bodies and dendrites. *J Neurosci* 1987; **7**: 3907–3914.
- [51] KUNIMOTO M, OTTO E, BENNETT V. A new 440-kD isoform is the major ankyrin in neonatal rat brain. *J Cell Biol* 1991; **115**: 1319–1331.
- [52] LAMBERT S, YU H, PRCHAL JT, LAWLER J, RUFF J, SPEICHER D, CHEUNG MC, KAN W, PALEK J. cDNA sequence for human erythrocyte ankyrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 1730–1734.
- [53] LETO TL, MARCHESI VT. A structural model of human erythrocyte protein 4.1. *J Biol Chem* 1984; **259**: 4603–4608.
- [54] LING E, DANILOV YN, COHEN CM. Modulation of red cell band 4.1 function by cAMP-dependent kinase and protein kinase C phosphorylation. *J Biol Chem* 1988; **262**: 2209–2216.
- [55] LIU SC, DERICK LH, PALEK J. Molecular anatomy of erythrocyte membrane skeleton in health and disease. Cellular and molecular biology of normal and abnormal erythroid membranes, UCLA Symposia on cellular and molecular biology, New Series (vol.118). Cohen C.M. and Palek J., ed. Cohen CM; Palek J. New York: Liss; 1990: 171–183.
- [56] LOW PS, WILLARDSON BM, MOHANDAS N, ROSSI M, SHOHE T. Contribution of the band 3-ankyrin interaction to erythrocyte membrane mechanical stability. *Blood* 1991; **77**: 1501–1506.
- [57] LUX SE, JOHN KM, BENNETT V. Analysis of cDNA for human erythrocyte ankyrin indicated a repeated structure with homology to tissue-differentiation and cell-cycle control proteins. *Nature* 1990; **344**: 36–42.

- [58] LUX SE, TSE WT, MENNINGER JC, JOHN KM, HARRIS P, SHALEV O, CHILCOTE RR, MARCHESI SL, WATKINS PC, BENNETT V, MCINTOSH MC, COLLINS F, FRANCKE U, WARD DC, FORGET BG. Hereditary spherocytosis associated with deletion of human erythrocyte ankyrin gene on chromosome 8. *Nature* 1990; **345**: 736–739.
- [59] MAK A, ROSEBROUGH G, BAKER H. Tropomyosin from human erythrocyte membrane polymerizes poorly but binds f-actin effectively in the presence and absence of spectrin. *Biochim Biophys Acta* 1987; **912**: 157–166.
- [60] MARCHESI SL, CONBOY J, AGRE P, LETSINGER JT, MARCHESI VT, SPEICHER DW, MOHANDAS N. Molecular analysis of insertion/deletion mutations in protein 4.1 in elliptocytosis. I. Biochemical identification of rearrangements in the spectrin/actin binding domain and functional characterizations. *J Clin Invest* 1990; **86**: 516–523.
- [61] MATSUZAKI F, SUTOH K, IKAI A. Structural unit of the erythrocyte skeleton. Isolation and electron microscopic examination. *Eur J Cell Biol* 1985; **39**: 153–160.
- [62] MCGOUGH AM, JOSEPHS R. On the structure of erythrocyte spectrin in partially expanded erythrocyte membrane skeleton. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 5208–5212.
- [63] MCGUIRE M, SMITH L, AGRE P. Distinct variants of erythrocyte protein 4.1 inherited with linkage with elliptocytosis and Rh type in three white families. *Blood* 1988; **72**: 287–293.
- [64] MICHALAK K, BOBROWSKA M, SIKORSKI AF. Interaction of bovine spectrin with aminophospholipids. *Gen Physiol Biophys* 1993: in press.
- [65] MIDDELKOOP E, LUBIN BH, BEVERS EM, OP DEN KAMP JAF, COMFURIUS P, CHIU DT-Y, ZWAAL RFA, VAN DEENEN LLM, ROELOFSEN B. Studies on sickled erythrocytes provide evidence that the asymmetric distribution of phosphatidylserine in the red cell membrane is maintained by both ATP-dependent translocation and interaction with membrane skeletal proteins. *Biochim Biophys Acta* 1988; **937**: 281–288.
- [66] MISCHÉ S, MOOSEKER M, MORROW JS. Erythrocyte adducin: A calmodulin regulated actin-bundling protein that stimulated spectrin-actin binding. *J Cell Biol* 1987; **105**: 2837–2849.
- [67] MOMBERS C, DE GIER J, DEMEL RA, VAN DEENEN LLM. Spectrin phospholipid interaction – a monolayer study. *Biochim Biophys Acta* 1980; **603**: 52–62.
- [68] MUELLER T, MORRISON M. Glyconnectin (PAS 2) a membrane attachment site for the human erythrocyte cytoskeleton. Erythrocyte membranes 2: Recent clinical and experimental advances. Kruckeberg, WC; Eaton, JW; Brewer, GJ. New York: A.R. Liss; 1981: 95–112.
- [69] NELSON WJ, HAMMERTON RW. A membrane-cytoskeletal complex containing Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase, ankyrin and fodrin in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells: implications for the biogenesis of epithelial cell polarity. *J Cell Biol* 1989; **108**: 893–902.
- [70] OTTOE, KUNIMOTO M, MCLAUGHLIN T, BENNETT V. Isolation and characterization of cDNAs encoding human brain ankyrins reveal a family of alternatively-spliced genes. *J Cell Biol* 1991; **114**: 241–253.
- [71] PINDER J, OHANIAN V, GRATZER WB. Spectrin and protein 4.1 as an actin filament capping complex. *FEBS Lett* 1984; **169**: 161–164.
- [72] PODOLSKI JL, STECK TL. Association of deoxyribonuclease I with the pointed ends of actin filaments in human red blood cell membrane skeletons. *J Biol Chem* 1988; **263**: 638–645.
- [73] RACUSEN RH, PASTERNAK GR. Microscale, filtration-type binding assay for studying myosin-erythrocyte protein 4.1 interaction. *Anal Biochem* 1990; **188**: 344–348.
- [74] REID ME, TAKAKUWA Y, CONBOY J, TCHERNIA G, MOHANDAS N. Glycophorin C content of human erythrocyte membrane is regulated by protein 4.1. *Blood* 1990; **75**: 2229–2234.
- [75] RYBICKI AC, HEATH R, LUBIN B, SCHWARTZ RS. Human erythrocyte protein 4.1 is a phosphatidylserine binding protein. *J Clin Invest* 1988; **81**: 255–260.
- [76] SATO SB, OHNISHI S. Interaction of a peripheral protein of the erythrocyte membrane, band 4.1 with phosphatidylserine-containing liposomes and erythrocyte inside-out vesicles. *Eur J Biochem* 1983; **130**: 19–25.
- [77] SHAHROKH Z, VERKMAN AS, SHOHET SB. Distance between skeletal protein 4.1 and the erythrocyte membrane bilayer as measured by resonance energy transfer. *J Biol Chem* 1991; **266**: 12082–12089.
- [78] SHEN BW, JOSEPHS J, STECK TL. Ultrastructure of the intact skeletons of the human erythrocyte membrane. *J Cell Biol* 1986; **102**: 997–1006.
- [79] SHIFFER KA, GOERKE J, DUZGUNES N, FEDOR J, SHOHET SB. Intraction of erythrocyte protein 4.1 with phospholipids. A monolayer and liposome study. *Biochim Biophys Acta* 1988; **937**: 269–280.
- [80] SIKORSKI AF. Oddziaływanie spektryny ze zrebem hydrofobowym błony erytrocytu. Wrocław: Wyd. Uniw. Wrocław; 1988.
- [81] SIKORSKI AF. Interaction of spectrin with hydrophobic agaroses. *Acta Biochim Polon* 1988; **35**: 19–26.
- [82] SIKORSKI AF, JEZIERSKI, A. Influence of spectrin on the fluidity of erythrocyte membrane. *Studia Biophys* 1986; **113**: 193–201.

- [83] SIKORSKI AF, KOZUBEK A, SZOPA J. Proteolysis of spectrin by trypsin and pronase in the presence of phospholipid suspensions. *Acta Biochim Polon* 1988; **35**: 72–81.
- [84] SIKORSKI AF, KUCZEK M, NYCZKA Z, KUBIAK Z. Hydrophobic labelling of spectrin in erythrocytes using arylisothiocyanates. *Biomed Biochim Acta* 1987; **46**: 75–82.
- [85] SIKORSKI AF, KUCZEK M. Labelling of erythrocyte spectrin in situ with phenylisothiocyanate. *Biochim Biophys Acta* 1985; **820**: 147–153.
- [86] SIKORSKI AF, MICHALAK K, BOBROWSKA M. Interaction of spectrin with phospholipids. Quenching of spectrin intrinsic fluorescence by phospholipid suspensions. *Biochim Biophys Acta* 1987; **904**: 55–60.
- [87] SIKORSKI AF, MICHALAK K, BOBROWSKA M, KOZUBEK A. Interaction of spectrin with some amphipatic compounds. *Studia Biophys* 1987; **121**: 183–191.
- [88] STAUFENBIEL M, LAZARIDES E. Ankyrin is fatty acid acylated in erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 318–322.
- [89] SUDHOFTC, CZERNIK AJ, KAOH-T, TAKEI K, JOHNSTON PA, HORIUCHI A, KANAZIR SD, WAGNER MA, PERIN MS, DE CAMILLI P, GREENGARD P. Synapsins: mosaics of shared and individual domains in a family of synaptic vesicle phosphoproteins. *Science* 1989; **245**: 1474–1480.
- [90] SUNG LA, FOWLER VM, LAMBERT K, SUSSMAN MA, KARR D. Molecular cloning and characterization of human fetal liver tropomodulin. A tropomyosin-binding protein. *J Biol Chem* 1992; **267**: 2616–2621.
- [91] SUSSMANN MA, FOWLER VM. Tropomodulin binding to tropomyosins. Isoform-specific differences in affinity and stoichiometry. *Eur J Biochem* 1992; **205**: 355–362.
- [92] TANAKA T, KADOWAKI K, LAZARIDES E, SOBUE K.  $Ca^{2+}$ -dependent regulation of the spectrin/actin interaction by calmodulin and protein 4.1. *J Biol Chem* 1991; **266**: 1134–1140.
- [93] TANG TK, QIN Z, LETO T, MARCHESI VT, BENZ EJ JR. Heterogeneity of mRNA and protein products arising from the protein 4.1 gene in erythroid and nonerythroid tissues. *J Cell Biol* 1990; **110**: 617–624.
- [94] THEVENIN BJ-M, LOW PS. Kinetics and regulation of the ankyrin-band 3 interaction of the human red blood cell membrane. *J Biol Chem* 1990; **265**: 16166–16172.
- [95] TREHARNE KJ, RAYNER D, BAINES AJ. Identification and partial purification of ABGP 205, an integral glycoprotein from brain that binds ankyrin. *Biochem J* 1988; **253**: 345–350.
- [96] VERTESSY BG, STECK TL. Elasticity of the human red cell membrane skeleton. Effect of temperature and denaturants. *Biophys J* 1989; **55**: 255–262.
- [97] WHITE RA, BIRKENMAYER CS, LUX SE, BARKER JE. Ankyrin and the hemolytic anemia mutation, nb, map to mouse chromosome 8; presence of the nb allele is associated with a truncated ankyrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 3117–3121.
- [98] WYATT K, CHERRY RJ. Both ankyrin and band 4.1 are required to restrict the rotational mobility of band 3 in the human erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1103**: 327–330.

Otrzymano: 07.01.1993 r.

Przyjęto: 03.02.1993 r.

Adres autorów: 51-148 Wrocław, ul. Przybyszewskiego 63/77.



# ZMIANY W BŁONIE KOMÓRKOWEJ JAKO SKŁADNIK PROCESU STARZENIA SIĘ

## AGING-RELATED PLASMA MEMBRANE CHANGES

Jacek M. WITKOWSKI

Katedra i Zakład Histologii Akademii Medycznej w Gdańsku

*Streszczenie.* W pracy dokonano przeglądu nagromadzonej w ciągu ostatnich lat informacji dotyczącej zmian w błonie komórkowej towarzyszących osobniczemu starzeniu się, na tle ogólnej wiedzy o właściwościach starzejących się komórek. W szczególności uwzględniono fizyko-chemiczne zmiany w lipidach błony (wzrost "lepkości"), różnokierunkowe zmiany właściwości i ekspresji receptorów powierzchniowych oraz aktywności enzymów związanych z błoną i wreszcie zmiany właściwości błonowych mechanizmów transportowych, takich jak pompy jonowe, nośniki oraz kanały błonowe. Uwagę poświęcono zwłaszcza przebiegowi i roli towarzyszących starzeniu się zmian dotyczących mechanizmów transdukcji sygnałów przez błonę komórkową. Wykazano, że ilościowe i jakościowe zmiany w zakresie wszystkich składników błony komórkowej towarzyszą zarówno osobniczemu starzeniu się, jak też starzeniu się poszczególnych komórek. Dużą część pracy poświęcono na wykazanie, że zmiany w zakresie jednego z powyższych zjawisk mogą być przyczyną lub skutkiem zaburzeń innego typu, a także, że towarzyszące starzeniu zmiany w błonie komórkowej są na tyle głębokie iż można oczekiwać ich poważnego wpływu na fizjologiczną wydolność komórki.

*Summary.* The paper concentrates on the review of relatively recent materials concerning cellular ageing, especially in its part related to age-associated changes in the cell membrane. Physicochemical changes in membrane lipids, changes in surface receptor density and affinity, changes of the activities of membrane-bound enzymes and different types of transmembrane transporters are described in detail. The paper attempts to highlight some interrelations between different types of age-related changes of cell membrane properties as well as importance of these for impaired functions of cells in old individuals.

### I. STARZENIE SIĘ KOMÓREK POPRZEDZA STARZENIE SIĘ ORGANIZMU

Procesowi starzenia się ulegają wszystkie] organizmy wielokomórkowe, co prowadzi do ich postępującej deterioracji nasilającej się zwłaszcza po zakończeniu okresu rozrodczego. Przed wystąpieniem zauważalnych zmian w funkcjonowaniu starzejącego się organizmu jako całości można zaobserwować zaburzenia dotyczące zwykle najpierw czynności, a później także morfologii poszczególnych komórek, a nawet ich wyspecjalizowanych organelli. Nie

jest wyjaśnione, czy zaburzenia w działaniu komórek, a w konsekwencji zbudowanych z nich tkanek, narządów i układów, zachodzą równolegle we wszystkich ich rodzajach, czy też istnieje typ komórek (tkanka? narząd?), który starzeje się "najpierw". W związku z tą wątpliwością, w niniejszej pracy przyjęto popularną w literaturze gerontologicznej konwencję, określejącą jako "stare komórki" komórki pochodzące ze starzejącego się organizmu. Wczesne starzenie się takich "wrażliwych" komórek mogłoby być przyczyną zaburzeń, a w konsekwencji objawów starzenia w innych strukturach organizmu. W charakterze hipotetycznych inicjatorów starzenia wymieniane są: układ nerwowy i dokrewny [33, 41], wątroba [106] i wreszcie układ odpornościowy [84, 125, 144]. Szczególnie ten ostatni jest zarówno dobrym "kandydatem" na ewentualny inicjator starzenia, jak też wygodnym modelem do śledzenia jego przebiegu. Składa się na to szereg przyczyn:

- Po pierwsze, system odpornościowy wykorzystuje w swoim działaniu uniwersalne mechanizmy komórkowe (np. rozbudowany system receptorów i mechanizmów transdukcji sygnałów pochodzących zarówno z własnej aktywności komórki, jak też z interakcji z innymi komórkami).

- Po drugie, jego działanie u osobników starzejących się jest zaburzone, co może prowadzić do określonych konsekwencji klinicznych.

- Po trzecie wreszcie, jest on klasycznym wieloskładnikowym układem homeostatycznym, którego postępująca dysfunkcja ma liczne analogie z procesami starzenia zachodzącymi w innych systemach komórkowych [84]. Limfocyty są przy tym szczególnie, wysoce heterogenną populacją komórkową o zróżnicowanej dynamice wzrostu, zawierającą zarówno dużą (sięgającą ponad 3/4) pulę komórek intensywnie dzielących się – o średnim czasie przeżycia nie przekraczającym tygodnia [70], jak też odpowiednio mniejszą grupę komórek nie dzielących się przez znacznie dłuższe okresy lub nawet przez całe życie osobnicze – zahamowanych w fazie  $G_0$  cyklu komórkowego [125]. Dodatkową, korzystną z punktu widzenia badacza cechą limfocytów jest łatwość ich uzyskania w stosunkowo dużych ilościach tak od zwierząt doświadczalnych, jak też od ludzi. W związku z tym stosunkowo duża część przedstawionych poniżej informacji, dotyczących starzenia się komórek pochodzi właśnie z badań wykonanych na limfocytach.

## II. ZMIEJSZENIE ZDOLNOŚCI DO PODZIAŁU NIE JEST UNIWERSALNĄ CECHĄ WSZYSTKICH STARZEJĄCYCH SIĘ KOMÓREK

Większość komórek pochodzących ze starzejącego się organizmu charakteryzuje obniżenie zdolności do proliferacji w odpowiedzi na fizjologiczne czynniki pobudzające. Szczególnie dobrze jest to udokumentowane w przypadku fibroblastów, które zdolne są *in vitro* tylko do określonej liczby podziałów, zmniejszającej się z wiekiem dawcy komórek [przegląd w: 93]. Interesująca jest obserwacja, że proces ten wydaje się dotyczyć także obecnych w heterogennej populacji fibroblastów komórek pnia dla tej linii komórkowej [9]. Do niedawna uważano, że tendencja do redukcji zdolności do proliferacji dotyczy także innych prekursorowych komórek, w szczególności hemopoetycznych komórek pnia i komórek bezpośrednio potomnych w szpiku kostnym. Wykazano m.in., że proporcja komórek w fazie S należących do populacji GM-CFC zmniejsza się z 25–35% u myszy poniżej 6 miesięcy do ok. 10% u dwuletnich zwierząt [129]. Również u ludzi Hirota i wsp. wykazali zależne od starzenia

zmniejszenie częstości BFU-E a także CFU-GM [52]. W świetle innych badań wydaje się jednak, że zmiany zachodzące w szpiku kostnym starzejących się zwierząt i ludzi nie są jednokierunkowe. Na przykład stwierdzono, że pierwotne komórki pnia występujące w szpiku kostnym mają praktycznie nieograniczony potencjał podziałyowy niezależnie od wieku ich dawcy [125].

Proliferacja szpikowych komórek pnia starych myszy i ich zdolność do wytwarzania różnicujących się linii CFU-S, BFU-E, GM-CFC i CFU-F jest, według Sharp i wsp. [121], równa lub nawet większa niż u młodych zwierząt. Williams i wsp. [147] wykazali, że powyższe stwierdzenie jest słuszne nawet, jeśli badany jest szpik bardzo starych myszy (42-miesięcznych) pod warunkiem, że były one hodowane pojedynczo, a nie poddane stresowi życia w klatce z innymi osobnikami. Podobnie, Harrison i wsp. [47] zauważyli, że liczba i zdolność do proliferacji pierwotnych, immuno-hemopoetycznych komórek pnia jest dwukrotnie większa u starych myszy niż u młodych osobników; ci sami autorzy wyliczyli także, że rzeczywista liczba pierwotnych prekursorów szpikowych będących źródłem krążących komórek krwi jest znacznie mniejsza, niż przyjmowano do tej pory i wynosi tylko ok. 1 do 2 na 100 tysięcy wszystkich niezrębowych komórek szpiku. Zwiększoną (w porównaniu do młodych osobników) zdolność proliferacyjną szpikowych prekursorów mielopoety obserwowali także Sharp i wsp. [121] u starych myszy; towarzyszyła temu jednak proporcjonalna utata zdolności do proliferacji i repopulacji grasicy przez prekursorów komórek T. Z kolei Van Zant i wsp. wykryli, że różnice wielkości potencjału proliferacyjnego mogą być nie tyle zależne od wieku, ile od genetycznego tła danego osobnika. Wytworzyli oni allofeniczne chimery myszy szczepów DBA/2 i C57BL/6, z których pierwszy charakteryzuje się wysoką, a drugi niską częstotliwością występowania komórek CFU-S w fazie S cyklu. CFU-S pochodzące ze szczepu o niskiej częstotliwości proliferacji (C57BL/6) zdominowały, a pod koniec życia prawie całkowicie wyparły komórki DBA/2 ze szpiku chimer, co przemawia za istnieniem odwrotnej korelacji między długowiecznością komórek pnia a ich zdolnością proliferacyjną [136]. Również wyniki badań granulopoety u starych ludzi wskazują na tendencję do wzrostu proliferacji pierwotnych (CFU-S) i wstępnie zróżnicowanych (GM-CFU) komórek szpikowych [109]. Cytowani wyżej Hirota i wsp., stwierdzili, że niezależnie od zmniejszonych ilości prekursorów szpikowych u starych ludzi, ich komórki prekursorowe BFU-E były zdolne do proliferacyjnej odpowiedzi na stymulację erytropoetyną w stopniu równym odpowiedzi młodych komórek [52]. Hemopoetyczne komórki pnia pochodzące ze szpiku kostnego myszy można hodować *in vitro*, obserwując wytwarzanie przez nie zróżnicowanych komórek krwi w czasie dłuższym od przeciętnego okresu życia tych zwierząt, przy czym czas ten nie zmienia się w zależności od wieku dawcy szpiku [67].

### III. KOMÓRKI O RÓŻNEJ DYNAMICE WZROSTU MOGĄ SIĘ STARZEĆ W RÓŻNYM TEMPIE

W analizie zjawisk towarzyszących starzeniu się komórek] należy wziąć pod uwagę istnienie populacji o krańcowo różnej dynamice wzrostu. Z jednej strony mamy tu do czynienia z intensywnie proliferującymi komórkami o krótkich (w porównaniu do czasu życia organizmu) okresach międzypodziałyowych, odpowiadających indywidualnemu życiu komórki (np. nabłonki, komórki macierzyste (pnia) i ukierunkowane w szpiku). Populacją komórek

uważanych za krótko żyjące są także "naiwne" limfocyty T, które nie spotkały jeszcze antygeny rozpoznawanego przez ich swoiste receptory. Komórki te po uzyskaniu kompetencji immunologicznej nie dzielą się i pozostają "zawieszane" w fazie  $G_0$  cyklu do momentu spotkania właściwego antygeny. Do niedawna uważano, że "naiwne" komórki T muszą spotkać "swój" antygen i ulec klonalnemu rozplemowi oraz przekształceniu w komórki pamięci) w ciągu kilku, a najwyżej kilkunastu dni od powstania. Wyniki nowych badań, wykorzystujących model repopulacji myszy SCID (które nie mają własnych, zróżnicowanych limfocytów T) oczyszczonymi komórkami o znanym fenotypie odpowiadającym "naiwnym" lub "pamięciowym" limfocytom T wskazują jednak na możliwość przeżycia także "naiwnych" komórek T przez wiele miesięcy (praktycznie przez całe życie biorcy) **bez proliferacji** [126]. Na drugim końcu skali znajdują się populacje komórek postmitotycznych, których podziały a także różnicowanie zakończyły się we wczesnych okresach życia osobniczego, a które następnie przez większą jego część funkcjonują nie dzieląc się (np. komórki nerwowe, hepatocyty), czyli przeżywają czas porównywalny z czasem trwania życia osobniczego [12]. Do tego typu populacji można zaliczyć także limfocyty T tworzące pulę komórek pamięci immunologicznej, z tym jednak zastrzeżeniem, że kontakt z właściwym antygenem zmusza je do proliferacji). Można by przypuszczać, że starzenie się tych dwóch skrajnych odmian populacji komórkowych przebiega odmiennie, gdyż komórki dzielące się ulegają "odmłodzeniu" przy każdym podziale. Okazuje się jednak, że wiele, a prawdopodobnie większość objawów towarzyszących starzeniu się pojedynczej komórki występuje u osobników w podeszłym wieku zarówno w komórkach należących do dynamicznie odnawiających się populacji, jak też w tych, które należą do nie dzielących się populacji statycznych (postmitotycznych) i – oczywiście – w komórkach o "przejściowym" charakterze, do których można zaliczyć wspomniane wyżej limfocyty pamięci immunologicznej. Dotyczy to w szczególności towarzyszących komórkowemu starzeniu się zmian właściwości błony komórkowej, będących przedmiotem niniejszego opracowania.

#### IV. STARZENIU TOWARZYSZĄ CHARAKTERYSTYCZNE ZMIANY WŁAŚCIWOŚCI LIPIDÓW BŁONY KOMÓRKOWEJ

Jedną z najwcześniejszych opisanych, towarzyszących starzeniu się zmian jest wzrost stężenia cholesterolu z równoczesnym względnym spadkiem zawartości fosfolipidów w dwuwarstwie lipidów błony komórkowej. Zmiana ta prowadzi do wzrostu sztywności (lepkości) błon i w konsekwencji do zmniejszenia szybkości dyfuzji lateralnej składników błony komórkowej, a to z kolei do możliwych zaburzeń przezbłonowej transdukcji sygnału. Zmiany składu i proporcji lipidów błonowych występują w równym stopniu w pochodzących od starzejących się osobników, proliferujących enterocytach nabłonka jelitowego i nabłonka gruczołu krokowego, jak też w błonach neuronów, hepatocytów i komórek mięśni szkieletowych [141, 143, 157, 164] czy wreszcie w błonach tak specyficznych tworów, jak lipocyty [161] i płytki krwi [145]. W błonach komórkowych limfocytów T starych ludzi i myszy stwierdzono również zmiany polegające na zwiększonej lepkości błony, zależnej od podwyższonej zawartości cholesterolu [48, 53, 112]. Zmiany te są ściśle skorelowane z obniżoną zdolnością komórek pochodzących od starych osobników do odpowiedzi na stymulację Con A [53]. Są one także podatne, podobnie jak wzrost sztywności błony komórkowej "starych" hepatocytów i neuro-

nów, na modulację diety. Komórki szczurów, u których od połowy czwartego miesiąca życia stosowano dietę polegającą na głodzeniu co drugi dzień, wykazywały poprawę właściwości lipidów błon, tj. obniżenie lepkości błony, czemu w limfocytach T towarzyszyło polepszenie odpowiedzi proliferacyjnej [103, 105]. Ciekawe, że w błonach limfocytów T pochodzących od pacjentów z chorobą Alzheimera dochodzi do przeciwstawnej zmiany – zwiększonej płynności [20]. Ze zmianami składu i płynności warstwy lipidowej błony komórkowej wiąże się prawdopodobnie również obserwowane w limfocytach T starych ludzi i zwierząt zaburzenie ruchliwości receptorów powierzchniowych (tworzenia "czapeczek" przez receptory związane z ligandem) [19, 40]. Inną przyczyną tego ostatniego zjawiska może być zmiana proporcji składników białkowych i lipidowych błon. Stwierdzono m.in., że błony komórkowe limfocytów T starych myszy zawierają znacznie więcej składników białkowych i są bardziej podatne na uszkodzenie przez wolne rodniki niż błony pochodzące z komórek młodych zwierząt [48].

Wyniki nowych badań wskazują, że podwyższenie stosunku ilości cholesterolu do fosfolipidów może nie być jedyną przyczyną wzrostu lepkości błon starych komórek. W lipocytach starych szczurów stwierdzono wzrost stężenia nasyconych kwasów tłuszczowych i ich stosunku do form nienasyconych, a także względny wzrost ilości fosfatydyloetanolaminy – bez zmiany stosunku ilości cholesterolu do fosfolipidów [161]. Niedawno Venkatraman i Fernandez wykazali, że także w błonach komórkowych limfocytów starych szczurów dochodzi do obniżenia zawartości kwasu arachidonowego z równoczesnym istotnym wzrostem zawartości kwasu linolenowego w fosfatydylocholinie i fosfatydyloetanolaminie; według tych autorów, zmiany składu lipidów błon korelowały z obniżoną produkcją interleukiny 2 (IL-2) i podwyższoną – prostaglandyny E2 [140]. W sarkolemie kardiomiocytów starychszczurów stwierdzono z kolei obniżenie zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych z równoczesnym wzrostem lizofosfatydylocholin; to ostatnie zjawisko ma być bezpośrednio odpowiedzialne za "uszywnienie" błony tych komórek [81]. W tym samym materiale pochodzącym odpowiednio od 7- i 24-miesięcznych szczurów stwierdzono jednak także znamienne wzrost zawartości kwasu arachidonowego u starych zwierząt [44]. Wreszcie, w hepatocytach starych szczurów, oprócz wspomnianego wyżej wzrostu stosunku cholesterolu do fosfolipidów błony wykryto także podwyższoną zawartość sfingomieliny i redukcję stężenia fosfatydylocholin [101].

## V. NIEKTÓRE OBSERWOWANE W CZASIE STARZENIA ZMIANY AKTYWNOŚCI ENZYMÓW BŁONOWYCH MOGĄ BYĆ KONSEKWENCJĄ ZABURZEŃ STANU FIZYKOCHEMICZNEGO LIPIDÓW BŁONY KOMÓRKOWEJ

Ze zmianami dotyczącymi składu i stanu fizycznego lipidów błony komórkowej związane są przynajmniej niektóre obserwowane w trakcie starzenia zmiany aktywności enzymów błonowych. Na przykład Pieri stwierdził niedawno obniżenie aktywności 5'-nukleotydyazy w błonach hepatocytów starych szczurów skorelowane ze wzrostem sztywności błon i dające się "wyleczyć" wspomnianą wyżej naprzemienną dietą [104, 105]. Również w hepatocytach szczurzych stwierdzono obniżenie aktywności obojętnej sfingomielinazy, silnie skorelowane z obniżoną zawartością fosfatydylocholin w błonach starych komórek [101].

W przypadku innych błonowych enzymów, których aktywność ulega zmianom w rakcie starzenia, nie wykryto zależności między tymi zmianami a stanem lipidów błonowych. Na przykład, wzrost aktywności związanej z błoną frakcji kinazy białkowej C z równoczesnym spadkiem aktywności frakcji cytoplazmatycznej stwierdzono w starych erytrocytach, izolowanych na podstawie ich podwyższonej gęstości [107]. Również aktywność endogennej proteinazy ulega redukcji w starych ludzkich erytrocytach w porównaniu z komórkami "w średnim wieku" [38]. Aktywność proteolityczna ulega także redukcji w błonach komórek nabłonka cewek proksymalnych kory nerek u starych szczurów; w szczególności dotyczy to metaloproteaz, a zwłaszcza endopeptydazy 24.11 [108]. Znamienneму obniżeniu ulega też aktywność cykazy adenylowej (CA) w komórkach nabłonka gruczołowego ślinianek podżuchwowych starych szczurów [1] a także w neuronach korowych [98]. W tym ostatnim przypadku różnicę zaobserwowano już, gdy porównywano aktywność enzymu w preparatach pochodzących od 2- i 12-miesięcznych zwierząt. Natomiast w splenocytach starych szczurów aktywność CA zarówno spoczynkowa, jak też stymulowana forskoliną lub izoproterenolem nie różniła się od obserwowanej w komórkach młodych zwierząt [135]. Powyższa różnica może wynikać z sugerowanej przez Ahmada i wsp. interpretacji ich wyników; otóż stwierdzili oni, że prawdopodobną przyczyną zmniejszonej aktywności cykazy adenylowej w śliniankach jest zmniejszona zawartość niezbędnych dla działania enzymu białek  $G_s$  w błonach tych komórek [1].

Szczególłą uwagę zaczęto od niedawna poświęcać zmianom aktywności kinaz białkowych (głównie tyrozynowych) związanych z receptorami błonowymi, w związku z ich stwierdzonym i potencjalnym udziałem w transdukcji sygnału. I tak, w lipocytach starych szczurów stwierdzono spadek aktywności tyrozynowej kinazy białkowej związanej z receptorem dla insuliny i związane z tym obniżenie fosforylacji substratu tej kinazy o masie cząsteczkowej 60 kDa [14]. Również związane z błoną komórkową procesy fosforylacji w limfocytach T pochodzących od starych myszy ulegają zaburzeniu. Wykazano na przykład znamienne obniżenie stopnia fosforylacji wszystkich 16 fosfoprotein, które reagują fosforylacją na stymulację komórek T przeciwciałem anti-CD3, konkanawaliną A lub estrami forbolu [100]. Redukcja ta była widoczna już u myszy w wieku 10–13 miesięcy i nasilała się w trakcie starzenia. Co ciekawe, w tych samych omórkach wykryto także efekt odwrotny, tj. proporcjonalny do wieku wzrost stopnia indukowanej przeciwciałem anti-CD3 fosforylacji trzech fosfoprotein [100]. Warunkiem aktywności niektórych składników CD3 (np. CD3  $\gamma$ ) jest ich uprzednia fosforylacja przez kinazę białkową C, której aktywność zależy od działania fosfolipazy  $Cy\ 1$ , a ta z kolei jest uruchomiana przez sygnał pochodzący z pobudzonego receptora dla antygeny (TcR) [przegląd: 146]. Już wcześniej Fong i Makinodan wykazali, że translokacja kinazy C z cytoplazmy do błony komórkowej jest zaburzona w komórkach u starych myszy [34]; zaburzenie to może więc rzutować na szereg współzależnych reakcji. Zupełnie niedawno (wrzesień 1992) pojawiła się także praca, której autorzy wykazali związaną ze starzeniem redukcję ilości produktów fosforylacji zależnej od aktywacji związanej z antygenem CD4 kinazy tyrozylowej  $p56^{lck}$  w mysich limfocytach  $CD4^+$  [122]. Ponieważ działanie kompleksu  $CD4-p56^{lck}$  jest kluczowe dla prawidłowej aktywacji pomocniczych limfocytów T [138], a sama kinaza  $p56^{lck}$  ulega prawdopodobnie fosforylacji pod działaniem kinazy białkowej C [139], wykazanie zaburzenia jej enzymatycznej aktywności w starych komórkach T implikuje poważne konsekwencje dla funkcji układu odpornościowego u starych osobników.

Towarzyszące starzeniu zmiany aktywności enzymów z grupy ATPaz błonowych będących efektorami aktywnego transportu zostaną omówione poniżej.

## VI. W STARZEJĄCYCH SIĘ KOMÓRKACH ZACHODZĄ ZMIANY GĘSTOŚCI RECEPTORÓW POWIERZCHNIOWYCH

Typowym objawem starzenia się komórek różnych typów, jest zmniejszanie się gęstości receptorów powierzchniowych i wewnątrzkomórkowych i/lub ich powinowactwa do ligandów. Udokumentowano to m.in. na przykładzie receptorów beta-adrenergicznych na powierzchni komórek mięśnia sercowego, neuronów i innych [przegląd : 113]. Obniżenie liczby odpowiadających receptorom beta-adrenergicznym miejsc wiążących propranolol na powierzchni limfocytów pochodzących od ludzi w podeszłym wieku stwierdzili Schocken i Roth już ponad 15 lat temu [118] i potwierdzili Padovani i wsp. w 10 lat później [99]. Ostatnio jednak istnienie zmian ilościowych, a także jakościowych (powinowactwa) dotyczących receptorów beta-adrenergicznych w limfocytach ludzi w podeszłym wieku jest kwestionowane. Część autorów nie obserwuje zmniejszenia z wiekiem liczby receptorów [76], inni natomiast stwierdzają wręcz, że w zaawansowanym wieku mamy do czynienia ze wzrostem liczby receptorów beta-adrenergicznych w ludzkich limfocytach [95, 162]. Wreszcie, elegancka praca Gietzen i wsp. wykonana przy użyciu dwóch wysoce specyficznych agonistów beta-receptorów:  $^3\text{H}$ -dihydroalprenololu i 125I-cyanopindololu wykazała także statystycznie istotny wzrost liczby receptorów na limfocytach ludzi w wieku 51–90 lat w porównaniu z komórkami ludzi 19–30-letnich; badacze ci nie stwierdzili natomiast zmian powinowactwa stosowanych ligandów do receptorów [39].

Kontrowersja odnośnie kierunku zmian, jakim ulegają receptory adrenergiczne w trakcie starzenia może dotyczyć nie tylko limfocytów. Na przykład, w pracy zespołu Kobatake i wsp. zawarte są informacje na temat receptorów adrenergicznych w komórkach tłuszczowych młodych i starych szczurów. Autorzy ci wykazali, że liczba receptorów beta i alfa2 ulega redukcji, podczas gdy zawartość receptorów alfa1 wzrasta w tych komórkach u starych zwierząt [61].

Także inne receptory powierzchniowe, obecne w błonach komórkowych limfocytów T, zmieniają gęstość lub powinowactwo do liganda w trakcie osobniczego starzenia się. Analiza tych zmian jest szczególnie ważna, jeśli weźmiemy pod uwagę rolę i wielostronne interakcje receptorów obecnych na powierzchni komórek T. Dotyczy to m.in. receptorów CD2, związanych z "alternatywną" drogą stymulacji tych limfocytów, a rozpoznawalnych dzięki zdolności do wiązania erytrocytów owcy (SRBC)\*; stwierdzono, że tzw. wczesne ("aktywne") rozetki pomiędzy ludzkimi limfocytami T a SRBC wytwarzane są w większym odsetku przez limfocyty starych ludzi [13, 87]. Czynnikiem odpowiedzialnym za obserwowany efekt jest prawdopodobnie wzrost powinowactwa receptorów do SRBC; w przypadku "aktywnych" rozetek możliwa jest także korelacja z obserwowanym w podeszłym wieku wzrostem częstości komórek pamięci ( $\text{CD45R0}^+$ ) – patrz niżej.

Ekspresja receptora dla antygeny TcR (CD3) na powierzchni nie stymulowanych limfocytów T pochodzących od starych myszy, szczurów i ludzi jest w istotny sposób obniżona [4, 40, 46, 66, 96]. Nie stwierdzono natomiast różnic w bezwzględnych ilościach limfocytów T, a także komórek  $\text{CD4}^+$  i  $\text{CD8}^+$  pomiędzy młodymi i starymi ludźmi [78, 80], chociaż ci sami autorzy zaobserwowali istotne zmniejszenie odsetka komórek  $\text{CD8}^+$  kosztem  $\text{CD4}^+$  u ludzi powyżej siedemdziesiątego roku życia [78]. Część badaczy zwraca uwagę na pojawienie się lub ekspansję u ludzi w podeszłym wieku populacji limfocytów T nie mających antygeny

\*SRBC – erytrocyty owcy.

CD3, które mogą być odpowiedzialne za towarzyszące starzeniu zaburzenia immunologiczne [46]. Analiza zmian ekspresji antygenów CD4 i CD8 w wyniku stymulacji mitogenami wykazała statystycznie istotne zmniejszenie bezwzględnej liczby komórek CD8<sup>+</sup>, korelujące u ludzi w podeszłym wieku z obniżeniem ekspresji receptora dla transferyny [78].

Jedną z uznanych przyczyn obniżonej odpowiedzi limfocytów T starych ludzi i zwierząt na stymulację mitogenami jest zmniejszona produkcja i sekrecja interleukin, zwłaszcza IL-2 [25, 35, 72] i IL-3 [15, 72]. Według niektórych badaczy towarzyszy temu proporcjonalnie zmniejszona ekspresja receptorów dla IL-2 na powierzchni "starych" limfocytów T [35, 124]. Stwierdzono, że u myszy obniżenie ekspresji IL-2R dotyczy w większym stopniu komórek CD8<sup>+</sup> niż CD4<sup>+</sup> [49]. Natomiast limfocyty CD4<sup>+</sup> starych myszy charakteryzują się większym niż CD8<sup>+</sup> i obniżeniem zdolności do produkcji i sekrecji IL-2 pod wpływem alloantygenów, anti-CD3 a także PMA i jonomycyny [49, 142]. Orson i współautorzy nie stwierdzają jednak na powierzchni limfocytów T pochodzących od starych ludzi istotnego ubytku ekspresji ani też powinowactwa do liganda receptorów dla IL-2; według tych badaczy zmniejsza się natomiast liczba komórek, które zdolne są do ekspresji IL-2R [97]. Warto tu także wspomnieć o doniesieniach, w których nie tylko nie obserwowano obniżenia produkcji interleukin przez limfocyty T pochodzące od starych myszy, ale nawet (w przypadku IL-3 i IL-4) donoszono o istotnym wzroście ich produkcji [63, 64]. Wykazano także istnienie różnic w ekspresji samych antygenów powierzchniowych CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> w komórkach młodych i starych myszy; większe zmiany, polegające na znamienym obniżeniu gęstości receptora na powierzchni "starych" komórek mają dotyczyć antygeny CD8 [133]. Ekspresja związanych z rozróżnieniem komórek pamięci immunologicznej i "naiwnych" limfocytów T antygenów CD45RB (odpowiednika CD45RA obecnego na powierzchni ludzkich limfocytów T) i 3G11 ulega obniżeniu, antygeny Pgp-1 (CD44) zaś – podwyższeniu u starych zwierząt [29, 69].

Błony komórkowe limfocytów pochodzących od starzejących się osobników stają się zwykle uboższe także w niektóre receptory związane z interakcją z układem nerwowym. Na przykład wyniki badań Normana i wsp. sugerują, że obniżony efekt immunomodulacyjny beta-endorfiny w stosunku do limfocytów T starych myszy zależy od zmniejszonej gęstości receptorów dla endogennych opiatów w błonie tych komórek [92]. Na powierzchni limfocytów pochodzących od starych ludzi pojawia się natomiast, podobnie jak na powierzchni starych erytrocytów, specyficzny "antygen starzenia", który jest najprawdopodobniej zmodyfikowaną formą białka transportującego aniony przez błonę komórkową (patrz niżej) [58]. Innym przykładem wzrostu ekspresji receptora powierzchniowego w błonach limfocytów T pochodzących od ludzi w podeszłym wieku może być podwyższona gęstość cholinergicznym receptorów muskarynowych [32].

Lista receptorów powierzchniowych, których ilość lub powinowactwo do liganda zmniejsza się w zaawansowanym wieku w różnych typach komórek jest oczywiście znacznie większa [przegląd w: 26]. Dla ilustracji należy tu wymienić redukcję liczby receptorów dla czynnika wzrostowego EGF w keratynocytach naskórka [12, 111] i mózgu [51], receptorów dla insuliny i konkanawaliny A na powierzchni fibroblastów [2], czy receptorów dla estrogenów w macicy [33]. Spośród dwóch typów receptorów dla TSH na błonach komórek nabłonka gruczołowego tarczycy szczura, liczba receptorów o wysokim powinowactwie jest o połowę mniejsza u starych zwierząt niż u młodych osobników; natomiast liczba receptorów o niskim powinowactwie nie zmienia się [110]. W mózgach starych szczurów (zwłaszcza w obszarze *neostriatum*) stwierdzono z kolei obniżenie liczby i powinowactwa do liganda receptorów o wysokim i niskim powinowactwie dla czynnika wzrostowego NGF [3] i obniżenie liczby receptorów dla



dopaminy [123] oraz GABA [21]; w innych regionach mózgu redukcja dotyczyła tylko receptorów NGF o wysokim powinowactwie lub nie występowała [3].

Ciekawe, że szczur może nie być najlepszym modelem dla procesów starzenia się ludzkiego mózgu. Yamaguchi i Yamagata stwierdzili niedawno, że ilość receptorów serotonergiczných w korze mózgu starych szczurów szczepu Fisher nie zmieniała się w porównaniu do młodych zwierząt [159]. Natomiast u starych osobników ryjówki pizmowej *Suncus murinus* ci sami autorzy stwierdzili istotną redukcję powinowactwa tych receptorów do ligandów a także ich ilości; utrzymują oni, że ryjówka ta jest ewolucyjnie bliższa ssakom naczelnym i człowiekowi niż szczur [159].

Wydaje się, że towarzyszące starzeniu zmiany gęstości powierzchniowych receptorów mogą, przynajmniej w komórkach nerwowych, występować nie tylko u ssaków; przykładem może być stwierdzenie redukcji liczby receptorów dla benzodiazepiny w mózгах starych węgorzy (*Anguilla Anguilla*) w porównaniu z liczbą tych receptorów w mózгах młodych, dojrzałych osobników tego samego gatunku [22].

## VII. ZMIANY POWINOWACTWA LIGAND-RECEPTOR MOGĄ ZALEŻEĆ OD ZABURZEŃ ŁADUNKU POWIERZCHNIOWEGO I/LUB POTENCJAŁU BŁONOWEGO W STARYCH KOMÓRKACH

Zmiany właściwości elektrycznych powierzchni starzejących się komórek badane są od prawie 10 lat, jednak zajmujący się tym zagadnieniem badacze nie stworzyli jeszcze spójnego modelu tych zaburzeń. Związane jest to z jednej strony z trudnościami metodycznymi oceny tak ładunku powierzchniowego (ŁP), jak też przezbłonowego potencjału elektrycznego (PPE) w żywych komórkach, z drugiej zaś ze stosunkowo późnym uświadomieniem sobie istotnej roli dynamicznych zmian ŁP, a zwłaszcza PPE w czynności komórek innych niż nerwowe i mięśniowe. W ostatnim dziesięcioleciu rozwinięte zostały techniki badawcze, umożliwiające nieinwazyjne badanie potencjału błonowego (bez użycia mikroelektrod, które zastąpione zostały przez barwniki fluorescencyjne o odpowiednich właściwościach), co umożliwiło jego wiarygodną ocenę także w małych komórkach, takich jak komórki gruczołowe czy komórki krwi.

Od dawna wiadomo, że zmiana wielkości ładunku powierzchniowego błony powoduje zmianę aktywności niektórych enzymów błonowych [11], a także zmianę temperatury przejścia fazowego lipidów błonowych [55]. Zmiana potencjału PPE może wpływać na metabolizm, a przez to ostateczny stan lipidów błonowych, przynajmniej w komórkach bez kręgowców; wykazano, że komórki *Acholeplasma laidlawii* hiperpolaryzowane działaniem jonoforu potasowego walinomycyny syntetyzują i wbudowują w swoje błony powierzchniowe więcej dwuglicerydów zawierających reszty diglukozylowe kosztem form zawierających reszty monoglukozylowe [18]. W komórkach limfatycznych z kolei stwierdzono istnienie korelacji pomiędzy PPE a sztywnością błony [65]. Bardzo dobrze udokumentowana jest obserwacja, że zmiana potencjału elektrycznego wpływa na aktywność (prawdopodobieństwo otwarcia) sterowanych potencjałem błonowych kanałów jonowych, wykrywanych (w bardzo szerokim zakresie właściwości takich jak selektywność, konduktancja i właśnie wrażliwość na zmiany PPE) we wszystkich badanych komórkach [przegląd w:

71, 91]. Podobnie, zmiany pola elektrycznego generowanego (w uproszczeniu) przez ładunek i potencjał błony mogą wpływać na aktywność transportową nośników błonowych [7]. Wreszcie, zmiany ładunku powierzchniowego błony mogą zmieniać reaktywność komórek na (elektrycznie naładowane) ligandy. Na przykład, dojrzałe mysie limfocyty T mają stosunkowo duży ujemny ładunek powierzchniowy i nie reagują mitogenezą na działanie kwasu poliakrylowego, który jest mitogenny dla komórek B i niedojrzałych tymocytów; redukcja ŁP dojrzałych komórek T powoduje, że stają się one podatne na mitogenne działanie tej substancji [8].

Ładunek, jaki w warunkach fizjologicznych ma cząsteczka białka, może decydować o jej przestrzennym stosunku do otaczających lipidów błonowych [10, 23]. Efekt ten zależy od interakcji między ładunkiem elektrycznym cząsteczki białka i polem elektrycznym komórki, które z kolei jest funkcją sumarycznego ładunku i potencjału błonowego. I tak na przykład depolaryzacja, tj. obniżenie PPE, wpływa stymulująco na ekspresję integralnych białek błonowych w neuronach [74].

Zmiany potencjału błonowego (szybsze) i ładunku powierzchniowego (wolniejsze) zachodzą w trakcie normalnych czynności życiowych większości, a być może wszystkich komórek. Oprócz oczywistych zmian potencjału (potencjałów czynnościowych) w "pobudliwych" komórkach nerwowych i mięśniowych, fluktuacje PPE zachodzą także, pod wpływem właściwego dla danego typu komórek czynnika pobudzającego, np. w egzokrynowych komórkach gruczołowych ślinianek przyusznych [130] czy gruczołów potowych [56], komórkach chromafinowych nadnerczy [90], monocytach i makrofagach [79], neutrofilach z ludzkiej krwi obwodowej [przegląd w: 62] i limfocytach T [przegląd w: 153]. W tych ostatnich komórkach wykazano także zmiany ładunku powierzchniowego będące wynikiem odpowiedzi na stymulację mitogenem [54].

Powyższe fakty stanowią podstawę dla próby odpowiedzi na pytanie, czy właściwości elektryczne powierzchni komórek zmieniają się w trakcie starzenia i czy zmiany te korelują z opisywanymi w starzejących się komórkach zaburzeniami czynnościowymi. Odpowiedź na pierwsze z powyższych pytań jest, jak zostanie wykazane niżej, twierdząca; odpowiedź na drugie wymaga, jak się wydaje, dalszych badań. I tak, dość typową zmianą potencjału błonowego zachodzącą w komórkach starych osobników jest spoczynkowa depolaryzacja (zmniejszenie ujemnego potencjału elektrycznego wnętrza nie pobudzonej komórki). W komórkach nerwowych opisali ten efekt Tanaka i Ando; w synapsach korowych u myszy 27-mies. dochodziło do redukcji PPE od  $-65.4$  mV typowego dla młodych zwierząt do  $-58.1$  mV, z równoczesną obniżką stężenia  $K^+$  w cytoplazmie o ok. 13% i redukcją aktywności pompy sodowej o ok. 20%, która dodatnio korelowała z redukcją zawartości fosfatydylocholiny w błonach synaptosomów [128]. Względnie spoczynkową depolaryzację limfocytów T pochodzących z krwi obwodowej ludzi w podeszłym wieku, zaobserwowali Witkowski, Myśliwski i Myśliwska [150], Damjanovich i Pieri [24] oraz Witkowski i Myśliwski [152]. Depolaryzacji ulegają także nie stymulowane limfocyty T z węzłów chłonnych, krwi obwodowej i śledziony starych myszy [149, 151]. Limfocyty T starych myszy i ludzi w mniejszym stopniu niż komórki młodych osobników reagują zmianą potencjału spoczynkowego błony na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia kationów potasowych [137, 154]. Zaburzenia spoczynkowego potencjału elektrycznego błony w komórkach starych osobników obserwowali także Frolkis i wsp. [36]. Autorzy ci wiążą zmiany PPE z obniżoną wydolnością energetyczną (produkcją ATP) starych komórek; zwracają także uwagę na stan podwyższonej oksydacji białek błonowych jako na możliwą przyczynę zaburzeń funkcji transportowych, a w konse-

kwencji potencjału błonowego [36]. Nadmierną oksydację białek błonowych obserwowali także Seppi i wsp. w błonach starych erytrocytów uzyskanych metodą wirowania w gradiencie gęstości. W szczególności oksydacja miała dotyczyć przezbłonowego transportera anionów (białka 3 pasma) [120]; porównaj cytowane prace M.M.B. Kay i wsp. [58, 59].

Również potencjał czynnościowy ulega zmianom w starzejących się komórkach. Także w tym przypadku, obserwacje dotyczą głównie komórek pobudliwych. I tak, we włóknach mięśni szkieletowych starych szczurów zaobserwowano m.in. wydłużenie czasu trwania potencjału czynnościowego [27]. Podobnie, redukcję wielkości potencjału spoczynkowego, a także wydłużenie i zmianę kształtu potencjału czynnościowego zaobserwowano w neuronach i kardiomiocytach pochodzących od ludzi w podeszłym wieku [30, 31, 119]. Jeśli chodzi o komórki proliferujące, to informacje na temat związanych ze starzeniem zmian ich czynnościowych potencjałów elektrycznych są jeszcze bardziej skąpe. Nieco informacji udało się nagromadzić na temat zmian potencjału czynnościowego w starych limfocytach T ludzi i zwierząt. Badania autora, wykonane za pomocą metody cytofotometrii przepływowej oraz anionowej sondy potencjałowo-wrażliwej DiBAC<sub>4</sub> (3) wykazały istnienie głębokiej różnicy w przebiegu potencjału czynnościowego w ciągu pierwszej godziny stymulacji konkanawaliną A limfocytów T młodych i starych myszy; podczas gdy dominującym zjawiskiem elektrycznym w stymulowanych komórkach młodych zwierząt była depolaryzacja, typowa dla limfocytów pochodzących od starych myszy była hiperpolaryzacja [149, 154]. Tę samą tendencję obserwował Gupta w przypadku stymulowanych PHA limfocytów T pochodzących od młodych i starych ludzi [45]. Ciekawe, że o ile hiperpolaryzacja błony indukowana była selektywnie działaniem jonoforów wapniowych jonomycyny lub A23187, wykazujących działanie mitogenne w stosunku do mysich i ludzkich limfocytów T, zachodziła ona z opóźnieniem w komórkach T starych zwierząt [154].

Towarzyszące starzeniu zmiany wielkości ładunku powierzchniowego dotyczą również komórek różnych typów. Badane są one z zastosowaniem kilku głównych metod: obserwacji wiązania "dużych, trwałych jonów" (np. kationizowanej ferrytyny, a także sprzężonych z barwnikami fluorescencyjnymi polikationów, takich jak wysokocząsteczkowa polilizyna lub poliornityna, czy wreszcie cząsteczek immunoglobulin), oraz obserwacji szybkości przemieszczania się komórek w zewnętrznym, sztucznym polu elektrycznym ("ruchliwości elektroforetycznej"). Według obserwacji Yamamoto i Yamamoto [160] ładunek powierzchniowy fibroblastów ludzkich hodowanych *in vitro* obniżał się z wiekiem w istotnym stopniu w każdej z 13 badanych przez nich linii komórkowych. Ze zmianami ładunku powierzchni korelują według Mann i wsp. [77] zmiany w składzie oligosacharydów w fibroblastach starzejących się *in vitro*, polegające m.in. na obniżonej zawartości kwasu siałowego w glikoproteidach. Podobne zjawisko obserwował Aminoff w starych erytrocytach ludzkich [6]; w tych komórkach desialylacja ma dotyczyć głównie glikoforyny i prowadzić do wyeksponowania na powierzchni starych krwinek reszt galaktozylo-N-acetylo-galaktozaminy, które rozpoznawane są przez IgG i IgM powstające w wyniku autoimmunizacji. Wzrost wiązania immunoglobulin na powierzchni starych ludzkich erytrocytów obserwowali także Mohandas i Groner [86]; również ci autorzy przypisują obserwowane zjawisko zmniejszeniu ładunku powierzchniowego starych komórek. Zmiany ładunku powierzchniowego w starych erytrocytach powodują także nabycie przez nie zdolności do wiązania lektyn roślinnych WGA i PNA [114]. Z kolei wśród limfocytów T pochodzących od ludzi w podeszłym wieku wzrasta ilość komórek obdarzonych **większym** ładunkiem powierzchniowym [152]. Ładunek powierzchniowy wzrasta także w komórkach kłębków nerkowych 24-miesięcznych szczurów, co

wiązane jest ze zwiększoną sulfatacją proteoglikanów i większą ilością grup karboksylowych w tychże [127].

### VIII. ZABURZENIA POTENCJAŁU BŁONOWEGO W STARYCH KOMÓRKACH WIĄŻĄ SIĘ ZE ZMIANAMI WŁAŚCIWOŚCI AKTYWNYCH I PASYWNYCH MECHANIZMÓW TRANSPORTU PRZEZ BŁONĘ

Utrzymanie spoczynkowego potencjału elektrycznego błony zależy od wybiórczego przepływu przez tę błonę niektórych jonów, szczególnie kationów  $K^+$ ,  $Na^+$  i  $Ca^{2+}$  oraz anionów chlorkowych  $Cl^-$  [94]. Podobnie, powstanie potencjału czynnościowego, a następnie szybki powrót środowiska wewnątrzkomórkowego do stanu sprzed jego powstania uwarunkowane jest szybkim, kontrolowanym przepływem jonów przez błonę. W błonach wszystkich komórek *Eucaryota*, a prawdopodobnie także *Procaryota* zawarte są mechanizmy aktywnego i pasywnego transportu jonów, takie jak zużywające energię hydrolizy ATP pompy jonowe, a także korzystające głównie z potencjalnej energii związanej z istnieniem przezbłonowego gradientu stężeń jonów błonowe kanały jonowe i nośniki. Oprócz uczestniczenia w tworzeniu potencjału błonowego, jony metali pełnią ważną dla czynności komórki funkcję w procesie transdukcji sygnałów do jej wnętrza. Szczególnie ważne są tu jony  $Ca^{2+}$ ; gwałtowny, krótkotrwały wzrost ich stężenia ("sygnał wapniowy") wykrywany jest w cytoplazmie praktycznie wszystkich stymulowanych komórek. Z transportem jonów przez błony komórkowe związany jest także transport substratów organicznych niezbędnych dla życia komórki, takich jak cukry, aminokwasy i nukleozydy. Wreszcie, transportowi jonów przez błonę komórkową towarzyszy ruch cząsteczek wody przez tę błonę, co prowadzi do zmian objętości komórki; wykazano, że objętość ta jest w pewnym stopniu kontrolowana przez aktywację błonowych systemów transportu kationów i anionów [117]. Poniżej zostanie krótko wykazane, że większość z wyżej wspomnianych aktywnych i pasywnych transportów przez błonę ulega zaburzeniom w starzejących się komórkach.

Związane ze starzeniem zaburzenia wewnątrzkomórkowych stężeń jonów metali zostały szczególnie dobrze udokumentowane w przypadku  $Ca^{2+}$ . Zmiany wielkości napływu wapnia do cytoplazmy w odpowiedzi na stymulację obserwowali m.in. Frolkis i wsp. w neuronach starych osobników *Lymnea stagnalis* [37]. Stwierdzili oni wzrost lub spadek wielkości "sygnału wapniowego" w zależności od rodzaju badanych komórek nerwowych; zauważyli także, że pewne typy kanałów wapniowych zanikały, a inne, mające zmienione właściwości, pojawiały się w błonach starych neuronów. Obniżenie liczby kanałów wapniowych i związana z tym redukcję sygnału wapniowego stwierdzili także Gudmundsdottir i wsp. [44] w kardiomiocytach starych szczurów. Z kolei według Dillon, Gu i Nayler gęstość receptorów dla antagonistów wapnia (odpowiadających kanałom  $Ca^{2+}$ ) **zwiększa się** na powierzchni kardiomiocytów starych szczurów [28].

Ostatnio ze szczególną uwagą badane są zaburzenia transdukcji związanych z przezbłonowym transportem jonów sygnałów stymulujących w limfocytach T starych ludzi i zwierząt. Jeszcze w roku 1986 Tollefsbol w swoim wyczerpującym na ówczesne czasy zagadnienie przeglądzie zaprzeczał istnieniu związanych z wiekiem zmian transportu jonów  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$  i  $Zn^{2+}$  przez błonę komórkową limfocytów T ulegających aktywacji, równocześnie

wskazując na zależne od wieku obniżenie poziomu cyklicznego AMP i wzrost poziomu cyklicznego GMP w tych komórkach [131]. Już w tym samym roku Miller wykazał, że limfocyty T pochodzące od starych myszy wymagają (w porównaniu do komórek młodych zwierząt) wyższych dawek jonomycyny w celu uzyskania maksymalnej proliferacji, co wiązało z zaburzeniem transdukcji "sygnału wapniowego" przez błonę komórkową starych limfocytów [82]. Bezpośrednie badania wielkości zmiany stężenia wapnia w cytoplazmie stymulowanych limfocytów T w zależności od wieku pochodzą głównie z tej samej pracowni. Wykazano w nich, że w stymulowanych Con A limfocytach T starych myszy dochodzi zarówno do zmniejszenia wielkości "sygnału wapniowego", jak też do obniżenia szybkości jego narastania; ponadto zmniejsza się także liczba komórek zdolnych do generowania "sygnału wapniowego" w odpowiedzi na Con A [83]. Może to być związane z udokumentowanym wzrostem u starych zwierząt proporcji komórek pamięci immunologicznej, w których "sygnał wapniowy" w odpowiedzi na Con A i anti-CD3 jest wydatnie obniżony [102]. Wydaje się, że zmniejszony napływ  $Ca^{2+}$  do cytoplazmy stymulowanych mitogenem limfocytów T jest niezależny od szybkości przemian fosfotydyloinozytolu (tworzenia aktywnych biologicznie polifosforanów inozytolu –  $IP_3$  i  $IP_4$ ), która nie ulega zmniejszeniu w limfocytach T starych zwierząt [68]. Obniżenie zdolności do generowania sygnału wapniowego przez stymulowane PHA limfocyty T starych ludzi obserwowali Lustyik i O'Leary [75], a także Gupta [45]. To samo zjawisko stwierdzili także Grossman, Ledbetter i Rabinovitch w przypadku limfocytów T starych ludzi stymulowanych mitogenem PHA lub przeciwciałem monoklonalnym anti-CD3. Autorzy ci stwierdzili jednak, że efekt ten dotyczy wyłącznie "starzejących się" limfocytów  $CD4^+$ , podczas gdy "sygnał wapniowy" w limfocytach  $CD8^+$  od tych samych starych osób nie tylko nie zmniejszał się, ale nawet ulegał wzmoczeniu [42]. Ci sami autorzy, badając reakcję mysich limfocytów T na stymulację konkanawaliną A lub anti-CD3 stwierdzili, że wzrost cytoplazmatycznego stężenia  $Ca^{2+}$  był zredukowany w równym stopniu w komórkach  $CD4^+$ , jak i  $CD8^+$  pochodzących od starych zwierząt [43]. Z kolei Nagelkerken wykazał, że odsetek limfocytów  $CD4^+$ , które odpowiadają wzrostem cytoplazmatycznego stężenia  $Ca^{2+}$  na stymulację anti-CD3 malał z 70% u młodych myszy do 35% u starych zwierząt; podobnie obniżał się odsetek komórek odpowiadających "sygnałem wapniowym" na działanie jonomycyny, wynosząc odpowiednio 95% u młodych i 55% u starych myszy [89]. Obniżona odpowiedź limfocytów T pochodzących od starych zwierząt na stymulację jonoforami wapniowymi A23187 i jonomycyną, zarówno bez- jak i z dodatkiem estrów forbolu [82, 158] wydaje się nie zależeć od zaburzonego transportu kompleksu  $Ca^{2+}$ -jonofor przez błonę komórkową; Miller sugeruje, że może być za nie odpowiedzialna "nadczynność" mechanizmów eliminujących  $Ca^{2+}$  z cytoplazmy starych komórek, takich jak błonowa  $Ca^{2+}$ -zależna ATP-aza ("pompa wapniowa") [85]. Wzrost aktywności pompy wapniowej obserwowali Samaja i wsp. w starych erytrocytach; autorzy ci sugerują, że efekt ten może zależeć od zmiany poziomu kalmuliny lub eliminacji nie specywowanego inhibitora pompy wapniowej w starych komórkach [116]. Podobne są także obserwacje i sugestie Rubinacci i wsp. [115]. Obserwowano jednak także obniżenie aktywności ATP-azy aktywnie transportującej  $Ca^{2+}$  w starych erytrocytach [50]. Także w innych typach komórek może zachodzić zależna od wieku redukcja aktywności ATP-azy wapniowej. Na przykład Ambudkar i wsp. stwierdzili redukcję aktywnego uwalniania wapnia z komórek nabłonka gruczołowego przyusznic (podstawno-boczny obszar błony) u starych szczurów [5], a cytowany wyżej Heyliger wykazał zmniejszoną aktywność pompy wapniowej także w starych kardiomiocytach [50].

W trakcie starzenia dochodzi także do obniżenia transportowej aktywności ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) ATP-azy ("pompy sodowej") w wielu typach komórek. Redukcję aktywności pompy sodowej obserwowano we włóknach mięśnia szkieletowego [17], erytrocytach [163] jak też komórkach nabłonków gruczołowych [33]. Viani i wsp. stwierdzili niedawno, że w synaptosomach starych szczurów zachodzi redukcja aktywności ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) ATP-azy skorelowana ze wzrostem peroksydacji lipidów błon [141]. Aktywny, wrażliwy na ouabainę transport kationów  $\text{K}^+$  ulega istotnemu zmniejszeniu także w limfocytach krwi obwodowej starych ludzi [148]. Obserwacja ta nie zgadza się w pełni z wynikami wcześniejszych badań Kennes i wsp., którzy wykazali, że aktywacja ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) ATP-azy błonowej w stymulowanych PHA limfocytach T starych ludzi zachodzi prawidłowo; autorzy ci zwracali jednak głównie uwagę na wielkość i szybkość wzrostu aktywności enzymu w stymulowanych komórkach, a nie na jego spoczynkową aktywność w komórkach nie poddanych działaniu mitogenu [60].

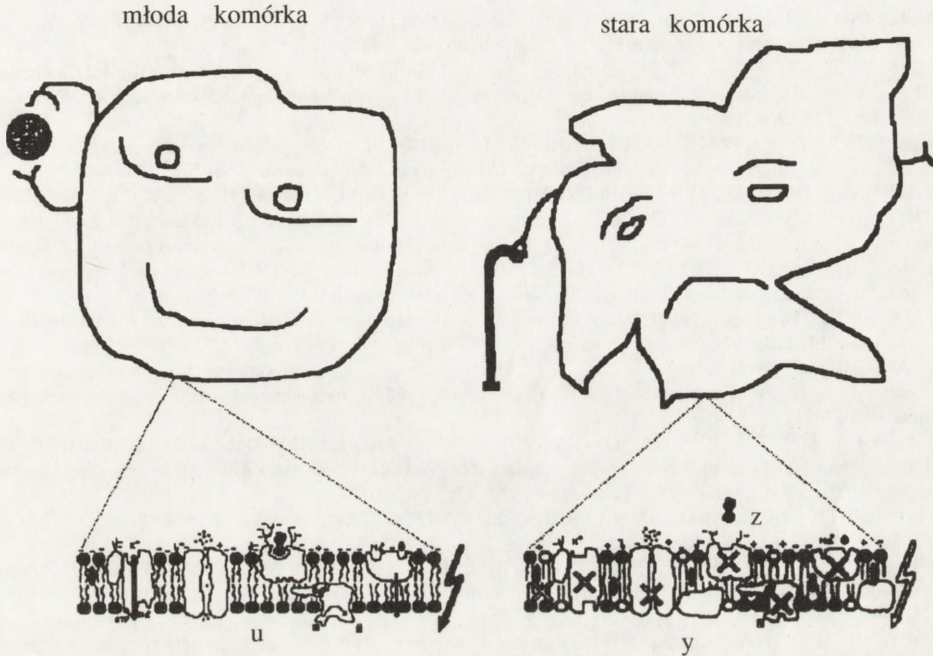
Również pasywny transport jonów przez błonę komórkową, związany z aktywnością kanałów błonowych, ulega towarzyszącym starzeniu zmianom. Damjanovich i Pieri stwierdzili niedawno (1991), że w starych ludzkich limfocytach T zmienia się dynamika i obniża prawdopodobieństwo otwarcia kanałów sodowych [24]. Autor niniejszego opracowania wykazał natomiast, że w ludzkich, a także mysich limfocytach T dochodzi w podeszłym wieku do głębokiego upośledzenia transportu  $\text{K}^+$  przez kanały potasowe zależne od  $\text{Ca}^{2+}$  [150, 156], a także, że stymulowane Con A komórki T starych ludzi wykazują podwyższoną wrażliwość na ko-stymulacyjne działanie blokera kanału sodowego- saksytoksyny, co pośrednio sugeruje istnienie towarzyszących starzeniu zmian ekspresji lub właściwości kanału sodowego w tych komórkach [88].

Ciekawe obserwacje dotyczą także zmian wielkości przepływu anionów  $\text{Cl}^-$  przez błony starych komórek. Obniżenie indukowanego GABA przepływu  $\text{Cl}^-$  przez błony neuronów w mózgach starych szczurów obserwowali Concas i wsp. [21], a we włóknach mięśni szkieletowych De Luca i wsp. [27].

Zmiany towarzyszące starzeniu dotyczą także innych błonowych białek transportowych. Można tu wymienić zmniejszenie aktywności wymiennika  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  w erytrocytach [50], nośnik anionów, którego aktywność wzrasta w erytrocytach, nabłonkach i neuronach [163], a także transporter glukozy, którego zdolność do przenoszenia cukru przez błonę komórkową w enterocytach [132] oraz komórkach tłuszczowych i mięśniach szkieletowych szczurów [73] i erytrocytach [58] ulega znamiennej zmniejszeniu. Według Kay [59], zmiana w strukturze transportera anionów w starych RBC jest stosunkowo niewielka i zachodzi w określonych miejscach cząsteczki odpowiadających dwóm zewnątrzkomórkowym, wiążącym aniony regionom zawierającym lizynę.

Ostatnim jak dotychczas "dodatkiem" do listy transportowych białek błonowych, których aktywność wydaje się ulegać zmianie w trakcie starzenia, jest glikoproteina P (*gp170*). Białko to znane jest jako efektor wielolekowej oporności (*multidrug resistance*) komórek nowotworowych, w których też jest najczęściej i w największych ilościach wykrywane [przegląd w: 57]. Glikoproteina P jest ATP-zależnym, stosunkowo nieselektywnym transporterem – pompą, eliminującym z cytoplazmy tak różne substancje jak leki cytostatyczne, barwniki, hormony sterydowe itp. Oprócz komórek nowotworowych *gp170* znajduje się także w nabłonkach gruczołowych (nadnercza), enterocytach, hepatocytach, komórkach kanalików nerkowych, hematopoetycznych komórkach pnia w szpiku kostnym i śródbłonkach [16, 57]. Ostatnio autorowi tej pracy udało się wykazać, że *gp170* pojawia się na powierzchni dużego (zwykle przekraczającego 60%) odsetka limfocytów T starych myszy, odpowiadającego

ilościowo, ale nie w pełni identycznego fenotypowo z komórkami T pamięci immunologicznej [155]. Nie jest jeszcze wiadome, jaką funkcję pełni to białko w limfocytach; z badań innych komórek wiadomo natomiast, że może ono mieć m.in. związek z regulacją stężenia  $\text{Cl}^+$  w cytoplazmie [134], co wskazuje na możliwą bardziej uniwersalną rolę zmian wewnątrzkomórkowych stężeń  $\text{Cl}^+$  w procesach starzenia się komórek.



Rys. Zasadnicze zmiany w błonach starzejących się komórek: I – wzrost stężenia cholesterolu, u – fizykochemiczne zmiany stanu fosfolipidów (1), y – zmiany właściwości białek błonowych, w tym: ekspresji i/lub aktywności pomp jonowych (2), kanałów błonowych (3), enzymów (5), nośników (6), ekspresji, interakcji i/lub powinowactwa receptorów (4); wzrost gęstości białek (7), zmiany ładunku powierzchniowego i potencjału przezbłonowego (8); z – ligand, x – zaburzenia ilości, struktury lub czynności składników błon

## IX. WNIOSKI

Zadaniem powyższego przeglądu było zilustrowanie tezy, mówiącej, że błona komórkowa w praktycznie wszystkich komórkach *Eucaryota* ulega charakterystycznym zmianom towarzyszącym zarówno "starzeniu się" komórki jak też starzeniu się osobnika. Zmiany te dotyczą wszystkich podstawowych składników błony: lipidów, białek i cukrów i mają zarówno ilościowy, jak też jakościowy charakter (patrz ilustracja). Szczególnie ważne wydają się być zmiany dotyczące receptorów powierzchniowych, a także – związanych z nimi – mechanizmów bezpośrednio i pośrednio związanych z transdukcją sygnału do wnętrza komórki, takich jak kinazy białkowe, a także aktywne i pasywne mechanizmy regulacji przepływu przez błonę jonów  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  i  $\text{Cl}^+$ , (a więc kontroli spoczynkowego i czynnościowego potencjału elektrycznego błony) i jej ładunku. Oczywiście, niezbędne są dalsze badania

mające na celu zrozumienie konkretnych skutków, jakie zaburzenia błonowe mogą mieć dla czynności starzejących się komórek.

## LITERATURA

- [1] AHMAD SN, ALAM SQ, ALAM BS. Effect of ageing on adenylate cyclase activity and G-proteins in rat submandibular salivary glands. *Arch. Oral Biol* 1990; **35**: 885–890
- [2] AIZAWA S, MITSUI Y, KURIMOTO F. Cell surface changes accompanying aging in human diploid fibroblasts. II. Two types of age-related changes revealed by concanavalin A-mediated red blood cell adsorption. *Exptl Cell Res* 1980; **125**: 287–296
- [3] ALBERCH J, PEREZ-NAVARRO E, ARENAS E, MARSAL J. Involvement of nerve growth factor and its receptor in the regulation of the cholinergic function in aged rats. *J Neurochem* 1991; **57**: 1483–1487
- [4] ALES-MARTINEZ JE, ALVAREZ-MON M, MERINO F, BONILLA F, MARTINEZ AC, DURANTEZ A, DE LA HERA A. Decreased TcR-CD3<sup>+</sup> T cell numbers in healthy aged humans. Evidence that T cell defects are masked by a reciprocal increase of TcR-CD3<sup>+</sup>CD2<sup>+</sup> natural killer cells. *Eur J Immunol* 1988; **18**: 1827–1830
- [5] AMBUDKAR IS, KUYATT BL, ROTH GS, BAUM BJ. Modification of ATP-dependent Ca<sup>2+</sup> transport in rat parotid basolateral membranes during aging. *Mech Ageing Dev* 1988; **43**: 45–60
- [6] AMINOFF D. The role of sialoglycoconjugates in the aging and sequestration of red cells from circulation. *Blood Cells* 1988; **14**: 229–257
- [7] ANTONENKO YN, YAGUZHINSKY LS. Effect of changes in cation concentration near bilayer lipid membrane on the rate of carrier-mediated cation fluxes and on the carrier apparent selectivity. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1026**: 236–240
- [8] ATAULLAKHANOV RI, KHAITOV RM, PETROV RV, ABDULLAEV DM, ATAULLAKHANOV FI. Interaction of polyanion molecules with the plasma membrane of lymphocytes differing in density of charged groups on the cell surface. *Bull Eksp Biol Med* 1984; **97**: 588–590
- [9] BAYREUTHER K, RODEMANN HP, FRANZ PI, MAIER K. Differentiation of fibroblast stem cells. *J Cell Sci Suppl.* 1988; **10**: 115–130
- [10] BELTZER JP, FIEDLER K, FUHRER C, GEFFEN I, HANDSCHIN C, WESSELS HP, SPIESS M. Charged residues are major determinants of the transmembrane orientation of a signal-anchor sequence. *J Biol Chem* 1991; **266**: 973–978
- [11] BOND JD, WYETH NC. Alterations in the structure of the electrical double layer adjacent to a charged membrane arising from electromagnetically induced changes in the activity of membrane-bound enzymes. *Cell Biophys* 1985; **7**: 293–404
- [12] BOWMAN PD. Aging and the cell cycle in vivo and in vitro. w: CRC Handbook of Cell Biology of Aging, wyd. VJ Cristofalo, CRC Press, Inc., Boca Raton, USA 1985; 117–134
- [13] BROHEE D, KENNES B, HUBERT C, NEVE P. Human lymphocyte affinity for sheep erythrocytes in young and aged healthy subjects. *Clin Exp Immunol* 1980; **42**: 399–401
- [14] CARRASCOSA JM, RUIZ P, MARTINEZ C, PULIDO JA, SATRUSTEGUI J, ANDRES A. Insulin receptor kinase activity in rat adipocytes is decreased during aging. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **160**: 303–309
- [15] CHANG M-P, UTSUYAMA M, HIROKAWA K, MAKINODAN T. Decline in the production of interleukin-3 with age in mice. *Cell Immunol* 1988; **115**: 1–12
- [16] CHAUDHARY PM, RONINSON IB. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* 1992; **66**: 85–94
- [17] CLAUSEN T, HANSEN O, KJELDSEN K, NORGAARD A. Effect of age, potassium depletion and denervation on specific displaceable <sup>3</sup>Houabain binding in rat skeletal muscle in vivo. *J Physiol* 1982; **333**: 367–381
- [18] CLEMENTZ T, CHRISTIANSSON A, WIESLANDER A. Transmembrane electrical potential affects the lipid composition of *Acholoplasma laidlawii*. *Biochemistry* 1986; **25**: 823–830
- [19] COHEN HJ, BOLAND KM, RAO KM. Age-related studies of Sig, Leu-4 and concanavalin A receptor densities and capping in human lymphocytes. *Mech Ageing Dev* 1991; **59**: 253–262
- [20] COLLINS JM, SCOTT RB, MCCLISH DK, TAYLOR JR, GROGAN WM. Altered membrane anisotropy gradients of plasma membranes of living peripheral blood leukocytes in aging and Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev* 1991; **59**: 153–162
- [21] CONCAS A, PEPITONI S, ATSOGGIU T, TOFFANO G, BIGGIO G. Aging reduces the GABA-dependent <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> flux in rat brain membrane vesicles. *Life Sci* 1988; **43**: 1761–1771



- [22] CORDA MG, ORLANDI M, DEIANA AM, SALVADORI S, DIORGI O. Age-related decrease in the density of benzodiazepine recognition sites in the brain of the fresh water eel (*Anguilla Anguilla*). *Neurosci Letters* 1991; **133**: 168–170
- [23] DALBEY RE. Positively charged residues are important determinants of membrane protein topology. *Trends Biochem Sci* 1990; **15**: 253–257
- [24] DAMJANOVICH S, PIERI C. Electroimmunology: membrane potential, ion channel activities, and stimulatory signal transduction in human T lymphocytes from young and elderly. *Ann NY Acad Sci* 1991; **621**: 29–39
- [25] DAVILA DR, KELLEY KW. Sex differences in lectin-induced interleukin-2 synthesis in aging rats. *Mech Ageing Dev* 1988; **44**: 231–240
- [26] DAX EM. Age-related changes in membrane receptor interactions. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1987; **16**: 947–963
- [27] DE LUCA A, MAMBRINI M, CONTE CAMERINO D. Changes in membrane ionic conductance and excitability characteristics of rat skeletal muscle during aging. *Pflugers Arch* 1990; **415**: 642–644
- [28] DILLON JS, GU XH, NAYLER WG. Effect of age and of hypertrophy on cardiac  $Ca^{2+}$  antagonist binding sites. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; **14**: 233–240
- [29] ERNST DN, HOBBS MV, TORBETT BE, GLASEBROOK AL, REHSE MA, BOTTOMLY K, HAYAKAWA K, HARDY RR, WEIGLE WO. Differences in the expression profiles of CD45RB, Pgp-1, and 3G11 membrane antigens and in the patterns of lymphokine secretion by splenic  $CD4^{+}$  T cells from young and aged mice. *J Immunol* 1990; **145**: 1295–1302
- [30] ESCANDE D, CORABOEUF E, BINET J-P. Age-related increase in variability of action potential duration in isolated human atrial fibers. *CR Acad Sci* 1985; **301**: 477–481
- [31] ESCANDE D, LOISANCE D, PLANCHE C, CORABOEUF E. Age-related changes of action potential plateau shape in isolated human atrial fibers. *Am J Physiol* 1985; **249**: H843–H850
- [32] EVA C, FERRERO P, ROCCA P, FUNARO A, BERGAMASCO B, RAVIZZA L, GENAZZANI E. [ $^3H$ ]N-methylscopolamine binding to muscarinic receptors in human peripheral blood lymphocytes: characterization, localization on T-lymphocyte subsets and age-dependent changes. *Neuropharmacology* 1989; **28**: 719–726
- [33] FINCH CE. Neural and endocrine determinants of senescence: investigation of causality and reversibility by laboratory and clinical interventions. w: *Modern Biological Theories of Aging*, wyd. HR Warner i wsp., Raven Press New York 1987; 261–308
- [34] FONG TC, MAKINODAN T. Preferential enhancement by 2-merkapt ethanol of IL-2 responsiveness of T blast cells from old over young mice is associated with potentiated protein kinase C translocation. *Immunol Letters* 1989; **20**: 149–154
- [35] FROELICH CJ, BURKETT JS, GUIFFAUT S, KINGSLAND R, BRAUNER D. Phytohemagglutinin induced proliferation by aged lymphocytes: reduced expression of high affinity interleukin-2 receptors and interleukin-2 secretion. *Life Sci* 1988; **43**: 1583–1590
- [36] FROLKIS VV, TANIN SA, GORBAN EN, BOGATSKAYA LN, SABKO VE. Membrane potential of cells and its regulation during aging. 1. Report: the role of energetic metabolism and plasma membrane phospholipid contents. *ZFA* 1987; **42**: 67–75
- [37] FROLKIS VV, MARTYENKO OA, TIMCHENKO AN. Potential-dependent  $Ca$  channels of neurons in the mollusc *Lymnaea stagnalis* in aging: effect of norepinephrine. *Mech Ageing Dev* 1991; **58**: 75–83
- [38] GACZYŃSKA M. Changes in the proteolytic activity of human erythrocyte membrane during red cell aging. *Biochim Biophys Acta* 1989; **981**: 173–177
- [39] GIETZEN DW, GOODMAN TA, WEILER PG, GRAF K, FREGEAU DR, MAGLIOZZI JR, DORAN AR, MADDOCK RJ. Beta receptor density in human lymphocyte membranes: Changes with aging? *J Gerontol Biol Sci* 1991; **46**: B130–B134
- [40] GILMAN SC, WODA BA, FELDMAN JD. T lymphocytes of young and aged rats. I. Distribution, density and capping of T antigens. *J Immunol* 1981; **127**: 149–153
- [41] GOYA RG. Neuroendocrine system, programmed cell death, and aging. *Interdiscipl. Topics Geront* 1988; **24**: 81–89
- [42] GROSSMANN A, LEDBETTER JA, RABINOVITCH PS. Reduced proliferation in T lymphocytes in aged humans is predominantly in the  $CD8^{+}$  subset, and is unrelated to defects in transmembrane signaling which are predominantly in the  $CD4^{+}$  subset. *Exptl Cell Res* 1989; **180**: 367–382
- [43] GROSSMANN A, LEDBETTER JA, RABINOVITCH PS. Aging-related deficiency in intracellular calcium response to anti-CD3 or concanavalin A in murine T-cell subsets. *J. Gerontol* 1990; **45**: B81–B8
- [44] GUDMUNSDOTTIR E, BENEDIKTSDDOTTIR VE, GUDBJARNASON S. Combined effects of age and dietary fat on beta-1 receptors and  $Ca^{2+}$  channels in rat hearts. *Am J Physiol* 1991; **260**: H66–H72

- [45] GUPTA S. Membrane signal transduction in T cells in aging humans. *Ann NY Acad Sci* 1989; **568**: 277–282
- [46] HALLGREN HM, JACKOLA DR, O'LEARY JJ. Evidence for expansion of a population of lymphocytes with reduced or absent T3 expression in aged human donors. *Mech Ageing Dev* 1985; **30**: 239–250
- [47] HARRISON DE, ASTLE CM, STONE M. Numbers and functions of transplantable primitive immunohematopoietic stem cells. Effects of age. *J Immunol* 1989; **142**: 3833–3840
- [48] HENDRICKS LC, HEIDRICK ML. Susceptibility to lipid peroxidation and accumulation of fluorescent products with age is greater in T cells than B cells. *Free Radical Biol Medicine* 1988; **5**: 145–154
- [49] HERTOIGH - HUIJBREGTS A, VISSINGA C, ROZING J, NAGELKERKEN L. Impairment of CD3-dependent and CD3-independent activation pathways in CD4<sup>+</sup> and in CD8<sup>+</sup> T cells from old CBA/RIJ mice. *Mech Ageing Dev* 1990; **53**: 141–155
- [50] HEYLIGER CE, PRAKASH AR, MCNEILL JH. Alterations in membrane Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange in the aging myocardium. *Age* 1988; **11**: 1–6
- [51] HIRAMATSU M, KASHIMATA M, SATO A, MURAYAMA M, MINAMI N. Influence of age on epidermal growth factor receptor level in the rat brain. *Experientia* 1988; **44**: 23–25
- [52] HIROTA Y, OKAMURA S, KIMURA N, SHIBUYA T, NIHO Y. Haematopoiesis in the aged as studied by in vitro colony assay. *Eur J Haematol* 1988; **40**: 83–90
- [53] HUBER LA, XU QB, JURGENS G, BOCK G, BUHLER E, GEY KF, SCHONITZER D, TRAILL KN, WICK G. Correlation of lymphocyte lipid composition, membrane microviscosity and mitogen response in the aged. *Eur J Immunol* 1991; **21**: 2761–2765
- [54] HUCKEL C, SANDOR M, JENSSEN HL, RYCHLY J, BROCK J, GERGELY J. The binding of IgG1 containing immune complexes to the FcR of allo genically activated T cells induces changes in the membrane potential and the cell surface charge. *Mol Immunol* 1988; **25**: 517–525
- [55] JAHNIG F, HARLOS K, VOGEL H, EIBL H. Electrostatic interactions at charged lipid membranes. Electrostatically induced tilt. *Biochemistry* 1979; **18**: 1459–1468
- [56] JONES CJ, BELL CL, QUINTON PM. Different physiological signatures of sweat gland secretory and duct cells in culture. *Am J Physiol* 1988; **255**: C102–C111
- [57] JURANKA PF, ZASTAWNY RL, LING V. P-glycoprotein: multidrug resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins. *FASEB J* 1989; **3**: 2583–2592
- [58] KAY MMB. Aging of cell membrane molecules leads to appearance of an aging antigen and removal of senescent cells. *Gerontology* 1985; **31**: 215–235
- [59] KAY MMB, LIN FB. Molecular mapping of the active site of an aging antigen: senescent cell antigen requires lysine(s) for antigenicity and is located on an anion-binding segment of band 3 membrane transport protein. *Gerontology* 1990; **36**: 293–305
- [60] KENNES BJ, MOEST PF, NEVE PE. Biochemical events associated with lymphocyte activation in aging. K<sup>+</sup> transport and sensitivity of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump to digoxine. *Exptl Gerontol* 1982; **17**: 245–254
- [61] KOBATAKE T, WATANABE Y, MATSUZAWA Y, TOKUNAGA K, FUJIOKA S, KAWAMOTO T, KENO Y, TARUI S, YOSHIDA H. Age-related changes in adrenergic alpha 1, alpha 2, and beta receptors of rat white fat cell membranes: an analysis using [<sup>3</sup>H]bunazosin as a novel ligand for the alpha 1 adrenoceptor. *J Lipid Res* 1991; **32**: 191–196
- [62] KRAUSE KH, LEW DP, WELSH MJ. Electrophysiological properties of human neutrophils. *Adv Exp Med Biol* 1991; **297**: 1–11
- [63] KUBO M, CINADER B. IL-3 production as a function of age and its correlation with splenomegaly: age versus disease-related change. *Immunol Lett* 1990; **24**: 133–136
- [64] KUBO M, CINADER B. Polymorphism of age-related changes in interleukin (IL) production: differential changes of T helper subpopulations, synthesizing IL2, IL3 and IL4. *Eur J Immunol* 1990; **20**: 1289–1296
- [65] LAKOS Z, SOMOGYI B, BALAZS M, MATKO J, DAMJANOVITCH S. The effect of transmembrane potential on the dynamic behavior of cell membranes. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1023**: 41–46
- [66] LÄWETZKY A, HUNIG T. Analysis of CD3 and antigen receptor expression on T cell subpopulations of aged athymic mice. *Eur J Immunol* 1988; **18**: 409–416
- [67] LENNON JE, MICKLEM HS. Stromal cells in long-term murine bone marrow culture: FACS studies and origin of stromal cells in radiation chimeras. *Exp Hematol* 1986; **14**: 287–292
- [68] LERNER A, PHILOSOPHE B, MILLER RA. Defective calcium influx and preserved inositol phosphate generation in T cells from old mice. *Aging: Immunology and Infectious Disease*, 1988; **1**: 149–157
- [69] LERNER A, YAMADA T, MILLER RA. Pgp-1<sup>hi</sup> T lymphocytes accumulate with age in mice and respond poorly to concanavalin A. *Eur J Immunol* 1989; **19**: 977–982
- [70] LEVY M, BANDEIRA A, FORNILLI, COUTINHO A. A phenotypic and functional analysis of long-lived B and T lymphocytes. *Cell Immunol* 1988; **117**: 327–338

- [71] LEWIS DL, LECHLEITER JD, KIM D, NANAVATIC, CLAPHAM DE. Intracellular regulation of ion channels in cell membranes. *Mayo Clin Proc* 1990; **65**: 1127–1143
- [72] LI DD, CHIEN YK, GU MZ, RICHARDSON A, CHEUNG HT. The age-related decline in interleukin-3 expression in mice. *Life Sci* 1988; **43**: 1215–1222
- [73] LIN JL, ASANO T, SHIBASAKI Y, TSUKUDA K, KATAGIRI H, ISHIHARA H, TAKAKU F, OKA Y. Altered expression of glucose transporter isoforms with aging in rats - selective decrease in GluT4 in the fat tissue and skeletal muscle. *Diabetologia* 1991; **34**: 477–482
- [74] LINDERMAN KM, GREIF KF. Depolarization regulates expression of a synaptic vesicle protein in rat superior cervical ganglia in vitro. *J Neurobiol* 1990; **21**: 295–302
- [75] LUSTYIK G, O'LEARY JJ. Aging and the mobilization of intracellular calcium by phytohemagglutinin in human T cells. *J Gerontol* 1989; **44**: B30–B36
- [76] MADER SL, DAVIS PB. Effect of age on acute regulation of beta-adrenergic responses in mononuclear leukocytes. *J Gerontol Med Sci* 1989; **44**: M168–M175
- [77] MANN PL, BUSSE SC, GRIFFE RH, LAUBSCHER K. Cell surface oligosaccharide modulation during differentiation: VI. The effect of biomodulation on the senescent and neoplastic cell phenotype. *Mech Ageing Dev* 1992; **62**: 79–110
- [78] MATOUR D, MELNICOFF M, KAYE D, MURASKO DM. The role of T cell phenotypes in decreased lymphoproliferation of the elderly. *Clin Immunol Immunopathol* 1989; **50**: 82–99
- [79] MCKINNEY LC, GALLIN EK. Effect of adherence, cell morphology, and lipopolysaccharide on potassium conductance and passive membrane properties of murine macrophage J774.1 cells. *J Membr Biol* 1990; **116**: 47–56
- [80] MENZEL EJ, ZLABINGER GJ, DUNKY A, STEFFEN C. Autoimmunity and T-cell subpopulations in old age. *Arch Gerontol Geriatr* 1988; **7**: 249–260
- [81] MILIUTIN AA, BULANOVA KI, KIRILIUK AP, KOLTOVER VK. Structural state of the cardiomyocyte sarcolemma in animals of different ages. *Biofizika* 1987; **32**: 438–442
- [82] MILLER RA. Immunodeficiency of aging: Restorative effects of phorbol ester combined with calcium ionophore. *J Immunol* 1986; **137**: 805–808
- [83] MILLER RA, JACOBSON B, WEIL G, SIMONS E. Diminished calcium influx in lectin-stimulated T cells from old mice. *J Cell Physiol* 1987; **132**: 337–342
- [84] MILLER RA. Minireview: The cell biology of aging: Immunological models. *J Gerontol Biol Sci* 1989; **44**: B4–B8
- [85] MILLER RA. Accumulation of hyporesponsive, calcium extruding memory T cells as a key feature of age-dependent immune dysfunction. *Clin Immunol Immunopathol* 1991; **58**: 305–317
- [86] MOHANDAS N, GRONER W. Cell membrane and volume changes during red cell development and aging. *Ann NY Acad Sci* 1989; **554**: 217–224
- [87] MYŚLIWSKA J, WITKOWSKI J, MYŚLIWSKI A. Proportion of early E rosettes formed by peripheral blood lymphocytes from young and aged subjects. *Gerontology* 1981; **27**: 140–145
- [88] MYŚLIWSKI A, WITKOWSKI JM, MYŚLIWSKA J, BIGDA J. Modification of mitogenic response to concanavalin A of lymphocytes from aged donors by ion channel blockers. *Materia Med Polona* 1991; Fasc. 1(77): 5–6
- [89] NAGELKERKEN L, HERTOIGH-HUIJBREGTS A, DOBBER R, DRAGER A. Age-related changes in lymphokine production related to a decreased number of CD45RB<sup>hi</sup> CD4<sup>+</sup> T cells. *Eur J Immunol* 1991; **21**: 273–281
- [90] NASSAR-GENTINA V, POLLARD HB, ROJAS E. Electrical activity in chromaffin cells of intact mouse adrenal gland. *Am J Physiol* 1988; **254**: C675–C683
- [91] NEHER E. Ion channels for communication between and within cells. *Science* 1992; **256**: 498–502
- [92] NORMAN DC, MORLEY JE, CHANG M-P. Aging decreases beta-endorphin enhancement of T cell mitogenesis in mice. *Mech Ageing Dev* 1988; **44**: 185–191
- [93] NORWOOD TH, SMITH JR, STEIN GH. Aging at the cellular level: The human fibroblastlike cell model. [w:] Schneider EL, Rowe JW [red.] *Handbook of the Biology of Aging*. San Diego, New York: Academic Press 1990: 131–154
- [94] OFFNER FF. Ion flow through membranes and the resting potential of cells. *J Membr Biol* 1991; **123**: 171–182
- [95] O'HARA AE, DAUL R, FIESEL R, SEIKMANN U, BRODDE OE. Different mechanisms underlying reduced beta2-adrenoceptor responsiveness in lymphocytes from neonates and old subjects. *Mech Ageing Dev* 1985; **31**: 115–122
- [96] O'LEARY JJ, FOX R, BERGH N, RODYSILL KJ, HALLGREN HM. Expression of the human T cell antigen receptor complex in advanced age. *Mech Ageing Dev* 1988; **45**: 239–252

- [97] ORSON FM, SAADEH CK, LEWIS DE, NELSON DL. Interleukin 2 receptor expression by T cells in human aging. *Cell Immunol* 1989; **124**: 278–291
- [98] OZAWA H, IKEDA H, SAITO T. Age-related alteration in the catecholamine-sensitive adenylate cyclase system of the rat cerebral cortex. *Yakubutsu Seishin Kodo* 1989; **9**: 359–368
- [99] PADOVANI A, GOVONI S, BOTTAINI F, MAGNONI MS, CIVELLI L, MAURI A, PICOTTI GB, GALVA MD, TRABUCCHI M. Alcohol impairs age-dependent adaptation of human lymphocyte - beta-adrenergic receptors. *Eur J Clin Invest* 1987; **17**: 511–514
- [100] PATEL HR, MILLER RA. Age-associated changes in mitogen-induced protein phosphorylation in murine T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1992; **22**: 253–260
- [101] PETKOVA DH, MOMCHILOVA-PANKOVA AB, MARKOVSKA TT, KOUMANOV KS. Age-related changes in rat liver plasma membrane sphingomyelinase activity. *Exptl Gerontol* 1988; **23**: 19–24
- [102] PHILOSOPHE B, MILLER RA. Diminished calcium signal generation in subsets of T lymphocytes that predominate in old mice. *J Gerontol* 1990; **45**: B87–B93
- [103] PIERI C, MORONI F, FALASCA F, MARCHESELLI F, RECCHIONI R. Diet restriction decreases the membrane microviscosity of cerebellar membranes of old female Wistar rats. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1990; **66**: 915–920
- [104] PIERI C, FALASCA M, MORONI F, RECCHIONI R, MARCHESELLI F. Influence of membrane fluidity on 5'-nucleotidase activity in isolated hepatocyte plasma membrane. *Biochem Intl* 1991; **25**: 631–638
- [105] PIERI C. Food restriction slows down age-related changes in cell membrane parameters. *Ann NY Acad Sci* 1991; **621**: 353–362
- [106] POPPER H. The liver in aging. w: *Modern Biological Theories of Aging*. wyd. H.R. Warner i wsp., Raven Press, New York 1987; 219–234
- [107] RAMACHANDRAN M, ABRAHAM EC. Age-dependent variation in the cytosol/membrane distribution of red cell protein kinase C. *Am J Hematol* 1989; **31**: 69–70
- [108] RECKELHOFF JF, BAYLIS C. Proximal tubular metalloprotease activity is decreased in the senescent rat kidney. *Life Sci* 1992; **50**: 959–963
- [109] RESNITZKY P, SEGAL M, BARAK Y, DASSA C. Granulopoiesis in aged people: inverse correlation between bone marrow cellularity and myeloid progenitor cell numbers. *Gerontology* 1987; **33**: 109–114
- [110] REYMOND F, DENEREAZ N, LEMARCHAND-BERAUD T. Thyrotropin action is impaired in the thyroid gland of old rats. *Acta Endocrinol* 1992; **126**: 55–63
- [111] RHEINWALD JG. The role of terminal differentiation in the finite culture lifetime of the human epidermal keratinocyte. *Int Rev Cytol (Suppl.)* 1979; **10**: 25–34
- [112] RIVNAY B, GLOBERSON A, SHINITZKY M. Viscosity of lymphocyte plasma membrane in aging mice and its possible relation to serum cholesterol. *Mech Ageing Dev* 1979; **10**: 71–79
- [113] ROBERTS J, STEINBERG GM. Effects of aging on adrenergic receptors. *Fed Proc* 1986; **45**: 40–41
- [114] ROLFES-CURL A, LAZARRE OGDEN L, OMANN GM, AMINOFF D. Flow cytometric analysis of human erythrocytes: II. Possible identification of senescent RBC with fluorescently labelled wheat germ agglutinin. *Exptl Gerontol* 1991; **26**: 327–345
- [115] RUBINACCI A, MOTTERLINI R, DE PONTI A, PORTINARON N. Red cell aging and active calcium transport. *Exp Gerontol* 1990; **25**: 279–286
- [116] SAMAJA M, RUBINACCI A, DE PONTI A, PORTINARON N. The effect of in vitro and in vivo cellular aging on the active calcium transport in human inside-out red cell membrane vesicles. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **159**: 432–438
- [117] SARKADI B, CHEUNG R, MACK E, GRINSTEIN S, GELFAND EW, ROTHSTEIN A. Cation and anion transport pathways in volume regulatory response of human lymphocytes to hypoosmotic media. *Am J Physiol* 1985; **248**: C480–C487
- [118] SCHOCKEN DD, ROTH GS. Reduced beta-adrenergic receptor concentrations in ageing man. *Nature* 1977; **267**: 856–858
- [119] SCOTT B, LEU J, CINADER B. Effects of aging on neuronal electrical membrane properties. *Mech Ageing Dev* 1988; **44**: 203–214
- [120] SEPPI C, CASTELLANA MA, MINETTI G, PICCININI G, BALDUINI C, BROVELLI A. Evidence for membrane protein oxidation during in vivo aging of human erythrocytes. *Mech Ageing Dev* 1991; **57**: 247–258
- [121] SHARP A, ZIPORI D, TOLEDO J, TAL S, RESNITZKY P, I GLOBERSON A. Age-related changes in hemopoietic capacity of bone marrow cells. *Mech Ageing Dev* 1989; **48**: 91–99
- [122] SHI J, MILLER RA. Tyrosine-specific protein phosphorylation in response to anti-CD3 antibody is diminished in old mice. *J Gerontol Biol Sci* 1992; **47**: B147–B153

- [123] SHIMIZU I, PRASAD C. Relationship between [ $^3$ H]mazindol binding to dopamine uptake sites and [ $^3$ H] dopamine uptake in rat striatum during aging. *J Neurochem* 1991; **56**: 575–579
- [124] SIMOVA J, BUBENIK J, HAUSNER P, KLENER P, CINADER B. Expression of IL-2 receptors on peripheral blood lymphocytes from young adult and aged human donors. *Folia Biologica (Praha)* 1987; **33**: 282–284
- [125] SISKIND GW. Aging and the immune system. w: *Modern Biological Theories of Aging* wyd. HR Warner i wsp., Raven Press, New York 1987; 235–242.
- [126] SPRENT J, SCHAEFER M, HURD M, SURH CD, RON Y. Mature murine B and T cells transferred to SCID mouse can survive indefinitely and many maintain a virgin phenotype. *J Exp Med* 1991; **174**: 717–728
- [127] SUDEY I, BAKALA H, PERICHON M, SCHAEVERBEKE J. Age-related changes in the plasma membrane proteoglycans of rat kidney glomerular cells. *Exp Gerontol* 1991; **26**: 573–587
- [128] TANAKA Y, ANDO S. Synaptic aging as revealed by changes in membrane potential and decreased activity of ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ )-ATPase. *Brain Res* 1990; **506**: 46–52
- [129] TEJERO C, TESTA NG, HENDRY JH. Decline in cycling of granulocyte-macrophage colony-forming cells with increasing age in mice. *Exp Hematol* 1989; **17**: 66–67
- [130] THESLEFF P. Effects of beta-adrenergic agonists in the parotid gland of the rat - an electrophysiologic study. *Acta Physiol Scand* 1989; **136**: 245–251
- [131] TOLLEFSBOL TO, COHEN HJ. Expression of intracellular biochemical defects of lymphocytes in aging: proposal of a general aging mechanism which is not cell-specific. *Exptl Gerontol* 1986; **21**: 129–148
- [132] TREVES C, FAVILLI F, STIO M, IANTOMASI T, VINCENZINI MT. Changes in metabolite transport by small intestine and kidney of young and old rats. *Mech Ageing Dev* 1990; **52**: 263–276
- [133] UTSUYAMA M, HIROKAWA K. Age-related changes of splenic T cells in mice - a flow cytometric analysis. *Mech Ageing Dev* 1987; **40**: 89–102
- [134] VALVERDE MA, DIAZ M, SEPULVEDA FV, GILL DR, HYDE SC, HIGGINS CF. Volume-regulated chloride channels associated with human multidrug-resistance P glycoprotein. *Nature* 1992; **355**: 830–832
- [135] VAN SCHEEUWIJCK P, VAN DE VELDE E, FRAEYMAN N. Characterization of the beta-adrenergic transduction system in spleen mononuclear leukocyte membranes of young and senescent rats. *Biochem Pharmacol* 1990; **39**: 2035–2040
- [136] VAN ZANT G, HOLLAND BP, ELDRIDGE PW, CHEN JJ. Genotype-restricted growth and aging patterns in hematopoietic stem cell populations of allophenic mice. *J Exp Med* 1990; **171**: 1547–1565
- [137] VARGA Z, BRESSANI N, ZAIA AM, BENE L, FULOP T, LEOVEY A, FABRIS N, DAMJANOVICH S, ZAID AM. Cell surface markers, inositol phosphate levels and membrane potential of lymphocytes from young and old human patients. *Immunol Lett* 1990; **23**: 275–280
- [138] VEILLETTE A, HORAK ID, HORAK EM, BOOKMAN MA, BOLEN JB. Alterations of the lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (p56lck) during T-cell activation. *Mol Cell Biol* 1988; **8**: 4353–4361
- [139] VEILLETTE A, HORAK ID, BOLEN JB. Post-translational alterations of the tyrosine kinase p56lck in response to activators of protein kinase C. *Oncogene Res* 1988; **2**: 385–401
- [140] VENKATRAMAN J, FERNANDES G. Modulation of age-related alterations in membrane composition and receptor-associated immune functions by food restriction in Fisher 344 rats. *Mech Ageing Dev* 1992; **63**: 27–44
- [141] VIANI P, CERVATO G, FIORILLI A, CESTARO B. Age-related differences in synaptosomal peroxidative damage and membrane properties. *J Neurochem* 1991; **56**: 253–258
- [142] VISSINGA C, HERTOIGH-HUIJBREGTS A, ROZING J, NAGELKERKEN L. Analysis of the age-related decline in alloreactivity of  $\text{CD4}^+$  and  $\text{CD8}^+$  T cells in CBA/RIJ mice. *Mech Ageing Dev* 1990; **51**: 179–194
- [143] WAHNON R, MOKADY S, COGAN U. Age and membrane fluidity. *Mech Ageing Dev* 1989; **50**: 249–255
- [144] WALFORD RL. MHC regulation of aging: an extension of the immunologic theory of aging. w: *Modern Biological Theories of Aging*, wyd. H.R. Warner i wsp., Raven Press, New York 1987; 243–260
- [145] WATAŁA C. May the alteration in lipid fluidity-mediated platelet hypersensitivity contribute to accelerated aging of platelets in diabetes mellitus? *Med Hypotheses* 1991; **36**: 142–145
- [146] WEGENER A-M, LETOURNEUR F, HOEVELER A, BROCKER T, LUTON F, MALISSEN B. The T cell receptor/CD3 complex is composed of at least two autonomous transduction modules. *Cell* 1992; **68**: 83–95
- [147] WILLIAMS LH, UDUPA KB, LIPSHITZ DA. Evaluation of the effect of age on hematopoiesis in the C57BL/6 mouse. *Exp Hematol* 1986; **14**: 827–832
- [148] WITKOWSKI JM, MYŚLIWSKI A, MYŚLIWSKA J. Decrease of lymphocyte ( $\text{Na},\text{K}$ )ATPase activity in aged people. *Mech Ageing Dev* 1985; **33**: 11–17
- [149] WITKOWSKI JM, MICKLEM HS. Age-related changes in murine lymphocytes: flow cytometric studies with oxonol dyes and rhodamine-123. *Cytometry Suppl.* 1., 1987; 115–121

- [150] WITKOWSKI JM, MYŚLIWSKI A, MYŚLIWSKA J. Age-related changes in transmembrane potential and potassium ion fluxes across membranes of human blood lymphocytes. Proceedings of 2nd International Congress of Biomedical Gerontology wyd. TNO Institute for Experimental Gerontology, Rijsvijk, 1988; 181-183
- [151] WITKOWSKI JM, MICKLEM HS. Transmembrane electrical potential of lymphocytes in aging mice. Flow cytometric studies with oxonol, cyanine and rhodamine-123 dyes. *Aging: Immunity and Infectious Disease* 1990; 2: 287-294
- [152] WITKOWSKI JM, MYŚLIWSKI A. Influence of age on transmembrane potential and cell surface charge of human peripheral blood lymphocytes estimated with fluorescent probes. *Folia Histochem Cytobiol* 1991; 29: 115-120
- [153] WITKOWSKI JM. Udział kationów w transdukcji sygnału w stymulowanych limfocytach T. I. Kationy metali i zmiany potencjału błonowego. *Post Biol Kom* 1992; 19: 117-137
- [154] WITKOWSKI JM, MICKLEM HS. Transmembrane electrical potential of lymphocytes in ageing mice. Flow cytometric analysis of mitogen-stimulated cells. *Mech Ageing Dev* 1992; 62: 167-179
- [155] WITKOWSKI JM, MILLER RA. Increased function of P-glycoprotein in T lymphocyte subset of aging mice. *J Immunol* 1993; 150 (w druku)
- [156] WITKOWSKI JM. Calcium-dependent efflux of  $K^+$  ions from stimulated T lymphocytes of young and old mice. *Mech Ageing Dev* 1993 (praca przedstawiona do recenzji)
- [157] WOOD WG, SCHROEDER F. Membrane structure in aged humans and animals. w: Central Nervous System Disorders of Aging: Clinical Intervention and Research. wyd. R. Strong i wsp., Raven Press, New York 1988; 199-209
- [158] WU W, PAHLAVANI M, RICHARDSON A, CHEUNG HT. Effect of maturation and age on lymphocyte proliferation induced by A23187 through an interleukin-independent pathway. *J Leukocyte Biol* 1985; 38: 531-540
- [159] YAMAGUCHI T, YAMAGATA A. Serotonergic ligand binding in aging brain of experimental animals. *Neurochem Res* 1991; 16: 469-473
- [160] YAMAMOTO K, YAMAMOTO M. Changes in the cell surface charge of human diploid fibroblasts during cellular aging. *Mutat Res* 1991; 256: 169-175
- [161] YEGUTKIN GG, SAMBURSKY SS, ZHITKOVITCH AV, GATSKO GG. Evaluation of age-related changes of physicochemical properties and functional activity of rat adipose plasma membranes and their possible relationship. *Mech Ageing Dev* 1991; 59: 1-16
- [162] ZAHNISER NR, PARKER DC, BIER-LANING CM, MILLER JA, GERBER JG, NIES AS. Comparison between the effects of aging on antagonist and agonist interactions with beta-adrenergic receptors on human mononuclear and polymorphonuclear leukocyte membranes. *J Gerontol Med Sci* 1988; 43: M151-M157
- [163] ZANNER MA, GALEY WR. Aged human erythrocytes exhibit increased anion exchange. *Biochim Biophys Acta* 1985; 818: 310-315
- [164] ZS.-NAGY I, KITANI K, OHTA M. Age-dependence of the lateral mobility of proteins in the plasma membrane of hepatocytes of C57BL/6 mice: FRAP studies on liver smears. *J Gerontol* 1989; 44: B83-B87.

Otrzymano: 01.12.1992 r.

Przyjęto: 03.02.1993 r.

Adres autora: ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk.

## INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, nie publikowane 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.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

1. Artykuły przeglądowe nie przekraczające 20 stron maszynopisu i do 100 pozycji bibliograficznych w zasadzie z ostatnich 5 lat (do 10% pozycji bibliograficznych starszych).

2. Artykuły przeglądowe ze wskazaniem kierunków przyszłych badań o objętości do 15 stron maszynopisu i bibliografii z ostatnich 3 lat (do 35 pozycji). Każda pozycja bibliograficzna powinna zawierać dodatkowo 1 zdanie streszczenia, a szczególnie ważne pozycje powinny być oznaczone gwiazdką.

3. Doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach maszynopisu z kilkoma pozycjami bibliograficznymi ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji).

4. Listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przysyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 z podwójną interlinią i marginesem 4 cm po lewej stronie. Strony powinny być kolejno numerowane. W tekście nie należy robić podkreśleń.

Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona jest dla redakcji i powinna zawierać: imiona i nazwiska autorów oraz ich tytuły naukowe, adresy pracy i domowe wraz z telefonem, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rysunków. 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 i wysyłającego nadbitek, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona powinna zawierać streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile słowa te są tam zawarte. Streszczenie i słowa kluczowe powinny być przedstawione także w języku angielskim. 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 rysunków, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na rozdziały tytułowane i numerowane (1, 2 itd.) oraz podrozdziały (1.1, 1.2 itd.). Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

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

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

Tabele, opisy schematów i rysunków powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie prosimy zastępować raczej rysunkami, ale jeżeli są niezbędne, powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. Wymiary poszczególnych rysunków, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmiennionej formie. Wszystkie załączniki muszą być opatrzone na odwrocie nazwiskiem pierwszego autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji.

Stosowane 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 3 dni. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 nadbitek.

## TREŚĆ

W tym zeszycie Postępów Biologii Komórki . . .	1
Z Kroniki	2
WÓJCIK C. : Znaczenie metylacji DNA u eukaryontów	3
KSIĄŻKIEWICZ-KAPRALSKA M. : Oogeneza owadów	25
HRABIEC E., PŁUCIENNICZAK A.: Budowa i rola histonu H1	35
SĄCZYŃSKA V.: Molekularny mechanizm fotoinhibicji	45
KOWALCZYK S.: Fruktozo2,6-bisfosforan, efektor integrujący metabolizm cukrów i pirofosforanu w przedziałach subkomórkowych roślin	67
KAWIAK J., JAKÓBISIAK M.: Niektóre funkcje kinaz białkowych i fosfataz białkowych związanych z regulacją cyklu komórkowego	87
SIKORSKI A. F., DIAKOWSKI W., KUCZEK M.: Szkielet błony erytrocytu	93
WITKOWSKI J. M. : Zmiany w błonie jako składnik procesu starzenia się	111

*Warunki prenumeraty kwartalnika*  
**POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI**

***Prenumerata na rok 1993***

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1993 na konto:

FUNDACJA POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa;  
 Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 501132-40006576-2701-3-1110.

Cena prenumeraty rocznika (4 zeszyty) dla instytucji (bibliotek) wynosi 190 000 zł, a dla odbiorców indywidualnych 40 000 zł.

*Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI is through the local press distributors or directly – Editorial Board of POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland, account No:*

FUNDACJA POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 501132-40006576-2701-3-1110.

*Price per year 20 dollars USA.*

**Indeks 369705**