

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

VOL. 30, ISSUE 4/2003
(603–787)

Postępy Biologii Komórki

Advances in Cell Biology

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, Polskiej Sieci UNESCO oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej wydawany z częściową pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych.

Quarterly of the Polish Anatomical Society, the Polish Society of Cell Biology, the Polish UNESCO Net, and the Foundation for Cell Biology and Molecular Biology, partially supported by the Committee for Scientific Research (KBN)

Redaguje Kolegium – Editors:

Szczepan BILINSKI – biologia rozwoju, embriologia, cytoszkielet, połączenia międzykomórkowe – developmental biology, embryology, cytoskeleton, cell junctions – *Inst. Zoologii UJ, 30-060 Kraków, Ingardena 6*

Lilla HRYNIEWIECKA – energetyka komórki, mitochondria – cell energetics, mitochondria – *Zakład Bioenergetyki, Uniwersytetu im. A. Mickiewicza, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*

Bożena KAMIŃSKA – neurobiologia, biologia molekularna – neurobiology, molecular biology – *Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego 02-097 Warszawa, ul. Pasteura 3*

Jerzy KAWIAK – immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów – immunology, cytometry, hematology, cancer biology – *Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*

Wincenty KILARSKI – mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek – muscles, muscle contraction, cell movements – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*

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

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

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

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

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

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

Adres Redakcji – Editorial Office: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, Poland, tel. 8340 344, fax 8340470, e-mail: jkawiak@cmkp.edu.pl.

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

Indexed in: National Library of Medicine, Bathesda, Biosis, Philadelphia, Ulrich's International Periodicals Directory, New Jersey

Wszystkie prawa zastrzeżone. Zabrania się kopiowania części lub całości bez uprzedniego pisemnego zezwolenia Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced in any form or by any means without the prior written permission of the publisher. Requests to the publisher for permission should be addressed to the Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

Ark. wyd.15,0. Ark. druk.11,75. Podpisano do druku w sierpniu 2003 r. Druk ukończono w październiku 2003 r.

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, Polskiej Sieci UNESCO oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej wydawany z częściową pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych.

Quarterly of the Polish Anatomical Society, the Polish Society of Cell Biology, the Polish UNESCO Net, and the Foundation for Cell Biology and Molecular Biology, partially supported by the Committee for Scientific Research (KBN)

Redaguje Kolegium – Editors:

Szczepan BILIŃSKI – biologia rozwoju, embriologia, cytoskielet, połączenia międzykomórkowe – developmental biology, embryology, cytoskeleton, cell junctions – *Inst. Zoologii UJ, 30-060 Kraków, Ingardena 6*

Lilla HRYNIEWIECKA – energetyka komórki, mitochondria – cell energetics, mitochondria – *Zakład Bioenergetyki, Uniwersytetu im. A. Mickiewicza, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*

Bożena KAMIŃSKA – neurobiologia, biologia molekularna – neurobiology, molecular biology – *Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego 02-097 Warszawa, ul. Pasteura 3*

Jerzy KAWIAK – immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów – immunology, cytometry, hematology, cancer biology – *Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*

Wincenty KILARSKI – mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek – muscles, muscle contraction, cell movements – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*

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

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

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

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

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

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

Adres Redakcji – Editorial Office: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, Poland, tel. 8340 344, fax 8340470, e-mail: jkawiak@cmkp.edu.pl.

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

Indexed in: National Library of Medicine, Bathesda, Biosis, Philadelphia, Ulrich's International Periodicals Directory, New Jersey

Wszystkie prawa zastrzeżone. Zabrania się kopiowania części lub całości bez uprzedniego pisemnego zezwolenia Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced in any form or by any means without the prior written permission of the publisher. Requests to the publisher for permission should be adressed to the Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

Ark. wyd.15,0. Ark. druk.11,75. Podpisano do druku w sierpniu 2003 r. Druk ukończono w październiku 2003 r.

W TYM ZESZYCIE PBK

- Polarny transport auksyny (PAT) jest procesem kontrolującym etapy wzrostu i rozwoju roślin. PAT odbywa się dzięki obecności w błonie plazmatycznej wyspecjalizowanych nośników wpływającej i wypływającej z komórki auksyny. Znane są rodziny genów kodujących wymienione nośniki. Więcej na ten temat można znaleźć na stronie 605.
- Niestabilność genetyczna jest jedną z charakterystycznych cech komórek nowotworowych. Artykuł na stronie 635 nawiązuje do wcześniejszej publikacji na ten temat (Post.Biol.Komórki 2003; 30: 259). W obecnej publikacji Autorzy dyskutują skutki niestabilności mikrosatelitarnej i utraty heterozygotyczności.
- Infekcja bakterią *Helicobacter pylori* może prowadzić do choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy. Zakażenie powoduje zaburzenia funkcji komórek błony śluzowej, a przewlekłe zapalenie w tej okolicy może prowadzić do transformacji nowotworowej komórek. W artykule na stronie 679 przedstawiono molekularne podłoże chrobotwórczości bakterii *H. pylori*, zróżnicowanie funkcjonalne genomu bakterii oraz mechanizmy kolonizacji błony śluzowej żołądka.
- W zeszycie znalazły się dwa artykuły o fizjologii metaloproteinaz (strony 695 i 721). Metaloproteinazy ADAM to białka transbłonowe, które łączą cechy białek adhezyjnych i proteinaz. Uczestniczą w adhezji i fuzji komórek, uwalnianiu domen zewnątrzkomórkowych białek transbłonowych i przekazywaniu sygnału. W drugim artykule zatytułowanym „Metaloproteazy w fizjologii i patologii ośrodkowego układu nerwowego” omówiono klasyfikację, budowę molekularną i mechanizmy aktywności tych enzymów. Jednak stosunkowo niewiele uwagi poświęcono udziałowi metaloproteinaz w fizjologii i patologii ośrodkowego układu nerwowego, mimo że podkreślono to w tytule.
- Cerebelina to stosunkowo mało poznany neuropeptyd obecny u różnych gatunków zwierząt (patrz strona 707). Obecność peptydu stwierdzono w mózdzku i innych okolicach mózgowia, w przewodzie pokarmowym, nerce oraz nadnerczach. Peptyd wzmacnia wydzielanie aldosteronu oraz kortyzolu przez korę nadnerczy, stymuluje uwalnianie katecholamin z rdzenia nadnerczy. Sugeruje się też jego hamujący wpływ na czynność tarczycy.
- Na stronie 745 opisano grupę białek, którym przypisuje się funkcję cytoplazmatycznych regulatorów heterotrimerycznych białek G. Opisano reprezentanta tej grupy białek fosducynę oraz jej izoformy.

POLARNY TRANSPORT AUKSYNY – HIPOTEZY I ODKRYCIA

POLAR AUXIN TRANSPORT – HIPOTHESES AND DISCOVERIES

Alicja Sylwia BANASIAK

Zakład Morfologii i Rozwoju Roślin, Instytut Biologii Roślin
Uniwersytetu Wrocławskiego

Streszczenie: Polarny transport auksyny (PAT) jest procesem kontrolującym wszystkie etapy wzrostu i rozwoju roślin. Poznanie odpowiedzialnych za ten proces mechanizmów stało się więc jednym z głównych celów współczesnej nauki. Dzięki najnowszym badaniom z użyciem technik biologii molekularnej udało się potwierdzić postawioną kilkadziesiąt lat wcześniej hipotezę chemiosmotyczną. Według niej PAT odbywa się dzięki obecności w błonie cytoplazmatycznej wyspecjalizowanych nośników wpływającej (AUX) i wypływającej (PIN) z komórki auksyny. Obecnie znane są całe rodziny genów kodujących wymienione nośniki. Ustalono także, że nośnik wypływającej auksyny jest kompleksem białkowym i zidentyfikowano, przynajmniej częściowo, jego przypuszczalne komponenty, a także czynniki mogące wpływać na lokalizację tegoż nośnika w błonie komórkowej. Mimo to nie udało się dokładnie wyjaśnić żadnego z procesów kontrolowanych przez auksynę. Dokonano natomiast odkryć, które wymagają weryfikacji dotychczasowego spojrzenia na PAT. Jednym z nich jest stwierdzenie, że znany bazypetalny PAT nie jest jedynym sposobem długodystansowego transportu auksyny poprzez miękisz ksylemowy lub kambium z części pędowych do korzenia, gdyż podobny transport wymagający obecności nośników auksyny wpływającej do komórki odkryto także w tkance floemowej. Przypuszcza się więc, że w roślinie może występować wiele dróg transportu auksyny, a każda z nich może być związana z kontrolą innego procesu. Innym bardzo ważnym odkryciem stało się stwierdzenie, że nośniki wypływającej auksyny mogą zmieniać swoje położenie w błonie komórkowej. Kierunek transportu auksyny mógłby zatem ulegać zmianie, teoretycznie w każdy inny, zależnie od tego, w którym miejscu błony w danym momencie umiejscowione są nośniki. Daje to wskazówkę do poszukiwania wyjaśnień sprzeczności między znanym bazypetalnym kierunkiem PAT w tkankach pędowych a akropetalnym ukierunkowaniem sterowanych przez auksynę procesów, takich jak tworzenie związków organów czy różnicowanie tkanek waskularnych.

Słowa kluczowe: polarny transport auksyny (PAT), nośniki auksyny, PIN, AUX, *Arabidopsis*.

Summary: Polar auxin transport (PAT) is a process, which controls many stages of plant growth and development. According to the chemiosmotic hypothesis auxins move in the polar manner through the

influx (AUX) and the efflux (PIN) carriers connected with the plasma membrane. Recent molecular studies have identified gene families encoding these carriers. It has been established that auxin efflux carrier is a protein complex. Its putative components and factors influencing this carrier localisation in plasma membrane have been partially identified. Nevertheless, any of processes, which are controlled by auxin has been explained yet. However, recent molecular studies supplied new data, demanding verification of the present view on the polar auxin transport. The known basipetal PAT in xylem parenchyma and cambium appears to be not sole conduit for long distance auxin transport from the stem to the root. The similar transport has been discovered in the phloem. This requires the presence of auxin influx carrier. It is likely, that in a plant many auxin transport ways are present and act simultaneously, and each of these may be connected with the control of different process. The important discovery was, that auxin influx carriers could change their location in plasma membrane. Thus the direction of auxin transport could also be altered, theoretically into anyone, depending on the site, in which the carriers are located at a given moment.

Key words: polar auxin transport (PAT), auxin influx carrier, AUX, auxin efflux carrier, PIN, *Arabidopsis*.

WSTĘP

Auksyny są cząsteczkami sygnalizacyjnymi występującymi powszechnie w świecie roślin i to zarówno w roślinach z grup bardziej pierwotnych, jakimi są ramienice, mszaki czy widłaki, jak i w roślinach nasiennych [13]. Działając jako regulatory wzrostu i rozwoju uczestniczą w procesach komórkowych, takich jak podziały, elongacja i różnicowanie [11, 64]. Mogą też jako sygnał pozakomórkowy sterować morfogenezą i odpowiedzią fizjologiczną roślin na bodźce zewnętrzne [6, 10, 55]. Złożoność i zróżnicowanie pełnionych przez auksynę zadań sprawia, że poznanie szlaku auksynowego począwszy od biosyntezy tego hormonu aż po wywołanie przez niego określonej reakcji stało się kluczem do zrozumienia funkcjonowania żywego organizmu roślinnego. Mimo iż na całym świecie trwają intensywne badania nad auksynami, żaden z procesów przez nie kontrolowanych nie został dotychczas dokładnie poznany. Wiadomo jednak, że w większości z nich kluczową rolę odgrywa tzw. polarny transport auksyny (PAT). Polega on na długodystansowym przemieszczaniu sygnału auksynowego na zasadzie od komórki do komórki [41] z miejsca syntezy do rejonów, gdzie dochodzi do percepcji bodźca i wywołania określonej reakcji.

MIEJSCE BIOSYNTETY AUKSYNY PRZYPUSZCZENIA I DOWODY

Dla zrozumienia podstaw PAT zasadnicze jest poznanie miejsca syntezy auksyny, jako jej źródła dla pozostałych tkanek. Miejsce to jest dotąd kontrowersyjne. Wprawdzie powszechnie przyjmuje się, że auksyna jest syntetyzowana w młodych tkankach wierzchołka pędu [34], jednak istnieją różnice co do bardziej precyzyjnego określenia tego miejsca. Niektóre spośród publikowanych prac za miejsce syntezy podają merystem wierzchołkowy pędu [14], inne – najmłodsze zawiązki liściowe. Ostatnio pojawił się

także pogląd, że auksyna jest produkowana w liściach w pełni zróżnicowanych, które mają zróżnicowane elementy przewodzące [2]. Dowodem na słuszność takiego spojrzenia mogą być eksperymenty z ukorzenianiem sadzonek *Dianthus caryophyllus* [19]. Wiadomo, że za tworzenie korzeni bocznych odpowiedzialna jest auksyna płynąca bazypetalnie z części pędowych [6, 60]. Przeprowadzono więc doświadczenia, w których obserwowano tworzenie korzeni bocznych przez dwa rodzaje sadzonek, tzn. sadzonki pozbawiane merystemu i najmłodszych zawiązków liściowych oraz sadzonki pozbawione dojrzałych liści. Okazało się, że sadzonki bez merystemu i najmłodszych zawiązków normalnie wytwarzały korzenie boczne. Natomiast usunięcie dojrzałych liści hamowało tworzenie korzeni bocznych do czasu, kiedy najstarsze zawiązki liściowe osiągały dojrzałość. Na tej podstawie wyciągnięto wniosek, że tylko rozwinięte liście zdolne są do wytwarzania auksyny. Z kolei badania nad tworzeniem korzeni bocznych przez siewki *Arabidopsis* wskazują na to, że liście są zdolne do wytwarzania auksyny tylko na pewnym etapie ich rozwoju, pomiędzy stadium zawiązka a pełną dojrzałością [6, 30].

STWIERDZONE I HIPOTETYCZNE KIERUNKI PAT

W licznych eksperymentach przeprowadzonych na grochu, kukurydzy i *Arabidopsis* stwierdzono, że PAT w tkankach nadziemnych odbywa się jedynie w kierunku bazypetalnym [50], natomiast akropetalny transport auksyny w tych tkankach jest transportem ograniczonym i niepolarnym. Z kolei w korzeniach, zarówno kukurydzy jak i *Arabidopsis*, występują dwa różne kierunki PAT – akropetalny i bazypetalny [57] i wydają się być one zarezerwowane dla różnych procesów sterowanych przez auksynę [10, 55].

Występowanie wyżej opisanych kierunków transportu jest bogato udokumentowane. Nie ma natomiast żadnych dowodów na istnienie typowego PAT akropetalnego w tkankach pędowych, chociaż auksyna może być w pędzie akropetalnie transportowana np. podczas kiełkowania nasion [4]. Istnienie akropetalnego PAT nie zostało więc ostatecznie wykluczone. Mogłoby ono natomiast wyjaśnić wiele niezrozumiałych dotychczas procesów rozwojowych. Do takich procesów należy inicjacja zawiązków liściowych na merystemie wierzchołkowym pędu. Zawiązki inicjowane są w regularnych wzorach filotaktycznych. Już jedna z bardzo wczesnych hipotez zakładała, że miejsce inicjacji zawiązków determinowane jest przez akropetalnie płynący morfogen [23, 29]. Badania nad mutantem *Arabidopsis pin1* wykazały, że do inicjacji zawiązków jedynym niezbędnym czynnikiem jest auksyna [28, 56]. Jeżeli uznamy słuszność hipotezy o akropetalnie płynącym morfogenie, to w świetle tego odkrycia powinna nim być auksyna. Z kolei opisane wyżej poglądy i dowody dotyczące miejsca biosyntezy auksyny wskazują, że hormon ten jest najprawdopodobniej syntetyzowany w liściach, a nie w wierzchołku, aby więc mógł dotrzeć do rejonu organogenicznego merystemu, musiałby być transportowany akropetalnie.

Na możliwość występowania akropetalnego PAT w tkankach pędowych wskazują też badania wpływu auksyny na tworzenie systemu przewodzącego [1, 36, 67, 69]. Z wielu badań wynika, że auksyna jest czynnikiem warunkującym różnicowanie wiązek waskularnych. Istnieje jednak sprzeczność między kierunkiem znanego bazypetalnego PAT a akropetalnym różnicowaniem wiązek [2]. Akropetalny PAT byłby więc doskonałym wyjaśnieniem tegoż różnicowania.

Dlaczego więc taki kierunek PAT w tkankach pędowych nie został dotychczas stwierdzony ani w badaniach molekularnych, ani fizjologicznych? Wy tłumaczeniem może być metodyka wykonywanych badań. Ze względów technicznych PAT jest badany nie w całym pędzie, lecz w stosunkowo krótkich jego fragmentach [19]. Należałoby się więc zastanowić, co jest czynnikiem polaryzującym transport auksyny? W przypadku PAT bazypetalnego może nim być odpowiednia polarność tkanki obecna także w krótkich fragmentach. W przypadku PAT akropetalnego czynnikiem polaryzującym transport mogą być np. specyficzne zależności natury fizjologicznej pomiędzy odległymi układami tkankowymi, a wówczas fragmentacja pędu może je zmieniać, powodując obserwowany ograniczony, akropetalny transport auksyny nie wykazujący polarności [19]. Fragmentacja pędu może zmieniać także układy naprężeń tkankowych, które to według jednej z hipotez warunkują kierunek transportu auksyny [24].

ZRÓŻNICOWANIE DRÓG PRZEBIEGU PAT

W łodydze o budowie pierwotnej bazypetalny PAT odbywa się przez miękisz ksylemowy [20]. W korzeniu natomiast PAT akropetalny odbywa się poprzez tkanki walca osiowego, a PAT bazypetalny poprzez epidermę i/lub korę pierwotną [25, 31]. Jeżeli dodamy do tego fakt, iż auksyna może być także transportowana w elementach przewodzących ksylemu i floemu [1, 64], to okaże się, że praktycznie prawie wszystkie układy tkankowe są predestynowane do transportu auksyny. Dane te pokazują, jak bardzo skomplikowany jest układ transportowy tego hormonu. Ciekawe byłoby sprawdzenie, na ile autonomiczne są poszczególne elementy tego układu i czy istnieje związek między drogą transportu auksyny a reakcją, jaką ona wywołuje. Niedawno ukazała się praca, której autorzy postulują istnienie takiej zależności [64]. Stwierdzili oni, że auksyna może być transportowana z miejsca syntezy do korzeni poprzez floem. Jest to ich zdaniem także długodystansowy transport polarny, z tym że inną drogą niż powszechnie znany PAT. Jednocześnie sugerują, że mogą istnieć jeszcze inne drogi, a każda z nich może być zarezerwowana dla sterowania innymi procesami.

MOLEKULARNE PODSTAWY PAT

Od czasu kiedy odkryto PAT w roślinach, wiele emocji wzbudza poznanie molekularnych mechanizmów tego rodzaju transportu. Powstało wiele hipotez, które próbowały ten transport objaśnić. Wśród nich największą popularność zdobyła hipoteza

chemioosmotyczna [54, 59]. Według niej specyficzny transport polarny odbywa się na zasadzie symportu i antyportu protonowego dzięki obecności w błonie cytoplazmatycznej wyspecjalizowanych białkowych nośników auksyny wpływającej do komórki (AUX) i auksyny wpływającej z komórki (PIN) [16, 37, 50, 51].

Nośniki auksyny wpływającej z komórki

Przez długi czas wydawało się, że dla polarnego transportu auksyny i odpowiedzi na bodziec auksynowy mają znaczenie jedynie nośniki auksyny wpływającej z komórki. Takie spojrzenie wydawało się potwierdzać odkrycie, że w kwiatostanach *Arabidopsis* inhibitory blokujące nośniki auksyny wpływającej do komórki nie likwidują PAT [50, 51]. Dlatego też w większości ośrodków prowadzących badania nad auksynami skoncentrowano się na nośnikach wpływającej auksyny. Ułatwiła to znajomość inhibitorów polarnego transportu auksyny, takich jak NPA i TIBA, blokujących te właśnie nośniki, a także zidentyfikowanie w ostatnich latach szeregu mutantów z uszkodzonym PAT [49]. Dzięki temu badania te poczyniły ostatnio znaczne postępy i dokonano odkryć, które otwierają nowe drogi badań nad auksynami. Już bardzo wczesny model PAT zakładał, że nośniki wpływającej z komórki auksyny są białkami błonowymi pompującymi cząsteczki auksyny z wnętrza komórek do przestrzeni międzykomórkowych i apoplastu, z których to mogą one wchodzić do otaczających komórek [31]. W tym modelu kierunek transportu auksyny był określany przez asymetryczne rozmieszczenie białek nośnikowych w błonie komórkowej, co potwierdziły późniejsze eksperymenty na *Arabidopsis* [20, 46]. W roślinach tego gatunku białka nośnikowe wpływającej auksyny AtPIN1 są zlokalizowane w bazalnej części błony cytoplazmatycznej wyspecjalizowanych komórek miększu ksylemowego [20].

Białko będące nośnikiem jest od kilku lat intensywnie badane. Pomocne w tych badaniach okazały się mutanty *tir3* (*transport inhibitor response 3*) i *doc1* (*dark overexpression of CAB 1*). Oba te mutanty wykazują defekty w PAT i mają prawdopodobnie zredukowaną liczbę białek NBP, które są miejscem wiązania inhibitora PAT - NPA. Połączenie defektu w transporcie auksyny z redukcją NBP sugerowało, że białka te mogą wiązać NPA, a jednocześnie być nośnikami wpływającej auksyny. Hipoteza ta została odrzucona, ponieważ wykazano eksperymentalnie, że NPA i auksyna nie wykazują współzawodnictwa o te same miejsca w błonie komórkowej. Na obecnym etapie wiedzy przyjmuje się, że nośnik wpływającej auksyny jest kompleksem białkowym zbudowanym z co najmniej dwóch białek [37, 38, 40]. Pierwszym z nich jest związany z błoną transporter pompujący IAA w poprzek błony komórkowej. Jest on przypuszczalnie kodowany przez geny z rodziny PIN [49]. U *Arabidopsis* zidentyfikowano już ponad 10 genów należących do tej rodziny, między innymi *PIN1* w miększu ksylemowym [20], *PIN2* w zewnętrznych tkankach korzeni [49], *PIN3* w tkankach wrażliwych na grawitację [18] i *PIN4* w merystemach korzeni [17]. Rośliny z mutacjami w tych genach wykazują zmieniony transport auksyny i związane z tym charakterystyczne fenotypy [12, 32, 46, 57, 65]. Drugim białkiem kompleksu jest białko peryferyczne błony komórkowej – NBP, które to jest związane z nośnikiem i

działa jako regulacyjna podjednostka wiążąca NPA [33]. Rola regulacyjnej podjednostki nie została dotychczas jednoznacznie sprecyzowana, ale najnowsze odkrycia dostarczyły dowodów, że NBP może odpowiadać za właściwe usytuowanie samego nośnika w błonie komórkowej [22], co jest podstawą regulacji transportu auksyny [45, 61, 62].

Interesujących danych dotyczących regulacyjnej podjednostki kompleksu dostarczyły badania genów *Arabidopsis*, które są spokrewnione z genami oporności wielolekowej występującymi u zwierząt – MDR. Jeden z tych genów *AtMDR* wydawał się być indukowany przez auksynę. Wyizolowano więc mutanty, u których uszkodzony był wymieniony gen lub jego najbliższy podrzędny gen – *AtPGP1*. Zarówno u mutantu *atmdr*, jak i podwójnego mutantu *atmdr1 atpgp1* aktywność transportu auksyny była znacznie osłabiona. Fenotyp tych mutantów wykazywał epinastyczne liścienie i zredukowaną dominację apikalną. Okazało się, że białka *AtMDR* i *AtPGP* wiążą silnie, w sposób specyficzny inhibitor PAT - NPA. Wyniki te wskazują więc, że obydwa geny podobne do zwierzęcych MDR mogą kodować białka regulatorowe – NBP, które jako białka związane z nośnikiem wypływu auksyny są niezbędne do jej normalnej dystrybucji i sterowania przez nią rozwojem [47].

Przypuszcza się, że białka wiążące NPA wiążą także endogenne regulatory, takie jak flawonoidy, które mogą zastępować NPA i hamować wpływ auksyny *in vitro* [9, 52]. Dowodzą tego badania mutantów *Arabidopsis* nietworzących flawonoidów w wyniku defektu ich biosyntezy. Mutanty te wykazują fenotypy związane z podniesionym transportem auksyny [9, 44]. Zmiany w syntezie i lokalizacji flawonoidów mogą więc zmieniać wielkość i kierunek transportu modulując w ten sposób np. transport auksyny podczas reakcji grawitropijnej i fototropijnej [9, 44].

Lokalizacja nośnika wypływającej auksyny w błonie komórkowej

Za lokalizację białek błonowych odpowiedzialny jest cytoszkielet aktynowy. Wydawało się więc logiczne, że za lokalizację nośnika wypływającej auksyny także może być odpowiedzialny ten rodzaj cytoszkieletu. Potwierdziły to eksperymenty polimeryzacji i depolimeryzacji filamentów aktynowych *in vitro*, które wykazały, iż regulacyjna podjednostka nośnika zbudowana z białka NBP wiążącego NPA jest trwale powiązana z aktyną i rozdziela się wraz z nią. Z kolei trucizny mikrofilamentów zmieniające stan polimeryzacji aktyny zmniejszają także ilość polarnie transportowanej auksyny [39, 40]. Wyciągnięto więc wniosek, że funkcją związania białek NPA z filamentami aktynowymi może być lokalizacja nośnika w błonie i związana z tym kontrola polarności transportu auksynowego [39, 40].

Ze względu na przypuszczalny udział białek NBP w lokalizacji nośnika wypływającej auksyny w błonie komórkowej, szczególnie interesujące wydawały się wspomniane wcześniej mutanty *doc1/tir3*, u których następuje redukcja tych białek. Badania zmutowanego locus wykazały, że w przypadku wszystkich alleli zmiany nastąpiły w tej samej, pojedynczej ramce odczytu kodującej białko, które ze względu na nadzwyczaj duże rozmiary nazwano BIG. Białko to uznano za potencjalny regulator transportu auksynowego [33]. BIG wykazuje podobieństwo do znanych białek zwierzęcych,

będących między innymi produktami genu *Calossin* u *Drosophila*. Calossin (CalO) zostało zidentyfikowane jako białko wiążące kalmodulinę. Jest ono rozmieszczone w neuronach asymetrycznie, co jest związane prawdopodobnie z kontrolą przesyłania synaptycznego poprzez sterowanie transportem pęcherzykowym [62]. Asymetryczne rozmieszczenie nośników wypływającej z komórki auksyny jest podobne do rozmieszczenia Calossin. Jeżeli białko BIG także ma rozmieszczenie zgodne z rozmieszczeniem nośnika wypływającej z komórki auksyny, to może być one odpowiedzialne za transport pęcherzykowy białek nośnikowych, a tym samym decydować o ich odpowiednim usytuowaniu w błonie komórkowej [62]. Ostatnio wysunięto hipotezę, że białko BIG jest odpowiedzialne za lokalizację nie samych białek nośnikowych, lecz związane z nimi białka NBP, które dopiero decyduje o rozmieszczeniu PIN1. Podstaw do takich przypuszczeń dostarczyły badania eksperymentalne nad lokalizacją PIN1 u sadzonek mutantów *doc1/tir3* [22]. Gdy zmutowane sadzonki potraktowano inhibitorem – NPA, następował transport białka PIN1 do wnętrza komórki, gdzie tworzył się nieznaną dotychczas kompartment. Prawdopodobnie defekt w syntezie BIG w przypadku mutantu spowodował zmianę lokalizacji białka NBP wiążącego NPA, a tym samym zaburzenia usytuowania PIN1 w błonie komórkowej.

Kierunek PAT – zjawiskiem dynamicznym

Nośniki wypływającej auksyny zlokalizowane są w bazalnej części błony komórkowej [20, 39], co jest związane z kierunkiem polarnego transportu. Jednak liczne modele odpowiedzi wzrostowej roślin na czynniki zewnętrzne, takie jak światło czy też grawitacja, zakładają asymetryczną dystrybucję auksyny w komórce w odpowiedzi na bodziec [41]. Potwierdzają to badania fizjologiczne, które wskazują na istnienie systemu transportowego, dzięki któremu auksyna przemieszcza się bocznie, w wyniku czego następuje charakterystyczne zróżnicowanie wzrostu powodujące wygięcie grawitropijne [8, 27]. Dotychczas nieznaną były molekularne podstawy tego systemu. Odkrycie w ostatnich latach wielu genów PIN z różnym wzorem ekspresji i komórkowej lokalizacji sugerowało, że w wygięcie grawitropijne może być wplątanych wiele nośników wypływu auksyny [49]. Jedną z przyczyn gwałtownych zmian polarności, a tym samym zmian kierunku przemieszczania auksyny, mogłyby być wówczas zróżnicowana synteza tych nośników i różny ich transport z systemu endomembranowego [15, 37]. Inną przyczyną mogłaby być zróżnicowana aktywacja nośników wywołana istnieniem kilku różnych mechanizmów regulacyjnych, włączając fosforylację [42]. Z kolei zmiany błonowej lokalizacji nośnika mogłyby pozwolić, aby te same nośniki pośredniczyły zarówno w polarnym, jak i bocznym transporcie auksyny [43]. Ta ostatnia hipoteza znalazła potwierdzenie w przełomowym odkryciu, że lokalizacja białka będącego nośnikiem wypływającej auksyny w bazalnej części błony komórkowej nie jest statyczna, gdyż nie jest ono przez cały czas związane z plazmalemą, lecz wędruje od błony komórkowej do wnętrza komórki i odwrotnie [21]. Najnowsze eksperymenty wykazały z kolei, że auksyna jest odpowiednio akumulowana podczas zróżnicowanego wzrostu w miejscach zależnych od tego, którędy hormon ten wypływa z komórki. U *Arabidopsis* w tkankach

wrażliwych na grawitację regulatorem wypływu auksyny jest PIN3. Białka będące produktami tego genu, występujące w kolumelli czapeczki korzenia, w normalnych warunkach są usytuowane symetrycznie w błonie komórkowej, ale w odpowiedzi na stymulację grawitropijną gwałtownie przemieszczają się na boczną stronę komórek zmieniając kierunek transportu auksyny [18]. To wskazuje, że PIN3 uczestniczy zarówno w polarnym, jak i bocznym transporcie auksyny regulującym wzrost tropiczny. Zmiana lokalizacji PIN3 w odpowiedzi na grawitację oznacza, iż istnieje mechanizm, dzięki któremu białka będące nośnikami wypływającej auksyny nie mają stałej lokalizacji w błonie komórkowej, lecz mogą ją zmieniać zależnie od panujących warunków. Odkrycie to jest przełomowe w badaniach nad auksynami, gdyż przedstawione wyniki oznaczają, że wektor transportu auksyny nie musi być wartością stałą, lecz może zmieniać się teoretycznie w każdy inny. To otwiera zupełnie nowe możliwości i może tłumaczyć niektóre sprzeczności pojawiające się w badaniach nad auksynami. Jeżeli przyjmiemy, że bodziec warunkujący przemieszczanie nośnika może mieć naturę fizjologiczną, to odkrycie to staje się szczególnie interesujące z punktu widzenia sporu na temat, czy w pędzie istnieje akropetalny transport auksyny. Można przypuszczać, że skoro nośnik może zmieniać swoje położenie w błonie komórkowej, to być może w szczytowej części pędu występuje okresowo akropetalny transport auksyny do strefy organogenicznej wierzchołka, na przykład na skutek bodźca pochodzącego z samego merystemu.

Białko PIN3 jest obecne nie tylko w kolumeli czapeczki, ale także w pochwie skrobiowej pędu, a także w perycyklu korzenia [18], co oznacza, że mechanizm zmiany lokalizacji nośnika może być mechanizmem uniwersalnym działającym nie tylko podczas wygięcia grawitropijnego korzenia, ale także podczas innych odpowiedzi wzrostowych.

PIN3 podobnie jak inne białka błonowe może się przemieszczać pęcherzykowo między wnętrzem komórki a błoną komórkową i odwrotnie. Gdy siewki *Arabidopsis* zostaną potraktowane brefeldyną A, wówczas następuje gwałtowne przemieszczanie PIN3 do wnętrza komórki, gdzie tworzą się specyficzne kompartmenty akumulujące to białko. Podobnie dzieje się, gdy zostanie uszkodzony cytoszkielet aktynowy przez traktowanie latrunkuliną B lub cytochalazyną D. To wskazuje, że pęcherzykowe przemieszczanie PIN3 jest zależne od aktyny [42].

Na pęcherzykowe przemieszczanie nośników wypływającej z komórki auksyny wskazują także badania nad mutantami grawitropizmu u *Arabidopsis* – *sgr2* i *zig/sgr4*. Mutanty te wykazują anormalny grawitropizm zarówno pędu kwiatostanowego, jak i hypokotyła. Uszkodzone u tych mutantów geny są najprawdopodobniej zaangażowane we wczesne etapy odpowiedzi grawitropijnej. Odkryto, że gen *ZIG* koduje AtVTI11 – białko homologiczne z drożdżowym VTI11, które odpowiada za transport pęcherzykowy [26]. Uszkodzenie grawitropizmu u wymienionych mutantów może więc być związane z tym, iż w wyniku zaburzeń w transporcie pęcherzykowym nie może nastąpić zmiana lokalizacji nośnika PIN3 i w związku z tym mogą być uszkodzone kolejne etapy odpowiedzi grawitropijnej.

Nośnik auksyny wpływającej do komórki

W ostatnich latach zidentyfikowano i opisano grupę genów kodujących białka będące przypuszczalnie nośnikami wpływającej do komórki auksyny. Mutacja w jednym z tych genów *AUX1*, ekspresjonowanym między innymi w kolumelli, komórkach epidermy korzenia i czapczkach korzeni bocznych przejawia się brakiem grawitropizmu. To wskazuje, że do reakcji grawitropijnej niezbędne są nie tylko nośniki wyphywającej, ale i wpływającej do komórki auksyny [5, 53, 64]. Odkryto, że w wierzchołku korzenia mutantu *aux1* dochodzi do zmniejszenia przepływu znakowanej IAA, co jest przyczyną powstawania fenotypu niewykazującego reakcji grawitropijnej [57].

Ciekawe okazało się, że mutacja biosyntezy sterolu u *Arabidopsis* – *hydra2* znosi agrawitropijny fenotyp mutantu *aux1*. Efekt taki może być wywołany tym, że mutacja *hydra2* powoduje zmiany kompozycji błony komórkowej, powodując u podwójnego mutantu *aux1hydra2* zwiększenie przepuszczalności plazmalemy komórek korzenia dla endogennej IAA, omijając w ten sposób defekt *aux1* [36]. Grawitropijny fenotyp mutantowi *aux1* można także przywrócić przez użycie auksyny 1-NAA, która jest transportowana do komórki bez udziału nośnika wpływającej auksyny [34, 50, 66]. Z kolei auksyny, które wymagają aktywności tegoż nośnika, np. 2,4-D, nie są zdolne do przywrócenia grawitropizmu korzenia *aux1* [34, 50, 66].

Badania sekwencji genu *AUX1* wykazały, że jest on w 21% identyczny i w 48% podobny do AAP – członków rodziny roślinnych i grzybowych permeaz aminokwasowych [5]. To sugerowało, że sekwencje *AUX1* i AAP mają wspólną strukturę domen i stąd funkcje transportowe *AUX1*. Homologia między rodziną AAP i przypuszczalną auksynową permeazą została potwierdzona badaniami transportu, które wykazały, że nośniki wpływającej auksyny i białka AAP działają na zasadzie symportu protonowego [48]. *AUX1* obecnie jest zaliczany do ATF – rodziny transporterów aminokwasowych [48, 68]. Rodzina ta składa się z 5 podklas: *AUX1*, AAP, transporterów lizynowo-histydynowych (LHTs), transporterów prolinowych (ProT) i nowej klasy transporterów aminokwasów aromatycznych i neutralnych (ANT).

Sekwencja *AUX1* jest blisko związana z trzema innymi sekwencjami w genomie *Arabidopsis* nazywanymi *LAX1*, *LAX2* i *LAX3*. U *Medicago truncatula* także ostatnio odkryto co najmniej pięć genów spokrewnionych z *AUX1*. Geny te nazwano *MtLAX*. Podobieństwo sekwencji tych genów z *AUX1* wskazuje na to, że *MtLAX* kodują nośniki wpływającej do komórki auksyny. Ekspresja tych genów wykazuje przestrzenne i czasowe zróżnicowanie [7].

Funkcje nośników auksyny wpływającej do komórki

Mimo iż od dawna zakładano istnienie nośników wpływającej auksyny, ich funkcje w procesach rozwojowych były niejasne. Charakterystyka fenotypu mutantu *aux1* u *Arabidopsis* ukazała, że to właśnie białko *AUX1* może być przypuszczalnym nośnikiem i że odgrywa ono rolę w wielu procesach, takich jak np. grawitropizm czy tigmotropizm korzenia [64]. Przypuszczano, że ekspresja genu *AUX1* w komórkach czapczek korzeni bocznych może ułatwiać polarny, bazypetalny transport auksyny pomiędzy wrażliwymi

na grawitację komórkami kolumelli a tkankami w dystalnej strefie wydłużania, uczestniczącymi w odpowiedzi grawitropijnej [34]. Zgodnie z tym modelem mutacje w AUX1 uszkadzałyby bazyetalny transport [58, 64]. Natomiast z badań lokalizacji AUX1 wynika, że białko to w komórkach czapeček korzeni bocznych jest rozmieszczone symetrycznie, nie uczestnicząc w długodystansowym PAT [63, 64]. Na tej podstawie badacze wnioskują [50], że AUX1 ułatwia jedynie lokalny przepływ auksyny między sąsiadującymi komórkami lub tkankami, ale nie jak wcześniej sądzono długodystansowy bazyetalny PAT. Jest to zgodne z wynikami wcześniejszych badań, zgodnie z którymi 1-NAA jest zdolna do omijania defektu *aux1* i całkowicie przywraca grawitropijny fenotyp mutantowi [34, 66]. Także badania nad MtLAX u *Medicago truncatula* dowodzą, że nośniki wpływającej auksyny są zaangażowane w lokalny transport auksyny. MtLAX mogą być także niezbędne do inicjacji zawiązków korzeni bocznych, jak i do różnicowania waskularnego [7].

Badania lokalizacji AUX1 w wierzchołku korzenia wskazują, że nośnik wpływającej auksyny uczestniczy w długodystansowym, floemowym transporcie auksyny [64]. Szeregi komórek protofloemu są prawdopodobnie jedną z dróg transportu auksyny, wymagają jednak wyspecjalizowanych nośników do rozładowania IAA z floemu w tkankach docelowych, w korzeniu. Taką funkcję pełni najprawdopodobniej AUX1 [35]. Białko to może służyć także do załadowania auksyny w elementy przewodzące floemu w rozwijających się liściach będących potencjalnym źródłem tego hormonu [35]. Wskazują na to pomiary metodą GC-SRM-MS, które wykazały różnice w poziomie IAA między liśćmi *aux1* i liśćmi formy dzikiej. U *Arabidopsis* w liściach typu dzikiego ekspresja markera IAA2::uidA była zlokalizowana głównie w elementach waskularnych wyższego rzędu, podczas gdy w liściach *aux1* barwienie GUS w elementach waskularnych było znacząco zredukowane (mimo podwyższonego poziomu IAA w tkankach otaczających). Uważa się, że zmiana wzoru ekspresji markera w liściach *aux1* jest związana z uszkodzeniem załadowania waskularnego, a nie z defektem rozwojowym, ponieważ liście *aux1* mają taki sam wzór waskularny jak liście typu dzikiego.

PODSUMOWANIE

Szlaki transportu auksynowego stanowią skomplikowany system, dzięki któremu są kontrolowane wszystkie lub prawie wszystkie procesy rozwojowe w roślinie. Tak skomplikowana kontrola całego organizmu wymaga szybkiego przemieszczania sygnałów na duże odległości, które można porównać do impulsów nerwowych w organizmach zwierzęcych [25]. PAT został stwierdzony już ponad wiek temu i od tamtej pory opisywano jego rolę w kolejnych procesach, ale dopiero odkrycia ostatnich lat pokazują, jak bardzo jest on skomplikowany. Jeden związek, jakim jest auksyna, pełni prawdopodobnie różnorodne funkcje w zależności od tego, w jakich tkankach jest transportowana, w jakim kierunku, jakie nośniki membranowe w jej transporcie uczestniczą, jakie jest jej stężenie i jak wrażliwe są na nią komórki docelowe.

Wymienione czynniki mogą wchodzić w różne kombinacje, które tworzą w roślinie obszary o zdefiniowanej funkcji. Opisany układ nie jest statyczny, lecz zmienia się zależnie od stadium rozwojowego rośliny i podlega wpływom czynników zewnętrznych, takich jak światło, grawitacja czy też wilgotność powietrza.

W przedstawionej pracy dużo uwagi poświęcono dyskusji nad możliwością istnienia akropetalnego PAT w tkankach pędowych. Przyczyną tego jest fakt, iż problem ten jest szczególnie bliski autorce tej pracy. Możliwość istnienia akropetalnego PAT w pędzie została praktycznie odrzucona wiele lat temu ze względu na brak potwierdzenia w badaniach fizjologicznych i molekularnych. Ostatnio jednak coraz częściej ukazują się prace, w których mówi się, że taki transport musi istnieć, ponieważ wskazuje na to sposób zachodzenia wielu procesów zależnych od auksyny. Także odkrycia autorki pracy w badaniach nad organogenezą i różnicowaniem waskularnym u roślin szpilkowych sygnalizowały możliwość istnienia akropetalnego PAT [3]. Najnowsze badania molekularne, szczególnie odkrycie możliwości zmian kierunku przepływu auksyny na skutek zmian lokalizacji białkowych nośników dają szansę na logiczne powiązanie zjawisk zachodzących w roślinie na różnych poziomach jej organizacji.

LITERATURA

- [1] ALONI R, SCHWALM K, LANGHANS M, ULLRICH CI. Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *Planta* 2003; **216**: 841–853.
- [2] AVSIAN-KRETCHMER O, CHENG JC, CHEN L, MOCTEZUMA E, SUNG ZR. Indole Acetic Acid Distribution Coincides with Vascular Differentiation Pattern during *Arabidopsis* Leaf Ontogeny. *Plant Physiol* 2002; **130**: 199–209.
- [3] BANASIAK AS. Anatomiczne uwarunkowania osiowej homodromii i antydromii w pędach roślin szpilkowych. *Rozprawa Doktorska* 2001. Uniwersytet Wrocławski.
- [4] BARTEL B, LECLERE S, MAGIDIN M, ZOLMAN BK. Inputs to the Active Indole-3-Acetic Acid Pool: De Novo Synthesis, Conjugate Hydrolysis, and Indole-3-Butyric Acid β -Oxidation. *J Plant Growth Regul* 2001; **20**: 198–216.
- [5] BENNETT MJ, MARCHANT A, GREEN HG, MAY ST, WARD SP, MILLNER PA, WALKER AR, SCHULZ B, FELDMANN KA. *Arabidopsis* AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* 1996; **273**: 948–950.
- [6] BHALERAO RP, EKLÖF J, LJUNG K, MARCHANT A, BENNETT MJ, SANDBERG G. Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J* 2002; **29**: 325–332.
- [7] de BILLY F, GROSJEAN C, MAY S, BENNETT M., CULLIMORE JV. Expression studies on AUX-like genes in *Medicago truncatula* suggest that auxin is required at two steps in early nodule development. *Mol Plant Microbe Interact* 2001; **14**: 267–277.
- [8] BOONSIRICHAJ K, GUAN C, CHEN R, MASSON PH. Root Gravitropism: An Experimental Tool to Investigate Basic Cellular and Molecular Processes Underlying Mechanosensing and Signal Transmission in Plants. *Annu Rev Plant Biol* 2002; **53**: 421–447.
- [9] BROWN D, RESHOTTE A, MURPHY A, TAGUE B, PEER W, TAIZ L, MUDAY G. Flavonoids acts as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 2001; **126**: 524–535.
- [10] CASIMIRO I, MARCHANT A, BHALERAO RP, BEECKMAN T, DHOOGHE S, SWARUP R, GRAHAM N, INZÉ D, SANDBERG G, CASER PJ, BENNETT MJ. Auxin transport promotes *Arabidopsis* root initiation. *Plant Cell* 2001; **13**: 843–852.

- [11] CHEN J. Dual Auxin Signaling Pathways Control Cell Elongation and Division. *J Plant Growth Regul* 2001; **20**: 255–264.
- [12] CHEN R, HILSON P, SEDBROOK J, ROSEN E, CASPAR T, MASSON PH. The *Arabidopsis thaliana* AGRAVITROPIC 1 gene encodes a component of polar-auxin-transport efflux carrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 15112–15117.
- [13] COOKE TJ, POLI D, SZTEIN AE, COHEN JD. Evolutionary patterns in auxin action. *Plant Mol Biol* 2002; **49**: 319–338.
- [14] DAVIES PJ. Plant Hormones-Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Dordrecht: The Netherlands: Kluwer Academic Publishers 1995.
- [15] DELBARRE A, MULLER P, GUERN J. Short-lived and phosphorylated proteins contribute to carrier-mediated efflux, but not to influx, of auxin in suspension-cultured tobacco cells. *Plant Physiol* 1998; **116**: 833–844.
- [16] ESTELLE M. Polar Auxin Transport: New Support for an Old Model. *Plant Cell* 1998; **10**: 1775–1778.
- [17] FRIML J, BENCOVA E, BLILOU I, WIŚNIEWSKA J, HAMANN T, LJUNG K, WOODY S, SANDBERG G, SCHERES B, JURGENS G, PALME K. AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell* 2002a; **108**: 661–673.
- [18] FRIML J, WISNIEWSKA J, BENKOVA E, MENDGEN K, PALME K. Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 2002b; **415**: 806–809.
- [19] GARRIDO G, RAMON GUERRERO J, ANGEL CANO E, ACOSTA M, SANCHEZ-BRAVO J. Origin and basipetal transport of the IAA responsible for rooting of carnation cuttings. *Physiol Plant* 2002; **114**: 303–312.
- [20] GÄLWEILER L, GUAN CH, MÜLLER A, WISMAN E, MENDGEN K, YEPHREMOV A, PALME K. Regulation of Polar Auxin Transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* Vascular Tissues. *Science* 1998; **282**: 2226–2230.
- [21] GELDNER N, FRIML J, STERHOF YD, JURGENS G, PALME K. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 2001; **413**: 425–428.
- [22] GIL P, DEWEY E, FRIML J, ZHAO Y, SNOWDEN KC, PUTTERILL J, PALME K, ESTELLE M, CHORY J. BIG: a calossin-like protein required for polar transport auxin in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 2001; **15**: 1985–1997.
- [23] GIROLAMI G. Relation between phyllotaxis and primary vascular organization in *Linum*. *Amer J Bot* 1953; **40**: 618–625.
- [24] HEJNOWICZ Z. Anizotropia naprężeń w ścianach komórkowych a wpływ auksyny na szybkość wzrostu pędu i korzenia. *Post Biol Kom* 1999; **26**: 71–82.
- [25] JONES AM. Auxin transport: down and out and up again. *Science* 1998; **282**: 2201–2203.
- [26] KATO T, MORITA MT, FUKAKI H, YAMAUCHI Y, UEHARA M, NIHAMA M, TASAKA M. SGR2, a Phospholipase-Like Protein, and ZIG/SGR4, a SNARE, Are Involved in Shoot Gravitropism of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2002; **14**: 22–46.
- [27] KISS J. Mechanisms of the early phases of plant gravitropism. *Crit Rev Plant Sci* 2000; **19**: 551–573.
- [28] KUHLEMEIER C, REINHARDT D. Auxin and phyllotaxis. *Trends Plant Sci* 2001; **5**: 187–189.
- [29] LARSON PR. Phyllotactic transitions in the vascular system in *Populus deltoides* Bartr. as determined by ¹⁴C labeling. *Planta* 1977; **134**: 241–249.
- [30] LJUNG K, OSTIN A, LIOUSSANNE L, SANDBERG G. Developmental regulation of indole-3-acetic acid turnover in Scots pine seedlings. *Plant Physiol* 2001; **125**: 464–475.
- [31] LOMAX TL, MUDAY GK, RUBERY PH. Auxin transport. [w] Davies PJ [red.] Plant Hormones: Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers 1995: 509–530.
- [32] LUSCHNIG CH, GAXIOLA RA, GRISAFI P, FINK GR. EIR1, a root specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 1998; **12**: 2175–2187.
- [33] LUSCHNIG CH. Why plants like to think BIG. *Curr Biol* 2001; **11**: R831–R833.
- [34] MARCHANT A, KARGUL J, MAY ST, MÜLLER P, DELBARRE A, PERRÖT-RECHENMANN C, BENNETT MJ. AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO J* 1999; **18**: 2066–2073.
- [35] MARCHANT A, BHALERAO R, CASIMIRO I, EKLÖF J, CASERO PJ, BENNETT M, SANDBERG G. AUX1 promotes lateral root formation by facilitating IAA distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. *Plant Cell* 2002; **14**: 589–597.

- [36] MATTSSON J, SUNG ZR, BERLETH T. Responses of plant vascular systems to auxin transport inhibition. *Development* 1999; **126**: 2979–1991.
- [37] MORRIS DA, ROBINSON JS. Targeting of auxin carriers to the plasma membrane: differential effects of brefeldin A on the traffic of auxin uptake and efflux carriers. *Planta* 1998; **205**: 606–612.
- [38] MORRIS DA. Transmembrane auxin carrier systems – dynamic regulators of polar auxin transport. *J Plant Growth Regul* 2000; **32**: 161–172.
- [39] MUDAY GK. Maintenance of asymmetric cellular localization of an auxin transport protein through interaction with the actin cytoskeleton. *J Plant Growth Regul* 2000a; **19**: 385–396.
- [40] MUDAY GK. Interactions between the actin cytoskeleton and an auxin transport protein. [w] Staiger CJ, Baluska F, Volkman D, Barlow P [red.] Actin: a dynamic framework for multiple plant cell functions. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Press 2000b: 541–556.
- [41] MUDAY GK. Auxins and Tropisms. *J Plant Growth Regul* 2001a; **20**: 226–243.
- [42] MUDAY GK, DELONG A. Polar auxin transport: controlling where and how much. *Trends Plant Sci* 2001b; **6**: 535–542.
- [43] MUDAY GK, MURPHY AS. An Emerging Model of Auxin Transport Regulation. *Plant Cell* 2002; **14**: 293–299.
- [44] MURPHY A, PEER WA, TAI Z L. Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta* 2000; **211**: 315–324.
- [45] MURPHY AS, HOOGNER KR, PEER WA, TAI Z L. Identification, purification, and molecular cloning of N-1-naphthylphthalamic acid-binding plasma membrane-associated aminopeptidases from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2002; **128**: 935–950.
- [46] MÜLLER A, GUAN CH, GÄLWEILER L, TÄNZLER P, HUIJSER P, MARCHANT A, PARRY G, BANNETT M, WISMAN E, PALME K. AtPIN2 defines locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J* 1998; **17**: 6903–6911.
- [47] NOH B, MURPHY AS, SPALDING EP. Multidrug resistance-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin mediated development. *Plant Cell* 2001; **13**: 2441–2454.
- [48] ORTIZ-LOPEZ A, CHANG H-C, BUSH DR. Amino acid transporters in plants. *Biochem Biophys* 2000; **1465**: 275–280.
- [49] PALME K, GÄLWEILER L. PIN-pointing the molecular basis of auxin transport. *Curr Opin Plant Biol* 1999; **2**: 375–381.
- [50] PARRY G, MARCHANT A, MAY S, SWARUP R, SWARUP K, JAMES N, GRAHAM N, ALLEN T, MARTUCCI T, YEMM A, NAPIER R, MANNING K, KING G, BENNETT M. Quick on the Uptake: Characterization of a Family of Plant Auxin Influx Carriers. *J Plant Growth Regul* 2001a; **20**: 217–225.
- [51] PARRY G, DELBARRE A, MARCHANT A, SWARUP R, PERROT-RECHENMANN C, BENNETT M. Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier mutation *aux1*. *Plant J* 2001b; **25**: 399–406.
- [52] PEER WA, BROWN DE, TAGUE BW, MUDAY GK, TAI Z L, MURPHY AS. Flavonoid Accumulation Patterns of Transparent Testa Mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2001; **126**: 536–548.
- [53] RAHMAN A, AHAMAD A, AMAKAWA A, GOTO N, TSURUMI S. Chromosaponin I specifically interacts with AUX1 protein in regulating the gravitropic response of *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol* 2001; **125**: 990–1000.
- [54] RAVEN JA. Transport of indole-3-acetic acid in plant cells in relation to pH and electrical potential gradients, and its significance for polar IAA transport. *New Phytol* 1975; **74**: 163–172.
- [55] REED R, BRADY S, MUDAY G. Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 1998; **118**: 1369–1378.
- [56] REINHARDT D, MANDEL T, KUHLEMEIER C. Auxin Regulates the Initiation and Radial Position of Plant Lateral Organs. *Plant Cell* 2000; **12**: 507–518.
- [57] RESHOTTE AM, BRADY SR, REED RC, ANTE SJ, MUDAY GK. Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2000; **122**: 481–490.
- [58] RESHOTTE AM, DELONG A, MUDAY GK. Genetic and chemical reductions in protein phosphatase activity alter auxin transport, gravity response and lateral root growth. *Plant Cell* 2001; **13**: 1683–1697.
- [59] RUBERY PH, SHELDRAKE AR. Carrier-mediated auxin transport. *Planta* 1974; **118**: 101–121.

- [60] RUEGGER M, DEWEY E, HOBBIIE L, BROWN D, BERNASCONI P, TURNER J, MUDAY G, ESTELLE M. Reduced naphthylphthalamic acid binding in the tir3 mutant of *Arabidopsis* is associated with a reduction in polar transport auxin and diverse morphological defects. *Plant Cell* 1997; **9**: 745–757.
- [61] SIEBERER T, SEIFERT GJ, HAUSER MT, GRISAFI P, FINK GR, LUSHNIG C. Post-transcriptional control of the *Arabidopsis* auxin efflux carrier EIR1 requires AXR1. *Curr Biol* 2000; **10**: 1595–1598.
- [62] STEINMANN T, GELDNER N, GREBE M, MANGOLD S, JACKSON CL, PARIS S, GALWEILER L, PALME K, JÜRGENS G. Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* 1999; **286**: 316–318.
- [63] SWARUP R, MARCHANT A, BENNETT MJ. Auxin transport: providing a sense of direction during plant development. *Biochem Soc Trans* 2000; **28**: 481–485.
- [64] SWARUP R, FRIML J, MARCHANT A, LJUNG K, SANDBERG G, PALME K, BENNET M. Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes Dev* 2001; **15**: 2648–2653.
- [65] UTSUNO K, SHIKANAI T, YAMDA Y, HASHIMOTO T. *AGR*, an *Agravitropic* locus of *Arabidopsis thaliana*, encodes a novel membrane protein family member. *Plant Cell Physiol* 1998; **39**: 1111–1117.
- [66] YAMAMOTO M, YAMAMOTO K. Differential effects of 1-Naphtaleneacetic acid, Indole-3-acetic and 2:4-Dichlorophenoxyacetic acid on the gravitropic response of roots in an auxin-resistant mutant of *Arabidopsis*, *aux1*. *Plant Cell Physiol* 1998; **39**: 660–664.
- [67] YE ZH. Vascular tissue differentiation and pattern formation in plants. *Annu Rev Plant Biol* 2002; **53**: 183–202.
- [68] YOUNG G, JACK D, SMITH D, SAIER MJR. The amino acid/auxin: proton symport permease family 1. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1415**: 302–322.
- [69] ZHONG R., TAYLOR JJ, YE ZH. Transformation of Collateral Vascular Bundles into Amphivasal Vascular Bundles in an *Arabidopsis* Mutant. *Plant Physiol* 1999; **120**: 53–64.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 01.04.2003 r.

Przyjęto: 09.05.2003 r.

Adres autora: ul. Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław
balicja@biol.uni.wroc.pl

RURKI SITOWE – FENOMEN FUNKCJONALNOŚCI

SIEVE TUBES – PHENOMENON OF FUNCTIONALITY

Paweł SOWIŃSKI

Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin,
Radzików oraz Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Botaniki UW

Streszczenie: Budowa rurek sitowych jest znana od dawna, jednak dopiero ostatnie doniesienia dotyczące ultrastruktury pozwalają w pełni zrozumieć, jak dobrze te twory są przystosowane do pełnionych funkcji, poczynając od redukcji oporów dla przepływu soku floemowego, przez wytrzymywanie wysokich ciśnień, aż po mechanizmy zabezpieczające przed wyciekami zawartości w razie uszkodzenia oraz przed atakiem patogenów. Sok floemowy zawiera nie tylko cukry i jony, ale też hormony, białka i kwasy nukleinowe. Związki te są zaangażowane w sygnalizację, a także w systemiczną reakcję odporności przed wirusami. Z tego względu rurki sitowe roślin, mimo iż stanowią jedynie ciągi komórkowe, wewnątrz których odbywa się transport, można uznać za odpowiednik systemu krążenia, pokarmowego, limfatycznego, a nawet – ze względu na przenoszenie sygnałów biofizycznych – nerwowego zwierząt.

Słowa kluczowe: floem, transport, ultrastruktura.

Summary: The anatomy of sieve tubes has been known for a long time. Only recently however, new discoveries led to understand how sieve tube ultrastructure fit to its functions: fast flow of phloem sap and extreme resistance to injuries as well as pathogen attack. Phloem sap contains not only sugars and ions, but also of hormones, proteins and RNA. These molecules are involved in signalization as well as in systemic response of plants against viruses. It is now apparent, that sieve tubes being cell continuum play the role analogical to distinct animal systems: alimentary, circulatory, lymphatic, or even nervous.

Key words: phloem, transport, ultrastructure.

WSTĘP

Transport międzykomórkowy odbywa się w roślinach dwiema drogami: tak jak u zwierząt i organizmów niższych przez błony komórkowe lub specyficznie u roślin przez plazmodesmy, liczne kanały cytoplazmatyczne łączące sąsiednie protoplasty. W drugim przypadku, transportowane związki nie opuszczają protoplastów komórek tworzących

symplast zanurzony w apoplaście tworzonym przez ściany komórkowe i przestrzenie międzykomórkowe. Transport taki odbywa się bądź przez dyfuzję, tzn. przemieszczenie substancji rozpuszczonej z miejsca o wyższym stężeniu do miejsca o niższym stężeniu lub w wyniku przepływu masowego, tzn. przemieszczenia rozpuszczalnika wraz z substancjami rozpuszczonymi z miejsca o wyższym ciśnieniu do miejsca o niższym ciśnieniu.

Zjawiska transportowe zachodzące na poziomie komórkowym są u roślin przeniesione na poziom nadkomórkowy. Transport dalekodystansowy u roślin odbywa się bowiem wewnątrz wyspecjalizowanych komórek: żywych członów rurek sitowych w przypadku nisko- i wysokocząsteczkowych związków organicznych transportowanych z liści oraz wewnątrz członów martwych naczyń w przypadku transportu wody z korzeni, a nie tak jak u zwierząt w różnego typu przewodach o ścianach tworzonych przez komórki.

Ruch soku floemowego odbywający się na zasadzie przepływu masowego w rurkach sitowych jest wynikiem istnienia różnicy ciśnienia hydrostatycznego wzdłuż szlaku transportowego. Gradient ten jest wytwarzany dzięki dwóm procesom – załadowaniu floemu, w którym asymilaty bądź inne związki przemieszczane są do wnętrza rurek sitowych i przebiegającego w odwrotnym kierunku rozładowania floemu. W chwili obecnej można wyróżnić co najmniej trzy typy załadowania floemu, występujące u roślin wyższych samodzielnie lub w połączeniu [50]. Są to:

- (i) załadowanie apoplastyczne,
- (ii) symplastyczne załadowanie wielocukrów lub polioli,
- (iii) symplastyczne załadowanie sacharozy.

W pierwszym przypadku, sacharoza jest transportowana przez błony kompleksu komórki towarzyszące/rurki sitowe przy udziale specyficznych nośników białkowych na zasadzie symportu. W drugim przypadku, sacharoza jest transportowana przez plazmodesmy do komórek towarzyszących, gdzie jest polimeryzowana do wielocukrów lub polioli, których wielkość zapobiega ich powrotowi do komórek miękiszu. W trzecim przypadku, sacharoza jest przemieszczana do kompleksu komórki towarzyszące/rurki sitowe dzięki dyfuzji zgodnie z gradientem stężenia, w efekcie istnienia różnicy ciśnienia turgorowego lub w wyniku istnienia nieznanego jeszcze mechanizmu. Rozładowanie floemu odbywa się z reguły symplastycznie, a transport post-floemowy symplastycznie lub apoplastycznie.

BUDOWA RUREK SITOWYCH ROŚLIN OKRYTONASIENNYCH

Budowa członów rurek sitowych została już dość dobrze poznana, chociaż uzyskanie dobrych preparatów wciąż stanowi problem. Wszystkie bowiem techniki preparacji powodują większe lub mniejsze uszkodzenia w rurkach, co uruchamia mechanizmy chroniące przed wyciekami soku floemowego. W efekcie preparaty mikroskopowe często zawierają artefakty, co może prowadzić do fałszywych wniosków dotyczących struktury rurek oraz ich funkcji.

Człony rurek sitowych u roślin okrytonasiennych są wydłużonymi komórkami o średnicy 20–30 μm i długości do 500 μm [6, 34]. Krótsze ściany zwane płytkami sitowymi zawierają liczne pory powstałe w miejscach, w których przebiegały plazmodesmy łączące różnicujące się elementy przewodzące. Długie ściany są wzmocnione poprzecznie, co zwiększa odporność na rozciąganie związane z wysokim ciśnieniem panującym wewnątrz rurek [47]. Budowa rurek sitowych zapewnia niezakłócony przepływ soku floemowego z szybkością 30–130 cm/h zarówno u drzew [26], jak i u roślin zielnych [41,51]. Wnętrze członów rurek sitowych składa się z dwóch części: światła, w którym przebiega transport, oraz z warstwy przyściennej zawierającej białka, mitochondria, plastydy i retikulum endoplazmatyczne. Pory w płytkach sitowych mają znacznie większą średnicę niż plazmodesmy. Może ona dochodzić nawet do 1 mikrometra. W dobrze utrwalonych preparatach nie widać w świetle porów odkładającego się materiału [11].

Człony rurek sitowych nie zawierają jądra oraz rybosomów, należy więc przypuszczać, że składniki odżywcze i strukturalne są tam dostarczane z komórek towarzyszących ściśle przylegających do rurek sitowych. Komórki towarzyszące charakteryzują się bardzo gęstą cytoplazmą i licznymi mitochondriami. U roślin okrytonasiennych, pojedynczy człon rurki sitowej i przylegające do niego dwie komórki towarzyszące pochodzą z tej samej komórki macierzystej. Ze względu na ścisły związek przestrzenny i funkcjonalny komórki związane z dalekim transportem asymilatów określa się mianem kompleksu komórki towarzyszące/rurki sitowe.

Elementy przyścienne są przymocowane do błony komórkowej w specyficzny dla rurek sitowych sposób, bowiem podczas ontogenezy zanikają tam mikrotubule kortykalne [48]. Organelle komórkowe są powiązane rodzajem więzadeł zarówno między sobą, jak i z plazmalemą [11]. Mitochondria występujące w rurekach sitowych mogą prowadzić reakcje utleniania [9], chociaż nie są zapewne bardzo aktywne, ze względu na słabe rozwinięcie systemu grzebieni mitochondrialnych. Plastydy nie zawierają tylakoidów. U sosny i pokrewnych występują zawierające ziarna skrobi S-plastydy, natomiast inne szpilkowe mają P-plastydy z widocznymi wewnątrz kryształopodobnymi tworami białkowymi [5]. Wśród dwuliściennych, z przebadanych 382 rodzin, 320 ma wyłącznie S-plastydy, 48 P-plastydy, a 14 oba typy. W obrębie P-plastydów i S-plastydów wyróżnia się jeszcze dodatkowo formy tych organelli ze względu na kształt inkluzji, głównie dotyczy to białek. Nie są znane funkcje plastydów w rurekach sitowych, są one zapewne związane z reakcją na zranienie. W momencie uszkodzenia P-plastydy uwalniają bowiem błyskawicznie swoją zawartość, która zatyka pory sit [29].

Retikulum endoplazmatyczne jest dość dobrze rozwinięte, ale nie jest związane z rybosomami, więc synteza białek, których w rurekach może być 200 i więcej, odbywa się najpewniej w komórkach towarzyszących połączonych licznymi plazmodesmami z rurekami sitowymi. ER może też brać udział w przemieszczaniu i kierowaniu białek z komórek towarzyszących w miejsca docelowe w członach rurek sitowych [40]. W tych bowiem nie ma elementów cytoskieletu, które w innych komórkach stanowią drogę transportu wewnątrzkomórkowego białek i kwasów nukleinowych.

Prawdopodobnie ER członów rurek sitowych stanowi ciągłość z retikulum endoplazmatycznym komórek towarzyszących przechodzącym w postaci desmotubul przez plazmodesmy. Ponadto, retikulum endoplazmatyczne może być rezerwuarem wapnia wydzielanego po zranieniu, co inicjuje odkładanie się kalozy (β -1,3-glukanu), wielocukru zatykającego pory w płytkach sitowych w przypadku uszkodzenia rurki sitowej [27].

Wiele struktur, które pozostały w dojrzałych rurkach sitowych, ma jakiś związek z mechanizmem zabezpieczania rurek. Interesujące wydaje się tu porównanie transportu ksylemowego i floemowego. Człony rurek sitowych są komórkami żywymi, natomiast dojrzałe człony naczyń są zbudowane tylko ze ścian pozostałych ze zróżnicowanych komórek po lizie ich protoplastów. Różnice w transporcie wody z gleby do liści i soku floemowego z liści do akceptorów są zapewne związane z różnym mechanizmem ich transportu. W przypadku ksylemu, mechanizm transportu wody jest związany z kohezją słupa wody podciąganego dzięki transpiracji. W naczyniach woda przemieszcza się dzięki podciśnieniu, co powoduje, że ewentualne uszkodzenie, w najgorszym razie, wyłącza dane naczynie z użytku – chociaż istnieją tu mechanizmy naprawcze. Natomiast sok floemowy przemieszcza się w rurkach sitowych dzięki nadciśnieniu, tak więc uszkodzenie rurki powodowałoby wyciek zawartości, a więc znaczne straty cennych dla rośliny składników. Tylko żywa komórka może być wyposażona w aktywne mechanizmy zamykające miejsce wycieku. Znaczenie tych mechanizmów jest widoczne, gdy w miejsce przecięcia floemu pada się EDTA, chelator wiążący wapń. Powoduje to ciągły wyciek soku z floemu. Wapń jest elementem szlaku sygnalizacji prowadzącego do odkładania się kalozy zamykającej pory w płytkach sitowych [58].

Poznano już nieco szczegółów związanych z reakcją rurek sitowych na uszkodzenie [29]. Zmiany strukturalne zależą od stopnia uszkodzenia. Na płytce sitowej uszkodzonego członu, od strony płynących asymilatów, powstaje czop. W przypadku silnego uszkodzenia, czop może również osadzać się na następnej płytce. W członie za uszkodzoną rurką powstają pasma białkowe, niekiedy sięgające drugiej płytki sitowej. Pasma te mogą się rozgałęziać i dochodzić do ścian bocznych. W przypadku silnego uszkodzenia takie pasma nie są widoczne, są zapewne porywane przez odpływający sok floemowy i osadzają się w czopie. W ciągu około 30 minut od uszkodzenia, tworzą się pęcherzyki i dołączają do pasm białkowych. P-plastydy i białka przyścienne nie są widoczne. Pęcherzyki powstają zapewne z P-plastydów. Może o tym świadczyć fakt, że w rurce poddanej działaniu silnego światła laserowego, tam gdzie P-plastydy pozostają nietknięte, nie tworzą się też pęcherzyki. W takiej rurce powstają natomiast pasma białkowe. Reakcja P-plastydów na uszkodzenie polega na ich eksplozji. Następuje ona zapewne w wyniku obniżenia ciśnienia turgorowego w rurce sitowej. Reakcję taką można wywołać wkłuciem mikrokapilary o średnicy 1 mikrometra. Cieńsze mikrokapilary też wywołują rozerwanie P-plastydów, ale dopiero po wycofaniu mikrokapilary. Pokazuje to jak czuły jest mechanizm czopowania rurek sitowych.

Rurki sitowe roślin okrytonasiennych stanowią końcowy efekt ewolucji komórek specjalizujących się w przewodzeniu asymilatów u roślin lądowych. Komórki pełniące takie funkcje występują już w bardziej prymitywnych roślinach lądowych. Podczas

ewolucji, optymalizacja transportu dalekodystansowego została osiągnięta przez wzrost porowatości ścian końcowych i usunięcie głównych przegród w pewnych ciągach komórek. Człony rurek sitowych wydłużały się, ich ściany ulegały pogrubieniu, a kontakt z innymi komórkami stawał się coraz bardziej ograniczony. Cytoplazma była stopniowo usuwana ze światła rurek. Wakuola zanikła na wczesnym etapie ewolucji. Jądro ulega stopniowo dezintegracji, a liczba mitochondriów się zmniejsza.

Poczynając od mchów, obserwuje się ubożenie zawartości elementów przewodzących, aż do końcowego obrazu u roślin okrytonasiennych. U mchów komórki przewodzące zwane leptoidami mają w zasadzie cały zestaw organelli, jednak duża wakuola jest zastąpiona przez kilka małych, brak jest też rybosomów, aparatu Golgiego, a cytoszkielek jest zubożony [43]. W rurkach sitowych niższych roślin lądowych już mikrotubul, zanika też wakuola [13]. U iglastych następuje specjalizacja pewnych organelli komórek sitowych, a także plazmodesm w ścianach poprzecznych tworzących rodzaj porów. Powstaje też mechanizm chroniący rurki przed wyciekami soku komórkowego w razie zranienia [47].

Już u mchów obserwuje się występowanie bardzo aktywnych komórek mniej lub bardziej zintegrowanych z komórkami sitowymi [43], chociaż prawdziwe komórki towarzyszące obserwowane są dopiero u okrytonasiennych. U roślin nagonasiennych i niższych roślin naczyniowych rurki sitowe nie mają komórek towarzyszących [47]. U iglastych i *Ginkgo*, a więc prymitywnych okrytonasiennych, niektóre komórki parenchymatyczne są związane z komórkami sitowymi licznymi plazmodesmami, jednak nie mają wspólnego pochodzenia [12,14]. Zwane są komórkami albuminowymi ze względu na ich zasobność w białka lub komórkami Strassburgera, ze względu na osobę odkrywcy.

SKŁAD SOKU FLOEMOWEGO: ZWIĄZKI NISKO- I WIELKOCZĄSTECZKOWE

W soku floemowym występują głównie cukry, przede wszystkim sacharoza. Jej stężenie może dochodzić do 1 M i więcej [55]. U niektórych gatunków formą transportową mogą być ponadto oligosacharydy i poliole [38,62]. W rurkach sitowych nie występują cukry redukujące, zapewne ze względu na ich dużą reaktywność. Rozkład sacharozy we floemie jest praktycznie niemożliwy, a to ze względu na całkowite wyeliminowanie aktywności kwaśnej inwertazy. W soku floemowym występują też aminokwasy [1]. Oprócz sacharozy i aminokwasów, w soku floemowym obecne są też hormony [3,60], w tym również te, które są syntetyzowane w korzeniach. Występują tu również kwasy organiczne, witaminy, a także ADP i ATP. Ponadto znajduje się tu wiele jonów, nawet w ilościach przekraczających ich stężenie w ksylemie [1].

Skład soku floemowego podlega zmianom zarówno dobowym, jak i sezonowym. Np. drzewa w okresie letnim mają we floemie niewiele związków azotowych, natomiast jesienią, podczas wycofywania składników odżywczych z liści, zawartość tych związków rośnie kilkakrotnie. Podczas starzenia się liści, przez floem usuwane są

produkty rozpadu białek. Intensywność transportu u drzew nasila się jesienią, przed wejściem w stan spoczynku, gdy w plastydach komórek miękiszowych pnia i korzeni magazynowane są składniki odżywcze, pod postacią skrobi, która wiosną służy jako źródło związków organicznych.

W soku floemowym wykrywa się liczne białka [35]. W przypadku roślin okrytonasiennych pochodzą one z komórek towarzyszących i dostają się do rurek sitowych przez liczne plazmodesmy łączące oba typy komórek. Wiele białek występujących we floemie ma zdolność otwierania kanałów transportowych plazmodesm [2,24] i przypuszcza się, że przekrój czynny plazmodesm łączących rurki sitowe i komórki towarzyszące jest stale zwiększony z normalnej wartości ok. 1 kDa do wartości 20–30 kDa [28], co umożliwiła stałą wymianę białek między komórkami. Ponadto występujące w rurkach sitowych białka opiekuńcze [44] umożliwiają zapewne przemieszczanie się białek o większych masach.

U wielu roślin, z wyjątkiem palm i traw, rurki sitowe zawierają białka fibrylarne [42,53,54]. Wiele takich białek powstaje już podczas różnicowania się elementów przewodzących. Białka te ulegają rozproszeniu i lokalizują się w warstwie przyściennej członów rurek sitowych [5]. Niektóre białka występujące w rurkach są rozpoznawane jako nierozproszone, jednak wydaje się, że powstają one jako efekt uszkodzenia rurki podczas preparatyki. Białka fibrylarne składają się głównie z dwóch typów: P-protein typu 1 (PP1) i P-protein typu 2 (PP2). Te pierwsze, to białka fibrylarne o masie ok. 96 kDa, a te drugie to dimeryczne lecytyny o masie 48 kDa. P-proteiny typu 2 łączą się z PP1 wiązaniami kowalencyjnymi i wiążą te białka fibrylarne do błony komórkowej. Mogą też unieruchamiać bakterie i grzyby zakażające miejsca zranienia. Białka floemowe PP1 i PP2 były szczególnie intensywnie badane u dyniowatych, gdyż występują w ich floemie w dużych ilościach.

Białka fibrylarne wykazują duże zróżnicowanie między grupami taksonomicznymi. W soku floemowym większości roślin białek jest mało. Obecnie istnieją już metody immunologiczne, z użyciem przeciwciał monoklonalnych wytworzonych przeciwko P-proteinom typu PP1, które ułatwiają ich lokalizację [53,54]. Przeciwciała te uzyskuje się po wstrzyknięciu myszy frakcji z kultur tkankowych *Streptanthus tortuosus* z rodziny *Brassicaceae* (*Cruciferae*). Ponieważ kultury tkankowe wielu roślin zawierają mniej lub bardziej zróżnicowany floem, można uzyskać stosunkowo dużo materiału w przypadku roślin, od których nie można uzyskać wystarczającej do analiz ilości soku floemowego. Takim sposobem otrzymano trzy przeciwciała monoklonalne przeciwko PP1. Rozpoznawały one białka floemowe w obrębie *Brassicaceae*, włączając w to *Arabidopsis*, a także blisko spokrewnioną rodzinę *Capparaceae*. Natomiast nie rozpoznawały białek floemowych dyniowatych. Jedno z przeciwciał rozpoznawało nawet białko floemowe roślin z bardziej oddalonych rodzin, np. *Euphorbiaceae* czy *Papaveraceae*, a nawet *Amarylidaceae* i *Iridaceae* z jednoliściennych. Natomiast nie stwierdzono reakcji immunologicznej w przypadku gatunków z rodziny *Poaceae*, a konkretnie traw, u których białka fibrylarne nie występują.

Przy użyciu metod immunologicznych wykazano, że wiele białek floemowych występuje w roślinach różnych, niekiedy odległych gatunków, natomiast pewne białka

są specyficzne gatunkowo. Poddając białka rozpuszczalne z soku floemowego różnych roślin reakcji immunologicznej z przeciwciałami wytworzonymi przeciw białkom z floemu rącznika – zwanymi STEP (*Sieve Tube Exudate Proteins*) oraz białkom STEP 20, o masie około 20 kDa, stwierdzono [45], że w soku floemowym, uzyskanym z tak różnych gatunków, jak: ryż, rącznik, jukka, dynia, robinia czy lipa, występują białka opiekuńcze pokrewne białku wiążącemu podjednostki RUBISCO, a ponadto cyklofilina, ubikwityna oraz białka związane z regulacją potencjału oksydo-redukcyjnego, tioredoksyna h i glutaredoksyna. Wykryto także aktyne i białko będące modulatorem polimeryzacji aktyny – profilinę. Inne białka były gatunkowo specyficzne, np. inhibitor proteiny był obecny tylko w roślinach rącznika.

Niektóre z białek stanowią konstytutywny składnik soku floemowego i są zapewne związane ze specyficznymi funkcjami rurek sitowych. W soku floemowym występują białka strukturalne albo błonowe. Co oczywiste, wśród białek lokalizowanych we floemie, znajdują się przenośniki cukrów [30]. Ich funkcje polegają na transporcie sacharozy do wnętrza kompleksu komórki towarzyszące/rurki sitowe. Być może biorą też udział w recyrkulacji wyciekającej sacharozy. Szybkość syntezy i degradacji przenośników związanych z błonami rurek sitowych jest bardzo duża, półokres życia niektórych z tych białek wynosi ok. 1 h. Dlatego mechanizm transportu przenośników i ich wbudowywania w błony musi być bardzo wydajny. Poza przenośnikami cukrów, w kompleksach komórki towarzyszące/rurki sitowe lokalizują się też inne białka błonowe, takie jak: ATP-azy [10], białka wiążące sacharozę [19] i akwaporyny [4], wszystkie związane z załadowaniem floemu. W soku floemowym znaleziono również liczne enzymy związane z metabolizmem cukrów [39,56,57]. Mogą być one zaangażowane w produkcję ATP potrzebnego do załadowania floemu i produkcji glukozy będącej prekursorem kalozy.

Innym białkiem, którego funkcje upatruje się w udroźnianiu szlaku transportowego wewnątrz rurek sitowych, jest profilina RCPRO1, wykryta w soku floemowym rącznika [46]. Profiliny biorą udział w polimeryzacji bądź depolimeryzacji aktyny fibrylnej, jest to zależne od typu komórki i obecności innych białek wiążących aktyne. Jak wcześniej wspomniano, w rurkach sitowych brak jest elementów cytoszkieletu, tzn. mikrotubul i mikrofilamentów. Mikrotubule są jeszcze obecne podczas różnicowania się rurek sitowych, lecz znikają podczas dojrzwania. W późniejszym okresie we floemie zarówno dwu-, jak i jednoliściennych brak jest tubuliny wchodzącej w skład mikrotubul. Mikrofilamenty i aktyna w postaci fibrylnej nie są wykrywane po etapie degeneracji jądra. Okazuje się jednak, że aktyna jest wciąż obecna w rurkach sitowych, zarówno rącznika jak i innych roślin dwu- i jednoliściennych. Wydaje się, że rolą profiliny, której jest 15 razy więcej w stosunku molowym niż aktyny, jest niedopuszczenie do polimeryzacji aktyny.

Niektóre białka występujące we floemie są uważane za element szlaku transdukcji sygnałów w komórce. Między innymi znaleziono kinazy białkowe zależne od wapnia [37]. Niektóre białka występują we floemie w formie ufosforylowanej, a poziom fosforylacji zależy od warunków zewnętrznych. Wykryto też białko indukowane jasmonianem [20], chociaż tego hormonu we floemie nie znaleziono. W soku floemowym występują też białka związane z ochroną roślin przed patogenami, np. inhibitory proteiny

[7]. Główną rolą takich białek, jak cystatyna, inhibitor trypsyny i innych, jest ochrona rurek sitowych przed atakiem patogenów, w szczególności przed owadami wkluwającymi się do floemu. Generalnie, rozkład białek we floemie jest zahamowany. Może to mieć znaczenie dla stabilności białek w rurkach sitowych, które są pozbawione jąder, a więc wymiana białek jest utrudniona.

Kolejna grupa białek, które występują w soku floemowym, to białka związane z regulacją potencjału oksydoredukcyjnego i usuwające wolne rodniki. Białka takie są konieczne do funkcjonowania wszystkich komórek, ponieważ wolne rodniki mogłyby uszkadzać struktury komórkowe. Znalaziono trzy białka o takim charakterze. Są to tioredoksyna h, glutaredoksyna i reduktaza glutationu [45]. Tioredoksyna h jest białkiem o masie 13 kDa, o charakterze cytoplazmatycznej oksydoreduktazy. Natomiast glutaredoksyna ma masę 11 kDa i jest reduktazą tiolową zależną od glutationu. Jak stwierdzono w badaniach immunologicznych, tioredoksyna h występuje w wielu roślinach jedno- i dwuliściennych. Szczególnie dobrze zbadano ją u ryżu [24,25]. Przypuszcza się, że może ona brać udział w różnicowaniu systemu przewodzącego w korzeniach, szczególnie w warunkach anaerobiozy.

Osobnym problemem jest, czy białka wykrywane w rurkach sitowych są przypisane do jednego miejsca czy przemieszczają się na większe odległości. Odpowiedź na takie pytanie znaleziono w doświadczeniach, w których szczepiono tzw. zrazy z roślin, w których nie występują dane białka, na takich, w których one występują. Po czasie potrzebnym do wytworzenia nowych wiązek przewodzących, co jest warunkiem udanego szczepienia, we floemie zrazu znajdowano białka podkładki. W ten sposób wykazano, że transportowi dalekodystansowemu ulegają P-proteiny typu PP1 i PP2 [17,18]. Możliwe, że formą transportową są w tym przypadku podjednostki tych białek. Przypuszcza się, że czynnikiem powodującym łączenie podjednostek, a także białek między sobą jest stan oksydoredukcyjny soku floemowego. W razie stresu związanego ze zranieniem, następowałoby blokowanie płytek sitowych przez fibrylarne białka floemowe.

W podobny sposób udowodniono transport floemowy białka CmPP16 [63]. Jest ono normalnie lokalizowane w komórkach floemu dyni i występuje w zasadzie we wszystkich organach rośliny. Jak wykazano, zwiększa ono przekrój czynny plazmodesm, co umożliwia nie tylko jego transport, ale także transport innych związków wielkocząsteczkowych, w tym i RNA. Białko CmPP16 jest o tyle interesujące, że wydaje się być spokrewnione z białkiem transportowym (*movement protein*) wirusa mozaiki nekrotycznej koniczyny, wiąże RNA niezależnie od sekwencji i przenosi go przez plazmodesmy. Podobne własności, jak białko CmPP16, tzn. zdolność do współdziałania z kanałami transportowymi plazmodesm, mają inne białka floemowe.

Wiele roślin ma białka będące odpowiednikami CmPP16, ich wspólną cechą jest umożliwianie transportu mRNA nie tylko przez plazmodesmy, ale i w rurkach sitowych. mRNA przemieszczane na większe odległości może być związane z funkcjonowaniem floemu bądź całej rośliny. Takie mRNA może być zaangażowane w obronę przed wirusami w drodze tzw. post-transkrypcyjnego wyciszania genów (PTGS) [8,32]. Zachodzi to wtedy, gdy RNA wyciszonego genu nie ulega akumulacji, nawet gdy zaszła

transkrypcja. Wirusy stanowią rodzaj kompleksu nukleoproteinowego mającego zdolność przemieszczania się najpierw przez plazmodesmy, a później przez floem. Pewne białka osłonki niektórych wirusów mają zdolność otwierania kanałów transportowych plazmodesm, co umożliwia im transport międzykomórkowy. Tą samą drogą są przemieszczane czynniki zaangażowane w obronę przed wirusami, jak się sądzi, jest to dwuniciowe RNA. Powstanie tych czynników może być indukowane nie tylko przez wirusy, ale też przez każde egzogenne RNA, np. powstające w roślinach transgenicznych.

Floem stanowi drogę przemieszczania różnych związków wielkocząsteczkowych, w tym białek zupełnie obcych dla rośliny. Wykazano to przy wykorzystaniu białka GFP (*Green Fluorescent Protein*) [23]. Gen kodujący to białko został wbudowany do genomu *Arabidopsis* i tytoniu pod kontrolą promotora *AtSUC2*. W roślinach typu dzikiego, promotor ten reguluje ekspresję przenośnika sacharozy specyficznego dla komórek towarzyszących. Stwierdzono, że GFP syntetyzowane w komórkach towarzyszących ma zdolność przemieszczenia się do rurek sitowych przez łączące je plazmodesmy, a następnie wraz z prądem asymilatów wędruje do różnych akceptorów, takich jak: ogonki liściowe, wierzchołki wzrostu korzeni, kwiaty czy młode liście. Fakt, że GFP opuszcza floem w akceptorach, wskazuje, że floem może być też drogą transportową dla białek syntetyzowanych w jednych organach i wykorzystywanych w innych organach. Trzeba jednak pamiętać, że GFP, jako białko egzogenne, może nie być zatrzymywane we floemie. Wiele białek endogennych, o mniejszej masie, z floemu nie wycieka. Może to być tłumaczone jedynie istnieniem jakiegoś mechanizmu ograniczającego wyciek niskocząsteczkowych białek endogennych z floemu.

Białka znajdowane w soku floemowym i ich transport wciąż stanowią problem badawczy, a wiele zjawisk i procesów z nimi związanych pozostaje nierozwiązane. W szczególności dotyczy to funkcji wielu białek obecnych we floemie, mechanizmów ich transportu z komórek towarzyszących do rurek sitowych i z powrotem, a także mechanizmu transportu dalekodystansowego. Nie jest jasne, dlaczego część białek jest usuwana z floemu, a część nie, a także dlaczego większość badanych białek floemowych ma zdolność otwierania kanałów transportowych plazmodesm. Być może jest to spowodowane koniecznością ciągłej wymiany związków wielkocząsteczkowych między rurkami sitowymi a komórkami towarzyszącymi.

MECHANIZM TRANSPORTU – TERAŹNIEJSZOŚĆ I PRZESZŁOŚĆ

Badania dotyczące transportu w roślinach są niewiele późniejsze niż u zwierząt [61]. Pierwszym badaczem translokacji w roślinach był Malpighi, który w końcu XVII wieku przeniósł na te organizmy odkrycia związane z przepływem krwi dokonane przez Harveya. Początkowe badania były związane z transportem ksylemowym. Transport floemowy został odkryty na początku XVIII wieku przez Magnola. Jego znaczenie zostało jednak docenione dopiero wraz z odkryciem przez de Saussure w

1804 roku asymilacji CO_2 . Konsekwencją tego odkrycia było stwierdzenie ruchu węglowodanów z fotosyntetyzujących liści wzdłuż łodyg i ich gromadzenie w postaci skrobi. W tym samym czasie odkryto ważne dla transportu zjawiska dyfuzji i osmozy. Szczególny postęp miał miejsce w połowie XIX wieku wraz z odkryciem rurek sitowych przez Hartiga, który badał też wydzielanie soku z ksylemu i floemu, a także opisał cyrkulację tych mediów w roślinie. Wykazał też znaczenie gromadzenia materiałów zapasowych w łodydze dla wzrostu rośliny w następnych latach. W XIX wieku powstało też wiele teorii dotyczących transportu. Co się tyczy transportu we floemie, przez długi czas uważano, że asymilaty rozprzestrzeniają się w roślinie dzięki dyfuzji.

Na początku XX wieku wiedzano już, że węglowodany są transportowane z liści rurkami sitowymi. Stwierdzono także, że eksudaty soku floemowego uzyskane po nacięciu floemu zawierają 10 do 30% cukrów. Rozpoczęto wtedy też prace eksperymentalne nad transportem asymilatów. Pod koniec lat 20 XX wieku powstała teoria przepływu masowego Müncha [36], która zakładała, że transport soku floemowego w rurkach sitowych jest bierny i zachodzi w wyniku istnienia różnicy ciśnienia hydrostatycznego wzdłuż szlaku transportowego.

Teoria ta, mimo że powstała tak dawno, dopiero ostatnio została zaakceptowana przez większość badaczy. Głównym powodem jej kwestionowania było stwierdzenie, że pory w płytkach sitowych oglądane pod mikroskopem zawierały materiał cytoplazmatyczny, co wykluczało możliwość biernego transportu. Dopiero niedawno stwierdzono, iż w dobrze utrwalonych preparatach wszystkie pory są czyste i nie zawierają okluzji [11]. Wydaje się więc, że wcześniejsza dyskusja była spowodowana obecnością artefaktów na źle utrwalonych preparatach. Przy założeniu braku oporów związanych z płytkami sitowymi modele matematyczne odnoszące się do ruchu soku floemowego są zgodne z teorią Müncha [22].

Większość teorii tworzonych w XX wieku dotyczących transportu w rurkach sitowych zakładała aktywny mechanizm. Założenie to było oparte na obserwacji włókien występujących wzdłuż rurek sitowych. Przechodzić miały one przez pory w płytkach sitowych. W nich miał też występować materiał zatykający pory. Uniemożliwiałoby to transport bierny. Dodatkowym czynnikiem była niewiara, że tak szybki i intensywny proces jak translokacja może być procesem biernym. Już bardzo wcześnie zdano sobie bowiem sprawę, że intensywność pewnych procesów transportowych może być bardzo duża. Więcej niż 100 lat temu wiedzano np., że pewne palmy przez 50 lat gromadzą węglowodany w pniu, aby następnie w ciągu zaledwie roku przetransportować 600 kg cukrów do tworzących się owoców [61]. Dlatego szukano aktywnych mechanizmów translokacji asymilatów w rurkach sitowych.

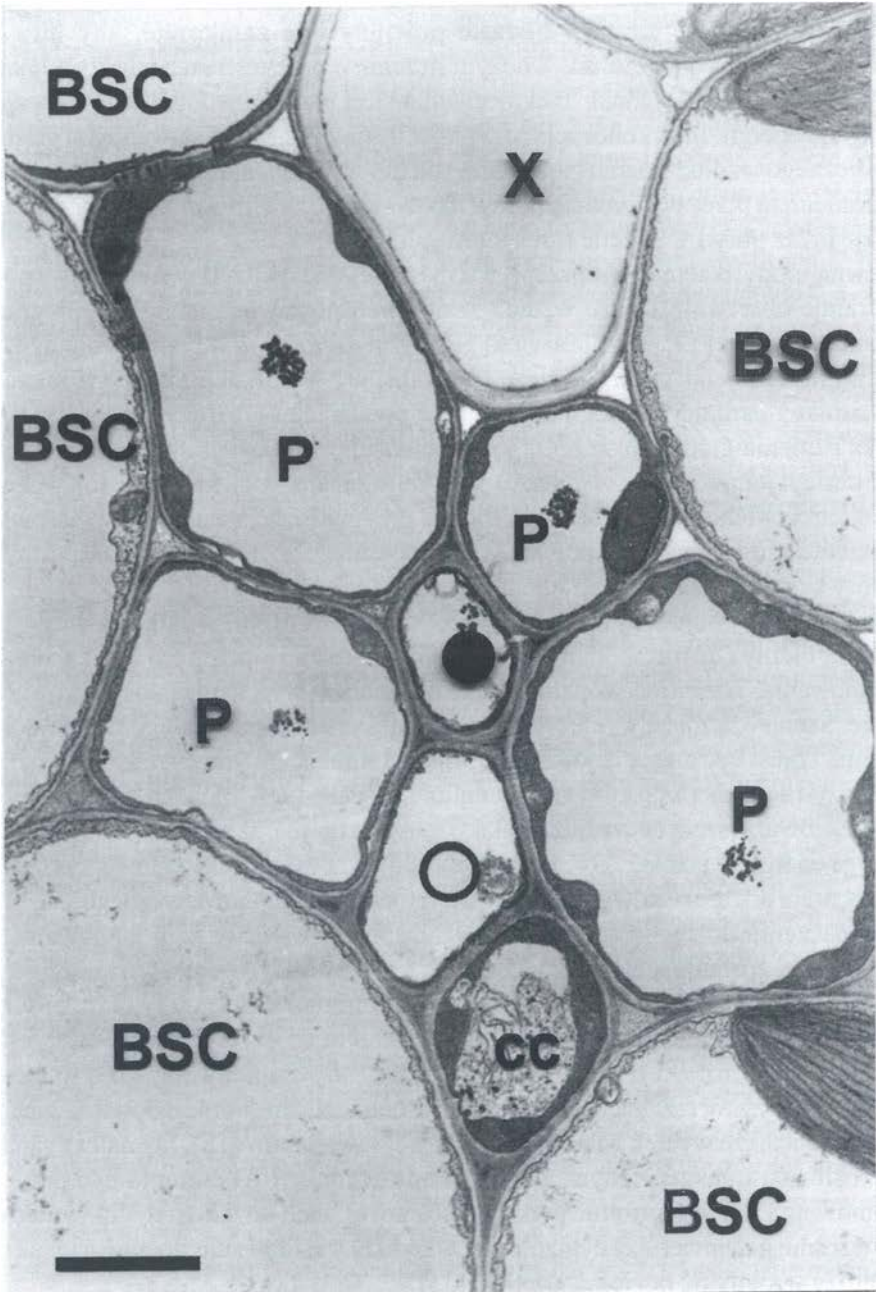
Zakładano między innymi, że mechanizmem napędzającym translokację może być kurczenie się i rozkurczanie włókien białkowych [9]. Przepływ we floemie mógłby być wywoływany falami perystaltycznymi lub rodzajem wirów. Część koncepcji zakładała udział zjawisk elektrycznych różnego typu, szczególnie elektroosmozy [52]. Przepływ elektroosmotyczny w rurkach sitowych jest w założeniu bardzo podobny do przepływu pod ciśnieniem, przy czym zamiast gradientu ciśnienia hydrostatycznego, transport jest napędzany przez gradient potencjału elektrycznego. Jednak w przypadku

elektroosmozy, pory zamiast otwarte powinny być zamknięte, aby utrzymać hydratowane jony jednego znaku w dużym stężeniu w przestrzeniach między włóknami. Od strony teoretycznej jednak, taki mechanizm jest mało prawdopodobny ze względu na zużycie energii. Inna koncepcja przyjmowała natomiast powstawanie fal gradientu elektrycznego wzdłuż floemu napędzających lub wspomagających przepływ masowy pod ciśnieniem przez udrażnianie porów lub tworzenie zawirowań, co ma przyspieszać dyfuzję przez pory i w świetle rurek sitowych [21].

Pewną modyfikacją teorii przepływu masowego jest udział w nim jonów potasu. Generalnie obserwuje się, że wzdłuż szlaku transportowego istnieje duży gradient stężenia tego jonu [59]. Jony potasu są głównym *osmoticum* w roślinie, dlatego Lang [31] wysunął 20 lat temu hipotezę, że transport w rurkach sitowych może być uruchamiany bardziej przez gradient jonów potasu niż sacharozy. Za taką hipotezą, oprócz istnienia gradientu stężenia jonów potasu, przemawia kilka argumentów, np. to, że deficyt jonów potasu w podłożu powoduje zahamowanie translokacji wcześniej niż jakichkolwiek innych procesów. Można przypuszczać, że przepływ masowy jest wynikiem istnienia gradientu potencjału osmotycznego wzdłuż szlaku transportowego, na który składa się zarówno gradient sacharozy, jak i potasu.

Obecnie przyjmuje się już dość powszechnie, że transport w rurkach sitowych ma charakter bierny i od metabolizmu zależy tylko pośrednio – przez procesy załadowania i rozładowania. Trzeba jednak pamiętać, że metabolizm wspomaga transport również po drodze. Sacharoza może wyciekać z rurek pod wpływem panującego tam wysokiego ciśnienia i musi być ciągle ładowana do wnętrza rurek sitowych. Przenośniki białkowe sacharozy i innych związków, np. mannitolu, występują w błonach rurek sitowych i komórek towarzyszących wzdłuż szlaku. Transport ten jest aktywny, w związku z czym wymaga energii w postaci ATP. Jest ona uzyskiwana w komórkach towarzyszących, a ATP wędruje do rurek sitowych z udziałem retikulum endoplazmatycznego.

O znaczeniu dostępności energii dla transportu świadczy jego hamowanie, gdy zahamowany zostanie metabolizm komórek towarzyszących. Po wprowadzeniu genu kodującego fosforylazę z *E. coli* pod kontrolą promotora rol C do tytoniu, obserwuje się silne zahamowanie rozkładu sacharozy i glikolizy, co jest wynikiem przyspieszenia hydrolizy PP_i . Pirofosforan jest normalnie potrzebny dla konwersji UDP-glukozy w fosforan glukozy. W rezultacie zaobserwowano silne zahamowanie ładowania sacharozy do floemu, a także wyciek znacznych ilości węglowodanów [16]. Jak należy sądzić, w tych roślinach transgenicznych zahamowanie produkcji ATP mogło być przyczyną zahamowania funkcjonowania pompy protonowej. Jeśli do takich roślin wbudowano jednocześnie gen inwertazy cytozolowej z drożdży, załadowanie floemu, a także straty sacharozy wróciły do poziomu kontroli [33].



RYCINA 1. Przekrój poprzeczny przez małą wiązkę przewodzącą w liściu kukurydzy, w małych i średnich wiązkach przewodzących traw wyróżnia się dwa typy rurek sitowych: cienkościenne (O) z przylegającymi do nich komórkami towarzyszącymi (cc) z reguły mniejszymi niż u dwuliściennych oraz grubościenne (●) bez komórek towarzyszących, ale połączone plazmodesmami z sąsiednimi komórkami parenchymy wiązkowej (P), na przekroju widoczne są również naczynia ksylemu (X) przewodzące wodę oraz komórki pochwę wiązkowych (BSC), znacznik – 2 μ m

ZAKOŃCZENIE

Rurki sitowe stanowią efekt skrajnej specjalizacji. Składają się na to przystosowania ultrastrukturalne, liczne mechanizmy zabezpieczające przed wyciekami soku floemowego, a także przed atakiem patogenów. Dzięki temu rurki sitowe mogą pełnić swoje funkcje związane z wydajnym transportem substancji odżywczych. Jednocześnie coraz silniej uwidacznia się inna rola rurek sitowych, a mianowicie drogi, którą przemieszczane są również związki wielkocząsteczkowe, takie jak białka i kwasy nukleinowe, pełniące funkcje regulacyjne, sygnałowe i odpornościowe. Ponadto, rurki sitowe mogą przenosić sygnały o charakterze biofizycznym, takie jak falę potencjału pobudzenia [15] i falę ciśnienia hydrostatycznego [49]. Z tego powodu rurki sitowe roślin można uznać za odpowiednik systemów krążenia, wydalniczego, limfatycznego i nerwowego u zwierząt.

LITERATURA

- [1] ATKINS CA. Spontaneous phloem exudation accompanying abscission in *Lupinus mutabilis* (Sweet). *J Exp Bot* 1999; **50**: 805–812.
- [2] BALACHANDRAN S, XIANG Y, SCHOBERT C, THOMPSON G, LUCAS WJ. Phloem sap proteins from *Cucurbita maxima* and *Ricinus communis* have the capacity to traffic cell to cell through plasmodesmata. *Proc Nat Acad Sci USA* 1997; **94**: 14150–14155.
- [3] BAKER DA. Vascular transport of auxins and cytokinins in *Ricinus*. *Plant Growth Reg* 2000; **32**: 157–160.
- [4] BARRIEU F, CHAUMONT F, CHRISPEELS MJ. High expression of the tonoplast aquaporin *ZmTIP1* in epidermal and conducting tissues of maize. *Plant Physiol* 1998; **117**: 1153–1163.
- [5] BEHNKE H-D. Distribution and evolution of forms and types of sieve-element plastids in the dicotyledons. *Aliso* 1991; **13**: 167–182.
- [6] CANNY MJP. Phloem translocation. Cambridge Univ. Press. 1973: 301.
- [7] CHRISTELLER JT, FARLEY PC, RAMSAY RJ, SULLIVAN PA, LAING WA. Purification, characterization and cloning of an aspartic proteinase inhibitor from squash phloem exudate. *Eur J Bioch* 1998; **254**: 160–167.
- [8] CITOVSKY V, ZAMBRYSKI P. Systemic transport of RNA in plants. *Trends in Plant Sci* 2000; **5**: 52–54.
- [9] CRONSHAW J. Phloem structure and function. *Ann Rev Plant Physiol* 1981; **32**: 465–484.
- [10] DEWITT ND, SUSSMAN MR. Immunocytological localisation of an epitope-tagged plasma membrane proton pump (H^+ -ATPase) in phloem companion cells. *The Plant Cell* 1995; **7**: 2053–2067.
- [11] EHLERS K, KNOBLAUCH M, VAN BEL AJE. Ultrastructural features of well-preserved and injured sieve elements: minute clamps keep the phloem transport conduits free for mass flow. *Protoplasma* 2000; **214**: 80–92.
- [12] ELEFTHERIOU EP. Monocotyledons. [w] Behnke H-D, Sjölund RD [red.] Sieve elements. Comparative structure, induction and development. Berlin, Springer-Verlag, 1990: 139–159.
- [13] EVERT RF. Seedless vascular plants. [w] Behnke H-D, Sjölund RD [red.] Sieve elements. Comparative structure, induction and development. Berlin, Springer-Verlag, 1990: 35–62.
- [14] EVERT RF. Dicotyledons. [w] Behnke H-D, Sjölund RD [red.] Sieve elements. Comparative structure, induction and development. Berlin, Springer-Verlag, 1990: pp. 103–137.
- [15] FROMM J. Control of phloem unloading by action potentials in *Mimosa*. *Physiol Plant* 1991; **83**: 529–533.
- [16] GEIGENBERGER P, LERCHL J, STITT M, SONNEWALD U. Phloem-specific expression of pyrophosphatase inhibits long-distance transport of carbohydrates and amino acids in tobacco plants. *Plant Cell Environ* 1996; **19**: 43–55.
- [17] GOLECKI B, SCHULZ A, CARSTENS-BEHRENS U, KOLLMANN R. Evidence for graft transmission of structural phloem proteins or their precursors in heterografts of *Cucurbitaceae*. *Planta* 1998; **206**: 630–640.

- [18] GOLECKI B, SCHULZ A, THOMPSON GA. Translocation of structural P proteins in the phloem. *Plant Cell* 1999; **11**: 127–140.
- [19] GRIMES HD, OVERVOORDE PJ, RIPP K, FRANCESCHI VR, HITZ WD. A 62-kD sucrose binding protein is expressed and localized in tissues actively engaged in sucrose transport. *The Plant Cell* 1992; **4**: 1561–1574.
- [20] HAUSE B, DEMUS U, TEICHMANN C, PARTHIER B, WASTERNAK C. Developmental and tissue-specific expression of JIP-23, a jasmonate-inducible protein of barley. *Plant Cell Physiol* 1996; **37**: 641–649.
- [21] HEJNOWICZ Z. Propagated disturbances of transverse potential gradient in intracellular fibrils as the source of motive forces for longitudinal transport in cells. *Protoplasma* 1970; **71**: 343–364.
- [22] HENTON SM, GREAVES AJ, PILLER GJ, MINCHIN PEH. Revisiting the Münch pressure-flow hypothesis for long-distance transport of carbohydrates: modelling the dynamics of solute transport inside a semi-permeable tube. *J Exp Bot* 2002; **53**: 1411–1419.
- [23] IMLAU A, TRUERNIT E, SAUER N. Cell-to cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *Plant Cell* 1999; **11**: 309–322.
- [24] ISHIWATARI Y, FUJIWARA T, MCFARLAND KC, NEMOTO K, HAYASHI H, CHINO M, LUCAS WJ. Rice phloem thioredoxin h has the capacity to mediate its own cell-to-cell transport through plasmodesmata. *Planta* 1998; **205**: 12–22.
- [25] ISHIWATARI Y, NEMOTO K, FUJIWARA T, CHINO M, HAYASHI H. *In situ* hybridization study of the rice phloem thioredoxin h mRNA accumulation – possible involvement in the differentiation of vascular tissues. *Physiol Plant* 2000; **109**: 90–96.
- [26] JAHNKE S, SCHLESINGER U, FEIGE GB, KNUST EJ. Transport of photoassimilates in young trees of *Fraxinus* and *Sorbus*: Measurement of translocation *in vivo*. *Bot Acta* 1998; **111**: 307–315.
- [27] KALLARACKAL J, MILBURN JA. Studies on the phloem sealing mechanism in *Ricinus communis* var. *gibsonii* fruit stalks. *Aust J Plant Physiol* 1983; **10**: 561–568.
- [28] KEMPERS R, VAN BEL AJE. Symplasmic connections between sieve element and companion cell in the stem phloem of *Vicia faba* L. have a molecular exclusion limit of at least 10 kDa. *Planta* 1997; **201**: 195–201.
- [29] KNOBLAUCH M, VAN BEL AJE. Sieve tubes in action. *The Plant Cell* 1998; **10**: 35–50.
- [30] KÜHN C, FRANCESCHI VR, SCHULZ A, LEMOINE R, FROMMER WB. Macromolecular trafficking indicated by localisation and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. *Science* 1997; **275**: 1298–1300.
- [31] LANG A. Turgor-regulated translocation. *Plant Cell Environ* 1983; **6**: 683–689.
- [32] LEHMANN P. Wyciszenie RNA: Naturalny system obronny roślin przeciw infekcji wirusowej. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 75–86.
- [33] LERCHL J, GEIGENBERGER P, STITT M, SONNEWALD U. Impaired photoassimilate partitioning caused by phloem-specific removal of pyrophosphate can be complemented by a phloem-specific cytosolic yeast-derived invertase in transgenic plants. *Plant Cell* 1995; **7**: 259–270.
- [34] MACROBBIE EAC. Phloem translocation. Facts and mechanisms: a comparative survey. *Biol Rev Cambridge Philos Soc* 1971; **46**: 429–481.
- [35] MARENTS E, GRUSAK MA. Mass determination of low-molecular-weight proteins in phloem sap using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Exp Bot* 1998; **49**: 903–911.
- [36] MÜNCH E. Die Stoffbewegungen in der Pflanze. Jena, Gustav Fischer. 1930.
- [37] NAKAMURA S, HAYASHI H, MORI S, CHINO M. Protein phosphorylation in the sieve tubes of rice plants. *Plant Cell Physiol* 1993; **34**: 927–933.
- [38] NOIRAUD N, MAUROUSSET L, LEMOINE R. Transport of polyols in higher plants. *Plant Physiol Biochem* 2001; **39**: 717–728.
- [39] NOLTE KD, KOCH KE. Companion-cell specific localisation of sucrose synthase in zones of phloem loading and unloading. *Plant Physiol* 1993; **101**: 899–905.
- [40] OPARKA KJ, TURGEON R. Sieve elements and companion cells – traffic control centres of the phloem. *Plant Cell* 1999; **11**: 739–750.
- [41] ROKITTA M, PEUKE AD., ZIMMERMANN U, HAASE A. Dynamic studies of phloem and xylem flow in fully differentiated plants by fast nuclear-magnetic-resonance microimaging. *Protoplasma* 1999; **209**: 126–131.

- [42] SAKUTH T, SCHOBERT C, PECSVARADI A, EICHHOLZ A, KOMOR E, ORLICH G. Specific proteins in the sieve-tube exudate of *Ricinus communis* L. seedlings: separation, characterization and *in vivo* labelling. *Planta* 1993; **191**: 207–213.
- [43] SCHEIRER DC. Mosses. [w] Behnke H-D, Sjölund RD [red.] Sieve elements. Comparative structure, induction and development. Berlin, Springer-Verlag, 1990: pp. 19–33.
- [44] SCHOBERT C, GROßMANN P, GOTTSCHALK M, KOMOR E, PECSEVARDI A, NIEDEN UZ. Sieve-tube exudate from *Ricinus communis* L. seedlings contains ubiquitin chaperones. *Planta* 1995; **196**: 205–210.
- [45] SCHOBERT C, BAKER L, SZEDERKÉNYI J, GROßMANN P, KOMOR E, HAYASHI H, CHINO M, LUCAS WJ. Identification of immunologically related proteins in sieve-tubes exudate collected from monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Planta* 1998; **206**: 245–252.
- [46] SCHOBERT C, GOTTSCHALK M, KOVAR DR, STAIGER CJ, YOO B-C, LUCAS WJ. Characterization of *Ricinus communis* phloem profilin, RcPRO1. *Plant Mol Biol* 2000; **42**: 719–730.
- [47] SCHULZ A. Conifers. [w] Behnke H-D, Sjölund RD [red.] Sieve elements. Comparative structure, induction and development. Berlin, Springer-Verlag, 1990: 63–88.
- [48] SJÖLUND RD. The phloem sieve element: a river runs through it. *The Plant Cell* 1997; **9**: 1137–1146.
- [49] SMITH JAC, MILBURN JA. 1980. Water stress and phloem loading. *Ber Deutsch Bot Ges* **93**: 269–280.
- [50] SOWIŃSKI P. Ultrastruktura wiązek przewodzących w liściu oraz załadowanie floemu a ewolucja roślin okrytonasiennych. *Wiad Bot* 2003; (w druku).
- [51] SOWIŃSKI P, RICHNER W, SOLDATI A, STAMP P. 1998. Assimilate transport in maize (*Zea mays* L.) seedlings at vertical low temperature gradients in the root zone. *J Exp Bot* **49**: 747–752.
- [52] SPANNER DC. The electroosmotic theory of phloem transport: a final restatement. *Plant Cell Environ* 1979; **2**: 107–121.
- [53] TÓTH KF, WANG Q, SJÖLUND RD. Monoclonal antibodies against phloem p-protein from plant tissue cultures I. Microscopy and biochemical analysis. *Am J Bot* 1994; **81**: 1370–1377.
- [54] TÓTH KF, SJÖLUND RD. Monoclonal antibodies against phloem p-protein from plant tissue cultures II. Taxonomic distribution of cross-reactivity. *Am J Bot* 1994; **81**: 1378–1383.
- [55] TURGEON R., MEDVILLE R. The absence of phloem loading in willow leaves. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 12055–12060.
- [56] WANG Q, MONROE J, SJÖLUND RD. Identification and characterization of a phloem-specific β -amylase. *Plant Physiol* 1995; **109**: 743–750.
- [57] WANG Q, KUO L, SJÖLUND RD, SHIH M-C. Immunolocalization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* 1997; **198**: 155–162.
- [58] VOLK GM., FRANCESCHI VR. Localization of a calcium channel-like protein in the sieve element plasma membrane. *Aust J Plant Physiol* 2000; **27**: 779–786.
- [59] VREUGDENHIL D. Source-to-sink gradient of potassium in the phloem. *Planta* 1985; **163**: 238–240.
- [60] ZHONG W, HARTUNG W, KOMOR E, SCHOBERT C. Phloem transport of abscisic acid in *Ricinus communis* L. seedlings. *Plant Cell Environ* 1996; **19**: 471–477.
- [61] ZIMMERMAN MH. Long distance transport. *Plant Physiol* 1974; **54**: 472–479.
- [62] ZIMMERMAN MH, ZIEGLER H. List of sugars and sugar alcohols in sieve-tubes exudates. [w] Zimmerman MH, Milburn JA [red.] Encyclopedia of Plant Physiology, vol. 1. Transport in Plants, New York, Springer-Verlag, 1978: 480–503.
- [63] XOCONOSTLE-CÁZARES B, XIANG Y, RUIZ-MEDRANO R, WANG H-L, MONZER J, YOO B-C, MCFARLAND KC, FRANCESCHI VR, LUCAS WJ. Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. *Science* 1999; **283**: 94–98.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 12.02.2003 r.

Przyjęto: 12.05.2003 r.

Adres autora: 02-096 Warszawa, Miecznikowa 1

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

NIESTABILNOŚĆ GENETYCZNA W NOWOTWORACH. II. NIESTABILNOŚĆ MIKROSATELITARNA I UTRATA HETEROZYGOTYCZNOŚCI

GENETIC INSTABILITY IN CANCER. II. MICROSATELLITE INSTABILITY AND LOSS OF HETEROZYGOSITY

Agnieszka STEMBAŁSKA-KOZŁOWSKA¹, Robert ŚMIGIEL²,
Kamila SCHLADE-BARTUSIAK¹, Danuta DUŚ³, Maria SAŚIADEK¹

¹Zakład Genetyki AM, ²Katedra Patofizjologii AM,
³Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu

Streszczenie: Niestabilność genetyczna jest jedną z najbardziej charakterystycznych cech komórek nowotworowych. Wyraża się nagromadzeniem w komórce aberracji chromosomowych i mutacji, a także niestabilnością mikrosatelitarną i utratą heterozygotyczności. Niestabilność mikrosatelitarna (MSI) jest cechą fenotypu mutatorowego. Występuje w nowotworach dziedzicznych i sporadycznych, choć z różną częstością. MSI polega na zmianie długości (wielkości) alleli na skutek zwiększenia lub zmniejszenia liczby powtórzeń nukleotydowych. Utrata heterozygotyczności (LOH) oznacza delecję jednego z dwóch alleli tego samego genu, prowadzącą do jego hemizygotyczności. MSI i LOH są obserwowane zarówno we wczesnych, jak i późnych stadiach karcinogenezy. W pracy omówiono znaczenie MSI i LOH w transformacji nowotworowej oraz metody ich diagnozowania.

Słowa kluczowe: niestabilność genetyczna, niestabilność mikrosatelitarna (MSI), utrata heterozygotyczności (LOH), nowotwór.

Summary: Genomic instability is one of the main features of cancer cells. It is expressed by the accumulation of chromosomal aberrations and mutations in cancer cell, but also by microsatellite instability (MSI) and loss of heterozygosity (LOH). MSI means a change in the length (size) of one out of two alleles in a given locus, caused by an increase or decrease in the number of microsatellite repeats. MSI results in mutator phenotype and is observed in both, sporadic and familial cancers, however with the variable frequency. LOH is caused by a deletion of one of the gene alleles, and leads to hemizygoty. MSI and LOH are observed in early as well as in late stages of the neoplastic transformation process. The implications of MSI and LOH for the carcinogenesis as well as methods of their diagnosis are presented in the review.

Key words: genomic instability, microsatellite instability (MSI), loss of heterozygosity (LOH), cancer.

Niestabilność genetyczna, wyrażająca się nagromadzeniem w komórkach aberracji chromosomowych i/lub molekularnych, jest jedną z podstawowych cech nowotworów [22, 26, 54, 57].

Obecnie dyskutowane są dwie główne teorie tłumaczące znaczenie niestabilności genetycznej w etiologii nowotworów. Według jednej, niestabilność genetyczna jest podstawową cechą warunkującą transformację nowotworową, gdyż umożliwia kumulacje kolejnych zmian genetycznych w pojedynczych komórkach. Mutacje spontaniczne w komórkach prawidłowych zachodzą rzadko, tzn. z częstością około $1,4 \times 10^{-10}$ mutacji na parę zasad, w jednym cyklu replikacji. Oznacza to, że bez wystąpienia dodatkowych mechanizmów sprzyjających zwiększeniu liczby mutacji w komórkach, czyli niestabilności genetycznej, nie byłaby możliwa transformacja nowotworowa [37]. Druga teoria opiera się na założeniu, że proces karcinogenezy może zostać zapoczątkowany w komórkach o prawidłowej stabilności genetycznej drogą nabycia przez komórki zwiększonego potencjału proliferacyjnego. W trakcie podziałów komórki tracą stabilność genetyczną, co sprzyja dalszym etapom transformacji [11].

Do wystąpienia niestabilności genetycznej i kumulacji zmian genetycznych w komórkach może prowadzić utrata funkcji genów:

- i) z grupy *caretakers*, kodujących białka biorące udział w naprawie DNA [5, 12],
- ii) z grupy *gatekeepers*, kontrolujących przejście komórki w kolejne fazy cyklu podziałowego (G1/S; G2/M) [3, 49],
- iii) kontrolujących proces mitozy (ang. *mitotic checkpoint*) [21].

Niezależnie od tego, czy niestabilność genetyczna jest zjawiskiem pierwotnym czy wtórnym w transformacji nowotworowej, prowadzi do kumulacji w komórce aberracji chromosomowych, mutacji lub/i wystąpienia niestabilności mikrosatelitarnej.

Niestabilność chromosomowa i jej rola w procesie transformacji nowotworowej została opisana przez Autorów w części pierwszej niniejszego artykułu pt. „Niestabilność chromosomowa w nowotworach” [52].

NIESTABILNOŚĆ MIKROSATELITARNA

Mikrosatelity są to krótkie sekwencje DNA, które składają się z powtarzających się 1–6-nukleotydomowych motywów (mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, sextanukleotydomowych). Sekwencje mikrosatelitarne są równomiernie rozmieszczone w genomie zarówno w obszarach kodujących, jak i niekodujących [2]. Stabilność sekwencji mikrosatelitarnych jest kontrolowana przez system naprawy DNA. Grupa genów kodujących białka naprawy DNA, które rozpoznają błędnie dobrane zasady, wycinają je i wymieniają na właściwe nukleotydy, została nazwana systemem usuwania błędnie sparowanych zasad (ang. *Mismatch Repair*; MMR) [4, 25]. Do tej pory poznano kilka genów, zwanych mutatorowymi, które kodują białka usuwające błędnie sparowane zasady (*MLH1* 3p31; *MSH2* 2p21-22; *MSH6* 2p16; *PMS2* 7p22; *PMS1* 2q31-33; *MLH3* 14q24.3) [18, 54]. Mutacje inaktywujące w genach MMR powodują utratę lub obniżenie sprawności

naprawy błędów powstałych w procesie replikacji DNA. W efekcie kolejne mutacje, polegające na zmianie długości (wielkości) alleli na skutek zwiększenia lub zmniejszenia liczby powtórzeń nukleotydowych, zachodzą od 100 do 1000 razy częściej niż w komórkach mających sprawny system MMR i dotyczą różnych genów, również krytycznych dla transformacji nowotworowej [54]. Zjawisko to jest określane jako niestabilność mikrosatelitarna (ang. *Microsatellite Instability*; MSI). MSI warunkuje powstanie tzw. fenotypu mutatorowego (ang. *Replication Error Phenotype*; RER). Nowotwory, w których stwierdzono niestabilność mikrosatelitarną, są klasyfikowane jako RER+.

Niestabilność mikrosatelitarna i fenotyp mutatorowy zostały po raz pierwszy opisane w dziedzicznym niepolipowatym raku jelita grubego (ang. *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*; HNPCC). Fenotyp RER+ jest obserwowany u prawie 92% pacjentów z HNPCC i u około 15% chorych ze sporadycznym rakiem jelita grubego [14, 51]. Niestabilność mikrosatelitarna jest stwierdzana, z mniejszą częstością (2–60%), również w innych nowotworach zarówno dziedzicznych, jak i sporadycznych. Rozróżnia się dwie grupy nowotworów, które wykazują podwyższoną częstość występowania MSI:

- Większość nowotworów należących do tzw. „spektrum HNPCC” (zespoły: Lynch I, Lynch II, Muir-Torre): raki jelita grubego, endometrium, jajnika, jelita cienkiego, żołądka, dróg żółciowych, gruczołu łojowego, rak podstawnokomórkowy skóry, charakteryzuje się fenotypem MSI podobnym do występującego w HNPCC i wykazuje niestabilność w markerach mono- i dinukleotydowych [29].
- Raki piersi, płuc, skóry, pęcherza moczowego, głowy i szyi oraz mięsaki wykazują MSI tylko w niektórych powtórzeniach nukleotydowych [46].

Ocena występowania fenotypu RER+ (niestabilność mikrosatelitarna) ma istotne znaczenie w molekularnej patologii nowotworów i praktyce klinicznej. Według Chiaravalli i wsp. [13] fenotypy MSI i MSS charakteryzują dwie różne drogi w karcinogenezie. Tę teorię potwierdzają obserwacje Lynch i de la Chapelle [39], którzy uważają, że dziedziczne raki jelita grubego można podzielić na dwie grupy:

- 1) guzy, które wykazują MSI (jak HNPCC), częściej rozwijają się w prawej okrężnicy, mają diploidalne DNA oraz charakterystyczne mutacje TGF β RII i BAX, rosną powoli,
- 2) guzy, wykazujące MSS oraz niestabilność chromosomową (jak FAP – rodzinna polipowatość jelit), mające tendencję do zajmowania lewej strony okrężnicy, charakteryzują się aneupoidalnym DNA i mutacjami takich genów, jak: K-ras, APC i P53, rozwijają się agresywnie].

Ocenę MSI wykorzystuje się do diagnostyki i określenia rokowania m.in. w raku jelita grubego. Wykazano, że występują różnice w przebiegu choroby nowotworowej, rokowaniu i odpowiedzi na leczenie w grupie pacjentów z rakiem jelita grubego (dziedzicznym, sporadycznym) lub nowotworami z jego „spektrum” wykazującym MSI w porównaniu do tych samych typów nowotworów z MSS. Pacjenci z rakiem jelita grubego [19, 27, 38, 46, 50, 56] lub rakiem żołądka [45], u których obserwuje się MSI, mają lepsze rokowanie niż pacjenci z takimi samymi nowotworami i MSS.

W odróżnieniu od przeważającej części przypadków HNPCC, w których MSI wynika z mutacji w genach MMR, w większości guzów sporadycznych wykazujących MSI nie stwierdza się mutacji w tych genach. Może to znaczyć, że fenotyp RER+ w tych

nowotworach jest skutkiem uszkodzenia także innych genów uczestniczących w naprawie DNA. W procesy te zaangażowanych jest wiele białek, a niektóre z nich tworzą funkcjonalne kompleksy. Przykładem może być kompleks BRCA1 z hRad50-hMre11-p95 [62, 63]. Giannini i wsp. w 2002 r. wykazali, że w *mismatch-repair-deficient cancers* mutacji ulega gen MRE11, którego zmiany były obserwowane dotychczas w zespołach podobnych do ataksji-teleangiektazji (ang. *ataxia-teleangiectasia-like syndrome*). MER11 formuje kompleks z NBS1 i RAD50 (ang. *M-N-R complex*), którego integralność jest konieczna do sprawnego funkcjonowania punktu kontrolnego fazy S oraz relokalizacji tego kompleksu w miejsca uszkodzeń DNA [22].

Mechanizm molekularny niestabilności mikrosatelitarnej nie jest do końca wyjaśniony.

W odniesieniu do guzów ze spektrum HNPCC przyjmuje się obecnie dwie główne teorie powstania MSI:

- 1) nieprawidłowości podczas rekombinacji DNA (procesu *crossing-over*) oraz
- 2) tzw. efekt poślizgu polimerazy DNA.

Podczas replikacji odcinka DNA, dwa łańcuchy DNA (matrycowy i nowo syntetyzowany) rozdzielają się, a następnie łączą się ponownie w błędnej konfiguracji. Jeżeli błędnie sparowane pary zasad są zlokalizowane w nowo syntetyzowanym łańcuchu, to kontynuowanie wydłużania łańcucha będzie powodować zwiększenie długości odcinka DNA. Niewłaściwie sparowane zasady zlokalizowane na matrycowym łańcuchu DNA będą powodować utratę jego krótkich odcinków [34].

UTRATA HETEROZYGOTYCZNOŚCI

Zjawisko utraty heterozygotyczności (ang. *loss of heterozygosity*; LOH) wiąże się z utratą jednego z dwóch różnych alleli tego samego genu (heterozygota), co prowadzi do hemizygotyczności (obecność pojedynczego allelu) danego genu. LOH odgrywa ważną rolę w genetycznej etiologii nowotworów, gdyż delecja (mikrodelecja, utrata części lub całego chromosomu) jest jednym z głównych mechanizmów odpowiedzialnych za utratę funkcji genów supresorowych i mutatorowych. Geny obu tych grup wykazują recesywny mechanizm działania na poziomie komórkowym, tzn. mutacje muszą dotyczyć obu alleli danego genu, aby doszło do jego inaktywacji [33, 48].

Występowanie LOH opisuje się najczęściej w nabłonkowych nowotworach złośliwych, takich jak: rak jelita grubego, nerki, piersi, płuc, pęcherza moczowego. Zjawisko to stwierdza się jednak także w różnych innych typach nowotworów, m.in. mięśniakach, białaczkach, chłoniakach.

Utrata heterozygotyczności, stwierdzana w mniej niż 20% badanych przypadków dla danego locus, jest określana jako przypadkowa i interpretowana jako wyraz uogólnionej niestabilności genetycznej. LOH obserwowany w ponad 20% przypadków dla badanego markera jest interpretowany jako specyficzny [1, 36, 43, 60]. Badania nad specyficzną utratą heterozygotyczności są wykorzystywane do identyfikacji genów supresorowych i mutatorowych przez określanie tzw. najmniejszych obszarów delekcji (ang. *minimal critical region of allelic loss*), w obrębie których poszukiwane są

następnie geny krytyczne dla rozwoju badanego typu nowotworu [58]. Przykładem mogą być badania ramienia krótkiego chromosomu 3. Maestro i wsp. [40] wykazali badaniem LOH delecję w tym obszarze w nowotworach głowy i szyi. Stwierdzili, że region ten zawiera kilka genów supresorowych w trzech niezależnych, umieszczonych obok siebie „gorących miejscach” (ang. *hot spots*): 3p14-cen, 3p21.3 oraz 3p24-pter [40]. Dalsze badania Mao i wsp. [41] pozwoliły na zlokalizowanie w jednym z tych obszarów genu *FHIT*, w którym mutacje opisywane były w 80% linii komórkowych płaskonabłonkowych nowotworów głowy i szyi. Innym przykładem wykorzystania badań LOH do określenia przypuszczalnej lokalizacji genów supresorowych jest analiza regionu 8p. Alleliczna utrata w regionie 8p była opisywana w wielu nowotworach, takich jak: rak jelita grubego i odbytnicy, rak niedrobnokomórkowy płuc, raki płaskonabłonkowe krtani i jamy ustnej, rak pęcherza moczowego, piersi, trzustki czy rak prostaty [7, 55]. Sunwoo i wsp. [55] badając raki głowy i szyi, analizowali region 8p23 i znaleźli dwie różne delecje w obrębie tego stosunkowo małego regionu. Cytowani autorzy postawili hipotezę, że w regionie 8p23 znajdują się dwa geny supresorowe. Scholnik i wsp. [53] badając natomiast 3 regiony: 8p23, 8p22-23, 8p21, zasugerowali obecność w tym obszarze co najmniej 3 genów supresorowych. Powyższe wyniki badań stały się podstawą do wnikliwej analizy molekularnej wymienionych regionów i zmapowania np. przez Bova i wsp. [8] genu supresorowego *N33* (8p22), który zaangażowany jest m.in. w rozwój raka prostaty. Natomiast Fujiwara i wsp. [20] zmapowali w tym regionie (8p21.3-p22) gen *PRLTS* (*PDGF-receptor beta-like tumor suppressor*).

Zjawisko utraty heterozygotyczności odgrywa kluczową rolę w inicjacji procesu nowotworowego, ale jest też obserwowane we wczesnych i zaawansowanych stadiach procesu nowotworowego [33, 35]. Przykładowo El-Naggar i wsp. utratę heterozygotyczności w regionie 8p skorelowali z wczesnymi etapami karcinogenezy płaskonabłonkowych nowotworów jamy ustnej i krtani [17]. Również Fujiwara i wsp. sugerują, że utratę heterozygotyczności w regionie, gdzie zlokalizowany jest gen *PRLTS* obserwuje się częściej w procesie inicjacji niż progresji sporadycznych raków: jelita grubego, wątrobowokomórkowego i niedrobnokomórkowego płuc [20].

Alleliczna utrata 8p obserwowana była natomiast w korelacji z wyższym stopniem zaawansowania takich nowotworów, jak: rak prostaty [44], jelita grubego [19] albo pęcherza moczowego [32]. Wyniki badań Oba i wsp. w raku prostaty sugerują, że delecja 8p22-p21.3 odgrywa rolę w różnicowaniu nowotworu, natomiast delecja 8p21.1-p21.2 – w progresji procesu nowotworowego [44]. Miyaki i wsp. stwierdzili bardzo wysoką częstość utraty heterozygotyczności w 8p22 w przerzutach raka jelita grubego co sugeruje, że utrata funkcji genów na chromosomie 8 może odgrywać rolę w progresji tego nowotworu [42].

Częstość występowania LOH, a zwłaszcza stwierdzenie LOH w więcej niż 2 loci w niektórych nowotworach ma znaczenie prognostyczne. W zmianach łagodnych jelita grubego (gruczolaku) LOH obserwowany jest w pojedynczych loci, podczas gdy w około 90% nowotworów złośliwych jelita grubego (gruczolakorakach) LOH obserwowane jest w 2 lub więcej loci [31, 61]. Również w rakach głowy i szyi, utrata heterozygotyczności stwierdzana w więcej niż 1 locus wiąże się z gorszą prognozą [16, 23, 24, 36].

METODY BADANIA NIESTABILNOŚCI MIKROSATELITARNEJ I UTRATY HETEROZYGOTYCZNOŚCI

Do badania niestabilności mikrosatelitarnej i utraty heterozygotyczności wykorzystuje się polimorfizm markerów mikrosatelitarnych. DNA jest amplifikowane ze starterami swoistymi dla wybranych markerów. Otrzymane produkty są następnie rozdzielane na żelu (najczęściej poliakrylamidowym) i uwidaczniane za pomocą barwienia bromkiem etydy, srebrzenia, audioradiografii lub analizowane w sekwenatorach DNA z użyciem markerów fluorescencyjnych. Badania polegają na porównaniu wielkości markerów mikrosatelitarnych między DNA wyizolowanym z tkanki nowotworowej a DNA tkanek prawidłowych (głównie z krwi obwodowej), pochodzących od tego samego pacjenta. MSI jest rozpoznawana na podstawie każdej zmiany długości allelu, będącej wyrazem zmiany liczby jednostek powtarzalnych w mikrosatelitach w komórkach nowotworowych w porównaniu z tkanką prawidłową. Kryteria elektroforetycznej oceny MSI w żelach denaturujących zostały zestawione w tabeli 1. Przykłady wyników badań MSI przedstawiono na rycinach 1a i b.

Również nieswoista utrata heterozygotyczności, wyrażająca się utratą jednego z dwóch alleli danego markera w mniej niż 20% badanych przypadków dla danego locus, jest traktowana jako wyraz MSI.

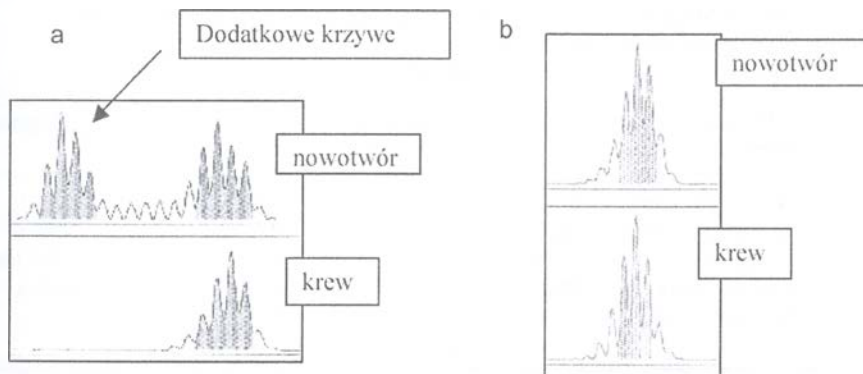
Do oceny MSI, np. w rakach jelita grubego, rekomendowane jest stosowanie pięciu markerów mikrosatelitarnych: dwóch mononukleotydowych i trzech dinukleotydowych. Referencyjny panel mikrosatelitów, rekomendowany przez Bolanda i wsp. [6] do badań niestabilności mikrosatelitarnej w HNPCC, oraz kryteria interpretacji wyników zostały przedstawione w tabeli 2.

Przyjęto następujące kryteria klasyfikacji MSI w tych nowotworach:

- MSI-H (*MicroSatellite Instability, High*) – przynajmniej 2 spośród 5 badanych markerów lub ponad 30–40% (gdy badanych jest więcej markerów) wykazują niestabilność,
- MSI-L (*MicroSatellite Instability, Low*) – jeden z pięciu badanych markerów, bądź mniej niż 30–40% wykazuje niestabilność,
- MSS (*MicroSatellite Stability*) – gdy żaden z badanych markerów nie wykazuje niestabilności [6].

TABELA 1. Kryteria oceny MSI w denaturujących żelach PAA: z użyciem metody srebrzenia oraz z zastosowaniem markerów fluorescencyjnych w automatycznym sekwenatorze DNA

Rozdział w żelu denaturującym PAA + metoda srebrzenia	Analiza fragmentów w automatycznym sekwenatorze z użyciem markerów fluorescencyjnych
dodatkowe prążki przesunięcie (ang. <i>shift</i>) prążków zmiany w intensywności prążków utrata prążka	dodatkowe krzywe alleli przesunięcie krzywych alleli utrata krzywych alleli



RYCINA 1. Przykład oceny MSI w automatycznym sekwenatorze DNA: a – stwierdzona MSI (marker BAT26), b – brak MSI (marker BAT25), MSI oceniane przez porównanie krzywych dla markera mikrosatelitarnego dla DNA tkanki prawidłowej z krzywymi dla DNA tkanki nowotworowej (materiał własny)

Według Perucho do określenia MSI wystarczająca może być ocena dwóch markerów mononukleotydowych i jednego dinukleotydowego [47]. Mononukleotydowymi markerami mogą być: BAT26 (26 powtórzeń deoksyadenozyny – sekwencja zlokalizowana w obrębie intronu 5 genu MSH2), BAT25 (sekwencja $(T)_7(A)_{25}$ zlokalizowana w obrębie intronu onkogenu c-kit) albo BAT40 (sekwencja zlokalizowana w obrębie intronu genu dehydrogenazy 3- β -hydroksysteroidu) (tab. 3). Są one wysoce specyficzne i szczególnie przydatne do oceny MSI-H. Kolejno Hong i wsp. [28], de la Chapelle [15] oraz cytowany powyżej Perucho [47] wykazali także, że do wykrywania MSI można zastosować tylko jeden marker mononukleotydowy, BAT26-poli(A)₂₆. W opinii cytowanych autorów marker ten jest tak swoisty, że do oceny MSI wystarczy stwierdzenie zmiany liczby powtórzeń poli(A), bez konieczności porównania wyników z tkanki nowotworowej z wynikami z tkanki prawidłowej.

Rozbieżności w ocenie częstości występowania MSI w nowotworach mogą wynikać z różnic w metodyce badań, jak np. doborze i liczbie analizowanych markerów mikrosatelitarnych, interpretacji wyników oraz w kryteriach rozpoznawania MSI. Obecnie poszukuje się takiego markera, który dałby jednoznaczny wynik badania MSI w badanych nowotworach.

Utratę heterozygotyczności rozpoznaje się na podstawie oceny markerów informatywnych, tzn. takich, które występują w komórkach prawidłowych w postaci heterozygotycznej (mają różne allele w badanym locus). W żelu poliakrylamidowym heterozygota rozpoznawana jest na podstawie obecności dwóch prążków, a w automatycznym sekwenatorze na podstawie występowania dwóch krzywych dla badanego locus (ryc. 2b). Homozygoty są klasyfikowane jako nieinformatywne i wyłączane z analizy (ryc. 2a). W elektroforezie LOH rozpoznawana jest, gdy występuje utrata jednego z prążków w DNA nowotworowym w porównaniu z DNA komórek prawidłowych. Analiza LOH w sekwenatorze polega na porównaniu pola pod krzywymi odpowiadającymi allelom badanego markera mikrosatelitarnego (ryc. 2c). Swoista utrata heterozygotyczności jest rozpoznawana tylko w guzach niewykazujących MSI,

TABELA 2. Panel referencyjny, rekomendowany przez Boland i wsp. do oceny niestabilności mikrosatelitarnej w owotworach jelita grubego [6]

Kryteria interpretacyjne MSI

Marker	Jednostka powtórzeniowa		Analizowane loci genowe = 5	Analizowane loci genowe > 5	Interpretacja
BAT25 BAT26 D5S346 D2S123 D17S250	mononukleotydowe mononukleotydowe dinukleotydowe dinukleotydowe dinukleotydowe	Liczba markerów wykazująca MSI	>2 1 0	>30%–40% <30%–40% 0	MSI-H MSI-L MSS lub MSI-L

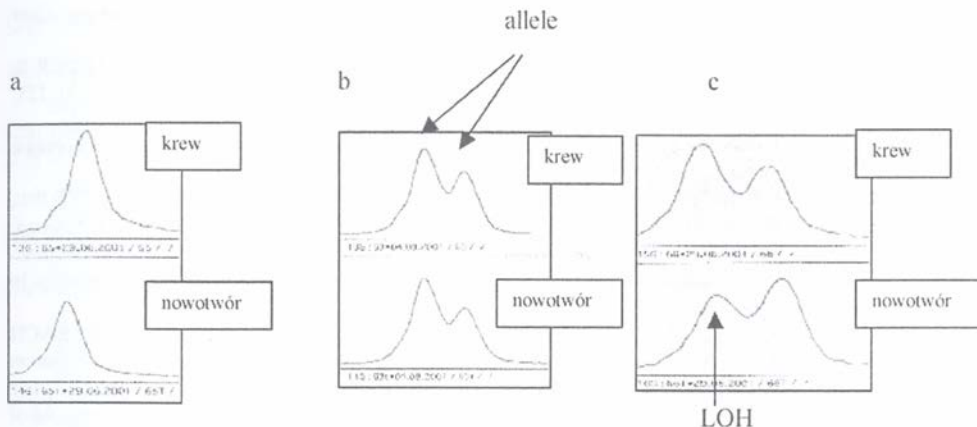
Alternatywne loci

BAT40	APC	D18S64	D13S153	D7S519
BAT34C4	D20S100	D18S69	D13S175	D5S107
TGF- β -RII	D18S55	D17S787	D10S197	D3S1029
ACTC	D18S58	D17S588	D8S87	D2S123
CCD1	D18S61	D17S250		

gdyż w guzach o fenotypie mutatorowym nie można odróżnić LOH swoistego od przypadkowego (wynikającego z niestabilności mikrosatelitarnej) [9]. Utrata heterozygotyczności oceniana jest według wzoru $(T1 \times N2)/(T2 \times N1)$, gdzie N1 i N2 stanowią pola pod krzywymi otrzymanymi z DNA z tkanki prawidłowej, a T1 i T2 krzywe z DNA z tkanki nowotworowej. Wynik obliczeń powinien znajdować się w granicach od 0,0 do 1,0. Wynik >1,0 wymaga odwrócenia wzoru: $(T2 \times N1)/(T1 \times N2)$ [10]. Opracowanie i analiza danych prowadzona jest za pomocą programów komputerowych. Całkowita utrata allelu oznacza teoretycznie wynik 0,0, ale ponieważ tkanki nowotworowe są zawsze heterogenne i zawierają część komórek prawidłowych (nawet do 50%), to całkowitą utratę allelu rozpoznaje się już, gdy wynik wynosi 0,5 [10]. LOH jest rozpoznawany, jeśli wyniki obliczeń zawarte są pomiędzy 0,0 a 0,5.

TABELA 3. Charakterystyka mononukleotydowych markerów mikrosatelitarnych: lokalizacja chromosomowa, gen sprzężony z danym markerem, wielkość markera

Marker	Lokalizacja	Gen	Wielkość (bp - pary zasad)
BAT25	4q12	<i>c-kit</i>	90
BAT26	2p16	<i>MSH2</i>	80–100
BAT40	1p13.1	Dehydrogenaza 3- β -hydroksysteroidowa	80–100



RYCINA 2. Przykład badania utraty heterozygotyczności w automatycznym sekwenatorze DNA: a – przykład homozygoty, b – przykład heterozygoty, c – przykład LOH. Ocena LOH w przypadkach informatywnych (heterozygoty): porównanie pola pod krzywymi odpowiadającymi allelom badanego markera mikrosatelitarnego sprzężonego z genem *MLH1* (materiał własny)

Przy założeniu, że tkanka nowotworowa zawiera tylko około 30% prawidłowych komórek, LOH można rozpoznać również, gdy wskaźnik wynosi 0,0–0,7 [30].

Inną metodę oceny LOH zaproponowali van Houten i wsp. [59]. Według tych autorów LOH może być była oceniana przez porównanie stosunku wysokości szczytu (ang. *peak height*) krótkiego (Sn) i długiego (Ln) allelu badanego markera w DNA tkanki prawidłowej ze stosunkiem wysokości szczytów odpowiednich alleli (St i Lt) uzyskanych w DNA guza (Sn:Ln / St:Lt). LOH jest stwierdzany, gdy tak liczona zmiana wielkości allelu w DNA nowotworowym wynosi co najmniej 50% (wynik < 0,5 lub > 2,0).

PODSUMOWANIE

Obecnie nie ma wątpliwości, że niestabilność genetyczna jest charakterystyczną cechą komórek nowotworowych. Dokładne poznanie mechanizmów powstawania i zależności między różnymi rodzajami niestabilności oraz określenie znaczenia niestabilności dla transformacji nowotworowej rzuci nowe światło na biologiczne podstawy rozwoju nowotworów. Ustalenie natomiast jednolitych kryteriów badania i oceny tego zjawiska umożliwi zapewne wprowadzenie nowych markerów do oceny ryzyka zachorowania, monitorowania leczenia i prognozowania przebiegu choroby.

LITERATURA

- [1] AH-SEE K, COOKE TG, PICKFORD IR, SOUTAR D, BALMAIN A. An allelotype of squamous carcinoma of the head and neck using microsatellite markers. *Cancer Res* 1994; 54: 1617–1621.
- [2] BAL J [red.]. Badania molekularne w medycynie. *Wyd Nauk PWN* 2001.

- [3] BARTEK J, LUKAS J. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* 2000; **6**: 734–747.
- [4] BEN YEHUDA A, GLOBERSON A, KRICHEVSKY S, BAR ON H, KIDRON M, FRIEDLANDER Y, FRIEDMAN G, BEN YEHUDA D. Ageing and the mismatch repair system. *Mech Ageing Dev* 2000; **121**: 173–179.
- [5] BERWICK M, VINEIS P. Response re: markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review. *J Natl Cancer Inst* 2000; **92**: 1537.
- [6] BOLAND CR, THIBODEAU SN, HAMILTON SR, SIDRANSKY D, ESCHELMAN JR, BURT RW, MELTZER SJM, RODRIGUEZ-BIGAS MA, FODDE R, RANZANI GN, SRIVASTAVA S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for Cancer Detection and Familial Predisposition: Development of International Criteria for the Determination of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Cancer Res* 1998; **58**: 5248–5257.
- [7] BOOKSTEIN R, LEVY A, MACGROGAN D, LEWIS TB, WEISSENBACH J, O'CONNELL P, LEACH RJ. Yeast artificial chromosome and radiation hybrid map of loci in chromosome band 8p22, a common region of allelic loss in multiple human cancers. *Genomics* 1994; **24**: 317–323.
- [8] BOVA GS., MACGROGAN D, LEVY A, PIN SS, BOOKSTEIN R, ISAAC WB. Physical mapping of chromosome 8p22 markers and their homozygous deletion in a metastatic prostate cancer. *Genomics* 1996; **35**: 46–54.
- [9] CANZIAN F, SALOVAARA R, HEMMINKI A, KRISTOP, CHADWICK RB, AALTONEN LA, DE LA CHAPELLE A. Semiautomated assessment of loss of heterozygosity and replication error in tumors. *Cancer Res* 1996; **14**: 3331–3337.
- [10] CAWKWELL L, BELL SM, LEWIS FA, DIXON MF, TAYLOR GR, QUIRKE P. Rapid detection allele loss in colorectal tumours using microsatellites and fluorescent DNA technology. *Br J Cancer* 1993; **67**: 1262–1267.
- [11] CHEAH PY, EU KW, SEOW FC. Update of genetics in colorectal carcinomas: genomic instability and somatic evolution. *Ann Acad Med Singapore* 2000; **29**: 331–336.
- [12] CHENG L, SPITZ MR, HONG WK, WIE Q. Reduced expression levels of nucleotide excision repair genes in lung cancers: a case-control analysis. *Carcinogenesis* 2000; **21**: 1527–1530.
- [13] CHIARAVALLI AM, FURIAN D, FACCO C, TIBILETTI MG, DIONIGI A, CASATI B, ALBARELLO L, RIVA C, CAPELLA C. Immunohistochemical pattern of hMSH2/hMLH1 in familial and sporadic colorectal, gastric, endometrial and ovarian carcinomas with instability in microsatellite sequences. *Virchows Arch* 2001; **438**: 39–48.
- [14] DE LA CHAPELLE A, PELTOMAKI P. Genetic of hereditary colon cancer. *Annu Rev Gen* 1995; **29**: 329–348.
- [15] DE LA CHAPELLE A. Testing tumors for microsatellite instability. *Eur J Hum Genetics* 1999; **7**: 407–408.
- [16] EL-NAGGAR AK, HURR K, BATSAKIS JG, LUNA MA, GOEPFERT H, HUFF V. Sequential loss of heterozygosity at microsatellite motifs in preinvasive and invasive head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1995; **55**: 2656–2659.
- [17] EL-NAGGAR AK, COOMBES MM, BATSKIS JG, HONG WK, GOEPFERT H, KAGAN J. Localization of chromosome 8p regions involved in early tumorigenesis of oral and laryngeal squamous carcinoma. *Oncogene* 1998; **16**: 2983–2987.
- [18] ESHELMAN JR, MARCOWITZ SD. Microsatellite instability in inherited and sporadic neoplasms. *Curr Opin Oncol* 1995; **7**: 83–89.
- [19] FUJIWARA Y, EMI M, OHATA H, KATO Y, NAKAJIMA T, MORI T, NAKAMURA Y. Evidence for the presence of two tumor suppressor genes on chromosome 8p for colorectal carcinoma. *Cancer Res* 1993; **53**: 1172–1174.
- [20] FUJIWARA Y, OHATA H, KUROKI T, KOYAMA K, TSUCHIYA E, MONDEN M, NAKAMURA Y. Isolation of candidate tumor suppressor gene on chromosome 8p21.3-p22 that is homologous to an extracellular domain of the PDGF receptor beta gene. *Oncogene* 1995; **10**: 891–895.
- [21] GEMMA A, SEIKE M, SEIKE Y, UEMATSU K, HIBINO S, KURIMOTO F, YOSHIMURA A, SHIBUYA M, HARRIS CC, KUDOCH S. Somatic mutation of the hBUB1 mitotic checkpoint gene in primary lung cancer. *Genes Chromosomes Cancers* 2000; **3**: 213–218.
- [22] GIANNINI G, RISTORI E, CERIGNOLI F, RINALDI C, ZANI M., VIEL A, OTTIN L. Human MRE11 is inactivated in mismatch repair-deficient cancers. *EMBO Rep* 2000; **3**: 248–254.
- [23] GLEICH LL, LI YQ, BIDDINGER PW, GARTSIDER PS, STAMBROOK PJ, PAVELIC ZP, GLUCKMAN JL. The loss of heterozygosity in retinoblastoma and p53 suppressor genes as a prognostic indicator for head and neck cancer. *Laryngoscope* 1996; **106**: 1378–1381.

- [24] GLEICH LL, LI YQ, WANG X, STAMBROOK PJ, GLUCKMAN JL. Variable genetic alterations and survival in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999; **125**: 949–952.
- [25] GOUKASSIAN D, GAD F, YAAR M, ELLER MS, NEHAL US, GILCHREST BA. Mechanisms and implications of the age-associated decrease in DNA repair capacity. *FASEB J* 2000; **14**: 1325–1334.
- [26] GREENWOOD E. Genomic instability. Let's stick together. *Nature Reviews Cancer* 2002; **2**: 78.
- [27] GRYFE R, KIM H, HSIEH ETK, ARONSON MD, HOLOWATY EJ, BULL SB, REDSTON M, GALLINGER S. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Eng J Med* 2000; **342**: 69–77.
- [28] HOANG JM, COTTU PH, THUILLIE B, SALMON RJ, THOMAS G, HAMELIN R. BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Res* 1997; **58**: 300–303.
- [29] IKICHAWA Y, LEMONST, WANG S, FRANKLIN B, WATSON P, KNEZETIC JA, BEWTRA C, LYNCH HT. Microsatellite instability and expression of MLH1 and MSH2 in normal and malignant endometrial and ovarian epithelium in hereditary nonpolyposis colorectal cancer family members. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; **112**: 2–8.
- [30] KARNIK P, PARIS M, WILLIAMS BRG, CASEY G, CROWE J, CHEN P. Two distinct tumor suppressor loci within chromosome 11p15 implicated in breast cancer progression and metastasis. *Hum Mol Genet* 1998; **7**: 895–903.
- [31] KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; **87**: 159–170.
- [32] KNOWLES MA, SHAW ME, PROCTOR AI. Deletion mapping of chromosome 8 in cancers of the urinary bladder using restriction fragment length polymorphisms and microsatellite polymorphisms. *Oncogene* 1993; **8**: 1357–1364.
- [33] KNUDSON AGJ. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci* 1971; **61**: 820–823.
- [34] KUNKEL TA. Slippery DNA and diseases. *Nature* 1993; **365**: 207–208.
- [35] LEE NK. Tumor suppressor gene. *Head Neck* 1992; **14**: 407–414.
- [36] LI X, LEE NK, YE YW, WABER PG, SCHWEITZER C, CHENG QC, NISEN PD. Allelic loss at chromosomes 3p, 8p, 13q, 17p. associated with poor prognosis in head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 1994; **86**: 1524–1529.
- [37] LOEB LA. A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 2001; **61**: 3230–3239.
- [38] LOTHE RA, PELTOMAKI P, MELING GI, AALTONEN LA, NYSTROM-LATHI M, PYLKKANEN L, HEIMDAL K, ANDERSEN TI, MOLLER P, ROGNUM TO, FOSSA SD, HALDORSEN T, LANGMARK F, BROGGER A, DE LA CHAPELLE A, BORRESEN AL. Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res* 1993; **53**: 5849–5852.
- [39] LYNCH HT, DE LA CHAPELLE A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 1999; **36**: 801–818.
- [40] MAESTRO R, GASPAROTTO D, VUKSAVLEVIC T, BARZAN L, SULFARO S, BOIOCCHI M. Three discrete regions of deletion at 3p in head and neck cancer. *Cancer Res* 1993; **53**: 5775–5779.
- [41] MAO L, FAN Y, LOTAN R, HONG WK. Frequent abnormalities of FHIT, a candidate tumor suppressor gene in head and neck cancer cell lines. *Cancer Res* 1996; **56**: 5128–5131.
- [42] MIYAKI M, TANAKA K, KIKUCHI-YANOSHITA R, MURAOKA M, KONISHI M. Familial polyposis: recent advances. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995; **19**: 1–13.
- [43] NAVROZ H, VAN DER RIET P, HRUBAN RH, KOCH W, RUPPERT JM, SIDRANSKY D. Allelotype of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1994; **54**: 1152–1155.
- [44] OBA K, MATSUYAMA H, YOSHIHIRO S, KISHI F, TAKAHASHI M, TSUKAMATO M, KINJO M, SAGIYAMA K, NAITO K. Two putative tumor suppressor genes on chromosome arm 8p may play different roles in prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; **124**: 20–26.
- [45] OLIVEIRA C, SERUCA R, SEIXAS M, SOBRINHO-SIMÕES M. The clinicopathological feature of gastric carcinoma with microsatellite instability may be mediated by mutations of different „target genes”. *Am J Pathol* 1998; **153**: 1211–1219.
- [46] PELTOMAKI P. DNA mismatch repair and cancer. *Mutat Res* 2001; **488**: 77–85.
- [47] PERUCHO M. Correspondence re: BOLAND CR, THIBODEAU SN, HAMILTON SR, SIDRANSKY D, ESCHELMAN JR, BURT RW, MELTZER SJM, RODRIGUEZ-BIGAS MA, FODDER, RANZANI GN, SRIVASTAVA S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for Cancer Detection and Familial Predisposition: Development of International Criteria for the Determination of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Cancer Res* 1998; **58**: 5248–5257; *Cancer Res* 1999; **59**: 249–256.
- [48] PONDER B. Cancer. Gene losses in human tumours. *Nature* 1988; **335**: 400–402.
- [49] ROBELS AI, HARRIS CC. P53-mediated apoptosis and genomic instability diseases *Acta Oncol* 2001; **40**: 696–701.

- [50] RODRIGUEZ-BIGAS MA, BOLAND R, HAMILTON SR, HENSON D, JASS J, MERRA-KAN P, LYNCH HAT, PERUCHO M, SMYRK T, SOBIN L, SRIVASTAVA S. A National Cancer Institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* 1997; **89**: 1758–1762.
- [51] SAMOWITZ WS, SLATTERY ML. Regional Reproducibility of Microsatellite Instability in Sporadic Colorectal Cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; **26**: 106–114.
- [52] SAŚIADEK M, SCHLADE-BARTUSIAK K, STEMBALSKA-KOZŁOWSKA A, BIELAWSKA-POHL A, ŚMIGIEL R, DUŚ D. Niestabilność genetyczna w nowotworach. I. Niestabilność chromosomowa w nowotworach. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 259–272.
- [53] SCHOLNICK SB, HAUGHEY BH, SUNWOO JB, EL-MOFTY SK, BATY JD, PICCIRILLO JF, ZEKUIERA MR. Chromosome 8 allelic loss and outcome of patients with squamous cell carcinoma of the supraglottic larynx. *J Natl Cancer Inst* 1996; **88**: 1676–1682.
- [54] SIMPSON AJ. The natural somatic mutation frequency and human carcinogenesis. *Adv Cancer Res* 1997; **71**: 209–240.
- [55] SUNWOO JB, SUN PC, GRUPTA VK, SCHMIDT AP, EL-MOFTY S, SCHOLNICK SB. Localization of putative tumor suppressor gene in the subtelomeric region of chromosome 8p. *Oncogene* 1999; **18**: 2651–2655.
- [56] THIBODEAU SN, BREN G, SCHAID D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; **260**: 816–819.
- [57] TOMLINSON I, LAMBROS M, ROYLANCE R. Loss of heterozygosity analysis: Practically and conceptually flawed? *Genes Chromosomes Cancer* 2002; **34**: 349–353.
- [58] TOMLINSON I, SASIENI P, BODMER W. How many mutations in a cancer? *Am J Pathol* 2002; **160**: 755–758.
- [59] VAN HOUTEN VM, TABOR MP, VAN DEN BREKEL MW, DENKERS F, WISHAUPT RG, KUMMER JA, SNOW GB, BRAKENHOFF RH. Molecular assays for the diagnosis of minimal residual head-and-neck cancer: methods, reliability, pitfalls, and solutions. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 3803–3816.
- [60] VAN DER RIET P, NAVROZ H, HRUBAN RH, CORIO R, TOKINO K, KOCH W, SIDRANSKY D. Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. *Cancer Res* 1994; **54**: 1156–1158.
- [61] VOGELSTEIN B, KINZLER KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993; **9**: 138–141.
- [62] WANG Y, CORTEZ D, YAZDI P, NEFF N, ELLEDGE SJ, QIN J. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Devel* 2000; **14**: 927–939.
- [63] ZONG Q, CHEN C-F, LI S, CHEN Y, WANG C-C, XIAO J, CHEN P-L, SHARP ZD, LEE W-H. Association of BRCA1 with the hrad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science* 1999; **285**: 747–750.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 26.09.2002 r.

Przyjęto: 13.05.2003 r.

Adres autora: ul. Marcinkowskiego 1, 50-368 Wrocław,
sasiadek@gen.am.wroc.pl

MOLEKULARNE PODSTAWY ODPOWIEDZI ROŚLIN NA NIEDOBÓR FOSFORANU*

MOLECULAR RESPONSES OF PLANT TO PHOSPHATE STARVATION

Iwona CIERESZKO

Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku

Streszczenie: Niedobór przyswajalnych przez rośliny fosforanów nieorganicznych (Pi) w środowisku jest zjawiskiem często spotykanym. Rośliny dostosowują się do warunków takiego stresu uruchamiając szereg mechanizmów zwiększających pobieranie Pi z podłoża oraz mobilizację Pi z zasobów wewnętrznych. Korzenie mogą wydzielać do podłoża kwasy organiczne, kwaśne fosfatazy, a także, o ile to konieczne, rybonukleazy. Następuje także indukcja błonowych przenośników Pi i fosfataz wewnątrzkomórkowych. Wiele zmian dostosowujących rośliny do niedoboru fosforu jest poprzedzonych aktywacją (lub represją) specyficznych genów. W warunkach deficytu Pi obserwowano indukcję genów kodujących transportery Pi w korzeniach, genów kodujących kwaśne fosfatazy, nukleazy, β -glukozydazy i inne białka. Roślina, aby reagować szybko i właściwie na zmiany środowiskowe, musi mieć sprawny system percepcji sygnałów i ich przekazywania do wszystkich komórek. Niewiele wiadomo dotychczas o mechanizmach odbioru i transdukcji sygnału o niedoborze Pi w podłożu i/lub tkankach roślinnych, jednak badania tego zagadnienia zaczęły się intensywnie rozwijać w ostatnich latach. W pracy dyskutowana jest natura i pochodzenie sygnału o niedoborze Pi oraz rola hormonów i innych związków uczestniczących w jego percepcji i transdukcji w komórkach roślinnych. Zwrócono uwagę na szereg mutantów charakteryzujących się obniżonym lub podwyższonym poziomem Pi, zróżnicowaną aktywnością kwaśnych fosfataz i zawartością białek oraz ich odmiennymi reakcjami na deficyt Pi w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Zastosowanie i analiza tych mutantów okazują się pomocne w badaniach sposobów przenoszenia informacji o deficycie Pi i mechanizmów odpowiedzi roślin na niedobór fosforu.

Słowa kluczowe: deficyt Pi, ekspresja genów, *pho*, regulacja metabolizmu, transdukcja sygnału.

Summary: The deficiency of available for plants inorganic phosphate (Pi) in the environment is a common phenomenon. Plants adapt to such stress conditions by developing a number of mechanisms, e.g. increasing Pi uptake from soil and/or Pi mobilization from intercellular pools. Plant roots can secrete organic acids, acid phosphatase and, if necessary, also ribonucleases to the ground with simultaneous induction of Pi transporters and numerous phosphatases in cells. These changes are usually

* Praca powstała w trakcie realizacji grantu KBN nr 6 P04C 019 20.

preceded or accompanied by activation or repression of specific genes. Under phosphate starvation conditions the induction of genes encoding Pi transporters, acid phosphatases, ribonucleases, β -glucosidase and others was observed in roots. To react fast and adequately to the variety of environmental changes plants require efficient signal perception and transduction systems. Little is known about mechanisms of Pi signaling, however this problem is recently under extensive study. Studies on the function of hormones, phosphonate, Pi transporters and other factors in signal transduction are currently underway. In addition, selection and characterization of various phosphate mutants (with decreased or increased Pi level and acid phosphatases activity) – may provide information that help in elucidating Pi signaling pathway(s) and mechanisms of plant responses to Pi starvation.

Key words: gene expression, metabolism regulation, *pho*, phosphate deficiency, Pi signaling.

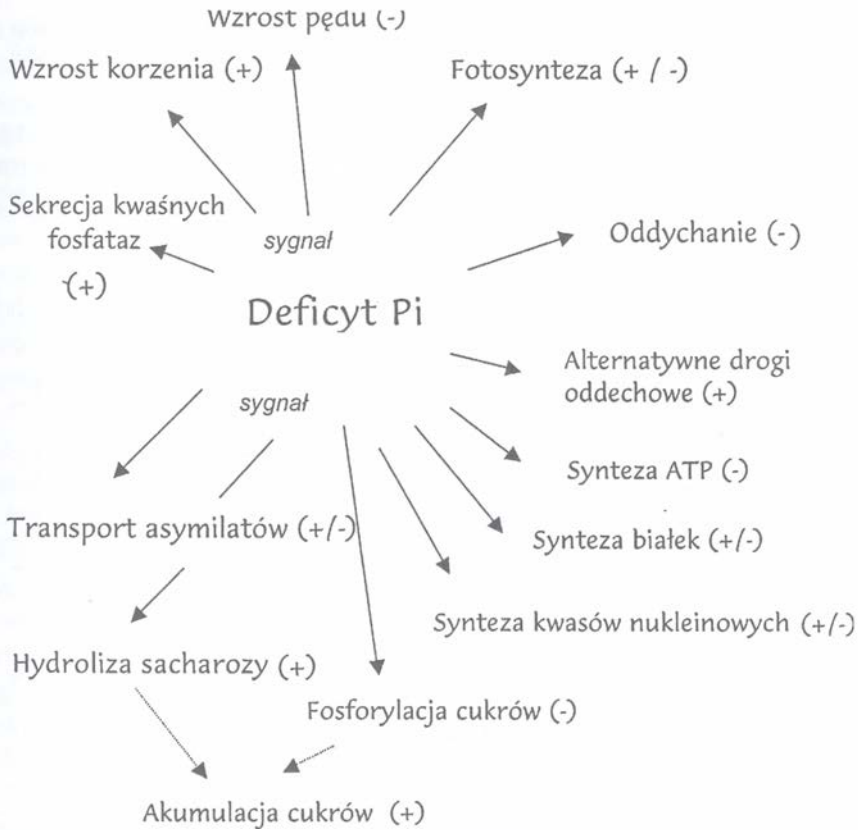
Stosowane skróty: Pi (*inorganic phosphate*) – jony fosforanowe: H_2PO_4^- i HPO_4^{2-} ; Phi (phosphites) – aniony: H_2PO_3^- i HPO_3^{2-} .

WSTĘP

Fosfor jest jednym z głównych składników mineralnych niezbędnych do prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin. Występuje on w postaci wolnych jonów ortofosforanowych (Pi) lub wchodzi w skład związków organicznych mających kluczowe znaczenie w metabolizmie roślin, takich jak: kwasy nukleinowe, koenzymy, nukleotydy, fosfolipidy, estry fosforanowe cukrów oraz zapasowe związki fosforu (feofityna). Poziom Pi w tkankach wpływa istotnie na przebieg i intensywność fotosyntezy, oddychania, fotooddychania i innych procesów metabolicznych, a w konsekwencji wzrostu i rozwoju roślin (ryc. 1) [11, 20, 30, 40, 45, 58, 60, 61, 85, 93]. Pi jest substratem wielu reakcji, uczestniczy w przenoszeniu i magazynowaniu energii (ATP, P_i), pełni również funkcje regulacyjne oddziałując bezpośrednio lub pośrednio na aktywność białek (np. przez procesy fosforylacji/defosforylacji), translację czy transkrypcję.

W warunkach niedoboru fosforu dochodzi w roślinach do zmian morfologicznych: zahamowania wzrostu pędu oraz zmniejszenia powierzchni i masy liści, przy jednoczesnej stymulacji wzrostu korzeni (ryc. 1) [11, 14, 20, 30, 44]. Rośliny uruchamiają mechanizmy służące intensyfikacji pobierania Pi ze środowiska i/lub mobilizacji Pi z zasobów wewnętrznych. Wydzielają do środowiska kwasy organiczne oraz enzymy: kwaśne fosfatazy, a jeśli to konieczne – nukleazy (RNAzy). Następuje indukcja przenośników Pi w błonach komórkowych i szeregu fosfataz wewnątrzkomórkowych [11, 61, 72, 80]. Wiele ze zmian dostosowujących rośliny do niedoboru fosforu jest poprzedzona aktywacją (lub represją) specyficznych genów (tab.1) [1, 15, 23, 65, 73, 75, 92, 95].

Reakcje roślin narażonych na niedobór fosforu w środowisku często klasyfikuje się na odpowiedzi natychmiastowe (specyficzne) i odpowiedzi ogólne (niespecyficzne). Do odpowiedzi specyficznych zalicza się zmiany w ekspresji niektórych genów, inicjowane już po kilku godzinach niedoboru fosforu, które umożliwiają mobilizację i pozyskiwanie fosforu ze środowiska i z zasobów wewnątrzkomórkowych (ryc. 1–3). Indukowane są wówczas transportery Pi, fosfatazy,



RYCINA 1. Regulacja procesów metabolicznych i wzrostu u roślin w warunkach deficytu fosforu; (+) indukcja procesu, (-) hamowanie procesu

enzymy uczestniczące w syntezie kwasów organicznych oraz białka ułatwiające ich wydzielanie do gleby [1, 2, 3, 72, 73, 75]. Druga kategoria odpowiedzi, reakcje ogólne, umożliwiają roślinom przetrwanie w warunkach długotrwałego niedoboru Pi przez stopniowe dostosowanie ich wzrostu i metabolizmu do stresu deficytu fosforu (ryc. 1).

Aklimatyzacyjne zmiany morfologiczne, anatomiczne i metaboliczne zachodzące u roślin wyższych w następstwie deficytu fosforu zostały już wyczerpująco opisane i przedyskutowane w licznych pracach przeglądowych [11, 20, 26, 40, 60, 61, 72, 74, 80, 85]. Znacznie mniej wiadomo natomiast o molekularnych podstawach odpowiedzi roślin na niedobór fosforu [1, 73, 75]. Warunkiem szybkiej i właściwej reakcji rośliny na zmiany środowiska jest sprawna percepcja i transdukcja sygnału. Mechanizmy odbioru i szlaki przekazywania sygnału związanego ze zmianą stężenia Pi w podłożu i/lub tkankach są słabo poznane – badania zaczęły się dopiero rozwijać [1, 73, 77, 92]. W artykule tym podjęto próbę przedstawienia najnowszych wyników badań nad reakcjami roślin na niedobór Pi, których uzyskanie możliwe było m.in. dzięki zastosowaniu metod biologii molekularnej i inżynierii genetycznej.

TABELA 1. Regulacja ekspresji wybranych genów i syntezy kodowanych przez nie białek u roślin w warunkach deficytu fosforu; (+) indukcja ekspresji genu/syntezy białka, (-) hamowanie ekspresji genu/syntezy białka, (0) brak efektu

Gen	Charakterystyka białka	Roślina	Typ regulacji
<i>AtPT1, AtPT2</i>	AtPT1, AtPT2 – transportery Pi	<i>Arabidopsis thaliana</i>	+
<i>LePT1, LePT2</i>	LePT1, LePT2 – transportery Pi	<i>Lycopersicon esculentum</i>	+
<i>StPT1, StPT2</i>	StPT1, StPT2 – transportery Pi	<i>Solanum tuberosum</i>	+
<i>MtPT1, MtPT2</i>	MtPT1, MtPT2 – transportery Pi	<i>Medicago truncatula</i>	+
<i>CrPT1</i>	CrPT1 – transporter Pi	<i>Cataranthus roseus</i>	+
<i>NtPT1</i>	NtPT1 – transporter Pi	<i>Nicotiana tabacum</i>	+
<i>TPS11</i>	nieznane	<i>Lycopersicon esculentum</i>	+
<i>RNS1</i>	RNS1 – rybonukleazy	<i>Arabidopsis thaliana</i>	+
<i>RLE, RLX</i>	RLE, RLX – rybonukleazy	<i>Lycopersicon esculentum</i>	+
<i>VspB</i>	VSPB – wakuolame fosfatazy	<i>Glycine max</i>	+
<i>LEPS2</i>	LEPS2 – kwaśne fosfatazy	<i>Lycopersicon esculentum</i>	+
<i>AtACP5</i>	AtACP5 – kwaśne fosfatazy	<i>Arabidopsis thaliana</i>	+
<i>Ugp</i>	UGPaza – pirofosforylaza UDP-glukozy	<i>Arabidopsis thaliana</i>	+
<i>Sus1</i>	SuSy – syntaza sacharozy	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0
<i>ApL1, ApS</i>	AGPaza – pirofosforylaza ADP-glukozy	<i>Arabidopsis thaliana</i>	+

REGULACJA EKSPRESJI GENÓW W WARUNKACH DEFICYTU FOSFORU

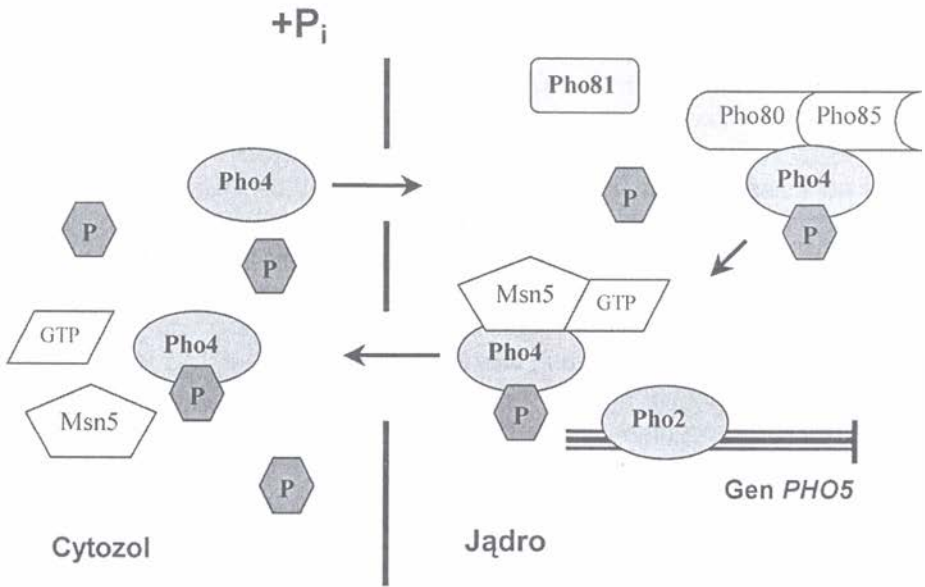
U wielu mikroorganizmów podczas deficytu Pi aktywowane są geny zwane *pho*-regulonem [1, 31, 49, 72, 75, 94]. U bakterii *Escherichia coli* ponad 130 genów jest regulowanych przez pozakomórkowy Pi [75, 94]. Kontrola tych genów wymaga dwuskładnikowego systemu transdukcijnego (ang. *two-component signalling system*): sensora PhoR i białka regulatorowego PhoB oraz dodatkowo specyficznych transporterów Pst [94]. Podczas deficytu fosforu aktywacja genów wchodzących w skład *pho*-regulonu zwiększa syntezę kwaśnych fosfatyz (w tym także fosfatyz wydzielanych do środowiska) i błonowych transporterów Pi. W komórkach drożdży, *Saccharomyces cerevisiae*, występuje

bardziej skomplikowany system regulacji ekspresji genów w warunkach niedoboru fosforu [41, 49]. W warunkach deficytu Pi następuje indukcja ekspresji genu *PHO5*, kodującego kwasne fosfatazy, wzmożenie sekrecji fosfataz do podłoża i zwiększenie ich aktywności. Wykazano, że do aktywacji *PHO5* niezbędne są czynniki transkrypcyjne Pho4 i Pho2 (ryc. 2), kodowane przez *PHO2* i *PHO4* [41, 49]. Lokalizacja czynników transkrypcyjnych w komórce zależy od fosforylacji przebiegającej z udziałem jądrowego kompleksu kinaz cyklicznych, Pho80-Pho85 (ryc. 2). Nieufosforylowany Pho4 jest aktywny i znajduje się w jądrze, natomiast ufosforylowany, nieaktywny Pho4 – w większości w cytoplazmie (ryc. 2). W warunkach optymalnego żywienia fosforanowego następuje fosforylacja Pho4 i transport ufosforylowanego czynnika transkrypcyjnego do cytoplazmy. Transport ten przebiega przy udziale białka Msn5 oraz GTP (ryc. 2A) [41, 49]. W warunkach niedoboru Pi aktywność kinaz Pho80-Pho85 jest blokowana przez inhibitor białkowy Pho81 i wówczas nieufosforylowany Pho4 wraz z drugim czynnikiem transkrypcyjnym, Pho2, aktywuje transkrypcję genu *PHO5* (ryc. 2B). W podobny sposób mogą być regulowane także inne geny z grupy *PHO*. Nie ustalono dotychczas, w jaki sposób regulowane są inne odpowiedzi drożdży na deficyt fosforu, np. te prowadzące do zahamowania wzrostu i podziału komórek [49].

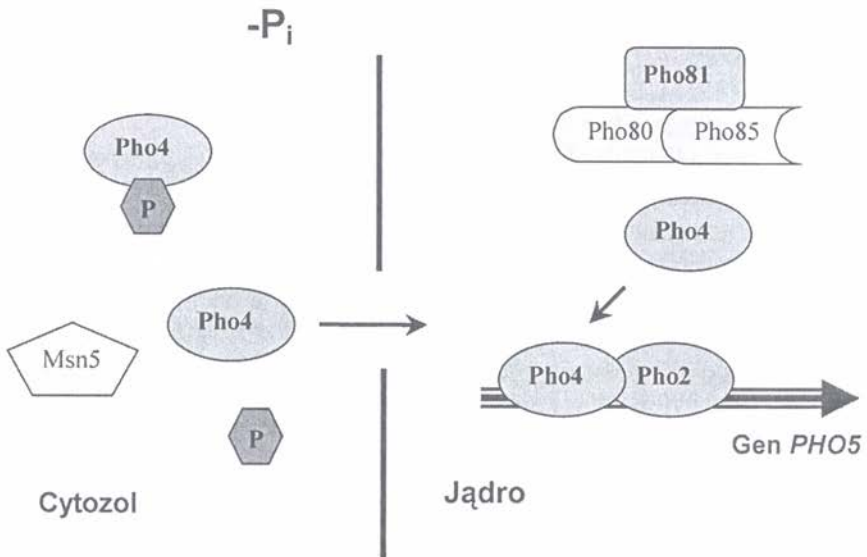
Znacznie mniej wiadomo o systemie fosfo-regulacji w komórkach roślinnych; prawdopodobnie jego funkcjonowanie i regulacja jest podobna do *pho*-regulonu bakterii i drożdży [1, 31, 72, 75, 95]. Chociaż stwierdzono u roślin funkcjonowanie dwuskładnikowych systemów transdukcyjnych [38, 53], nie wiadomo jednak, czy są one aktywne w przypadku niedoboru składników mineralnych. W warunkach niedoboru fosforu, za pomocą metod Northern blot i RT-PCR (ang. *reverse transcriptase polymerase chain reaction*), wykazano indukcję genów kodujących transportery Pi w korzeniach roślin [42, 51, 63, 73, 80, 83], a także genów kodujących kwasne fosfatazy [3, 59, 72, 78] i nukleazy [4, 9, 46] (ryc. 3).

U roślin występują dwa różne systemy transportujące Pi, wykorzystywane w zależności od obecności lub braku tego składnika w otoczeniu [72, 80]. Pierwszy, operujący w warunkach optymalnego żywienia fosforanowego, to transportery o stosunkowo niskim powinowactwie do Pi i niewielkiej aktywności [22, 61]. Drugi system obejmuje transportery o wysokim powinowactwie do Pi i jest aktywny w warunkach niedoboru fosforu w środowisku [42, 60, 61, 72, 73]. Ostatnio wykazano zwiększoną w warunkach deficytu fosforu ekspresję genów kodujących transportery o wysokim powinowactwie do Pi w korzeniach wielu gatunków roślin (tab. 1). Wykazano indukcję *AtPT1* i *AtPT2*, genów kodujących transportery Pi w korzeniach rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh.) [63, 73, 83] oraz genów *LePT1* i *LePT2* kodujących białka nośnikowe w tkankach pomidora (*Lycopersicon esculentum* Mill.) [21, 51], *MtPT1* i *MtPT2* w korzeniach *Medicago truncatula* [10, 52], *StPT1*, *StPT2* u ziemniaka, *NtPT1* u tytoniu, a także analogicznych genów u innych gatunków roślin (tab. 1) [73]. Geny te wykazywały zwiększoną ekspresję w korzeniach, szybką indukcję przy deficycie Pi i znaczące obniżenie ekspresji po dostarczeniu Pi do tkanek [42, 63, 72]. Represja genów kodujących przenośniki Pi widoczna była także podczas rozwoju symbiozy pomiędzy korzeniami roślin a grzybami (mikoryza) [10], która ułatwia uzyskiwanie Pi

A



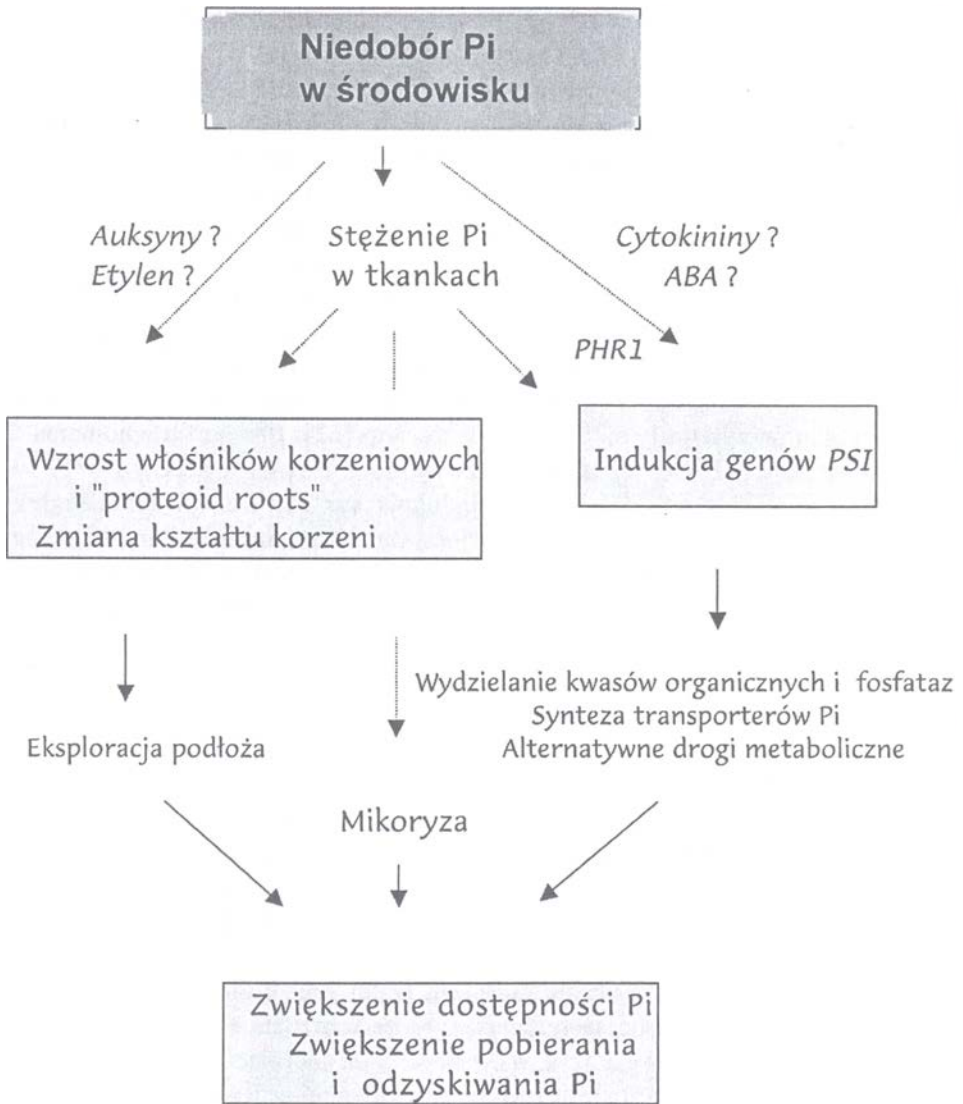
B



RYCINA 2. Regulacja transkrypcji genu *PHO5* u drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) w warunkach optymalnego zaopatrzenia w fosforan (A, +P_i) i przy deficycie fosforanowym (B, -P_i); zmodyfikowane wg [41, 49]. *PHO5* – gen kodujący kwasną fosfatazę; Pho4, Pho2 – czynniki transkrypcyjne; Pho80-Pho85 – jądrowy kompleks kinaz cyklicznych; Pho81 – inhibitor białkowy; Msn5 – białko eksportujące ufosforylowany Pho4 z jądra do cytoplazmy, przy udziale GTP

z podłoża licznym gatunkom roślin [80]. Ostatnio scharakteryzowano transportery wyspecjalizowane w odbiorze Pi z komórek grzybni [10, 34, 76] i wykazano, że ekspresja genu kodującego taki transporter (np. StPT3 u ziemniaka) występuje jedynie w korzeniach mikoryzowych podczas deficytu fosforu [76]. Transportery o wysokim powinowactwie do Pi są zlokalizowane przede wszystkim we włosnikach i komórkach epidermalnych młodych części korzenia [10, 64, 73], a u roślin z mikoryzą – w partiach korzeni spenetrowanych przez strzępki grzyba [34]. Obecność transporterów Pi w liściach, łodygach oraz kwiatach pomidora i ziemniaka świadczy o ich zaangażowaniu nie tylko w zdobywanie Pi przez korzenie z podłoża, ale także w transport Pi w obrębie rośliny (floemem) [51]. Kultury transgenicznych komórek tytoniu wykazujące wzmożoną ekspresję transportera o wysokim powinowactwie do Pi wykazywały mniejszą wrażliwość na deficyt Pi niż kultury kontrolne, wydajniej pobierały fosforan z podłoża i charakteryzowały się lepszym wzrostem [62]. Badania Raghothama i współpracowników [42, 64] wykazały, że zwiększona ekspresja genów *LePT1* w korzeniach pomidora pociągała za sobą indukcję syntezy i aktywności białek przENOŚNIKOWYCH LePT1 wskazując, iż funkcjonowanie transporterów Pi regulowane jest na poziomie transkrypcji (tab. 1). Niedobór Pi w tkankach pomidora wzmagał także aktywność genu *TPSII*, o nieznannej dotychczas funkcji [50]. Ponadto, analiza ekspresji genów *AtPT2* i *TPSII* i interakcji DNA-białko w ich regionach promotorowych wykazała istnienie specyficznych miejsc wiążących jądrowe czynniki białkowe w warunkach optymalnego zaopatrzenia w fosfor [65]. W warunkach niedoboru Pi nie stwierdzano przyłączania czynników białkowych do DNA [65].

Zaobserwowano, że u *Arabidopsis thaliana* rosnących w warunkach deficytu fosforu indukowany był gen *RNSI*, odpowiedzialny za syntezę rybonukleaz, enzymów degradujących RNA [4], zwłaszcza u roślin hodowanych na podłożu zawierającym kwasy nukleinowe jako źródło fosforu [9]. Zwiększoną aktywność zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych rybonukleaz oraz genów je kodujących (*RLE* i *RLX*) podczas niedoboru Pi obserwowano także w kulturach komórkowych pomidora (tab. 1) [46, 69]. Deficyt fosforu wzmagał ekspresję *psr3*, genu kodującego β -glukozydazę, enzymu uczestniczącego w wielu procesach związanych ze wzrostem roślin, w tworzeniu ścian komórkowych, rozpadzie glikozydów cyjanogennych oraz metabolizmie hormonów roślinnych [55, 56]. Deficyt fosforu stymulował również transkrypcję genu *VspB* odpowiedzialnego za syntezę wakuolarnych kwaśnych fosfatyz w tkankach soi [78] oraz genu *LEPS2*, kodującego kwaśne fosfatazy w liściach, korzeniach i kulturach komórkowych pomidora [3]. Ekspresja *LEPS2* była indukowana jedynie przez niedobór Pi, nie była natomiast wrażliwa na niedobory innych pierwiastków lub stresy abiotyczne. W warunkach podwyższonego poziomu Pi obserwowano natomiast zmniejszenie ekspresji *LEPS2* [3]. Gen kwaśnej fosfatazy z tkanek *A. thaliana*, typu *AtACP5* był indukowany zarówno przez deficyt fosforu, jak i stres oksydacyjny oraz ABA [23]. Scharakteryzowano region promotorowy innego genu kodującego kwaśną fosfatazę, wydzielaną przez korzenie *A. thaliana* do podłoża, wykazano, że był on indukowany jedynie u roślin z deficytem fosforu i jego ekspresja następowała początkowo w merystemie korzeni bocznych, a następnie w całym korzeniu [33]. Gen kodujący



RYCINA 3. Rola Pi w wywołaniu i przekazaniu sygnałów decydujących o zmianach w morfologii, metabolizmie i indukcji poszczególnych genów w tkankach roślinnych; zmodyfikowane wg [1]. Geny *PSI* (ang. *Pi-starvation-inducible*) – grupa różnorodnych genów indukowanych przez deficyt fosforu; *PHR1* (ang. *phosphate-starvation-response*) – geny uczestniczące w regulacji gospodarki fosforanowej

kwaśną fosfatyzę wydzielaną do podłoża w warunkach niedoboru Pi przez korzenie *Lupinus albus* wykazywał tylko w pewnych regionach podobieństwo do genu z *Arabidopsis*, zawierał natomiast sekwencję kodującą 31 aminokwasów, charakterystyczną dla białek zlokalizowanych w pobliżu błony plazmatycznej [59].

W korzeniach łubinu rosnącego w warunkach niedoboru fosforu stwierdzono wzmoczoną ekspresję genu odpowiedzialnego za syntezę karboksylazy fosfoenolopirogronianowej oraz podwyższoną aktywność tego enzymu [39]. Korzenie te jednocześnie wydzielały do podłoża duże ilości kwasu cytrynowego i jabłkowego [39]. W warunkach deficytu fosforu w korzeniach fasoli wzrastała ponadto synteza i aktywność oddechowej oksydazy alternatywnej [40].

Obniżenie Pi w tkankach stymulowało aktywność genu kodującego jedną z dużych podjednostek enzymu uczestniczącego w syntezie skrobi – pirofosforylasy ADP-glukozy, nie miało natomiast wpływu na syntezę małej podjednostki karboksylazy rybulozo-1,5-bisfosforanu, kluczowego enzymu fotosyntezy [68]. Niedobór fosforu wzmagał ekspresję genu *Ugp* kodującego pirofosforylase UDP-glukozy oraz genu *ApS*, kodującego małą podjednostkę pirofosforylasy ADP-glukozy w tkankach *A. thaliana* [15, 17, 18]. Ekspresja genu *Sus1*, kodującego syntazę sacharozową nie ulegała zmianie [17]. Ekspresja *Sus1* i *Ugp* była wzmoczona natomiast w warunkach obniżonej temperatury, podwyższonego natężenia światła, suszy, a także po zranieniu liści [43]. Pirofosforylaza UDP-glukozy łącznie z syntazą sacharozy uczestniczą w produkcji UDP-glukozy w tkankach roślinnych, niezbędnej do syntezy sacharozy i polisacharydów ścian komórkowych, także do produkcji glikolipidów, glikoprotein i proteoglikanów [18, 43]. Deficyt fosforu wzmagał syntezę białka oraz aktywność pirofosforylasy UDP-glukozy w tkankach *A. thaliana* [15, 17], wzrastała również aktywność inwertazy (kwaśnych i obojętnych), syntazy sacharozowej i syntazy fosfosacharozowej w liściach i korzeniach fasoli [13]. Geny kodujące enzymy metabolizmu cukrowców, takie jak: syntaza sacharozy (*Sus1*), inwertazy (*Inv2*), pirofosforylaza UDP-glukozy (*Ugp*), pirofosforylaza ADP-glukozy (*ApL3*, *ApS*), były ponadto indukowane przez cukry [12, 17, 43]. Stwierdzono jednak, że u *A. thaliana* deficyt fosforu wzmagał ekspresję genu kodującego pirofosforylase UDP-glukozy niezależnie od poziomu sacharozy w tkankach i warunków świetlnych [18].

Ekspresję genów w warunkach niedoboru fosforu zaczęto ostatnio analizować za pomocą DNA-chipów/mikromacierzy DNA (ang. *cDNA microarray*) [92, 95]. W pierwszych tego typu badaniach, z użyciem korzeni pomidora (*Lycopersicon esculentum*), spośród przeanalizowanych 1280 genów roślin przeniesionych na pożywki płynne niezawierające składników mineralnych, 195 genów wykazywało zmiany w ekspresji w odpowiedzi na brak Pi [92]. Oprócz transporterów Pi i genów kodujących fosfatazy, aktywowane były geny kodujące czynnik transkrypcyjny Nitr (ang. *nutrient-induced transcription factor*), kinazy MAP (ang. *mitogen-activated protein kinase*) i białka 14-3-3. Indukcja genów następowała już po 1–3 godzinach niedoboru pierwiastków [92]. W korzeniach ryżu pozbawionych Pi przez 24 h zaobserwowano indukcję 15 genów i represję 23 genów [95]. Natomiast po 9 dniach wzrostu w warunkach niedoboru Pi wykazano wzmoczoną ekspresję 86 genów oraz obniżoną ekspresję 97 genów [95]. Funkcje wielu tych genów nie są jeszcze znane [95].

ODBIÓR I PRZEKAZANIE SYGNAŁU O NIEDOBORZE PI

Mimo wielu lat badań nadal nie ma jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, co jest sygnałem do zmian wywołanych deficytem fosforu, gdzie i jak sygnał jest odbierany i w jaki sposób jest przekazywana informacja. Sygnałem może być zarówno brak Pi w środowisku, jak i niedobór Pi w tkankach (korzenia lub pędu). Być może niezbędne jest obniżenie Pi w tkankach poniżej ściśle określonego poziomu krytycznego. Sygnałem mogą być też pewne pierwsze reakcje rośliny (lub ich brak) wywołane niedoborem Pi.

U roślin funkcjonują przynajmniej dwa mechanizmy odbierające i przekazujące sygnały o zmianie stężenia Pi (ang. *Pi signaling mechanisms*), dzięki którym utrzymują one równowagę w gospodarce fosforanowej (ang. *Pi homeostasis*). Jeden z nich działa na poziomie komórki (m.in. utrzymuje stały poziom Pi w puli cytozolowej kosztem puli wakuolarniej), drugi – w całym organizmie, lecz odbiór sygnału (i decyzja o odpowiedniej reakcji) zapada w korzeniu lub w pędzie [72, 73].

Jednym z typowych objawów deficytu fosforu jest zwiększenie zawartości cukrów w korzeniach roślin [11, 14, 19, 20, 93], między innymi w wyniku zwiększonego transportu sacharozy z pędu do korzenia (ryc. 1). Sygnałem prowadzącym do zwiększonej translokacji asymilatów, transmitowanym przez korzenie do pędu może być pewien krytyczny poziom Pi w tkance korzeni lub brak fosforu w pożywce. Umieszczenie części systemu korzeniowego w pożywce bez fosforu (*split root system*) na okres 8 dni prowadziło do obniżenia zawartości Pi w tej części korzenia, nie spowodowało natomiast typowych objawów deficytu fosforu: różnic we wzroście, gromadzenia cukrów ani zwiększonego transportu asymilatów z pędu do korzenia [19]. Sygnałem do zwiększenia transportu asymilatów z pędu do korzenia nie był więc jedynie brak fosforu w pożywce i obniżenie zawartości Pi w części systemu korzeniowego. Do wywołania wzrostu zapotrzebowania tkanek korzenia na asymilaty i uruchomienia transportu cukrów konieczne było obniżenie Pi w całym systemie korzeniowym i pędzie [19]. Podobne doświadczenia z rozdzielonym systemem korzeniowym pomidora wykazały, że ekspresja genu kwaśnej fosfatazy, *LEPS2*, była regulowana przez wewnętrzny poziom Pi w tkankach [3]. Ekspresja genu *Mt4* w korzeniach *Medicago truncatula* zależała natomiast od poziomu Pi w pędzie i wymagałaby hipotetycznego „czynnika pędowego” zdolnego do szybkiej translokacji [6]. Pobieranie Pi przez korzenie *Sesbania rostrata*, rośliny motylkowej pozostającej w symbiozie z bakteriami brodawkowymi, regulowane było również przez sygnał zależny od stężenia Pi w tkankach rośliny, a nie od zawartości Pi w glebie [2].

Typową reakcją na deficyt Pi są zmiany w morfologii korzeni, w tym wytworzenie specyficznych struktur o zwiększonej ilości drobnych korzeni bocznych, obficie pokrytych włosnikami (ang. *proteoid/cluster roots*) [39, 66, 67, 96]. Wiele gatunków roślin wykazywało taką odpowiedź już po kilkudziesięciu godzinach głodu fosforanowego [39, 67] lub po przeniesieniu części systemu korzeniowego do pożywki bez Pi [48]. Ponowne przeniesienie korzeni (lub ich części) do pożywki z fosforem powodowało szybki zanik *proteoid roots* [48, 67]. W tym przypadku sygnałem prowadzącym do zmian w morfologii korzeni był prawdopodobnie brak Pi w pożywce.

Fosforan nie musi być jednak bezpośrednim sygnałem prowadzącym do wszystkich obserwowanych zmian. Czasami bowiem, represja aktywności niektórych genów jest zjawiskiem wcześniejszym niż wzrost poziomu Pi w tkance u roślin, którym po uprzednim deficycie fosforu podano egzogenne Pi [1, 6].

W warunkach niedoboru Pi, K i Fe, już po godzinie od zadziałania stresu, indukowane były w korzeniach geny kodujące czynnik transkrypcyjny Ntft, kinazy MAP, kinazy MEK1 i białka 14-3-3, co sugeruje udział tych związków w odbiorze i transdukcji sygnału [92]. Badania te wykazały także, że percepcja sygnału o deficycie składników mineralnych następowała w komórkach korzenia [92]. Informacja o niedoborze Pi, odebrana przez specyficzny receptor, przekazywana jest prawdopodobnie przez podobne przekaźniki sygnałów (np. białko G, fosfolipazy, kaskady kinaz MAP) jak w przypadku innych stresów abiotycznych [12, 84]. Jednak w warunkach silnie obniżonego poziomu Pi w komórkach mogą ulegać zaburzeniu procesy fosforylacji, warunkujące prawidłowe funkcjonowanie transdukcji sygnału.

W przekazywaniu sygnału o deficycie Pi mogą uczestniczyć hormony roślinne: kwas abscysynowy (ABA), etylen, auksyny i cytokininy [1, 5, 47, 57, 79] (ryc. 3). Niedobór Pi w podłożu prowadzi do zwiększenia ilości, długości i gęstości włośników korzeniowych [66, 96], efektów regulowanych m.in. przez auksyny i etylen [81]. Sugeruje się również, że etylen może decydować o kształcie systemu korzeniowego, nachyleniu korzeni bocznych czy rozprzestrzenieniu włośników w podłożu (ang. *root architecture*) w odpowiedzi na niski poziom fosforu [5] (ryc. 3). López-Bucio i wsp. [54] wykorzystując mutanty *Arabidopsis*: etylenowe (*eto1*, *ein2*, *etr3*) i auksynowe (*axr1*, *axr2*, *axr4*, *aux1*) stwierdzili, że w przypadku zależnych od deficytu Pi zmian kształtu systemu korzeniowego większą rolę odgrywała wrażliwość korzenia na auksyny niż na etylen. Jednak doniesienia innych badaczy wykazały, że rozwój włośników i kształt korzeni nie zależy od sygnałów hormonalnych (auksyn i etylenu), a raczej od innych czynników zaangażowanych w regulację ekspresji genów odpowiedzialnych za rozwój strefy włośnikowej korzeni [82, 97].

W warunkach niedoboru Pi, w liściach *Arabidopsis*, wzrastała również ekspresja genu zależnego od poziomu ABA, *rab18* [16]. W innych doświadczeniach z mutantami *aba* (z obniżonym poziomem ABA) nie stwierdzono jednak zależności między deficytem Pi i poziomem ABA [89].

Typowym zjawiskiem w warunkach deficytu fosforu jest zwiększenie wartości stosunku korzeń/pęd (na rzecz systemu korzeniowego), ostatnio jednak stwierdzono, że równocześnie następuje obniżenie zawartości cytokinin w tkankach roślinnych. Egzogenne cytokininy hamowały ekspresję genu *At1PS1* u *Arabidopsis* oraz innych genów należących do rodziny *TPS11/Mt4*, indukowanych podczas niedoboru Pi [57]. Jednak cytokininy nie zmniejszały liczby i długości włośników korzeniowych, które przy deficycie fosforu występowały w zwiększonej ilości oraz były dłuższe niż u roślin rosnących w warunkach optymalnego żywienia fosforanowego [57]. Karthikeyan i wsp. [42] stwierdzili, że auksyny i cytokininy tłumią ekspresję genu *AtPT1*, kodującego białko przekaźnikowe o wysokim powinowactwie do Pi. Badacze zasugerowali, że fitohormony mogą pełnić dwojaką funkcję w procesie aklimatyzacji roślin do niedoboru

fosforu: uczestniczą w powiększeniu masy i powierzchni korzeni (np. poprzez reakcje szybkie), ale też mogą zmieniać ekspresję poszczególnych genów (ryc. 3) [42].

Zastosowanie analogów Pi – jonów fosforanowych(3), $H_2PO_3^-$ i HPO_3^{2-} (reszt kwasu ortofosforawego), określanych jako Phi (ang. *phosphite*, *phosphonate*) dostarczyło nowych danych do badań deficytu fosforu u roślin, zwłaszcza dotyczących percepcji Pi i przekazywania sygnału [1, 29, 86]. Phi wchodził w skład niektórych środków ochrony roślin (np. fungicydów), a także nawozów fosforowych i był często stosowany w rolnictwie [8]. Pomimo że jony Phi były intensywnie pobierane przez korzenie za pomocą transporterów Pi (podobnie jak Pi) i transportowane ksylemem (lub floemem, podczas remobilizacji fosforu), rośliny wyższe nie potrafiły asymilować Phi i wykorzystać ich w metabolizmie [91]. Podanie roślinom jonów HPO_3^{2-} w pożywce obniżało znacząco poziom Pi w tkankach i powodowało nagromadzenie Phi [7, 8]. Stwierdzono jednak, że Phi odwracał wiele procesów typowych dla deficytu fosforu, m.in. hamował indukcję i wydzielanie kwaśnych fosfataz oraz hamował zwiększone w warunkach niedoboru fosforu pobieranie Pi, a także hamował wzrost roślin, zwłaszcza korzeni, nawet w warunkach optymalnego zaopatrzenia w fosfor [7, 8, 86]. Phi okazał się selektywnym inhibitorem reakcji roślin na niedobór fosforu, a jego działanie zależało od stężenia [1]. Podanie roślinom zarówno Phi, jak i syntetycznych auksyn indukowało tworzenie w korzeniach struktur typu „*proteoid root*” [29]. Ostatnie badania wykazały, że zanim wystąpiły zmiany morfologiczne czy metaboliczne u roślin, Phi specyficznie hamował indukcję wielu genów znanych z podwyższonej ekspresji w warunkach deficytu fosforu: *LePT1*, *LePT2*, *AtPT1*, *AtPT2*, *LePS2*, *LePS3* i *TPSII* [91]. Użycie Phi może ponadto ułatwić selekcję mutantów o ściśle określonych, specyficznym odpowiedziach na niedobór fosforu u roślin hodowanych na podłożu zawierającym tylko organiczne źródło fosforu [1, 86].

MUTANTY FOSFORANOWE

Wyzolowanie mutantów fosforanowych przyczyniło się niewątpliwie do poszerzenia wiedzy o różnych sposobach reakcji roślin na deficyt Pi. Wiele mutantów może być także wykorzystanych w badaniach percepcji i transdukcji sygnału związanego z niedoborem Pi.

Oznaczając zawartość fosforu w tkankach tysięcy roślin wyizolowano dwa mutanty rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh.): *pho1*, z obniżonym poziomem Pi w pędzie (ok. 5% kontroli) [70] i *pho2*, z nadmiarem Pi w pędzie [25]. Mutacja *pho1* (chromosom 3) prowadzi do zaburzeń transportu Pi z korzenia do łodygi, prawdopodobnie podczas załadunku ksylemu, gdyż stężenie Pi w korzeniu mutantu jest podobne jak u roślin typu dzikiego [70]. Natomiast mutacja *pho2* (chromosom 2) zmienia regulację stężenia Pi w pędzie *Arabidopsis* i transport jonów fosforanowych (floemem) z pędu/liści do korzeni [24, 25]. Mutant *pho2* akumuluje Pi w liściach, łodydze, strąkach i nasionach, natomiast nie stwierdzono gromadzenia Pi w korzeniach [25]. Mutant *pho2* odznacza się jednak dwukrotnie wyższym tempem pobierania jonów fosforanowych

przez korzenie w porównaniu z roślinami kontrolnymi [27]. Mutant *pho2* jest bardzo podobny pod względem morfologicznym do roślin kontrolnych, natomiast mutant *pho1* wyraźnie wykazuje cechy rośliny pozostającej w warunkach deficytu Pi: zahamowany wzrost pędu i liści, ciemne zabarwienie liści rozetowych. Mutanty te są powszechnie stosowane w wielu badaniach nad aklimatyzacją roślin do deficytu fosforu [6, 15, 17, 28, 35, 36, 37], m.in. dzięki udostępnieniu ich w bankach nasion, np. w ABRC (*Arabidopsis Biological Resource Center*, <http://arabidopsis.org>). Pomimo tego że mutanty *pho1* mają znacznie obniżony poziom fosfatydyloglicerolu, ważnego składnika błon tylakoidowych, nie zmniejsza to jednak zdolności aklimatyzacyjnych tych roślin do różnych warunków świetlnych [36]. W warunkach deficytu fosforu fosfolipidy w błonach komórkowych mogą być zastąpione przez niektóre sulfolipidy lub galaktolipidy (*digalaktozylodiacylglycerol*, DGDG) związki nie zawierające fosforu [28, 35]. Badając mutanty *pho1*, stwierdzono, że obniżenie puli Pi może odgrywać istotną rolę w procesie aklimatyzacji układu fotosyntetycznego do niskich temperatur [37].

Ostatnio zidentyfikowano i scharakteryzowano gen *PHO1* u *A. thaliana* [32]; okazało się, że nie wykazuje on podobieństwa do żadnego ze znanych transporterów Pi oraz transporterów innych związków u roślin i grzybów. Ekspresję *PHO1* wykazano głównie w korzeniu (w pobliżu wiązek przewodzących) i dolnej części hypocotyła. Stwierdzono ponadto, że ekspresja tego genu jest indukowana w warunkach deficytu Pi [32]. Genom *A. thaliana* zawiera także 10 innych genów homologicznych do *PHO*. Autorzy tej pracy zasugerowali istnienie nowej, nieznanej dotychczas grupy białek *PHO1* uczestniczących w transporcie jonowym u roślin [32].

Stosując selekcję roślin na podstawie zróżnicowanej aktywności kwaśnych fosfataz w korzeniach opisano kolejne mutanty *A. thaliana*: *pup1* [88], *cps* [87] i *pho3* [99]. Mutant *pup1* (ang. *phosphatase underproducer*) nie ma jednej z izoform fosfatazy kwaśnej (mutacja w chromosomie 2); konsekwencją tego jest zmniejszenie sekrecji fosfataz zewnątrzkomórkowych do podłoża w warunkach niedoboru Pi [88]. Mutant *pup1* nie ma cech morfologicznych typowych dla rośliny z deficytem Pi, a zatem nie odróżnia się od roślin kontrolnych ani w warunkach optymalnego żywienia fosforanowego, ani podczas deficytu Pi [88, 90]. W podobnej selekcji uzyskano także mutanty *cps* (ang. *constitutive phosphatase secretors*) charakteryzujące się silniejszą indukcją aktywności kwaśnych fosfataz w korzeniach podczas deficytu Pi niż rośliny kontrolne [87, 90]. Mutanty te mogą być przydatne w badaniach mechanizmów decydujących o sekrecji fosfataz, a także innych odpowiedzi roślin na niedobór fosforu.

Najnowszy mutant z deficytem fosforu – *pho3* charakteryzuje się niższą aktywnością korzeniowych fosfataz kwaśnych niż rośliny kontrolne w warunkach optymalnego żywienia fosforanowego oraz brakiem indukcji ich aktywności podczas niedoboru fosforu [99]. Mutant *pho3* wykazuje typowe cechy rośliny z deficytem Pi: obniżony poziom Pi w tkankach (zwłaszcza w korzeniach), zahamowany wzrost pędu, gromadzenie antocyjanów oraz akumulację skrobi w liściach [99]. Autorzy sugerują jednak, że mutant *pho3* nie jest zdolny w pełni dostosować się do niedoboru fosforu z powodu braku transportera Pi lub/i składników szlaku transdukcji sygnału, niezbędnych do regulacji dostępności i dystrybucji fosforanów w roślinie [99].

Wyizolowano także mutanty kukurydzy i jęczmienia z obniżoną zawartością w nasionach kwasu fitynowego, *lpa* (ang. *low phytic acid*), związku będącego rezerwuarem fosforu w nasionach wielu gatunków roślin [71].

Interesującym sposobem selekcji mutantów okazało się zastosowanie do wzrostu roślin podłoża, w którym jedynym źródłem fosforu były kwasy nukleinowe. Wyizolowano w ten sposób szereg mutantów *A. thaliana* charakteryzujących się brakiem zdolności wzrostu na podłożu z DNA i/lub RNA i utylizacji kwasów nukleinowych, a które po przeniesieniu na podłoże zawierające nieorganiczne związki fosforu rozwijały się normalnie [9]. Jedną z linii mutantów, *psr1* (ang. *phosphate starvation response*) wykazywała znaczącą redukcję aktywności zależnych od deficytu Pi rybonukleaz i kwaśnych fosfataz. Autorzy uważają, że mutanty *psr1* mogą być ważnym narzędziem do badań szlaków transdukcji sygnału, funkcjonujących w odpowiedzi na niedobór Pi [9].

Wykorzystując rośliny transgeniczne *A. thaliana* z genem reporterowym specyficznie indukowanym przez deficyt Pi (*AtIPS1 :: GUS*) wyizolowano także mutanty *phr1* (ang. *phosphate starvation response*) wykazujące słabsze reakcje na deficyt fosforu [77]. Mutacja *phr1* obniżała m.in. ekspresję genu *AtPT1* (kodującego Pi transporter), *RNS1* (kodującego rybonukleazę), *AtACP5* (kodującego kwaśną fosfatazę 5) oraz syntezę antocyjanów u roślin hodowanych w warunkach niedoboru fosforu [77]. Ponadto, autorzy sklonowali gen *PHR1* z *A. thaliana*, który wykazywał wzmożoną ekspresję w warunkach deficytu Pi i podobieństwo do genu *PSR1* z *Chlamydomonas reinhardtii* [98]. Ekspresję *PHR1* stwierdzano także w warunkach optymalnego żywienia fosforanowego [77]. Poziom Pi w tkankach mutantu *phr1* był zawsze niższy niż u roślin kontrolnych wskazując na uczestnictwo genu *PHR1* w regulacji gospodarki fosforanowej (ryc. 3). Ponadto sekwencja wiążąca *PHR1* (ang. *PHR1-binding sequence*) była opisana w promotorach wielu znanych genów strukturalnych, których aktywacja jest zależna od deficytu Pi, co sugeruje udział tego białka w szlakach transdukcji sygnału [77].

PODSUMOWANIE

W okresie ostatnich kilku lat nastąpił ogromny postęp w badaniach regulacji gospodarki fosforanowej u roślin. Wprowadzono wiele nowych metod badawczych, scharakteryzowano geny uczestniczące w odpowiedzi roślin na niedobór Pi, wyselekcjonowano liczne mutanty oraz skonstruowano szereg roślin transgenicznych ułatwiających poznanie mechanizmów stymulujących bądź hamujących poszczególne drogi metaboliczne. Mimo to określenie sposobu percepcji bodźca i kolejnych etapów szlaku transdukcji sygnału o zmianach w poziomie/dostępności Pi okazało się zadaniem skomplikowanym i wymagającym wielu dalszych badań. Najprawdopodobniej w niektórych drogach odbioru/przekazywania sygnału uczestniczą hormony, a informacja o niedoborze Pi, odebrana przez specyficzny receptor, jest przekazywana przez przekaźniki sygnałowe, takie jak: białko G, fosfolipazy czy kaskady kinaz MAP. Należy

jednak pamiętać, iż w poznanych dotychczas szlakach przekazywania sygnałów ważnym składnikiem jest mechanizm fosforylacji i defosforylacji białek, w którym substratem jest Pi, ściśle limitowany w warunkach niedoboru fosforu w podłożu.

LITERATURA

- [1] ABEL S, TICCONI CA, DELATORRE CA. Phosphate sensing in higher plants. *Physiol Plant* 2002; **115**: 1–8.
- [2] AONO T, KANADA N, IJIMA A, OYAIZU H. The response of the phosphate uptake system and the organic acid exudation system to phosphate starvation in *Sesbania rostrata*. *Plant Cell Physiol* 2001; **42**: 1253–1264.
- [3] BALDWIN JC, KARTHIKEYAN AS, RAGHOTHAMA KG. *LEPS2*, a phosphorus starvation-induced novel acid phosphatase from tomato. *Plant Physiol* 2001; **125**: 728–737.
- [4] BARIOLA PA, HOWARD CJ, TAYLOR CB, VERBURG MT, JAGLAN VD, GREEN PL. The *Arabidopsis* ribonuclease gene *RNS1* is tightly controlled in response to phosphate limitation. *Plant J* 1994; **6**: 673–685.
- [5] BORCH K, BOUMA TJ, LYNCH JP, BROWN KM. Ethylene: a regulator of root architectural responses to soil phosphorus availability. *Plant Cell Environ* 1999; **22**: 425–431.
- [6] BURLEIGH SH, HARRISON MJ. The down-regulation of *Mt4*-like genes by phosphate fertilization occurs systematically and involves phosphate translocation to the shoots. *Plant Physiol* 1999; **119**: 241–248.
- [7] CARSWELL MC, GRANT BR, PLAXTON WC. Disruption of the phosphate-starvation response of oil-seed rape suspension cells by the fungicide phosphonate. *Planta* 1997; **203**: 67–74.
- [8] CARSWELL MC, GRANT BR, THEODOROU ME, HARRIS J, NIERE JO, PLAXTON WC. The fungicide phosphonate disrupts the phosphate-starvation response in *Brassica nigra* seedlings. *Plant Physiol* 1996; **110**: 105–110.
- [9] CHEN DL, DELATORRE CA, BAKKER A, ABEL S. Conditional identification of phosphate-starvation-response mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 2000; **211**: 13–22.
- [10] CHIOU T-J, LIU H, HARRISON M. The spatial expression patterns of a phosphate transporter (*MtPT1*) from *Medicago truncatula* indicate a role in phosphate transport at the root/soil interface. *Plant J* 2001; **25**: 281–293.
- [11] CIERESZKO I. Wzrost i metabolizm roślin w warunkach deficytu fosforu. *Kosmos* 2000; **49**: 179–189.
- [12] CIERESZKO I. Regulacyjna rola cukrów. Percepcja cukrów i przekazywanie sygnałów w komórkach roślinnych. *Post Biol Kom* 2002; **29**: 269–289.
- [13] CIERESZKO I, BARBACHOWSKA A. Sucrose metabolism in leaves and roots of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during phosphate deficiency. *J Plant Physiol* 2000; **156**: 640–644.
- [14] CIERESZKO I, JANONIS A, KOCIAKOWSKA M. Growth and metabolism of cucumber (*Cucumis sativus* L.) in phosphate-deficient conditions. *J Plant Nutrition* 2002; **25**: 1115–1127.
- [15] CIERESZKO I, JOHANSSON H, HURRY V, KLECZKOWSKI LA. Phosphate status affects the gene expression, protein content and enzymatic activity of UDP-glucose pyrophosphorylase in wild-type and *pho* mutants of *Arabidopsis*. *Planta* 2001; **212**: 598–605.
- [16] CIERESZKO I, KLECZKOWSKI LA. Effects of phosphate deficiency and sugars on expression of *rab18* in *Arabidopsis*: hexokinase-dependent and okadaic acid-sensitive transduction of the sugar signal. *Bioch Bioph Acta* 2002; **1579**: 43–49.
- [17] CIERESZKO I, KLECZKOWSKI LA. Ekspresja genów syntazy sacharozowej i pirofosforylasy UDP-glukozy w liściach *Arabidopsis thaliana* w warunkach zmiennego poziomu fosforu i sacharozy. *Zesz Probl Post Nauk Roln* 2002; **481**: 281–287.
- [18] CIERESZKO I, KLECZKOWSKI LA. Wpływ deficytu fosforu, cukrów i światła na ekspresję genu pirofosforylasy UDP-glukozy w liściach *Arabidopsis thaliana*. [w] Streszczenia XXXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Wrocław, 18–22 września 2002; 445.

- [19] CIERESZKO I, MILOSEK I, RYCHTER AM. Assimilate distribution in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) during phosphate deficiency. *Acta Soc Bot Pol* 1999; **68**: 269–273.
- [20] CIERESZKO I, RYCHTER AM. Zmiany metaboliczne w korzeniach wywołane deficytem fosforu. *Wiad Bot* 1995; **39**: 81–90.
- [21] DARAM P, AMRHEIN N, BUCHER M. Functional analysis and cell-specific expression of a phosphate transporter from tomato. *Planta* 1998; **206**: 225–233.
- [22] DARAM P, BRUNNER S, RAUSCH C, STEINER C, AMRHEIN N, BUCHER M. *Pht2;1* encodes a low-affinity phosphate transporter from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1999; **11**: 2153–2166.
- [23] DEL POZO JC, RUBIO V, LEYVA A, DE LA PEÑA A, PAZ-ARES J. A type 5 acid phosphatase gene from *Arabidopsis thaliana* is induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilising/oxidative stress conditions. *Plant J* 1999; **19**: 579–589.
- [24] DELHAIZE E, DONG B. Phosphorus mutants of *Arabidopsis*. [w] Phosphorus in Plant Biology: Regulatory Roles in Molecular, Cellular, Organismic, and Ecosystem Processes. Lynch JP, Deikmann J [red.] American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland USA. 1998: 242–251.
- [25] DELHAIZE E, RANDALL PJ. Characterization of a phosphate-accumulator mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 1995; **107**: 207–213.
- [26] DIETZ K-J, HARRIS GC. Photosynthesis under nutrient deficiency. [w] Pessaraki M [red.] Handbook of Photosynthesis. Marcel Dekker Inc, New York. 1997: 951–975.
- [27] DONG B, RENGEL Z, DELHAIZE E. Uptake and translocation of phosphate by *pho2* mutant and wild-type seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 1998; **205**: 251–256.
- [28] ESSIGMANN B, GÜLER S, NARANG RA, LINKE D, BENNING C. Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of *SQDI*, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 1950–1955.
- [29] GILBERT GA, KNIGHT JD, VANCE CP, ALLAN DL. Proteoid root development of phosphorus deficient lupin is mimicked by auxin and phosphonate. *Ann Bot* 2000; **85**: 921–928.
- [30] GNIAZDOWSKA A, MIKULSKA M, RYCHTER AM. Growth, nitrate uptake and respiration rate in bean roots under phosphate deficiency. *Biol Plant* 1998; **41**: 217–226.
- [31] GOLDSTEIN AH, BAERTLEIN DA, DANON A. Phosphate starvation stress as an experimental system for molecular analysis. *Plant Mol Biol Rep* 1989; **7**: 7–16.
- [32] HAMBURGER D, REZZONICO E, PETÉTOT J MD-COMBER, SOMERVILLE C, POIRIER Y. Identification and characterization of the *Arabidopsis PHO1* gene involved in phosphate loading to the xylem. *Plant Cell* 2002; **14**: 889–902.
- [33] HARAN S, LOGENDRA S, SESKAR M, BRATANOVA M, RASKIN I. Characterization of *Arabidopsis* acid phosphatase promoter and regulation of acid phosphatase expression. *Plant Physiol* 2000; **1124**: 615–626.
- [34] HARRISON MJ, DEWBRE GR, LIU J. A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* 2002; **14**: 2413–2429.
- [35] HÄRTEL H, DÖRMANN P, BENNING C. DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 10649–10654.
- [36] HÄRTEL H, ESSIGMANN B, LOKSTEIN H, HOFFMANN-BENNING S, PETERS-KOTTIG M, BENNING C. The phospholipid-deficient *pho1* mutant of *Arabidopsis thaliana* is affected in the organization, but not in the light acclimation, of the thylakoid membrane. *Bioch Bioph Acta* 1998; **1415**: 205–218.
- [37] HURRY V, STRAND Ľ, FURBANK R, STITT M. The role of inorganic phosphate in the development of freezing tolerance and the acclimatization of photosynthesis to low temperature is revealed by the *pho* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2000; **24**: 383–396.
- [38] HWANG I, CHEN H-C, SHEEN J. Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2002; **129**: 500–515.
- [39] JOHNSON JF, VANCE CP, ALLAN DL. Phosphorus deficiency in *Lupinus albus*. Altered lateral root development and enhanced expression of phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol* 1996; **112**: 31–41.
- [40] JUSZCZUK IM, RYCHTER AM. Regulacja aktywności oksydazy alternatywnej. *Post Biochem* 2001; **47**: 318–327.
- [41] KAFFMAN A, MILLER RANK N, O'NEILL EM, HUANG LS, O'SHEA EK. The receptor Msn5 exports the phosphorylated transcription factor Pho4 out of the nucleus. *Nature* 1998; **396**: 482–486.
- [42] KARTHIKEYAN AS, VARADARAJAN DK, MUKATIRA UT, D'URZO MP, DAMSZ B, RAGHOTHAMA KG. Regulated expression of *Arabidopsis* phosphate transporters. *Plant Physiol* 2002; **130**: 221–233.

- [43] KLECZKOWSKI LA, CIERESZKO I, JOHANSSON H, DÉJARDIN A. Transcriptional regulation of genes of UDP-glucose synthesis in *Arabidopsis*. [w] PS2001 Proceedings: 12th International Congress on Photosynthesis. CSIRO Publishing, Melbourne, Australia 2001; S24-004: 1–4.
- [44] KONDRACKA A, RYCHTER AM. The role of Pi recycling processes during photosynthesis in phosphate-deficient bean plants. *J Exp Bot* 1997; **48**: 1461–1468.
- [45] KOZŁOWSKA-SZERENOS B, ZIELIŃSKI P, MALESZEWSKI S. Involvement of glycolate metabolism in acclimation of *Chlorella vulgaris* cultures to low phosphate supply. *Plant Physiol Biochem* 2000; **38**: 727–734.
- [46] KÖCK M, THEIERL K, STENZEL I, GLUND K. Extracellular administration of phosphate-sequestering metabolites induces ribonucleases in cultured tomato cells. *Planta* 1998; **204**: 404–407.
- [47] KUIPER D, STAAL M. The effect of exogenously applied plant growth substances on the physiological plasticity in *Plantago major* pleiosperma. Responses of growth, shoot to shoot ratio and respiration. *Physiol Plant* 1987; **69**: 651–658.
- [48] LAMBERS H, SHANE MW. Cluster roots: an adaptation to extremely phosphate-impooverished soils. [w] Roubelakis-Angelakis KA [red.] 13th Cogress of the Federation of European Societies of Plant Physiology. Book of Abstracts. Hersonissos, Heraclion, Crete, Greece, 2–6 September 2002: 80.
- [49] LENBURG ME, O'SHEA EK. Signaling phosphate starvation. *Trends Bioch Sci* 1996; **21**: 383–387.
- [50] LIU C, MUCHHAL US, RAGHOTHAMA KG. Differential expression of *TPS11*, a phosphate starvation-induced gene in tomato. *Plant Mol Biol* 1997; **33**: 867–874.
- [51] LIU C, MUCHHAL US, UTHAPPA M, KONONOWICZ AK, RAGHOTHAMA KG. Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. *Plant Physiol* 1998; **116**: 91–99.
- [52] LIU H, TRIEU AT, BLAYLOCK LA, HARRISON M. Cloning and characterization of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots: regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Mol Plant - Microb Interac* 1998; **11**: 14–22.
- [53] LOHRMANN J, HARTER K. Plant two-component signaling systems and the role of response regulators. *Plant Physiol* 2002; **128**: 363–369.
- [54] LÓPEZ-BUCIO J, HERNÁNDEZ-ABREU E, SÁNCHEZ-CALDERÓN L, NIETO-JACOBO MF, SIMPSON J, HERRERA-ESTRELLA L. Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiol* 2002; **129**: 244–256.
- [55] MALBOOBI ML, HANNOUFA A, TREMBLAY L, LEFEBVRE DD. Toward an understanding of gene regulation during the phosphate-starvation response. [w] Phosphorus in Plant Biology: Regulatory Roles in Molecular, Cellular, Organismic, and Ecosystem Processes. Lynch JP, Deikmann J [red.] American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland USA. 1998: 215–228.
- [56] MALBOOBI ML, LEFEBVRE DD. A phosphate-starvation inducible β -glucosidase gene (psr. 3.2) isolated from *Arabidopsis thaliana* is a member of a distinct subfamily of the BGA family. *Plant Mol Biol* 1997; **34**: 57–68.
- [57] MARTIN AC, DEL POZO JC, IGLESIAS J, RUBIO V, SOLANO R, DE LA PEÑA A, LEYVA A, PAZARES J. Influence of cytokinins on the expression of phosphate starvation responsive genes in *Arabidopsis*. *Plant J* 2000; **24**: 559–567.
- [58] MIKULSKA M, BOMSEL J-L, RYCHTER AM. The influence of phosphate deficiency on photosynthesis, respiration and adenine nucleotide pool in bean roots. *Photosynthetica* 1998; **35**: 79–88.
- [59] MILLER SS, LIU J, ALLAN DL, MENZHUBER CJ, FEDOROVA M, VANCE CP. Molecular control of acid phosphatase secretion into the rhizosphere of proteoid roots from phosphorus-stressed white lupin. *Plant Physiol* 2001; **127**: 594–606.
- [60] MIMURA T. Homeostasis and transport of inorganic phosphate in plants. *Plant Cell Physiol* 1995; **36**: 1–7.
- [61] MIMURA T. Regulation of phosphate transport and homeostasis in plant cells. *Inter Rev Cytol* 1999; **191**: 149–200.
- [62] MITSUKAWA N, OKUMURA S, SHIRANO Y, SATO S, KATO T, HARASHIMA S, SHIBATA D. Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* high-affinity phosphate transporter gene in tobacco cultured cells enhances cell growth under phosphate-limited conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 7098–7102.
- [63] MUCHHAL US, PARDO JM, RAGHOTHAMA KG. Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 10519–10523.
- [64] MUCHHAL US, RAGHOTHAMA KG. Transcriptional regulation of plant phosphate transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 5868–5872.

- [65] MUKATIRA UT, LIU C, VARADARAJAN DK, RAGHOTHAMA KG. Negative regulation of phosphate starvation-induced genes. *Plant Physiol* 2001; **127**: 1854–1862.
- [66] NEUMANN G, MARTINOIA E. Cluster roots – an underground adaptation for survival in extreme environments. *Trends Plant Sci* 2002; **7**: 162–167.
- [67] NEUMANN G, MASSONNEAU A, MARTINOIA E, RÖMHELDT V. Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin. *Planta* 1999; **208**: 373–382.
- [68] NIELSEN TH, KRAPP A, RÖPER-SCHWARZ, STITT M. The sugar-mediated regulation of genes encoding the small subunit of Rubisco and the regulatory subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase is modified by phosphate and nitrogen. *Plant Cell Environ* 1998; **21**: 443–454.
- [69] NÜRNBERGER T, ABEL S, JOST W, GLUND K. Induction of an extracellular ribonuclease in cultured tomato cells upon phosphate starvation. *Plant Physiol* 1990; **92**: 970–976.
- [70] POIRIER Y, THOMA S, SOMERVILLE C, SCHIEFELBEIN J. A mutant of *Arabidopsis* deficient in xylem loading of phosphate. *Plant Physiol* 1991; **97**: 1087–1093.
- [71] RABOY V. The genetics of seed storage phosphorus pathways. [w] Phosphorus in Plant Biology: Regulatory Roles in Molecular, Cellular, Organismic, and Ecosystem Processes. Lynch JP, Deikmann J [red.] American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland USA. 1998: 192–203.
- [72] RAGHOTHAMA KG. Phosphate acquisition. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1999; **50**: 665–693.
- [73] RAGHOTHAMA KG. Phosphate transport and signaling. *Curr Opin Plant Biol* 2000; **3**: 182–187
- [74] RAO M. The role of phosphorus in photosynthesis. [w] Pessarakli M [red.] Handbook of Photosynthesis. Marcel Dekker, Inc, New York, 1997: 173–194.
- [75] RAUSCH C, BUCHER M. Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta* 2002; **216**: 23–37.
- [76] RAUSCH C, DARAM P, BRUNNER S, JANSA J, LALOIM, LEGGEWIE G, AMRHEIN N, BUCHER M. A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. *Nature* 2001; **414**: 462–466.
- [77] RUBIO V, LINHARES F, SOLANO R, IGLESIAS J, LEYVA A, PAZ-ARES J. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Develop* 2001; **15**: 2122–2133.
- [78] SADKA A, DEWALD DB, MAY GD, PARK WD, MULLET JE. Phosphate modulates transcription of soybean *VspB* and other sugar-inducible genes. *Plant Cell* 1994; **6**: 737–749.
- [79] SALAMA AMSE-DA, WAREING PF. Effects of mineral nutrition on endogenous cytokinins in plants of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J Exp Bot* 1979; **30**: 971–981.
- [80] SCHACHTMAN DP, REID RJ, AYLING SM. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol* 1998; **116**: 447–453.
- [81] SCHIEFELBEIN JW. Constructing a plant cell. The genetic control of root hair development. *Plant Physiol* 2000; **124**: 1525–1531.
- [82] SCHMIDT W, SCHIKORA A. Different pathways are involved in phosphate and iron stress-induced alteration of root epidermal cell development. *Plant Physiol* 2001; **125**: 2078–2084.
- [83] SMITH FW, EALING PM, DONG B, DELHAIZE E. The cloning of two *Arabidopsis* genes belonging to a phosphate transporter family. *Plant J* 1997; **11**: 83–92.
- [84] STĘPIEŃ K. Transdukcja sygnałów w komórce roślinnej pod wpływem stresów abiotycznych. *Post Biol Kom* 2002; **29**: 595–612.
- [85] THEODOROU ME, PLAXTON WC. Adaptation of plant respiratory metabolism to nutritional phosphate deprivation. [w] Smirnoff N [red.] Environment and Plant Metabolism. Flexibility and Acclimation. BIOS Scientific Publishers Ltd., 1995: 79–109.
- [86] TICCONI CA, DELATORRE CA, ABEL S. Attenuation of phosphate starvation responses by phosphite in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2001; **127**: 963–972.
- [87] TOMSCHA J, DEWALD A, LYNCH JP, GUILTINAN M, DEIKMAN J. Constitutive phosphatase secretion mutants in *Arabidopsis thaliana*. [w] Phosphorus in Plant Biology: Regulatory Roles in Molecular, Cellular, Organismic, and Ecosystem Processes. Lynch JP, Deikmann J [red.] American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland USA. 1998: 376–378.
- [88] TRULL MC, DEIKMAN J. An *Arabidopsis* mutant missing one acid phosphatase isoform. *Planta* 1998; **206**: 544–550.
- [89] TRULL MC, GUILTINAN MJ, LYNCH JP, DEIKMAN J. The responses of wild-type and ABA mutant *Arabidopsis thaliana* plants to phosphorus starvation. *Plant Cell Environ* 1997; **20**: 85–92.

- [90] TRULL MC, TOMSCHA J, DEIKMAN J. *Arabidopsis thaliana* mutants defective in the phosphorus-starvation response. [w] Phosphorus in Plant Biology: Regulatory Roles in Molecular, Cellular, Organismic, and Ecosystem Processes. Lynch JP, Deikmann J [red.] American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland U.S.A. 1998: 281–289.
- [91] VARADARAJAN DK, KARTHIKEYAN AS, MATILDA PD, RAGHOTHAMA KG. Phosphite, an analog of phosphate, suppresses the coordinated expression of genes under phosphate starvation. *Plant Physiol* 2002; **129**: 1232–1240.
- [92] WANG Y-H, GARVIN DF, KOCHIAN LV. Rapid induction of regulatory and transporter genes in response to phosphorus, potassium, and iron deficiencies in tomato roots. Evidence for cross talk and root/rhizosphere-mediated signals. *Plant Physiol* 2002; **130**: 1361–1370.
- [93] WANKE M, CIERESZKO I, PODBIELKOWSKA M, RYCHTER AM. Response to phosphate deficiency in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) roots. Respiratory metabolism, sugar localization and changes in ultrastructure of bean root cells. *Ann Bot* 1998; **82**: 809–819.
- [94] WANNER BL. Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. *J Cell Biochem* 1993; **51**: 47–54.
- [95] WASAKI J, YONETANI R, KURODA S, SHINANO T, YAZAKI J, FUJII F, SHIMBO K, YAMAMOTO K, SAKATA K, SASAKI T, KISHIMOTO N, KIKUCHI S, OSAKI M. Whole aspect of metabolic changes by phosphorus stress in rice plant roots. *Plant Cell Environ* 2003; **26** (w druku)
- [96] WATT M, EVANS JR. Proteoid roots. Physiology and development. *Plant Physiol* 1999; **121**: 317–323.
- [97] WILLIAMSON LC, RIBRIOUX SPCP, FITTER AH, LEYSER HMO. Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2001; **126**: 875–882.
- [98] WYKOFF DD, GROSSMAN AR, WEEKS DP, USUDA H, SHIMOGAWARA K. Pst1, a nuclear localized protein that regulates phosphorus metabolism in *Chlamydomonas*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 15336–15341.
- [99] ZAKHLENIUK OV, RAINES CA, LLOYD JC. *Pho3*: a phosphorus-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* 2001; **212**: 529–534.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 07.01.2003 r.

Przyjęto: 21.05.2003 r.

Adres autora: Świerkowa 20b, 15-950 Białystok

E-mail: icier@uwb.edu.pl

UDZIAŁ JĄDROWYCH RECEPTORÓW KSENOBIOTYKÓW W INDUKCJI CYTOCHROMÓW P450

THE ROLE OF NUCLEAR XENOBIOTIC RECEPTORS IN CYTOCHROME P450 INDUCTION

Janina KWIATKOWSKA-KORCZAK, Danuta KWIATKOWSKA

Zakład Biochemii Lekarskiej Akademii Medycznej we Wrocławiu

Streszczenie. Jądrowe receptory heterodimeryczne: konstytutywny receptor androstanu (CAR), receptor pregnanu X oraz receptor steroidów i ksenobiotyków (PXR/SXR) wiążą się z wieloma nieswoistymi ligandami, takimi jak endogenne toksyczne metabolity oraz egzogenne ksenobiotyki. Po aktywacji przez ligandy receptory mają zdolność indukcji i stymulacji ekspresji genów cytochromów P450. Swój miejsce odpowiedzi w DNA, rozpoznawane i wiązane przez receptor pregnanu X oraz receptor ksenobiotyków i steroidów występuje głównie w promotorze genów cytochromów *CYP3A*, zaś element odpowiedzi konstytutywnego receptora androstanu – w promotorze *CYP2A*. Obydwie rodziny cytochromów odgrywają główną rolę w metabolizmie ksenobiotyków oraz w procesach detoksykacji. Omawiane receptory są zlokalizowane w wątrobie i jelitach, tam gdzie mają miejsce reakcje detoksykacyjne. Opisano swoistość gatunkową obu receptorów, ich wybiórczość względem ligandów oraz wzajemne interakcje.

Słowa kluczowe: CAR, CYP3A, CYP2B, cytochromy P450, ksenobiotyki, PXR, SXR.

Summary: Heterodimeric nuclear receptors, constitutive androstane receptor (CAR), pregnane X receptor and steroid and xenobiotic receptor (PXR/SXR) bind unspecific ligands, such as toxic endogenous metabolites and exogenous xenobiotics. Activated by ligands, receptors are able to induce and stimulate expression of cytochrome P450 genes. Specific responsive elements in DNA, recognised and bound by pregnane X receptor and steroid and xenobiotic receptor is located mainly in the promoter of *CYP3A* genes and that of constitutive androstane receptor – in *CYP2B* genes. Both CYP families play central role in xenobiotic metabolism and processes of detoxication. Both receptors are colocalized with CYP2B and CYP3A in liver and intestine, where main detoxication reactions take place. Ligand and species specificity of receptors and their crosstalk is described.

Key words: CAR, cytochromes P450, CYP3A, CYP2B, PXR, SXR, xenobiotics.

WSTĘP

Niektóre produkty przemian oraz egzogenne substancje, takie jak: składniki pożywienia, leki, chemiczne zanieczyszczenia środowiska, mogą gromadzić się w toksycznych stężeniach w organizmie i stanowić dla niego zagrożenie. Kluczową rolę w metabolizmie i eliminacji tych substancji odgrywają cytochromy P450, zaliczane do monoooksygenaz zawierających hem. Enzymy te cechuje szerokie spektrum działania i mała swoistość substratowa. Występują one głównie w wątrobie i komórkach jelit. W procesach detoksykacji endogennych i egzogennych związków uczestniczą rodziny cytochromów CYP1, CYP2, CYP3 i CYP4, przede wszystkim izoformy CYP2B i CYP3A. Enzymy te cechuje szczególna właściwość: są one indukowane przez swoje substraty, w tym też obce ustrojowi ksenobiotyki. Na przykład aż 60% znanych leków ma zdolność indukcji transkrypcji genów *CYP*. Leki te są następnie rozkładane przez indukowane cytochromy, co zmniejsza skuteczność leczenia.

Liczne substancje aktywują ekspresję genów obu rodzin, np. *CYP2* i *CYP3*, ale też wiele ksenobiotyków działa wybiórczo. Klasycznym induktorem *CYP3A*, stosowanym przy jego identyfikacji, jest ryfampicyna. Syntezę tego cytochromu pobudza też wiele endogennych i syntetycznych steroidów, immunosupresorów oraz leków przeciwdepresyjnych. Z kolei barbiturany, między innymi fenobarbital indukują syntezę CYP2B [4, 29, 42, 44].

Zdolność indukcji syntezy cytochromów P450 przez ksenobiotyki nie jest cechą gatunkowo uniwersalną. Stwierdzono, że u człowieka i królika ryfampicyna jest silnym induktorem *CYP3A*, u myszy – słabym, podczas gdy u szczura jest nieaktywna. Z kolei pregnenolono-16- α -karbonitryl (PCN) jest pod tym względem bardzo aktywny u myszy i szczura, słabo zaś działa u człowieka i królika [4, 32]. Przyczyn tego zjawiska szukano w różnorodności izoform *CYP3A*, występujących u różnych gatunków zwierząt [2].

Mechanizmy indukcji cytochromów P450 przez ksenobiotyki oraz przyczyny gatunkowej swoistości stały się bardziej zrozumiałe po odkryciu receptorów jądrowych, wiążących nieswoiste ligandy. Nazwano je odpowiednio: konstytutywnym receptorem androstanu (*constitutive androstane receptor*, CAR), receptorem pregnanu X (*pregnane X receptor*, PXR) i receptorem steroidów i ksenobiotyków (*steroid and xenobiotic receptor*, SXR). Te dwa ostatnie okazały się odpowiednikami tego samego typu receptora, tylko występującego u różnych gatunków zwierząt, stąd często używa się w piśmiennictwie określenia PXR/SXR [3, 42]. Receptory ksenobiotyków, podobnie jak wiele innych receptorów jądrowych są przedstawicielami nadrodziny czynników transkrypcyjnych indukowanych przez ligandy. Zakwalifikowano je do rodziny NR1.

BUDOWA I FUNKCJA RECEPTORÓW RODZINY NR1

W skład rodziny NR1 wchodzi między innymi: receptor tyroksyny, receptor kwasu retinowego, receptor witaminy D₃ oraz liczne receptory sieroco o nieznanym dotąd ligandach [20, 30]. Rodzinę tą cechuje wiele wspólnych właściwości strukturalnych i

funkcjonalnych. W odróżnieniu od receptorów hormonów steroidowych, które są homodimerami, NR1 wykazują aktywność jako heterodimery, przy czym stałym składnikiem dimerów jest zawsze receptor kwasu 9-*cis*-retinowego (receptor X retinoidów, *retinoid X receptor*, RXR) .

W każdym monomerze receptora można wyróżnić kilka domen funkcjonalnych. W obszarze końca karboksylowego znajduje się domena wiążąca ligand, LBD (*ligand binding domain*), która uczestniczy także w dimeryzacji oraz aktywacji transkrypcji docelowego genu. W tej ostatniej funkcji biorą udział także domeny końca aminowego. Bardzo istotna rola przypada domenie wiążącej DNA (*DNA binding domain*, DBD), odznaczającej się wysoką homologią w obrębie całej rodziny NR1. Domena ta rozpoznaje i wiąże się ze specyficzną sekwencją DNA w tzw. regionie odpowiedzi, zwanym HRE (*hormone responsive element*), utworzonym przez dwa heksanukleotydy AGGTCA. Swoistość wiązania danego heterodimeru determinuje liczba nukleotydów, rozdzielających oba heksanukleotydy oraz sposób ich wzajemnego ułożenia. Mogą one występować w konfiguracji DR, czyli jako proste powtórzenie, (AGGTCA)*n*AGGTCA), IR, czyli powtórzenie palindromowe, (AGGTCA)*n*(ACTGGA) lub ER, powtórzenie odwrócone (ACTGGA)*n*AGGTCA), gdzie *n* oznacza liczbę nukleotydów rozdzielającą obydwa heksanukleotydy. Konfiguracja HRE, rozpoznająca receptory ksenobiotyków jest zgodna z tym wzorcem, ale może się różnić w zależności od gatunku zwierzęcia. Np. HRE receptora CAR może przybierać konfigurację DR-5, DR-3, IR-6, lub ER-6, a PXR/SXR – DR-3, DR-4 i IR-6 [24, 25].

Po związaniu ligandów przez oba monomery receptora następuje ich dimeryzacja i połączenie z HRE w DNA. Domeny LBD receptora mogą się wtedy połączyć z odpowiednimi koaktywatorami transkrypcji (np. SRC1), albo też zachodzi dysocjacja związanych z tą domeną inhibitorów transkrypcji. Prowadzi to do interakcji z kompleksem koaktywatorów (np. CBP/p300) i aktywacji transkrypcji docelowego genu, w którego promotorze lokuje się dany HRE. Aktywacja receptora może wywołać też represję genu. W tym przypadku zachodzi asocjacja receptora z represorami SMRT i N-CoR [24, 34, 38].

Zgodnie z przyjętą klasyfikacją rodziny receptorów NR1, PXR/SXR określa się jako NR112, a CAR – NR113.

HRE receptorów CAR znaleziono w promotorach genów *CYP2B*, zaś HRE PXR/SXR – w promotorach *CYP3A* oraz *CYP7a1* .

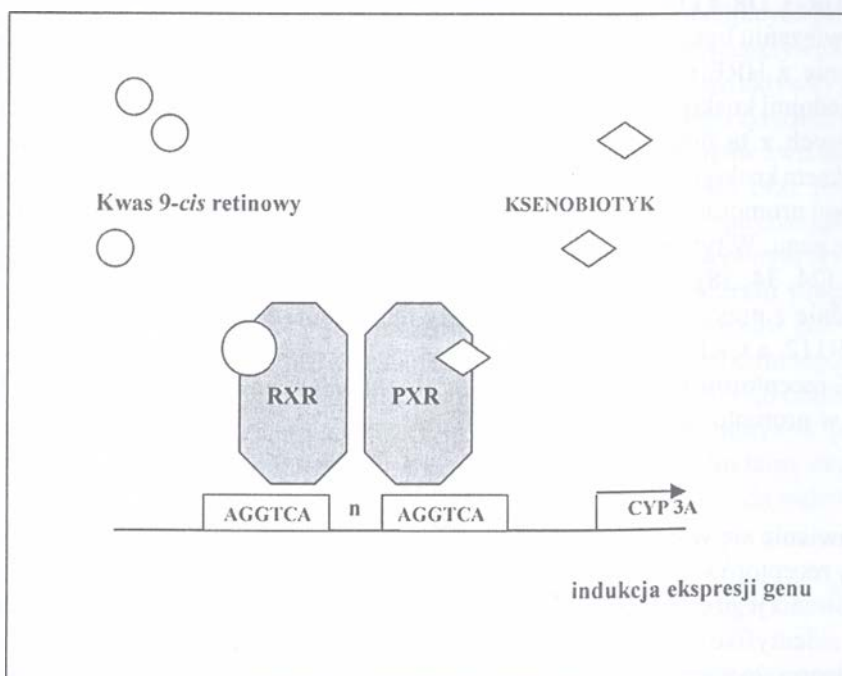
PXR/SXR

Pojawienie się w bazie danych GenBank mysiego genu nowego przedstawiciela rodziny receptorów jądrowych NR1 skłoniło grupę badaczy w 1998 r. do izolacji genu i sklonowania jego całkowitego cDNA. Testując szereg znanych związków organicznych w celu zidentyfikowania potencjalnych ligandów i aktywatorów otrzymanego białka stwierdzono, że wiąże się ono ze steroidami C21 i tworzy dimery z RXR. Nadano mu nazwę receptoru pregnanu X, PXR (*pregnane X receptor*) [22]. Początkowo szukano swoistego endogenego liganda PXR, ale okazało się, że receptor wiąże się z jednakowym powinowactwem z całą gamą steroidów, naturalnych i syntetycznych

zarówno agonistów, jak i antagonistów znanych hormonów steroidowych. Znalezienie sekwencji HRE receptora w promotorze genu cytochromu CYP3A myszy skierowało poszukiwania w inną stronę.

Prawie równocześnie z mysim PXR, u człowieka również odkryto receptor aktywowany przez steroidy C18, C19 i C21, indukujący ekspresję *CYP3A* w hepatocytach człowieka [3]. Postała wtedy koncepcja „sensora steroidów”, przypisująca steroidom stymulację reakcji detoksykacyjnych z udziałem receptora jądrowego i cytochromów P450. Koncepcja ta uległa modyfikacji, gdy okazało się, że ligandami receptora są też liczne ksenobiotyki o niesteroidowej budowie. Znaleziony u człowieka odpowiednik PXR uzyskał nazwę receptora steroidów i ksenobiotyków, SXR (*steroid and xenobiotic receptor*) [4, 5]. Na rycinie 1 przedstawiono schemat działania PXR.

Do ligandów PXR/SXR zalicza się liczne substancje chemiczne, indukujące syntezę CYP3A, między innymi wiele powszechnie stosowanych leków, takich jak: lowastatyna, ryfampicyna, deksametazon, ibupren, cyklosporyna, chemoterapeutyki stosowane w leczeniu nowotworów [14, 33]. Indukowane CYP wykazują bardzo niską swoistość wobec substratów, dlatego też określony ligand PXR/SXR stymuluje rozkład wielu innych substancji, między innymi endogennych hormonów steroidowych i leków o odmiennej budowie [21]. Ma to ogromne znaczenie przy jednoczesnym podawaniu różnych leków, z których jeden jest ligandem SXR. Np. hiperforyna, roślinny lek antydepresyjny może pobudzać rozkład doustnych środków antykoncepcyjnych,



RYCINA 1. Mechanizm działania heterodimeru RXR/PXR. Po związaniu ligandów przez oba monomery receptora następuje ich dimeryzacja, a następnie połączenie ze specyficzną sekwencją w DNA zwaną HRE, co w efekcie prowadzi do indukcji ekspresji genu

immunosupresora cyklosporyny czy inhibitora proteazy HIV, indinawiru. Wykazano, że hiperforyna indukuje *CYP3A4* w hodowli ludzkich hepatocytów [29].

Zdolność wiązania i aktywacji PXR przez dany ksenobiotyk na ogół koreluje z potencjałem indukcji *CYP3A4*, co wykazano w hodowli ludzkich hepatocytów. Ryfampicyna, silny aktywator PXR znacząco zwiększa ekspresję *CYP*, deksametazon działa pod oboma względami słabiej, a metotreksat o bardzo słabej sile wiązania receptora nie indukuje ekspresji *CYP* [26].

SXR ma szczególne, wielokierunkowe działanie w procesach detoksykacji endogennego kwasu litocholowego, który gromadzi się w wątrobie pacjentów z cholestazą, wywołując uszkodzenie tego narządu i zaburzenia wchłaniania lipidów. Podobnie jak inne steroidy, kwas litocholowy aktywuje SXR i indukuje syntezę *CYP3A4*, a następnie jest utleniany przez ten cytochrom [23, 45]. Co ciekawe, SXR reguluje też syntezę innego cytochromu, *CYP7a1*, pierwszego, kluczowego enzymu syntezy kwasów żółciowych. Hamując syntezę *CYP7a1* receptor wpływa na zmniejszenie produkcji kwasów żółciowych, w tym toksycznego kwasu litocholowego. Aktywacja SXR przez litocholan ogranicza zarazem transport cholesterolu w jelitach, gdyż obniża syntezę transportera organicznych anionów-2 [35].

Wyizolowano geny odpowiedzialne za syntezę receptorów PXR/SXR z wątroby szczura, królika i kurczęcia. Sklonowano i scharakteryzowano właściwości ich białkowych produktów [1, 32]. U kurczęcia występuje tylko jeden typ receptora ksenobiotyków – kurzy receptor X, CXR (*chicken X receptor*) indukujący cytochrom *CYP2H1*. Uważa się, że CXR może być formą macierzystą, z której drogą dywergencji powstały PXR i CAR [15].

Receptory PXR/SXR znaleziono w wątrobie wszystkich gatunków zwierząt i człowieka, tam gdzie stwierdza się obecność *CYP3A*. Tworzą one dimery z RXR i wiążą się z elementami odpowiedzi, które mogą różnić się w zależności od gatunku. U człowieka HRE dla receptora SXR o konfiguracji DR-3 znajduje się w promotorze genu *CYP3A4*, podczas gdy u królika HRE receptora PXR wykazano w promotorze genu *CYP3A6*. U myszy w promotorze genu *CYP3A11* element odpowiedzi ma konfigurację typu DR-4, natomiast u szczura w promotorze genu *CYP3A23* HRE ma postać ER-6 [2, 44]. Doświadczenia przeprowadzane na transfekowanych komórkach HepG2 wykazały, że opisany wyżej element odpowiedzi na PXR, aktywowany przez ryfampicynę mieści się w pozycji –160 promotora genu *CYP3A4*. Ten bliższy element jest konieczny, ale nie wystarcza on do maksymalnej aktywacji ekspresji genu. Potrzebny jest do tego HRE dalszy, leżący w pozycji około –7800–7200 [7, 12].

Receptory PXR pochodzące z różnych gatunków zwierząt, jak i ich ludzkie odpowiedniki receptory SXR odznaczają się stosunkowo niską homologią wzajemną (70%) w porównaniu z innymi receptorami rodziny NR1. Zdaniem wielu autorów świadczy to ich znacznej zmienności w procesie ewolucji [31].

Stwierdzono, że PXR i SXR niejednokrotnie różnią się powinowactwem do ksenobiotyków. Np. fitoestrogeny, kortykosteron i ryfampicyna silnie aktywują ludzki SXR, a bardzo słabo – mysz PXR. Odwrotnie jest w przypadku PCN i deksametazonu, silnych aktywatorów PXR, a znacznie słabszych – SXR [5]. Różnice gatunkowe

należy mieć na uwadze przy testowaniu na zwierzętach leków i innych substancji, na które narażony jest człowiek. Tak było w przypadku bifenolu A, składnika wielu produktów handlowych, który nie wiąże się z PXR myszy i nie indukuje u nich *CYP3A*, a jest induktorem *CYP3A4* u ludzi [39].

U myszy *pxr* (-/-), pozbawionych *locus pxr*, deksametazon i PCN nie indukują ekspresji *CYP3A11*. Zastąpienie genu *pxr* u tych myszy genem ludzkiego receptora SXR w pełni przywraca zdolność indukcji *CYP3A11*, ale z farmakologicznym profilem wrażliwości na inne ligandy, właściwym ludzkiemu SXR [43]. Doświadczenia na myszach *pxr* (-/-) i transgenicznych SXR +/+ potwierdziły pogląd głoszący, że aktywacja receptora za pomocą jednego liganda pobudza metabolizm i detoksykację innych substancji [45].

CAR

Receptor CAR, podobnie jak pozostałe receptory ksenobiotyków wykazuje relatywnie niską specyficzność i dlatego może być aktywowany przez szeroki zakres strukturalnie różnych związków chemicznych. Znajdowany przede wszystkim w wątrobie tworzy heterodimery z receptorem RXR i uważany jest za główny mediator indukcji syntezy cytochromu P4502B. W odróżnieniu od klasycznych receptorów jądrowych wymagających ligandów do swojej aktywności transaktywacyjnej, konstytutywna aktywność CAR wynika z niezależnych od ligandów oddziaływań z koaktywatorami zaangażowanymi w proces transkrypcji. Za proces transaktywacji zarówno zależnej, jak i niezależnej od liganda odpowiedzialny jest konserwatywny motyw AF-2 znajdujący się w domenie wiążącej ligand (LBD), w karboksylowym końcu łańcucha polipeptydowego receptora.

Poszukując potencjalnych ligandów receptora CAR stwierdzono, że androstenol (5 α -androst-16-en-3 α -ol) i androstanol (5 α -androstan-3 α -ol) hamują jego konstytutywną aktywność. Efekt hamowania aktywności receptora CAR zaobserwowano przy stężeniach ligandów nieco wyższych niż fizjologiczne, miał on charakter stereospecyficzny, gdyż odnosił się jedynie do związków zredukowanych w pozycji 5 α i mających grupę hydroksylową w pozycji 3 α . Dalsze badania wykazały, że zarówno androstenol, jak i androstanol nie wpływały na tworzenie heterodimerów ani ich wiązanie z DNA, lecz efekt hamujący polegał na uwalnianiu koaktywatorów oddziałujących z LBD receptora. Wydaje się, że w tym przypadku CAR zachowuje się inaczej niż klasyczne receptory jądrowe, gdzie wiązanie liganda powodowało zmiany konformacyjne obszaru AF-2 prowadzące do przekształcenia go w postać aktywną, zdolną do oddziaływania z koaktywatorami. Można przypuszczać, że CAR zachowuje aktywną konformację AF-2 w nieobecności liganda, a wiązanie pochodnych androstanu przesuwą równowagę w kierunku konformacji nieaktywnej, niezdolnej do oddziaływania z koaktywatorami, powodując ich odłączenie i w rezultacie hamowanie aktywności transkrypcyjnej receptora CAR [10].

Najlepiej poznanymi czynnikami wzmagającymi transkrypcję genu *CYP2B*, odpowiedzialnego za syntezę cytochromu P4502B, są związki z grupy fenobarbituranów (PB), do których należy między innymi 1,4-bis-[2(3,dichloropirydyloksy)]benzen

(TCPOBOP). Stwierdzono, że związki chemiczne należące do tej grupy mogą wzmacniać także transkrypcję szeregu innych genów *CYP*: 2A, 2C, 3A oraz genów odpowiedzialnych za syntezę niektórych enzymów, takich jak: transferazy czy enzymy biorące udział w metabolizmie hemu.

Stwierdzono, że zarówno u myszy nienarażonych na obecność PB, jak i w hodowlach hepatocytów receptor CAR znajdujący jest w cytoplazmie. Podanie zwierzętom PB jak również jego obecność w hodowlach hepatocytów powoduje translokację receptora do jądra komórkowego, wiązanie się jako heterodimeru CAR/RXR z odpowiednią sekwencją odpowiedzi w DNA tzw. HRE, w tym przypadku nazywaną PBRE (*phenobarbital-responsive element*), co prowadzi do wzmożonej transkrypcji genu *CYP2B* [17, 19]. Translokacji CAR do jądra komórkowego nie zaobserwowano w hodowlach hepatocytów w obecności inhibitora fosfatazy białkowej – kwasu okadainowego. Można więc przypuszczać, że proces fosforylacji i defosforylacji może być jednym z czynników regulujących translokację CAR do jądra komórkowego i stanowić jeden ze sposobów regulacji transkrypcji [19].

Niezbędny w procesie translokacji wydaje się być fragment karboksylowego końca receptora. Wprawdzie utrata 10 końcowych reszt aminokwasowych nie ma wpływu na ten proces, to jednak usunięcie 30 aminokwasowych reszt uniemożliwia translokację. Niezbędna jest również obecność trzech reszt leucynowych (Leu 313, 316 i 319) w tym fragmencie receptora [46]. Jakkolwiek sam proces transaktywacji z udziałem receptora CAR nie został jeszcze całkowicie wyjaśniony, wyizolowano i zbadano region wzmacniacza obejmujący 132 pary zasad znajdujący się w dalszym regionie promotora genu *CYP2B*. Stwierdzono, że w procesie indukcji transkrypcji mysiego genu *cyp2b* przez różne związki z grupy fenobarbituranów, w oddziaływaniu heterodimeru CAR/RXR z DNA uczestniczy region składający się z 51 par zasad zwany PBREM (*PB responsive enhancer module*) zawierający sekwencję PBRE (*phenobarbital response element*) o konfiguracji DR-4 [16]. PBREM znajduje się w regionie od –2339 do –2289 par zasad, i zawiera dwa potencjalne miejsca wiążące dla receptorów jądrowych oraz jedno dla NF1 [17]. Sekwencję PBREM składającą się z 51 par zasad o podobnej funkcji zidentyfikowano również w ludzkim genie *CYP2B6* [36].

Stwierdzono, że aktywność transaktywacyjna receptora CAR znacznie wzrasta w obecności TCOBOP. O tym, że TCOPOP jest ligandem i aktywatorem receptora CAR, świadczy jego zależne od stężenia działanie prowadzące do osłabienia hamującego efektu wywoływanego przez androstany, bezpośrednia stymulacja interakcji domeny wiążącej ligand receptora CAR z koaktywatorami, obserwowana *in vivo* i *in vitro* oraz fakt, że mutacje w domenie wiążącej ligand hamują nie tylko inhibitorowy efekt androstanów, lecz także stymulujące działanie TCOBOP. Ponieważ mutacje nie hamują konstytutywnej aktywności CAR, można uważać, że aktywność ta jest rzeczywiście niezależna od ligandu [40].

Ostatnie doniesienia wskazują, że receptor CAR różni się nieco w swojej budowie od innych receptorów jądrowych. Ma krótką pętlę pomiędzy fragmentem o strukturze α helisy i domeną transaktywacyjną oraz nieco krótszą alfa-helisę w regionie karboksylowego końca łańcucha. Te zmiany powodują możliwość przyjęcia przez

domenę transaktywacyjną w nieobecności liganda aktywnej konformacji, charakterystycznej dla receptorów aktywowanych przez ligandy [8].

Aktywność receptora CAR zarówno konstytutywna, jak i wzmożona, indukowana przez PB może mieć znaczenie praktyczne. Nie zaobserwowano aktywacji ekspresji genu *CYP2B* w obecności PB jak również TCOBOP u myszy pozbawianych genu CAR. Takie zwierzęta charakteryzują się znacznie wolniejszym metabolizmem wielu związków. Podawanie myszom określonej dawki zoksazolaminy wywołuje u nich porażenie trwające kilka godzin. Podanie PB przed zoksazolaminą chroniło zwierzęta przed porażeniem. Myszy pozbawione receptora CAR pozostawały sparaliżowane, nawet wówczas gdy przed zoksazolaminą podano im PB czy TCOBOP [41].

Obecność induktorów z grupy PB może być niekorzystna, prowadzić do zwiększonej wrażliwości na różne toksyny i wzmacniać hepatotoksyczność niektórych związków, takich jak np. kokaina. Powstające z kokainy w wyniku działania monoooksygenaz związki wiążą się z białkami hepatocytów prowadząc do śmierci komórki [6].

Uważa się, że receptor CAR może odgrywać kluczową rolę w regulacji metabolizmu acetaminofenu. Obecność aktywatorów CAR oraz duże dawki acetaminofenu mogą prowadzić do powstania związków toksycznych i uszkodzenia wątroby. Hamowanie aktywności CAR przez podanie pochodnych androstanu godzinę przed acetaminofenem hamuje powstawanie toksycznych metabolitów acetaminofenu [47].

Receptory ksenobiotyków mają też wpływ na usuwanie obcych substancji z komórki. Aktywatory SXR, np. taksol, indukują ekspresję genu *MDR1* (*multidrug resistance*). Lek przeciwnowotworowy ET 743, który okazał się inhibitorem SXR, jest supresorem *MDR1* [37, 44]. W hepatocytach gryzoni, poddanych działaniu ligandów PXR i CAR, obserwowano znaczne zwiększenie zawartości mRNA białka MRP2 (*multidrug resistance-associated protein 2*). Białko to uczestniczy w usuwaniu sprzężonych związków chemicznych, powstających w procesie detoksykacji z hepatocytów do kanalików żółciowych [18].

WSPÓLDZIAŁANIE RECEPTORÓW JĄDROWYCH W INDUKCJI CYP

Początkowo wydawało się, że istnieje wyraźny podział funkcji między aktywatorami PXR/SXR, uznanego za induktora *CYP3A* i ligandami CAR stymulatora *CYP2B*. Dalsze badania obejmujące szeroki wachlarz badanych leków wykazały jednak, że wiele z nich ma powinowactwo do obu receptorów [15]. W wielu przypadkach PXR/SXR i CAR rozpoznają nakładające się na siebie elementy odpowiedzi w promotorach obu rodzin cytochromów – *CYP3A* i *CYP2B*. Np. w pierwotnych kulturach hepatocytów człowieka ekspresja genów *CYP2B6* była indukowana przez szereg typowych aktywatorów SXR, takich jak: ryfampicyna, hiperworyna, deksametazon i inne. SXR wiązał się w regionie wzmacniacza *CYP2B6* z elementem odpowiedzi CAR [13]. Tak

więc w wielu przypadkach można mówić o małej wybiórczości zarówno receptorów względem ligandów, jak i promotorów genów cytochromów względem receptorów.

Coraz więcej faktów przemawia za tym, że cytochromy P450 mogą podlegać regulacji nie tylko przez PXR/SXR i CAR, ale także przez inne receptory jądrowe. Np. wątrobowy receptor X, LXR (*liver X receptor*) wiążący oksysterole działa konkurencyjnie z receptorami ksenobiotyków, znosząc ich wpływ na ekspresję *CYP3A* i *CYP2B*. Przypuszczalnie LXR wiąże się z elementami odpowiedzi SXR i CAR w promotorach tych genów [15]. Receptor witamin D₃, VDR (*vitamin D₃ receptor*) rozpoznaje HRE o konfiguracji DR-3, DR-4 i ER-6 i może konkurować z wiązaniem receptorów ksenobiotyków w promotorach *CYP*. VDR indukuje ekspresję *CYP3A4* oraz w słabszym stopniu *CYP2B6* i *CYP2C9*. Działanie to wymaga połączenia VDR z dwoma elementami odpowiedzi – bliższym ER-6 i dalszym DR-3 [7].

Istnieją też wzajemne powiązania między receptorem glukokortykoidów, GR (*glucocorticoid receptor*) i receptorami ksenobiotyków. W promotorze *CYP2C9* znajdują się dwa elementy odpowiedzi: HRE dla PXR i CAR w regionie -1803-1818 oraz dla GR w regionie -1662-1676. Cytochrom ten jest indukowany przez glukokortykoidy, deksametazon, ryfampicynę i fenobarbital. Autorzy sądzą, że właściwymi induktorami *CYP2C9* są glukokortykoidy, a ksenobiotyki – jedynie dodatkowymi [11]. Glukokortykoidy aktywują PXR/SXR i tą drogą indukują *CYP3A4*. Wydaje się jednak, że mogą one działać także w sposób niezależny od tych receptorów [9].

Wspólnym elementem mechanizmu transaktywacji receptorów hormonów steroidowych i CAR jest ich oddziaływanie z koaktywatorem p160. Białko GRIP1 (*glucocorticoid receptor-interacting protein 1*), współdziałające z p160 ma zdolność wiązania się *in vitro* i *in vivo* z CAR, pobudzając jego translokację do jądra i aktywację. Być może GRIP1 uczestniczy w konstytutywnej aktywności CAR [27]. Natomiast receptor estrogenów wydaje się konkurować z CAR o p160. Stąd wniosek, że przy ograniczonej zawartości p160 w komórce ksenobiotyki mogą zakłócać działanie fizjologiczne estrogenów [28].

Poznanie mechanizmów degradacji ksenobiotyków przez cytochromy P450 stanowi ważne zagadnienie poznawcze i praktyczne. Jego znaczenie wzrasta wobec narastającego skażenia środowiska substancjami chemicznymi. W medycynie znajomość podatności leków na utlenianie pozwala określić skuteczność działania i możliwość jednoczesnego stosowania leków. Wyjaśnienie udziału receptorów jądrowych w indukcji cytochromów znacząco przyczyniło się do poznania mechanizmów degradacji ksenobiotyków, a w perspektywie może pozwolić na regulowanie tego procesu przez człowieka.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BAADER M, GNERRE C, STEGEMAN JJ, MEYER UA. Transcriptional activation of cytochrome p450 CYP2C45 by drugs is mediated by the chicken xenobiotic receptor (CXR) interacting with a phenobarbital response enhancer unit. *J Biol Chem* 2002; **277**: 15647-15653.

- [2] BARWICK JL, QUATTROCHI LC, MILLS AS, POTENZA C, TUKEY RH, GUZELIAN PS. Trans-species gene transfer for analysis of glucocorticoid-inducible transcriptional activation of transiently expressed human CYP3A4 and rabbit CYP3A6 in primary cultures of adult rat and rabbit hepatocytes. *Mol Pharmacol* 1996; **50**: 10–16.
- [3] BERTILSSON G, HEIDRICH J, SVENSSON K, ASMAN M, JENDEBERG L, SYDOW-BACKMAN M, OHLSSON R, POSTLIND H, BLOMQUIST P, BERKENSTAM A. Identification of human nuclear receptor defines a new signalling pathway for CYP3A induction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 12208–12213.
- [4] BLUMBERG B, EVANS RM. Orphan nuclear receptors – new ligands and new possibilities. *Genes Dev* 1998; **12**: 3149–3155.
- [5] BLUMBERG B, SABBAGH W Jr, JUGUILON H, BOLADO J jr, van METER CM, ONG ES, EVANS RM. SXR, a novel steroid and xenobiotic sensing nuclear receptor. *Genes Dev* 1998; **12**: 3195–3205.
- [6] DORNHEIM LM. Effect of cytochrome P450 inducers on cocaine-mediated hepatotoxicity. *Toxicol App Pharmacol* 1998; **150**: 158–165.
- [7] DROCOURT L, OURLIN JC, PASCUSI JM, MAUREL P, VILAREM MJ. Expression of CYP3A4, CYP2B6 and CYP2C9 is regulated by the vitamin D receptor pathway in primary human hepatocytes. *J Biol Chem* 2002; **277**: 25125–25132.
- [8] DUSSAULT I, LIN M, HOLLISTER K, FAN M, TERMINI J, SHERMAN MA, FORMAN BM. A structural model of the constitutive androstane receptor defines novel interactions that mediate ligand-independent activity. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 5270–5280.
- [9] EL-SANKARY W, BOMBAIL V, GIBSON GG, PLANT N. Glucocorticoid-mediated induction of CYP3A4 is decreased by disruption of a protein: DNA interaction distinct from the pregnane X receptor response element. *Drug Metab Dispos* 2002; **30**: 1029–1034.
- [10] FORMAN BM, TZAMELI I, CHOI HS, CHEN J, SIMHA D, SEOL W, EVANS R.M, MOORE DD. Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR- β . *Nature* 1998; **395**: 612–615.
- [11] GERBAL-CHALOIN S, DAUJAT M, PASCUSI JM, PICHARD-GARCIA L, VILAREM MJ, MAUREL P. Transcriptional regulation of CYP2C9 gene. *J Biol Chem* 2002; **277**: 209–217.
- [12] GOODWIN B, HODGSON E, LIDDLE C. The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module. *Mol Pharmacol* 1999; **56**: 1329–1339.
- [13] GOODWIN B, MOORE LB, STOLTZ CM, MCKEE DD, KLIEWER SA. Regulation of the human CYP2B6 gene by the nuclear pregnane X receptor. *Mol Pharmacol* 2001; **60**: 427–432.
- [14] GOODWIN B, REDINBO MR, KLIEWER SA. Regulation of CYP3A gene transcription by the Pregnane X Receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002; **42**: 1–23.
- [15] HANDSCHIN C, PODVINEC M, AMHERD R, LOOSER R, OURLIN JC, MEYER UA. Cholesterol and bile acids regulate xenosensor signalling in drug-mediated induction of cytochromes P450. *J Biol Chem* 2002; **277**: 29561–29567.
- [16] HONKAKOSKI P, MOORE R, WASHBURN K A, NEGISHI M. Activation by diverse xenochemicals of the 51-base pair phenobarbital-responsive enhancer module in the CYP2B10 gene. *Mol Pharm* 1998; **53**: 597–601.
- [17] HONKAKOSKI P, ZELKO I, SUEYOSHI T, NEGISHI M. The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 5652–5658.
- [18] KAST HR, GOODWIN B, TARR PT, JONES SA, ANISFELD AM, STOLTZ CM, TONTONOZ P, KLIEWER S, WILLSON TM, EDWARDS PA. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem* 2002; **277**: 2908–2915.
- [19] KAWAMOTO T, SUEYOSHI T, ZELKO I, MOORE R, WASHBURN K, NEGISHI M. Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 6318–6322.
- [20] KLIEWER SA, GOODWIN B, WILLSON TM. The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocrine Rev* 2002; **23**: 687–702.
- [21] KLIEWER SA, LEHMANN JM, MILBURN MV, WILLSON TM. The PPARs and PXR: nuclear xenobiotic receptors that define novel hormone signaling pathways. *Recent Prog Horm Res* 1999; **54**: 345–367.

- [22] KLIEWER SA, MOORE JT, WADE L, STAUNDINGER JL, WATSON MA, JONES SA, McKEE DD, OLIVER BB, WILLSON TM, ZETTERSTROM RH, PERLMANN T, LEHMANN JM. An orphan nuclear receptor activated by pregnane defines a novel steroid signaling pathway. *Cell* 1998; **92**: 73–82.
- [23] KLIEWER SA, WILLSON TM. Regulation of xenobiotic and bile acid metabolism by the nuclear pregnane X receptor. *J Lipid Res* 2002; **43**: 359–364.
- [24] KWIATKOWSKA D, KWIATKOWSKA-KORCZAK J. Heterodimeryczne receptory jądrowe. *Post Biochem* 2000; **46**: 115–129.
- [25] KWIATKOWSKA D, KWIATKOWSKA-KORCZAK J. Regulacja gospodarki lipidowej z udziałem receptorów jądrowych. *Arch Clin Exp Med* 2002; **11**: 219–228.
- [26] LUO G, CUNNINGHAM M, KIM S, BURN T, LIN J, SINZ M, HAMILTON G, RIZZO C, JOLLEY S, GILBERT D, DOWNEY A, MUDRA D, GRAHAM R, CAROLL K, XIE J, MADAN A, PARKINSON A, CHRIST D, SELLING B, LeCLUYSE E, GAN LS. CYP3A4 induction by drugs: correlation between a pregnane X receptor reporter gene assay and CYP3A4 expression in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2002; **30**: 795–804.
- [27] MIN G, KEMPER JK, KEMPER B. Glucocorticoid receptor-interacting protein 1 mediates ligand-independent nuclear translocation and activation of constitutive androstane receptor *in vivo*. *J Biol Chem* 2002; **277**: 26356–26363.
- [28] MIN G, KIM H, BAE Y, PETZ L, KEMPER JK. Inhibitory cross-talk between estrogen receptor (ER) and constitutively activated androstane receptor (CAR). *J Biol Chem* 2002; **277**: 34626–34633.
- [29] MOORE LB, GOODWIN B, JONES SA, WISELY GB, SERABJIT-SINGH CJ, WILLSON TM, COLLINS JL, KLIEWER SA. St John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 7500–7502.
- [30] MOORE LB, MAGLICH JM, McKEE DD, WISELY B, WILLSON TM, KLIEWER SA, LAMBERT MH, MOORE JT. Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors. *Mol Endocrinol* 2002; **16**: 977–986.
- [31] MOORE LB, PARKS DJ, JONES SA, BLEDSOE RK, CONSLER TG, STIMMEL JB, GOODWIN B, LIDDLE C, BLANCHARD SG, WILLSON TM, COLLINS JL, KLIEWER SA. Orphan nuclear receptors, constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *J Biol Chem* 2000; **275**: 15122–15127.
- [32] SAVAS U, GRIFFIN KJ, JOHNSON EF. Molecular mechanisms of cytochrome p-450 induction by xenobiotics: an expanded role for nuclear hormone receptors. *Mol Pharm* 1999; **56**: 851–857.
- [33] SCHUETZ E, LAN L, YASUDA K, KIM R, KOCAREK TA, SCHUETZ J, STROM S. Development of a real-time *in vivo* transcription assay: application reveals pregnane X receptor-mediated induction of CYP3A4 by cancer chemotherapeutic agents. *Mol Pharm* 2002; **62**: 439–445.
- [34] SPENCER TE, JENSTER G, BURCIN MM, ALLIS C D, ZHOU J, MIZZEN CA, McKENNA NJ, ONATE SA, TSAI SY, TSAI M-J, O'MALLEY BW. Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 1997; **389**: 194–197.
- [35] STAUNDINGER JL, GOODWIN B, JONES SA, HAWKINS-BROWN D, MacKENZIE KI, LaTOUR A, LIU Y, KLAASSEN CD, BROWN KK, REINHARD J, WILLSON TM, KOLLER BH, KLIEWER SA. The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 3369–3374.
- [36] SUEYOSHI T, KAWAMOTO T, ZELKO I, HONKAKOSKI P, NEGISHI M. The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene. *J Biol Chem* 1999; **274**: 6043–6046.
- [37] SYNOLD TW, DUSSAULT I, FORMAN BM. The nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nat Med* 2001; **7**: 584–590.
- [38] TAKAHASHI N, KAWADA T, YAMAMOTO T, GOTO T, TAIMATSU A, AOKI N, KAWASAKI H, TAIRA K, YOKOYAMA KK, KAMEI Y, FUSHIKI T. Overexpression and ribozyme-mediated targeting of transcriptional coactivators CREB-binding protein and p300 revealed their indispensable roles in adipocyte differentiation through the regulation of peroxisome proliferator-activated receptor χ . *J Biol Chem* 2002; **277**: 16906–16912.
- [39] TAKESHITA A, KOIBUCHI N OKA J, TAGUCHI M, SHISHIBA Y, OZAWA Y. Bisphenol-A, an environmental estrogen activates the human orphan nuclear receptor, steroid and xenobiotic receptor-mediated transcription. *Eur J Endocrinol* 2001; **145**: 513–517.

- [40] TZAMELI I, PISSIOS P, SCHUETZ EG, MOORE DD. The xenobiotic compound 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 2951–2958.
- [41] WEI P, ZHANG J, EGAN-HAFLEY M, LIANG S, MOORE DD. The nuclear receptor CAR mediated specific xenobiotic induction of drug metabolism. *Nature* 2000; **407**: 920–923.
- [42] WAXMAN DJ. P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR and PPAR. *Arch Biochem Biophys* 1999; **369**: 11–23.
- [43] XIE W, BARWICK JL, DOWNES M, BLUMBERG B, SIMON CM, NELSON MC, NEUSCHWANDER-TETRI BA, BRUNT EM, GUZELIAN PS, EVANS RM. Humanized xenobiotic response in mice expressing nuclear receptor SXR. *Nature* 2000; **406**: 435–439.
- [44] XIE W, EVANS RM. Orphan nuclear receptors: the exotics of xenobiotics. *J Biol Chem* 2001; **276**: 37739–37742.
- [45] XIE W, RADOMINSKA-PANDYA A, SHI Y, SIMON CM, NELSON MC, ONG ES, WAXMAN DJ, EVANS RM. An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 3375–3380.
- [46] ZELKO I, SUEYOSHI T, KAWAMOTO T, MOORE R, NEGISHI M. The peptide near the C terminus regulates receptor CAR nuclear translocation induced by xenochemicals in mouse liver. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 2838–2846.
- [47] ZHANG J, HUANG W, CHUA SS, WEI P, MOORE DD. Modulation of acetoaminophen-induced hepatotoxicity by the xenobiotic receptor CAR. *Science* 2002; **298**: 422–424.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 04.02.2003 r.

Przyjęto: 25.05.2003 r.

Adres autora: ul Chalubińskiego 10, 50-368 Wrocław

MOLEKULARNE ASPEKTY INFЕКCJI WYWOŁANEJ *HELICOBACTER PYLORI*

MOLECULAR ASPECTS OF *HELICOBACTER PYLORI* INFECTION

Michał ARABSKI, Janusz BŁASIAK

Katedra Genetyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie: Infekcja wywołana *H. pylori* jest istotnym czynnikiem ryzyka choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy. Zakażenie tą bakterią powoduje zaburzenie struktury i funkcji komórek błony śluzowej żołądka mogące być początkiem szeregu procesów patologicznych, w tym transformacji nowotworowej. Infekcja związana jest z rozwojem przewlekłego zapalenia komórek nabłonkowych żołądka wywołanym procesami adaptacyjnymi mikroorganizmu do środowiska, określonymi przez budowę chemiczną i swoistość adhezyn bakteryjnych, aktywność enzymatyczną ureazy *H. pylori*, a także jego ruchliwość i chemotaksję. Przedstawione w pracy molekularne podłoże chorobotwórczości bakterii dotyczy różnicowania strukturalnego i funkcjonalnego genomu *H. pylori* oraz mechanizmu kolonizacji błony śluzowej żołądka, których zrozumienie ma znaczenie zarówno poznawcze, jak i kliniczne.

Słowa kluczowe: infekcja wywołana *H. pylori*, kolonizacja, adhezyny bakteryjne, ureaza *H. pylori*, ureotaksja.

Summary: *H. pylori* is a causative agent of chronic gastritis, peptic ulcer diseases and has a significant impact on gastric carcinogenesis. Gastrointestinal disorders associated with *H. pylori* infection are predominantly results of the immune responses of gastric epithelial cells and adaptation of bacteria to stomach environment determined by chemical structure and biological specificity of bacterial adhesins, activity of *H. pylori* urease and motility/chemotaxis of the bacterium. In this paper the overview of structural and functional differentiation of *H. pylori* genome and the mechanism for its colonizing the gastric mucus is presented.

Keywords: *H. pylori* infection, colonization, bacterial adhesins, *H. pylori* urease, ureotaxis.

Rozwój choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy związany jest z nadmiernym wytwarzaniem kwasu solnego, nieprawidłowymi nawykami żywieniowymi, stresem, a także nadużywaniem niesterydowych leków przeciwzapalnych. Na początku lat osiemdziesiątych dzięki badaniom Marshalla i Warrena w ocenie czynników bezpośrednio prowadzących do procesu patogenezy komórek żołądka uwzględniono wpływ zakażeń wywołanych przez gramujemną bakterię bytującą w błonie śluzowej

oraz na powierzchni komórek nabłonkowych żołądka – *Helicobacter pylori* [72, 68]. Poznanie molekularnych podstaw infekcji tą bakterią może więc mieć istotne znaczenie z punktu widzenia zarówno poznawczego, jak i klinicznego. Obecnie znana jest struktura genomu i funkcje genów *H. pylori*, co pozwala na określenie ich roli w infekcji. Badania nad genomem *H. pylori* pozwoliły na wyodrębnienie nowego rodzaju *Helicobacter* na podstawie analizy sekwencyjnej jej 16S rRNA [55]. Pomimo iż obecnie zidentyfikowano ponad 20 gatunków *Helicobacter*, to zakażenie nią pozostaje poważnym czynnikiem ryzyka w łańcuchu zdarzeń prowadzącym nie tylko do choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy, lecz także może odgrywać istotne znaczenie w mechanizmie transformacji nowotworowej komórek błony śluzowej człowieka [18]. Na związek ten wskazują dane epidemiologiczne. Częstość zakażeń *H. pylori* w populacji ludzkiej wynosi około 50% i chociaż odsetek ten kształtuje się różnie w zależności od regionów geograficznych, to jest on dodatnio skorelowany z ryzykiem występowania zmian chorobowych górnego odcinka układu pokarmowego [52].

Oddziaływanie pomiędzy komórkami gospodarza a *H. pylori* indukuje złożony proces zdarzeń, związanych zarówno z mechanizmami adaptacyjnymi bakterii do warunków środowiska żołądka, jak również z immunopatogenezą przewlekłego procesu zapalnego komórek błony śluzowej. Mechanizmy infekcji bakteryjnej wpływają na zmiany fizjologiczne komórek błony śluzowej i pomimo ich znaczenia klinicznego, procesy te nie zostały ostatecznie poznane. Badania dodatkowo utrudnia zmienność białek powierzchniowych oraz zróżnicowanie morfologiczne bakterii *H. pylori* w warunkach *in vitro*. Po względem biologicznym możemy wyróżnić dwie formy morfologiczne mikroorganizmu: postać spiralną oraz formę coccoidu. Forma spiralna *H. pylori* pod wpływem stresu wywołanego reaktywnymi formami tlenu lub związkami przeciwbakteryjnymi ulega przekształceniu do formy kulistej – *coccoid*. Zarówno mechanizm transformacji morfologicznej bakterii, jak również jego znaczenie patofizjologiczne nie zostały ostatecznie wyjaśnione [45]. W obrębie gatunku *H. pylori* obserwujemy także zmienność fenotypową związaną zarówno ze zróżnicowaniem strukturalnym i funkcjonalnym adhezyn bakteryjnych, jak również spowodowanym nabywaniem oporności na leki stosowane w terapiach mających na celu eradykację bakterii. W świetle obecnego stanu wiedzy na temat klinicznej roli zakażeń *H. pylori* w patogenezie błony śluzowej żołądka poznanie molekularnych aspektów takich infekcji wydaje się odgrywać nie tylko rolę poznawczą, ale przede wszystkim kliniczną, co ma znaczenie w prewencji, diagnostyce i leczeniu dolegliwości żołądkowo-jelitowych [26].

1. ZRÓŻNICOWANIE STRUKTURALNE I FUNKCJONALNE GENOMU *H. PYLORI*

Poznanie genomu *H. pylori* możliwe było dzięki technice elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym z zastosowaniem enzymów restrykcyjnych. Taylor i wsp. [61] jako pierwsi opublikowali mapę genową szczepu UA802 (1,7 Mbp) przy użyciu dwóch restryktaz *NotI* i *NruI*. Skonstruowanie mapy fizycznej genomu trzech szczepów

UA861, NTCT 11637 i NCTC 11639 *H. pylori* pozwoliło na przewidywanie zróżnicowania fenotypowego tych szczepów, będącego konsekwencją zróżnicowania ich genomów, a w szczególności różnej pozycji 17 genów [32]. Wyniki badań świadczą także o wysokim stopniu homologii niektórych genów, w tym *vacA*, *katA*, *pfr* i *hpa*, które zidentyfikowano w ponad 25% poznanych dotąd chromosomach bakteryjnych [64].

Podstawy molekularne badań nad związkiem pomiędzy strukturą i funkcją genów bakteryjnych a mechanizmem infekcji *H. pylori* umożliwiła analiza budowy chromosomów dwóch szczepów: J99 i 26695. Pomimo że rozmiar genomu szczepu 26695 jest większy od J99 o około 24 kpz, to procentowy udział zasad guaniny i cytozyny jest w obu taki sam i wynosi 39% [2, 61, 64]. Oba szczepy bakteryjne różnią się również pod względem liczby genów, których wzór ekspresji może być dodatkowo różny ze względu na wykorzystywanie różnych otwartych ramek odczytu (ORFs). W chromosomach J99 i 26695 zidentyfikowano odpowiednio 1495 i 1590 genów, z których około 60% pełni funkcje poznane w innych mikroorganizmach, 25% – funkcje swoiste dla *H. pylori*, a funkcja około 20% nie została poznana. Około 47% swoistych genów *H. pylori* niosących otwarte ramki odczytu znajduje się w obszarze zwanym *plasticity zone*, różniącym się budową strukturalną w obydwu szczepach. Region ten w przypadku J99 tworzą sekwencje sąsiadujące, natomiast *plasticity zone* szczepu 26695 przedzielony jest sekwencją o długości 600 kpz zawierającą powtórzenia heptamerowe, gen 5S rRNA i elementy insercyjne IS605 i IS606 [2]. Podobieństwa w budowie chromosomów bakteryjnych *H. pylori* związane są głównie z organizacją systemu restrykcji i modyfikacji DNA, który może uczestniczyć w mechanizmie powstawania rekombinantów w wyniku fragmentacji DNA [10, 12]. Proces ten regulowany jest przez około 20 białek homologicznych zidentyfikowanych również u innych gatunków bakterii [11].

Podobieństwa strukturalne genomów wynikają również z obecności rodziny 32 genów zewnątrzkomórkowych białek błonowych (OMPs) stanowiących 1% genomu oraz sekwencji homopolimerycznych i powtórzeń dinukleotydowych kodujących białka powierzchniowe o właściwościach katalitycznych, uczestniczących w biosyntezie lipopolisacharydu (LPS) i/lub biorących udział w modyfikacji DNA [2, 28, 53, 64]. Podobieństwa i różnice genomów różnych szczepów *H. pylori* wskazują na zróżnicowanie mechanizmu ekspresji białek powierzchniowych komórek bakteryjnych i ich roli w kolonizacji błony śluzowej oraz swoistego zespołu oddziaływań bakterii z powierzchnią komórek nabłonkowych związanych z ich patogenizacją (tab. 1).

1.1. Białka VacA i CagA

Podstawowym czynnikiem wirulentnym *H. pylori* w patogenie komórek nabłonkowych żołądka jest cytotoksyna wakuolizująca kodowana przez gen *vacA*. Białko VacA o masie 139–140 kDa składa się z trzech domen: części błonowej związanej z powierzchnią komórki (47 kDa), uwalnianej toksyny (90 kDa) i sekwencji sygnałowej [15, 51, 54]. Cytotoksyna wydzielana jest w efekcie pęknięcia niekowalencyjnego wiązania w N-końcowym fragmencie o masie 37 kDa i C-końcowym (58 kDa) [62].

TABELA 1. Charakterystyka funkcjonalna genów *H. pylori*

Gen	Funkcja
<i>abcABCD</i>	regulacja aktywności ureazy
<i>amiE</i>	produkcja amoniaku
<i>babA/B</i>	adhezyna oddziałująca z komórkami nabłonkowymi żołądka
<i>cagA</i>	czynnik wirulentny
<i>cagI</i>	pierwsza podjednostka cag-PAI, indukcja interleukiny 8
<i>cagII</i>	druga podjednostka cag-PAI, indukcja interleukiny 8
<i>cdrA</i>	regulacja podziałów komórkowych
<i>chey</i>	ruchliwość komórki bakteryjnej
<i>coA-TA</i>	podjednostka A CoA-transferazy
<i>coA-TB</i>	podjednostka B CoA-transferazy
<i>copAP</i>	transport miedzi
<i>flaA/B</i>	flagelina A/B
<i>flbA</i>	regulacja ekspresji flaA/B
<i>flgE</i>	stabilizacja błonowa wici
<i>flil</i>	eksport składników wici
<i>frdCAB</i>	mechanizm produkcji energii w warunkach beztlenowych
<i>ftsH</i>	metaloproteaza
<i>fucT</i>	α 1,3-fukozylotransferaza regulująca biosyntezę antygeny Lex i Ley
<i>fucT2</i>	α 1,2-fukozylotransferaza regulująca biosyntezę antygeny Ley
<i>fur</i>	repressor transkrypcji genów regulujących poziom żelaza
<i>galE</i>	UDP-galaktozylo-4-epimeraza
<i>gyrA</i>	replikacja DNA, oporność na ciprofloksacin
<i>hpaA</i>	hemaglutynina wiążąca N-acetyloneuraminyloaktozę
<i>hpn</i>	wiązanie NH_4^+
<i>hsp60</i>	białko szoku termicznego
<i>hspA</i>	białko opiekuńcze, transport NH_4^+
<i>hspB</i>	białko opiekuńcze
<i>katA</i>	katalaza
<i>nixA</i>	transport NH_4^+
<i>oorDABC operon</i>	2-oksylglutaran, akceptor oksydoreduktazy
<i>orf2comB123</i>	transformacja DNA w warunkach naturalnych
<i>pfr</i>	ferrytyna
<i>picB</i>	indukcja produkcji interleukiny 8
<i>porCDAB operon</i>	pirogonian: oksydoreduktaza flawodoksyny
<i>pss</i>	syntaza fosfatydyloseryny
<i>recA</i>	rekombinacja homologiczna
<i>rexA</i>	tleno-niewrażliwa nitroreduktaza NADPH
<i>ribBA</i>	wychwytywanie żelaza
<i>sod</i>	dysmutaza ponadtlenkowa
<i>topA</i>	topoizomeraza I
<i>ureA/B</i>	geny strukturalne ureazy
<i>ureC</i>	mutaza fosfoglukozoaminy
<i>ureD</i>	nieznana
<i>ureEFGHI</i>	geny funkcjonalne ureazy
<i>uvrB</i>	naprawa uszkodzeń DNA
<i>vacA</i>	cytotoksyna wakuolizująca
<i>geny 23S/5S rRNA</i>	synteza białek, oporność na antybiotyki makrolidowe
<i>wbcJ</i>	synteza lipopolisacharydu

VacA jako toksyna typu AB tworzy kompleks złożony z podjednostki B (fragment C-końcowy) związanej z powierzchnią komórki oraz podjednostki A (fragment N-końcowy), który ulega aktywacji enzymatycznej w wyniku translokacji błonowej do cytozolu komórki gospodarza [19]. Budowa chemiczna białka nie została ostatecznie poznana i rozważać można co najmniej dwie alternatywne formy, zawierające 6 lub 7 kopii polipeptydu o masie 95 kDa lub też 12–14 kopii składających się na dwie podjednostki polipeptydowe [8, 14, 36]. Przedmiotem badań jest także mechanizm wakuolizacji komórek nabłonkowych żołądka wywołany cytotoxyną. Prawdopodobnie w kwaśnym środowisku żołądka oligomery białka rozpadają się do monomerów wiążących się z receptorami powierzchniowymi komórek gospodarza (białko 140 kDa). W drodze endocytozy wnikają one do cytozolu i przy udziale ATPazy typu V i białka Rab7 pobudzają przyłączenie lizosomu [14, 24, 44].

W 45% szczepów *H. pylori vac*⁺ stwierdzono aktywność białka CagA o masie 120–128 kDa i na tej podstawie wyróżniono dwa typy kliniczne bakterii [12, 13]. Do typu I zakwalifikowano szczepy *H. pylori* z fenotypem *cag*⁺ i *vac*⁺, które stanowią większe ryzyko wystąpienia choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy w porównaniu ze szczepami *H. pylori cag* i *vac* typu II [16]. W 1996 roku zidentyfikowano region 40 kbp nazwany *cag*-PAI z genem *cagA* w chromosomach bakteryjnych szczepów typu I [9]. Sekwencja *cag*-PAI szczepu CCUG17874 *H. pylori* może być przedzielona na dwa regiony *cagI* i *cagII* przez sekwencję insercyjną IS605 lub przez jej element flankujący złożony z 31 pz [1, 6, 64]. Ponadto w obrębie regionu *cagI* zlokalizowane są geny *picB* i *cagA*, których mechanizm ekspresji związany jest z 16 rodzajami otwartych ramek odczytu. Białka bakteryjne związane z mechanizmem ekspresji regionu *cag*-PAI bezpośrednio wpływają na proces zapalny, pobudzając produkcję interleukiny 8 oraz cytokinin jako czynników prozapalnych przez komórki nabłonkowe żołądka [1, 9, 66].

1.2. Biosynteza antygenów Lewis

Antygeny Lewis (*Le*^a, *Le*^b, *Le*^x i *Le*^y) to grupy difukozylowanych glikoprotein, które są integralnymi składnikami powierzchni komórek eukariotycznych, a zarazem jako składniki lipopolisacharydu *H. pylori* mają znaczenie zarówno strukturalne, jak i funkcjonalne w mechanizmach patogenezy w komórkach nabłonkowych żołądka, wynikające z homologicznej budowy chemicznej składników błony komórkowej patogenu i gospodarza [4, 5, 46]. Najsilniejsze zaburzenie procesu zapalnego związane z indukcją mechanizmów autoimmunologicznych wywoływane są przez antygeny *Le*^x i *Le*^y [17]. Szlak biosyntezy *Le*^x w przypadku zarówno mikroorganizmów, jak i komórek ludzkich jest identyczny i jest związany z aktywnością β 1,4-galaktozylotransferazy katalizującej przyłączenie galaktozy do N-acetyloglukozoaminy oraz z aktywnością α 1,3-fukozylotransferazy, która umożliwia enzymatyczne przeniesienia fukozy z kompleksu GDP-fukoza na kwas galaktozylo- β 1,4-glucozoneuraminowy [10]. W syntezie *Le*^x uczestniczy produkt genu *fucT*, α 1,3-fukozylotransferaza, o czym świadczą wyniki klonowania ekspresyjnego z wykorzystaniem szczepu *H. pylori* NCTC11639 w komórkach *E. coli*. Delecja pojedynczej cytozyny w regionie poly(C) końca 5' genu

fucT związana jest z jego inaktywacją, czego efektem jest brak aktywności kodowanego przez niego białka, w przeciwieństwie do komórek *E. coli* z genem prawidłowym [25, 37].

Źródłem fukozy w procesie biosyntezy antygeny *Lex* jest mannoza, która w wyniku przemian katalizowanych przez produkt genu *wbcJ* jest przekształcana z GDP-mannozy do GDP-fukozy. Białko *WbcJ* złożone jest z 319 aminokwasów i jak sugerują wyniki badań na mutantach z defektywnym genem *wbcJ*, kontroluje syntezę O-antygeny Le^x/Le^y [38].

2. KOLONIZACJA BŁONY ŚLIZOWEJ ŻOŁĄDKA PRZEZ *H. PYLORI*

Zróznicowanie genetyczne *H. pylori* wpływa na jego zdolności adaptacyjne. Mechanizm kolonizacji błony śluzowej żołądka związany jest z cechami inwazyjności bakterii, jak również z odpowiedzią komórek gospodarza. Kolonizacja zależy głównie od białek adhezyjnych, aktywności enzymatycznej ureazy *H. pylori*, a także związana jest z jej ruchliwością i chemotaksją [72].

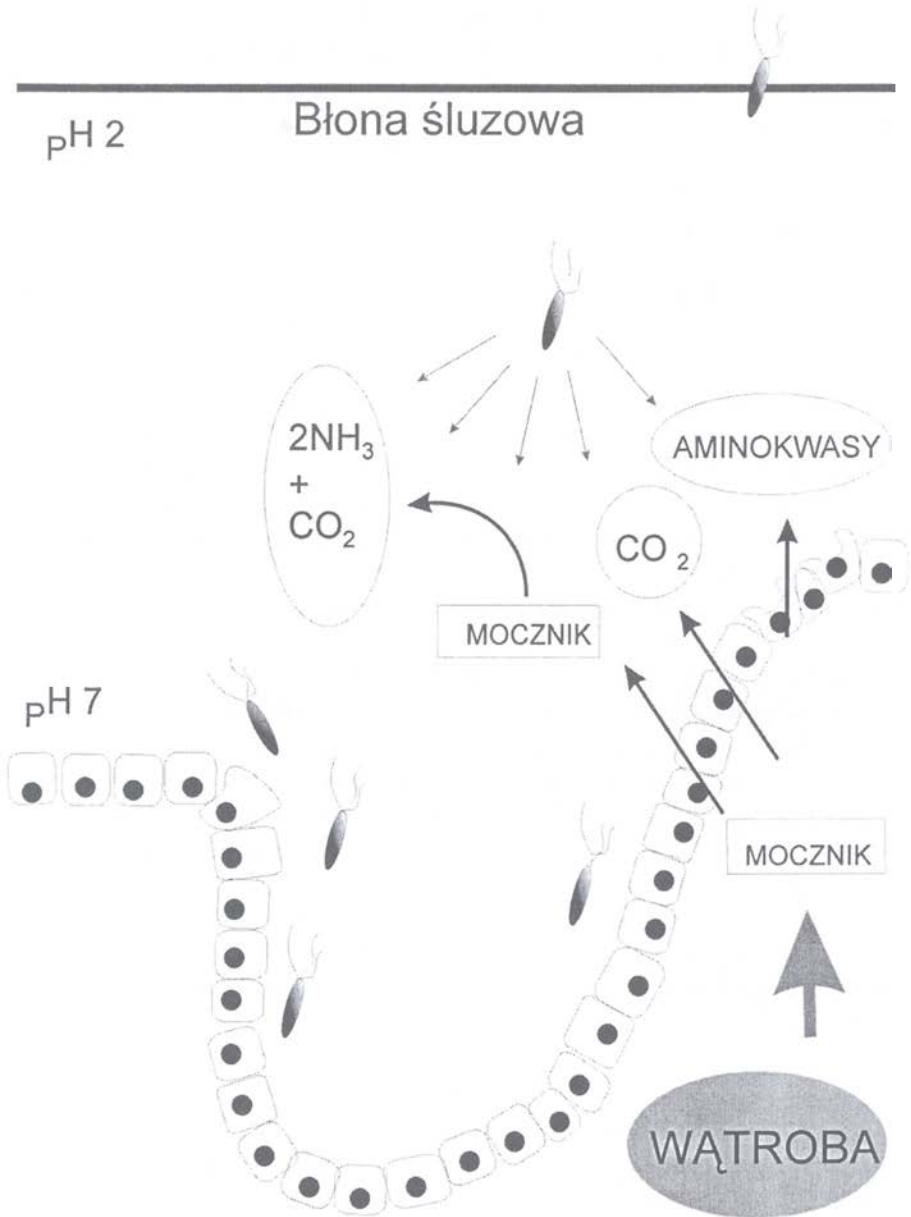
W środowisku żołądka powierzchnia komórki bakteryjnej narażona jest na wpływ czynników egzogennych: mikroorganizmów tego samego lub innego gatunku, składników diety, a także mechanizmów obronnych komórek gospodarza. Obecność adhezyn na powierzchni komórki bakteryjnej umożliwia jej проникnięcie do światła żołądka, chroni przed warunkami środowiskowymi, a także wpływa na przebieg fagocytozy [22].

Kolonizacja żołądka przez *H. pylori* związana jest również z aktywnością enzymatyczną ureazy bakteryjnej. Enzym ten w drodze katalitycznej hydrolizy mocznika do amoniaku i dwutlenku węgla neutralizuje niekorzystne, kwaśne środowisko żołądka [43]. Szczepy bakteryjne pozbawione hydrolitycznej aktywności enzymu ($ureB^-$) nie mają zdolności adaptacyjnych, a jedynie mutanty $ureB^+$ preferencyjnie w stosunku do $ureB^-$ kolonizują komórki błony śluzowej. Badania te sugerują, że neutralizacja środowiska jest istotnym, lecz nie jedynym czynnikiem wpływającym na bytowanie *H. pylori* w żołądku [19, 65].

Chemotaksja *H. pylori* umożliwia jej bytowanie w możliwie optymalnych warunkach mikrośrodowiskowych, umożliwia wybór niszy o maksymalnej koncentracji mocznika [59]. Jest on uwalniany przez sieć naczyń włosowatych na powierzchnię komórek nabłonkowych żołądka, przez co osiąga on najwyższe stężenie w błonie śluzowej, będącej przez to najkorzystniejszym miejscem bytowania bakterii (ryc. 1).

2.1 Białka adhezyjne *H. pylori*

Adaptacja do warunków środowiskowych mikroorganizmu wynika z oddziaływania specyficznych adhezyn bakteryjnych ze składnikami powierzchniowymi komórek błony śluzowej żołądka. Oddziaływanie to określane mianem *molecular cross-talk* związane jest zarówno z aktywnością białek adhezyjnych, jak również z indukcją i przebiegiem



RYCINA 1. Schemat mechanizmu kolonizacji błony śluzowej i komórek nabłonkowych żołądka przez *H. pylori*

procesu zapalnego [22]. Zróżnicowanie fenotypowe *H. pylori* umożliwia jakościowe dostosowanie adhezyn do powierzchniowych białek błony śluzowej, czego wynikiem są jej zmiany patologiczne. W wyniku oddziaływania ze składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej (lamina, kolagen typu IV, witronektyna) dochodzi do uszkodzenia i owrzodzenia tkanki oraz rozwoju chronicznego zanikowego nieżytu żołądka [60].

Obecność bakterii na powierzchni komórek nabłonkowych żołądka związana jest z indukcją czynników prozapalnych: chemokin (interleukina 8, RANTES, GRO α) oraz cytokin (interleukina 1 i 6) [58]. Na przebieg fagocytozy wpływa struktura chemiczna białek adhezyjnych prezentowanych na powierzchni komórki bakteryjnej, która określa ich specyfikę substratową. Fagocytoza jest bardziej efektywna w przypadku zakażeń szczepami *H. pylori* wiążącymi reszty kwasu sialowego niż siarczan heparyny [39]. W wyniku reakcji składników błony komórkowej *H. pylori* z pochodną heparyny, a także kwasem hialuronowym i witronektyną gospodarza dochodzi do maskowania adhezyn, co prowadzi do zaburzenia mechanizmu prezentacji antygeny i hamowania fagocytozy bakterii przez makrofagi [11]. Białka adhezyjne jako czynniki zjadliwości związane są z mechanizmem zakażenia. Bakteria przedostaje się do światła żołądka w postaci kompleksu utworzonego pomiędzy resztami siarczanowymi mucyny ślinowej a adhezynami *H. pylori*. Znajdująca się w soku żołądkowym jej pochodna pełni funkcję ochronną dla mikroorganizmu i umożliwia kolonizację komórek błony śluzowej. Mechanizm ten może być hamowany przez składniki diety. Mleko krowie zawiera pochodne węglowodanowe kwasu siarkowego i sialowego, które wiążąc się z receptorem bakteryjnym oraz powierzchniowym białkiem adhezyjnym Lewis b blokują możliwość wytworzenia kompleksu z resztami siarczanowymi mucyny. [30]. Mleko krowie hamuje przyleganie *H. pylori* do płytek opłaszczonych ugrupowaniami siarczanowymi oraz komórek nowotworowych żołądka linii MKN-45 [29].

Poziom ekspresji większości adhezyn, a także ich struktura biologiczna zależy od czynników środowiskowych. Oddziaływanie powierzchni komórki bakteryjnej z błoną śluzową indukuje adhezyny zewnątrzkomórkowe, jednak brak kontaktu z komórkami gospodarza prowadzi do ich inaktywacji. Mechanizm ten obserwowano jedynie w badaniach *in vitro* w wyniku zastosowania określonych warunków eksperymentalnych, co jest istotnym problemem w identyfikacji bakteryjnych białek błonowych. Proces ten może jednak zachodzić *in vivo* i może uczestniczyć w niespecyficznym mechanizmie wydzielania i transportu białek bakteryjnych do wnętrza komórek błony śluzowej żołądka, jak cytotoksyna wakualizująca (VacA) oraz białko aktywujące neutrofile (*H. pylori*-NAP) [34].

2.1.1. Białko *H. pylori*-NAP

H. pylori-NAP jest homopolimerycznym białkiem o masie 150 000 kDa zawierającym podjednostkę 15 000 kDa, które indukuje adhezję neutrofilów do powierzchni komórek nabłonkowych żołądka *in vitro* oraz *in vivo*. Obecność białka wpływa na aktywację neutrofilów ICAM-1 wiążących integrynę CD11b/CD18. Aktywność białka *H. pylori*-NAP związana jest z genem *napA*, którego ekspresja wpływa także na poziom bakteryjnych białek wiążących DNA, bakterioferytyn wiążących jony żelaza oraz adhezyn [20, 70]. Białko *H. pylori*-NAP wyizolowane z frakcji zewnątrzkomórkowych białek błonowych (OMPs) obok właściwości adhezyjnych, wiąże jony żelaza, a także pełni inne funkcje komórkowe w zależności od tego, czy jest prezentowane na powierzchni błony bakteryjnej, czy też jest wydzielane do

środowiska. Badania wskazują na wysoką specyficzność białka do liniowych sekwencji reszt chemicznych składników błony komórkowej. Jedną z nich jest sekwencja NeuAc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β glikosfingolipidów białek powierzchniowych neutrofilów (leukosialin i sialoforyny), określająca selektywne wiązanie *H. pylori*-NAP z błoną komórkową [63].

Specyficzność substratowa białka *H. pylori*-NAP związana jest także z powinowactwem do reszt siarczanowych SO₃Gal β 1-Cer oraz gangliotetrazolowych SO₃Gal β 3GalNAc β 4Gal β 4Glc β 1-Cer ceramidu, które nie są składnikami błon komórkowych ludzkich neutrofilów, lecz siarczanu mucyny. Oddziaływanie to może mieć znaczenie ochronne dla bakterii wobec czynników chemicznych środowiska bytowania i wpływa na mechanizm zakażenia komórek błony śluzowej żołądka. Białko *H. pylori*-NAP wiąże również grupy chemiczne SO₃-3-Gal-, SO₃-NacGlc, antygen grupowy krwi SO₃-Lewis, a także Lewis x [47, 63]. Aktywność adhezyjną białka określa więc jakościowy model powinowactwa, chociaż może on mieć charakter ilościowy, m.in. oddziaływanie siarczanu heparyny i heparanu z białkiem bakteryjnym związane jest głównie z ilością reszt siarczanowych [67].

2.1.2. Białko NLBH

Dla funkcjonalnego zróżnicowania białek powierzchniowych *H. pylori* ma znaczenie to, że nie wszystkie hemaglutyniny bakteryjne są białkami adhezyjnymi, lecz nie wszystkie adhezyny są hemaglutyninami. W skład białek powierzchniowych *H. pylori* wchodzi hemaglutynina wiążąca N-acetylo-neuraminylo-(α -2,3)-laktozę, natomiast nie zalicza się do nich jej α -2,6-izomeru [21]. Aktywność białka NLBH związana jest z poziomem ekspresji genu *hpaA* oraz obecnością podjednostki HpaA z konserwatywnym regionem wiążącym reszty kwasu sialowego. Lokalizacja komórkowa podjednostki jest jednak nadal przedmiotem badań. Wykorzystując mysie przeciwciała monoklonalne specyficzne wobec białek otoczki wici *H. pylori* zidentyfikowano białko o masie 29 kDa jako HpaA, którego aktywność regulowana jest przez poziom ekspresji genu *hpaA* nazwanego *HPO797*. Wyniki prac sugerują jednak cytoplazmatyczną lokalizację białka HpaA [33]. Analiza składników otoczki wici bakteryjnej wskazuje na aktywność biologiczną niespecyficznych białek błonowych związanych z lipopolisacharydem bakterii. Jedno z nich o masie 29,5 kDa związane jest z przyleganiem bakterii do prawidłowych komórek nabłonkowych żołądka w kulturach tkankowych. W komórkach nowotworowych żołądka linii KATO III dochodzi do zaburzenia mechanizmu przylegania w wyniku nieprawidłowej ekspresji substratów dla receptorów komórkowych.

Proces oddziaływania *H. pylori* z komórkami nabłonkowymi żołądka może być hamowany przez inhibitory białka NLBH, w tym przez 3'-sialylolaktozę [21, 56]. Badania na mutantach *H. pylori* *flaA*⁻ i *flaB*⁻ wskazują, że produkty genów kodujących wic i otoczkę *H. pylori* mogą brać udział w kolonizacji komórek nabłonkowych żołądka. Aktywność białek OMPs, ureazy oraz niespecyficznych adhezyn może być zaburzana przez mutacje genów *flaA*, *fliQ* i *fliI* kodujących składniki wici bakteryjnej, które zaburzają transport zarówno podjednostki HpaA, jak również białka NLBH [40, 69].

2.1.3. Białko wiążące PGCs

Specyficzność receptorów *H. pylori* w komórkach gospodarza wynika ze zróżnicowania w obrębie szczepów bakteryjnych, a także warunków hodowli *in vitro*. Czynniki środowiskowe indukują adhezynę o aktywności białka NLBH wiążącą reszty kwasu sialowego poliglikozyloceramidów (PGCs). Pomimo że oba białka wrażliwe są na neuraminidazę i ich poziom ekspresji *in vitro* jest zbliżony, to czynnikiem różnicującym jest reakcja na fetuinę i asialofetuinę, które hamują jedynie aktywność hemaglutyniny NLBH. Ponadto, białko wiążące PGCs w porównaniu z NLBH oddziałuje bardziej selektywnie z laktosyloceramidem, podstawowym diglikozyloceramidem fitosfingozyny i dwuhydroksylowych kwasów tłuszczowych [3]. Poziom ekspresji adhezyny wiążącej PGCs oraz jej specyficzność substratowa są różne w zależności od szczepów *H. pylori*. Bakterie szczepu NCTC 11637 oddziałują jedynie z poliglikozyloceramidem pochodzenia ludzkiego, natomiast szczep NCTC 11638 wiąże także PGCs pochodzący od szczurów i małp [41].

2.1.4. Białka OMPs (BabA, AlpA, AlpB i HopZ)

Selektywne wiązanie *H. pylori* z ludzkimi komórkami nabłonkowymi żołądka związane jest z oddziaływaniem bakteryjnych białek adhezyjnych z receptorami powierzchniowymi komórek nabłonkowych żołądka. W przyleganiu *H. pylori* do tych komórek bierze udział adhezyna bakteryjna BabA, specyficznie wiążąc ludzki antygen powierzchniowy Lewis b [7]. Bab A należy do rodziny około 30 konserwatywnych białek OMPs o wysokiej homologii regionów N- i C-końcowych. Zarówno prezentacja błonowa białka, jak również jego aktywność są regulowane przez poziom ekspresji genów *babA1* i *babA2*. Gen *babA1* nie ma kodonu inicjacyjnego, co wiąże się ze strukturalnym i funkcjonalnym brakiem adhezyny i utratą zdolności oddziaływania szczepu z powierzchnią nabłonka żołądka przez wiązanie receptora Lewis b. Aktywność transkrypcyjna genu *babA2* z inicjującą proces sekwencją powtarzalną wpływa na obecność strukturalną białka oraz określa wysokie powinowactwo BabA do antygeny [31].

W mechanizmie kolonizacji uczestniczą także inne białka OMPs i jak sugerują wyniki badań Odenbreita, szczególną rolę przypisuje się białkom AlpA i AlpB. AlpA i głównie sekwencja N-terminalna białka AlpB mają w stosunku do receptorów komórkowych powierzchni nabłonkowej żołądka zbliżony stopień powinowactwa jak podjednostka HpA hemaglutyniny bakteryjnej NLBH [48, 49]. Podobnie adhezyjne białko HopZ z rodziny OMPs ma również istotny udział w selektywnym wiązaniu receptorów komórek nabłonkowych. Regulacja poziomu jego ekspresji związana jest z błędnym parowaniem dwunukleotydu powtórzeń CT w regionie kodującym sekwencję sygnałową białka. Adhezyny AlpA, AlpB i HopZ wykazują wysoki stopień homologii i zróżnicowany mechanizm regulacji, co może mieć kluczowe znaczenie w poznaniu roli białek klasy OMPs w zakażeniach *H. pylori*, zwłaszcza w kontekście zmian fenotypowych w obrębie gatunku [64].

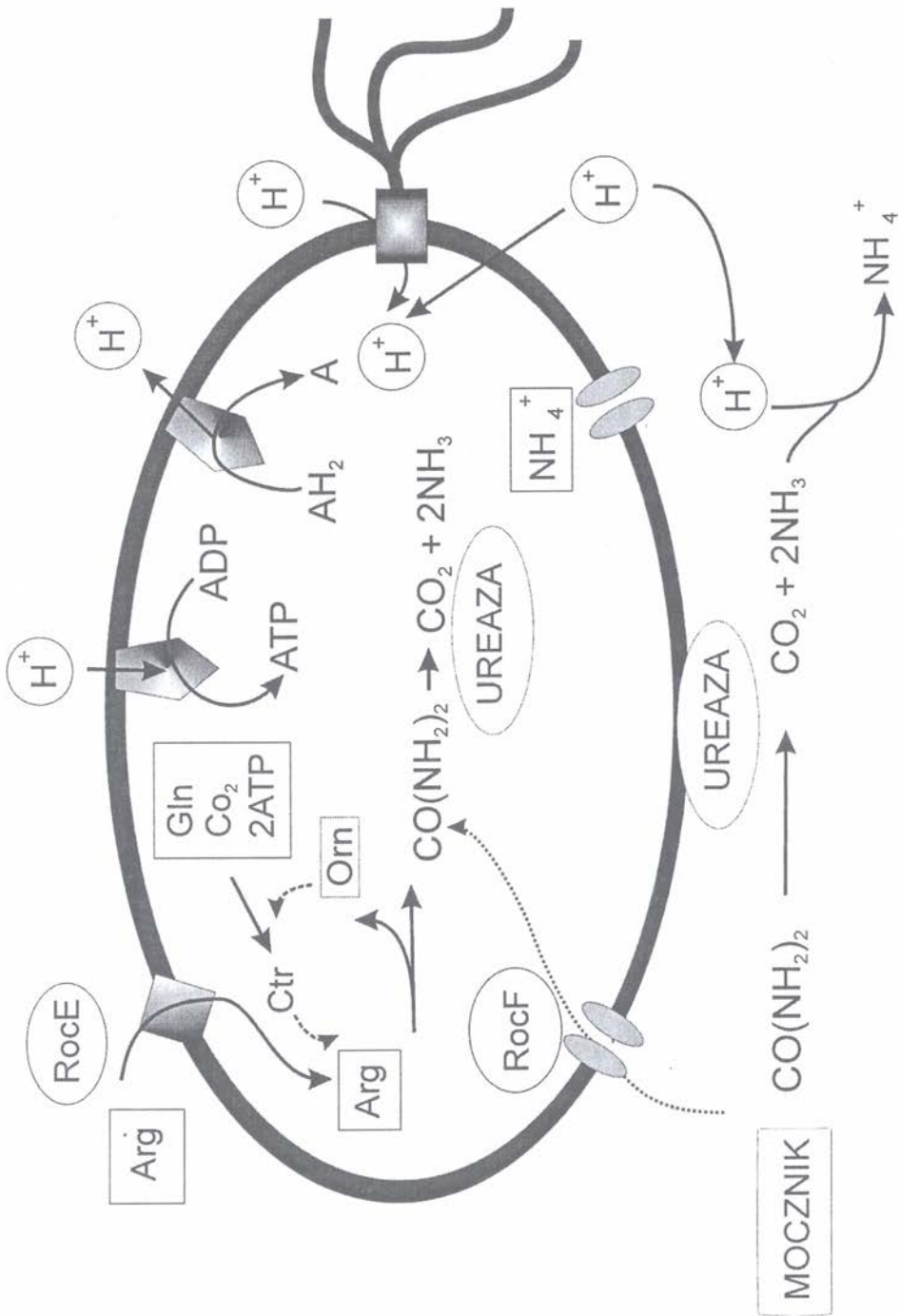
2.2. Znaczenie aktywności ureazy *H. pylori* w kolonizacji błony śluzowej

Lokalizacja komórkowa ureazy i jej aktywność mają istotny wpływ na mechanizm kolonizacji błony śluzowej żołądka przez *H. pylori* (ryc. 2). Biosynteza tego enzymu regulowana jest przez strukturalną rodzinę genów *ureAB* oraz rodzinę *ureIEFGH* odpowiedzialną za wbudowanie jonów niklu do centrum aktywnego enzymu [43]. Aktywność ureazy jest ściśle zależna od obecności jonów niklu, co tłumaczy udział szeregu białek w regulacji transportu i wiązania Ni^{2+} z apoenzymem w tym białka NixA, białka transportowego ABC, HspA oraz produktu ekspresji genu *hpn* [42].

NixA jest białkiem błonowym złożonym z 308 aminokwasów o wysokim powinowactwie do jonów niklu. W wyniku mutacji w obrębie śródbłonowej domeny Asp-Glu-His białka dochodzi do zaburzenia transportu jonów. Mechanizm ten regulowany jest także przez białko Hsp złożone z dwóch domen: N-końcowej domeny A homologicznej do białek bakteryjnych GroES i domeny B wiążącej swoiście jony Ni^{2+} [23]. Z kolei aktywność katalityczna ureazy zależy od poziomu ekspresji genów *abcABC* kodujących białko ABC oraz błonowej ATPazy typu B. Rola produktu genu *hpn* o masie 7,1 kDa, bogatego w histydynę i wiążącego jony dwuwartościowe, podobnie jak genu *ureI* nie została ostatecznie poznana [27]. Wyniki badań wskazują na możliwy udział *ureI* w regulacji wewnątrzkomórkowego poziomu mocznika oraz jonów amonowych [57].

Ureaza występuje w dwóch formach, których aktywność określa zdolności adaptacyjne *H. pylori*. W skład powierzchni zewnętrznej błony komórkowej wchodzi izoforma enzymu, której aktywność katalityczna związana jest z hydrolizą mocznika do amoniaku i dwutlenku węgla w celu neutralizacji kwasu żołądkowego [43]. Postać cytoplazmatyczna enzymu o takiej samej specyficy substratowej określa kierunek chemotaksji, a także pośrednio odpowiada za motorykę komórki bakteryjnej.

Mechanizm transportu i wbudowania ureazy na powierzchni komórki nie został ostatecznie poznany, chociaż próbą jego wyjaśnienia jest model *altruistycznej autolizy* [35]. Proces ten składa się z dwóch etapów. W etapie sekrecyjnym dochodzi do uwolnienia ureazy cytoplazmatycznej do środowiska przez niektóre komórki mikroorganizmu. W drugim etapie następuje wychwycenie i wbudowanie enzymu do struktury błony przez inne komórki bakteryjne. Substratem dla ureazy cytoplazmatycznej jest mocznik pochodzący z przemian metabolicznych argininy katalizowanych przez arginazę (RocF), jak również arginina transportowana do komórki dzięki aktywności błonowej permeazy aminokwasów RocE. W celu ochrony komórki przed szkodliwym wpływem amoniaku będącego produktem aktywności enzymu ulega on przekształceniu do glutaminy lub jonów amonowych w wyniku reakcji z jonami wodorowymi. Neutralizacja amoniaku i produkcja jonów ma ścisły związek z komórkową regulacją potencjału redoks, będącego źródłem energii mechanicznej wici *H. pylori*. Aktywność motoryczna komórki bakteryjnej nie jest zależna od hydrolizy ATP. Proces chemotaksji w kierunku produktów hydrolizy mocznika możliwy jest dzięki przekształceniu energii elektrochemicznej gradientu protonów pomiędzy błoną komórkową bakterii w energię mechaniczną w wyniku ich przepływu. Na mechanizm ten wskazują wyniki badań z zastosowaniem inhibitora transportu jonów wodorowych



RYCINA 2. Schemat aktywności i lokalizacji ureazy *H. pylori*

m-chlorofenylohydrazonu (CCCP), który powoduje zaburzenie ruchliwości wici *H. pylori* [71]. Rola ureazy w mechanizmie kolonizacji błony śluzowej żołądka związana jest zarówno z neutralizacją środowiska bytowania jak również kierunkiem chemotaksji i wiążącym się z nią wydatkiem energetycznym [72].

4. PODSUMOWANIE

Konsekwencją zakażeń *H. pylori* może być przewlekłe zanikowe zapalenie błony śluzowej żołądka, co może prowadzić do powstawania niszy wrzodowej, a także rozwoju procesu transformacji nowotworowej. Podstawową metodą eradykacji jest podawanie antybiotyków oraz leków hamujących wydzielanie kwasu solnego. W celu poprawy skuteczności terapii choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy prowadzi się obecnie badania porównawcze różnych schematów eradykacji *H. pylori*. Poznanie molekularnych mechanizmów zakażeń *H. pylori* może przyczynić się do optymalizacji warunków zwalczania zakażeń i zapobiegania ich następstwom, a także pozwoli na wyjaśnienie procesów prowadzących do nabywania przez te bakterie oporności na antybiotyki stosowane w terapii. Molekularne aspekty infekcji *H. pylori* leżą u podłoża zarówno zmian chorobowych błony śluzowej żołądka, jak również odgrywają kluczową rolę w zrozumieniu mechanizmów inicjacji i rozwoju procesu transformacji nowotworowej.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AKOPYANTS NS, CLIFTON SW, KERSULYTE D, CRABTREE JE, YOUREE BE. Analyses of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 1998; **28**: 37–53.
- [2] ALM RA, LING LL, MOIR DT, KING BL, BROWN ED. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1999; **397**: 176–180.
- [3] ANGSTROM J, TENEBERG S, MILH MA, LARSSON T, LEONARDSSON, OLSSON BM, HALVARSSON MO. The lactosylceramide binding specificity of *Helicobacter pylori*. *Glycobiology* 1998; **8**: 297–309.
- [4] APPELMELK BJ, SIMOONS-SMIT I, NEGRINI R, MORAN AP, ASPINALL GO. Potential role of molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and host Lewis blood group antigens in autoimmunity. *Infect Immun* 1996; **64**: 2031–2040.
- [5] ASPINALL GO, MONTEIRO MA, PANG H, WALSH EJ, MORAN AP. Lipopolysaccharide of the *Helicobacter pylori* type strain NCTC 11637 (ATCC 43504): structure of the O antigen chain and core oligosaccharide regions. *Biochemistry* 1996; **35**: 2489–2497.
- [6] BERG DE, HOFFMAN PS, APPELMELK BJ, KUSTERS JG. The *Helicobacter pylori* genome sequence: genetic factors for long life in the gastric mucosa. *Trends Microbiol* 1997; **5**: 468–474.
- [7] BOREN T, FALK P, ROTH KA, LARSON G, NORMARK G. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science* 1993; **262**: 1892–1895.
- [8] BURRONI D, LUPETTI P, PAGLIACCIA C, REYRAT JM, DALLAI R. Deletion of the major proteolytic site of the *Helicobacter pylori* cytotoxin does not influence toxin activity but favors assembly of the toxin into hexameric structures. *Infect Immun* 1998; **66**: 5547–5550.

- [9] CENSINI S, LANGE C, XIANG Z, CRABTREE JE, BORODOVSKY M. Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci* 1996; **93**: 14648–14653.
- [10] CHAN NW, STANGIER K, SHERBURNE R, TAYLOR DE, ZHANG Y. The biosynthesis of Lewis X in *Helicobacter pylori*. *Glycobiology* 1995; **5**: 683–688.
- [11] CHMIELA M, LJUNGH A, RUDNICKA W, WADSTROM T. Phagocytosis of *Helicobacter pylori* bacteria differing in the heparan sulfate binding by human polymorphonuclear leukocytes. *Zbl Bakt* 1996; **283**: 346–350.
- [12] COVACCI A, CENSINI S, BUGNOLI M, PETRACCA R, BURRONI D. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci* 1993; **90**: 5791–5795.
- [13] COVER TL, DOOLEY CP, BLASER MJ. Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. *Infect Immun* 1990; **58**: 6032–6100.
- [14] COVER TL, HANSON PI, HEUSER JE. Acid-induced dissociation of VacA, the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, reveals its pattern of assembly. *J Cell Biol* 1997; **138**: 759–769.
- [15] COVER TL, TUMMURU MK, CAO P, THOMPSON SA, BLASER MJ. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J Biol Chem* 1994; **269**: 10566–10573.
- [16] COVER TL. The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 1996; **20**: 241–246.
- [17] CRABTREE JE, XIANG Z, LINDLEY IJ, TOMPKINS DS., RAPPOULI R. Induction of interleukin-8 secretion from gastric epithelial cells by a cagA negative isogenic mutant of *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol* 1995; **48**: 967–969.
- [18] DUNN BE, COHEN H, BLASER MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 1997; **10**: 720–741.
- [19] EATON KA, KRAKOWSKA S. Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1994; **62**: 3604–3607.
- [20] EVANS DJ, EVANS DG, LAMPERT HC, NAKANO H. Identification of four new prokaryotic bacterioferitins, from *Helicobacter pylori*, *Anabaena variabilis*, *Bacillus subtilis* and *Treponema pallidum*, by analysis of gene sequences. *Gene* 1995; **153**: 123–127.
- [21] EVANS DJ, EVANS DG, MOULDS JJ, GRAHAM DY. N-acetylneuraminyllactose-binding fibrillar hemagglutinin of *Campylobacter pylori*: a putative colonization factor antigen. *Infect Immun* 1988; **56**: 2896–2906.
- [22] EVANS DJ, EVANS GD. *Helicobacter pylori* adhesins: review and perspectives. *Helicobacter* 2000; **4**: 183–195.
- [23] FULKERSON JF, GARNER RM, MOBLEY HL. Conserved residues and motifs in the NixA protein of *Helicobacter pylori* are critical for the high affinity transport of nickel ions. *J Biol Chem* 1998; **273**: 235–241.
- [24] GARNER JA, COVER TL. Binding and internalization of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by epithelial cells. *Infect Immun* 1996; **64**: 4197–4203.
- [25] GE Z, CHAN NW, PALACIC MM, TAYLOR DE. Cloning and heterologous expression of an alpha1,3-fucosyltransferase gene from the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 1997; **272**: 21357–21363.
- [26] GE Z, TAYLOR DE. Contributions of genome sequencing to understanding the biology of *Helicobacter pylori*. *Annu Rev Microbiol* 1999; **53**: 353–587.
- [27] GILBERT JV, RAMAKRISHNA J, SUNDERMAN FW, WRIGHT A, PLAUR AG. Protein Hpn: cloning and characterization of a histidine-rich metal-binding polypeptide in *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae*. *Infect Immun* 1995; **63**: 1682–1688.
- [28] HANCOCK RE, ALM R, BINA J, TRUST T. *Helicobacter pylori*: a surprisingly conserved bacterium. *Nat Biotechnol* 1998; **16**: 216–217.
- [29] HATA Y, KITA T, MURAKAMI M. Bovine milk inhibits both adhesion of *Helicobacter pylori* to sulfatide and *Helicobacter pylori*-induced vacuolation of vero cells. *Digest Dis Sci* 1999; **44**: 1696–1702.
- [30] HIRMO S, KELM S, IWERSEN M, HOTTA K, GOSO Y, ISHIHARA K, SUGURI T, MOTITA M, WADSTROM T. Inhibition of *Helicobacter pylori* sialic acid-specific haemagglutination by human gastrointestinal mucins and milk glycoproteins. *Microbiol Immunol* 1998; **20**: 275–281.

- [31] ILVER D, ARNQVIST A, OGREN J, FRICK IM, KERSULYTE D, INCECIK ET, BERG DE, COVACCI A, ENGSTRAND L, BOREN T. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* 1998; **279**: 373–377.
- [32] JIANG Q, HIRATSUKA K, TAYLOR DE. Variability of gene order in different *Helicobacter pylori* strains contributes to genome diversity. *Mol Microbiol* 1996; **20**: 833–842.
- [33] JONES AC, LOGAN RP, FOYNES S, COCKAYNE A, WREN BW, PENN CW. A flagellar sheath protein of *Helicobacter pylori* is identical to HpaA, a putative N-acetylneuraminylactose-binding hemagglutinin, but is not an adhesin for AGS cells. *J Bacteriol* 1997; **179**: 5643–5647.
- [34] KEENAN J, DAY T, COOK B, PEREZ-PEREZ G, ALLARDYCE R, BAGSHAW P, NEAL S. A role for the bacterial outer membrane in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *FEMS Microbiol Lett* 2000; **2**: 259–264.
- [35] KRISHNAMURTHY P, PARLOW M, ZITZER JB, VAKIL NB, MOBLEY HLT. *Helicobacter pylori* containing only cytoplasmic urease is susceptible to acid. *Infect Immun* 1998; **66**: 5060–5066.
- [36] LUPETTI P, HEUSER JE, MANETTI R, MASSARI P, LANZAVECCHIA S. Oligomeric and subunit structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J Cell Biol* 1996; **133**: 801–807.
- [37] MARTIN SL, EDBROOKE MR, HODGMAN TC, VAN DEN EIJNDEN DH, BIRD MI. Lewis X biosynthesis in *Helicobacter pylori*. Molecular cloning of an alpha(1,3)-fucosyltransferase gene. *J Biol Chem* 1997; **272**: 21349–21356.
- [38] MCGOWAN CC, NETCHEVA A, THOMPSON S.A., COVER TL, BLASER MJ. Acid-induced expression of an LPS-associated gene in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 1998; **30**: 19–31.
- [39] MENTIS A, TZOUVELEKIS L, SPILIADIS C, BLACKWELL CC, WEIR DM. Inhibition of *Helicobacter pylori* haemagglutination activity by human salivary mucins. *FEMS Microbiol Immunol* 1990; **3**: 125–127.
- [40] MILLER-PODRAZA H, BERGSTROM J, MILH MA, KARLSSON KA. Recognition of glycoconjugates by *Helicobacter pylori*. Comparison of two sialic acid-dependent specificities based on haemagglutination and binding to human erythrocyte glycoconjugates. *Glycoconj J* 1997; **4**: 467–471.
- [41] MILLER-PODRAZA H, MILH MA, TENEBERG S, KARLSSON KA. Binding of *Helicobacter pylori* to sialic acid-containing glycolipids of various origins separated on thin-layer chromatograms. *Infect Immun* 1997; **65**: 2480–2482.
- [42] MOBLEY HLT, FULKERSON J, HENDRICKS JK, GARNER RM. Expression of catalytically active urease by *Helicobacter pylori*. [w] Moran AP, O'Marain CA [red.] Pathogenesis and host response in *Helicobacter pylori*. Englewood, NY: Normed Verlag 1997: 58–66.
- [43] MOBLEY HLT, ISLAND MD, HAUSINGER RP. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev* 1995; **59**: 451–480.
- [44] MOLINARI M, GALLI C, DE BERNARD M, NORAIS N, RUYSSACHAERT JM. The acid activation of *Helicobacter pylori* toxin VacA: structural and membrane binding studies. *Biochem Biophys Res* 1998; **248**: 334–340.
- [45] MONSTEIN HJ, DE LA COUR CHD, JONASSON J. Probing 23S ribosomal RNA cleavage sites in coccoid *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2001; **6**: 100–109.
- [46] MONTEIRO MA, CHAN KH, RASKO DA, TAYLOR DE, ZHENG PY. Simultaneous expression of type 1 and type 2 Lewis blood group antigens by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides. Molecular mimicry between *H. pylori* lipopolysaccharides and human gastric epithelial cell surface glycoforms. *J Biol Chem* 1998; **273**: 11533–11543.
- [47] NAMAVAR F, SPARRIUS M, VEERMAN ECI, APPELMELK BJ, VANDERBROUCKER-GRAULS CMJE. Neutrophil-activating protein mediates adhesion of *Helicobacter pylori* to sulfated carbohydrates on high-molecular-weight salivary mucin. *Infect Immun* 1998; **66**: 444–447.
- [48] ODENBREIT S, TILL M, HOFREUTER D, FALLER G, HAAS R. Genetic and functional characterization of the *alpAB* gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Mol Microbiol* 1999; **5**: 1537–1548.
- [49] O'TOOLE PW, JANZON L, DOIG P, HUANG JZ, KOSTRZUŃSKA M, TRUST TJ. The putative neuraminylactose-binding hemagglutinin HpaA of *Helicobacter pylori* CCUG 17874 is a lipoprotein. *J Bacteriol* 1995; **177**: 6049–6057.
- [50] PECK B, ORTKAMP M, DIEHL KD, HUNDT E, KNAPP B. Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. *Nucl Acids Res* 1999; **16**: 3325–3333.

- [54] SCHMITT W, HAAS R. Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol Microbiol* 1994; **12**: 307–319.
- [55] SHEN Z, FENG Y, FOX JG. Identification of enterohepatic *Helicobacter* species by restriction fragment-length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *Helicobacter* 2000; **5**: 121–128.
- [56] SIMON PM, GOODE PL, MOBASSERI A, ZOPF D. Inhibition of *Helicobacter pylori* binding to gastrointestinal epithelial cells by sialic acid-containing oligosaccharides. *Infect Immun* 1997; **65**: 750–757.
- [57] SKOULOUBRIS S, THIBERGE JM, LABIGNE A, DEREUSE H. The *Helicobacter pylori* UreI protein is not involved in urease activity but is essential for bacterial survival *in vivo*. *Infect Immun* 1998; **66**: 4517–4521.
- [58] STEIN M, RAPPUOLI R, COVACCI A. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after csg-driven host cell translocation. *Proc Natl Acad Sci* 2000; **3**: 1263–1268.
- [59] STUARD-TILLEY AC, SARDET J, POUSSEGUR MA. Immunolocalization of anion exchanger AE2 and cation exchanger NHE-1 in distinct adjacent cells of gastric mucosa. *Am J Physiol* 1994; **266**: 559–568.
- [60] SYDER AJ, GURUGE JL, LI Q, HU Y, OLEKSIWICZ CM, LORENZ RG, KARAM SM, FALK PG, GORDON JI. *Helicobacter pylori* attaches to NeuAc alpha 2,3Gal beta 1,4 glycoconjugates produced in the stomach of transgenic mice lacking parietal cells. *Molec Cell* 1999; **3**: 263–274.
- [61] TAYLOR DE, EATON M, CHANG N, SALAMA S. Construction of a *Helicobacter pylori* genome map and demonstration of diversity at the genome level. *J Bacteriol* 1992; **174**: 6800–6806.
- [62] TEFORD JL, GHIARA P, DELL'ORCOM, DWYER B, CAMANDUCCI M. Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J Exp Med* 1994; **179**: 1653–1668.
- [63] TENEBERG S, MILLER-PODRAZA H, LAMPERT HC, EVANS DJ, EVANS DG, DANIELSSON D, KARLSSON KA. Carbohydrate binding specificity of the neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 1997; **272**: 19067–19071.
- [64] TOMB JF, WHITE O, KERLAVAGE AR, CLAYTON RA, SUTTON GG. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997; **388**: 539–547.
- [65] TSUDA M, KARITA M, MORSHED MG, OKITA K, NAKAZAWA T. A urease-negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach. *Infect Immun* 1994; **62**: 3586–3589.
- [66] TUMMURU MKR, SHARMA SA, BLASER MJ. *Helicobacter pylori* picB, a homologue of the *Bordetella pertussis* toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. *Mol Microbiol* 1995; **18**: 867–876.
- [67] UTT M, WADSTROM T. Identification of heparan sulphate binding surface proteins of *Helicobacter pylori*: inhibition of heparan sulphate binding with sulphated carbohydrate polymers. *J Med Microbiol* 1997; **46**: 541–546.
- [68] WARREN JR, MARSHALL BJ. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983; **1**: 1273–1275.
- [69] YAMAGUCHI H, OSAKI T, KURIHARA N, TAGUCHI H, HANAWA T, YAMAMOTO T, KAMIYA S. Heat-shock protein 60 homologue of *Helicobacter pylori* is associated with adhesion of *H. pylori* to human gastric epithelial cells. *J Med Microbiol* 1997; **46**: 825–832.
- [70] YOSHIDA N, GRANGER DN, EVANS DJ, EVANS DG, GRAHAM DY, ANDERSON DC, WOLF RE, KYIETYS PR. Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Gastroenterology* 1993; **105**: 1431–1440.
- [71] YOSHIYAMA H, MIZOTE T, NAKAMURA H, OKITA K, NAKAZAWA T. Chemotaxis of *Helicobacter pylori*: a urease-independent response. *J Gastroenterol* 1998; **33**: 1–5.
- [72] YOSHIYAMA H, NAKAZAWA T. Unique mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus. *Microbes and Infection* 2000; **2**: 55–60.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 06.05.2003 r.

Przyjęto: 29.05.2003 r.

Adres autora: ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

e-mail janusz@biol.uni.lodz.pl

METALOPROTEINAZY ADAM – ROLA W FUZJI KOMÓREK I PROTEOLIZIE

METALOPROTEINASES ADAM – THE ROLE IN CELL FUSION AND PROTEOLYSIS

Edyta BRZÓSKA

Zakład Cytologii, Uniwersytet Warszawski

Streszczenie: Proteoliza białek na powierzchni błony komórkowej i proteoliza białek macierzy zewnątrzkomórkowej jest niezwykle ważnym procesem zachodzącym w prawidłowo funkcjonujących komórkach. Metaloproteinazy ADAM to białka transbłonowe, które łączą cechy białek adhezyjnych i proteinaz. Białka te uczestniczą w: adhezji, fuzji, uwalnianiu domen zewnątrzkomórkowych białek transbłonowych, przekazywaniu sygnału. Białka ADAM odgrywają istotną rolę w procesach związanych z: zapłodnieniem, fuzją mioblastów i neurogenezą oraz w wielu innych. Na szczególną uwagę zasługuje: udział białka ADAM 17 w uwalnianiu TNF α , rola białka ADAM 10 w przekazywaniu sygnału przy udziale receptora Notch, funkcje fertyliny w procesie zapłodnienia oraz meltryny α w fuzji mioblastów.

Słowa kluczowe: ADAM, fertylina, fuzja, Kuzbanian, metaloproteinazy, meltryna, proteoliza, TACE.

Summary: Proteolysis on the cell surface and in the extracellular matrix is a very important process in normal cellular functions. Metalloproteinases ADAM are transmembrane proteins, which combine features of adhesion molecules and proteases. They participate in: adhesion, fusion, release ectodomains of membrane proteins, signal transduction. ADAMs play a key role in: fertilization, myoblasts fusion, neurogenesis, and other processes. A particularly interesting is: participation of ADAM 17 in TNF α releasing, role of ADAM 10 in Notch-mediated signaling, function of fertilin in fertilization and meltrin α in myoblast fusion.

Key words: ADAM, fertilin, fusion, Kuzbanian, meltrin, metalloproteinases, proteolysis, TACE.

1. WSTĘP

Metaloproteinazy ADAM (*A Disintegrin And Metalloproteinase*), nazywane również białkami MDC (*Metalloproteinase/Disintegrin/Cysteine-rich proteins*) to rodzina białek transbłonowych klasy I. Szczególną cechą tej grupy białek jest połączenie

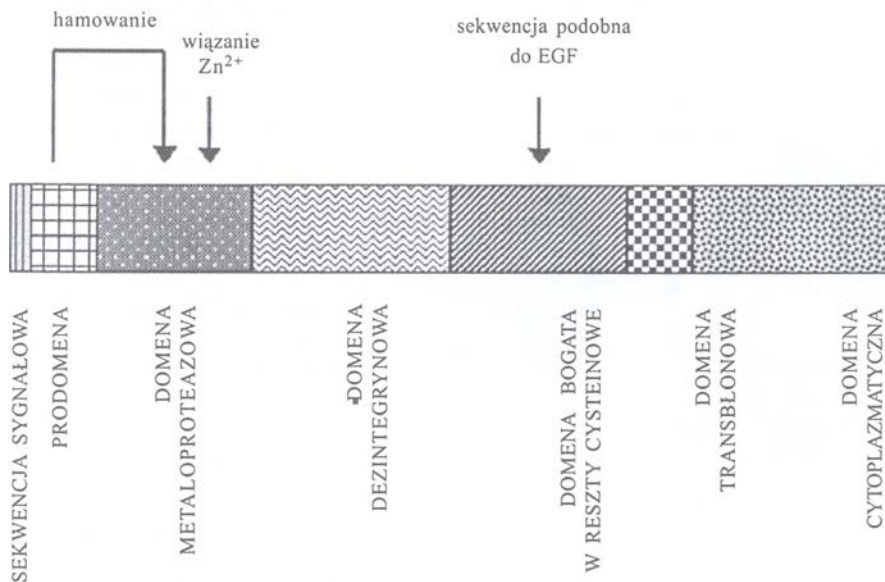
właściwości białek adhezyjnych i proteinaz. Białkami, które charakteryzują się budową podobną do ADAM, są: metaloproteinazy (MMP), białka ADAMTS (*A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin motifs*), proteinazy serynowe (np. trombina, plazminogen tkankowy, plazmina), występujące w jądzie węży metaloproteinazy – SVMP (*Snake Venom MetalloProteinase*) oraz cała rodzina dezintegryn [11,20,42,47].

Ogółem u różnych organizmów od *Schizosaccharomyces pombe* do człowieka odkryto ponad 30 białek, które zaliczono do rodziny ADAM [7]. Budowa białek ADAM determinuje pełnione przez nie funkcje. Do procesów, w jakich biorą udział, należą przede wszystkim: adhezja, fuzja, proteoliza domen zewnątrzkomórkowych białek transbłonowych oraz białek ECM. Białka ADAM uczestniczą w zjawiskach związanych z: zapłodnieniem, fuzją mioblastów, neurogenezą oraz przekazywaniem sygnału przez receptor Notch i wielu innych [42].

2. BUDOWA BIAŁEK ADAM

Białka ADAM zbudowane są z kilku domen (ryc. 1), jest to kolejno:

- N-końcowa sekwencja sygnałowa,
- prodomena – pełniąca funkcje regulatorowe, przez wiązanie się z domeną metaloproteinazową hamująca miejsce katalityczne enzymu (ryc. 2),
- domena metaloproteinazowa – zawierająca domenę katalityczną o charakterystycznej sekwencji HEXGHXXGXXHD,
- domena dezintegrynowa – mająca budowę podobną do domeny występującej w SVMP, zaangażowana w oddziaływania z integrynami oraz wiązanie substratów metaloproteinaz [15,18,42, 3852],
- region bogaty w reszty cysteinowe, zazwyczaj zawierający powtórzenia analogiczne do EGF (*Epidermal Growth Factor*), biorący udział w procesach adhezji i fuzji, prawdopodobnie uczestniczący w wiązaniu integryn, syndekanów (proteoglikany transbłonowe) i substratów metaloproteinaz ADAM [5]; w obrębie tej domeny w niektórych białkach ADAM, na przykład ADAM 1 (fertylina α), ADAM 12 (meltryna α) oraz ADAM 9, 11 i 19, znajduje się krótka sekwencja o charakterze hydrofobowym tak zwany peptyd fuzyjny (*fusion peptid*), której budowa jest analogiczna do sekwencji występującej w białkach wirusów zaangażowanych w fuzję z błoną komórkową, sekwencja ta jest niezwykle istotna w procesie fuzji błon komórkowych,
- domena transbłonowa – krótka domena o charakterze hydrofobowym,
- domena cytoplazmatyczna – prawdopodobnie biorąca udział w regulacji funkcji białek ADAM.

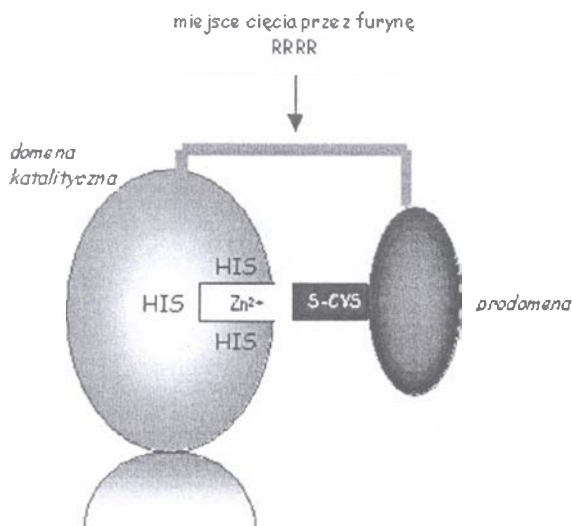


RYCINA 1. Schemat budowy białek ADAM

3. UDZIAŁ BIAŁEK ADAM W PROTEOLIZIE

3.1. Regulacja aktywności proteolitycznej

Niezwykle interesująca wydaje się aktywność proteolityczna białek ADAM. Do aktywnych proteinaz należą ADAM: 1,8,9,10,12,13,15,17,19,20 oraz 28 [5,7,39]. Proteinazy ADAM wiążą substrat przez domenę dezintegrynową lub bogatą w reszty cysteinowe. Umożliwia to oddziaływanie domeny katalitycznej z substratem. W aktywacji metaloproteinaz niezbędna jest obecność jonów cynku, które wiązane są przez trzy reszty histydynowe domeny metaloproteazowej (ryc. 2). Prawdopodobnie rolę w regulacji aktywności proteolitycznej białek ADAM odgrywa ich prodomena, która wiąże się przez wolne grupy sulfhydryłowe reszt cysteinowych z miejscem katalitycznym i inhibuje je (ryc. 2). Prodomena może być odcinana przez furynę (konwertaza) w obrębie sekwencji RRRR [6,42]. Odcięcie prodomeny prawdopodobnie nie jest jedynym mechanizmem regulującym aktywność białek ADAM. Jest to jednak etap niezbędny w ich aktywacji. Na aktywność proteinazową białek ADAM ma wpływ wiele czynników, chociaż mechanizm ich działania nie jest wyjaśniony. Aktywność proteinazowa białek ADAM zwiększa się po traktowaniu estrami forbolu (aktywatory PKC), inhibitorami fosfatyz serynowo/treoninowych lub tyrozynowych oraz w wyniku aktywacji kinaz tyrozynowych i MAP kinaz (*Mitogen-Activated Protein kinase*) [43].



RYCINA 2. Inhibicja domeny katalitycznej przez prodomenę w białkach ADAM oraz udział furyny w odcinaniu prodomeny

białek transbłonowych [39]. Tym sposobem uwalniany jest szereg substancji, takich jak: cytokiny oraz czynniki wzrostu (TGF α – *Tumor Growth Factor α* , TNF α – *Tumor Necrosis Factor α* , SCF – *Stem Cell Factor*, DCC – *Deleted in Clon Cancer*, HB-EGF – *Heparin Binding-Epidermal Growth Factor*) [31]. Do puli substratów ADAM należą również receptory (*Fibroblast Growth Factor Receptor*: FGF- R, *Notch*, *InterLeukin Receptor-6*: IL6R, TNFR1, TNFR2), cząsteczki adhezyjne (L-selektyny), białko APP (*Amyloid Precursor Protein*), Fas-ligand [5,7,8,31,42,43,51].

3.3. Funkcje białka ADAM 17 (TACE)

Jedną z najlepiej opisanych aktywnych proteinaz jest ADAM 17, nazywany również TACE (*TNF- α Converting Enzyme*) [6,27,31]. Substraty TACE to: TNF α , TGF α , EGF, HB-EGF, L-selektyna, receptor I i II dla TNF, receptor IV dla interleukiny 1, receptor dla interleukiny 6, receptor Notch, amyloidowe prekursor białka APP, ACE (*Angiotensin-Converting Enzyme*) [6,9,37].

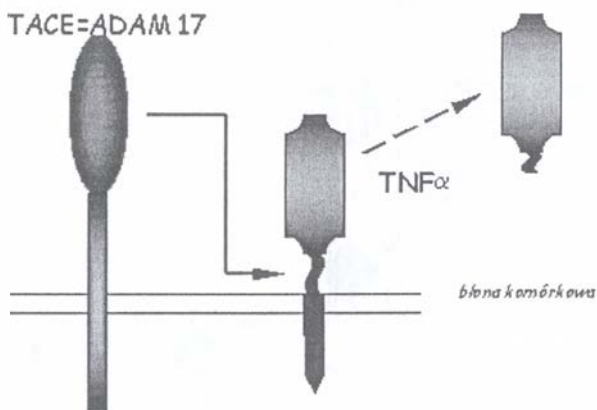
TACE odgrywa niezwykle istotną rolę w uwalnianiu TNF α . TNF α to wielofunkcyjna cytokina, która jest szybko wydzielana w odpowiedzi na infekcję. TNF α ulega translacji jako 26 kDa białko transbłonowe, które jest odcinane między Ala76 a Val77 i uwalniane z powierzchni jako 17 kDa białko [51] (ryc. 3). Limfocyty T i monocyty z mutacją w obrębie domeny katalitycznej HEXXH w eksonie kodującym TACE uwalniają o 90% mniej TNF α [4,5,6]. Komórki z takim nokautem produkują również mniej TGF α . Natomiast mutacja Tace Δ Zn/ Δ Zn u myszy jest letalna [37].

3.2 Substraty białek ADAM

Proteoliza białek na powierzchni błony komórkowej oraz białek ECM jest niezwykle ważnym procesem w prawidłowym funkcjonowaniu, migracji i różnicowaniu się komórek. W ten sposób komórki mogą zmieniać otaczające je środowisko przez częściową degradację składników ECM, modulację ich właściwości czy uwalnianie związanych z białkami ECM czynników wzrostu [32,45]. Do substratów metaloproteinaz ADAM należą zarówno białka macierzy zewnątrzkomórkowej, jak i domeny zewnątrzkomórkowe

3.4. Rola białka ADAM 10 w przekazywaniu sygnału przez receptor Notch

Kolejnym niezwykle ciekawym białkiem jest ADAM 10 (MADM), u *Drosophila melanogaster* nazywane Kuz lub Kuzbanian, natomiast u *Caenorhabditis elegans* nazywane SUP-17. ADAM 10 odrywa niezwykle istotną rolę w procesach miogenezy oraz neurogenezy, w rozwoju centralnego i obwodowego układu nerwowego oraz wzroście aksonów [31,41]. Wykazano również obecność ADAM 10 w kościach, monocytach i limfocytach T [5,51]. Substraty dla ADAM 10 to między innymi: kolagen typu IV, $TNF\alpha$, mielina, ephirina-A2, APP oraz receptor Notch. Białko ADAM 10 odgrywa istotną rolę w przekazywaniu sygnału za pośrednictwem białka Notch [40]. Receptor

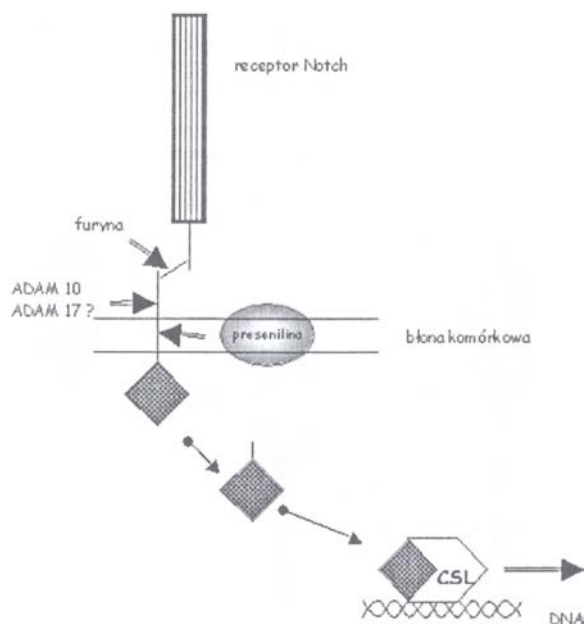


RYCINA 3. Proces odcinania $TNF\alpha$ przez TACE (ADAM 17)

Notch jest białkiem transbłonowym, zaangażowanym w przekazywanie sygnału w procesie bocznej inhibicji podczas organogenezy. Receptor Notch kontroluje przebieg procesów rozwoju organizmów i różnicowania [34,44,49]. Białko Notch jest cięte proteolitycznie w trzech miejscach przez: konwertazę podobną do furyny (*furin-like convertase*), ADAM 10 i presenilinę (ryc. 4). Konwertaza jako pierwsza odcina około 200 kDa zewnątrzkomórkowy fragment białka i jej aktywność jest konstytutywna. Następnie receptor Notch cięty jest przez metaloproteinazę ADAM 10 również w obrębie domeny zewnątrzkomórkowej. Uwolnienie dużego fragmentu zewnątrzkomórkowego pozwala na odcięcie domeny wewnątrzkomórkowej przez presenilinę. Uwolniony w ten sposób fragment wewnątrzkomórkowy receptora Notch podlega translokacji do jądra komórkowego i łączy się z czynnikami transkrypcyjnymi z rodziny CSL (CBF1, Su(H), Lag-1), aktywując transkrypcję wielu genów [8,46]. Prawdopodobnie również białko ADAM 17 (TACE) ma udział w cięciu receptora Notch, miejsce działania jest takie samo jak w przypadku ADAM 10. Jednak głównym enzymem odpowiedzialnym za proteolizę receptora Notch jest ADAM 10 (Kuzbanian) [14,37].

3.5. Rola białka ADAM 10 (MADM) w proteolizie białka APP

Podobnie jak białko Notch transbłonowe białko APP (amyloidowe białko prekursorowe) również należy do substratów ADAM 10. Białko APP odgrywa ważną rolę w patogenezie choroby Alzheimera. Białko APP jest cięte proteolitycznie w trzech miejscach przez: α -, β - i γ -sekretazę. Zarówno α -, jak i β -sekretaza odcinają fragmenty zewnątrzkomórkowe. Natomiast γ -sekretaza tnie białko w obrębie domeny



RYCINA 4. Proteoliza receptora Notch przez ADAM 10 (Kuzbanian) i udział Notch w przekazywaniu sygnału do komórki

transbłonowej. W następstwie proteolizy przez sekretazy γ i β uwalniane zostają nierozpuszczalne fragmenty zewnątrzkomórkowe białka APP o różnej długości: $A\beta_{40}$ i $A\beta_{42}$. Podczas rozwoju choroby Alzheimera krótkie peptydy $A\beta$ (nazywane beta-amyloidem) ulegają agregacji i akumulacji w zewnątrzkomórkowych tarczach amyloidowych między komórkami nerwowymi, nazywanych również płytkami starczymi [8,42,48]. Złogi amyloidowe są objawem histopatologicznym choroby Alzheimera, nie wiadomo jednak dokładnie, jaka jest ich rola w rozwoju choroby. W wyniku cięcia przez α -sekre-tazę powstaje rozpuszczalny fragment białka APP: APPs α .

Wydaje się iż α -sekre-taza pełni funkcje ochronne w przypadku choroby Alzheimera, ponieważ uniemożliwia powstawanie patogennych fragmentów $A\beta$. Wykazano, iż funkcje α -sekre-tazy może spełniać ADAM 10 (Kuz) [8,26]. W fibroblastach i komórkach linii HEK-293 ADAM 17 (TACE) może odgrywać rolę w tym procesie [9,43,48,51]. W przypadku komórek COS nadekspresja ADAM 9 również powodowała wzrost proteolizy APP [19]. Tym niemniej według niektórych autorów w badaniach *in vitro* metaloproteinaza TACE w bardzo niewielkim stopniu jest w stanie ciąć białko APP [35]. Prawdopodobnie w komórce jest kilka enzymów mogących pełnić rolę endogennych α -sekre-taz.

4. BIAŁKA ADAM W ZAPŁODNIENIU

Najlepiej poznanymi białkami ADAM biorącymi udział w procesie fuzji komórki jajowej i plemnikowej jest fertylina α i β (nazywana również PH-30) występujące w błonie komórkowej plemników w rejonie równikowym i wewnętrznej błony akrosomu. Plemniki z fertyliną β -/- o około 87% słabiej wiążą się do oocytu pozbawionego osłonki przejrzystej. Plemniki takie również gorzej migrują z macicy do jajowodów

[31]. W komórkach z nokautem genu fertyliny β wykazano ponad to obniżony poziom ekspresji fertyliny α [12] i ADAM 3 (cyritestyny) [3,53].

Podczas dojrzewania plemników obydwie podjednostki zarówno α , jak i β ulegają licznym modyfikacjom, które polegają na odcięciu prodomeny i domeny metaloproteinazowej, zanim plemniki opuszczają jądra [2]. Proces „dojrzewania” fertyliny jest niezwykle interesujący [42]. W wyniku tego procesu w błonie dojrzałej komórki plemnikowej obecna jest fertylina, na której N-końcu znajduje się domena dezintegrynowa. Prawdopodobnie umożliwia to wiązanie integryn obecnych w błonie komórkowej oocyty. Ligandem dla fertyliny jest integryna $\alpha 6 \beta 1$ obecna w błonie komórkowej oocyty [15,18]. Oprócz integryny $\alpha 6 \beta 1$ w proces fuzji oocyty i plemnika zaangażowane są również inne integryny $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha M \beta 2$, $\alpha V 1 \beta 3$ oraz kombinacje $\alpha 6$ i $\beta 1$ z innymi podjednostkami oraz białko z rodziny tetraspanin CD9 [15]. Wiązanie fertylina-integryny poprzedza proces fuzji błon komórkowych plemnika i oocyty. Tą drogą prawdopodobnie możliwe jest oddziaływanie krótkiej sekwencji amino-kwasowej o charakterze hydrofobowym, występującej w domenie bogatej w reszty cysteinowe fertyliny α , z błoną komórkową oocyty [33,36].

ADAM 3 (cyritestyna) jest równie ważnym białkiem w procesie fuzji [52]. Podczas dojrzewania plemników ADAM 3 ulega podobnej obróbce posttranslacyjnej jak fertylina α i β . Brak ADAM 3 znacznie obniża wiązanie plemnika do oocyty o 91%. Komórki takie również wykazują mniejszą ekspresję fertyliny α i β . Kolejne białka ADAM odgrywające rolę w tym procesie to ADAM 24,25,26,27 [53].

5. BIAŁKA ADAM W FUZZI MIOBLASTÓW

Fuzja dwóch komórek jest niezwykle skomplikowanym procesem wymagającym rearanżacji w strukturze błony komórkowej i zaangażowania licznych białek, które po pierwsze uczestniczą w powstaniu kontaktu komórka-komórka, a następnie umożliwiają sam proces fuzji błon [21]. Jednym z białek, które niewątpliwie odgrywa ważną rolę w procesie fuzji mioblastów jest meltryna α (ADAM 12) [30]. Prawdopodobnie białko z racji swojej budowy może uczestniczyć zarówno w adhezji komórka-komórka wiążąc się z integrynami sąsiedniej komórki, jak i w samym procesie fuzji, ponieważ ma w obrębie domeny bogatej w cysteinę krótką sekwencję o charakterze hydrofobowym, której budowa jest analogiczna do sekwencji peptydu fuzyjnego występującego u wirusów [25,36,51].

Metaloproteinaza ADAM 12 została zidentyfikowana przez Fujisawa-Sehara i zespół w 1995 roku [50]. Meltryna α bierze udział w procesach miogenezy i kościotworzenia. Jej ekspresję wykazano w mięśni serca, mięśniach gładkich oraz szkieletowych, a także w komórkach MGC (*Macrophage-derived Giant Cells*), osteoklastach i niektórych komórkach nowotworowych [10,23].

W proces adhezji komórka-komórka zaangażowana jest niewątpliwie domena dezintegrynowa białka ADAM 12, która prawdopodobnie oddziałuje z integrynami poprzez sekwencję SNS [42,55]. Ponadto domena bogata w cysteinę oddziałuje z

syndekanami (proteoglikany transbłonowe towarzyszące integrynom), przez co również zaangażowana jest w proces adhezji komórka-ECM i komórka-komórka, wzmacniając wiązanie z integrynami [22,23,28,55]. Poza tym niezwykle ważną rolę w fuzji odgrywa sekwencja peptydu fuzyjnego w obrębie domeny bogatej w cysteinę. Jednak transfekcja fibroblastów cDNA dla ADAM 12 nie prowadzi do fuzji tych komórek [50].

Domena cytoplazmatyczna ADAM 12 wiąże α -aktyninę 1 i 2 oraz kinazę tyrozynową Src [10,17,24]. Poprzez aktyninę meltryna α może tworzyć połączenia z elementami cytoszkieletu.

Meltryna α jest markerem różnicowania się komórek mięśniowych. ADAM 12 nie występuje w mięśniach dorosłych osobników, obecny jest natomiast w mięśniach zarodkowych i regenerujących [16,50]. ADAM 12 pojawia się w różnicujących mioblastach wraz z pojawieniem się miogeniny, czynnika transkrypcyjnego indukującego syntezę specyficznych białek mięśniowych [16]. Prawdopodobnie, podobnie jak w przypadku fertyliny α i β oraz cyritestyny, białko promeltryna podlega proteolizie podczas różnicowania się mioblastów i zostaje pozbawione prodomeny i domeny metaloproteinazowej.

Wykazano również, iż istnieje wydzielana na zewnątrz komórki forma białka ADAM 12. Jest to forma ADAM 12-S, powstająca w wyniku alternatywnego *spliceingu* białka ADAM 12 [29]. ADAM 12-S indukuje miogenezę komórek [17]. Meltryna α bierze udział także w zjawisku fuzji makrofagów [1]. Wzrost syntezy mRNA i samego białka ADAM 12 wykazano w jednojądrowych makrofagach tuż przed rozpoczęciem procesu fuzji, prowadzącego do powstawania osteoklastów i komórek MGC.

6. PODSUMOWANIE

Proteoliza białek na powierzchni komórki i białek macierzy zewnątrzkomórkowej jest niezwykle ważnym procesem w prawidłowym funkcjonowaniu komórki i organizmu. Oprócz procesów proteolizy i fuzji białka ADAM biorą również udział w migracji komórek. Przykładowo domena zewnątrzkomórkowa L-selektyny w leukocytach jest uwalniana po cięciu przez metaloproteinazy ADAM. Zmniejszenie puli L-selektyny na powierzchni komórki umożliwia odzepienie się leukocytów od nabłonka. Dodatkowo uwolniona L-selektyna wiążąc się z ligandami na powierzchni komórek nabłonka, uniemożliwia adhezję limfocytów [51].

Białka ADAM ze względu na swoją budowę i wielorakość pełnionych przez nie funkcji są niezwykle interesującym i trudnym obiektem badań. Oprócz złożonej budowy białek ADAM należy jeszcze zwrócić uwagę na niezwykle interesujące procesy związane z „dojrzewaniem” samego białka podczas różnicowania się komórek, jak to ma miejsce w przypadku fertylin i prawdopodobnie meltryny α . W wyniku „dojrzewania” białka ADAM możliwe staje się pełnienie przez nie innych funkcji (poza proteolizą) związanych z adhezją i fuzją.

Metaloproteinazy ADAM biorą również udział w rozwoju i progresji nowotworów oraz angiogenezie. Jest to możliwe dzięki zdolności białek ADAM do zmieniania

mikrośrodowiska ECM, a także aktywacji uwalniania cytokin oraz stymulacji migracji komórek.

PODZIĘKOWANIA

Autorka dziękuje Panu Prof. dr hab. Jerzemu Moraczewskiemu, Panu Prof. dr hab. Jerzemu Kawiakowi i Pani mgr Iwonie Grabowskiej za przeczytanie manuskryptu i cenne uwagi.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ABE E, MOCHARLA H, YAMATE T, TAGUCHI Y, MANOLAGAS SC. Meltrin- α a fusion protein involved in multinucleated giant cell and osteoclast formation. *Calcified Tissue Int* 1999; **64**: 508–520.
- [2] BIGLER D, CHEN M, WATERS S, WHITE JM. A model for sperm-egg binding and fusion based on ADAMs and integrins. *Trends Cell Biol* 1997; **7**: 220–224.
- [3] BIGLER D, TAKAHASI Y, CHEN MS, ALMEIDA EAC, OSBOURNE L, WHITE JM. Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 2 (fertilin β) and murine eggs. *J Biol Chem* 2000; **275**(16): 11576–11584.
- [4] BLACK R, RAUCH CT, KOZLOSKI CJ, PESCHON JJ, SLACK JL, WOLFSON MF, CASTNER BJ, STOCKING KL, REDDY P, SRINIVASAN S. A metalloprotease disintegrin that releases tumor-necrosis factor- α from cells. *Nature* 1997; **385**: 729–733.
- [5] BLACK RA, WHITE JM. ADAMs: focus on the protease domain. *Curr Opin Cell Biol* 1998; **10**: 654–659.
- [6] BLACK RA. Tumor necrosis factor- α converting enzyme. *IJBCB* 2002; **34**: 1–5.
- [7] BLOBEL CP. Functional and biochemical characterization of ADAMs and their predicted role in protein ectodomain shedding. *Inflamm Res* 2002; **51**: 083–084.
- [8] BLOBEL CP. Remarkable roles of proteolysis on and beyond the cell surface. *Curr Opin Cell Biol* 2000; **12**: 606–612.
- [9] BUXBAUM JD, LIU KN, LUO Y, SLACK, STOCKING KL, PESCHON JJ, JOHNSON RS, CASTNER BJ, CERRETTI DP, BLACK RA. Evidence that tumor necrosis factor α converting enzyme is involved in regulated α -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* 1998; **273**: 27764–27767.
- [10] CAO Y, KANG Q, ZOLKIEWSKA A. Metalloprotease-disintegrin ADAM 12 interacts with α -actinin-1. *Biochem J* 2001; **357**: 353–361.
- [11] CHANG C, WERB Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* 2001; **11** (11): S37–S43.
- [12] CHO C, GE H, BRANCIORTE DR, PRIMAKOFF P, MYLES DG. Analysis of mouse fertilin in wild type and fertilin β (-/-) sperm: evidence for C-terminal modification, α/β dimerization, and lack of essential role of fertilin α in sperm-egg fusion. *Dev Biol* 2000; **222**(2): 289–295.
- [13] CHO C, O'DELL BUNCH D, FAURE JM, GOUDLING EH, EDDY EM, PRIMAKOFF P, MYLES DG. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin β . *Science* 1998; **281**: 1857–1859.
- [14] DALLAS DJ, GENEVER PG, PATTON AJ, MILLICHIP MI, MCKIE N, SKERRY TM. Localization of ADAM 10 and Notch receptors in bone. *Bone Vol* 1999; **1**(25): 9–15.
- [15] EVANS JP. Fertilin β and other ADAMs as integrin ligands: insights into cell adhesion and fertilization. *Bioessays* 2001; **23**: 628–639.
- [16] GALLIANO MF, HUET C, FRYGELIUS J, POLGREN A, WEWER UM, ENGVAL E. Binding of ADAM12, a marker of skeletal muscle regeneration, to the muscle-specific aktin-binding protein, α -aktynin-2, is required for myoblast fusion. *J Biol Chem* 2000; **275**(18): 13933–13939.
- [17] GILPIN BJ, LOECHEL F, MATTEI MG, ENGVAL E, ALBRECHTSEN R, WEWER UM. A novel, secreted from human ADAM 12 (meltrin α) provokes myogenesis *in vitro*. *J Biol Chem* 1998; **273** (1): 157–166.

- [18] GUPTA S, LI H, SAMPSON NS. Characterization of fertilin β -disintegrin binding specificity in sperm-egg adhesion. *Bioorg Med Chem* 2000; **8**: 723–729.
- [19] HOTODA N, KOIKE H, SASAGAWA N, ISHIURA S. A secreted form of human ADAM9 has an α -secretase activity for APP. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **293**: 800–805.
- [20] HUANG TF. What snakes taught us about integrins? *CMLS* 1998; **54**: 527–540
- [21] HUOVILA APJ, ALMEIDA EAC, WHITE JM. ADAMs and cell fusion. *Curr Opin Cell Biol* 1996; **8**: 692–699.
- [22] IBA K, ALBRECHTSEN R, GLIPIN BJ, FROHLICH C, LOECHEL F, ZOLKIEWSKA A, ISHIGURO K, KOJIMA T, LIU W, LANGFORD KJ, SANDERSON RD, BRAKEBUSCH C, FASSLER R, WEWER UM. The cysteine-rich domain of human ADAM 12 supports cell adhesion through syndecans and triggers signaling events that lead to β 1 integrin-dependent cell spreading. *J Cell Biol* 2000; **149**: 1143–1155.
- [23] IBA K, ALBRECHTSEN R, GLIPIN BJ, LOECHEL F, WEWER UM. Cysteine-rich domain of human ADAM 12 (meltrin α) supports tumor cell adhesion. *Am J Pathol* 1999; **54**(5): 1489–1501.
- [24] KANG Q, CAO Y, ZOLKIEWSKA A. Metalloprotease-disintegrin ADAM 12 binds to the SH3 domain and activates Src tyrosine kinase in C2C12 cells. *Biochem J* 2000; **352**: 883–892.
- [25] KURISAKI T, MASUDA A, OSUMI N, NEBESHIMA Y, FUJISAWA-SEHARA A. Spatially- and temporally-restricted expression of meltrin α (ADAM 12) and β (ADAM 19) in mouse embryo. *Mech Dev* 1998; **73**: 211–215.
- [26] LAMMICH S, KOJRO E, POSTINA R, GILBERT S, PFEIFFER R, JASIONOWSKI M, HAASS C, FAHRENHOLZ F. Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci US* 1999; **96**: 3922–3927.
- [27] LEE MH, VERMA V, MASKOS K, BECHERER JC, KNAUPER V, DODDS P, AMOUR A, MURPHY G. The C-terminal domains of TACE weaken the inhibitory action of N-TIMP-3. *FEBS Lett* 2002; **520**: 102–106.
- [28] LOECHEL F, GILPIN BJ, ENGVAL E, ALBRECHTSEN R, WEWER UM. Human ADAM 12 (meltrin α) is an active metalloprotease. *J Biol Chem* 1998; **273**(27): 16993–16997.
- [29] LOECHEL F, WEWER UM. Activation of ADAM 12 protease by copper. *FEBS Lett* 2001; **506**: 65–68.
- [30] MILLER JB. Making one cell from two. *Nature* 1995; **377**: 555.
- [31] MOSS ML, WHITE JM, LAMBERT MH, ANDREWS RC. TACE and other ADAM proteases as targets for drug discovery. *DDT* 2001; **6**(8): 417–426.
- [32] MURPHY G, GAVRILOVIC J. Proteolysis and cell migration: creating a path? *Curr Opin Cell Biol* 1999; **11**: 614–621.
- [33] NISHIMURA H, BRANCIFORTE DR, MYLES DG, PRIMAKOFF P. Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin β . *Dev Biol* 2001; **233**: 204–213.
- [34] PAN D, RUBIN J. Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila melanogaster* and vertebrate neurogenesis. *Cell* 1997; **90**: 271–280.
- [35] PARVATHY S, KARRAN KH, TURNER AJ, HOOPER NM. The secretases that cleave angiotensin converting enzyme and the amyloid precursor protein are distinct from tumour necrosis factor- α convertase. *FEBS Lett* 1998; **431**: 63–65.
- [36] PECHEUR EI, SAINTE-MARIE J, BIENVENUE A, HOEKSTRA D. Peptides and membrane fusion: towards an understanding of the molecular mechanism of protein-induced fusion. *J Membrane Biol* 2000; **167**: 1–17.
- [37] PESCHON JJ, SLACK JL, REDDY P, STOCKING KL, SUNNARBORG SW, LEE DC, RUSSEL WE, CASTNER BJ, JOHNSON RS, FITZNER JN. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 1998; **282**: 1281–1284.
- [38] POINDEXTER K, NELSON N, DUBOSE RF, BLACK RA, CERRETTI DP. The identification of seven metalloproteinase-disintegrin (ADAM) genes from genomic libraries. *Gene* 1999; **237**: 61–70.
- [39] PRIMAKOFF P, MYLES DG. The ADAM gene family. *TIG* 2000; **2**(16): 83–87.
- [40] QI H, RAND MD, WU X, SESTAN N, WANG W, RAKIC P, XU T, ARTAVANIS-TSAKONAS S. Processing of the Notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian. *Science* 1999; **28**: 91–94.
- [41] SCHIMMELPFENG K, GOEGEL S, KLAČMBT C. The function of leak and kuzbanian during growth cone and cell migration. *Mech Dev* 2001; **106**: 25–36.
- [42] SCHLONDORFF J, BLOBEL CP. Metalloprotease - disintegrins: modulator proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci* 1999; **112**: 3603–3617.
- [43] SLACK BE, MA LK, SEAH CC. Constitutive shedding of the amyloid precursor protein ectodomain is up-

- regulated by tumor necrosis factor- α converting enzyme. *Biochem J* 2001; **357**: 787–794.
- [44] SOTILLOS S, ROCH F, CAMPUZANO S. The metalloprotease-disintegrin Kuzbanian participates in Notch activation during growth and patterning of *Drosophila* imaginal discs. *Development* 1997; **124**: 4769–4779.
- [45] STREULI C. Extracellular matrix remodeling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 1999; **11**: 634–640.
- [46] STRUHL G, ADACHI A. Nuclear access and action of Notch *in vivo*. *Cell* 1998; **93**: 649–660.
- [47] TANG BL. ADAMTS: novel family of extracellular matrix proteases. *IJBCB* 2001; **33**: 33–44.
- [48] VASSAR R, BENNETT BD, BABU-KHAN S, KAHN S, MENDIAZ EA, DENIS P, TEPLow DB, ROSS S, AMARANTE P, LOELOFF R. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 1999; **286**: 735–741.
- [49] WEN C, METZSTEIN MM, GREENWALD I. SUP-17 a *Caenorhabditis elegans* ADAM protein related to *Drosophila* KUZBANIAN, and its role in LIN-12/NOTCH signaling. *Development* 1997; **124**: 4759–4767.
- [50] YAGAMI-HIROMASA T, SATO T, KURISAKI T, KAMIJO K, NABESHIMA Y, FUJISAWA-SEHARA A. A metalloprotease-disintegrin participating in myoblast fusion. *Nature* 1995; **377**: 652–656.
- [51] YAMAMOTO S, HIGUCHI Y, YOSHIYAMA K, SHIMIZU E, KATAOKA M, HIJIYA N, MATSUURA K. ADAM family proteins in the immune system. *Immunol Today* 1999; **20**: 278–284.
- [52] YUAN R, PROMAKOFF P, MYLES DG. A role of the disintegrin of cirtestin, a sperm surface protein belonging to the ADAM family, in mouse sperm-egg plasma membrane adhesion and fusion. *J Cell Biol* 1997; **137**(1): 105–122.
- [53] ZHU GZ, LIN Y, MYLES DG, PRIMAKOFF P. Identification of four novel ADAMs with potential roles in spermatogenesis and fertilization. *Gene* 1999; **234**: 227–237.
- [54] ZHU M, RUSSELL GG, CROUCHER PI. MDC-9 (ADAM-9/Meltrin γ) functions as an adhesion molecule by binding the $\alpha_v\beta_3$ integrin. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **280**: 574–580.
- [55] ZOLKIEWSKA A. Disintegrin-like/Cysteine-rich region of ADAM 12 is an active cell adhesion domain. *Exp Cell Res* 1999; **252**: 423–431.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 30.06.2003 r.

Przyjęto: 21.05.2003 r.

Adres autora: ul. Ilij Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

email: edbrzoska@biol.uw.edu.pl

CEREBELINA – BIOSYNTeza, WYSTĘPOWANIE I ROLA

CEREBELLIN – SYNTHESIS, LOCALIZATION AND ROLE

Anna HOCHÓŁ, Marcin RUCIŃSKI, Witold MALENDOWICZ

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

Streszczenie: Cerebelina to stosunkowo nowy i mało poznany neuropeptyd, zbudowany z 16 aminokwasów. Obecnie wiadomo o istnieniu 4 białek prekursorowych określanych jako precerebeliny. W obrębie jednego gatunku geny dla poszczególnych precerebelin mieszczą się na różnych chromosomach, ale w każdym przypadku składają się z trzech eksonów. Porównanie poszczególnych precerebelin z różnych gatunków uwidacznia ich bardzo wysoką homologię. Przy pomocy RIA obecność immunoreaktywnej cerebeliny wykazano m.in. w mózdku oraz innych okolicach mózgowia, przewodzie pokarmowym, nerce oraz w nadnerczach prawidłowych, jak i ich guzach. Czynność cerebeliny nie jest do końca poznana. Peptyd ten między innymi wzmacnia wydzielanie aldosteronu oraz kortyzolu/kortykosteronu przez korę nadnerczy, ponadto bezpośrednio stymuluje on uwalnianie katecholamin z rdzenia nadnerczy. Sugeruje się także hamujący wpływ cerebeliny na czynność tarczycy.

Słowa kluczowe: cerebelina (CR), precerebelina (Cbln), neuropeptydy, ewolucja, gen, mózg, nadnercza, tarczyca.

Summary: Cerebellin represents a rather new and poorly recognised neuropeptide, consisting of 16 amino acids. At present, four precursors of the peptide are known, termed precerebellins. Within a single species genes for individual precerebellins are located on different chromosomes and in each case such a gene includes three exons. Comparison of individual precerebellins between various species demonstrates their very high homology. Using RIA presence of immunoreactive cerebellin has been demonstrated in cerebellum and in other parts of the brain, in alimentary tract, kidney, suprarenal glands and in their tumours. Activity of cerebellin has not been fully elucidated yet. Among other, the peptide stimulates secretion of aldosteron, cortisol/corticosterone by adrenal cortex and directly stimulates release of catecholamines from adrenal medulla. Available dates suggest inhibitory effect of cerebellin on thyroid gland function.

Key words: cerebellin (CR), precerebellin (Cbln), neuropeptides, evolution, gene, brain, adrenal cortex, thyroid.

WSTĘP

Cerebelina (CR), 16-aminokwasowy peptyd, została pierwotnie wyizolowana z mózdzku szczura [18]. Peptyd ten powstaje przez proteolityczne wycięcie z większego prekursora zwanego precerebeliną (Cbln). Z czasem odkryto, że istnieje cała rodzina precerebelin. Peptydy tej rodziny przypuszczalnie należą do neuropeptydów. Występują w wysokich stężeniach w mózdzku i jądrze grzbietowym ślimakowym (DcoN), natomiast w niższych stężeniach występują one w innych okolicach mózgu, zwłaszcza w podwzgórzu [2, 11, 12]. Ostatnie badania wykazały obecność CR w komórkach chromafinowych rdzenia nadnerczy i w takich guzach nadnerczy, jak: gruczolak kory nadnerczy produkujący kortyzol, guz chromochłonny nadnerczy (pheochromocytoma), ganglioneuroblastoma i neuroblastoma [17]. W tabeli 1 przedstawiono występowanie immunoreaktywnej CR wykazane przy pomocy metody radioimmunologicznej (RIA) w ośrodkowym układzie nerwowym oraz narządach obwodowych szczura [2, 17].

TABELA 1 Występowanie immunoreaktywnej cerebeliny w niektórych narządach człowieka, świnki morskiej i szczura

	Szczur	Świnka morska	Człowiek
Móździek	+++	+++	+++
Podwzgórze	+++	++	+
Hippokamp	+++	++	+
Wzgórze	++	+	+
Most	++	+	+
Rdzeń przedłużony	++	+	++
Kora czołowa	++	+	+
Żołądek	+	++	NB
Dwunastnica	+	++	NB
Jelito cienkie	+	+	NB
Jelito grube	+	+	NB
Serce	++	++	NB
Nerka	+	+	NB
Trzustka (b. mała)	+/-	+/-	NB
Przysadka	NB	NB	+
Nadnercze	NB	NB	+
Guz nadnercza wydzielający kortyzol	NB	NB	++
Guz nadnercza wydzielający aldosteron	NB	NB	+
Nieczynny guz nadnercza	NB	NB	+
Pheochromocytoma	NB	NB	+++
Ganglioneuroblastoma	NB	NB	+
Neuroblastoma	NB	NB	+

Na podstawie danych Burneta i wsp. [2] oraz Satoh i wsp. [17]. Plusami oznaczono stężenie mierzonej przy pomocy RIA cerebeliny, NB – nie badano.

1. RODZINA PRECEREBELIN

Powszechnie znane jest, że neuropeptydy tworzą rodziny blisko spokrewnionych białek, z których kilka może występować w obrębie jednego gatunku. Występowanie rodzin białek najczęściej spowodowane jest duplikacją pierwotnego genu lub eksonu oraz późniejszymi mutacjami, które powodują zmiany w sekwencji DNA, co może prowadzić do wymiany aminokwasu w sekwencji peptydu [6]. Różnice sekwencji aminokwasów w obrębie rodziny białek mogły prowadzić do zmiany funkcji białka, lecz często różne białka z tej samej rodziny wywołują bardzo podobny efekt biologiczny.

W przypadku CR istnieje również cała rodzina precerebelin, która obecnie obejmuje 4 propeptydy, oznaczane jako Cbln1, Cbln2, Cbln3 i Cbln4. Cbln1 jest homologiem pierwotnie opisaną ludzką precerebeliną [21], podczas gdy Cbln2 jest homologiem białka podobnego do CR szczura opisanego przez Wada i Ohtani [21, 22]. Cbln3 została wyizolowana i opisana podczas badania oddziaływania precerebeliny 1 (Cbln1) z innymi białkami w metodzie dwuhybrydowej [14]. Sekwencja Cbln 4 została natomiast odkryta w wyniku porównania homologii nukleotydów do wcześniej poznanych precerebelin. Obecnie jest ona opisana tylko u myszy.

Porównanie sekwencji poszczególnych precerebelin uwidacznia ich wysoki stopień homologii (ryc. 1), co pozwala przypuszczać, że w toku ewolucji precerebeliny powstały również przez duplikację pierwotnego genu. Precerebeliny wykazują wysoką homologię sekwencji aminokwasów z nadrodziną atypowych kolagenów, która obejmuje kolageny typu VII i X [3, 13], białka surowicy związane z hibernacją u ssaków [20] oraz podjednostki A, B i C kompleksu C₁q dopełniacza [15, 16].

2. GENY PRECEREBELIN

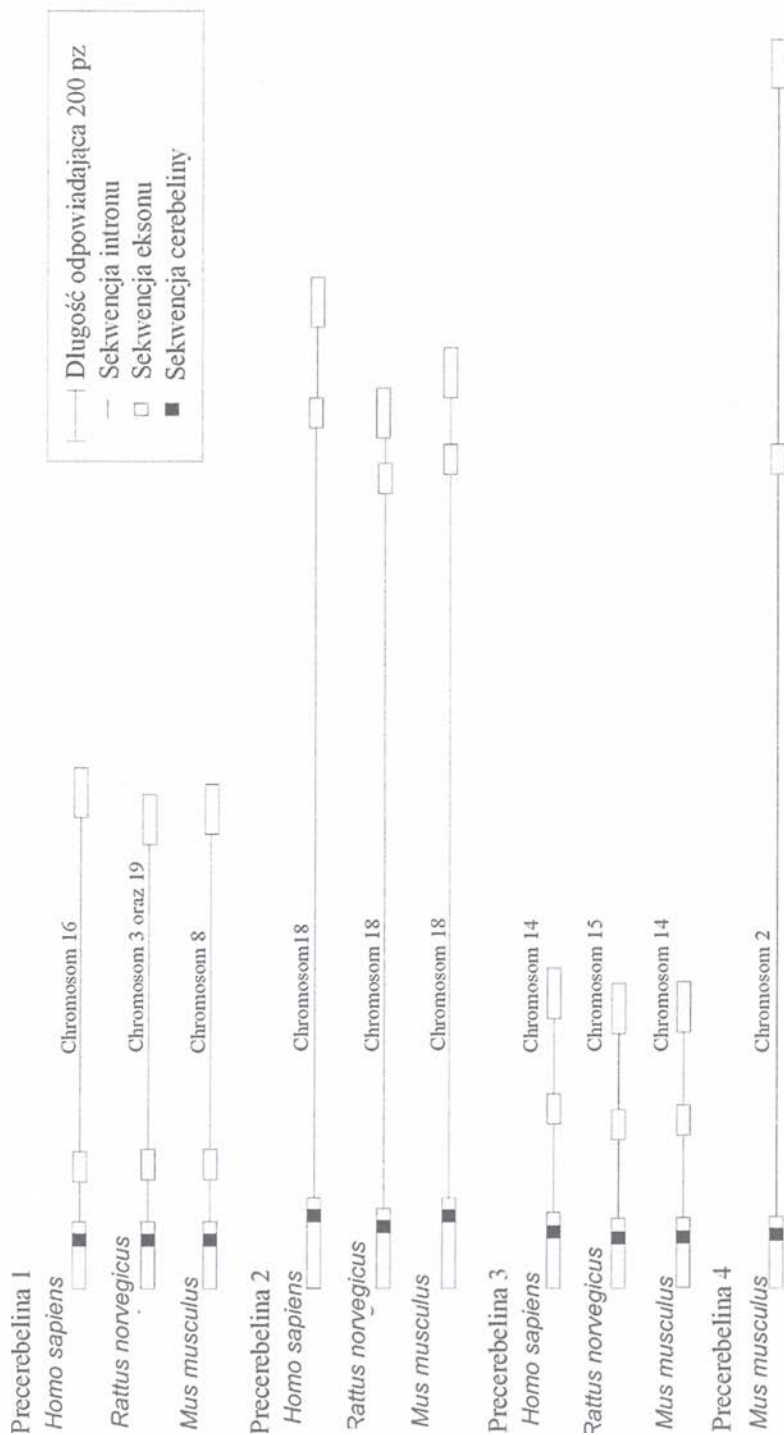
We wstępnych badaniach zakładano, iż cerebeliny mogą być produktem jednego genu, a warianty miałyby powstawać na skutek alternatywnego *splicingu* w obrębie sekwencji mRNA. Jednakże analiza *Southern blot* i mapowanie genomowe wykazały, że za syntezę cerebelin odpowiedzialne są różne geny. Zlokalizowane są one w różnych chromosomach, jednakże w każdym z przypadków część kodująca składa się z trzech eksonów, a sekwencja CR znajduje się na pierwszym z nich (ryc. 2).

3. BIOSYNTeza CEREBELIN

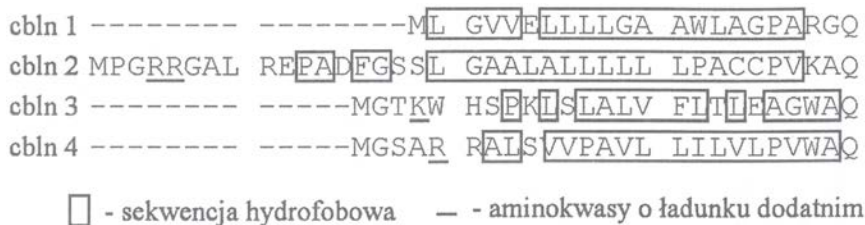
Cerebelina jest syntetyzowana w taki sam sposób jak inne znane neuropeptydy. DNA zostaje przepisane na mRNA, które ulega procesowi dojrzewania (wycinanie intronów, kapowanie oraz poliadenylacja), a następnie translacji. Powstały polipeptyd stanowi białko prekursorowe i jest on nazywany precerebeliną (Cbln). Zakładając przynależność cerebeliny do grupy neuropeptydów należy zwrócić uwagę na obecność

cb1n 1	-----MIGV VELLILGAAW LAGPARGONE	TEPIVLEGKC LVVCDNSN-PT SD	SD	PTGTA	LGISVRS	GGSA	80
cb1n 2	MPGRRGALRE PADFGSSILGA ALALILLLLP ACCEVKAQND	TEPIVLEGKC LVVCDSS-PS GDG	GDG	AVTSS	LGISVRS	GGSA	70
cb1n 3	-----MGTKWS PKLSIALVFL TLEAGWAQEG	SEPVILEGEC LVVCEPGRPT AGG	PGAA	LG	---	EAPPG	60
cb1n 4	-----MCSARRA LSVVPAVLLI LVIQVWAQND	TEPIVLEGKC LVVCDNSN-PA	TD	SKGSSSP	LGISVRS	RAANS	50
cb1n 1	KVAFSAIRST NHEPS-EMSN	RTM-IIYFDQ VLVNIGNDFD	SERSTFIAPR KGIYSFNHVFH	VKVYNRQTIQ	VSLMLNG	WPV	160
cb1n 2	KVAFSAIRST NHEPS-EMSN	RTM-TIYFDQ VLVNIGNHFD	LAASSIFVAPR KGIYSFSFHV	VKVYNRQTIQ	VSLMONG	YPV	150
cb1n 3	RVAFAVVRSH HHEPAGETGN	STSGAIYFDQ VLVNEGGGFD	RPSGCFVAHV RGVYSFRFHV	VKVYNRQTIQ	VSLMLNT	WPV	140
cb1n 4	KVAFSAVVRST NHEPS-EMSN	KTR-IIYFDQ ILVNVGNFET	LES-VFVAPR KGIYSFSEHV	IKVYOSOTIQ	VNLMING	KPV	130
cb1n 1	ISAFAGDQDV TREAAANGVL IQMEKGDRAV	LKLERGNIMG	GWKYSTFSGF	LVFPL			240
cb1n 2	ISAFAGDQDV TREAAANGVL ILMEREDKVVH	LKLERGNIMG	GWKYSTFSGF	LVFPL			230
cb1n 3	ISAFANIPDV TREAAATSSVL IPLDPGRVVS	ILIRGNILG	GWKYSTFSGF	LVFPL			220
cb1n 4	ISAFAGDKDV TREAAANGVL IYLDKEDKVV	LKLERGNILG	GWKYSTFSGF	LVFPL			210

RYCINA 1 Porównanie homologii aminokwasów poszczególnych precerebelin. Pochodzenie Cbln1 – Cbln3 – *Rattus norvegicus*, Cbln4 – *Mus musculus* (dane Genebank)



RYCINA 2. Układ genów kodujących poszczególne precerebeliny (fragment kodujący białko bez 3' oraz 5' UTR), *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*



RYCINA 3. Sekwencja sygnałowa precerebelin. Pochodzenie Cbln1 – Cbln3 – *Rattus norvegicus*, Cbln4 – *Mus musculus* (dane Genebank)

w N końcu precerebeliny krótkiej (13–36) aminokwasowej sekwencji sygnałowej charakterystycznej dla białek wydzielanych przez komórkę, w tym również dla neuropeptydów. Każda z analizowanych precerebelin ma silnie hydrofobowy odcinek N końcowy (ryc. 3), który jednak zawiera pojedyncze aminokwasy hydrofilowe, mogące obniżyć efektywność transportu do światła kanalików siateczki śródplazmatycznej. W przypadku Cbln 1 peptyd ten na końcu N nie ma aminokwasu o ładunku dodatnim. Fakt ten może sugerować, że Cbln1 nie ma sekwencji sygnałowej, a tym samym nie jest ona wydzielana i nie pełni funkcji klasycznego neuropeptydu. Alternatywnie możliwy jest inny mechanizm wydzielania precerebeliny 1 (Cbln1), tym bardziej że nie wszystkie wydzielane białka zawierają na N końcu sekwencje sygnałową. Pewne białka zawierają bowiem wewnętrzną sekwencje sygnałową, która pełni tę samą rolę co peryferyjna sekwencja sygnałowa. Być może analogiczna sytuacja istnieje w przypadku precerebeliny 1 (Cbln1).

Kolejnym etapem dojrzewania propeptydu jest wycięcie sekwencji sygnałowej, ewentualna glikozylacja (precerebeliny mają miejsca potencjalnej N-glikozylacji) oraz wycięcie docelowego peptydu z propeptydu. W przypadku większości neuropeptydów miejsca oskrzydłujące peptyd zawierają sekwencje argininy (Arg) lub parę argininalizyna (Arg-Liz) – są to miejsca rozpoznawane przez specyficzne proteazy biorące udział w procesie wycinania peptydu z prekursora. Wszystkie peptydy precerebeliny nie zawierają wyżej wymienionych aminokwasów w obrębie miejsca cięcia. W precerebelinach Cbln1, Cbln2 i Cbln4 peptyd CR jest ograniczony przez pary aminokwasów Val-Arg z lewej strony, a aminokwasów Glu-Pro z prawej. Taka sekwencja aminokwasów oskrzydłujących mogłaby być kolejnym dowodem na to, że cerebeliny nie są neuropeptydami lub że istnieje inny mechanizm wycinania cerebelin niż w przypadku wielu znanych klasycznych neuropeptydów.

4. STRUKTURA CEREBELIN ORAZ ICH PREKURSORÓW

Sekwencja aminokwasów cerebelin nie jest jednorodna (ryc. 1). W obrębie sekwencji peptydu, między CR 1 a 2, istnieje różnica jednego aminokwasu, jest nią substytucja izoleucyny (Ile) na treoninę (Thr) w 11. pozycji. W CR 3 tylko 7 z 16 aminokwasów są identyczne z CR 1, natomiast w CR 4 11 z 16 aminokwasów. Nie jest do końca

jasne, czy zmiana aminokwasów w obrębie sekwencji CR wpływa na jej funkcje. Zakłada się, że CR 3 oraz CR 4 nie pełnią biologicznej funkcji CR [14].

Z kolei porównanie sekwencji poszczególnych precerebelin z różnych gatunków uwidacznia bardzo wysoką ich homologię, która mogłaby świadczyć o dość istotnej funkcji, jaką może pełnić ten peptyd. Długość Cbln1 jest stała dla wszystkich wymienionych gatunków i wynosi 193 aminokwasy, a porównanie sekwencji aminokwasów Cbln1 u człowieka, szczura i myszy wskazuje na różnice obejmujące tylko dwa miejsca w pozycji 5. oraz 12. (ryc. 4A).

Analiza homologii Cbln2 u poszczególnych gatunków wykazuje więcej różnic w N końcowym fragmencie peptydu. U szczura ta sekwencja jest krótsza o 14 aminokwasów, a więc wynosi 210 aminokwasów. Zarówno u myszy, jak i człowieka sekwencja ta ma długość 224 aminokwasów (ryc. 4B).

Sekwencja aminokwasów Cbln3 u człowieka wykazuje więcej różnic niż homologia sekwencji szczura oraz myszy, mimo to stopień jej homologii jest i tak bardzo wysoki (około 93%). Długość Cbln3 u człowieka wynosi 205 aminokwasów, w pozostałych przypadkach 197 aminokwasów (ryc. 4C).

5. CZYNNOŚĆ CEREBELIN

Mimo szerokiego występowania CR w organizmie, jak wynika z tabeli 1, jej rola biologiczna nie jest poznana.

Jak wynika z dostępnych danych, stężenie CR w ośrodkowym układzie nerwowym wykazuje znaczne różnice gatunkowe (tab. 1). Ponadto lokalizacja tego neuropeptydu w mózgu człowieka różni się znacznie w porównaniu z rozmieszczeniem innych znanych neuropeptydów, takich jak: NPY, somatostatyna, substancja P czy też VIP. O ile stężenie tych ostatnich jest bardzo niskie w mózdzku, stężenie CR jest bardzo wysokie w półkulach i robaku mózdzku oraz w rdzeniu przedłużonym [12]. Immunoreaktywna CR występuje m.in. w komórkach Purkiniego mózdzku szczura, myszy czy też kurczęcia i jest ona uważana za wykładnik stopnia dojrzałości tych komórek [18, 19]. Współwystępowanie natomiast CR z VIP i substancją P we frakcjach podkomórkowych mózgu sugeruje, że w ośrodkowym układzie nerwowym CR może działać jako neurotransmitter i neuromodulator [2]. Z kolei obecność CR w synaptosomach izolowanych z mózdzku oraz fakt, iż uwalniana jest ona przez neurony (w tym podwzgórze) pod wpływem depolaryzacji wywołanej jonami K^+ , i to w sposób zależny od jonów Ca^{2+} , wydaje się świadczyć, iż CR może pełnić także funkcję neurotransmitera, przy czym w mózdzku związana jest ona z elementami postsynaptycznymi [2, 18]. Ponadto sugeruje się, że CR może odgrywać pewną rolę w patofizjologii niektórych chorób neurologicznych, takich jak: choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, schizofrenia czy choroba Huntingtona. W tym kontekście ostatnio opisano zmniejszone stężenie immunoreaktywnej cerebeliny w mózdzku pacjentów z atrofią oliwopontocerebralną (OPCA) i zespołem Shy-Dragera [10]. Godny podkreślenia jest także fakt, iż w przypadku mutacji prowadzących do zaburzonego rozwoju (eliminacji komórek warstwy ziamistej) mózdzku stężenie CR znacznie

	10	20	30	40	50	60	70	80		
<i>Homo sapiens</i>	MLGM	ELLLL	GAAWLAGPAR	GQNETEPIVL	EKCLVWCDS	NPTSDPTGTA	LGISVRS	GGSA	KVAFSAIRST	NHEPSEMSNR
<i>Rattus norvegicus</i>	MLGV	VELLLL	GAAWLAGPAR	GQNETEPIVL	EKCLVWCDS	NPTSDPTGTA	LGISVRS	GGSA	KVAFSAIRST	NHEPSEMSNR
<i>Mus musculus</i>	MLGV	VELLLL	GAAWLAGPAR	GQNETEPIVL	EKCLVWCDS	NPTSDPTGTA	LGISVRS	GGSA	KVAFSAIRST	NHEPSEMSNR
<i>Homo sapiens</i>	90	100	110	120	130	140	150	160		
<i>Rattus norvegicus</i>	TMIIYFDQVL	VNIGNNFDSE	RSTFIAPRKG	IYSFNHFVVK	VYNRQTIQVS	LMNGWFPIS	AFAGDQDVTR	EAASNGVLIQ		
<i>Mus musculus</i>	TMIIYFDQVL	VNIGNNFDSE	RSTFIAPRKG	IYSFNHFVVK	VYNRQTIQVS	LMNGWFPIS	AFAGDQDVTR	EAASNGVLIQ		
<i>Homo sapiens</i>	170	180	190	200	210	220	230	240		
<i>Rattus norvegicus</i>	MEKGDRAYLK	LERGNLMGGW	KYSTFSGFLV	FPL		
<i>Mus musculus</i>	MEKGDRAYLK	LERGNLMGGW	KYSTFSGFLV	FPL		

Preceberelina 1

RYCINA 4a. Porównanie sekwencji aminokwasów CbIn1 pochodzących od *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus* (dane Genebank)

	10	20	30	40	50	60	70	80
<i>Rattus norvegicus</i>	MPGRRG	ALREPADFGS	SLGAALALLL	LLLPACCPVK	AQNDTEPIVL	EGKCLVVCDS	SPSGDGAVTS	
<i>Mus musculus</i>	MPGRRG	ALREPADFGS	SLGAVLALLL	LLLPACCPVR	AQNDTEPIVL	EGKCLVVCDS	SPSGDGAVTS	
<i>Homo sapiens</i>	MPGRRG	ALREPADFGS	SLGAVLALLL	LLLPACCPVR	AQNDTEPIVL	EGKCLVVCDS	SPSGDGAVTS	
<i>Rattus norvegicus</i>	SLGISVRS	TNHEPSEMSN	RTMTIYFDQV	LVNIGNHFDL	ASSIFVAPRK	GIYSFSFHVV	KVYNRQTIQV	
<i>Mus musculus</i>	SLGISVRS	TNHEPSEMSN	RTMTIYFDQV	LVNIGNHFDL	ASSIFVAPRK	GIYSFSFHVV	KVYNRQTIQV	
<i>Homo sapiens</i>	SLGISVRS	TNHEPSEMSN	RTMTIYFDQV	LVNIGNHFDL	ASSIFVAPRK	GIYSFSFHVV	KVYNRQTIQV	
<i>Rattus norvegicus</i>	SLMONGYPVI	SAFAGDQDVT	REAAANGVLL	LMEREDKVHL	KLERNLGG	WKYSTFGFL	VFPL	
<i>Mus musculus</i>	SLMONGYPVI	SAFAGDQDVT	REAAANGVLL	LMEREDKVHL	KLERNLGG	WKYSTFGFL	VFPL	
<i>Homo sapiens</i>	SLMONGYPVI	SAFAGDQDVT	REAAANGVLL	LMEREDKVHL	KLERNLGG	WKYSTFGFL	VFPL	

Precerebelina 2

RYCINA 4b. Porównanie sekwencji aminokwasów Cbln2 pochodzących od *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus* (dane Genebank)

<i>Rattus norvegicus</i>	10	20	30	40	50	60	70	80
	---MGTK	ALVFLTLEAG	WAQEGSEPL	LEGECLVVCE	PGRPTAGGPG	GAALGEAPPG	RVAFAA VRSH	
<i>Mus musculus</i>	---MGTE	ALVLLTLEAG	WAQEGSEPL	LEGECLVVCE	PGRPTAGGPG	GAALGEAPPG	RVAFAA VRSH	
<i>Homo sapiens</i>	MLCAKPHWLP	GPIHSPGLIFL	VLVLLALGAG	WAQEGSEPL	LEGECLVVCE	PGRFAAGGPG	GAALGEAPPG	RVAFAA VRSH
	90	100	110	120	130	140	150	160
<i>Rattus norvegicus</i>	HHPEPAGETGN	STSGAIYFDQ	VLVNEG GGF D	RFSGCFVAPV	RGVYSFRFHV	VKVYNRQT VQ	VSLMLNTWPV	ISAFANDPDV
<i>Mus musculus</i>	HHPEPAGETGN	GTSGAIYFDQ	VLVNEG GGF D	RISGCFVAPV	RGVYSFRFHV	VKVYNRQT VQ	VSLMLNTWPV	ISAFANDPDV
<i>Homo sapiens</i>	HHPEPAGETGN	GTSGAIYFDQ	VLVNEG GGF D	RASGCFVAPV	RGVYSFRFHV	VKVYNRQT VQ	VSLMLNTWPV	ISAFANDPDV
	170	180	190	200	210	220	230	240
<i>Rattus norvegicus</i>	TREATATSSVL	LPLDPPGDRVS	LRLRRGNLLG	GWKYSSFSGF	LIFPL
<i>Mus musculus</i>	TREATATSSVL	LPLDPPGDRVS	LRLRRGNLLG	GWKYSSFSGF	LIFPL
<i>Homo sapiens</i>	TREATATSSVL	LPLDPPGDRVS	LRLRRGNLLG	GWKYSSFSGF	LIFPL

Precerebelina 3

RYCINA 4c Porównanie sekwencji aminokwasów Cbln3 pochodzących od *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus* (dane Genebank)

się obniża, co świadczy, iż w komórkach Purkiniego jej ekspresja regulowana jest transneuronalnie [11].

Nieliczne dane eksperymentalne sugerują rolę CR w regulacji czynności układu neuroendokrynowego organizmu – w tym zakresie badania dotyczyły głównie osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej i tarczycowej.

W nadnerczu immunoreaktywna CR zlokalizowana jest głównie w rdzeniu gruczołu, natomiast RIA-immunoreaktywna CR oraz jej mRNA występują także w guzach kory wydzielających kortyzol i guzach chromochłonnych, chociaż w niezmienionej korze nadnercza człowieka przy pomocy RT-PCR nie wykazano ekspresji genów CR [17]. Wspomniani autorzy sugerują, że w powyżej wymienionych guzach występowanie CR może być przyczyną wysokiej produkcji w nich kortyzolu. Inną możliwością jest ewentualne stymulujące działanie lokalnie podwyższonego poziomu kortyzolu na syntezę CR w guzach kory [17].

Wyniki badań nad wpływem CR na różnicowanie, wzrost i czynność kory nadnerczy sugerują, iż neuropeptyd ten może wpływać na korową część gruczołu. Pierwsze doniesienia wskazały, iż w skrawkach nadnerczy człowieka zawierających także komórki chromafinowe, CR w sposób proporcjonalny do dawki stymulowała wydzielanie adrenaliny i noradrenaliny [9]. Neuropeptyd ten stymulował także wydzielanie cAMP przez skrawki nadnercza, natomiast specyficzny inhibitor kinazy białkowej A (H-89) hamował odpowiedź katecholamin na CR. Ponadto CR nie wywierała wpływu na podstawowe wydzielanie aldosteronu i kortyzolu przez izolowane komórki kory nadnercza człowieka, jednakże taką stymulację obserwowano w skrawkach gruczołu. W tym ostatnim przypadku stymulujący wpływ CR na steroidogenezę hamowany był dodaniem l-alprenololu, specyficznego antagonisty β -adrenoceptorów oraz H-89. Dane te sugerują, iż CR stymuluje zarówno rdzeń kory nadnercza człowieka, jak i część korową gruczołu, przy czym w tym ostatnim przypadku efekt stymulowany jest katecholaminami wydzielanymi przez komórki chromafinowe. Podobne działanie wywierała CR na nadnercze szczura [1]. W tym przypadku neuropeptyd stymulował wydzielanie noradrenaliny przez skrawki gruczołu, a efekt ten był hamowany przez H-89, natomiast związek określany mianem U-73122, który jest inhibitorem fosfolipazy C, jak i kalfostin-C, inhibitor kinazy białkowej C, nie wywierały nań wpływu. Podobnie jak w przypadku nadnerczy człowieka, CR nie zmieniała podstawowego wydzielania aldosteronu i kortykosteronu przez izolowane komórki kory nadnercza szczura. W przeciwieństwie do tego, w modelu perfuzji *in situ*, CR stymuluje wydzielanie zarówno noradrenaliny, jak i aldosteronu i kortykosteronu, przy czym stymulujący wpływ na wydzielanie kortykosteroidów hamowany był zarówno przez l-alprenolol, jak i H-89. Powyższe badania sugerują, iż w nadnerczu CR wywiera stymulujący bezpośredni wpływ na wydzielanie katecholamin, które w drodze parakrynowej z kolei stymulują wydzielanie kortykosteroidów.

W badaniach *in vivo* wstrzyknięcie szczurom zarówno CR, jak i jej analogu [Des-Ser¹]-cerebeliny stymuluje wydzielanie aldosteronu i kortykosteronu, czemu nie towarzyszy stymulacja wydzielania ACTH [4]. Także u szczura CR nie wywierała wpływu na podstawowe i stymulowane ACTH wydzielanie aldosteronu i kortykosteronu przez izolowane komórki odpowiednio stref kłębkowatej i pasmowatej/siatkowatej.

Natomiast stosunkowo wysokie stężenia badanego analogu hamowały podstawowe i stymulowane ACTH wydzielanie kortykosteroidów, dane te także popierają sugestię, iż *in vivo* CR stymuluje czynność wydzielniczą kory nadnercza szczura w sposób niezależny od ACTH. Sugestia ta znalazła potwierdzenie w badaniach szczurów z regenerującą korą nadnercza [7]. W 5. czy też 8. dniu regeneracji, a więc w okresie, w którym jeszcze nie następuje regeneracja części rdzennej gruczołu, nie obserwowano stymulującego wpływu CR na wydzielanie aldosteronu i kortykosteronu. Interesujących wyników dostarczyły także doświadczenia z przewlekłym podawaniem CR czy też jej analogu [5]. Wprowadzanie neuropeptydu przez 6 dni wywołuje znaczną atrofię kory nadnercza szczura, która wywołana jest zmniejszeniem liczby komórek mięszkowych kory. Jednakże i w tych warunkach stężenia we krwi zarówno aldosteronu, jak i kortykosteronu były podwyższone, a ACTH niezmiennione. Potwierdza to niezależny od ACTH wpływ CR i jej analogu na nadnercza szczura.

CR wywiera także wpływ na stopień proliferacji komórek mięszkowych kory nadnercza szczura [7]. U zwierząt niedojrzałych płciowo neuropeptyd ten zwiększa indeks metafaz w korze, podczas gdy w 8. dniu regeneracji CR hamuje proliferację badanych komórek. Dane te sugerują, iż CR wywiera różny wpływ w poszczególnych typach wzrostu kory nadnercza – neuropeptyd ten wydaje się stymulować wzrost gruczołu (proliferaację komórek) związany z wiekiem i hamować wzrost odpowiadający wczesnym etapom organogenezy gruczołu (model regeneracji kory nadnercza).

W obrębie tarczycy, przewlekłe wprowadzanie CR czy też jej analogu znacznie zwiększa masę gruczołu oraz prowadzi do akumulacji koloidu w jej pęcherzykach oraz obniżenia wskaźnika nabłonek/koloid [8]. Dane te sugerują hamujący wpływ neuropeptydu na czynność tarczycy, jednakże wzmiankowanym zmianom nie towarzyszą zmiany w stężeniu we krwi TSH czy też hormonów tarczycy (wolne i całkowite T3 i T4).

Przedstawione powyżej dane wskazują na udział CR w regulacji wzrostu i czynności wydzielniczej niektórych gruczołów dokrewnych, jednakże jej rola fizjologiczna w tych procesach daleka jest od poznania. Zapewne stanie się to możliwe po identyfikacji receptora(ów) CR oraz po syntezie ewentualnych jej antagonistów.

LITERATURA

- [1] ALBERTIN G, MALENDOWICZ LK, MACCHI C, MARKOWSKA A, NUSSDORFER GG. Cerebellin stimulates the secretory activity of the rat adrenal gland: *in vitro* and *in vivo* studies. *Neuropeptides* 2000; **34**: 7–11.
- [2] BURNET PW, BRETHERTON-WATT D, GHATEI MA, BLOOM SR. Cerebellin-like peptide: tissue distribution in rat and guinea-pig and its release from rat cerebellum, hypothalamus and cerebellar synaptosomes *in vitro*. *Neuroscience* 1988; **25**: 605–612.
- [3] ELIMA K, EEROLA I, ROSATI R, METSARANTA M, GAROFALO S, PERALA M, DE CROMBRUG-GHE B, VUORIO E. The mouse collagen X gene: complete nucleotide sequence, exon structure and expression pattern. *Biochem J* 1993; **289**: 247–253.
- [4] HOCHÓŁ A, MACCHI C, MAJCHRZAK M, ZIÓŁKOWSKA A, NUSSDORFER GG, MALENDOWICZ LK. Comparison of the effects of cerebellin and cerebellin analog [Des-Ser¹]-cerebellin on the secretion of rat adrenal cortex: *in vitro* and *in vivo* studies. *Biomed Res* 2000; **21**: 217–219.

- [5] HOCHÓŁ A, NERI G, MAJCHRZAK M, ZIÓŁKOWSKA A, NUSSDORFER GG, MALENDOWICZ LK. Prolonged cerebellin administration inhibits the growth, but enhances steroidogenic capacity of rat adrenal cortex. *Endocr Res* 2001; **27**: 11–17.
- [6] HOLMGREN S, JENSEN J. Evolution of the nervous system. *Brain Res* 2001; **55**:723–735.
- [7] MALENDOWICZ LK, HOCHÓŁ A, DE CARO R, TREJTER M, MARKOWSKA A, NUSSDORFER GG, NOWAK M. Effect of cerebellin on the pituitary-adrenocortical function and the proliferative activity of immature and regenerating rat adrenal cortex. *Biomed Res* 2000; **21**: 85–88.
- [8] MALENDOWICZ LK, MACCHI C, NUSSDORFER GG, NOWAK KW, ZIÓŁKOWSKA A, TREJTER M, GINDA W. Inhibitory effect of cerebellin on rat thyroid gland. *Biomed Res* 2001; **22**: 99101.
- [9] MAZZOCCHI G, ANDREIS PG, DE CARO R, ARAGONA F, GOTTARDO L, NUSSDORFER GG. Cerebellin enhances *in vitro* secretory activity of human adrenal gland. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; **84**: 632–635.
- [10] MIZUNO Y, TAKAHASHI K, TOTSUNE K, OHNEDA M, KONNO H, MURAKAMI O, SATOH F, SONE M, TAKASE S, ITOYAMA Y, MOURI T. Decrease in cerebellin and corticotropin-releasing hormone in the cerebellum of olivopontocerebellar atrophy and Shy-Drager syndrome. *Brain Res* 1995; **686**: 115–118.
- [11] MORGAN JI, SLEMMON JR, DANHO W, HEMPSTESD J, BERREBI AS, MUGNAINI E. Cerebellin and related postsynaptic peptides in the brain of normal and neurodevelopmentally mutant vertebrates. *Synapse* 1988; **2**: 117–124.
- [12] MUGNAINI E, MORGAN JI. The neuropeptide cerebellin is a marker for two similar neuronal circuits in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 8692–8696.
- [13] MURAGAKI Y, SHIOTA C, INOUE M, OOSHIMA A, OLSEN BR, NINOMIYA Y. Alpha I(VIII)-collagen gene transcripts encode a short-chain collagen polypeptide and are expressed by various epithelial, endothelial and mesenchymal cells in newborn mouse tissues. *Eur J Biochem* 1992 **207**: 895–902.
- [14] PANG Z, ZUO J, MORGAN JI. Cbln3, a novel member of the precerebellin family that binds specifically to Cbln. *J Neuroscience* 2000; **20**: 6333–6339.
- [15] PETRY F, REID KB, LOOS M. Molecular cloning and characterization the complementary DNA coding for the B-chain of murine C1q. *FEBS Lett* 1989; **258**: 89–93.
- [16] PETRY F, REID KB, LOOS M. Isolation, sequence analysis and characterization of cDNA clones coding for the C chain of mouse C1q. Sequence similarity of complement subcomponent C1q, collagen type VIII and type X and precerebellin. *Eur J Biochem* 1992; **209**: 129–134.
- [17] SATOH F, TAKAHASHI K, MURAKAMI O, TOTSUNE K, OHNEDA M, MIZUNO Y, SONE M, MIURA Y, TAKASE S, HAYASHI Y, SASANO H, MOURI T. Cerebellin and cerebellin mRNA in the human brain, adrenal glands and the tumour tissues of adrenal tumour, ganglioneuroblastoma and neuroblastoma. *J Endocrinol* 1997; **154**: 27–34.
- [18] SLEMMON JR, BLACHER R, DANHO W, HEMPSTEAD JL, MORGAN JI. Isolation and sequencing of two cerebellum-specific peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 6866–6870.
- [19] SLEMMON JR, DANHO W, HEMPSTEAD JL, MORGAN JI. Cerebellin: A quantifiable marker for Purkinje cell maturation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 7145–7148.
- [20] TAKAMATSU N, OHBA K, KONDO J, KONDO N, SHIBA T. Hibernation associated gene regulation of plasma proteins with a collagen-like domain in mammalian hibernators. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 1516–1521.
- [21] URADE Y, OBERDICK J, MOLINAR-RODE R, MORGAN JI. Precerebellin is a cerebellum-specific protein with similarity to the globular domain of complement C1q B chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 1069–1073.
- [22] WADA CH, OHTANI H. Molecular cloning of rat cerebellin-like protein cDNA which encodes a novel membrane-associated glycoprotein. *Mol Brain Res* 1991; **9**: 71–77.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 30.05.2003 r.

Przyjęto: 24.06.2003 r.

Adres autora: ul. Świącickiego 6, 60-781 Poznań

anhoc@amp.edu.pl

METALOPROTEAZY W FIZJOLOGII I PATOLOGII OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO*

METALLOPROTEINASES IN PHYSIOLOGY AND PATHOLOGY OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

Małgorzata ZIEMKA-NAŁĘCZ

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN,
Zakład Neurochemii, Pracownia Neuropatologii Molekularnej, Warszawa

Streszczenie: Metaloproteazy stanowią grupę co najmniej 25 zależnych od Zn^{2+} egzoptydaz, których podstawową funkcją jest modulowanie środowiska zewnątrzkomórkowego przez proteolizę białkowych składników macierzy zewnątrzkomórkowej, receptorów błonowych i cytokin. Enzymy te syntetyzowane są w komórkach i w formie prekursorów uwalniane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, gdzie ulegają aktywacji przez proteolityczne cięcie w rejonie propeptydu. Metaloproteazy są bardzo precyzyjnie regulowane na poziomie transkrypcji i translacji oraz przez specyficzne tkankowe inhibitory (*tissue inhibitors of metalloproteinases*; TIMPs). W warunkach fizjologicznych metaloproteazy regulują procesy związane z rozwojem oraz zapewniają homeostazę organizmu. Nadmierna aktywacja proteolizy zewnątrzkomórkowej obserwowana jest w szeregu ostrych i przewlekłych procesów patologicznych (ischemia, stwardnienie rozsiane, nowotwory). Poznanie mechanizmów regulujących aktywność metaloproteaz oraz ich interakcji ze specyficznymi inhibitorami, modulatorami i substratami może mieć nie tylko znaczenie poznawcze, ale także potencjalne znaczenie praktyczne dla opracowania postępowania terapeutycznego w niektórych stanach patologicznych.

Słowa kluczowe: metaloproteazy, żelatynazy, ośrodkowy układ nerwowy, macierz zewnątrzkomórkowa.

Summary: The matrix metalloproteinases (MMPs) constitute a group of at least 25 Zn^{2+} -depending exopeptidases, which modulates the extracellular milieu primarily through cleavage of extracellular matrix (ECM) proteins, membrane receptors and cytokines. These proteins are synthesized in cells, and secreted to the extracellular space as inactive enzymes, where they are activated by the cleavage in the propeptide region. MMPs are tightly regulated at the transcriptional and post-transcriptional levels and via their endogenous inhibitors (TIMPs) to avoid unwanted proteolysis. Proteolytic remodelling of the

*Artykuł został przygotowany w ramach realizacji grantu KBN 4P05A08619.

extracellular matrix occurs normally during development. Extracellular proteolysis by MMPs is associated with tissue destruction in many pathological settings including ischemia, multiple sclerosis and cancer. An understanding of these processes would provide new insight for therapy in diseases of central nervous system (CNS).

Key words: metalloproteinases, gelatinases, central nervous system, extracellular matrix

WSTĘP

Metaloproteazy (ang. *metalloproteinases*, MMPs) stanowią grupę zależnych od Zn^{2+} egzopeptydaz, których podstawową funkcją jest modulacja interakcji pomiędzy komórkami a ich otoczeniem przez ograniczoną proteolizę białek macierzy zewnątrz-

komórkowej (ang. *extracellular matrix*, ECM), receptorów błonowych i cytokin. Enzymy te syntetyzowane są w komórkach i w formie prekursorów uwalniane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, gdzie ulegają aktywacji przez uwolnienie propeptydu. Metaloproteazy są bardzo precyzyjnie regulowane na poziomie transkrypcji i translacji oraz przy udziale specyficznych tkankowych inhibitorów (*tissue inhibitors of metalloproteinases*, TIMP). Obecnie znanych jest 25 metaloproteaz, tworzących 4 odrębne grupy: kolagenazy, żelatynazy, stromielizyny oraz metaloproteazy związane z błoną komórkową (tab.1). Podstawą klasyfikacji było podobieństwo budowy molekularnej i podobne preferencje substratowe [36, 48, 49]. Fizjologiczna funkcja metaloproteaz nie została jeszcze dokładnie poznana. Zdolność tych enzymów do przebudowy ECM koniecznej dla prawidłowego przebiegu rozwoju zarodkowego i morfogenezy tkanek, jak i gojenia się ran sugeruje, że metaloproteazy włączone są w

TABELA 1. Klasyfikacja metaloproteaz

MMP	Nazwa	Schemat budowy
MMP-1	kolagenaza-1	B
MMP-2	żelatynaza A	C
MMP-3	stromielizyna-1	B
MMP-7	matrilizyna	A
MMP-8	kolagenaza-2	B
MMP-9	żelatynaza B	C
MMP-10	stromielizyna-2	B
MMP-11	stromielizyna-3	D
MMP-12	metaloelastaza makrofagowa	B
MMP-13	kolagenaza-3	B
MMP-14	MT1-MMP	E
MMP-15	MT2-MMP	E
MMP-16	MT3-MMP	E
MMP-17	MT4-MMP	F
MMP-18	kolagenaza-4 (<i>Xenopus</i>)	B
MMP-19	RASI-1	B
MMP-20	Enamelysina	B
MMP-21	XMMP (<i>Xenopus</i>)	G
MMP-22	CMMP (kurczak)	B
MMP-23		H
MMP-24	MT5-MMP	E
MMP-25	MT6-MMP	F
MMP-26	Endometaza, matrylsina-2	A
MMP-27		B
MMP-28	epilylsina	D

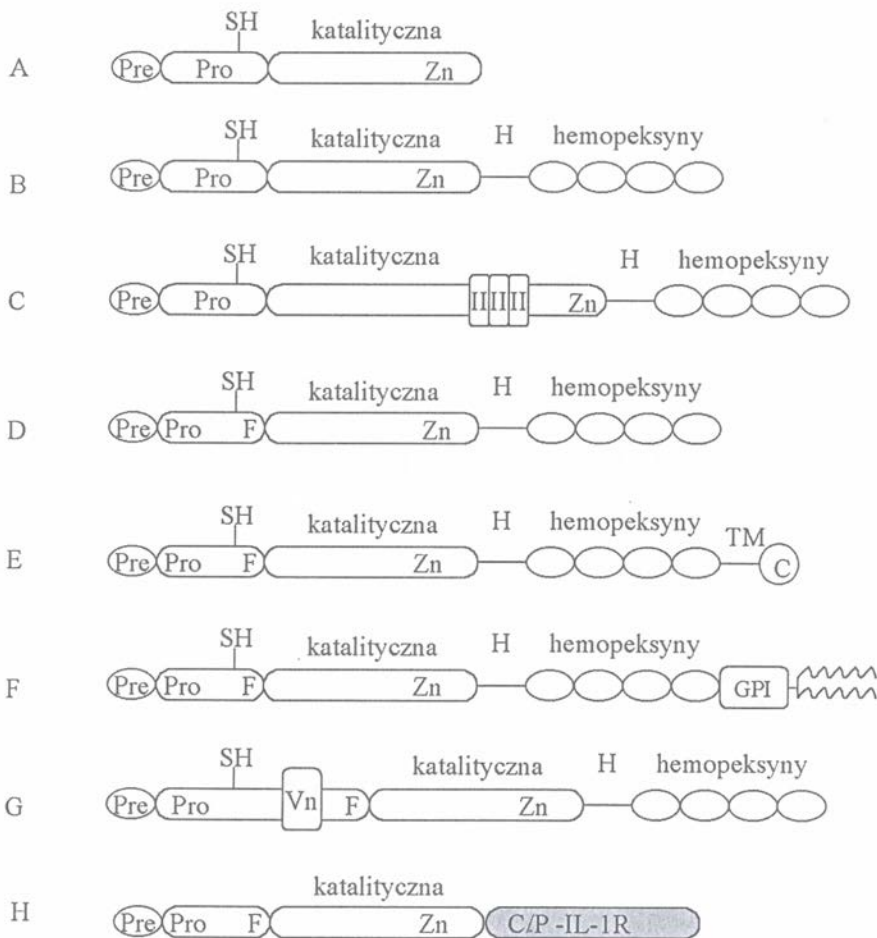
podstawowe funkcje komórek [54]. Rosnąca ilość dowodów wskazuje na udział tych enzymów w regulacji procesów związanych z przeżyciem, angiogenezą i odczynami zapalnymi. Częściowa proteoliza niektórych receptorów lub ligandów może prowadzić do uwolnienia, aktywacji lub inhibicji zarówno cząsteczek sygnałowych (np. czynników wzrostu), jak i powierzchniowych receptorów komórki, co świadczy o zaangażowaniu metaloproteaz w przekaźnictwo sygnałów [49, 51].

Udział substratów MMPs w szerokim spektrum reakcji biochemicznych uniemożliwia precyzyjne ustalenie ich roli fizjologicznej. Istotą tego opracowania jest zwrócenie uwagi na tę grupę zewnątrzkomórkowych proteaz oraz zasygnalizowanie ich prawdopodobnego znaczenia funkcjonalnego w fizjologii i stanach patologicznych ośrodkowego układu nerwowego (OUN), na podstawie najbardziej aktualnych doniesień.

STRUKTURA MOLEKULARNA

Większość znanych metaloproteaz zbudowana jest z 5 podstawowych domen białkowych (ryc.1). Pierwsza z nich, zwana sekwencją sygnałową, znajduje się na końcu aminowym (NH_2) łańcucha polipeptydowego. Domena ta decyduje o sekrecji proenzymu z siateczki śródplazmatycznej do macierzy zewnątrzkomórkowej i ulega proteolizie na błonie komórkowej. Następną domeną, licząc od końca aminowego proenzymu, jest domena propeptydowa (licząca około 80 aminokwasów) charakteryzująca się unikalną konserwatywną sekwencją PRCG(V/N)PD. Ulokowana wewnątrz tej sekwencji cysteina wiąże konieczny dla aktywacji enzymu atom cynku, utrzymując enzym w stanie nieaktywnym. Kolejną domeną jest domena katalityczna, złożona z około 170 aminokwasów. Zawiera ona stosunkowo krótką, konserwatywną sekwencję HEXXHXGXXH, która przy udziale obecnych w łańcuchu trzech reszt histydyny (H) wiąże atom cynku i tworzy centrum aktywne enzymu [36]. Pomiedzy domeną katalityczną a końcem karboksylowym jest odcinek polipeptydowy o różnej długości u poszczególnych MMPs pełniący funkcję "łącznika" (ang. *hinge region*). Określa on specyficzność substratową enzymów [25, 49]. Ostatnia z domen (umiejscowiona na końcu karboksylowym, licząca około 210 aminokwasów) ma strukturę podobną do hemopeksyny (ang. *hemopexin-like domain*). Domena ta u większości metaloproteaz zaangażowana jest w wiązanie białek macierzy oraz włączona w proces aktywacji i inhibicji enzymu [42].

Nie wszystkie poznane metaloproteazy mają ten sam schemat budowy molekularnej. Przykładem mogą być matrylizyny (MMP7 i MMP-26), metaloproteazy o najkrótszym łańcuchu polipeptydowym, w którym wyróżniono tylko dwie domeny: propeptydu i katalityczną [17, 49]. Natomiast metaloproteazy typu błonowego (MT-MMPs) na końcu karboksylowym mają dodatkową krótką, rozciągliwą, hydrofobową domenę, zakotwiczącą je w błonie komórkowej oraz krótką domenę cytoplazmatyczną (MMP-14, -15, -16 i -24) lub hydrofobowy region, który oddziałuje z glikofosfatydyloinozytolem (GPI) (MMP-17 i -25) [20, 24]. Metaloproteazy MMP-11, -21, -23, -27,



RYCINA 1. Budowa metaloproteaz. Pre – sekwencja sygnałowa; pro – domena propeptydu; F – miejsce cięcia przez furynę; Zn – miejsce wiązania cynku; II – odcinki peptydowe typu fibronektyny II, H – rejon łącznikowy; TM – domena transbłonowa; C – domena cytoplazmatyczna; GPI – domena wiążąca glikofosfatydyloinozytol; Vn – odcinek peptydowy typu witronektyny; C/P – sekwencja bogata w cysteinę i prolinę; IL-1R – sekwencja podobna do receptora interleukiny-1 (wg Sternlicht *et al.*[49] zmieniona)

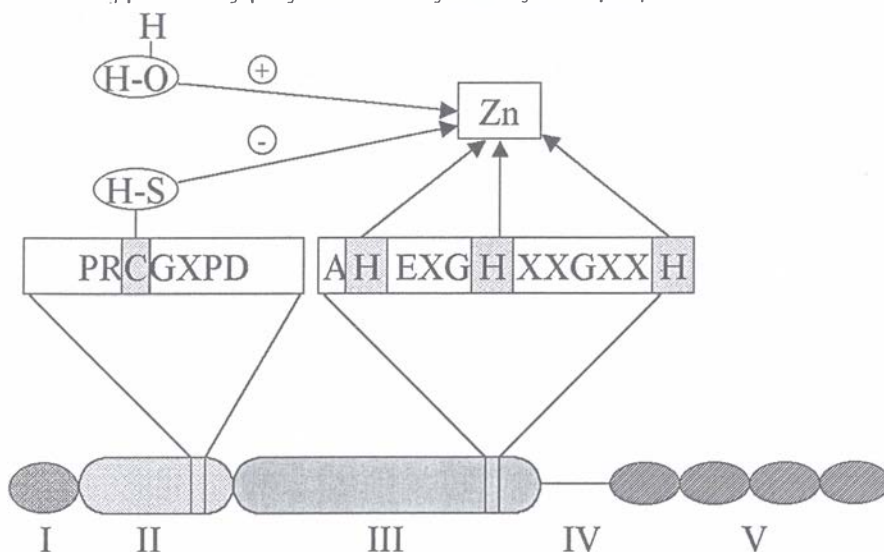
-28 oraz MT-MMPs pomiędzy domeną propeptydu a domeną katalityczną mają sekwencję RXX/RR. Sekwencja ta jest cięta przez wewnątrzkomórkowe proteazy serynowe (m.in. furynę), co prowadzi do aktywacji enzymu jeszcze przed jego sekrecją [39, 49]. Enzymy należące do grupy żelatynaz: żelatynaza A (MMP-2) i B (MMP-9) mają trzy powtarzające się odcinki peptydowe typu fibronektyny (ang. *fibronectin-type II domain*) wbudowane w domenę katalityczną; biorą one udział w połączeniu enzymu z kolagenem i elastyną. MMP-9 ma jeszcze dodatkową domenę kolagenu typu V [35, 47, 49].

MECHANIZMY REGULACJI AKTYWNOŚCI MMPS

Aktywność metaloproteaz w warunkach fizjologicznych podlega ścisłej, wielopoziomowej regulacji, zarówno na poziomie transkrypcji genów, translacji, aktywacji proenzymów jak i przez inhibitory tkankowe.

Jednym z głównych mechanizmów regulacji MMPs jest transkrypcja genów. Badania prowadzone w układach *in vitro* wykazały stymulację transkrypcji genów licznych MMP przez czynniki wzrostu, cytokiny, estry forbolu i onkogeny. Czynniki te indukują ekspresję protoonkogenów *fos* i *jun*, których produkty tworzą dimery funkcjonujące jako czynniki transkrypcyjne AP-1. AP-1 wiąże się do specyficznej sekwencji DNA w rejonie promotorowym genu i stymuluje proces transkrypcji np. genu MMP-9 [11, 29]. W regulacji ekspresji MMP-9 obok czynnika transkrypcyjnego AP-1 mogą być zaangażowane także czynniki transkrypcyjne NFκB i Sp-1 [40]. Natomiast region promotorowy genu konstytutywnej żelatynazy A posiada miejsce wiążące czynnik AP-2. W przyłączaniu AP-2 do DNA pośredniczą PKA zależna od cAMP, PKC oraz estry forbolu. Wykazano, że ekspresję genów indukuje także wiązanie ligandów, jakimi są białka ECM, do receptorów integrynowych.

Metaloproteazy są syntetyzowane jako pre-proenzymy i po odcięciu domeny sygnałowej są uwalniane w formie zymogenów do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Domena propeptydowa utrzymuje MMPs w formie proenzymu i jest odcinana w czasie aktywacji. W procesie aktywacji zwanym *cystein-switch* grupa SH cysteiny zostaje zastąpiona zhydrolizowaną cząsteczką wody (ryc. 2). W efekcie dochodzi do zmiany konformacji enzymu i usunięcia domeny propeptydu w wyniku autokatalizy bądź też ograniczonej proteolizy przy udziale innych enzymów [37].



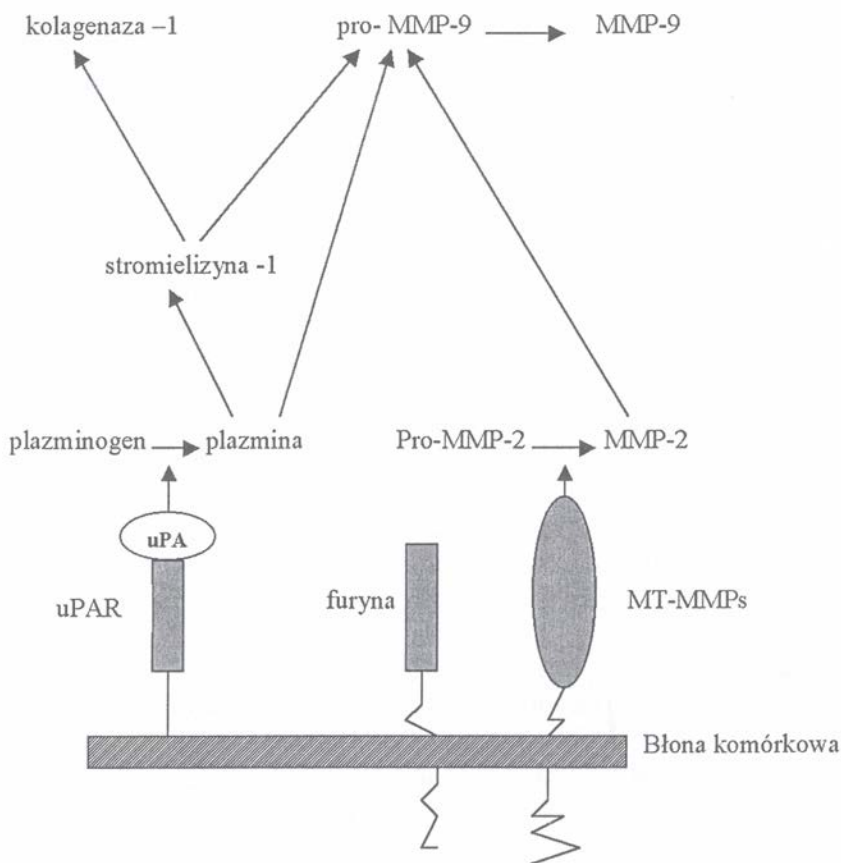
RYCINA 2. Schemat aktywacji MMPs tzw. *cystein switch*: I – domena sygnałowa; II – domena propeptydu; III – domena katalityczna; IV – region łącznikowy; V – domena hemopeksyny (wg Cuzner *et al.* [9], zmieniona)

Zgodnie z aktualną wiedzą aktywatorem MMP-9 może być plazmina, MMP-2 i stromielizyna (ryc. 3). Nie można również wykluczyć enzymów umiejscowionych na zewnętrznej powierzchni komórki. Żelatynaza A jest aktywowana przez MT1-MMP, w obecności niskich stężeń TIMP-2, który łączy się z cząsteczką proenzymu, umożliwiając jej asocjację z MT1-MMP. Metaloproteazy typu błonowego (MT-MMP) aktywowane są przez proteazę serynową – furynę [49]. Mechanizmy aktywacji poszczególnych enzymów należących do rodziny metaloproteaz nie są jeszcze wyjaśnione do końca. Wydaje się, że zależą od typu badanych komórek, jednak na podstawie dostępnych fragmentarycznych danych trudno jest wyciągnąć jednoznaczne wnioski.

Potranslacyjnym mechanizmem kontroli aktywności proteolitycznej metaloproteaz są poziomy specyficznych tkankowych inhibitorów (ang. *tissue inhibitor of metalloproteinases*, TIMP), które tworzą ścisłe, niekowalencyjne połączenia z enzymami w stosunku stechiometrycznym 1:1. Do chwili obecnej poznano 4 tkankowe inhibitory metaloproteaz (tab. 2). Są to białka o masie cząsteczkowej 21–30 kDa, zbudowane z dwóch podstawowych domen. Domenę N-końcową tworzy odcinek polipeptydowy, homologiczny u wszystkich 4 inhibitorów, który oddziałuje z centrum aktywnym metaloproteaz blokując ich aktywność. Domena C-końcowa poszczególnych inhibitorów charakteryzuje się większą zmiennością. Wpływa ona na połączenie inhibitora z fragmentem polipeptydowym metaloproteaz o charakterze hemopeksyny [4]. Poszczególne TIMP charakteryzują się różnym stopniem specyficzności dla poszczególnych metaloproteaz. Na przykład TIMP-1 hamuje aktywność MMP-9, a TIMP-2 – MMP-2 [37, 55, 49].

TABELA 2.

Parametr	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
Masa cząsteczkowa [kDa]	28	21	24	22
RNA [kb]	0,9	3,5 (1,0)	4,5 (2,8; 2,4)	1,2
Specyficzność tkankowa (u myszy)	kości, jajniki, serce	płuca, serce, mięśnie, mózg, skóra, naczynia, jądra, jajniki, łożysko	nerki, serce, mózg, płuca, jajniki, łożysko	serce, mózg, mięśnie, jajniki
Ekspresja	indukowalna	głównie konstytutywna	indukowalna	?
Kompleks z pro-MMPs	MMP-9	MMP-2	MMP-2	?
Inhibicja:				
MT-MMPs	–	+	+	?
żelatynaz	+	+	+	+
inwazji nowotworowej	+	+	+	+
apoptozy	+	?	?	?
angiogenezy	+	+	+	+



RYCINA 3. Schemat aktywacji metaloproteaz: uPA – urokinazowy aktywator plazminogenu; uPAR – receptor uPA (wg Yong *et al.* [57], zmieniona)

SUBSTRATY

Nasza wiedza o substratach metaloproteaz pochodzi głównie z badań prowadzonych na hodowlach tkankowych. Znaczną grupę substratów MMPs stanowią białka macierzy zewnątrzkomórkowej, np. fibronektyna, witronektyna, laminina, liczne typy kolagenu, entacyna, tenascyna, agrecan [49]. Substratami MMPs mogą być także interleukiny ($IL-1\alpha$, $IL-1\beta$, pro-TNF- α), czynniki wzrostu (pro-BDNF, pro-NGF, IGFBP-3, IGFBP-5) [27, 22, 34], zasadowe białko mieliny (MBP), substancja P oraz β -amyloid [41]. Nie do końca wiadomo, które z wyżej wymienionych białek są degradowane przez MMPs *in vivo*. W świetle ostatnich danych fizjologicznym substratem MMPs (najprawdopodobniej MMP2 i MMP9) w mózgu może być β -dystroglikan [56, 22]. Proteolityczny rozpad dystroglikanu, który korelował ze wzrostem aktywności

metaloproteaz (MMP-9 i MMP-2), zaobserwowano między innymi w hipokampie szczurów po podaniu kainianu sodu. Proteoliza dystroglikanu może prowadzić do zmiany organizacji elementów związanych z błonami pre- i post-synaptycznymi [22].

MMPs W FIZJOLOGII OUN

Pomimo intensywnych badań prowadzonych w ostatniej dekadzie, fizjologiczna rola metaloproteaz w ośrodkowym układzie nerwowym nie jest ściśle określona. Istnieją doniesienia wskazujące na ich zaangażowanie w procesy związane z rozwojem i dojrzewaniem układu nerwowego (tab. 3).

Przemodelowanie struktur macierzy zewnątrzkomórkowej w drodze proteolizy jest nieodzownym warunkiem rozwoju układu nerwowego, a więc procesów proliferacji, morfogenezy, czy migracji komórek zarówno niedojrzałych jak i neoplastycznych. Zaangażowanie poszczególnych MMPs w te procesy może być związane ze specyfiką budowy ECM, która uwarunkowana jest stopniem rozwoju układu nerwowego. Badania prowadzone *in vitro* wykazały, że migracja komórek progenitorowych oligodendrocytów wymaga aktywacji MMP-2 [58]. Podwyższoną ekspresję MMP-2 stwierdzono także w hodowlach neuronalnych komórek macierzystych oraz w komórkach progenitorowych różnicujących w astroglię i neurony [13, 58]. Natomiast w migracji transplantowanych do mózgu komórek zarodka królika zaangażowana jest MMP-1 [10].

Sugerowany jest udział metaloproteaz we wzroście neurytów w czasie rozwoju ontogenetycznego. Wykazano stymulację ekspresji MMP-2, -3, -9 w komórkach neuroblastoma i PC12 przez aktywatory różnicowania neuronalnego i wzrostu aksonu, takie jak: NGF (*nerve growth factor*), laminina, kwas retinowy [5, 58].

TABELA 3. Potencjalne konsekwencje ekspresji metaloproteaz w dojrzałym układzie nerwowym

<p>Efekty niepożądane:</p> <ul style="list-style-type: none"> * przerwanie bariery krew-mózg * demielinizacja * produkcja cytokin i propagacja odpowiedzi zapalnej * odkładanie β-amyloidu * inwazja nowotworowa, metastaza i angiogeneza * niewłaściwa degradacja macierzy zewnątrzkomórkowej prowadząca do zaburzeń integralności strukturalnej
<p>Działania korzystne:</p> <ul style="list-style-type: none"> * degradacja niepożądanych białek powstających po urazach * przebudowa macierzy zewnątrzkomórkowej umożliwiająca migrację komórek, wydłużanie aksonów i formowanie wypustek oligodendrytycznych * uwalnianie czynników wzrostowych zakotwiczonych w macierzy zewnątrzkomórkowej * degradacja β-amyloidu * angiogeneza

Wysoki poziom żelatynaz zaobserwowano w rozwijającym się mózdzku szczura [52]. Maksymalna ekspresja MMP-9 miała miejsce w 15. dniu życia szczurów. Autorzy sugerują udział tego enzymu w intensywnie przebiegającej w tym czasie synaptogenezie. Obecność MMP-9 w wypustkach oligodendrocytów oraz hamowanie ich wzrostu przez inhibicję MMPs wskazuje na udział metaloproteaz w procesie mielinizacji [38, 58].

Zdolność MMPs do proteolizy neurotrofin – proNGF i proBDNF może wskazywać pośrednio na włączenie MMPs w plastyczność neuronalną. Przekonywującym dowodem jest udział tych enzymów w degradacji β -dystroglikanu, który może pełnić rolę w długotrwałym wzmocnieniu synaptycznym, molekularnym modelu procesów uczenia się i pamięci [22].

MMPs W PATOLOGII OUN

Podczas gdy aktywność metaloproteaz w warunkach fizjologicznych podlega ścisłej regulacji, to w stanach patologicznych OUN zarówno ostrych, jak i przewlekłych, dochodzi do zaburzenia mechanizmów kontrolnych oraz nadmiernej stymulacji proteolizy. Wzrost aktywności metaloproteaz i związana z tym faktem wzmocniona proteoliza ECM prowadzą do osłabienia lub nawet utraty prawidłowego kontaktu między komórką a macierzą zewnątrzkomórkową. Zgodnie z wynikami badań *in vitro* zaburzenie interakcji komórka - macierz prowadzi do apoptozy określanej terminem “*anoikis*” [41, 12, 15, 30].

Prowadzone w ostatnich 10 latach badania mechanizmów śmierci neuronów po przebytych stresie niedokrwiennym wykazały istnienie dodatkowej korelacji pomiędzy aktywnością MMPs a dynamiką śmierci komórek nerwowych w różnych modelach ischemii [46, 33, 19, 14, 40]. Wzmocnioną ekspresję MMP-2 i -9 opisano zarówno w neuronach, jak i komórkach glejowych oraz komórkach śródnabłonka. Wzrost aktywności obu metaloproteaz w modelu ischemii ogniskowej jest prawdopodobnie odpowiedzialny za degradację białkowych składników błony podstawnej i przerwanie ciągłości bariery krew - mózg [44]. Konsekwencją uszkodzenia bariery jest przenikanie elementów morfotycznych krwi do mózgu, obrzęk mózgu i rozwój stanu zapalnego. W autopsyjnym badaniu mózgow ludzkich podwyższone poziomy MMPs utrzymywały się jeszcze kilka dni, a nawet miesiący po przebytych udarze [7, 40, 18]. O kluczowej roli MMPs w patologii poniedokrwiennnej świadczą wyniki badań z użyciem inhibitorów o wysokiej specyficzności w stosunku do żelatynaz lub też przeciwciała neutralizującego MMP-9. Postępowanie to zapobiegało w znacznej mierze opisanym skutkom niedo-krwienia [45, 21]. Podobny efekt opisywany był u myszy pozbawionych genu kodującego MMP-9 [2, 3]. W modelu przejściowego, całkowitego niedokrwienia u gerbila wzrost aktywności MMP-9 korelował z degradacją lamininy – białka ECM, co może wskazywać na zaburzenie prawidłowej interakcji komórka-macierz [59]. Opisane zmiany miały charakter wybiórczy i występowały jedynie w najbardziej wrażliwym na niedokrwienie rejonie CA1 hypokampa. Pisząc o roli MMPs w niedokrwieniu należy pamiętać o tym, że enzymy te obok podkreślonej w wielu pracach kluczowej roli w

rozwoju uszkodzenia prowadzącego do śmierci komórek mogą także brać udział w procesach naprawczych uszkodzonej tkanki, wymagających z pewnością przemodelowania macierzy zewnątrzkomórkowej [58].

Szereg doniesień wskazuje na udział MMPs w przewlekłych chorobach zwyrodnieniowych, tj. stwardnieniu rozsianym (SM) i chorobie Alzheimera. Stwardnienie rozsiane jest następstwem zaburzenia układu immunologicznego i charakteryzuje się demielinizacją z rozwojem stanu zapalnego oraz wtórną patologią aksonów. Badania immunohistochemiczne tkanki mózgowej chorych na SM wykonane *post mortem*, wykazały podwyższoną ekspresję MMPs (MMP-2, -3, -7, -9) w obszarach mózgu objętych przewlekłym procesem zapalnym [8, 1, 58, 31]. Wzrost ekspresji MMP-9 wykryto również w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz w leukocytach i osoczu pobranym od osób chorych [16, 28, 29]. Podwyższoną ekspresję MMP-9 i MMP-7 zaobserwowano także w mózgach zwierząt z autoimmunologicznym zapaleniem mózgu (ang. *experimental allergic encephalomyelitis*, EAE) – zwierzęcym modelem SM [23, 29]. Wzrost aktywności MMP-9 może prowadzić do degradacji białek błony podstawnej naczyń krwionośnych, uprzepuszczalnienia naczyń i infiltracji komórek zapalnych krwi do mózgu. Zniszczeniu ulega osłonka mielinowa otaczająca aksony. Na podstawie pozytywnej korelacji między podwyższonym poziomem metaloproteaz a nasileniem objawów klinicznych choroby zakłada się istnienie prawdopodobnego związku przyczynowego. Mocnym poparciem tej hipotezy jest wyraźne osłabienie zmian chorobowych po podaniu inhibitorów MMPs (np. GM 6001, Ro-9790, BB1101) szczurom chorym na autoimmunologiczne zapalenie mózgu [57, 6, 58]. Podobny efekt miało wykluczenie genu kodującego MMP-9 u zwierząt transgeniczných. Z inhibicją MMP-9 można łączyć efekty terapeutyczne β -interferonu [58].

Rola MMPs w przebiegu innej z chorób zwyrodnieniowych – choroby Alzheimera, jakkolwiek podkreślana przez wielu badaczy, jest przedmiotem szeregu kontrowersji. Dotychczas nie jest jasne, czy obserwowany w tym schorzeniu wzrost aktywności proteolitycznej metaloproteaz ma charakter amyloidogenny, czy też wprost przeciwnie zapobiega akumulacji amyloidu β [57].

Badania molekularne nad patologią mózgu wskazują na zaangażowanie MMPs w rozwój procesów nowotworowych. Według aktualnych hipotez, popartych wynikami badań biochemicznych, proteolityczna przebudowa ECM umożliwia migrację komórek nowotworowych. Ponadto podwyższona aktywność MMPs stymuluje proces angiogenezy w okolicy guza, co pobudza wzrost nowotworu. Podwyższony poziom różnych MMPs (MT-MMP1, MMP2 i MMP9), przy znacząco niższej ekspresji inhibitorów tkankowych, obserwowano w wielu rodzajach nowotworów m.in. w glejaku i rdzeniaku (*medulloblastoma*) – neuroektodermalnych nowotworach, charakteryzujących się wysoką inwazyjnością [28]. Wykazano też, że komórki nowotworowe o niższym stopniu inwazyjności fenotypu produkują więcej TIMP aniżeli nowotwory bardziej inwazyjne. Tak więc najprawdopodobniej bilans pomiędzy enzymami degradującymi a ich inhibitorami determinuje tempo wzrostu i rozprzestrzeniania się nowotworu [43]. Skuteczne hamowanie aktywności MMPs mogłoby ograniczać rozwój choroby nowotworowej. Wprowadzone do kliniki leki hamujące aktywność MMPs

okazały się być skuteczne w pewnych typach guzów, ale ze względu na wysoką toksyczność nie są obecnie stosowane.

UWAGI KOŃCOWE

W ciągu ostatnich lat prowadzone są liczne badania zmierzające do wyjaśnienia roli oraz mechanizmów działania metaloproteaz, zarówno w fizjologii jak i patologii układu nerwowego. Okazało się, że funkcje tych enzymów nie są ograniczone jedynie do prostej przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej. MMPs poprzez proteolizę szeregu receptorów i ligandów uczestniczą w przekazywaniu sygnału zewnątrzkomórkowego, a także wpływają na interakcje pomiędzy komórkami oraz komórkami i macierzą zewnątrzkomórkową. Prawidłowo przeprowadzana zewnątrzkomórkowa proteoliza reguluje normalne procesy rozwojowe oraz zapewnia homeostazę organizmu. Nasilenie tego procesu prowadzi do procesów patologicznych. Obecnie wielkim wyzwaniem jest dokładne wyjaśnienie, który z potencjalnych mechanizmów działania MMPs oraz który z substratów zidentyfikowanych *in vitro* reguluje procesy fizjologiczne i patologiczne. Szczegółowe badania nad strukturą i funkcją MMPs doprowadziły do odkrycia wielu potencjalnych, syntetycznych inhibitorów metaloproteaz, a niektóre zostały wykorzystane do terapii nowotworowej. Nie znane są też konsekwencje inhibicji MMPs dla procesów fizjologicznych. Istotne jest poznanie mechanizmów tkankowo-specyficznego regulacji ekspresji MMPs oraz ścieżek transdukcji sygnałów, w której enzymy te uczestniczą. Badania takie mogą pomóc w opracowaniu inhibitorów, które mogłyby hamować MMPs wybiórczo w poszczególnych typach komórek, nie wpływając na procesy fizjologiczne zachodzące w innych tkankach.

LITERATURA

- [1] ANTHONY DC, FERGUSON B, MATYZAK MK, ESIRI MM, PERRY VH. Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1997; **23**: 406–415.
- [2] ASAHI M, ASAHI K, JUNG JC, del ZOPPO GJ, FINI ME, LO EH. Role of matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; **20**: 1681–1689.
- [3] ASAHI M, WANG X, MORI T, SUMII T, JUNG JC, MOSKOWITZ MA, FINI ME, LO EH. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci* 2001; **21**: 7724–7732.
- [4] BLAVIER L, HENRIET P, IMREN S, DECLERCK YA. Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases in Cancer.[w] Inhibition of Matrix Metalloproteinases – Therapeutic Applications. *Ann New York Acad Sci* 1999; **878**: 108–119.
- [5] CHAMBAUT-GUERLIN AM, HERIGAULT S, ROUET-BENZINEB P, ROUCHER C, LAFUMA C. Induction of matrix metalloproteinase MMP-9 (92-kDa gelatinase) by retinoic acid in human neuroblastoma SKNBE cells: relevance to neuronal differentiation. *J Neuroch* 2000; **74**: 506–517.

- [6] CHANDLER S, MILLER KM, CLEMENTS JM, LURY J, CORKILL D, ANTHONY DC, ADAMS SE, GEARING AJ. Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview. *J Neuroimmunol* 1997; **72**: 155–161.
- [7] CLARK AW, KREKOSKI CA, BOU SS, CHAPMAN KR, EDWARDS DR. Increased gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) activities in human brain after focal ischemia. *Neurosci Lett* 1997; **238**: 53–56.
- [8] CUZNER ML, GVERIC D, STRAND C, LOUGHLIN AJ, OPDENAKKER G, NEWCOMBE J. The expression of tissue-type plasminogen activator, matrix metalloproteinases and endogenous inhibitors in the central nervous system in multiple sclerosis; comparison of stages in lesion formation. *J Neuro-pathol Exp Neurol* 1996; **55**: 1194–1204.
- [9] CUZNER ML, OPDENAKKER G. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases, mediators of extracellular proteolysis in inflammatory demyelination of the central nervous system. *J Neuroimmunol* 1999; **94**: 1–14.
- [10] DEL BIGLIO MR, TCHELINGERIAN JL, JACQUE CM. Expression of extracellular matrix degrading enzymes during migration of xenografted brain cells. *Neurophathol Appl Neurobiol* 1999; **25**: 54–62.
- [11] FINI ME, COOK JR, MOHAN R, BRINCKERHOFF CE. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. [w] W.C. Parks, R.P. Mecham (eds), *Matrix metalloproteinases*, Academic Press, San Diego, 1998: 299–356.
- [12] FRISCH SM, RUOSLAHTI E. Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol* 1997; **9**: 701–706.
- [13] FROLICHSTHAL-SCHOELLER P, VESCOVI AL., KREKOSKI CA, MURPHY G, EDWARDS DR, FORSYTH P. Expression and modulation of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitors of metalloproteinases in human embryonic CNS stem cells. *Neuroreport* 1999; **10**: 345–351.
- [14] FUJIMURA M, GASCHÉ Y, MORITA-FUJIMURA Y, MASSENGALE J, KAWASE M, CHAN PH. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood-brain barrier disruption in mice after focal cerebral ischemia and reperfusion. *Brain Res* 1999; **842**: 92–100.
- [15] GARY DS., MATTSON P. Integrin signaling via the PI-3-kinase-Akt pathway increases neuronal resistance to glutamate-induced apoptosis. *J Neurochem* 2001; **76**: 1483–1496.
- [16] GIJBELS K, MASURE S, CARTON H, OPDENAKKER G. Gelatinase in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurologic disorder. *J Neuroimmunol* 1992; **41**: 29–34.
- [17] GURURAJAN R, GRENET J, LAHTI JM, KIDD VJ. Isolation and characterization of two novel metalloproteinase genes linked to the CdC2L locus on human chromosome 1p36.3. *Genomics* 1998; **52**: 101–106.
- [18] HAMANN GF. Unriddling the role of matrix metalloproteinases in human cerebral stroke. *Stroke* 2003; **34**: 40–46.
- [19] HEO JH, LUCERO J, ABUMIYA T, KOIZOL JA, COPELAND BR, del ZOPPO GJ. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; **19**: 624–633.
- [20] ITOH Y, KAJITA M, KINOH H, MORI H, OKADA A, SEIKI M. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MT-MMP, MMP-17) is a glycosylphosphatidylinositol-anchored proteinase. *J Biol Chem* 1999; **274**: 34260–34266.
- [21] JIANG X, NAMURA S, NAGATA I. Matrix metalloproteinase inhibitor KB-R7785 attenuates brain damage resulting from permanent focal cerebral ischemia in mice. *Neurosci Lett* 2001; **305**: 41–44.
- [22] KACZMAREK L, LAPINSKA-DZWONEK J, SZYMCZAK S. Matrix metalloproteinases in the adult brain physiology: a link between c-Fos, AP-1 and remodeling of neuronal connections? *EMBO J* 2002; **21**: 6643–6648.
- [23] KIESELER BC, KIEFER R, CLEMENTS JM, MILLER K, WELLS GMA, SCHWEITZER T, GEARING AJ, HARTUNG HP. Matrix metalloproteinase-9 and -7 are regulated in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 1998; **121**: 159–166.
- [24] KNAUPER V, DOCHERTY AJ, SMITH B, TSCHESCHE H, MURPHY G. Analysis of contribution of the hinge region of human neutrophil collagenase (HNC, MMP-8) to stability and collagenolytic activity by alanine scanning mutagenesis. *FEBS Lett* 1997; **405**: 60–64.
- [25] KOJIMA S, ITOH Y, MATSUMOTO S, MASUHO Y, SEIKI M. Membrane-type 6 matrix metalloproteinase (MT6-MMP, MMP-25) is the second glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-anchored MMP. *FEBS Lett* 2000; **480**: 142–146.

- [26] LAMPERT K, MACHEIN U, MACHEIN MR, CONCA W, PETER HH, VOLK B. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human brain tumors. *Am J Pathol* 1998; **153**: 429–437.
- [27] LEE R, KERMANI P, TENG KK, HEMPSTEAD BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 2001; **294**: 1945–1948.
- [28] LEPPERT D, FORD J, STABLER G, GRYGAR C, LIENERT C, HUBER S, MILLER KM, HAUSER SL, KAPPOS L. Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) is selectively elevated during relapses and stable phases of multiple sclerosis. *Brain* 1998; **121**: 2327–2334.
- [29] LEPPERT D, LINDBERG RLP, KAPPOS L, LEIB SL. Matrix metalloproteinases: multifunctional effectors of inflammation in multiple sclerosis and bacterial meningitis. *Brain Res Rev* 2001; **36**: 249–257.
- [30] LESAY A, HICKMAN JA, GIBSON RM. Disruption of focal adhesions mediates detachment during neuronal apoptosis. *NeuroReport* 2001; **12**: 1465–1468.
- [31] LO EH, WANG X, CUZNER ML. Extracellular proteolysis in brain injury and inflammation: role of plasminogen activators and matrix metalloproteinases. *J Neurosci Res* 2002; **69**: 1–9.
- [32] LOHI J, WILSON CL, ROBY JD, PARKS WC. Epilysin: a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury. *J Biol Chem* 2001; **276**: 10134–10144.
- [33] MUN-BRYCE S, ROSENBERG GA. Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; **18**: 1163–1172.
- [34] MURPHY G, KNAUPER V, COWELL S, HEMBRY R, STANTON H, BUTLER G, FREIJE J, PENDAS A, LOPEZ-OTIN C. Evaluation of some newer matrix metalloproteinases. [w] Inhibition of Matrix Metalloproteinases – Therapeutic Applications. *Ann New York Acad Sci* 1999; **878**: 25–39.
- [35] MURPHY G, NGUYEN Q, COCKETT MI, ATKINSON SJ, ALLAN JA, KNIGHT CG, WILLENBROCK F, DOCHERTY AJ. Assessment of the role of the fibronectin-like domain of gelatinase A by analysis of a deletion mutant. *J Biol Chem* 1994; **269**: 6632–6636.
- [36] NAGASE H, WOESSNER JF. Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; **274**: 21491–21494.
- [37] NAGASE H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997; **378**: 151–160.
- [38] OH LYS, LARSEN PH, KREKOSKI CA, EDWARDS DR, DONOVAN F, WERB Z, YONG VW. Gelatinase B/matrix metalloproteinase 9 is required for oligodendroglial process expression *in vivo* and *in vitro*. *J Neurosci* 1999; **19**: 8464–8475.
- [39] PEI D, WEISS SJ. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* 1995; **375**: 244–247.
- [40] PLANAS AM, SOLE S, JUSTICIA C. Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in rat brain after transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 2001; **8**: 834–846.
- [41] RAFF MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992; **356**: 397–400.
- [42] ROEB E, SCHLEINKOFER K, KERNEBECK T, PÖTSCH S, JANSEN B, BEHRMANN I, MATERN S, GRÖTZINGER J. The matrix metalloproteinase (MMP-9) hemopexin domain is a novel gelatin binding domain and acts an antagonist. *J Biol Chem* 2002; **277**: 50326–50332.
- [43] ROOPRAI HK, McCORMICK D. Proteases and their inhibitors in human brain tumors: a review. *Anticancer Res* 1997; **17**: 4151–4162.
- [44] ROSENBERG GA, ESTRADA EY, DENCOFF JE. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain-barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke* 1998; **29**: 2189–2195.
- [45] ROSENBERG GA. Metalloproteinase inhibition blocks edema in intracerebral hemorrhage in the rat. *Neurology* 1997; **48**: 921–926.
- [46] ROSENBERG GA, NAVRATIL M, BE F, FEUERSTEIN G. Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; **16**: 360–366.
- [47] SHIPLEY JM, DOYLE GA, FLISZAR CJ, YE QZ, JOHNSON LL, SHAPIRO SD, WELGUS HG, SENIOR RM. The structural basis for the elastolytic activity of the 92-kDa and 72-kDa gelatinases. Role of fibronectin typeII-like repeats. *J Biol Chem* 1996; **271**: 4335–4341.
- [48] STERNLICHT MD, BERGERS G. Matrix metalloproteinases as emerging targets in anti-cancer therapy: status and prospects. *Emerging Ther Targets* 2000; **4**: 609–633.
- [49] STERNLICHT MD, WERB Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; **17**: 463–516.
- [50] UGITA S, SAITO F, TANG J, SATZ J, CAMPBELL K, SUDHOF TC. A stoichiometric complex of neuroligins and dystroglycan in brain. *J Cell Biol* 2001; **154**: 435–445

- [51] SZKLARCZYK A, LAPINSKA J, RYLSKI M, McKAY RDG, KACZMAREK L. Matrix metalloproteinase-9 undergoes expression and activation during dendritic remodeling in adult hippocampus. *J Neurosci* 2002; **22**: 920–930.
- [52] VAILLANT C, DIDIER-BAZES M, HUTTER A, BELIN MF, THOMASSET N. Spatiotemporal expressions patterns of metalloproteinases and their inhibitors in the postnatal developing rat cerebellum. *J Neurosci* 1999; **19**: 4994–5004.
- [53] VECIL GG, LARSEN PH, CORLEY SM, HERX LM, BESSON A, GOODYER CG, YONG VW. Interleukin-1 is a key regulator of matrix metalloproteinase-9 expression in human neurons in culture and following mouse brain trauma *in vivo*. *J Neurosci Res* 2000; **61**: 212–224.
- [54] VU TH, WERB Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 2000; **14**: 2123–2133.
- [55] WOESSNER JF, NAGASE H. Matrix Metalloproteinases and TIMPs. New York: Oxford Univ. Press 2000.
- [56] YAMADA H, SAITOF, FUKUTA-OHI H, ZHONG D, HASE A, ARAI K, SHIMIZU T, YORIFUJI H, MOTOYOSHI K, KAMAKURA K. Processing of β -dystroglycan by matrix metalloproteinase disrupts the link between the extracellular matrix and cell membrane via the dystroglycan complex. *Hum Mol Genet* 2001; **10**: 1563–1569.
- [57] YONG VW, KREKOSKI CA, FORSYTH PA, BELL R, EDWARDS DR. Matrix metalloproteinases and diseases of the central nervous system. *Trends Neurosci* 1998; **21**: 75–80.
- [58] YONG VW, POWER C, FORSYTH P, EDWARDS DR. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2001; **2**: 502–511.
- [59] ZALEWSKA T, ZIEMKA-NAŁĘCZ M, SARNOWSKA A, DOMAŃSKA-JANIK K. Involvement of MMPs in delayed neuronal death after global ischemia. *Acta Neurobiol Exp* 2002; **62**: 53–61.

Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska-Kaczmarek

Otrzymano: 01.04.2003 r.

Przyjęto: 30.06.2003 r.

Adres autora: 012-106 Warszawa, ul. Pawińskiego 5

e-mail: gosiana@cmdik.pan.pl

PRZEKAZ SYGNAŁU OD RECEPTORÓW BIAŁEK MORFOGENETYCZNYCH KOŚCI

SIGNAL TRANSDUCTION BY BONE MORPHOGENETIC PROTEINS RECEPTORS

Adrian ZARĘBSKI

Zakład Biochemii Komórki, Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego,
Kraków

Streszczenie: Białka morfogenetyczne kości to plejotropowe cytokiny należące do nadrodziny transformującego czynnika wzrostowego typu β . Są one wiązane przez dwa różne typy receptorów o aktywności kinazy serynowo-treoninowej. Wtórnymi przekaźnikami wewnątrzkomórkowego sygnału są białka Smad. Fosforylacja R-Smad prowadzi do utworzenia kompleksu z Co-Smad, który jest transportowany do jądra komórkowego i reguluje transkrypcję wybranych genów. Przekaz sygnału jest modulowany przez różne czynniki biologiczne.

Słowa kluczowe: białka morfogenetyczne kości, nadrodzina transformującego czynnika wzrostowego typu β , białka Smad.

Summary: Bone Morphogenetic Proteins are pleiotropic cytokines belonging to Transforming Growth Factor β superfamily. They bind to two different types of serin-threonine kinase receptors. Smad proteins are secondary mediators of intracellular signaling. Phosphorylation of R-Smad leads to formation of complex with Co-Smad, which then translocates to the nucleus and regulates expression of target genes. Signaling pathway from BMPs receptors is modulated by different biological factors.

Key words: Bone Morphogenetic Proteins, Transforming Growth Factor type β superfamily, Smad proteins.

Wykaz stosowanych skrótów: ActR (ang. *Activin Receptor*) – receptor aktywiny; ALK (ang. *Activin-like Kinase*) – kinaza podobna do receptorowej kinazy aktywiny; BMPR (ang. *Bone Morphogenetic Protein Receptor*) – receptor białek morfogenetycznych kości; BMPs (ang. *Bone Morphogenetic Proteins*) – białka morfogenetyczne kości; EGF (ang. *Epidermal Growth Factor*) – nabłonkowy czynnik wzrostowy; GDFs (ang. *Growth/Differentiation Factors*) – czynniki wzrostu/różnicowania; HGF (ang. *Hepatocyte Growth Factor*) – czynnik wzrostowy hepatocytów; LIF (ang. *Leukemia Inhibitory Factor*) – czynnik hamujący białaczkę; SARA (ang. *Smad Anchor for Receptor Activation*) – białko kotwiczące białka Smad; TGF β (ang. *Transforming Growth Factor type beta*) – transformujący czynnik wzrostowy typu beta;

WSTĘP

Białka morfogenetyczne kości (ang. *Bone Morphogenetic Proteins*, BMPs) zostały po raz pierwszy zidentyfikowane jako cząsteczki indukujące tworzenie tkanki kostnej i chrzęstnej *in vivo*, stąd ich nazwa [22]. Dalsze badania ujawniły, że BMPs to plejotropowe czynniki wzrostowe o szerokim spektrum działania na różne typy komórek: monocyty, komórki epitelialne, mezenchymalne, endotelialne, neurony [14, 3, 9]. Regulują one procesy wzrostu, różnicowania, proliferacji, przeżywalności, adhezji i chemotaksji, indukują apoptozę, stymulują produkcję białek macierzy zewnątrzkomórkowej. BMPs pojawiają się już we wczesnych etapach rozwoju embrionalnego, indukują rozwój mezodermy, warunkują wykształcenie grzbietowo-brzuszej osi ciała, regulują rozwój tkanek i organów [9, 7]. U osobników dorosłych biorą udział w regeneracji tkanek, np. kości po złamaniu.

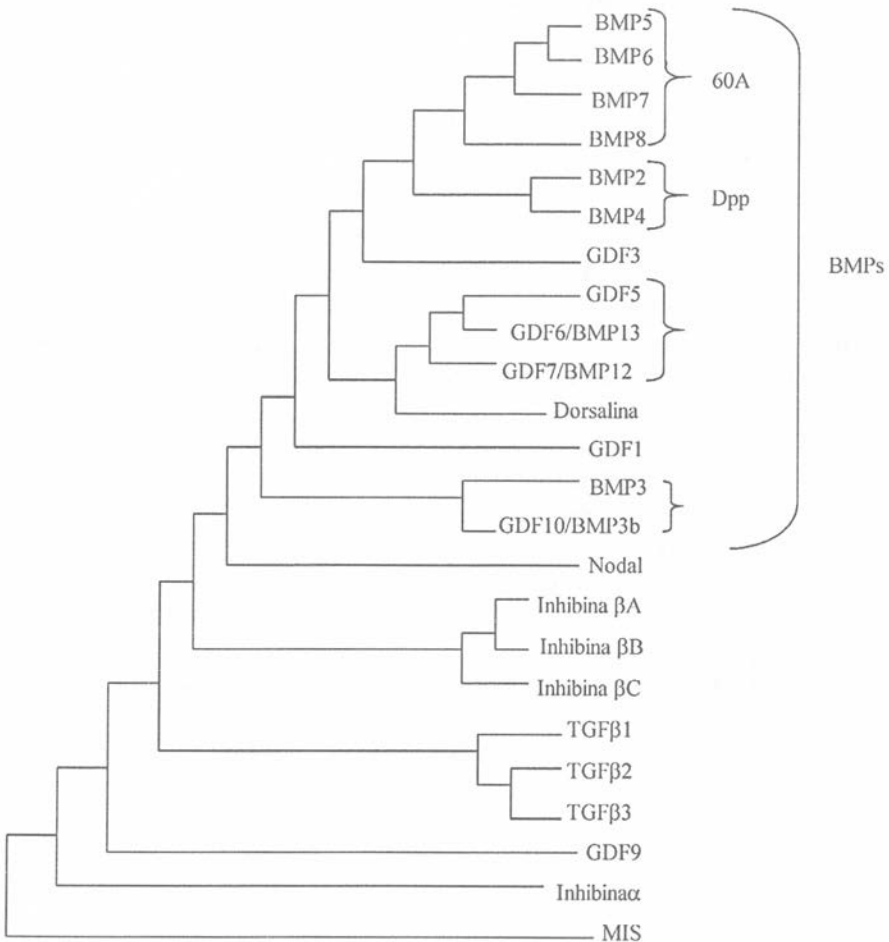
BMPs zidentyfikowane zostały zarówno u bezkręgowców (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*), jak i u kręgowców. Procesy biologiczne regulowane przez BMPs oraz mechanizmy zaangażowane w przekaz sygnału wydają się być wysoce konserwatywne ewolucyjnie [20]. Świadczyć o tym może chociażby fakt, że pochodzący od *Drosophila decapentaplegic* (DPP) indukuje tworzenie tkanki kostnej i chrzęstnej u ssaków [23], a ssaczy BMP 4 znosi skutki mutacji w genie *dpp* [18].

NADRODZINA TRANSFORMUJĄCEGO CZYNNIKA WZROSTOWEGO TYPU β

BMPs należą do nadrodziny transformującego czynnika wzrostowego typu β (ang. *Transforming Growth Factor* β , TGF β). Do grupy tej zalicza się obecnie około 30 białek u kręgowców i ok. 15 u bezkręgowców. Są one produkowane jako duże prekursorzy, a po obróbce proteolitycznej C-końcowe fragmenty tworzą funkcjonalne białka. Formą aktywną są dimery. Charakterystyczną cechą białek z rodziny TGF β jest obecność siedmiu konserwatywnych reszt cysteiny w cząsteczce [9]. W skład rodziny TGF β wchodzi również aktywiny, inhibiny, miostatyny, czynniki wzrostu i różnicowania (ang. *Growth/Differentiation Factors*, GDFs) i inne [13, 4] (ryc. 1).

Biorąc pod uwagę podobieństwo strukturalne i ewolucyjne pokrewieństwo, BMPs podzielić można na pięć grup:

- (1) grupa Dpp – zalicza się tu zidentyfikowany u *Drosophila decapentaplegic* oraz występujące u kręgowców BMP 2 i BMP 4, które wykazują 83% homologii sekwencji aminokwasowej i są najlepiej zbadanymi białkami z grupy BMPs;



RYCINA 1 Schematyczny dendrogram pokazujący pokrewieństwo w obrębie nadrodziny transformującego czynnika wzrostowego typu β u kręgowców. Do nadrodziny TGF β należy rodzina BMPs, w obrębie której wyróżnić można strukturalnie i funkcjonalnie podobne grupy białek zaznaczone na rysunku klamrami: 60A i Dpp nazwane tak od zidentyfikowanych u *Drosophila* analogów BMPs oraz dwie pozostałe niemające odrębnej nazwy (wg [4], zmienione)

- (2) grupa 60A nazwana tak od produktu genu *60a* występującego u *Drosophila*, obejmująca ponadto BMP 5, BMP 6, BMP 7 i BMP 8;
- (3) BMP 3 i GDF 10;
- (4) BMP 9, BMP 10;
- (5) BMP 12, BMP 13 i GDF 5 [12].

Oprócz homodimerów, BMPs występować mogą także jako białka heterodimeryczne, wykazując przy tym zupełnie inne własności biologiczne [1, 8].

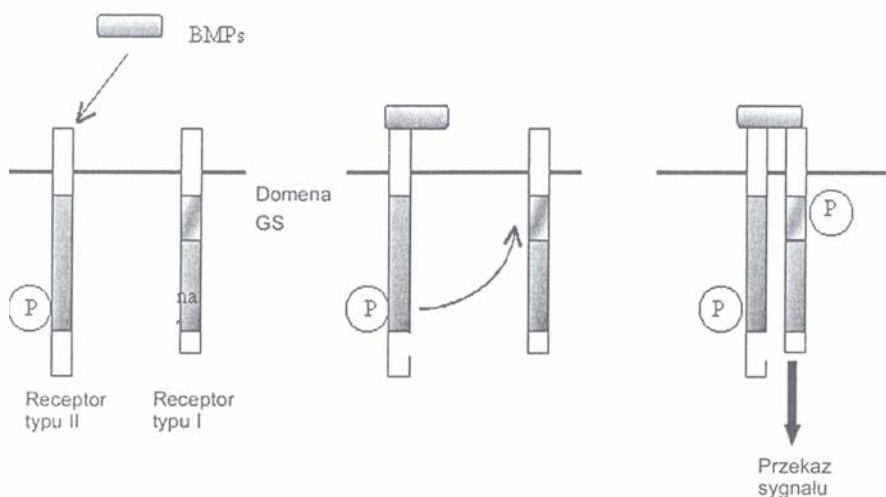
PRZEKAZ SYGNAŁU

Choć białka z rodziny TGF β wywierają zróżnicowane efekty biologiczne *in vivo*, wykorzystują podobne, choć nie identyczne szlaki sygnałowe w komórkach docelowych.

Receptory BMPs

W przekaz sygnału zaangażowane są dwa typy receptorów. Obydwa mają w części cytoplazmatycznej domenę o aktywności kinazy serynowo-treoninowej [5]. Pierwotnym receptorem odpowiedzialnym za wiązanie liganda jest receptor typu II. Wiąże on ligand z wysokim powinowactwem, ale nie przekazuje sygnału do wnętrza komórki. Domena kinazy receptora typu II jest konstytutywnie aktywna, po związaniu liganda, fosforyluje domenę GS receptora typu I, zlokalizowaną między częścią transmembranową a kinazową receptora. Dochodzi do utworzenia heterotetramerycznego kompleksu złożonego z dwóch cząsteczek receptorów typu I i II. Ufosforylowany receptor typu I ulega aktywacji i fosforyluje wewnątrzkomórkowe substraty dalszych etapów przekazu sygnału [11, 21] (ryc. 2).

U ssaków zidentyfikowano trzy receptory typu I zaangażowane w przekaz sygnału od BMPs. Są to podobne strukturalnie receptory typu I A i B (BMPR IA, BMPR IB) określane też odpowiednio ALK 3 i ALK 6 (ang. *Activin-like Kinase*) oraz odmienny od nich receptor ALK 2. W przypadku receptorów typu II istnieje specyficzny dla



RYCINA 2. Mechanizm aktywacji receptorów BMPs. Konstytutywnie aktywny receptor typu II wiąże ligand. Do kompleksu ligand-receptor typu II rekrutowany jest receptor typu I, który staje się substratem dla receptora typu II. Fosforylacji ulega domena GS receptora typu I. Do przekazu sygnału konieczne jest związanie liganda przez oba typy receptorów, ale przekaz i specyfika wewnątrzkomórkowego sygnału warunkowane są przez ufosforylowany receptor typu I

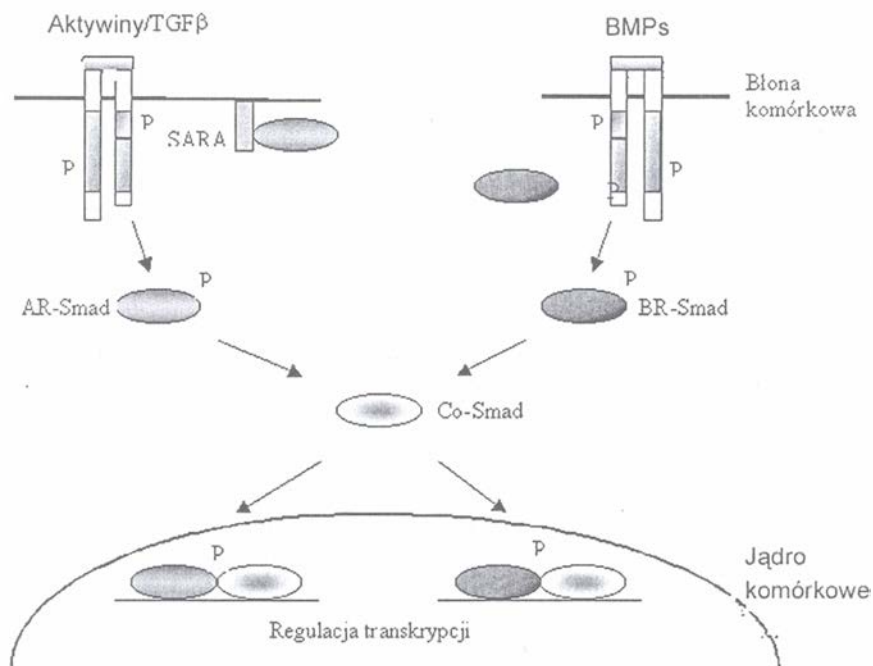
BMPs receptor typu II (BMPRII). BMPs mogą też być wiązane przez receptory aktywin II i IIB (ActRII, ActRIIB) [16].

Białka Smad

Białka Smad są głównymi cząsteczkami przekazującymi wewnątrzkomórkowy sygnał od receptorów BMPs [5, 16]. Podzielić je można na trzy grupy: białka Smad aktywowane przez receptor (ang. *Receptor-regulated Smad*, R-Smad), wspólny mediator Co-Smad (ang. *Common mediator Smad*) i inhibitorowe białka Smad (ang. *Inhibitory Smad*, I-Smad). Białka Smad wykazują strukturalne podobieństwo. W cząsteczce wyróżnić można dwie konserwatywne domeny: N-kończącą domenę MH-1 i C-kończącą MH-2 oddzielone mniej konserwatywnym łącznikiem (ryc. 4). Domena MH-2 występuje we wszystkich trzech grupach białek Smad i odpowiada za oligomeryzację, interakcję z receptorem typu I i regulację transkrypcji. Odpowiedzialny za transport do jądra komórkowego i wiązanie do DNA region MH-1 charakterystyczny jest dla R-Smad i Co-Smad, nie mają go I-Smad. Dodatkowo R-Smad mają motyw SSXS na C-końcu cząsteczki, w którym dwie ostatnie seryny ulegają fosforylacji przez receptor typu I. Region łącznikowy odpowiada za wiązanie ligaz ubikwityny Smurf1 i Smurf2 i kierowanie białek Smad do proteasomów. Ubikwitynacja i degradacja białek Smad jest jednym z mechanizmów regulacji ich funkcji w komórkach [26].

Związanie liganda do receptora powoduje fosforylację i aktywację białek R-Smad. W przypadku BMPs są to Smad 1, 5 i 8, zwane też BR-Smad w odróżnieniu od aktywowanych przez TGF β i aktywiny Smad 2 i 3 określanych jako AR-Smad. W komórkach spoczynkowych domeny MH-1 i MH-2 białek Smad są ze sobą zasocjowane. Dodatkowo AR-Smad są zakotwiczone do błony komórkowej przez białko zwane SARA (ang. *Smad Anchor for Receptor Activation*) [25]. Białka takiego nie zidentyfikowano dotychczas w przypadku BR-Smad. Ufosforylowanie białek Smad pociąga za sobą rozdzielenie domen MH-1 i MH-2 i utworzenie heterooligomerycznego kompleksu z Co-Smad, których jedynym przedstawicielem jest Smad 4. Następnie kompleks taki migruje do jądra komórkowego i reguluje transkrypcję docelowych genów [10, 6, 2] (ryc. 3). Może się to odbywać przez bezpośrednie wiązanie do DNA lub oddziaływanie na inne białka: czynniki transkrypcyjne, koaktywatory i korepresory transkrypcji (ryc. 4). Te ostatnie indukują odpowiednio acetylację lub deacetylację histonów i odgrywają kluczową rolę w regulacji transkrypcji [14].

Inhibitorowe białka Smad: Smad 6 i 7 mają zdolność hamowania kaskady sygnałowej. Smad 7 hamuje przekaz sygnału zarówno od receptorów TGF β i aktywin, jak i BMPs, podczas gdy Smad 6 specyficznie hamuje przekaz sygnału od receptorów BMPs. I-Smad lokalizują się w jądrze komórkowym blokując bezpośrednio transkrypcję niektórych genów. Po stymulacji przez BMPs przechodzą z jądra do cytoplazmy. Tu mogą wiązać się do aktywnych receptorów typu I i hamować fosforylację R-Smad. Dodatkowo I-Smad współzawodniczą z R-Smad w tworzeniu kompleksu ze Smad 4. BMPs indukują mRNA dla Smad 6 i 7, co wskazuje na istnienie negatywnego sprzężenia zwrotnego, w którym stymulacja receptora prowadzi do powstania białek hamujących kaskadę sygnałową [9].



RYCINA 3. Schemat przekazu sygnału od receptorów nadrodziny TGFβ. Związanie liganda do receptora powoduje fosforylację i aktywację białek R-Smad (AR-Smad w przypadku TGFβ/aktywin lub BR-Smad w przypadku BMPs), które tworzą następnie kompleks z Co-Smad. Kompleks taki migruje do jądra komórkowego i bezpośrednio lub pośrednio reguluje transkrypcję genów. W przekazie sygnału od TGFβ/aktywin bierze udział białko SARA, które kotwiczy białka Smad do błony komórkowej, co ułatwia ich fosforylację przez aktywny receptor typu I

Alternatywny szlak przekazu sygnału od receptorów BMPs

Choć kaskada białek Smad wydaje się odgrywać kluczową rolę w przekazie sygnału od receptorów BMPs, to istnieją alternatywne drogi przekazu sygnału. Stymulacja komórek przez BMPs prowadzi do aktywacji białek Rho. To pociąga za sobą aktywację kaskady kinaz MAP. Dochodzi do fosforylacji i aktywacji kinaz p38, ERK i JNK [2, 9].

WNIOSKI KOŃCOWE

Molekularne mechanizmu przekazu sygnału od receptorów BMPs nie są do końca poznane. Zadziwia fakt, że tak różne, często przeciwstawne efekty biologiczne BMPs osiągane są tak skromnym zasobem wtórnych przekaźników sygnału. Wydaje się, że kaskada sygnałowa może być modulowana przez różnorodne czynniki biologiczne na wielu etapach.

Transport do jądra komórkowego
Wiązanie do DNA
Regulacja transkrypcji

Oligomeryzacja
Interakcja z receptorem typu I
Regulacja transkrypcji



Ubikwitynacja Degradacja		Smurf1 Smurf2	
Koaktywatory transkrypcji			P300/CBP MSG-1
Korepresory transkrypcji	Hoxc-8	Hoxc-8	Hoxc-8 SIP 1 Tob
Czynniki transkrypcyjne	YY1		BF 1 E1H OAZ Runx1/2/3

RYCINA 4. Budowa białek Smad. W cząsteczce wyróżnić można N-końcowy region MH-1 i C-końcowy MH-2 połączone linkerem. Zaznaczono role poszczególnych domen budujących białka Smad, a w tabelce zebrano białka odpowiedzialne za ubikwitynację i degradację, koaktywatory i korepresory transkrypcji oraz czynniki transkrypcyjne, które mogą oddziaływać z poszczególnymi domenami białek Smad w ten sposób modulując przekaz sygnału od receptorów BMPs (wg [13 i 16], zmienione)

Poszczególne BMPs wykazują różne powinowactwo do receptorów. Wiadomo np., że receptory IA i IB wiążą BMP 4 z podobnym, wysokim powinowactwem, podczas gdy BMP 7 wiąże się silniej do receptora IB, a GDF 5 wiąże się tylko z receptorem IB, ale nie z receptorem IA [9]. Intensywne badania prowadzi się nad rolą poszczególnych receptorów typu I. W doświadczeniach *in vitro* z wykorzystaniem konstytutywnie aktywnych form receptorów wykazano m.in., że receptor IA indukuje proliferację, a receptor IB apoptozę prekursorowych komórek nerwowych w rozwoju centralnego układu nerwowego u myszy. Stymulacja progenitorowych komórek izolowanych z mózgu przez BMP 2 prowadziła do wzrostu poziomu transkryptu dla receptora IB. Autorzy sugerują istnienie sekwencyjnego modelu działania poszczególnych receptorów typu I, w którym stymulacja powszechniej występującego receptora IA prowadzi do indukcji ekspresji receptora IB [19].

Również inne czynniki wzrostowe i cytokiny mogą modulować przekaz sygnału od receptorów BMPs. Interferon γ działający przez kaskadę kinaz JAK/STAT indukuje ekspresję Smad 7, a estry forbolu nasilają stymulowaną TGF β ekspresję Smad 6 i 7. Aktywacja kinaz MAP przez receptory czynników wzrostowych, takich jak np. nabłonkowy czynnik wzrostowy (ang. *Epidermal Growth Factor*, EGF) lub czynnik wzrostowy hepatocytów (ang. *Hepatocyte Growth Factor*, HGF) prowadzi do fosforylacji i aktywacji Smad 2. Białka Smad mogą być fosforylowane przez kinazy

MAP ERK1/2 w części łącznikowej, co z kolei prowadzi np. do zahamowania aktywacji Smad 1 [27].

Dobrze poznanym przykładem synergistycznego działania BMPs i cytokin jest indukcja astrocytów z prekursorowych komórek nerwowych stymulowanych jednocześnie BMP i czynnikiem hamującym białaczkę (ang. *Leukemia Inhibitory Factor*, LIF). W komórkach tych dochodzi do utworzenia kompleksu Smad 1/STAT3 przy udziale białka p300 z grupy koaktywatorów transkrypcji. Związanie takiego kompleksu do regionów regulatorowych DNA pociąga za sobą aktywację genów odpowiedzialnych za różnicowanie komórek prekursorowych w kierunku astrocytów [17].

Oprócz białek Smad kluczową rolę w przekazie sygnału wydaje się odgrywać kaskada kinaz MAP. Wykazano np. udział kinaz p38 i ERK1/2 w różnicowaniu chondrocytów i produkcji białek macierzy zewnątrzkomórkowej przez osteoblasty stymulowane przez BMPs [27].

Ciekawą grupą czynników zaangażowanych w regulację odpowiedzi komórek na BMP są naturalne inhibitory białek z nadrodziny TGF β . Są to m.in. nogina, chordyna, gremlina, folistatyna i inne. Te wydzielnicze białka antagonizują receptory BMPs hamując w ten sposób szlaki sygnałowe w komórkach [24].

Podziękowania

Autor wyraża wdzięczność Panu Profesorowi Aleksandrowi Kojowi za pomoc w redagowaniu niniejszego tekstu.

LITERATURA

- [1] AONO A, HAZAMA M, NOTOYA K, TAKETOMI S, YAMASAKI H, TSUKUDA R, SASAKI S, FUJISAWA Y. Potent ectopic bone inducing activity of bone morphogenetic protein 4/7 heterodimer. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **210**: 670–677.
- [2] ATTISANO L, WRANA JL. Signal transduction by the TGF β superfamily. *Science* 2002; **296**: 1646–1647.
- [3] BLOBE GC, SCHIEMANN WP, LODISH HF. Role of transforming growth factor β in human diseases. *N Eng J Med* 2000; **342**: 1350–1358.
- [4] EBENDAL T, BENGTTSSON H, SODERSTROM S. Bone Morphogenetic Proteins and Their Receptors: Potential Function in the Brain. *J Neurosci Res* 1998; **51**: 139–146.
- [5] HELDIN C-H, MIYAZONO K, TEN DIJKE P. TGF β signalling from cell membrane to the nucleus through Smad proteins. *Nature* 1997; **390**: 465–471.
- [6] HILL CS. The Smads. *Int J Bioch Cell Biol* 1999; **31**: 1249–1254.
- [7] HOGAN BLM. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 1996; **10**: 1580–1594.
- [8] ISRAELDI, NOVEJ, KERNS KM, KAUFMAN RJ, ROSEN V, COX KA, WOZNEY KM. Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity *in vitro* and *in vivo*. *Growth Factors* 1996; **13**: 291–300.
- [9] KAWABATA M, IMAMURA T, MIYAZONO K. Signal transduction by Bone Morphogenetic Proteins. *Cytokines Growth Factors Rew* 1998; **9**:49–61.
- [10] KAWAI S, FAUCHEN C, GALLEA S, SPINELLA-JEAGLE S, ATFI A, BARON R, ROMAN S. Mouse Smad 8 phosphorylation downstream of BMP receptors ALK-2, ALK-3 and ALK-6 induces its association with Smad 4 and transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **271**: 682–687.
- [11] KIRSCH T, SEBALD W, DREYER MK. Crystal structure of the BMP2-BRIA ectodomain complex. *Nature Struct Biol* 2000; **7**: 492–496.

- [12] MEHLER MF, MABIE PC, ZHANG D, KESSLER JA. Bone morphogenetic proteins in the nervous system. *Trends Neurosci* 1997; **7**: 309–317.
- [13] MIYAZAWA K, SHINOZAKI M, HARA T, FURUYA T, MIYAZONO K. Two major Smad pathways in TGF β superfamily signalling. *Genes Cell* 2002; **7**: 1191–1204.
- [14] MIYAZONO K, TEN DIJKE P, HELDIN C-H. TGF β signalling by Smad proteins. *Adv Immunol* 2000; **75**: 115–157.
- [15] MIYAZONO K, TEN DIJKE P, ICHIJO H, HELDIN C-H. Receptors for transforming growth factor β . *Adv Immunol* 1994; **55**: 181–220.
- [16] MOUSTAKAS A, SOUCHELNYTSKYI S, HELDIN C-H. Smad regulation in TGF β signal transduction. *J Cell Sci* 2001; **114**: 4359–4369.
- [17] NAKASHIMA K, YANAGISAWA M, ARAKAWA H, KIMURAN, HISATSUNE T, KAWABATA M, MIYAZONO K, TAGA T. Synergistic signalling in fetal brain by STAT3-Smad 1 complex bridged by p300. *Science* 1999; **284**: 479–482.
- [18] PADGETT RW, WOZNEY JM, GELBART WM. Human BMP sequences can confer normal dorso-ventral patterning in the *Drosophila* embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 2905–2909.
- [19] PANCHISION DM, PICKEL JM, STUDER L, LEE SH, TURNER PA, HAZEL TG, MCKAY RDG. Sequential action of BMP receptors control neural precursors cell production and fate. *Genes Dev* 2001; **15**: 2094–2110.
- [20] PATTERSON GJ, PADGET RW. TGF β related pathways: roles in *Caenorhabditis elegans* development. *Trends Genet* 2000; **16**: 27–33.
- [21] QIN BY, LANA SS, CORREIA JJ, LIN K. Smad 3 allosteric links TGF β receptor kinase activation to transcriptional control. *Genes Dev* 2002; **16**: 1950–1965.
- [22] ROSEN V, WOZNEY JM. Bone Morphogenetic Proteins. [W] Principles of Bone Biology (eds) J. P. Bilezikin, L.G. Raisz, G.A. Roctan *et al.* San Diego: Academic Press 2nd edition June 2002: 919–928.
- [23] SAMPATH TK, RASHKA KE, DOCTOR JS, TUCKER RF, HOFFMAN FM. *Drosophila* transforming growth β superfamily proteins induce endochondral bone formation in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 6004–6008.
- [24] SMITH WC. TGF β inhibitors new and unexpected requirements in vertebrate development. *Trends Genet* 1999; **15**: 3–5.
- [25] TEN DIJKE P, HELDIN C-H. An anchor for activation. *Nature* 1999; **397**: 109–110.
- [26] WRANA JL, ATTISANO L. The Smad pathway. *Cytokines Growth Factors Rev* 2000; **11**: 5–13.
- [27] ZHANG Y, DERYNCK R. Regulation of Smad signalling by protein association and signalling crosstalk. *Trends Cell Biol* 1999; **9**: 274–279.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Przyjęto: 10.07.2003

Otrzymano: 30.06.2003

Adres autora: ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków

e-mail: adrian_zet@yahoo.com

FOSDUCYNA I JEJ IZOFORMY – REGULATORY BIAŁEK G*

PHOSDUCIN AND ITS ISOFORMS – REGULATORS OF G-PROTEIN FUNCTIONS

Hanna FABCZAK, Katarzyna SOBIERAJSKA, Stanisław FABCZAK

Instytut Biologii Doświadczalnej, Zakład Biologii Komórki, Warszawa

Streszczenie: Fosducyna i jej izoformy: białka podobne do fosducyny i niedawno odkryte białka sieroce podobne do fosducyny, tworzą odrębną grupę białek, którym przypisuje się funkcję cytoplazmatycznych regulatorów heterotrimerycznych białek G. Fosducyna ulega silnej ekspresji w komórkach fotoreceptorowych siatkówki, natomiast w znacznie mniejszym stężeniu występuje ona w komórkach wielu innych tkanek oraz u niektórych niższych organizmów eukariotycznych. Białko to może być fosforylowane w ciemności przez kinazę A, kinazę II zależną od wapnia i kalmoduliny oraz kinazy receptorów związanych z białkami G. Fosducyna w swojej zdefosforylowanej formie podczas stymulacji świetlnej wiąże się z wysokim powinowactwem do $\beta\gamma$ -podjednostek białka G ($G\beta\gamma$). W ten sposób fosducyna zapobiega reasocjacji $\beta\gamma$ -podjednostek z α -podjednostką białka G ($G\alpha$) i powstaniu heterotrimeru oraz działa jako negatywny regulator szlaku przekazywania sygnału w komórkach fotoreceptorowych. Zasadniczo podobny hamujący mechanizm regulacyjny przypisuje się także białkom podobnym do fosducyny. Obserwacje te sugerują, że fosducyna w komórkach fotoreceptorowych odgrywa istotną rolę w procesach adaptacji tych komórek do światła i ciemności. Fosducyna i jej izoformy mogą również, jak wykazano ostatnio, chronić białka G przed destrukcją w proteasomach, a być może także sprawować kontrolę nad czynnikami transkrypcyjnymi.

Słowa kluczowe: fosducyna, białka podobne do fosducyny, sieroce białka podobne do fosducyny, $\beta\gamma$ -podjednostka białka G, fosforylacja, czynnik transkrypcyjny CRX.

Summary: Phosducin (Phd) and its isoforms, phosducin-like proteins (PhdLPs) and recently discovered phosducin-like orphan proteins (PhdLOPs), represent superfamily of proteins, that are established as important cytoplasmic regulators of heterotrimeric G-protein functions. Phosducin is abundantly expressed in retinal photoreceptor cells and in lower contents in cells of many other tissues and some lower eukaryotic organisms. This phosphoprotein can be phosphorylated during darkness by protein kinase A, Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II and G-protein-coupled receptor kinase. In the light, the dephosphorylated form of phosducin favors the binding of $\beta\gamma$ -subunits of G-protein ($G\beta\gamma$), which prevents

*Praca finansowana przez KBN w ramach grantu Nr 6P04C-057-18 oraz działalności statutowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN.

interaction of $\beta\gamma$ -subunits with α -subunit of G-protein ($G\alpha$) to form heterotrimer, thus it can function as negative regulator of cGMP cascade in visual system. In general, similar down-regulation mechanisms have been ascribed for Phd isoform, like PhdLPs. These observations suggest that phosducin might be involved in photoreceptor cell processes for light and dark adaptation mechanism. Phd and its isomers may serve, as it has been reported recently, as protective factors for $G\beta\gamma$ degradation in proteasomes or potentially may act also as transcriptional regulators.

Key words: phosducin, phosducin-like proteins, phosducin-like orphan proteins, $\beta\gamma$ -subunits of G-protein, phosphorylation, transcriptional factor CRX.

1. WPROWADZENIE

W latach osiemdziesiątych ubiegłego wieku w dwóch pracowniach odkryto białko znane dzisiaj pod nazwą fosducyny (Phd). Zostało ono tak nazwane przez Lee i współpracowników [35, 36], którzy wyizolowali je z komórek fotoreceptorowych oczu wołu. Po raz pierwszy fosducyna została sklonowana przez Kuo i współpracowników [33] z siatkówki oczu wołu i nazwana MEKA. Podobieństwo sekwencji między MEKA i fosducyną stwierdzili w roku 1990 Lee i współpracownicy [37]. Trzy lata później Miles i współpracownicy [49] zidentyfikowali kolejne białka, homologiczne do fosducyny, które nazwano białkami podobnymi do fosducyny (ang. *phosducin-like proteins, PhdLP*). Fosducyna i jej izoformy kodowane są przez odmienne geny, ulokowane w przypadku fosducyny na chromosomie 1q u myszy [13], a PhdLP na 9 chromosomie u człowieka [72]. Koniec lat dziewięćdziesiątych przyniósł odkrycie kolejnych, nowych izoform fosducyny w komórkach fotoreceptorowych siatkówki, które otrzymały z kolei nazwę sierocych białek podobnych do fosducyny (ang. *phosducin-like orphan proteins, PhdLOPs*) [14]. Zarówno fosducyna, jak i PhdLP charakteryzują się zdolnością łączenia się z kompleksem podjednostek $\beta\gamma$ ($G\beta\gamma$) heterotrimerycznych białek G i do niedawna ta właściwość była najistotniejszym kryterium decydującym o przynależności do rodziny tych białek. Obecnie jednak, po odkryciu PhdLOPs, które wykazują wysoką homologię z pozostałymi członkami rodziny, ale pozbawione są zdolności łączenia się z kompleksem $G\beta\gamma$, uważa się takie kryterium za zbyt ostre.

Fosducyna, jak wcześniej wspomniano, została zidentyfikowana w komórkach fotoreceptorowych ssaków, jednak późniejsze badania wykazały, że sama fosducyna i jej izoformy występują w wielu innych tkankach, włączając system nerwowy, szyszynkę, serce, śledzionę, komórki węchowe i smakowe, komórki rozrodcze [3, 5, 14, 45, 49, 60, 64, 72], a także u niższych eukariota: drożdży, *Cryphonectria parasitica* i *Blepharisma japonicum* [16, 17, 32]. Badania nad funkcją białek z rodziny fosducyn skupiają się głównie na określeniu roli tych białek w regulacji aktywności białek G, biorących udział w różnego rodzaju procesach sygnalizacyjnych. Mogą one jednak pełnić również funkcje czynników adaptujących w pewnych eksperymentalnych warunkach, na przykład przy ekspozycji na opioidy [21, 66, 67] lub alkohol etylowy [49]. Białka podobne do fosducyny mogą regulować funkcję białek opiekuńczych (ang.

chaperonin containing tailless complex polypeptide 1, CCT) [47] oraz wpływać na obniżenie aktywności fosfolipazy C po stymulacji komórek angiotensyną II [46]. Odkrycie sierocych izoform fosducyny kieruje w ostatnim okresie zainteresowania poznawcze badaczy na białka z tej właśnie grupy jako czynniki wpływające na regulację procesu transkrypcji [14, 81, 82].

2. FOSDUCYNA

Białka należące do rodziny fosducyn występują w cytoplazmie komórek. Większość z nich charakteryzuje się zdolnością do specyficznego wiązania z wysokim powinowactwem do kompleksu $G\beta\gamma$ heterotrimerycznych białek G, wyjątek stanowią wspomniane sieroce białka podobne do fosducyny. Fosducyna jest kwaśnym białkiem, którego masa cząsteczkowa została, na podstawie sekwencji aminokwasowej, oszacowana na 28 kDa. Jednak podczas elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS, fosducyna migruje jak białko o masie cząsteczkowej 33 kDa. Trudno jednoznacznie wyjaśnić zaistniałą rozbieżność. Przypuszcza się, że przyczyną tego może być wysoki stopień kwasowości tego białka spowodowany obecnością reszt kwasu glutaminowego i asparaginowego (punkt izoelektryczny wynosi 4,5) [35, 37]. Wysoka zawartość aminokwasów mających w swojej cząsteczce grupy siarczkowe (5 cystein i 9 metionin) może również wpływać na szybkość migracji białka w żelu [75].

Ponieważ białka G stanowią w komórce kluczowe ogniwo w procesie przekazywania sygnału w wyniku aktywacji odpowiedniego receptora z nimi związanego (np. rodopsyny w przypadku układu wzrokowego kregowców) [12, 25, 59], badania nad funkcją białek z rodziny fosducyn skupiają się głównie na regulacji aktywności białek G w tych procesach. Jedną z możliwości kontroli mechanizmu przekazywania sygnału w komórce przez fosducyny jest współzawodnictwo między fosducyną a α -podjednostką ($G\alpha$) białka G w wiązaniu z jego podjednostkami $\beta\gamma$. Fosducyna może również hamować aktywność GTP-azową podjednostki $G\alpha$ [8, 15, 34, 41].

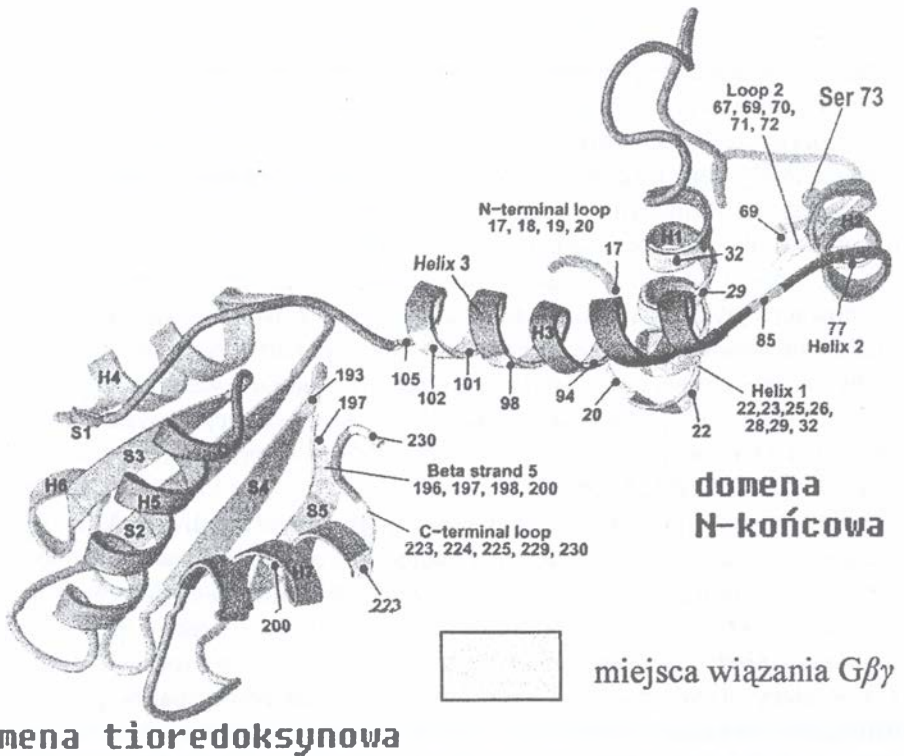
W komórkach fotoreceptorowych fosducyna ulega silnej ekspresji [36, 37, 39] i tylko jej zdefosforylowana forma ma zdolność do tworzenia kompleksu z podjednostkami $G\beta\gamma$ [22, 23, 78]. Dlatego też szczególną uwagę skupiono na poznaniu roli fosducyny w procesie przekazywania sygnału świetlnego w komórkach fotoreceptorowych kregowców. Należy zaznaczyć, że fosducyna występuje w cytoplazmie komórek fotoreceptorowych adaptowanych do ciemności w formie ufosforylowanej i dopiero stymulacja bodźcem świetlnym powoduje jej szybką defosforylację [35]. W konsekwencji tych odkryć zasugerowano, że fosducyna w komórkach fotoreceptorowych odgrywa istotną rolę w procesach adaptacji tych komórek do światła i ciemności [76, 79]. Stało się to przyczyną przypisania jej w komórkach fotoreceptorowych głównej funkcji czynnika hamującego aktywność białek G, poprzez przeciwdziałanie w ponownym tworzeniu kompleksu podjednostek $\alpha\beta\gamma$ białek G. Obecnie lepiej poznano fizjologiczne aspekty działania fosducyny, a wyniki ostatnich

badania sugerują, że występujące w cząsteczce fosducyny mutacje mogą być odpowiedzialne za dziedziczną retinopatię [4, 26] i autoimmunologiczną chorobę naczyńówki oka [2, 63].

2.1. Kompleks fosducyna z $\beta\gamma$ -podjednostką białka G

Charakter oddziaływań fosducyny z podjednostkami $G\beta\gamma$ był badany przy użyciu promieniowania X [22]. Uporządkowanie krystalograficzne struktury badanego białka wskazuje na obecność dwóch głównych domen (ryc. 1). Pierwsza, to polarny N-koniec (pierwsze 105 aminokwasów) z dwoma helisami, tworzący powierzchnię oddziaływania z podjednostką $\beta\gamma$ białka G [22, 27, 70, 77]. Pierwsze 63 aminokwasy wchodzące w skład helisy 1 tworzą rdzeń N-końca, a w pozycji 29 występuje ważny funkcjonalnie aminokwas, tryptofan (Try-29), istotny w interakcji fosducyny z podjednostką $G\alpha$ [77]. Helisa 1 otoczona jest ze wszystkich stron przez pozostałe domeny N-końca. N-koniec fosducyny wykazuje duży stopień ruchliwości szczególnie w rejonie, który nie jest odpowiedzialny za kontakt z podjednostkami $G\beta\gamma$. Trzydziestoaminokwasowy segment od Asp-37 do Arg-66 charakteryzuje się niskim stopniem uporządkowania i prawdopodobnie ze względu na swoją wewnętrzną ruchliwość odznacza się słabą gęstością elektronową. Region ten przypuszczalnie leży blisko miejsca fosforylacji fosducyny (Ser-73). Postulowano, że N-koniec fosducyny może zawierać fragment domeny homologicznej do plekstryny (domenę PH), odpowiedzialnej za wiązanie z fosfolipidami błony [27]. Jednak analiza struktury krystalicznej fosducyny nie wykazała obecności struktur podobnych do domeny PH [42]. Loew i współautorzy [44] sugerują, że wiązanie fosducyny do podjednostek G powoduje zmiany konformacyjne, w konsekwencji których następuje przemieszczenie kompleksu $G\beta\gamma$ z błony do cytoplazmy. Translokacja kompleksu $G\beta\gamma$ do cytoplazmy mogłaby być odpowiedzialna za hamowanie przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego. Wydaje się, że dysocjacja i asocjacja podjednostek $G\beta\gamma$ z udziałem fosducyny jest głównym mechanizmem regulującym aktywność białek G [38].

Druga domena zlokalizowana na C-końcu fosducyny, jest strukturalnie podobna do tioredoksyny [22]. Domena ta łączy się tylko z zewnętrznym pasmem podjednostki $G\beta$ (ryc. 1). Powinowactwo C-końca fosducyny do podjednostki β białka G jest dwukrotnie niższe niż stwierdzono to w przypadku N-końca [27, 70, 77]. Obie domeny, które w fosducynie rozdzielone są przestrzenią, prawdopodobnie również pełnią odmienne funkcje w komórce. N-końcowa domena odpowiedzialna jest za współzawodnictwo z podjednostką $G\alpha$ w wiązaniu podjednostek $G\beta\gamma$, natomiast C-końcowa domena, tioredoksynowa, miałaby odpowiadać za translokację podjednostek $G\beta\gamma$ z błony do cytoplazmy. Badanie wiązania dwóch domen fosducyny z $G\beta\gamma$, jako niezależnych struktur, okazało się bardzo użyteczne w poznaniu różnych aspektów oddziaływania podjednostek $\beta\gamma$ białka G z efektorami i podjednostką $G\alpha$. Doświadczenia przeprowadzone przez Hawesa [27] oraz Xu [77] potwierdziły wcześniejsze przypuszczenia, co do funkcji N-końcowej domeny fosducyny. Badacze ci wykazali, że N-koniec fosducyny po przyłączeniu podjednostek $G\beta\gamma$, tak jak zakładano wcześniej, może hamować ich funkcje. Oddziaływanie to jest jednak niewystarczające do



RYCINA 1. Struktura cząsteczki fosducyny z zaznaczonymi miejscami wiązania $G\beta\gamma$ oraz zaznaczonymi domenami na N-końcu i tioredoksynową domeną na C-końcu (wg Gaudet i współaut. [23], zmieniony)

odłączenia $G\beta\gamma$ od błony [69]. Natomiast pozbawienie fosducyny domeny N-końcowej nie przeszkadza w interakcji C-końca tego białka z $G\beta\gamma$ [64], ale połączenie to także nie jest w stanie spowodować translokacji podjednostek $G\beta\gamma$ do cytoplazmy. Prawdopodobnie w tym przypadku, przy braku N-końca białka, powierzchnia oddziaływania tych dwóch białek jest jednak zbyt mała, aby wytworzyć stabilne oddziaływania między nimi [69].

Podjednostki $G\beta\gamma$ zakotwiczone są do błony komórkowej za pośrednictwem hydrofobowej reszty farnesylowej przyłączonej do podjednostki γ białka G [50]. Wiązania hydrofobowe są dodatkowo wzmocnione oddziaływaniami elektrostycznymi. Przyłączenie fosducyny powoduje osłabienie wiązań elektrostycznych pomiędzy błoną a $G\beta\gamma$ o jeden rząd wielkości. Równocześnie następują nieznaczne zmiany konformacyjne podjednostki $G\beta$, które mogą prowadzić do osłabienia wiązania $G\beta\gamma$ z błoną i do dysocjacji kompleksu fosducyna- $G\beta\gamma$ do cytoplazmy [44, 50]. Warto natomiast wspomnieć, że nierównomierny rozkład kwaśnych aminokwasów w cząsteczce fosducyny może wiązać się z odmiennymi charakterystykami wiązania tego białka do podjednostek $G\beta\gamma$. Ponadto należy zaznaczyć, że fosducyna wiąże się z podobnym powinowactwem do różnych kombinacji kompleksu podjednostki $G\beta$ z podjednostką $G\beta$ [22, 23, 52]. Nie stwierdzono natomiast kontaktu fosducyny z podjednostką $G\gamma$ w kompleksie $G\beta\gamma$.

2.2. Fosforylacja fosducyny

Aktywność fosducyny, może być regulowana przez zmianę poziomu jej fosforylacji. Fosducyna ma wiele potencjalnych miejsc fosforylacji, włączając w to Ser-73, która jest fosforylowana przez białkową kinazę A (PKA) [1, 13, 38]. Fosforylacja fosducyny prowadzi do dysocjacji kompleksu fosducyna- $G\beta\gamma$. Przyczyną tego procesu mogłyby być zmiany konformacyjne w cząsteczce fosducyny spowodowane zmianą stopnia ufosforylowania, a bliskie sąsiedztwo reszt aminokwasowych mających ładunek dodatni (Lys-23, Arg-30 i Lys-71) mogłoby wspomagać te zmiany. Również zwiększenie powinowactwa wiązania kompleksu do błony komórkowej po fosforylacji fosducyny mogłoby powodować rozdzielenie białek. Lee i współaut. [36, 38] wykluczyli obie te możliwości sugerując, że fosforylacja fosducyny moduluje wewnętrzną, jeszcze nie znaną aktywność kompleksu fosducyna- $G\beta\gamma$, co w konsekwencji prowadzi do dysocjacji białek [38]. Defosforylacja fosducyny jest katalizowana przez serynowo-treoninową fosfatazę typu 2A (PP2A) [40, 56].

Willardson ze współpracownikami [76] zaproponował możliwy cykl fosforylacji i defosforylacji fosducyny w komórkach fotoreceptorowych siatkówki, uwzględniający rolę PKA. Stymulacja receptora przez światło w komórkach fotoreceptorowych prowadzi do aktywacji białka G (transducyny) i oddysocjowanie α -podjednostki od kompleksu $G\alpha\beta\gamma$. W stanie aktywnym $G\alpha$ aktywuje fosfodiesterazę, enzym hydrolizujący cGMP do GMP, w wyniku czego następuje spadek poziomu tego nukleotydu w komórce. Konsekwencją tego procesu jest zamknięcie kanałów jonowych aktywowanych przez cGMP. Stanowi to bezpośrednią przyczynę zahamowania wpływu jonów Na^+ i Ca^{2+} do wnętrza komórki fotoreceptorowej. Przy stale działającym systemie ATPaz i wymienników jonowych regulujących wypływ jonów na zewnątrz komórki, prowadzi to do redukcji stężenia Ca^{2+} z 300–500 nM w ciemności do 30–50 nM po stymulacji światłem [25,59]. Jednym z efektów spadku stężenia Ca^{2+} jest redukcja aktywności cykazy adenylanowej i zmniejszenie poziomu cAMP w komórce. W konsekwencji następuje inaktywacja PKA i obniżenie poziomu fosforylacji fosducyny. W stanie zdefosforylowanym fosducyna wiąże się z β -podjednostką kompleksu $G\beta\gamma$ uwolnionego po dysocjacji $G\alpha$. Obniżenie poziomu wapnia powoduje wzrost stężenia cAMP i cGMP do poziomu spoczynkowego, co z kolei przywraca aktywność PKA i następuje ponowne ufosforylowanie fosducyny. W tej formie fosducyna traci powinowactwo do podjednostek $G\beta\gamma$ i oddysocjowuje od kompleksu $G\beta\gamma$ [76].

W sprzeczności z proponowaną przez Willardsona [76] rolą cAMP w fosforylacji fosducyny i jej funkcją w mechanizmie kontrolującym przebieg przekazywania sygnału świetlnego w komórkach fotoreceptorowych pozostają rezultaty doświadczeń elektrofizjologicznych. Wynika z nich, że cAMP nie ma wpływu ani na odpowiedź elektryczną komórek fotoreceptorowych na światło, ani na proces adaptacji. Tym samym udział fosducyny w tych zjawiskach według autorów wydaje się mało prawdopodobny [30]. Dlatego ostatnie doniesienia na temat udziału białkowej kinazy II zależnej od Ca^{2+} i kalmoduliny (CaMK II) w regulacji poziomu fosforylacji fosducyny i roli tego procesu w funkcjonowaniu komórek fotoreceptorowych wydają się szczególnie ważne

[74]. CaMK II jest bardziej efektywna w swym działaniu, gdyż powoduje aż dwa rzędy wielkości silniejsze hamowanie wiązania fosducyny do kompleksu $G\beta\gamma$. Kinaza ta fosforyluje fosducynę podobnie jak PKA na Ser-73, lecz oprócz tego fosforylacji ulegają także Ser-6, Ser-36, Ser-54 oraz Ser-106. Szczególnie ważne wydaje się fosforylacja na Ser-73 i Ser-54, gdyż otaczające sekwencje aminokwasów spełniają warunek wiązania białka 14-3-3 wiążącego się do ufosforylowanych reszt serynowych (Ser-54 i Ser-73). Białko 14-3-3 zlokalizowano w pręcikach siatkówki oka [61], należy ono do rodziny białek, które wiążą się do ufosforylowanej reszty seryny, występującej w specyficznej sekwencji aminokwasowej $RSXS^*XP$ lub $RX(Y/F)XS^*XP$ [31, 43, 51, 78]. W komórkach fotoreceptorowych pełni ono rolę czynnika wiążącego fosducynę w formie ufosforylowanej po oddysocjowaniu od kompleksu $G\beta\gamma$. Natomiast obniżenie stężenia Ca^{2+} w komórce po stymulacji światłem, spadek aktywności CaMK II i defosforylacja fosducyny, hamowałoby wiązanie białka 14-3-3. W ten sposób jony wapnia mogłyby pełnić rolę czynnika kontrolującego poziom fosforylacji Ser-54 i Ser-73 *in vivo* [74].

W badaniach *in vitro* stwierdzono, że cząsteczka fosducyny może być również fosforylowana przez specyficzną kinazę receptorową typu 2, związaną z białkami G (ang. *G-protein-coupled receptor kinase 2*, *GRK2*) [62]. Miejsce wiązania fosducyny przez GRK2 jest różne i niezależne od miejsca fosforylacji przez PKA i CaMK II i znajduje się na C-końcu. Analiza fosforylacji przeprowadzona z wykorzystaniem zmutowanej fosducyny wskazuje, że miejsce fosforylacji występuje między 204 a 245 aminokwasem, w przypadku fosducyny i 195 a 218 aminokwasem, w przypadku białek podobnych do fosducyny. Podobnie jak miało to miejsce w przypadku fosforylacji przez PKA, ufosforylowanie białek z rodziny fosducyn przez GRK2 powoduje zmniejszenie powinowactwa do kompleksu $G\beta\gamma$.

Nowych danych na rolę fosducyny w regulacji szlaków sygnalizacyjnych dostarczają badania grupy Boekhoffa i współpracowników [9], którzy wykazali, że fosducyna może uczestniczyć w przekazywaniu sygnału zapachowego w komórkach węchowych, jako regulator nie tylko aktywności białek G, ale także aktywności kinazy GRK3. Doświadczenia te potwierdziły wcześniejsze doniesienia, że fosducyna może regulować kinetykę przekazywania sygnału z udziałem wtórnych przekaźników w rząskach komórek węchowych przez regulowanie translokacji kinazy receptorowej typu 3 (GRK3). Wynika to z obserwacji, że wprowadzenie do komórek egzogennej fosducyny hamuje translokację GRK3 do błony komórkowej. Ponadto stwierdzono, że mutacja punktowa w genie kodującym fosducynę, uniemożliwiająca fosforylację (wymiana Ser-73 na Ala), jest bardziej efektywna w hamowaniu szybkiego „wygaszenia” sygnału węchowego niż forma natywna. Odwrotną sytuację obserwowano w rząskach komórek węchowych, którym podawano zmutowaną fosducynę z wymienioną Ser-73 na Asp. Ujemny ładunek niesiony przez Asp-73 nadaje fosducynie stan „pseudoufosforylowania” ze wszystkimi jego konsekwencjami. Obserwuje się w tym przypadku szybsze niż w przy formie natywnej blokowanie odpowiedzi na sygnał zapachowy oraz translokację GRK3 do błony, w wyniku czego następuje fosforylacja receptora [9, 27, 77]. Wiadomo również, że współzawodnictwo fosducyny i GRK3 do wspólnego miejsca wiązania do kompleksu $G\beta\gamma$ jest antagonizowane w wyniku fosforylacji fosducyny przez PKA

[28]. Na podstawie tych danych został zaproponowany hipotetyczny model funkcjonowania fosducyny w komórkach węchowych [9]. W modelu tym fosducyna występuje jako regulator translokacji GRK3 między cytoplazmą a błoną komórkową. Proces ten, podobnie jak w przypadku komórek fotoreceptorowych, zależy od stanu ufosforylowania tego białka. W formie zdefosforylowanej, fosducyna silnie wiąże się z podjednostką $G\beta\gamma$, co uniemożliwia zakotwiczenie GRK3 do wspólnego miejsca wiązania na tej podjednostce. Stymulacja receptora przez sygnał zapachowy powoduje wzrost stężenia cAMP w komórce i zwiększenie aktywności PKA, co prowadzi do fosforylacji fosducyny. Efektem tej fosforylacji jest zmniejszenie powinowactwa fosducyny do kompleksu $G\beta\gamma$, a tym samym miejsce wiązania w podjednostce $G\beta\gamma$ ulega odblokowaniu. Nie ma więc w tej sytuacji przeszkody w przyłączeniu GRK3 do $G\beta\gamma$ i translokacji całego kompleksu do błony komórkowej [9]. W konsekwencji następuje fosforylacja receptora przez GRK3 i receptor w swojej ufosforylowanej formie staje się nieaktywny [18, 58].

2.3. Fosducyna – inhibitor ubiquitytacji $G\beta\gamma$

Nowa rola fosducyny, jako czynnika hamującego ubiquitytację, wiąże się z ochroną białek G przed degradacją w proteasomach. Ostatnio wykazano, że większość fosducyny w komórkach fotoreceptorowych, oszacowana na około $350 \mu\text{M}$ [35, 73], występuje nie w zewnętrznym segmencie pręcika, gdzie głównie przebiega proces przetwarzania sygnału świetlnego, lecz w wewnętrznej części komórki, gdzie mają miejsce funkcje metaboliczne [53, 68, 73]. Dane te sugerują, że rola fosducyny w komórkach fotoreceptorowych nie ogranicza się tylko do funkcji czynnika wiążącego $G\beta\gamma$ w celu hamowania szlaku przekazywania sygnału świetlnego. Pewne wskazówki nasuwają wyniki doświadczeń, w których stwierdzono, że 90% podjednostek $G\beta\gamma$ po stymulacji światłem ulega translokacji z zewnętrznego segmentu komórki fotoreceptorowej do jej segmentu wewnętrznego [68]. Z uwagi na fakt, że w segmencie wewnętrznym występuje także wysokie stężenie fosducyny i proteasomu 26S [54, 80], sprawdzono, czy translokacja $G\beta\gamma$ do wewnętrznego segmentu pręcika nie ma na celu degradacji tego kompleksu w drodze ubiquitytacji przez proteasom. Z doświadczeń przeprowadzonych przez Obina i jego współpracowników [55] wynika, że kompleks $G\beta\gamma$ jest substratem dla proteasomu w komórkach fotoreceptorowych. Miejsca ubiquitytacji konieczne, aby mogła zajść degradacja białka w proteasomie [57], znajdują się w γ -podjednostce białka G, natomiast ujemnym regulatorem tego procesu jest fosducyna. Na podstawie tych danych zaproponowano następujący mechanizm działania fosducyny. Przy długotrwałym naświetlaniu kompleks $G\beta\gamma$ ulega translokacji do wewnętrznego segmentu, gdzie wiąże się z fosducyną. Przyłączenie fosducyny do podjednostki $G\beta$ zabezpiecza cały kompleks $G\beta\gamma$ przed ubiquitytacją i degradacją w proteasomie [55]. Utworzenie kompleksu fosducyna- $G\beta\gamma$ zapobiega równocześnie przyłączeniu α -podjednostki do $G\beta\gamma$ i reasocjację białka G. Ponieważ miejsca ubiquitytacji białka G znajdują się na podjednostce $G\beta\gamma$, w ten sposób fosducyna może pośrednio chronić α -podjednostkę i w konsekwencji całą cząsteczkę białka G przed degradacją. W

ciemności, po fosforylacji fosducyny i zmniejszeniu jej powinowactwa do podjednostek $G\beta\gamma$ następuje powrót kompleksu białka G do zewnętrznego segmentu pręcika i połączenie z $G\alpha$, gdzie przy braku proteasomów zapewniona jest stabilność białka $G\alpha\beta\gamma$ [55].

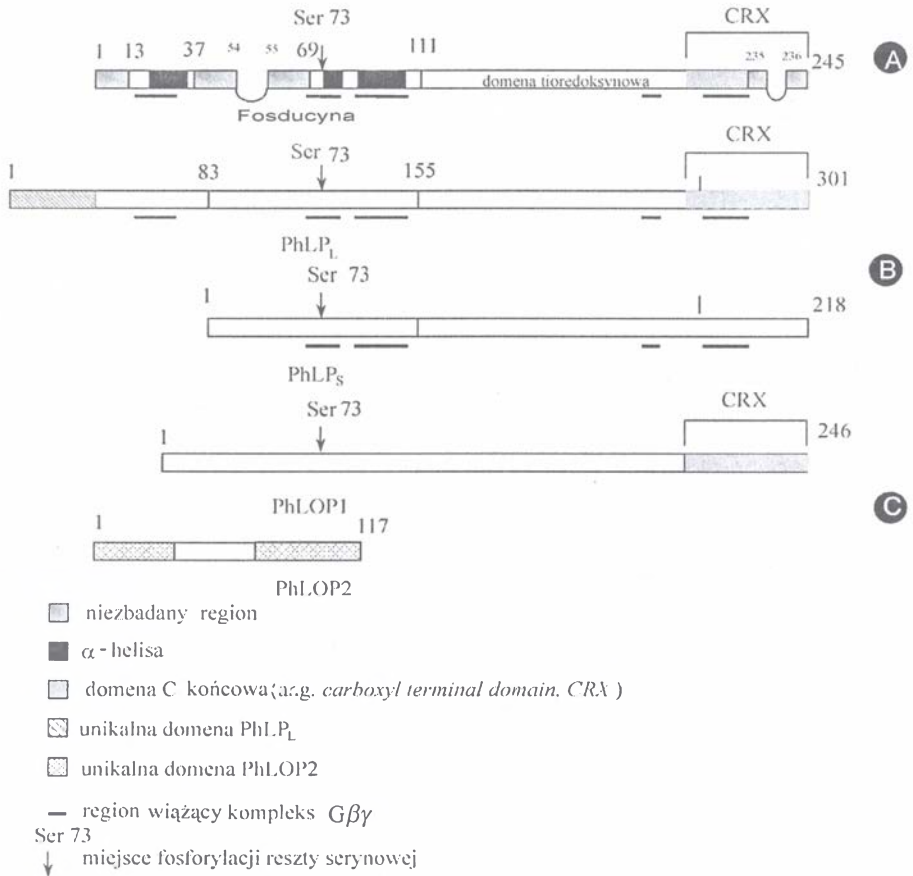
3. IZOFORMY FOSDUCYNY

3.1. Białka podobne do fosducyny

Białka podobne do fosducyny sklonowano jako produkt genu odpowiadającego na stymulację etanolem komórek neuroblastoma [49]. Mają one wysoką homologię sekwencji aminokwasowej do fosducyny oraz, podobnie jak fosducyna, wiążą się z wysokim powinowactwem do podjednostek G, zarówno *in vitro* [64] oraz *in vivo* [71]. Matrycowy RNA, który koduje białka podobne do fosducyny, występuje w dwóch wariantach, konsekwencją czego jest translacja białek różniących się między sobą obecnością lub brakiem 83-aminokwasowego odcinka na N-końcu (ryc. 2). Białka podobne do fosducyny mogą zatem występować w formie krótkiej (ang. *short phosducin-like protein*, $PhdLP_s$) oraz długiej (ang. *long phosducin-like protein*, $PhdLP_L$) [49, 72]. Badania porównawcze wykazały znaczne zróżnicowanie w dystrybucji tych białek w tkankach. W wielu organach $PhdLP_L$ ulega ekspresji na wysokim poziomie, podczas gdy $PhdLP_s$, jeśli w ogóle jest obecne, to występuje w ilościach śladowych [65, 72]. Białka te różnią się między sobą przede wszystkim stopniem powinowactwa do podjednostek $\beta\gamma$ białka G. Forma długa białka podobnego do fosducyny wykazuje 15-krotnie większe powinowactwo niż forma krótka [65]. Prawdopodobnie bezpośrednią przyczyną tego zjawiska jest brak jednej domeny wiążącej $G\beta\gamma$, zlokalizowanej na N-końcu (ryc. 2). Dlatego do niedawna uważano, że $PhdLP_s$ pełni niewielką rolę w regulacji aktywności białek G. Ostatnie doniesienia zaprzeczają jednak przypisywaniu $PhdLP_s$ podrzędnej roli w regulacji aktywności tych białek. Po raz pierwszy, $PhdLP_s$ zostało wyizolowane i oczyszczone z komórek chromochłonnych, gdzie pełni rolę inhibitora stymulowanej przez nikotynę egzocytozy katecholamin z udziałem czynnika 6, rybozylowanego przez $G\beta\gamma$ [22]. Humrich i współpracownicy [29] wykazali, że krótka forma $PhdLP$ wprowadzona do w komórek HEK 293 hamuje indukowaną przez $G\beta\gamma$ syntezę fosforanu inozytolu. Brak 83-aminokwasowego odcinka na N-końcu nie przeszkadza, podobnie jak ma to miejsce w przypadku fosducyny z drożdży, w wiązaniu się $PhdLP_s$ z podjednostką $G\beta\gamma$ i regulowaniu jej aktywności [29].

3.2. Fosforylacja białek podobnych do fosducyny

Funkcje fosducyny, są regulowane przez fosforylację z udziałem białkowych kinaz serynowo-treoninowych, PKA, CaMKII oraz GRK. Fosforylacja fosducyny wiąże się ze zmniejszeniem jej powinowactwa do $G\beta\gamma$ i oddysocjowaniem fosducyny od tego kompleksu. W wyniku tego procesu fosducyna traci zdolność regulacji aktywności



RYCINA 2. Model budowy białek z rodziny fosducyny: A – fosducyna: N-końiec fosducyny zawiera 3 α -helisy z regionami wiązania kompleksu $G\beta\gamma$. C-końiec w swej domenie tioredoksynowej zawiera 5 struktur β oraz trzy brzegowe α -helisy (niezaznaczone na rysunku) z regionem wiążącym kompleks $G\beta\gamma$. B – białka podobne do fosducyny, PhLP_L – forma długa, PhLP_S – forma krótka. PhLP_L ma pięć homologicznych do fosducyny regionów wiążących kompleks $G\beta\gamma$ oraz unikalną dla siebie domenę N-końcową. PhLP_S ma cztery homologiczne regiony wiązania $G\beta\gamma$. W białku tym nie występuje N-końcowa α -helisa fosducyny. C – sieroce białka podobne do fosducyny PhLOP1 – typ pierwszy, PhOP2 – typ drugi

białka G [7, 38, 62, 74, 79]. W przypadku białek podobnych do fosducyny sugerowano analogiczny sposób kontroli ich funkcji, jednak nie udało się tego jednak potwierdzić [62, 72]. Dopiero grupa Humricha [29] wykazała, że w komórkach HEK 293, do których wprowadzano gen kodujący PhdLP_L, białko to ulega specyficznej fosforylacji z udziałem białkowej kinazy kazeinowej typu 2 (CK2). W komórkach tych obecne są obie izoformy fosducyny, PhdLP_L i PhdLP_S i jedynie forma PhdLP_L ulega fosforylacji na N-końcu (Ser-18/Thr-19/Ser-20), gdyż forma krótka, PhdLP_S, pozbawiona jest tego fragmentu. W wyniku fosforylacji następuje redukcja wiązania PhdLP_L do $G\beta\gamma$

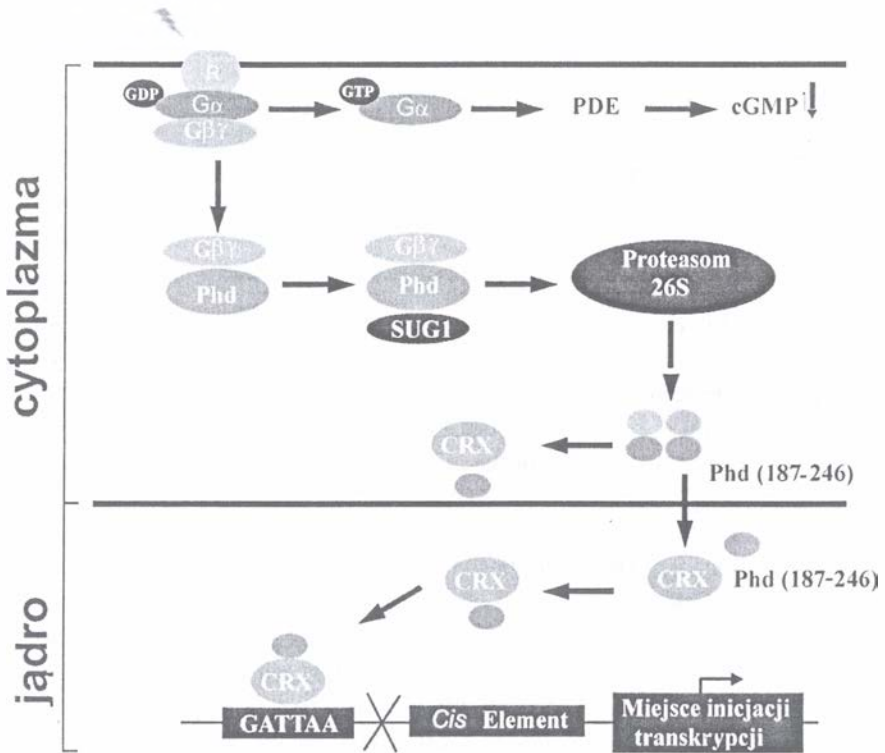
ze wszystkimi tego funkcjonalnymi konsekwencjami, analogicznie jak w przypadku fosducyny. Mutacja, w wyniku której następuje wymiana aminokwasów (Ser-18/Thr-19/Ser-20 na Ala), uniemożliwia fosforylację i powoduje przyłączenie zmutowanej formy PhdLP_L do Gβγ z takim samym powinowactwem jak w przypadku PhdLP_S. Ponadto, forma ufosforylowana PhdLP_L ma częściowo ujemny efekt na hamujące działanie PhdLP_S przy regulacji syntezy fosforanu inozytoli przez Gβγ [28].

3.3. Sieroce białka podobne do fosducyny

Kolejną grupę białek zaliczanych do rodziny fosducyn, a mianowicie sieroce białka podobne do fosducyny PhdLOP1 i PhdLOP2 (ang. *phosducin-like orphan proteins*) zidentyfikowano podczas przeszukiwania biblioteki cDNA z siatkówki oka człowieka [14]. W porównaniu z fosducyną PhdLOP1 charakteryzuje się brakiem 52 reszt aminokwasowych na N-końcu, natomiast C-koniec pozostaje niezmienny. Skrócenie białka na N-końcu w konsekwencji pozbawia PhdLOP1 domeny wiążącej Gβγ. Druga grupa białek, PhdLOP 2, ma znacznie mniejszą homologię sekwencji aminokwasowej do fosducyny (ryc. 2) [14]. Dodatkowo na C-końcu PhdLOP1, podobnie jak w fosducynie i PhdLP, zlokalizowano 60-aminokwasowy polipeptyd, odpowiedzialny za wiązanie się z czynnikiem transkrypcyjnym CRX (ryc. 2) [81]. Ten specyficzny dla komórek fotoreceptorowych czynnik transkrypcyjny wiąże się do miejsca konsensusowego (TAATCC/A) w regionie promotorowym genów kodujących takie białka, jak: opsyna, fosfodiesteraza i arrestyna. Czynnik ten również reguluje różnicowanie i przeżywalność komórek fotoreceptorowych [11, 19, 20]. Obecność domeny wiążącej CRX na C końcu fosducyny i jej homologów może sugerować, że białka te w komórkach fotoreceptorowych mogą pełnić rolę czynników regulujących proces transkrypcji.

4. FOSDUCYNA I JEJ IZOFORMY – REGULATORY PROCESU TRANSKRYPCJI

Pierwsze przesłanki, że fosducyna i jej izoformy mogą regulować proces transkrypcji pojawiły się w 1998 r., kiedy w dwóch niezależnych pracowniach stwierdzono, że Phd i PhdLOP1 mogą łączyć się z p45/SUG1, który stanowi podjednostkę wchodzącą w skład kompleksu proteasomu 26S i ponadto może on pośredniczyć w procesie transkrypcji [6, 80]. Stwierdzono wówczas, że wiązanie z p45/SUG1 ma miejsce na C-końcu PhdLOP1. Dopiero wyniki doświadczeń przeprowadzonych na komórkach COS-7 dostarczyły bezpośrednich dowodów na to, że fosducyna i PhdLOP1 mogą regulować proces transkrypcji [81, 82]. W komórkach tych, do których wprowadzano plazmid z wbudowanym genem fosducyny, zlokalizowano fosducynę w cytoplazmie komórki. Dodatkowo, wprowadzenie do komórek COS-7 czynnika transkrypcyjnego CRX powodowało częściowe przemieszczenie fosducyny do jądra komórkowego. Obserwacje te wykazały ponadto, że fosducyna i PhdLOP1 bezpośrednio mogą



RYCINA 3. Model interakcji fosducyny, z kompleksem SUG1 i CRX, opis w tekście (wg Zhu X., Craft C.M.[81,82], zmienione)

oddziaływać z CRX i każde z tych białek obniża aktywność CRX jako czynnika transkrypcyjnego. Na podstawie tych obserwacji Zhu i Craft [80] zaproponowali model potencjalnego oddziaływania fosducyny z p45/SUG1 i CRX oraz jej udział, jako czynnika kontrolującego transkrypcję (ryc. 3). Fosducyna w formie ufosforylowanej (wolna) lub zdefosforylowanej, tworząca kompleks z Gβγ, reaguje z p45/SUG1 stając się substratem proteasomu 26S. W wyniku procesu degradacji uwalniane są C-końcowe fragmenty cząsteczki fosducyny mogące oddziaływać z CRX zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze komórkowym. Łącząc się z CRX w jądrze, zapobiegają przyłączeniu CRX do miejsca promotorowego i w ten sposób hamują transkrypcję genów [82]. Przypuszczalną rolę fosducyny, jako czynnika regulującego proces transkrypcji, wspomagają ostatnie badania, w których zlokalizowano, po raz pierwszy, fosducynę w jądrze komórek fotoreceptorowych [48]. Fosducyna w tej frakcji komórkowej ulegała fosforylacji przez kinazę zależną od cGMP (PKG).

Badania dotyczące udziału fosducyny jako czynnika kontrolującego proces transkrypcji przeprowadzone były na komórkach, do których wprowadzono gen kodujący fosducynę [80, 81, 82]. Natomiast wyniki otrzymane w doświadczeniach na preparacie z pręcików siatkówki, w których fosducyna ulega naturalnej ekspresji, pozostają w sprzeczności z danymi prezentowanymi przez Zhu i Craft [80, 81, 82]. W

adaptowanych do światła pręcikach siatkówki oka fosducyna nie tworzy stabilnego kompleksu z proteasomem 26S ani z nieproteasomalnym białkiem p45/SUG1, a jej rola po połączeniu z $G\beta\gamma$ ogranicza się, jak sugerują autorzy, do ochrony tego kompleksu przed degradacją w proteasomie [55], co zostało omówione w podrozdziale 2.3.

PODSUMOWANIE

Identyfikacja fosducyny w komórkach fotoreceptorowych siatkówki, a następnie lokalizacja fosducyny w różnych tkankach wskazuje na istnienie rodziny białek, określanych mianem cytozolowych regulatorów aktywności białek G. Najnowsze badania potwierdzają wcześniejsze przypuszczenia, że białka z tej rodziny poprzez zdolność specyficznego wiązania się z podjednostką $\beta\gamma$ heterotrimerycznych białek G, w bardzo szerokim zakresie regulują wewnątrzkomórkowe szlaki przekazywania sygnału z udziałem białek G. Fosducyna i jej izoformy mogą również chronić białka G przed destrukcją w proteasomach, a być może także sprawować kontrolę nad czynnikami transkrypcyjnymi.

LITERATURA

- [1] ABE T, NAKABAYASHI H, TAMADA H, TAKAGI T, SAKURAGI S, YAMAKI K, SHINOHARA T. Analysis of the human, bovine and rat 33 kDa proteins and cDNA in retina and pineal gland. *Gene* 1990; **91**: 209–215.
- [2] ABE T, SATOH N, NAKAJIMA A, KOIZUMI T, TAMADA M, SAKURAGI S. Characterization of a potent uveitopathogenic site derived from rat phosducin. *Exp Eye Res* 1997; **65**: 703–710.
- [3] ABE A, TOMITA H, TAMAI M. Gene expression of the phosducin-like protein in the retina. *Ophthalmic Res* 1998; **30**: 74–83.
- [4] ARA-IWATA F, JACOBSON SG, GASS JD, HOTTA Y, FUJIKI K, HAYAKAWA M, INANA G. Analysis of phosducin as a candidate gene for retinopathies. *Ophthalmic Genet* 1996; **17**: 3–14.
- [5] BABILA T, SCHAAD NC, SIMONDS WF, SHINOHARA T, KLEIN DC. Development of MEKA (phosducin) G beta, G gamma and S-antigen in the rat pineal gland and retina. *Brain Res* 1992; **585**: 141–148.
- [6] BARHITE S, THIBAUT C, MILES MF. Phosducin-like protein (PhLP), a regulator of G beta gamma function, interacts with the proteasomal protein SUG1. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1402**: 95–101.
- [7] BAUER PH, MÜLLER S, PUZICHA M, PIPPIG S, OBERMAIER B, HELMREICH EJM, LOHSE MJ. Phosducin is a protein kinase A-regulated G-protein regulator. *Nature* 1992; **358**: 73–76.
- [8] BAUER PH, LOHSE MJ. Effects of phosducin on the GTPase cycle of Go. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998; **357**: 371–377.
- [9] BOEKHOFF I, TOUHARA K, DANNER S, INGLESE J, LOHSE M, BREER H, LEFKOWITZ J. Phosducin, potential role in modulation of olfactory signaling. *J Biol Chem* 1997; **272**: 4606–4612.
- [10] BROWN BM, CARLSON BL, ZHU X, LOLLEY RN, CRAFT CM. Light-driven translocation of protein phosphatase 2A complex regulates light/dark dephosphorylation of phosducin and rhodopsin. *Biochemistry* 2002; **41**: 13526–13538.
- [11] CHEN S, WANG QL, NIE Z, SUN H, LENNON G, COPELAND NG, GILBERT DJ, JENKINS NA, ZACK DJ. Crx, a novel Otx-like paired homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes. *Neuron* 1997; **19**: 1017–1030.

- [12] CLAPHAM DE, NEER EJ. G protein β subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; **37**: 167–203.
- [13] CRAFT CM, LOLLEY RN, SELDIN MF, LEE RH. Rat pineal gland phosducin: cDNA isolation, nucleotide sequence, and chromosomal assignment in the mouse. *Genomics* 1991; **10**: 400–409.
- [14] CRAFT CM, XU J, SLEPAK VZ, ZHAN-POE X, ZHU X, BROWN B, LOLLEY RN. PhLPs and PhLOPs in the phosducin family of G $\beta\gamma$ binding proteins. *Biochemistry* 1998; **37**: 15758–15772.
- [15] DANNER S, LOHSE MJ. Phosducin is ubiquitous G-protein regulator. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 10145–10150.
- [16] FABCZAK H., SOBIERAJSKA K., GROSZYŃSKA B, FABCZAK S. Phosducin homologue is present in *Blepharisma japonicum*. XXXIX Konferencja P.T. Bioch. Gdańsk 2003.
- [17] FLANARY PL, DIBELLO PR, ESTRADA P, DOHLMAN HG. Functional analysis of Plp1 and Plp2, two homologues of phosducin in yeast. *J Biol Chem* 2000; **275**: 18462–18469.
- [18] FREEDMAN NJ, LEFKOWITZ RJ. Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Prog Horm Res* 1996; **51**: 319–353.
- [19] FREUND CL, GREGORY-EVANS CY, FURUKAWA T, PAPAIOANNOU M, LOOSER J, PLODER J, BELLINGHAM J, NG D, HERBRICK JA, DUNCAN A, SCHERER L, TSUI LC, LOUTRADIS-ANAGNOSTOU A, JACOBSON SG, CEPKO CL, BHATTACHARYA SS, MCINNES RR. Cone-rod dystrophy due to mutations in a novel photoreceptor specific homeobox gene (CRX) essential for maintenance of the photoreceptor. *Cell* 1997; **91**: 543–553.
- [20] FURAKAWA T, MORROW EM, CEPKO CL. Crx a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell* 1997; **91**: 531–541.
- [21] GARZÓN J, RODRIGEZ-DIAZ M, LOPEZ-FANDO A, GARCIA-ESPANA A, SANCHEZ-BLAZQUEZ P. Glycosylated phosducin-like protein long regulates opioid receptor function in mouse brain. *Neuropharmacology* 2002; **42**: 813–828.
- [22] GAUDET R, BOHM A, SIGLER PB. Crystal structure at 2.4 Å resolution of the complex of transducin and its regulators, phosducin $\beta\gamma$ subunits of G-proteins. *Cell* 1996; **87**: 577–588.
- [23] GAUDET R, SAVAGE JR, MCLAUGHLIN JN, WILLARDSON BM, SIGLER PB. A molecular mechanism for the phosphorylation-dependent regulation of heteromeric G proteins by phosducin. *Mol Cell* 1999; **3**: 649–660.
- [24] GEN SSE M, VITALE N, CHASSEROT-GOLAZ S, BADER MF. Regulation of exocytosis in chromaffin cells by phosducin-like protein, a protein interacting with G protein betagamma subunits. *FEBS Lett* 2000; **480**: 184–188.
- [25] GORCZYCA WA. Role of calcium ions in vertebrate phototransduction. *Pol J Pharmacol* 1999; **51**: 167–172.
- [26] GROPP KE, HUANG JC, AGIURE GD. Differential expression of photoreceptor-specific proteins during disease and degeneration in the progressive rod-cone degeneration (*prcd*) retina. *Exp Eye Res* 1996; **64**: 875–886.
- [27] HAWES BE, TOUHARA K, KUROSE H, LEFKOWITZ RJ, INGLESE J. Determination of the G $\beta\gamma$ -binding domain of phosducin, A regulatable modular of G $\beta\gamma$ signaling. *J Biol Chem* 1994; **269**: 29825–29830.
- [28] HEKMAN M, BAUER P, SCHÖHLEMANN R, LOHSE MJ. Phosducin inhibits receptor phosphorylation by the beta-adrenergic receptor kinase in a PKA-regulated manner. *FEBS Lett* 1994; **343**: 120–124.
- [29] HUMRICH J, BERMEL C, GRÜBEL T, QUITTERER U, LOHSE MJ. Regulation of phosducin-like protein by casein kinase 2 and N-terminal splicing. *J Biol Chem* 2003; **278**: 4474–4481.
- [30] JINDROVA H, DETWILER PB. Cyclic AMP has no effect on the generation, recovery, or background adaptation of light responses in functionally intact rod outer segments: with implications about the function of phosducin. *Vis Neurosci* 2000; **17**: 887–892.
- [31] JONES DH, LEY S, AITKEN A. Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers *in vivo* and *in vitro*: implications for function as adapter proteins. *FEBS Lett* 1995; **368**: 55–58.
- [32] KASAHARA S, WANG P, NUSS DL. Identification of *bdm-1*, a gene involved in G protein beta-subunit function and alpha-subunit accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 412–417.
- [33] KUO CH, TANIURA H, WATANABE Y, FUKADA Y, YOSHIZAWA T, MIKI N. Identification of a retina-specific MEKA protein as a 33 K protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **162**: 1063–1068.
- [34] KUO C H, TAIRA E, TAKAHA, SOHMA H, AKINO T, FUKADA Y, SANADA K, MIKI N. Purification and characterization of three MEKA-like proteins in liver: association of a 94 kDa protein with $\beta\gamma$ subunits of G-proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **191**: 1097–1104.
- [35] LEE RH, BROWN BM, LOLLEY RN. Light induced dephosphorylation of 33 kDa protein in rod outer segments of rat retina. *Biochemistry* 1984; **23**: 1972–1977.

- [36] LEE RH, LIEBERMAN BS, LOLLEY RN. A novel complex form, bovine visual cells of 33 000-dalton phosphoprotein with β - and γ -transducin: purification and subunit structure. *Biochemistry* 1987; **26**: 3983–3990.
- [37] LEE RH, FLOWE A, MCGINNIS JF, LOLLEY RN, CRAFT CM. Amino acid and cDNA sequences of bovine phosducin, a soluble phosphoprotein from photoreceptor cells. *J Biol Chem* 1990; **265**: 15867–15873.
- [38] LEE RH, BROWN BM, LOLLEY RN, HO YK. Protein kinase A phosphorylates retinal phosducin on serine 73 *in situ*. *J Biol Chem* 1990; **265**: 15860–15866.
- [39] LEE RH, LIEBERMAN BS, LOLLEY RN. Retinal accumulation of the phosducin. β and γ transducin complexes in developing normal mice and in mice and dogs with inherited retinal degeneration. *Exp Eye Res* 1990; **51**: 325–333.
- [40] LEE RH, BROWN BM. Phosphoprotein phosphatases of bovine retinas: purification and characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; **32**: 1894.
- [41] LEE RH, TING TD, LIEBERMAN BS, TOBIAS DE, LOLLEY RN, HO YK. Regulation of retinal cGMP cascade by phosducin and transducin. *J Biol Chem* 1992; **267**: 25104–25112.
- [42] LEMMON MA, FERGUSON KM, SCHLESSINGER J. PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface. *Cell* 1996; **85**: 621–624.
- [43] LIU D, BIENKOWSKA J, PETOSA C, COLLIER RJ, FU H, LIDDINGTON R. Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature* 1995; **376**: 191–194.
- [44] LOEW A, HO YK, BLUNDELL T, BAX B. Phosducin induces a structural change in transducin $\beta\gamma$. *Structure* 1998; **6**: 1007–1019.
- [45] LOPEZ P, YAMAN R, LOPEZ-FERNANDEZ LA, VIDAL F, PUEL D, CLERTANT P, CUZIN F, RASSOULZADEGAN M. A novel germ line-specific gene of the phosducin-like protein (PhLP) family. *J Biol Chem* 2003; **278**: 1751–1757.
- [46] McLAUGHLIN JN, THULIN CD, BRAY SM, MARTIN MM, ELTON TS, WILLARDSON BM. Regulation of angiotensin II-induced G protein signaling by phosducin-like protein. *J Biol Chem* 2002; **277**: 34885–34895.
- [47] McLAUGHLIN JN, THULIN CD, HART SJ, RESING KA, AHN NG, WILLARDSON BM. Regulatory interaction of phosducin-like protein with the cytosolic chaperonin complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 7962–7967.
- [48] MARGULIS A, DANG L, PULUKURI S, LEE R, SITARAMAYYA A. Presence of phosducin in the nuclei of bovine retinal cells. *Mol Vis* 2002; **19**: 477–482.
- [49] MILES MF, BARHITE S, SGANGA M, ELLIOTT M. Phosducin like protein: an ethanol-responsive potential modulator of guanine nucleotide binding protein function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 10831–10835.
- [50] MURRAY D, McLAUGHLIN S, HONIG B. The role of electrostatic interactions in the regulation of the membrane association of G protein $\beta\gamma$ heterodimers. *J Biol Chem* 2001; **276**: 45153–45159.
- [51] MUSLIN AJ, TANNER JW, ALLEN PM, SHAW AS. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* 1996; **84**: 889–897.
- [52] MÜLLER S, STRAUB A, BAUER PH, LOHSE MH. Interactions of phosducin with defined G protein $\beta\gamma$ -subunits. *J Biol Chem* 1996; **271**: 11781–11788.
- [53] NAKANO K, CHEN J, TARR GE, YOSHIDA T, FLYNN JM, BITENSKY MW. Rethinking the role of phosducin: Light-regulated binding of phosducin to 14-3-3 in rod inner segments. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 4693–4698.
- [54] OBIN MS, JAHNGEN-HODGE J, NOWELL T, TAYLOR A. Ubiquitinylation and ubiquitin-dependent proteolysis in vertebrate photoreceptors (rod outer segments). Evidence for ubiquitinylation of Gt and rhodopsin. *J Biol Chem* 1996; **271**: 14473–14484.
- [55] OBIN MS, LEE BY, MEINKE G, BOHM A, LEE RH, GAUDET R, HOPP JA, ARSHAVSKY VY, WILLARDSON BM, TAYLOR A. Ubiquitylation of the transducin betagamma subunit complex. Regulation by phosducin. *J Biol Chem* 2002; **277**: 44566–44575.
- [56] PAGH-ROEHL K, LIN D, BURNSIDE B. Phosducin and PP33 are *in vivo* targets of PKA and Type 1 or 2A phosphatases, regulators of cell elongation in teleost rod inner-outer segments. *J Neurosci* 1995; **15**: 6475–6488.
- [57] PICKART CM. Ubiquitin and the Biology of the Cell. Peters J-M, Harris JR, Finley D (eds) *Plenum Press New York* 1998; 19–63.

- [58] PREMONT RT, INGLESE J, LEFKOWITZ RJ. Protein kinase that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *FASEB J* 1995; **9**: 175–182.
- [59] PUGH E N jr., LAMB T D. Amplification and kinetics of the activation steps in phototransduction. *Biochim Biophys Acta* 1993; **1411**: 111–149.
- [60] REIG JA, YU L, KLEIN DC. Pineal transduction, Adrenergic-cyclic AMP-dependent phosphorylation of cytoplasmic 33 kDa protein (MEKA) which binds $\beta\gamma$ -complex of transducin. *J Biol Chem* 1990; **265**: 5816–5824.
- [61] OSEBOOM PH, WELLER JL, BABILA T, AITKEN A, SELLERS LA, MOFFETT JR, NAMBOODIRI MA, KLEIN DC. Cloning and characterization of the epsilon and zeta isoforms of the 14-3-3 proteins. *DNA Cell Biol* 1994; **13**: 629–640.
- [62] RUIZ-GÓMEZ A, HUMRICH J, MURGA C, QUITTERER U, LOHSE MJ, MAJOR FJR. Phosphorylation of phosducin and phosducin-like protein by G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2). *J Biol Chem* 2000; **275**: 29724–29730.
- [63] SATOH N, ABE T, NAKAJIMA A, OHKOSHI M, KOIZUMI T, TAMADA M, SAKURAGI S. Analysis of uveitogenic sites in phosducin molecule. *Curr Eye Res* 1998; **17**: 677–680.
- [64] SCHRÖDER S, LOHSE MJ. Inhibition of G-protein $\beta\gamma$ -subunit functions by phosducin-like protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 2100–2104.
- [65] SCHRÖDER S, LOHSE MJ. Quantification of the tissue levels and function of the G-protein regulator phosducin-like protein (PhLP). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2000; **362**: 435–439.
- [66] SCHULZ R, WEHMEYER A, SCHULZ K, MURPHY J. Effect of phosducin on opioid receptor function. *J Pharmacol Exp Ther* 1999a; **289**: 599–606.
- [67] SCHULZ R, WEHMEYER A, MURPHY J, SCHULZ K. Phosducin, β -arrestin and opioid receptor migration. *Eur J Pharmacol* 1999b; **375**: 349–357.
- [68] SOKOLOV M, LYUBARSKY AL, STRISSEL KJ, SAVCHENKO AB, GOVARDOVSKII VI, PUGH EN JR, ARSHAVSKY VY. Massive light-driven translocation of transducin between the two major compartments of rod cells: a novel mechanism of light adaptation. *Neuron* 2002; **34**: 95–106.
- [69] TANAKA H, KUO C-H, MATSUDA T, FUKADA Y, HAYASHI F, DING Y, IRIE Y, MIKI N. MEKA/phosducin attenuates hydrophobicity of transducin $\beta\gamma$ subunits without binding to farnesyl moiety. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **223**: 587–591.
- [70] TANAKA H, IWAM C, KUO C-H, DING Y, DO E, IRIE Y, MIKI N. Analysis of the T $\beta\gamma$ binding domain of MEKA/phosducin. *Neurochem Int* 1997; **31**: 625–634.
- [71] THIBAUT C, SGANGA MW, MILES MF. Interaction of phosducin-like protein with G protein β subunits. *J Biol Chem* 1997; **272**: 12253–12256.
- [72] THIBAUT C, FENG WANG J, CHARNAS R., MIREL D, BARHITE S, MILES MF. Cloning and characterization of the rat and human phosducin-like protein genes: Structure, expression, and chromosomal localization. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1444**: 346–354.
- [73] THULIN CD, HOWES K, DRISCOLL CD, RAND TA, BAEHR W, WILLARDSON BM. The immunolocalization and divergent roles of phosducin and phosducin-like protein in the retina. *Mol Vis* 1999; **5**: 40–49.
- [74] THULIN CD, SAVAGE JR, MCLAUGHLIN JN, TRUSCOTT SM, OLD WM, AHN NG, RESING KA, HAMM HE, BITENSKY MW, WILLARDSON BM. Modulation of the G protein regulator phosducin by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation and 14-3-3 protein binding. *J Biol Chem* 2001; **276**: 23805–23815.
- [75] WILKINS JF, BITENSKY MW, WILLARDSON BM. Regulation of the kinetics of phosducin phosphorylation in retinal rods. *J Biol Chem* 1996; **271**: 19232–19237.
- [76] WILLARDSON BM, WILKINS JF, YOSHIDA T, BITENSKY MW. Regulation of phosducin phosphorylation in retinal rods by Ca²⁺/calmodulin-dependent adenyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 1475–1479.
- [77] XU J, WU D, SLEPAK VZ, SIMON MI. The N terminus of phosducin is involved in binding of $\beta\gamma$ -subunits of G-protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 2086–2090.
- [78] YAFFE MB, RITTINGER K, VOLINIA S, CARON PR, AITKEN A, LEFFERSEN H, GAMBLIN SJ, SMERDON SJ, CANTLEY LC. The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity. *Cell* 1997; **91**: 961–971.

- [79] YOSHIDA T, WILLARDSON BM, WILKINS JF, JENSEN GJ, THORNTON BD, BITENSKY MW. The phosphorylation state of phosducin determines its ability to block transducin subunit interaction and inhibits transducin binding to activated rhodopsin. *J Biol Chem* 1994; **269**: 24050–24057.
- [80] ZHU X, CRAFT CM. Interaction of phosducin and phosducin isoforms with a 26S proteasomal subunit, SUG1. *Mol Vis* 1998; **4**: 13.
- [81] ZHU X, CRAFT CM. The carboxyl terminal domain of phosducin functions as a transcriptional activator. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **270**: 504–509.
- [82] ZHU X, CRAFT CM. Modulation of CRX transactivation activity by phosducin isoforms. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 5216–5226.

Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska

Otrzymano: 02.06.2003 r.

Przyjęto: 21.07.2003 r.

ul. Pasteura 3, 02093 Warszawa.

e-mail: h.fabczak@nencki.gov.pl

MECHANIZM DZIAŁANIA PROLAKTYNY W JAJNIKU DOJRZAŁYCH PŁCOWO ŚWIŃ*

MECHANISM OF PROLACTIN ACTION IN OVARY OF SOWS

Renata CIERESZKO

Katedra Fizjologii Zwierząt, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Streszczenie: Prolaktyna (PRL) jest jednym z ważnych czynników regulujących steroidogenezę w komórkach ciała żółtego i pęcherzyka jajnikowego świni. Hormon ten stymuluje produkcję progesteronu przez komórki lutealne pochodzące z pierwszych trzech dni cyklu rujowego oraz komórki osłonki wewnętrznej izolowane z dużych pęcherzyków jajnikowych. Wpływa także na pęcherzykową produkcję estrogenów. Receptory PRL są obecne w komórkach ciała żółtego i komórkach osłonki wewnętrznej jajnika świni. Wyniki dotychczasowych badań wskazują na istnienie więcej niż jednego szlaku przekazywania sygnału indukowanego przez prolaktynę. Wewnątrzkomórkowy mechanizm działania PRL w komórkach steroidogennych jajnika świni obejmuje, między innymi, aktywację szlaku kinazy białkowej C (PKC) i szlaku niereceptorowych kinaz tyrozynowych (NRPTK). W transdukcji sygnału prolaktynowego w komórkach jajnika świni zaangażowane są również fosfatazy białkowe.

Słowa kluczowe: prolaktyna, świnia, ciało żółte, pęcherzyk jajnikowy, steroidogeneza, kinaza białkowa C, kinazy tyrozynowe, fosfatazy, transdukcja sygnału.

Summary: Prolactin (PRL) is one of the factors involved in controlling luteal and follicular steroidogenesis in sows. PRL stimulates progesterone production by luteal cells during the early luteal phase of the estrous cycle and by theca cells from large follicles. PRL affects also follicular production of estrogens. Prolactin receptors are present in both luteal and theca cells of porcine ovaries. Available data suggest that prolactin signaling in ovarian steroidogenic cells in pigs involves more than one intracellular pathway. Transduction of PRL signal in porcine luteal and theca cells includes protein kinase C and nonreceptor tyrosine kinases pathways. It appears that protein phosphatases are also involved in PRL signaling in steroidogenic cells of porcine ovaries.

Key words: prolactin, sow, *corpus luteum*, follicle, steroidogenesis, protein kinase C, tyrosine kinases, phosphatases, signal transduction.

*Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych, projekty badawcze nr 5P06D 048 14 i 02060.205.

WSTĘP

Prolaktyna (PRL) jest hormonem białkowym zbudowanym u świni ze 198 aminokwasów (masa cząsteczkowa: 22 400 Da). Głównym miejscem wytwarzania PRL są kwasochłonne komórki laktotropowe przedniego płata przysadki. Prolaktyna może też być wytwarzana poza przysadką [4]. Receptory prolaktynowe (PRL-R) wykryto w wielu tkankach samic i samców, w tym także tkankach układu rozrodczego [7].

Prolaktyna jest hormonem o działaniu ogólnoustrojowym, uczestniczącym w regulacji licznych i zróżnicowanych procesów fizjologicznych u kręgowców. Najwcześniej i najlepiej poznaną funkcją PRL jest stymulacja rozwoju gruczołu mlekowego oraz zapoczątkowanie i podtrzymanie laktacji u ssaków. W jajniku ssaków, PRL m.in. wpływa na aktywność steroidogeniczną komórek pęcherzyka jajnikowego i ciała żółtego. U mięsożernych jest uważana za główny składnik kompleksu luteotropowego [7, 12, 25, 58].

W cyklu rujowym świni można wyróżnić dwa okresy charakteryzujące się podwyższoną koncentracją PRL w osoczu krwi:

- 1) okres okołooowulacyjny i wczesna faza lutealna: 0–1 dzień cyklu;
- 2) wczesna faza pęcherzykowa: 16–17 dzień cyklu [26].

Wysokie poziomy PRL w okresie okołooowulacyjnym mogą być związane z udziałem tego hormonu w procesie luteinizacji oraz jego rolą luteotropową. Wskazują także na związek PRL z behawioralnymi objawami rui. Ponadto stwierdzono, że krycie loch w okresie rui indukuje wyrzut prolaktyny [54]. Fizjologiczna rola podwyższonych poziomów PRL w okresie fazy pęcherzykowej cyklu rujowego świni nie została do tej pory wyjaśniona.

WPŁYW PRL NA STEROIDOGENEZĘ KOMÓREK LUTEALNYCH

Faza lutealna

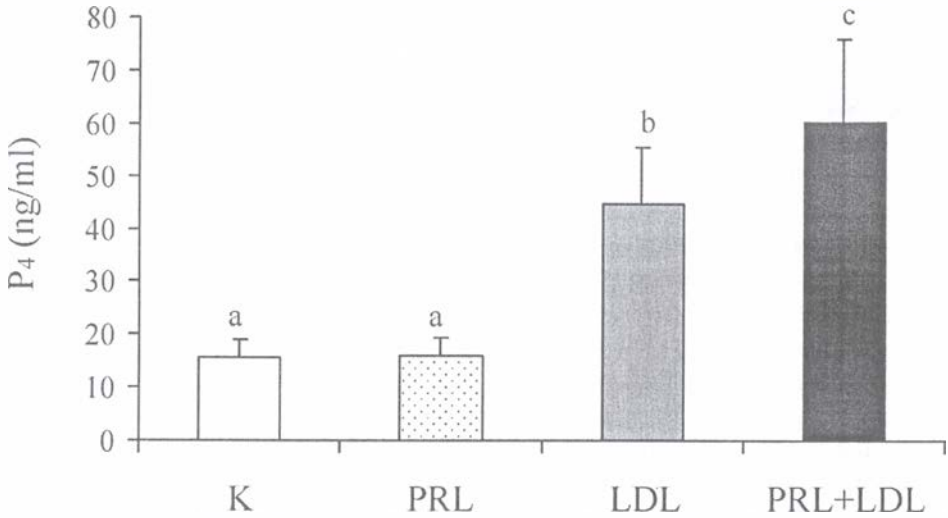
Luteinizacja jest procesem powstawania ciała żółtego zapoczątkowanym przez przedowulacyjny wyrzut hormonu luteinizującego (LH). W czasie luteinizacji komórki ściany pęcherzyka jajnikowego, tj. komórki ziarniste i osłonki wewnętrznej przekształcają się w komórki lutealne wchodzące w skład ciała żółtego. Proces ten zachodzi w pierwszych dniach fazy lutealnej cyklu rujowego, a jego regulacja jest kompleksowa. Jednym z czynników kontrolujących powstanie i funkcjonowanie wczesnego ciała żółtego u świni jest PRL. Luteotropowe działanie prolaktyny stwierdzono we wczesnej fazie lutealnej cyklu rujowego [13, 16, 38, 72] oraz w drugiej połowie ciąży [43, 62, 75]. Prolaktyna stymulowała produkcję progesteronu (P_4) przez komórki lutealne izolowane z ciałek żółtych pochodzących z pierwszych trzech dni cyklu rujowego świni [16, 17, 38]. Stymulacja produkcji P_4 przez PRL miała miejsce

przede wszystkim w dużych komórkach lutealnych [39]. Ujawnienie się luteotropowego wpływu PRL w warunkach *in vitro* wymaga dodania do medium substratu dla produkcji hormonów steroidowych, np. lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) [16] lub surowicy cielęcej [38]. Dodanie LDL do inkubowanych komórek wczesnolutealnych powoduje wzrost sekrecji P_4 , a wpływ ten jest potęgowany przez PRL (ryc. 1) [16]. Badania Rajkumar i współpracowników [62] wykazały, że PRL zwiększa wykorzystanie lipoprotein przez komórki lutealne ciężarnych loch oraz stymuluje wiązanie i degradację LDL w luteinizujących komórkach ziarnistych świń [64]. Wyniki te wskazują, że w okresie wczesnej fazy lutealnej i ciąży PRL wchodzi w skład kompleksu luteotropowego u świń, zwiększając prawdopodobnie dostępność substratu niezbędnego do syntezy P_4 .

Luteotropowy wpływ PRL u świń potwierdzono również w doświadczeniach *in vivo*. Dożylnie podawanie PRL w okresie fazy wczesnolutealnej podwyższało poziomy P_4 w osoczu krwi loch. Wzrost osoczowej koncentracji P_4 obserwowany był tylko wtedy, kiedy iniekcję PRL rozpoczynano 24–48 godzin po przedowulacyjnym pikie LH [13]. Wykazano też, że PRL podawana *in vivo* w okresie poowulacyjnym stymulowała podwyższoną produkcję P_4 przez ciała żółte w warunkach *in vitro* [19].

Stymulujący wpływ PRL na lutealną produkcję P_4 wydaje się być ograniczony tylko do pierwszych trzech dni cyklu rujowego świń. W komórkach lutealnych pochodzących z 5. i 13. [61], jak również 8. do 10. dnia [38] cyklu rujowego świń nie obserwowano luteotropowego działania PRL. Podobnie, badania *in vivo* wykazały, że iniekcje PRL rozpoczynane na przełomie trzeciej i czwartej doby od przedowulacyjnego pikie LH nie podwyższały poziomów P_4 w osoczu loch [13]. Nie stwierdzono również zmiany w poziomach P_4 w osoczu świń, którym prolaktynę [29] lub inhibitor jej uwalniania [28] podawano w okresie późnej fazy lutealnej (13. lub 14. dzień cyklu).

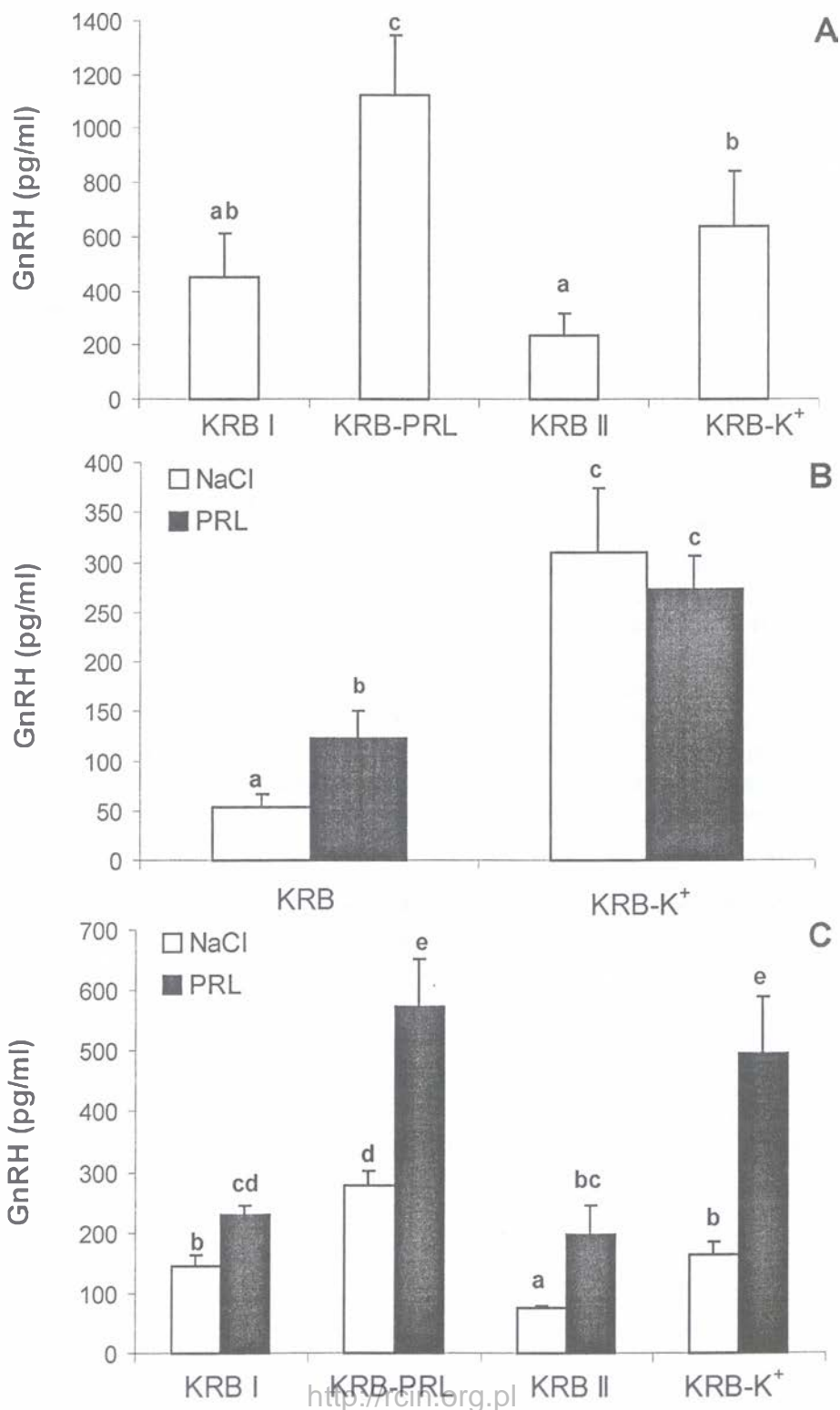
Wrażliwość tkanki lutealnej na PRL jest prawdopodobnie warunkowana przez szereg czynników hormonalnych działających zarówno przed luteinizacją, jak i w jej trakcie. Wydaje się, że warunkiem luteotropowego wpływu PRL w okresie poowulacyjnym u świń może być wcześniejsze działanie na ciało żółte hormonu luteinizującego lub estradiolu (E_2). Koncepcję tę potwierdza potęgowanie przez PRL stymulującego wpływu LH na syntezę P_4 w komórkach lutealnych ciężarnych loch [62]. Ponadto, preinkubacja luteinizujących komórek ziarnistych świń z hCG powiększała stymulowaną przez prolaktynę produkcję P_4 [10, 64], a ich ekspozycja na E_2 potęgowała wpływ PRL na wykorzystanie lipoprotein [63]. Stwierdzono również, że E_2 stymulował powstawanie miejsc wiążących PRL w komórkach ziarnistych świń [44]. Z drugiej strony sama PRL może zmieniać reaktywność komórek lutealnych na inne składniki kompleksu luteotropowego u świń. Dożylnie podanie PRL w okresie okołoowulacyjnym powodowało wzrost liczby receptorów LH w ciałkach żółtych [19]. Podobne wyniki uzyskano w doświadczeniach przeprowadzonych na szczurach (cytowane za [11]). Do potencjalnych czynników regulujących funkcjonowanie ciałek żółtych zaliczyć też można FSH [60] oraz działające lokalnie: oksytocynę, czynniki wzrostu i prostaglandyny. Jednak ich funkcja luteotropowa, a szczególnie kooperacja z prolaktyną nie jest wyjaśniona.



RYCINA 1. Wpływ prolaktyny (PRL) i lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) na produkcję progesteronu (P_4) przez komórki lutealne uzyskane z jajników w 1–3 dniu cyklu rujowego świni ($n=7$). Komórki lutealne (50 000/ml) inkubowano (8 godzin, 37°C, M199) tylko w obecności medium (K) oraz z LDL (140 μ g cholesterolu) i/lub PRL (200 ng). Różne oznaczenia literowe oznaczają statystycznie istotne różnice ($p<0,05$) między poszczególnymi grupami (reprodukowana za zgodą Towarzystwa Biologii Rozrodu z pracy Ciereszko i wsp. [18]: 63–83)

Stymulacyjny wpływ PRL na produkcję P_4 przez komórki lutealne wykazany w badaniach *in vitro* [16, 17, 38, 39] oraz obecność receptorów PRL w tych komórkach [9, 70] sugerują bezpośredni wpływ tego hormonu na jajnik świni. Jednak istnieją także dane wskazujące na pośrednie działanie PRL przez podwzgórze i przysadkę. Tę ostatnią hipotezę potwierdzają wyniki badań *in vitro*, w których PRL stymuluje uwalnianie GnRH z eksplantów podwzgórzowych świni (ryc. 2). PRL indukuje także zmianę reaktywności komórek przysadki na GnRH powodując zwiększone wydzielanie

RYCINA 2 (na sąsiedniej stronie). Wpływ PRL na uwalnianie GnRH przez eksplanty podwzgórzowe (wyniosłość pośrodkowa) świni. A – PRL i jony potasu (KRB-K⁺; kontrola pozytywna) stymulowały *in vitro* uwalnianie GnRH przez podwzgórze świni ($n=7$); B – PRL podawana *in vivo* (PRL) powodowała zwiększone *in vitro* uwalnianie GnRH w porównaniu ze zwierzętami otrzymującymi płyn fizjologiczny (NaCl; $n=5$); C – Dodanie PRL do inkubacji zawierających eksplanty podwzgórzowe świni potęgowało stymulujący wpływ PRL podanej *in vivo* na uwalnianie GnRH w porównaniu ze zwierzętami otrzymującymi płyn fizjologiczny (NaCl; $n=6$). Eksplanty preinkubowano przez 30 minut (95% O₂ + 5% CO₂, 37°C) w buforze Krebsa-Ringera (A i C – KRB I oraz B – KRB; podstawowa produkcja GnRH). Kolejne trzydziestominutowe inkubacje wykonywano najpierw w obecności PRL (KRB-PRL; 200 ng), a potem jonów potasu (KRB-K⁺; 56 mM). Pomiędzy inkubacjami z PRL i jonami potasu przeprowadzano inkubacje z buforem (KRB II). Różne oznaczenia literowe oznaczają statystycznie istotne różnice ($p<0,05$) między poszczególnymi grupami (reprodukowana za zgodą Elsevier z pracy Ciereszko i wsp. [19]: 99–115)



LH [19]. Dodanie hCG do medium inkubacyjnego zawierającego komórki lutealne świni pobudzało produkcję P_4 . [19]. Stymulujący wpływ PRL na lutealną produkcję P_4 może więc być wypadkową jej bezpośredniego oddziaływania na komórki ciała żółtego oraz aktywacji osi podwzgórze-przysadka-jajnik.

Luteoliza

Luteoliza jest procesem regresji ciała żółtego. Kończy ona fazę lutealną cyklu rujowego, poprzedzając fazę pęcherzykową. W wyniku działania prostaglandyny $F_{2\alpha}$, gwałtownie obniża się poziom P_4 w osoczu krwi (luteoliza funkcjonalna). Następuje regresja naczyń krwionośnych i zanik tkanki endokrynnej ciała żółtego oraz łącznotkankowy przerost gruczołu (luteoliza strukturalna). Wcześniejsze prace wykazały, że w okresie obniżania się poziomu P_4 we krwi obwodowej obserwuje się równoległy wysoki poziom PRL. Mogło to sugerować, że prolaktyna u świń – podobnie jak jest to u szczurów – bierze udział w regresji ciała żółtego (cytowane za [12]). Tymczasem bardziej szczegółowe doświadczenia, oparte na częstym pobieraniu krwi z żyły maciczno-jajnikowej, wykazały, że spadek P_4 pojawia się wcześniej niż wysoki poziom PRL [30]. Oznacza to, że PRL nie może być odpowiedzialna za luteolizę funkcjonalną, nie wyklucza jednak udziału PRL w luteolizie strukturalnej. Ponadto, już w czasie obniżania się osoczowych poziomów P_4 u świni zaobserwowano, że puls PRL i $PGF_{2\alpha}$ występują synchronicznie [30]. Istota zależności między prolaktyną, prostaglandyną i luteolizą nie jest jednak wyjaśniona i wymaga dalszych badań.

W okresie okołoluteolitycznym u świń obserwuje się także obniżenie osoczowej koncentracji androgenów i estrogenów [14]. Przyczyną tego zjawiska może być nagłe zmniejszenie ilości substratu (P_4) dla dalszych etapów steroidogenezy. Nie jest jednak wykluczone, że może mieć ono związek z podwyższonym poziomem PRL obserwowanym w tym okresie.

WPLYW PRL NA STEROIDOGENEZĘ KOMÓREK PĘCHERZYKOWYCH

W doświadczeniach przeprowadzonych na steroidogennych komórkach pęcherzyka jajnikowego większości gatunków zwierząt obserwuje się stymulujący wpływ PRL na produkcję P_4 oraz hamujący wpływ tego hormonu na aromatazę jajnikową i produkcję estrogenów (cytowane za [12, 17, 73]).

U świń, stymulujące działanie prolaktyny na produkcję P_4 obserwowano w komórkach ziarnistych pochodzących ze średnich (4–6 mm) oraz dużych (>6 mm) pęcherzyków jajnikowych [17, 73]. Hamujący wpływ PRL na produkcję P_4 został stwierdzony jedynie w komórkach ziarnistych izolowanych z małych (1–2 mm), niedojrzałych pęcherzyków jajnikowych [78]. Wydaje się, że reaktywność komórek ziarnistych na PRL zależy m.in. od estradiolu. Stwierdzono, że estradiol powodował zwiększenie liczby receptorów PRL [44]. Ponadto, wcześniejsza ekspozycja komórek

ziarnistych na E_2 potęgowała stymulujący wpływ PRL na sekrecję P_4 [63, 78]. Działanie podobne do estradiolu wykazywał także LH [10] i lipoproteiny osoczowe [63]. Ostatnio stwierdzono, że bardzo niskie dawki PRL (12,5 ng/ml) zwiększały wiązanie FSH i produkcję P_4 przez komórki ziarniste pochodzące z małych pęcherzyków jajnikowych świnii [60].

Komórkami wrażliwymi na prolaktynę okazały się również komórki osłonki wewnętrznej pęcherzyka jajnikowego świnii. Stymulujący wpływ PRL na produkcję P_4 przez te komórki wykazano w obecności surowicy cielęcej [42, 70, 71] oraz hydrokortyzonu, transferyny i insuliny [53]. Prolaktyna zwiększała także produkcję P_4 w komórkach osłonki inkubowanych w medium niezawierającym żadnych dodatków ([20]. Podobne działanie PRL opisano dla kokultur komórek ziarnistych i osłonki wewnętrznej [73]. Stwierdzono również, że PRL powoduje reorganizację tubuliny i aktywny wpływając na depolimeryzację mikrotubul i mikrofilamentów w komórkach osłonki wewnętrznej świnii. Efektem takiego działania PRL jest zbliżenie się organelli komórkowych do siebie i wzmożenie steroidogenezy [40].

Wielokrotne iniekcje PRL do żyły szyjnej wewnętrznej loch [31] lub loszek [29] przeprowadzone w fazie pęcherzykowej cyklu rujowego nie spowodowały zmian w osoczowych poziomach P_4 . Przyczyny rozbieżności między wynikami badań *in vitro* i *in vivo* nie są jasne. Możliwe, że działanie PRL na produkcję P_4 przez komórki pęcherzyka jajnikowego świnii w omawianym okresie cyklu ma znaczenie lokalne i nie jest widoczne w krążeniu ogólnym.

Wyniki badań dotyczących wpływu PRL na pęcherzykową sekrecję estrogenów są niejednoznaczne. Stokłowska i współpracownicy opisali wzrost akumulacji E_2 w mediach uzyskanych po hodowli komórek ziarnistych [38] i osłonki wewnętrznej [71, 73] z prolaktyną. Nie zauważono jednak stymulującego wpływu PRL na produkcję E_2 przez kokultury komórek ziarnistych i osłonki [73]. Kamiński [52] również nie stwierdził wpływu PRL na sekrecję E_2 i estrogenu przez oba typy komórek pęcherzyka jajnikowego, a Veldhuis i wsp. ([80] cytowane za [73]) wykazali, że PRL hamuje indukowaną przez FSH produkcję E_2 w komórkach ziarnistych świnii. Wspomniane wcześniej iniekcje PRL do żyły szyjnej wewnętrznej loch przeprowadzone w 17–18 dniu cyklu rujowego także spowodowały obniżenie się osoczowych poziomów estrogenów i androgenów [31]. Podobne wyniki uzyskano w eksperymentach wykonanych na loszkach [29]. Indukowany prolaktyną spadek poziomu estrogenów we krwi świń oraz hamujące działanie PRL na produkcję estrogenów, obserwowane w niektórych doświadczeniach *in vitro* [29, 31, 80] mogą sugerować udział prolaktyny w inicjacji atrezji pęcherzykowej. Stymulujące działanie PRL na sekrecję E_2 wykazane w innych doświadczeniach [38, 71, 73] nie potwierdza tej hipotezy. Różnice w ocenie działania PRL mogą wynikać z istnienia lub braku interakcji międzykomórkowych, różnic metodycznych związanych z izolacją komórek, dawki PRL itp. Niezależnie jednak od tego, czego dowiemy się w przyszłości o roli PRL w rozwoju i funkcjonowaniu poszczególnych struktur jajnika świnii, to nie ulega jednak wątpliwości, że komórki pęcherzyka jajnikowego i ciała żółtego są komórkami docelowymi dla tego hormonu.

RECEPTORY PROLAKTYNOWE

Miejsca wiążące prolaktynę w komórkach ciała żółtego i pęcherzyka jajnikowego świni zostały odkryte ponad 20 lat temu [66, 79]. Liczba miejsc wiążących PRL jest najniższa w okresie okołowulacyjnym, a wzrasta wraz z rozwojem ciała żółtego [9, 66]. Ostatnio, obecność receptorów prolaktyny we wczesnym ciałku żółtym i komórkach osłonki wewnętrznej świni potwierdzono metodami immunocytochemicznymi [70].

Wkrótce po sklonowaniu receptora PRL (PRL-R) pochodzącego z wątroby szczura [8] okazało się, że PRL-R należy do rodziny receptorów cytokinowych [7]. Obecnie, znanych jest kilka izoform PRL-R. Przyjmuje się, że receptory PRL po związaniu się z cząsteczką ligandu ulegają homodimeryzacji. Zapoczątkowuje to szereg wewnątrzkomórkowych zdarzeń prowadzących do odpowiedzi biologicznej komórki [7, 37, 46].

Budowa PRL-R w komórkach należących do układu rozrodczego świni nie została poznana. Większość dotychczas przeprowadzonych badań dotyczyła wewnątrzkomórkowego mechanizmu działania PRL w komórkach gruczołu mlekowego, układu immunologicznego i nerwowego [7, 37, 46]. W ostatnich latach pojawiły się prace dotyczące struktury PRL-R i mechanizmu działania PRL w układzie rozrodczym gryzoni i naczelnych, w tym przede wszystkim, jajnika szczurów [34, 35, 68]. Z prac tych wynika, że w transdukcję sygnału prolaktynowego zaangażowanych jest kilka szlaków wewnątrzkomórkowych.

Prolaktyna, po związaniu się ze swoim receptorem błonowym indukuje wystąpienie szeregu reakcji prowadzących do aktywacji kinaz białkowych. Kinazy serynowo-treoninowe i tyrozynowe fosforylują, odpowiednio, reszty serynowe i treoninowe lub tyrozynowe białek substratowych powodując ich aktywację. Ufosforylowane białka inicjują kaskadę zdarzeń prowadzących do określonego efektu biologicznego. Defosforylacja białek, katalizowana przez fosfatazy, zazwyczaj umożliwia wyciszenie sygnału indukowanego przez hormon [49].

Jedną z głównych dróg działania PRL w większości badanych komórek jest szlak niereceptorowych kinaz tyrozynowych Jak i czynników transkrypcyjnych Stat (ang. *signal transducer and activator of transcription*). W przekazywaniu sygnału prolaktynowego mogą również uczestniczyć inne mediatory wewnątrzkomórkowe: fosfatydyloinozytolo-3-kinaza (PI 3 K), niereceptorowe kinazy tyrozynowe Fyn, Src, Abl oraz kinazy MAP (ang. *mitogen activated protein*). Wewnątrzkomórkowym mediatorem sygnału prolaktynowego w niektórych komórkach jest również kinaza białkowa C (PKC) [7, 37, 46].

MECHANIZM DZIAŁANIA PRL W STEROIDOGENNYCH KOMÓRKACH JAJNIKA ŚWINI

Kinaza białkowa C

Kinazy białkowe C stanowią rodzinę kinaz serynowo-treoninowych zależnych od wapnia i fosfolipidów. Uczestniczą one w regulacji różnicowania, rozwoju i aktywności sekrecyjnej komórek oraz mogą brać udział w powstawaniu nowotworów. Kinaza białkowa C zbudowana jest z pojedynczego łańcucha polipeptydowego, w którym wyróżnia się domenę regulatorową i katalityczną. Obecnie znanych jest 11 izoform PKC, które na podstawie różnic w strukturze, właściwościach biochemicznych i zdolności do wiązania określonych aktywatorów zgrupowano w 3 podrodziny. Izoformy klasyczne (cPKC: α , β I, β II, γ) aktywowane przez fosfatydyloserynę (PS), diacyloglicerol (DAG) lub estry forboli są zależne od jonów wapnia i fosfolipidów. Nowe PKC (nPKC: δ , ϵ , η , μ , θ) aktywowane przez PS, nienasycone kwasy tłuszczowe, DAG lub estry forboli, są niezależne od jonów wapnia. Atypowe izoformy PKC (aPKC: ξ , λ/τ), aktywowane przez PS, fosfatydoloinozytole (PI) i nienasycone kwasy tłuszczowe, są niezależne od jonów wapnia, DAG oraz estrów forboli [6, 56, 76].

Molekularny mechanizm aktywacji PKC został najlepiej poznany dla cPKC. Aktywacja PKC wiąże się z jej translokacją z cytozolu do błon i wymaga asocjacji enzymu z fosfolipidami błonowymi. Endogennymi aktywatorami PKC są diacyloglicerole, fosfolipidy (głównie PS) oraz jony wapnia. Diacyloglicerol może powstawać w procesach katalizowanych przez: fosfatydyloinozytolo-zależną fosfolipazę C (PI-PLC), fosfatydylocholino-zależną fosfolipazę C (PC-PLC), fosfolipazę D (PLD) oraz fosfolipazę A_2 (PLA₂) [3, 6, 57, 76]. W pracach badawczych wykorzystuje się niewystępujące w komórkach aktywatory PKC, jakimi są estry forboli, np. PMA (forbol 12-mirystylo-13-acetylowy) i PDBu (forbol 12,13-dibutyrylowy). Egzogenne estry forboli wiążą się z kinazą białkową C w tym samym miejscu co DAG. Prowadzi to do aktywacji enzymu oraz wbudowania kompleksu ester forbolu-PKC w błonę. Estry forboli są bardzo wolno metabolizowane w komórce, dlatego aktywacja PKC wywołana estrami forboli trwa dłużej w porównaniu z aktywacją powodowaną przez szybciej metabolizowany DAG [3]. Interesujące, że długotrwała ekspozycja PKC na działanie estrów forboli (>4 godziny) powoduje proteolityczną aktywację PKC. Dalsza proteoliza prowadzi do inaktywacji kinazy i w konsekwencji do długotrwałego obniżenia aktywności PKC [6, 57].

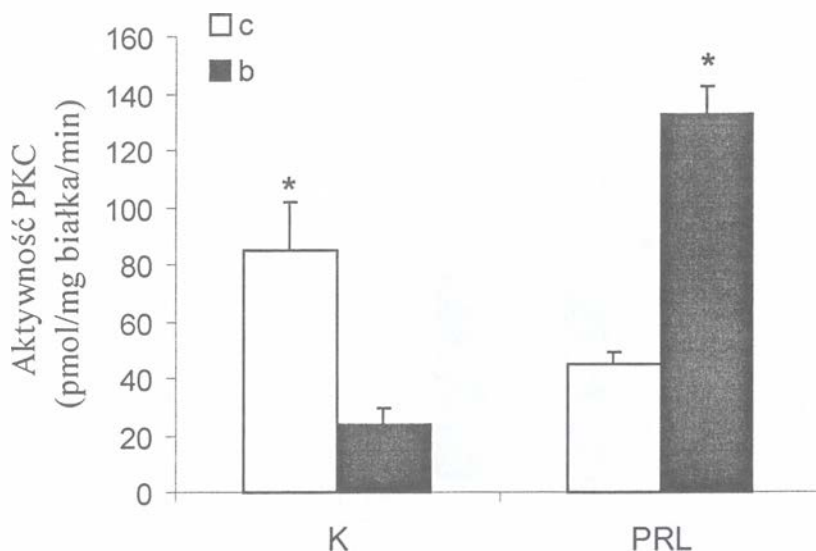
Kinaza białkowa C jest jednym z mediatorów działania PRL w komórkach wczesnolutealnych i osłonki wewnętrznej jajnika świni. Obecność PKC wykazano w ciałkach żółtych kilku gatunków zwierząt, w tym świń [17, 22, 83]. W tkance lutealnej świni znaleziono zarówno klasyczne, jak i nowe izoformy PKC [22]. Aktywność PKC opisano również w komórkach osłonki wewnętrznej świni [20]. Na udział PKC w wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału prolaktynowego w

komórkach wczesnolutealnych (1–3 dzień cyklu rujowego) i osłonki wewnętrznej (późna faza pęcherzykowa, duże pęcherzyki przedowulacyjne) jajnika świni wskazują wyniki doświadczeń wykorzystujących różne techniki badawcze, w tym inhibitory PKC.

Inhibitory PKC (staurosporyna – STS i chlorek chelerytryny – CC) obniżały stymulowaną przez PRL produkcję P_4 przez komórki wczesnolutealne (STS, CC) [16, 17] i osłonki wewnętrznej (CC) [20] jajnika świni, nie wpływając na jego produkcję podstawową. Przeciwnie, STS nie wpływała na lutealną produkcję P_4 stymulowaną przez LDL. Staurosporyna i CC, powszechnie uznawane za inhibitory PKC, blokują domenę katalityczną enzymu [45]. Z drugiej strony wiadomo, że STS może również hamować aktywność kinaz zależnych od cyklicznych nukleotydów (serynowo-treoninowe kinazy: PKA, PKG) oraz kinaz tyrozynowych [45, 47]. W przypadku PRL potencjalne oddziaływanie STS na PKA lub PKG wydaje się mieć marginalne znaczenie, ponieważ w transdukcji sygnału prolaktynowego szlaki cyklaza adenylowa/guanylowa – cAMP/cGMP nie biorą udziału [7, 23, 46, 65]. Ponadto, zastosowane przez nas koncentracje STS mieściły się w zakresie koncentracji uważanych za efektywne w odniesieniu do PKC, ale nie kinaz tyrozynowych [47]. Chlorek chelerytryny jest natomiast 100 razy bardziej selektywnym inhibitorem PKC niż innych kinaz białkowych [69]. W badaniach nad mechanizmem działania PRL w innych komórkach steroidogennych, tzn. w komórkach kory nadnerczy świni, sfingozyna, inhibitor PKC działający poprzez blokowanie domeny regulatorowej enzymu, obniżała stymulowaną przez PRL produkcję kortyzolu i androstendionu [51]. W początkowej fazie pracy nad mechanizmem działania hormonu, inhibitory kinazy okazały się narzędziem pomocnym i wyznaczyły kierunek dalszych badań.

Udział PKC w transdukcji sygnału prolaktynowego w komórkach jajnika świni potwierdziły doświadczenia, w których badano aktywność katalityczną kinazy [17, 20]. Aktywność PKC mierzono badając stopień ufosforylowania substratu dla PKC we frakcji cytozolowej i błonowej komórek ciała żółtego i osłonki wewnętrznej traktowanych prolaktyną [77]. W komórkach wczesnolutealnych świni 78% całkowitej aktywności PKC było zlokalizowane we frakcji cytozolowej. W wyniku pięciominutowej inkubacji komórek z PRL stwierdzono, że 75% całkowitej aktywności PKC znajduje się we frakcji błonowej (ryc. 3) [17]. Aktywację PKC przez PRL obserwowano także w komórkach osłonki wewnętrznej. Maksymalną aktywność PKC zanotowano we frakcji błonowej tych komórek po 10 minutach inkubacji z PRL [20]. W komórkach lutealnych, wzrostowi aktywności PKC we frakcji błonowej towarzyszy spadek aktywności enzymu we frakcji cytozolowej (ryc. 3). Aktywność PKC we frakcji cytozolowej komórek osłonki nie wykazywała wyraźnych tendencji malejących. Wyniki te mogą wskazywać na nieco odmienny sposób działania PRL w obu typach komórek. Translokację PKC z cytozolu do frakcji błonowej pod wpływem PRL wykazano także w komórkach ludzkiego endometrium [50] i wielu typach komórek spoza układu rozrodczego (cytowane za [16, 17, 20]).

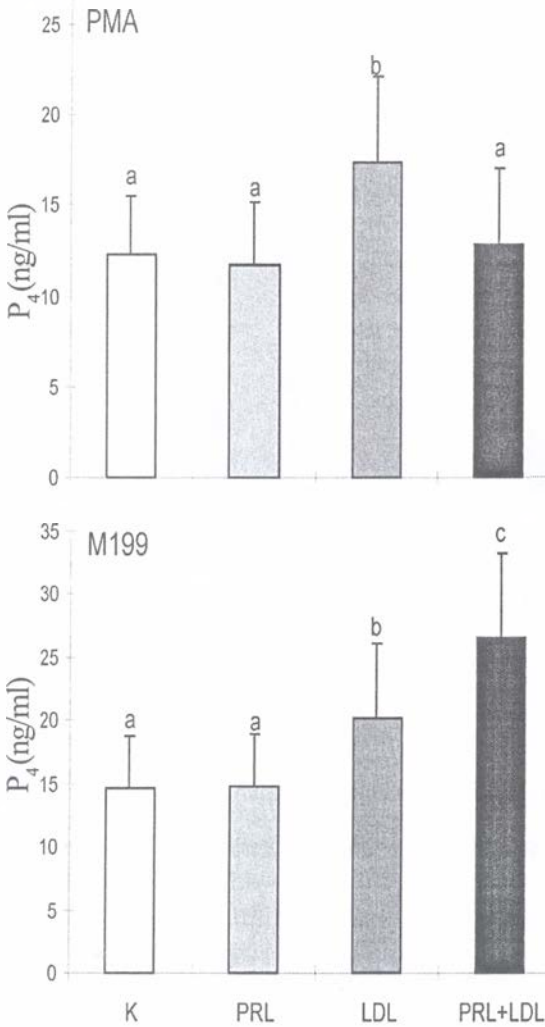
Prolaktyna aktywowała PKC w sposób podobny do PMA. Krótka (20 minut) ekspozycja komórek osłonki wewnętrznej świni na PMA powodowała także translokację PKC z frakcji cytozolowej do błonowej [20]. Podobne działanie PMA zanotowano w



RYCINA 3. Porównanie aktywności kinazy białkowej C (PKC) we frakcji cytozolowej i błonowej komórek wczesnolutealnych świni inkubowanych przez 5 minut w obecności PRL (200 ng) lub przy jej braku (K) w medium (n=5). Pomiaru aktywności PKC dokonywano w mieszaninie reakcyjnej zawierającej 20 mM Tris-HCL, 10 mM octanu magnezu, 10 mM DTT, 100 μ M ATP, 100 μ g/ml histonu, 100 μ g/ml leupeptyny i 0,5 μ Ci 32 P-ATP (30 Ci/mmol) oraz 6,4 μ g/ml 1, 2dioleiny (DAG), 96 μ g/ml fosfatydyloseryny i/lub 0,75 mM CaCl₂. Reakcję fosforylacji (4 min, 30°C) rozpoczynano przez dodanie frakcji cytozolowej lub błonowej, a hamowano 25% kwasem trójchlorooctowym (4°C). *p<0,05 (reprodukowana za zgodą Towarzystwa Biologii Rozrodu z pracy Ciereszko i wsp.[18]: 63–83)

wielu typach komórek [1, 50, 81]. W doświadczeniu przeprowadzonym na luteinizujących komórkach ziarnistych i komórkach lutealnych człowieka wykazano, że krótki czas inkubacji tych komórek z PMA powodował aktywację PKC. Przeciwnie, wydłużenie inkubacji do 20 godzin prowadziło do utraty ponad 85% aktywności enzymu [1].

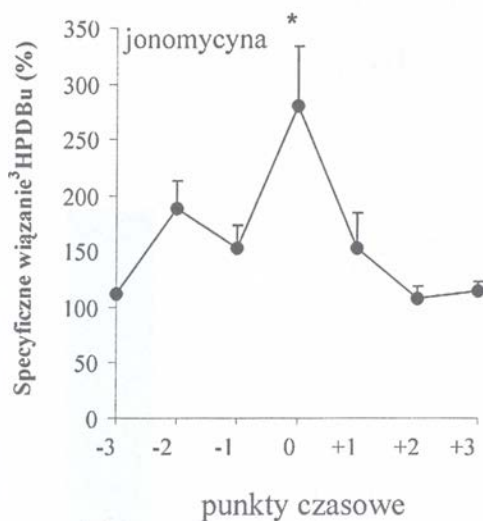
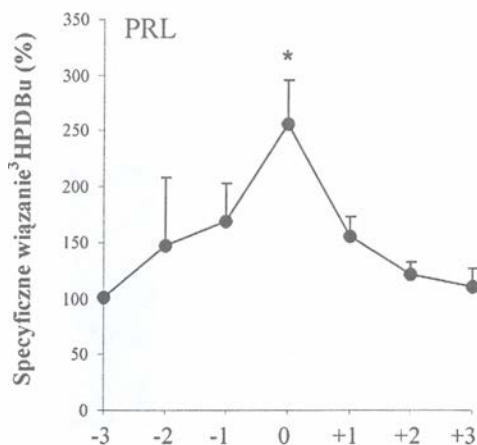
Znaczenie długości okresu inkubacji z PMA na aktywność PKC potwierdziło badanie dużych i małych komórek lutealnych świni [83]. Zaobserwowano, że dwugodzinna inkubacja z PMA stymulowała produkcję P₄ w obu typach komórek. PMA stymulował także sekrecję P₄ przez nierozdzielane komórki lutealne pochodzące ze środkowej fazy lutealnej człowieka [32] oraz świni [36]. Tendencję w zwiększaniu podstawowej i stymulowanej lipoproteinami produkcji P₄ przez PMA obserwowano również w krótko trwających inkubacjach (4 godziny) komórek wczesnolutealnych świni [16]. Cytowane powyżej dane potwierdzają obserwację, że krótkie ekspozycje komórek na niskie stężenia PMA aktywują PKC w tych komórkach. Przeciwnie, w wyniku kilkunastogodzinnej ekspozycji komórek na estry forboli otrzymuje się komórki pozbawione aktywności PKC (ang. *PKC deficient cells*) [82]. Długa, dwudziestoczegodzinna inkubacja komórek lutealnych i osłonki wewnętrznej świni z PMA obniżała stymulowaną prolaktyną sekrecję P₄ [41]. Luteotropowy wpływ PRL, ale nie LDL, jest znoszony w komórkach lutealnych świni pozbawionych aktywności PKC (ryc. 4) [16]. Podobnie, nie wykazano wpływu PRL na produkcję hormonów steroidowych przez pozbawione aktywności PKC komórki kory nadnerczy świni [51].



RYCINA 4. Wpływ PRL na stymulowaną przez LDL produkcję progesteronu (P_4) przez komórki lutealne świnie (1–3 dzień cyklu) pozbawione aktywności kinazy białkowej C (PKC; panel górny, $n=4$). Kinazę białkową C w komórkach lutealnych (50 000/ml) inaktywowano przez preinkubację z $1 \mu\text{M}$ PMA (12 godzin; 37°C). Panele środkowy i dolny przedstawiają wpływ PRL na komórki preinkubowane z DMSO lub M199 ($n=4$; 12 godzin; 37°C , kontrola). Następnie wszystkie komórki inkubowano (8 godzin, 37°C , M199) z medium (K), z LDL (140 μg cholesterolu) i/lub PRL (200 ng). Różne oznaczenia literowe przy poszczególnych słupkach oznaczają statystycznie istotne różnice między grupami (reprodukowane za zgodą The Society for Endocrinology z pracy Ciereszko i wsp. [16]: 201–203)

W kolejnym doświadczeniu stwierdzono, że PRL zwiększała specyficzne wiązanie znakowanego trytem estru forbolu ($^3\text{HPDBu}$) przez błony komórek wczesnolutealnych i osłonki wewnętrznej jajnika świnie [16, 20]. Ten stymulacyjny wpływ PRL jest najsilniejszy w ciągu pierwszych 5 minut ekspozycji obu typów badanych komórek na jej działanie (ryc. 5). Zwiększenie wiązania $^3\text{HPDBu}$ obserwowano również po ekspozycji komórek kory nadnerczy świnie na prolaktynę [51]. Błonowe wiązanie estrów forboli jest uważane za pośrednią metodę oznaczania aktywności PKC [15, 24].

Przedstawione wyniki wyraźnie wskazują, że PKC jest wewnątrzkomórkowym mediatorem sygnału prolaktynowego w komórkach wczesnolutealnych i osłonki wewnętrznej świnie. Sposób aktywacji PKC przez PRL w komórkach jajnika nie jest w pełni wyjaśniony. Prolaktyna nie wpływała na aktywność PI-PLC w komórkach wczesnolutealnych i osłonki wewnętrznej świnie [16, 20]. Stwierdzono również, że nie



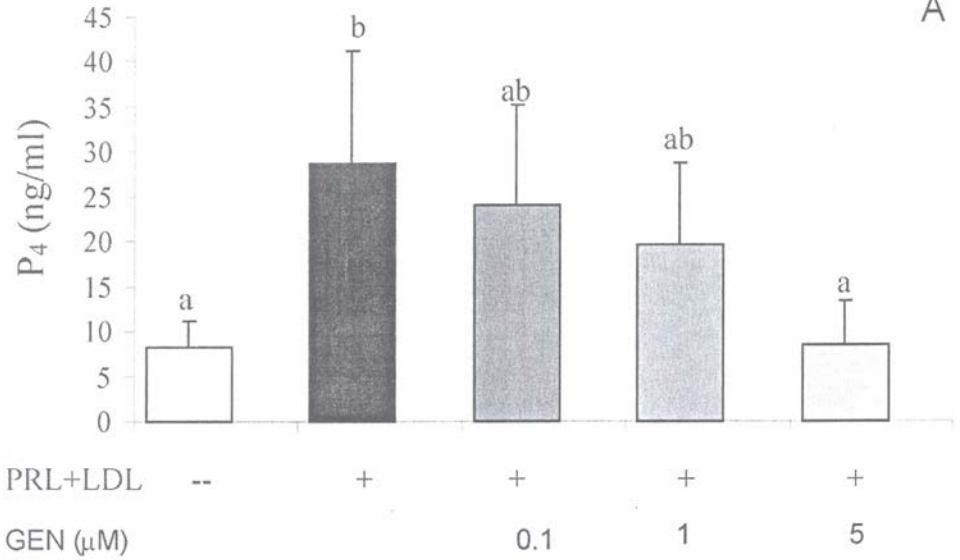
RYCINA 5. Wpływ PRL na specyficzne wiązanie znakowanego estru forbolu (3 HPDBu) przez komórki osłonki wewnętrznej jajnika świni ($n=6$). Komórki ($125\ 000/400\ \mu\text{l}$) po preinkubacji (30 min) z 3 HPDBu (16 nM) inkubowano przez 1, 2, 3, 5 i 10 minut (37°C) z PRL (200 ng/ml), jonomycyną ($1\ \mu\text{M}$; pozytywna kontrola) lub nieznakowanym PDBu (wiązanie niespecyficzne, $10\ \mu\text{M}$). Wiązanie 3 HPDBu wyrażano jako % specyficznego wiązania w próbach kontrolnych. Czas 0 oznacza moment maksymalnej stymulacji. * $p<0,05$ (reprodukowana za zgodą CSIRO z pracy Ciereszko i wsp. [20]: 27–35)

zwiększała ona wewnątrzkomórkowej koncentracji jonów wapnia w komórkach wczesnego ciała żółtego [16]. Sugeruje to udział innych fosfolipaz (PC-PLC, PLD, PLA_2), a także kinaz tyrozynowych (PTK) w aktywacji PKC. W przyszłości interesujące byłoby określenie dokładnej sekwencji wywołanych prolaktyną zdarzeń, które prowadzą do aktywacji PKC w omawianych komórkach. Należałoby także sprawdzić, które izoformy są indukowane przez PRL w tych komórkach.

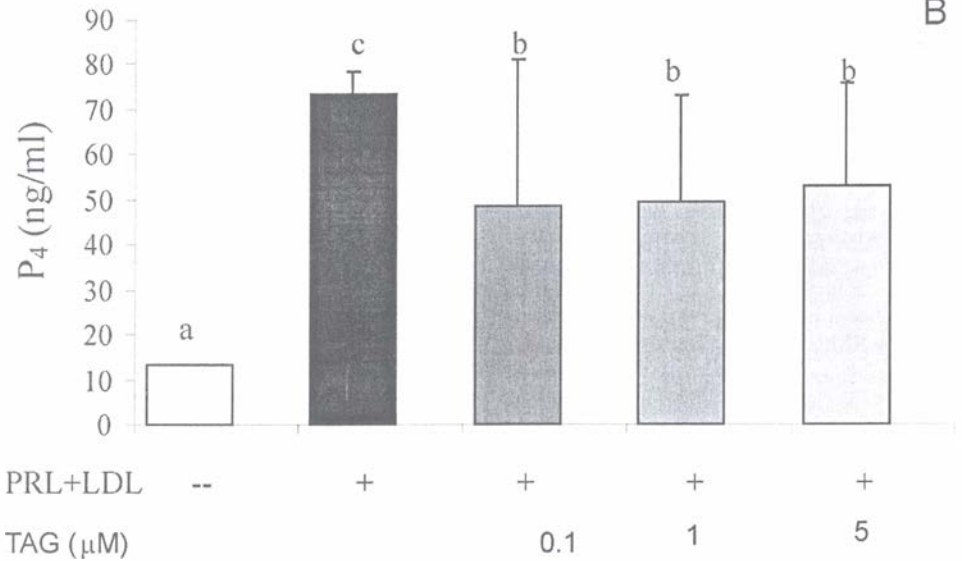
Kinazy tyrozynowe

Wśród kinaz tyrozynowych wyróżniamy kinazy receptorowe (RPTK) i niereceptorowe (NRPTK). Receptorowe kinazy tyrozynowe wchodzi w skład cytoplazmatycznej części receptorów dla czynników wzrostu [48]. Niereceptorowe kinazy tyrozynowe występują w cytoplazmie działając jako katalityczne podjednostki sprzężone z receptorami błonowymi nie mającymi wewnętrznej aktywności enzymatycznej np. z PRL-R.

A



B



RYCINA 6. Wpływ inhibitorów kinaz tyrozynowych, genisteiny (GEN) i tyrfostinu AG (TAG), na stymulowaną przez prolaktynę (200 ng) sekrecję P_4 przez komórki wczesnolutealne ($n=5$). Komórki lutealne (50 000/ml) były inkubowane (8 godzin, 37°C , M199) z LDL (140 μg cholesterolu) i PRL (200 ng). Różne oznaczenia literowe oznaczają statystycznie istotne różnice ($p < 0,05$) między poszczególnymi grupami. (reprodukowana za zgodą Towarzystwa Biologii Rozrodu z pracy Ciereszko i wsp. [17]: 63–83)

Niereceptorowe PTK są aktywowane przez oligomeryzację receptora związanego z ligandem. Aktywne NRPTK fosforylują podjednostki receptora oraz inne białka substratowe, np. enzymy (fosfolipazy, kinazy, fosfatazy), białka adaptorowe (shc, vav, grb2) i strukturalne (aneksyna, klatryna), a także czynniki transkrypcyjne. Analiza struktury kinaz wykazała, że poznane dotąd kinazy tyrozynowe mają regiony o bardzo wysokim stopniu homologii. Do regionów tych należą: domena katalityczna PTK (SH1), domeny rozpoznające i wiążące ufosforylowaną tyrozyne (SH2, PTB), domena wiążąca specyficzne regiony bogate w prolinę (SH3) oraz domena odpowiedzialna za wiązanie fosfoinozydów (PH). Te charakterystyczne dla PTK domeny umożliwiają interakcję kinaz z innymi cząsteczkami, ważnymi dla transdukcji określonego sygnału [48, 55].

Do NRPTK związanych z mechanizmem działania PRL należą m.in. kinazy Jak, Src, Abl i Fyn [48, 55]. W większości badanych komórek jednym z ważniejszych wewnątrzkomórkowych szlaków działania PRL jest szlak kinaz Jak2 i czynników transkrypcyjnych Stat (1, 3 lub 5). Cząsteczka PRL łączy się z dwiema cząsteczkami receptora prolaktynowego powodując ich dimeryzację oraz aktywację pary kinaz Jak2. Kinazy te przyłączają się do receptora, a następnie fosforylują siebie nawzajem, receptor i czynniki transkrypcyjne Stat. Białka Stat ulegają fosforylacji, po wcześniejszym przyłączeniu się do ufosforylowanych reszt tyrozynowych cytoplazmatycznej części PRL-R. Ufosforylowane białka Stat odłączają się od receptora i dimeryzują. Powstałe homo- lub heterodimery Stat przedostają się do jądra, gdzie łączą się z promotorem genu docelowego i indukują jego transkrypcję prowadząc do określonej odpowiedzi biologicznej [7, 23].

Na znaczenie kinaz tyrozynowych w mechanizmie działania PRL w komórkach lutealnych i osłonki wewnętrznej jajnika świni wskazują wyniki doświadczeń z inhibitorami tych enzymów. Genisteina – najpowszechniej stosowany inhibitor PTK oraz tyrfostin (ryc. 6) i herbimycyna obniżają stymulowaną przez PRL produkcję P_4 w komórkach jajnika świni [17, 20, 42]. W doświadczeniach z komórkami kory nadnerczy świni genisteina także obniżała stymulowaną przez PRL produkcję kortyzolu [51].

Z badań przeprowadzonych w naszym laboratorium wynika, że PRL stymuluje fosforylację tyrozyny w steroidogennych komórkach jajnika świni [18]. Badania wstępne wskazują na udział niereceptorowej kinazy tyrozynowej Jak2 i czynników transkrypcyjnych Stat5A i B w mediacji sygnału prolaktynowego w komórkach lutealnych i osłonki wewnętrznej świni (Ciereszko i Słomczyńska, dane niepublikowane). Udział szlaku Jak/Stat w mechanizmie wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału prolaktynowego był badany w komórkach jajnika szczura. Russel i wsp. [67] wykazali, że PRL aktywowała białka Stat oraz regulowała ich zdolność do wiązania się ze specyficznymi elementami regulatorowymi DNA w tych komórkach. Czynniki transkrypcyjne Stat5A został zidentyfikowany jako przekaźnik pośredniczący w działaniu PRL na aktywację promotora genu makroglobuliny α_2 w komórkach ziarnistych szczura [21]. Stwierdzono również udział kinazy Jak2 i białek Stat5 w indukowanej prolaktyną aktywacji genów receptorów estrogenowych w jajniku szczura [34, 35]. W komórkach jajnika świni nie określono jeszcze genów docelowych dla prolaktyny. Wiele wskazuje na to, że mogą to być geny receptorów: LH, FSH i/lub

estrogenów, jak również makroglobuliny α_2 , inhibitora proteaz związanego z reorganizacją tkanek. Rozpoznanie tych genów, sposób ich aktywacji, znaczenie kinaz tyrozynowych innych niż Jak2, wzajemne relacje między tymi kinazami i szlakiem Jak/Stat oraz kinazą białkową C to kolejne cele na drodze poznania mechanizmu działania PRL w jajniku świni.

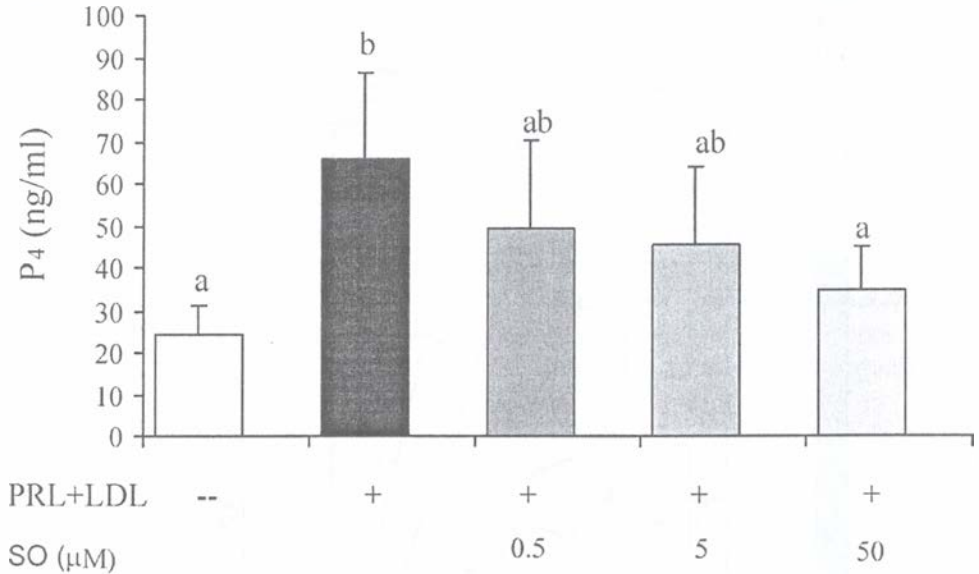
Fosfatazy białkowe

Fosfatazy białkowe usuwają grupy fosforanowe z białek ufosforylowanych przez kinazy. Wyróżnia się wśród nich fosfatazy serynowo-treoninowe (PP) i fosfatazy tyrozynowe (PTP). Fosfatazy serynowo-treoninowe dzieli się na fosfatazy typu 1 (PP1) i typu 2 (PP2A, PP2B, PP2C). Fosfatazy typu 1 preferencyjnie defosforylują podjednostkę β kinazy fosforylazy i są hamowane przez dwa białka określane jako inhibitor 1 i 2. Fosfatazy typu 2 defosforylują podjednostkę α kinazy fosforylazy i nie są wrażliwe na działanie wspomnianych inhibitorów. Większość zdefiniowanych do dnia dzisiejszego PP występuje w cytoplazmie. Mimo swej wielofunkcyjności i niskiej specyficzności, enzymy te zapewniają przeciwwagę dla różnorodnych procesów fosforylacji. Wydaje się, że jest to możliwe dzięki złożonym procesom regulacji aktywności fosfataz [49, 59].

Fosfatazy tyrozynowe stanowią dużą i strukturalnie różnorodną grupę enzymów zarówno receptorowych, jak i niereceptorowych. Niereceptorowe PTP występują w cytoplazmie lub jądrze. Mimo tego że w ostatnich latach zidentyfikowano wiele izoform poznanych dotychczas PTP, nasza wiedza na temat mechanizmu działania i regulacji fosfataz tyrozynowych jest ograniczona [48, 74].

W celu sprawdzenia, czy fosfatazy białkowe są istotne dla procesów związanych z przenoszeniem informacji indukowanej przez prolaktynę w komórkach jajnika świni, badano wpływ inhibitorów fosfataz na produkcję P_4 stymulowaną przez PRL. Inhibitory fosfataz typu PP1/PP2A, kwas okadejowy (OA) zastosowany w komórkach wczesnolutealnych i osłonki wewnętrznej oraz kantarydyna (CTH) w komórkach wczesnolutealnych obniżały produkcję P_4 stymulowaną przez PRL [17, 20]. Przeciwnie, inhibitor fosfataz typu PP2B – cypermetryna nie wpływała na luteotropową funkcję PRL [17]. Podobne zależności stwierdzono badając wpływ tych inhibitorów na stymulowaną przez LH sekrecję P_4 w komórkach lutealnych szczura [2, 33]. Autorzy ci uważają, że hamujące działanie inhibitorów PP na sekrecję P_4 może być odzwierciedleniem tego, że zapobiegają one defosforylacji białek niezbędnych dla właściwego przebiegu steroidogenezy.

Fosfatazy tyrozynowe mogą także działać synergistycznie z kinazami. Inhibitor fosfataz tyrozynowych – wanadan sodu (SO), podobnie jak genisteina i tyrfostin, hamuje produkcję P_4 stymulowaną przez PRL w komórkach jajnika świni (ryc. 7) [17, 20]. W komórkach linii COS7 wywodzącej się z małpich fibroblastów nerki, PRL aktywowała zarówno kinazę Jak2, jak i cytoplazmatyczną fosfatazę tyrozynową SHP-2 [5].

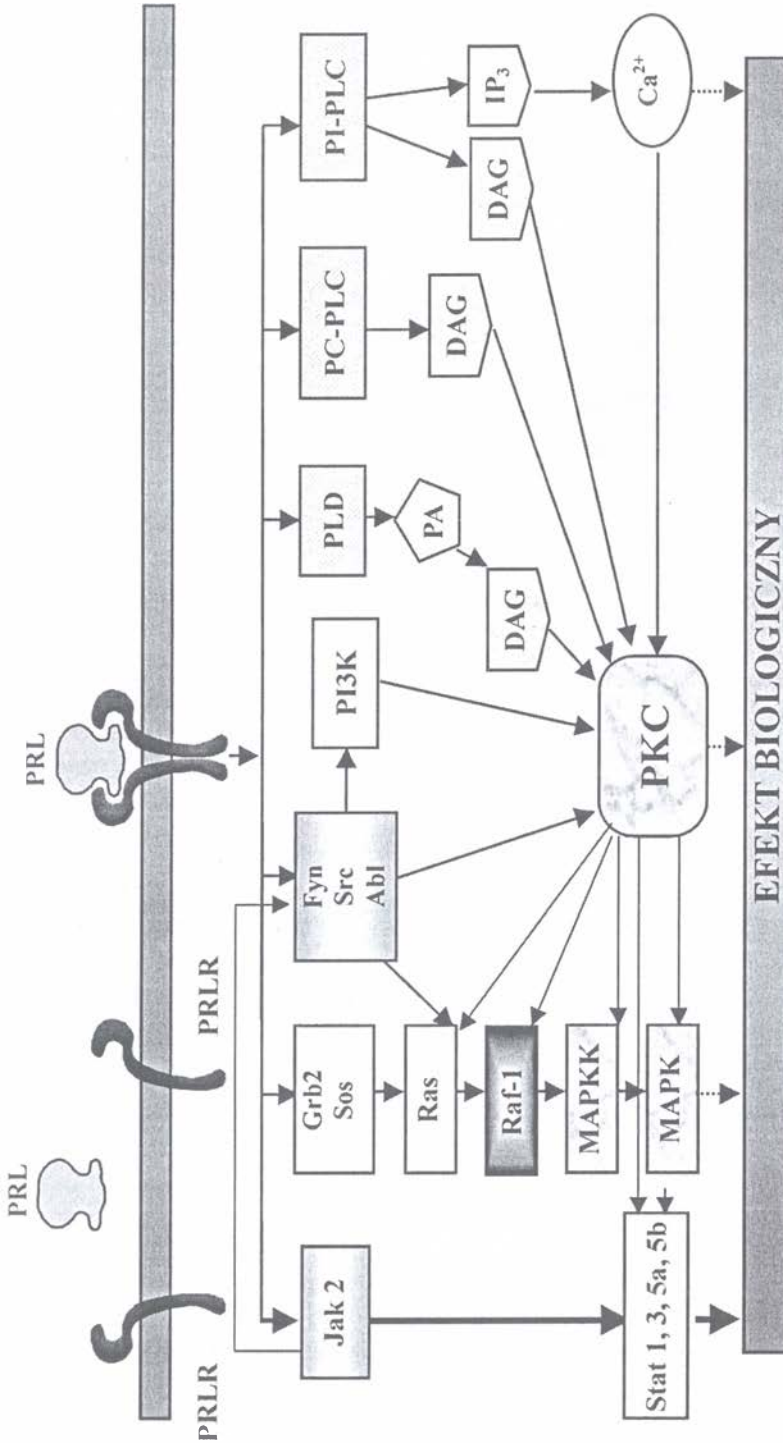


RYCINA 7. Wpływ inhibitora fosfataz tyrozynowych, wanadanu sodu (SO), na stymulowaną przez prolaktynę (200 ng) sekrecję P₄ przez komórki wczesnolutealne (n=4). Komórki lutealne (50 000/ml) były inkubowane (8 godzin, 37°C, M199) z LDL (140 μg cholesterolu) i PRL (200 ng). Różne oznaczenia literowe oznaczają statystycznie istotne różnice (p<0,05) między poszczególnymi grupami (reprodukowana za zgodą Towarzystwa Biologii Rozrodu z pracy Ciereszko i wsp. [17]: 63–83)

Kooperacja między kinazami i fosfatazami może być zilustrowana na przykładzie kinaz Src, gdzie jeden z mechanizmów aktywacji kinazy polega na hamowaniu przez PTP defosforylacji reszty fosfotyrozynowej [74]. Wiadomo również, że do działania niektórych RPTK niezbędna jest fosfataza tyrozynowa PTP1D [48]. Dostępne informacje sugerują, że w zależności od wewnątrzkomórkowego kontekstu, w czasie transmisji sygnału kinazy i fosfatazy mogą albo współdziałać ze sobą albo działać antagoniście. Określenie szczegółowych interakcji pomiędzy tymi enzymami w komórkach steroidogennych jajnika świni wymaga dalszych badań.

PODSUMOWANIE

Prolaktyna jest hormonem regulującym procesy steroidogenezy w komórkach wczesnego ciała żółtego i komórkach osłonki wewnętrznej jajnika świni. Wewnątrzkomórkowy mechanizm działania PRL w tych komórkach obejmuje zarówno aktywację PKC, jak i NRPTK (ryc. 8). Droga aktywacji PKC w komórkach jajnika stymulowanych prolaktyną nie jest wyjaśniona. Wiadomo tylko, że PRL nie wpływa na aktywność PI-PLC i nie



RYCINA 8. Hipotetyczne szlaki działania PRL w steroidogennych komórkach jajnika świni; kinazy tyrozynowe niereceptorowe: Jak, Fyn, Src, Abl; kinazy serynowo-treoninowe: kinaza białkowa (PKC), kinaza aktywująca kinazy aktywowane mitogenami (Raf-1/ MAPKK), kinaza aktywowana mitogenami (MAPK); kinaza o aktywności kinazy serynowo-treoninowej i tyrozynowej: kinaza aktywująca kinazy aktywowane mitogenami (MAPKK); PI3K – fosfatydyloinozytolo-3-kinaza; PI-PLC – fosfatydyloinozytolo-3-kinaza; PC-PLC – fosfatydylochoholino-zależna fosfolipaza C; PLD – fosfolipaza D; Sos – aktywator wymiany nukleotydów w białku Ras; Grb2 – białko adaptorowe; Ras – białko wiążące guanylowe; Stat – czynnik transkrypcyjny; DAG – diacyloglicerol; IP₃ – inozytolo(1,4,5)trisfosforan; PA – kwas fosfatydowy [12]

zwiększa wewnątrzkomórkowej koncentracji jonów wapnia w komórkach lutealnych świni. Może to sugerować udział innych fosfolipaz (PC-PLC, PLD, PLA₂) i/lub NRPTK (Fyn, Src) w aktywacji PKC. Ponadto, wewnątrzkomórkowymi mediatorami działania PRL w steroidogennych komórkach jajnika świni są niereceptorowe kinazy tyrozynowe Jak2 i czynniki transkrypcyjne Stat5A/B. W transdukcję sygnału prolaktynowego w jajniku świni zaangażowane są także fosfatazy białkowe. Mechanizm działania PRL w komórkach lutealnych i osłonki wewnętrznej jajnika świni jest zjawiskiem złożonym i wielotorowym. Pomimo poznania wielu aspektów dotyczących wewnątrzkomórkowych mediatorów działania PRL ciągle wiele pytań zostaje bez odpowiedzi. Sprawdzenia wymaga, między innymi, pytanie, czy w mechanizmie działania PRL w komórkach jajnika świni uczestniczą także inne kinazy, np. kinazy MAP i PI3kinaza. Wzajemne interakcje pomiędzy wymienionymi mediatorami także nie są jeszcze poznane.

PODZIĘKOWANIA

Składam serdeczne podziękowania prof. dr hab. Luizie Duszy, dr hab. Stanisławowi Okrasie, dr hab. Genowefie Kotwicy oraz prof. dr hab. Jadwidze Przała za wszechstronną pomoc i niezmienną życzliwość towarzyszącą wszystkim moim zawodowym poczynaniom.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ABAYASEKARA DRE, JONES PM, PERSAUD SJ, MICHAEL AE, FLINT APF. Prostaglandin F_{2α} activates protein kinase C in human ovarian cells. *Mol Cell Endocrinol* 1993; **91**: 51–57.
- [2] ABAYASEKARA DRE, FORD SL, PERSAUD SJ, JONES PM. Role of phosphoprotein phosphatases in the *corpus luteum*: II. Control of progesterone secretion by isolated rat luteal cells. *J Endocrinol* 1996; **150**: 213–221.
- [3] AZZI A, BOSCOBOINIK D, HENSEY C. The protein kinase C family. *Eur J Biochem* 1992; **208**: 547–557.
- [4] BEN-JONATHAN N, MERSHON JL, ALLEN DL, STEINMETZ RW. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocrine Rev* 1996; **17**: 639–669.
- [5] BERCHTOLD S, VOLAREVIC S, MORIGGI R, MERCEPM, GRONER B. Dominant negative variants of the SHP-2 tyrosine phosphatase inhibit prolactin activation of Jak2 (Janus kinase 2) and induction of Stat 5 (signal transducer and activator of transcription 5)-dependent transcription. *Mol Endocrinol* 1998; **12**: 556–567.
- [6] BLOBE GC, STRIBLING S, HANNUN LOY. Protein kinase C isoenzymes: regulation and function. *Cancer Surveys* 1996; **27**: 213–248.
- [7] BOLE-FEYSOT C, GOFFIN V, EDERY M, BINART N, KELLY PA. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Rev* 1998; **19**: 225–268.
- [8] BOUTIN MJ, JOLICOEUR C, OKAMURA H, GAGNON J, EDERY M, SHIRPTA M, BANVILLE D, DUSANTERFOURT I, DIJANE J, KELLY PA Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family. *Cell* 1988; **53**: 69–77.
- [9] BRAMLEY TA, MENZIES GS. Receptors for lactogenic hormones in the porcine *corpus luteum*: properties and luteal phase concentrations. *J Endocrinol* 1987; **113**: 355–364.
- [10] CHEDRESE PJ, RAJKUMAR K, LY H, MURPHY BD. Dose response of luteinized porcine granulosa cells *in vitro* to prolactin: dependency on pre-exposure to human chorionic gonadotrophin. *Can J Physiol Pharmacol* 1988; **66**: 1337–1340.

- [11] CIERESZKO R. Sterydogeneza u loch w pierwszych dniach cyklu rujowego i jej zależność od egzogennej prolaktyny. *Praca doktorska wykonana w Akademii Rolniczo-Technicznej w Olsztynie*, 1990: 1–65.
- [12] CIERESZKO R. Mechanizm działania prolaktyny w układzie rozrodczym samicy. *Post Biol Kom* 2001, 28, Supl. 18: 57–67.
- [13] CIERESZKO R, DUSZA L. Exogenous prolactin elevates plasma progesterone concentrations and reduces androgen concentrations during the early luteal phase of the porcine estrous cycle. *Anim Reprod Sci* 1993; 31: 141–154.
- [14] CIERESZKO R, DUSZA L, OKRASA S, KOTWICA G, TILTON JE. Endocrine changes associated with spontaneous luteolysis in sows. II Temporal relationships among the concentrations of A_4 , T, E_1 and E_2 measured in utero-ovarian vein plasma. *Anim Reprod Sci* 1989; 21: 53–61.
- [15] CIERESZKO RE, PETROFF BK, OTTOBRE AC, GUAN Z, STOKES BT, OTTOBRE JS. Arachidonic acid inhibits hCG-stimulated progesterone production by *corpora lutea* of primates: potential mechanism of action. *Prostaglandins* 1995; 50: 103–119.
- [16] CIERESZKO RE, PETROFF BK, OTTOBRE AC, GUAN Z, STOKES BT, OTTOBRE JS. Assessment of the mechanism by which prolactin stimulates progesterone production by early *corpora lutea* of pigs. *J Endocrinol* 1998; 159: 201–209.
- [17] CIERESZKO R, OPAŁKA M, KAMIŃSKA B, DUSZA L. Luteotrophic action of prolactin during the early luteal phase in pigs: the involvement of protein kinases and phosphatases. *Reproduct Biol* 2001a, 1: 33–50.
- [18] CIERESZKO R, OPAŁKA M, RASZKOWSKA A, KITOWSKA E, DUSZA L. Udział kinazy i fosfatazy tyrozynowej w wewnątrzkomórkowym przekazywaniu sygnału niesionego przez prolaktynę w komórkach jajnika świni. *II Krajowy Zjazd Towarzystwa Biologii Rozrodu*, Warszawa, 5–8.06.2001b: 27.
- [19] CIERESZKO R, OPAŁKA M, KAMIŃSKA B, KAMIŃSKI T, DUSZA L. Prolactin involvement in the regulation of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis during the early luteal phase of the porcine estrous cycle. *Anim Reprod Sci* 2002; 69: 99–115.
- [20] CIERESZKO R, OPAŁKA M, KAMIŃSKA B, GÓRSKA T, DUSZA L. Prolactin signalling in porcine theca cells: the involvement of protein kinases and phosphatases. *Reprod Fertil Dev* 2003; 15: 1–9.
- [21] DAJEE M, KAZANSKY AV, RAUGHT B, HOCKE GM, FEY GH, RICHARDS JS. Prolactin induction of the α_2 -macroglobulin gene in rat ovarian granulosa cells: STAT5 activation and binding to the interleukin-6 response element. *Mol Endocrinol* 1996; 10: 171–184.
- [22] DEMANNO DA, MAIZELS ET, HUNZICKER-DUNN M. Hormonal regulation of the type III isoform of C-kinase in porcine ovarian tissues. *Mol Cell Endocrinol* 1992; 86: 157–166.
- [23] DOPPLER W. Regulation of gene expression by prolactin. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1994; 124: 93–130.
- [24] DOUGHERTY RW, NIEDEL JE. Cytosolic calcium regulates phorbol diester binding affinity in intact phagocytes. *J Biol Chem* 1986; 261: 4097–4100.
- [25] DUSZA L. Prolaktyna, jej wydzielanie i rola w rozrodzie świń. *Rocz Nauk Rolnicz, seria D, Monografie* 1987; 211: 1–78.
- [26] DUSZA L, KRZYMOWSKA H. Plasma prolactin concentration during the estrous cycle of sows. *J Reprod Fertil* 1979; 57: 511–514.
- [27] DUSZA L, TILTON JE. Role of prolactin in the regulation of ovarian function in pigs. *J Reprod Fertil* 1990; 40: 33–45.
- [28] DUSZA L, KRZYMOWSKA H, KOTWICA G, ZIĘCIK A, TILTON J. Prolactin, progesterone and luteinizing hormone secretion after bromocriptine (CB-154) treatment in cyclic sows. *Theriogenology* 1983; 20: 529–535.
- [29] DUSZA L, TILTON JE, WEIGL RM. Prolactin administration during the luteal and follicular phase of the estrous cycle in gilts. *J Reprod Fertil* 1986; 67: 161–172.
- [30] DUSZA L, OKRASA S, CIERESZKO R, KOTWICA G, TILTON JE. Endocrine changes associated with spontaneous luteolysis in sows. I. Temporal relationships among prolactin, prostaglandin $F_{2\alpha}$, progesterone i LH. *Anim Reprod Sci* 1988; 17: 115–122.
- [31] DUSZA L, CIERESZKO R, OKRASA S, KOTWICA G. Prolactin administration during the follicular phase of cyclic sows. *Anim Reprod Sci* 1993; 34: 147–158.
- [32] ENDO T, WATANABE H, YAMAMOTO H, TANAKA S, HASHIMOTO M. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ - and phorbol 12-myristate-13-acetate-stimulated progesterone production by cultured human luteal cells in the mid-luteal phase: prostaglandin $F_{2\alpha}$ increases cytosolic Ca^{2+} and inositol phosphates. *J Endocrinol* 1992; 133: 451–458.

- [33] FORD SL, ABAYASEKARA DRE, PERSAUD SJ, JONES PM. Role of phosphoprotein phosphatases in the *corpus luteum*: I. Identification and characterization of serine/threonine phosphoprotein phosphatases in isolated rat luteal cells. *J Endocrinol* 1996; **150**: 205–211.
- [34] FRASOR J, BARKAI U, ZHONG L, FAZLEABAS AT, GIBORI G. PRL-induced $Er\alpha$ gene expression is mediated by Janus Kinase 2 (JAK2) while signal transducer and activator of transcription 5b (STAT5b) phosphorylation involves JAK2 and a second tyrosine kinase. *Mol Endocrinol* 2001a; **15**: 1941–1952.
- [35] FRASOR J, PARK K, BYERS M, TELLERIA C, KITAMURA T, YU-LEE L-Y, DJIANE J, PARK-SARGE O-K, GIBORI G. Differential roles for signal transducers and activators of transcription 5a and 5b in PRL stimulation of $Er\alpha$ and $Er\beta$ transcription. *Mol Endocrinol* 2001b; **15**: 2172–2181.
- [36] GADSBY JE, EARNEST KL. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ stimulates progesterone secretion by porcine luteal cells *in vitro* throughout the estrous cycle. *Prostaglandins* 1994; **48**: 109–123.
- [37] GRATAN DR. Behavioural significance of prolactin signalling in the central nervous system during pregnancy and lactation. *Reproduction* 2002; **123**: 497–506.
- [38] GREGORASZCZUK E. Steroid hormone release in cultures of pig *corpus luteum* and granulosa cells: effect of LH, hCG, PRL, and estradiol. *Endocrinol Exp* 1983; **17**: 59–68.
- [39] GREGORASZCZUK E. Different responses of porcine large and small luteal cells to PRL in terms of progesterone and estradiol secretion *in vitro*. *Exp Clin Endocrinol* 1990; **96**: 234–237.
- [40] GREGORASZCZUK E, STOKŁOSOWA S. The effect of microtubule and microfilament-disrupting drugs on prolactin-stimulated progesterone synthesis and secretion by cultured porcine theca cells. *Acta Histochem* 1997; **99**: 207–215.
- [41] GREGORASZCZUK E, STOKŁOSOWA S, SŁOMCZYŃSKA M. Activation of protein kinase C by phorbol ester decrease PRL-stimulated progesterone production by porcine theca and luteal cells. *Pol J Gyn Invest* 1998: 137–141.
- [42] GREGORASZCZUK E, SŁOMCZYŃSKA M, STOKŁOSOWA S. Effect of genistein, tyrphostin and herbimycin on prolactin-stimulated progesterone production by porcine theca and luteal cells. *J Physiol Pharmacol* 1999; **50**: 477–484.
- [43] GRINWICH DL, MCKIBBIN PE, MURPHY BD. Stimulation of progesterone secretion in the pregnant pig *corpus luteum in vitro* by prolactin and lipoproteins. [w] Greenwald GS, Terranova PF. [red.] Factor Regulating Ovarian Function. New York, Raven Press 1983: 123–128.
- [44] HAMMOND JM, KRALL E. Steroid hormone modulate prolactin binding by cultured porcine granulosa cells. *Biochem Biophys Res Comm* 1979; **91**: 284–288.
- [45] HOFMANN J. The potential for isoenzyme-selective modulation of protein kinase C. *FASEB J* 1997; **11**: 649–669.
- [46] HOOGHE R, DOGUSAN Z, MARTENS N, VELKENIERS B, HOOGHE-PETERS EL. Effects of prolactin on signal transduction and gene expression: possible relevance for systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2001; **10**: 719–727.
- [47] HU H. Recent discovery and development of selective protein kinase C inhibitors. *Drug Discovery Today* 1996; **1**: 438–447.
- [48] HUNTER T. Tyrosine phosphorylation: past, present and future. *Biochem Soc Trans* 1996; **24**: 307–327.
- [49] JAKUBOWICZ T, GAŚSIOR E. Od kinazy fosforylasy ...do tysiąc i jednej białkowej kinazy? *Post Bioch* 1993; **39**: 2–7.
- [50] KALBAG SS, ROGINSKY MS, JELVEH Z, SULIMOVICI S. Phorbol ester, prolactin, and relaxin cause translocation of protein kinase C from cytosol to membranes in human endometrial cells. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1094**: 85–91.
- [51] KAMIŃSKA B, CIERESZKO RE, OPALKA M, DUSZA L. Prolactin signaling in porcine adrenocortical cells: Involvement of protein kinases. *Dom Anim Endocrinol* 2002; **23**: 475–491.
- [52] KAMIŃSKI T. 1995. Sekrecja hormonów steroidowych przez komórki warstwy ziarnistej i osłonki wewnętrznej pęcherzyka jajnikowego oraz komórki małe i duże ciała żółtego świń w odpowiedzi na analog met-enkefalinę FK 33-824 i hormony gonadotropowe. Praca doktorska wykonana w Instytucie Fizjologii Zwierząt Akademii Rolniczo-Technicznej w Olsztynie.
- [53] KAMIŃSKI T, OKRASA S, BOGACKA I, SIAWRYŚ G, PRZAŁA J. Porcine theca cells produce immunoreactive β -endorphin and change steroidogenesis in response to opioid agonist. *Acta Vet Hung* 2001; **49**: 319–329.
- [54] KOTWICA G, SOBCZAK J, KOZIOROWSKI M. Effects of opioid peptides, indomethacin and age on oxytocin and prolactin release during mating in sows. *Reprod Dom Anim* 1995; **30**: 257–263.

- [55] LIU D, WANG LH. Oncogenes, protein tyrosine kinases, and signal transduction. *J Biomed Sci* 1994; **1**: 65–82.
- [56] LIU J.-P. Protein kinase C and its substrates. *Mol Cell Endocrinol* 1996; **116**: 1–29.
- [57] LIU J-P, HECKMAN CA. The sevenfold way of PKC regulation. *Cellular Signaling* 1998; **10**: 529–542.
- [58] MURPHY BD, RAJKUMAR K. Prolactin as a luteotrophin. *Can J Physiol Pharmacol* 1985; **63**: 257–264.
- [59] PALEŃ E. Fosfatazy fosfoproteinowe. *Post Bioch* 1989; **35**: 363–369.
- [60] PORTER MB, BRUMSTED JR, SITES CK. Effect of prolactin on follicle-stimulating hormone receptor binding and progesterone production in cultured porcine granulosa cells. *Fertil Steril* 2000; **73**: 99–105.
- [61] PRZAŁA J, GRAŻUL A, WIĘSAK T. The influence of PRL on progesterone secretion by porcine luteal cells *in vitro*. *Anim Reprod Sci* 1984; **7**: 351–362.
- [62] RAJKUMAR K, MALINEK J, MURPHY BD. Effect of lipoproteins and luteotrophins on progesterone accumulation by luteal cells from the pregnant pig. *Steroids* 1985; **45**: 119–134.
- [63] RAJKUMAR K, KLINGSHORN P, CHEDRESE PJ, MURPHY BD. Prolactin, LH and estradiol-17 β in utilization of lipoprotein substrate by porcine granulosa cells *in vitro*. *Can J Physiol Pharmacol* 1988a; **66**: 561–566.
- [64] RAJKUMAR K, LY H, CHEDRESE PJ, MURPHY BD. Effect of prolactin and cyclic AMP on 125I-labelled low density lipoprotein uptake and metabolism by luteinized porcine granulosa cells in culture. *Can J Physiol Pharmacol* 1988b; **66**: 1450–1454.
- [65] RILLEMA JA, ETINDI RN, OFENSTEIN JP, WATERS SB. Mechanisms of prolactin action. [w] Knobil E, Neill J. [red.] *The Physiology of Reproduction*. New York, Raven Press 1988: 2217–2234.
- [66] ROLLAND R, GUNALUS GL, HAMMOND JM. Demonstration of specific binding of prolactin by porcine corpora lutea. *Endocrinology* 1976; **98**: 1083–1091.
- [67] RUSSELL DL, NORMAN RL, DAJEE M, LIU X, HENNINGHAUSEN L, RICHARDS JS. Prolactin-induced activation and binding of STAT protein to the IL-6RE of the α_2 -macroglobulin (α_2 M) promoter: relation to the expression of α_2 M in the ovary. *Biol Reprod* 1996; **55**: 1029–1038.
- [68] RUSSELL DL, RICHARDS J. Differentiation-dependent prolactin responsiveness and Stat (signal transducers and activators of transcription) signaling in rat ovarian cells. *Mol Endocrinol* 1999; **13**: 2049–2064.
- [69] RYBCZYŃSKA M, KSIĄŻEK K, KACZMAREK J. Rola izoform PKC w nowotworzeniu i apoptycznej śmierci komórek. *Post Hig Med Dośw* 2000; **54**: 777–796.
- [70] SŁOMCZYŃSKA M, GREGORASZCZUK E, KOCHMAN K, STOKŁOSOWA S. Prolactin binding analysis and immunohistochemical localization of prolactin receptor in porcine ovarian cells. *Endocrine J* 2001; **48**: 71–80.
- [71] STOKŁOSOWA S. The interaction of follicular cells and steroidogenic activity of the ovary. *Acta Physiol Pol* 1989; **40**: 35–52.
- [72] STOKŁOSOWA S, GREGORASZCZUK E. Do theca interna cells contribute to corpus luteum formation? Tissue culture approach. *Cell Biology Intl Reports* 1981; **5**: 770–771.
- [73] STOKŁOSOWA S, GREGORASZCZUK E. The involvement of prolactin in steroidogenesis. *Ginekologia Pol* 1996; **67**: 21–28.
- [74] SUN HS, TONKS NK. The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling. *TOBS* 1994; **19**: 480–485.
- [75] SZAFRAŃSKA B, TILTON JE. Prolactin as a luteotrophin during late pregnancy in pigs. *J Reprod Fertil* 1993; **98**: 643–648.
- [76] SZCZEGIELNIAK J, MUSZYŃSKA G. Kinazy białkowe zależne od jonów wapnia. *Post Biochem* 2000; **46**: 85–97.
- [77] THOMAS TP, GOPALAKRISHNA R, ANDRESON WB. Hormone- and tumor promoter-induced activation or membrane association of protein kinase C in intact cells. *Methods in Enzymology* 1987; **141**: 399–411.
- [78] VELDHUIS JD, HAMMOND JM. Oestrogens regulate divergent effects of prolactin in the ovary. *Nature* 1980; **284**: 262–264.
- [79] VELDHUIS JD, KLASE P, HAMMOND JM. Divergent effects of prolactin upon steroidogenesis by porcine granulosa cells *in vitro*: influence of cytodifferentiation. *Endocrinology* 1980; **107**: 42–46.
- [80] VELDHUIS JD, KLASE P, HAMMOND JM. Sex steroids modulate prolactin action on spontaneously luteinizing porcine granulosa cells *in vitro*. *Endocrinology* 1981; **108**: 1463–1468.

- [81] WATERS SB, RILLEMA JA, TARRANT JM. Studies on the possible role of protein kinase C in the prolactin regulation of cell replication in NB2 node lymphoma cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; **192**: 140–144.
- [82] WILTBANK MC, KNICKERBOCKER JJ, NISWENDER GD. Regulation of the *corpus luteum* by protein kinase C. 1. Phosphorylation activity and steroidogenic action in large and small ovine luteal cells. *Biol Reprod* 1989; **40**: 1194–1200.
- [83] YUAN W, CONNOR ML. Protein kinase C activity and its effect on progesterone production by large and small porcine luteal cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; **216**: 86–92.

Redaktor prowadzący – Marcin Zabel

Otrzymano: 02.06.2003 r.

Przyjęto: 18.07.2003 r.

Adres autora: 10-718 Olsztyn, ul. Oczapowskiego 1A,

e-mail: reniac@uwm.edu.pl

Dodatkowe informacje dla Autorów

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

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

Cennik w 2003 r.

	odbitki prac dla Autorów				barwne rysunki i zdjęcia	dodatkowe strony
Liczba odbitek	50	100	200	400	1 szt.	1 str.
Cena zł	100,00	120,00	150,00	200,00	400,00	50,00

Zamówienie na odbitki musi być złożone wraz z przesłaną korektą pracy

Warunki prenumeraty kwartalnika PBK

Prenumerata na rok 2003 i 2004

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 2004 pod adresem:
FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl
na konto: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A.,
IV O/Warszawa 201240105311110-00004-409-533.

Cena prenumeraty rocznika na rok 2003 i na rok 2004
dla instytucji (bibliotek) wynosi 150 zł,
dla odbiorców indywidualnych 40 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2004

should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland,
tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl:

On account: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A.,
IV O/Warszawa, No 201240105311110-00004-409-533.

Price per year 25 dollars USA or 21 €.

INFORMACJE DLA AUTORÓW

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

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają

1) artykuły przeglądowe nie przekraczające 15 stron druku i do 100 pozycji bibliograficznych koniecznie z ostatnich 5 lat (natomiast wcześniejsze prace mogą być pracami przeglądowymi);

2) doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach druku z kilkoma pozycjami bibliograficznymi z ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji);

3) listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przysyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 w układzie normalnym 1800 znaków na stronie z podwójnym odstępem. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki s.787) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nienumerowana przeznaczona dla redakcji winna zawierać: imiona, nazwiska, tytuły naukowe autorów i adresy: w pracy, domowy wraz z telefonem i e-mail, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rycin. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 1 str.) oraz słowa kluczowe 3 do 10 słów zgodnych z terminami w *Medical Subject Headings (Index Medicus)*, o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rycin, a jedynie zaznaczyć olówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, ryc. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według *Index Medicus* (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

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

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

Tabele, opisy schematów i rycin powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. **Barwne ryciny i zdjęcia są płatne.** Wymiary poszczególnych rycin, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmienionej formie. Wszystkie załączniki, np. wykaz skrótów, muszą mieć na odwrocie nazwisko 1. autora i oznaczenie góry i dołu ilustracji. Jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

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

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

Dołączono 2 kopie maszynopisu, tabel i rycin

Treść pracy nie była uprzednio publikowana, **tak nie** nie została wysłana do innej redakcji **tak nie**

Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę
Jest zgoda osób, których informacje nie-
publikowane są zamieszczone w tekście

Dołączono kopię pracy wraz z rycinami na dyskietce z
podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego
z komputera IBM **tak nie** **tak nie**

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

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

podpisy wszystkich autorów

TREŚĆ – CONTENTS

W tym Zeszytcie PBK	603
BANASIAK A. S.: Polarny transport auksyny – hipotezy i odkrycia Polar auxin transport – hypotheses and discoveries	605
SOWIŃSKI P.: Rurki sitowe – fenomen funkcjonalności Sieve tubes – phenomenon of functionality	619
STEMBALSKA-KOZŁOWSKA A., ŚMIGIEL R., SCHLADE-BARTUSIAK K., DUŚ D., SAŚIADEK M. Niestabilność genetyczna w nowotworach. II. Niestabilność mikrosatelitarna i utrata heterozygotyczności Genetic instability in cancer. II. Microsatellite instability and loss of heterozygosity	635
CIERESZKO I.: Molekularne podstawy odpowiedzi roślin na niedobór fosforanu Molecular responses of plant to phosphate starvation	647
KWIATKOWSKA-KORCZAK J., KWIATKOWSKA D.: Udział jądrowych receptorów ksenobiotyków w indukcji cytochromów P450 The role of nuclear xenobiotic receptors in cytochrome P450 induction	667
ARABSKI M., BŁASIAK J.: Molekularne aspekty infekcji wywołanej <i>Helicobacter pylori</i> Molecular aspects of <i>Helicobacter pylori</i> infection	679
BRZÓSKA E. Metaloproteiny ADAM – rola w fuzji komórek i proteolizie Metalloproteinases ADAM – the role in cell fusion and proteolysis	695
HOCHÓŁ A., RUCIŃSKI M., MALENDOWICZ W.: Cerebelina – Biosynteza, występowanie i rola Cerebellin – Synthesis, localization and role	707
ZIEMKA-NAŁĘCZ M.: Metaloproteazy w fizjologii i patologii ośrodkowego układu nerwowego Metalloproteinases in physiology and pathology of the central nervous system	721
ZARĘBSKI A. Przekaz sygnału od receptorów białek morfogenetycznych kości Signal transduction by Bone Morphogenetic Proteins receptors	735
FABCZAK H., SOBIERAJSKA K., FABCZAK S.: Fosducyna i jej izoformy – Regulatory białek G* Phosducin and its isoforms – regulators of G-protein functions	745
CIERESZKO R.: Mechanizm działania prolaktyny w jajniku dojrzałych płciowo świń Mechanism of prolactin action in reproductive tract of sows	763
Dodatkowe informacje dla Autorów oraz warunki prenumeraty	787