

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

VOL. 31, 2004

Suplement nr 22

Redaktorzy:

M. J. Olszewska i M. Kwiatkowska

**OD CYTOCHEMII
DO BIOLOGII MOLEKULARNEJ**

FROM CYTOCHEMISTRY
TO MOLECULAR BIOLOGY

**Postępy
Biologii
Komórki**

**Advances
in Cell
Biology**

www.pbkom.pl

rcin.org.pl

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

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

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

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

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

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

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

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA, 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 addressed to the Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

OD CYTOCHEMII DO BIOLOGII MOLEKULARNEJ

FROM CYTOCHEMISTRY TO MOLECULAR BIOLOGY

Redaktorzy: Maria J. Olszewska i Maria Kwiatkowska

OD REDAKCJI

Część artykułów i streszczeń zawartych w suplemencie nr 22 vol. 31, 2004 “Postępów Biologii Komórki” stanowi treść referatów przedstawionych na Konferencji “**Od cytochemii do biologii molekularnej**”, która została zorganizowana dla uhonorowania 55-lecia twórczej pracy naukowej **Prof. dr hab. Marii J. Olszewskiej** w dniach 4–5 czerwca 2004 w Ośrodku SGGW w Rogowie.

Pozostali autorzy (M. Godlewski, Z. Kiliańska, A. Lipińska i M. Kwiatkowska) swoim udziałem w postaci artykułów przeglądowych włączonych do suplementu pragnęli wyrazić wielkie uznanie, uszanowanie i sympatię dla **Jubilatki**.

Organizatorzy



Mari Olvera

Warszawa, 21 kwietnia 2004.

Pani
Prof. dr hab. Maria Olszewska
Członek korespondent PAN

Wielce Szanowna i Droga Pani Profesor,

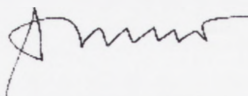
Z okazji jubileuszu urodzin, w imieniu Prezydium Polskiej Akademii Nauk, Wydziału Nauk Biologicznych PAN oraz swoim własnym składam Pani Profesor najserdeczniejsze gratulacje.

Autorytet Pani Profesor jako wybitnego biologa, tak wspaniale i bez reszty oddanego nauce badacza, pedagoga i organizatora życia naukowego jest od dawna ugruntowany zarówno w krajowym, jak też międzynarodowym środowisku naukowym. Swoimi wybitnymi osiągnięciami przyczyniła się Pani Profesor do stworzenia i rozwoju polskiej szkoły nowoczesnej cytologii roślin. Szczególnym uznaniem całego środowiska biologów cieszą się wybitne osiągnięcia Pani Profesor poświęcone wewnątrzkomórkowej lokalizacji enzymów hydrolitycznych, roli jądra komórkowego w procesach wzrostu i różnicowania komórek oraz mechanizmom regulującym cykl komórkowy. Badania naukowe Pani Profesor zaowocowały wieloma pracami doświadczalnymi opublikowanymi w prestiżowych czasopismach krajowych i zagranicznych, artykułami przeglądowymi oraz podręcznikami akademickimi. Zaowocowały także stworzeniem najpiękniejszego wzorca, jakim uczony może obdarować swych uczniów – ukazały wagę osobistego, warsztatowego przekazu przesłania badawczego.

Działalność naukowa Pani Profesor związana jest nieprzerwanie z Uniwersytetem Łódzkim, w którym zdobyła Pani nie tylko kolejne tytuły naukowe, ale też przez wiele lat sprawowała funkcję kierownika Katedry Cytologii i Cytochemii Roślin. Godną podziwu inicjatywę wykazuje Pani Profesor w zakresie organizowania życia naukowego jako członek wielu gremiów naukowych. Pragnę także przekazać słowa najwyższego uznania dla Pani wieloletniej, nieustrudzonej, ofiarnej i owocnej działalności w Prezydium PAN oraz Oddziale PAN w Łodzi.

Niewielu jest uczonych, którzy mogą poszczycić się tak znakomitymi osiągnięciami badawczymi, a także aktywnością i zaangażowaniem na rzecz rozwoju biologii komórki roślinnej. Uczonych cieszących się szacunkiem, uznaniem i wielką sympatią całego naszego środowiska. Proszę przyjąć, Szanowna i Droga Pani Profesor, wyrazy mojego podziękowania za trud wniesiony w rozwój nauki w Polsce oraz najlepsze życzenia dalszej, twórczej pracy badawczej, dobrego zdrowia i osobistej pomyślności.

Łączę wyrazy najgłębszego szacunku



Andrzej B. Legocki

STRUKTURA I EWOLUCJA KOMPLEKSU CENTROMER/KINETOCHOR

STRUCTURE AND EVOLUTION OF CENTROMERE/KINETOCHORE COMPLEX

MARIA JOANNA OLSZEWSKA

Zakład Cytogenetyki i Biologii Molekularnej Roślin Uniwersytetu Łódzkiego

Streszczenie: W artykule omówiono aktualne poglądy na temat istoty chromatyny centromerowej na przykładzie powstawania neocentromerów; obecnie wydaje się, że nie DNA, lecz białka centromerowe decydują o powstawaniu neocentromerów. Budowa kompleksów centromer/kinetochor w chromosomach holocentrycznych jest podobna, jak w chromosomach monocentrycznych. DNA centromerowy ulega szybkiej dywergencji spowodowanej przez mutacje punktowe oraz insercje i delecje. Białka centromeru i kinetochoru – CENP – mają charakter konserwatywny, tj. wykazują znaczny stopień homologii między drożdżami i wyższymi Eukaryota – zwierzętami i roślinami. Niedobór, brak lub modyfikacje CENP powodują niesprawność systemu centromer/kinetochor, wyrażającą się błędną segregacją siostrzanych chromatyd w anafazie. Również konserwatywne są białka kompleksu kohezyjnego.

Słowa kluczowe: ewolucja centromerowego DNA i białek, neocentromery, montowanie kompleksu centromer/kinetochor.

Summary: In this article the identity of centromere chromatin is discussed on the basis of recent opinions concerning the formation of neocentromeres; it seems that not DNA but centromeric proteins are involved in this process. The structure of centromere/kinetochore complexes in holocentric chromosomes is similar to that in monocentric ones. Centromeric DNA undergoes rapid divergence due to point mutations, insertions and deletions. Centromeric and kinetochore proteins – CENPs – are conserved, i.e. they display a high degree of homology between yeast and higher Eukaryota (animals and plants). Deficiency, lack or modifications of CENPs result in improper sister chromatids segregation during anaphase. Proteins of cohesion complex seem to be conserved, as well.

Key words: evolution of centromeric DNA and proteins, neocentromeres, centromere/kinetochore assembly.

WSTĘP

W poprzednim artykule [33] zostały przedstawione informacje o DNA centromerowym ze szczególnym uwzględnieniem roślin wyższych oraz podstawowe dane o białkach kompleksu centromer/kinetochor. Struktura i funkcjonowanie tego kompleksu nadal budzi zainteresowanie badaczy ze względu na jego rolę w poprawnej segregacji chromosomów homologicznych podczas I podziału mejozy i chromatyd w mitozie i II podziale mejozy. Cechą DNA centromerowego jest wychwytywanie białek kinetochoru i przyłączanie tej struktury do mikrotubul wrzeciona, a także podtrzymywanie kohezji siostrzanych chromatyd. Wiedza o mechanizmach uczestniczących w tych procesach jest konieczna do konstruowania sztucznych chromosomów (*Artificial Chromosomes*, AC), w których pokłada się wielkie nadzieje jako potencjalnych wektorach przenoszących wybrane geny z myślą o ich zastosowaniu w biotechnologii i medycynie.

W tym artykule, opracowanym na podstawie najnowszych danych głównie z lat 2002–2003, zwrócono uwagę na tzw. centromeryzację (termin wprowadzony przez Choo [6]), czyli te cechy DNA, które determinują jego przekształcenie w DNA centromerowy (na przykładzie neocentromerów), a także na ewolucję DNA centromerowego i konserwatywność białek kompleksu centromer/kinetochor. Przytoczone są również najnowsze dane na temat tworzenia i rozpadu kompleksu kohezyjnego.

REPLIKACJA DNA ORAZ CHROMATYNA W CENTROMERACH I NEOCENTROMERACH

Centromery. Można było oczekiwać, że okres fazy S, w którym następuje replikacja DNA centromerowego, ze względu na heterochromatynowy charakter chromatyny powinien mieć miejsce w późnej fazie S. We współczesnych badaniach dotyczących tego zagadnienia jako wyznacznik regionu centromerowego przyjmuje się obecność specyficznego dla centromerów konstytutywnego białka CENP-A, zastępującego w nukleosomach histon H3. Uzyskane dotąd dane wskazują, że DNA centromerowy bywa replikowany w rozmaitych okresach fazy S, w zależności od obiektu. U *Saccharomyces cerevisiae* DNA centromerowy jest replikowany we wczesnej fazie S. Nie wiadomo, kiedy nowe cząsteczki Csc4, homologu CENP-A, są przyłączane do nowopowstających nukleosomów. U *Schizosaccharomyces pombe* dokładny okres replikacji DNA centromerowego nie został stwierdzony. U *Drosophila* DNA centromerowy według jednych autorów jest replikowany asynchronicznie w okresie od środkowej do późnej fazy S [39] według innych [1] – we wczesnej fazie S. U bobu DNA centromerowy jest replikowany w pierwszej połowie fazy S (ref. [21]). U człowieka replikacja zachodzi asynchronicznie, równoległe z innymi regionami chromosomów, w czasie od środkowej do późnej fazy S [36]. Z przytoczonych danych nie wynika, aby okres syntezy DNA centromerowego podlegał modyfikacjom ewolucyjnym.

Neocentromery. Funkcjonalne neocentromery, wyposażone we wszystkie białka obecne w normalnym kompleksie centromer/kinetochor, mogą być tworzone *de novo* u wielu organizmów z niecentromerowego DNA (ref. [6, 33]). Neocentromery raz wytworzone są stabilne, przynajmniej u człowieka. Nie wszystkie regiony genomu mogą z równą łatwością osiągać funkcję centromeru. Wśród 41 ludzkich neocentromerów opisanych do 2000 r., 8 występowało na chromosomie 13q i 7 na 15q, ale tylko 1 na chromosomach 21 i X, zaś nigdy – na chromosomie 18 (ref. [42]).

Wspólną cechą chromatyny normalnych centromerów i neocentromerów, wykazaną u człowieka, jest obecność białka PARP (polimerazy poli(ADP) rybozy), które charakteryzuje się wybiórczą zdolnością do wiązania się do 9-nukleotydowej sekwencji w podwójnej nici DNA w α -satelitarnym DNA centromerów i w niespokrewnionym tandemowym powtórzeniu 28 pbz znalezionym w ludzkim neocentromerze dicentrycznego chromosomu (ref. [6]).

Wspólną cechą DNA centromerów i neocentromerów, stwierdzoną na podstawie analizy chromatyny wiążącej CENP-A, jest dominacja par AT i brak albo nieznaczna liczba genów [21], por. [28].

Wiele danych sugeruje, że istotną cechą chromatyny warunkującą powstawanie neocentromerów jest konformacja DNA [2]. Obszary bogate w heterochromatynę wydają się być regionem preferowanym dla tworzenia neocentromerów. Jednak u człowieka, obok wybiórczej lokalizacji neocentromerów w obrębie bloków heterochromatynowych, zostały opisane przypadki, w których neocentromery znajdują się w regionach euchromatynowych. U myszy wykazano obecność w neocentromerach euchromatynowych białek M31, analogów białek heterochromatynowych HP-1 (ref. [6]). Obecność heterochromatyny jest niezbędna dla kohezji w regionie centromerowym [4] (por. niżej **Kompleks kohezyjny**). U roślin, dzięki zastosowaniu metody FISH, można było porównać sekwencje DNA obecne w normalnych centromerach i neocentromerach kukurydzy i żyta. U obu gatunków preferowanym miejscem tworzenia neocentromerów są regiony bogate w heterochromatynę. Ani w neocentromerach kukurydzy, ani żyta nie wykryto obecności sekwencji specyficznych dla normalnych centromerów, tj. MCS1 u kukurydzy (ref. [33]), CCS1 – dla żyta [25, 26].

Jak wynika z przytoczonych danych, wspólną cechą DNA funkcjonalnych centromerów i neocentromerów nie jest jego struktura I-rzędowa, lecz konformacja i wysoki stan kondensacji chromatyny [2]. Ta cecha mogłaby być wstępnym warunkiem dla powstawania neocentromerów. Przyjęto, że istota centromeryzacji [6] jest determinowana przez epigenetyczne piętno na chromosomach, wywarne w miejscu na nie podatnym. U człowieka są nimi np. w szczególności długie ramiona chromosomów 13 i 15 [6]. Postulowano, że kandydatami do tej roli, poza wspomnianą konformacją chromatyny, mógłby być szczególny okres replikacji centromerowego DNA oraz metylacja DNA i histonu H3 (ref. [21, 36]).

Badania porównawcze dotyczące czasu replikacji DNA neocentromeru i normalnego centromeru zostały przeprowadzone na neocentromerach w regionie 10q25.3 chromosomu człowieka, pozbawionym w tym regionie α -satelitarnego DNA. W regionie neocentromerowym DNA replikuje się w środkowej fazie S. Tworzeniu neocentromeru

towarzyszy opóźnienie replikacji DNA wokół właściwego neocentromeru, tj. wokół obszaru wiążącego CENP-A; opóźnienie to jest większe z jednej strony neocentromeru [21].

Dotychczas uzyskane dane (por. wyżej) wskazują, że u zbadanych dotąd organizmów replikacja centromerowego DNA odbywa się w rozmaitych okresach fazy S, zatem okresu replikacji DNA nie można zaliczyć do czynników identyfikujących centromerowy DNA. Jest możliwe, że wyłączenie histonu H3 podczas replikacji DNA i zastąpienie go przez CENP-A jest jednym ze wstępnych warunków powstania funkcjonalnego neocentromeru [1].

Obecnie trudno jest definitywnie ocenić znaczenie metylacji. Metylacja lizyny w histonie H3 była badana *in situ* tylko w chromocentrach *Arabidopsis thaliana*; przeważająca liczba tych chromocentów stanowi interfazową postać chromatyny centromerowej i przycentromerowej. Wykazano w nich wysoki poziom metylacji lizyny 9. w H3, ale metylacja lizyny 9. nie jest konieczna dla istnienia poprawnej struktury chromocentów [13]. Natomiast u *Schizosaccharomyces pombe* metylacja lizyny 9. w heterochromatynie przycentromerowej jest jednym z czynników niezbędnych dla utrzymania w niej braku aktywności transkrypcyjnej. U mutantów drożdży rozszczepkowych, w których procesy z udziałem RNAi zapewniające dezaktywację transkrypcyjną tej heterochromatyny są uszkodzone, mają miejsce zakłócenia w segregacji chromosomów [44]. Jest więc możliwe, że w przypadku przyszłych neocentromerów powstanie kompetencji chromatyny do montowania kinetochorów jest uwarunkowane przez mechanizmy powodujące jej wyciszenie transkrypcyjne, co – jak się wydaje – może być wspólną właściwością tak odległych ewolucyjnie organizmów jak drożdże i roślina okryta zarodkiem.

CHROMOSOMY HOLOCENTRYCZNE

Nicienie, owady (pluskwiaki i łuskoskrzydłe) oraz niektóre gatunki roślin jednoliściennych mają chromosomy holocentryczne, tj. takie, w których centromery są rozproszone wzdłuż całych ramion chromosomów. Wyniki badań cytochemicznych w mikroskopie świetlnym oraz badań w mikroskopie elektronowym wykazały, że pojedynczy kompleks centromer/kinetochor jest zbudowany podobnie jak w chromosomach monocentrycznych (ref. [34]).

Nie jest obecnie rozstrzygnięte, czy holocentryczne chromosomy stanowią pierwotną formę centromerów, czy wyewoluowały one z chromosomów monocentrycznych. W pierwotnych chromosomach holocentrycznych centromerowo-specyficzne sekwencje DNA mogłyby być przypadkowo rozmieszczone wzdłuż całego chromosomu i dopiero inwazja transpozonów przyczyniłaby się do wytworzenia flankującej heterochromatyny, która u wielu gatunków z monocentrycznymi chromosomami jest bogata w retroelementy (ref. [33]). Jednak jest również możliwe, że holocentryczne chromosomy wyewoluowały z monocentrycznych wskutek ubytku heterochromatyny i poprzez rozpowszechnienie się *cis* chromatyny centromerowej w sposób analogiczny do generowania neocentromerów u *Drosophila* [39]. U wielu gatunków z chromosomami holocentrycznymi stwierdzono obecność satelitarnych DNA (ref. [24]), ale u przedstawiciela *Lepidoptera*,

Mammestra brassicae, sekwencje satelitarne są obecne tylko w chromosomach płci, jedynych zawierających heterochromatynę [24].

W genomie nicienia *Caenorhabditis elegans*, modelowego organizmu w badaniach chromosomów holocentrycznych, obecne są geny *hcp-3* kodujące białka homologiczne do CENP-A i 2 geny – *hcp-1* i *hcp-2* kodujące białko homologiczne do CENP-H (ref. [32]).

Istotna różnica między centromerami chromosomów monocentrycznych i holocentrycznych polega na tym, że w holocentrycznych montowanie białka homologicznego do CENP-C nazwanego w holocentrycznych białkiem HCP-4, następuje dopiero podczas mitozy (por. niżej, Montowanie kompleksu centromer/kinetochor). Ponadto w monocentrycznych chromosomach w metafazie mitozy silnie jest ufosforylowany histon H3 w chromatynie przycentromerowej, zaś w holocentrycznych – silna fosforylacja tego histonu ma miejsce wzdłuż całych chromosomów (ref. [12]).

EWOLUCJA DNA CENTROMEROWEGO

W toku ewolucji struktura centromeru i jego DNA stawała się coraz bardziej złożona, co można prześledzić porównując centromery u 3 gatunków drożdży i centromery człowieka na przykładzie chromosomu X. Najbardziej prymitywne z dotąd poznanych centromery *Saccharomyces cerevisiae* mają długość 125 pz i składają się z 3 elementów: CDEI, CDEII i CDEIII. CDEI i CDEIII zawierają miejsca wiążące białka i oflankowują CDEII. Modyfikację tej struktury stwierdzono ostatnio u *Kluyveromyces lactis*, którego centromery zawierają, obok CDEI i CDEII (ta druga sekwencja jest dwa razy dłuższa niż u *S. cerevisiae*) dodatkowy konserwatywny segment DNA – CDEO o nieznanej dotąd funkcji. U *Schizosaccharomyces pombe* region centromerowy ma długość 35–110 kpz. Składa się z centralnego rdzenia zwanego cnt o długości 4,1 kpz, w obrębie którego region zawierający 1,4 kpz wykazuje 48% identyczności w obrębie 3 chromosomów. Centralny rdzeń jest oflankowany przez sekwencje powtarzalne, zwane wewnętrznymi, o długości 5,6 kpz, w obrębie których znajdują się geny tRNA. Sekwencje powtarzalne zewnętrzne składają się z 3 odrębnych rodzajów DNA; są to powtórzenia zwane dg (4,4 kpz), cent253 (0,3 kpz) i dh (4,8 kpz). Powtórzenia dg są najbardziej konserwatywne w obrębie DNA centromerowego. Sekwencje cnt (rdzeniowe) i powtórzenia dg są jedynymi składnikami istotnymi dla funkcjonowania centromeru u *S. pombe*. W ludzkim chromosomie X region centromerowy o długości 2 Mpz składa się z wysoce homogennych układów α -satelitarnego DNA (monomer pok. 170 pz), zwanego DX21, oflankowanego przez α -satelitarne i γ -satelitarne powtórzenia DNA. Homologia tych sekwencji zmniejsza się z 99% do 70% na jego obrzeżach [10, 23]. Wiadomo, że DNA centromerowy w poszczególnych chromosomach człowieka nieco się różni, podobnie jak u *Arabidopsis thaliana* (ref. [33]). W chromosomie X dywergencja I-rzędowej struktury następowała w wyniku mutacji i transpozycji. Jeżeli integralność układów powtarzalnych DNA jest istotna dla funkcji centromeru, to młode ewolucyjnie homogenne powtórzenia DNA wchodziłyby w skład funkcjonalnej części

centromeru, zaś zdegradowane, tj. te o niższym poziomie homologii tworzyłyby heterochromatynę przycentromerową [10]. Taka geneza heterochromatyny przycentromerowej nie jest regułą. U *Ceratitits capitata* (śródziemnomorska muszka owocowa) znajdujący się w tym regionie satelitarny DNA, zbudowany z tandemowych monomerów długości 44 pz, obecny jest tylko w heterochromatynie przycentromerowej i jest gatunkowo specyficzny, dzięki czemu może służyć jako sonda molekularna do identyfikacji tego szkodnika [37].

W 2003 r. nie nastąpiły odkrycia nowych sekwencji DNA centromerowego ani u roślin, ani u zwierząt. Wyjątek stanowi sklonowanie i analiza struktury I-rzędowej sekwencji z DNA *Aegilops speltoides* zawierającej 301 pz, w której znajduje się motywy mikrosatelitarny składający się z 16 powtórzeń CAA [5]. Jest to pierwsze doniesienie o obecności sekwencji mikrosatelitarnej w DNA centromerowym u roślin, stwierdzonej na podstawie sekwencjonowania, bowiem dotychczasowe dane na ten temat opierały się na wynikach FISH (ref. [33]). Wyniki FISH ze wspomnianą sekwencją z DNA z *Aegilops speltoides* były pozytywne nie tylko w centromerach tego gatunku, ale także u *Triticum durum*, *T. monococcum* i *Secale cereale*. Na podstawie homologii można przypuścić, że omawiana sekwencja powstała z podobnych do *cereba* retroelementów, należących do rodziny *gypsy* [5]. Retroelementy mogą stanowić typową chromatinę centromerową, ponieważ wiążą białko nukleosomów centromerowych CENP-A [45].

DNA centromerowy u zbóż jest bogaty w ruchome elementy. Każdy centromer jęczmienia zawiera ok. 200 elementów *cereba*. Spokrewnione z *cereba* retroelementy są także u kukurydzy, sorgo, pszenicy, żyta, ryżu, owsa, a nawet u buraka. U większości gatunków te retroelementy nie są wykrywane w ramionach chromosomów. Przypuszczalnie pojawiły się one ok. 60 milionów lat temu i prawdopodobnie pochodzą z pojedynczej rodziny transpozonów i uległy nieregularnemu rozproszeniu między centromerowymi sekwencjami satelitarnymi, a niektóre z nich są nadal zdolne do transkrypcji (ref. [12]). Z drugiej strony, możliwość pochodzenia centromerowych sekwencji satelitarnych z retroelementów jest brana pod uwagę przez wielu autorów. Aktywnym retroelementom, tj. ulegającym transkrypcji, przypisuje się udział w zastępowaniu w nukleosomach chromatyny centromerowej histonu H3 przez podobne do niego białko CENP-A (u roślin zwane CENH3) [14]. Brak sekwencji typu retroelementów w neocentromerach, które nie zawsze zawierają sekwencje satelitarne (por. wyżej, Replikacja DNA ...), wskazuje, że obecność retroelementów nie jest konieczna do funkcjonowania centromerów, tj. do segregacji chromatyd [12].

Układy satelitarnego DNA w centromerach mogą osiągać długość kilku Mpz. U *Arabidopsis thaliana* każdy z 5 centromerów zawiera 2–4 Mpz, zbudowanych z bloków powtórzeń 180 pz. Wśród nich znajdują się rozproszone liczne pseudogeny i geny ulegające ekspresji – EST [8].

U większości gatunków satelitarne sekwencje obecne są w centromerach w nadmiarze. Świadczą o tym wyniki doświadczeń ze sztucznymi chromosomami. Minimalna długość funkcjonalnych loci centromerowych u ryżu oceniona na podstawie mapowania fizycznego w YAC (sztuczne chromosomy drożdży) wynosi: dla chromosomu 1. – 1390 kpz, dla 7. – 2160 kpz, dla 9. – 1610 kpz, dla 11. – 1220 kpz, przy całkowitej długości, np. w chromosomie 5. powyżej 2 Mpz [17]. U kukurydzy centromer chromosomu B

składa się z ponad 9 Mpz, zaś powstałe z niego chromosomy w wyniku błędnych podziałów centromerów mogą w DNA centromerowym zawierać zaledwie 200–500 kpz (ref. [14]). Jednak te mini-B-chromosomy składające się z mniej niż 1000 kpz wykazują zredukowaną funkcjonalność podczas mejozy, zaś takie chromosomy z centromerowymi powtórzeniami poniżej 500 kpz są defektywne również podczas mitozy (ref. [12]).

Wśród roślin spokrewnione gatunki zawierają centromerowe DNA o znacznej homologii. Jednak, ponieważ wspólną cechą centromerowych powtórzeń satelitarnych jest ich szybka dywergencja, nie tylko poszczególne chromosomy np. u *Arabidopsis thaliana* [8], (ref. [33]), ale również poszczególne gatunki mogą różnić się strukturą I-rzędową. Wyniki porównania sekwencji DNA centromerowych u 4 gatunków *Arabidopsis*: *thaliana* ($2n = 2x = 10$), *griffithiana* ($2n = 32$), *suecica* ($2n = 26$), *pumila* ($2n = 32$), *arenosa* ($2n = 4x = 32$) metodą Southern wykazały istnienie homologii powtórzeń 180 pz tylko między *A. griffithiana* i *A. pumila* [11]. Jednak pewne regiony w monomerach wykazują konserwatywność u wszystkich lub tylko niektórych gatunków. Jednym z takich odcinków DNA jest nazwany motywem A u *A. thaliana*, składający się z 30 pz, obecny u *A. arenosa*. Małą zmienność wykazuje także motyw B składający się z 24 pz. Różnice w strukturze I-rzędowej klonów uzyskanych z tego samego gatunku lub nieznaczne różnice w motywach konserwatywnych są przypisywane mutacjom punktowym oraz, w mniejszym stopniu, insercjom i delecjom [11], ponieważ region centromerowy nie podlega rekombinacji. Przytoczone wyniki stanowią dowód, że centromerowe satelitarne sekwencje DNA należą do sekwencji podlegających bardzo szybkiej ewolucji.

HOMOLOGIA BIAŁEK CENTROMEROWYCH – CENP

Białka kompleksu centromer/kinetochor (CENP – *CEN*trimeric *P*rotein) są aktualnie intensywnie badane. Można przyjąć, że do 2002 r. stwierdzono u *Saccharomyces cerevisiae* istnienie ok. 50 takich białek, u zwierząt i człowieka – około 20, u roślin wyższych – przynajmniej 14. Różnice w liczbie rozpoznanych białek są spowodowane przez znaczne trudności techniczne w identyfikacji tych białek u wyższych Eukaryota. Niektóre białka z grupy CENP są obecne w centromerach podczas całego cyklu komórkowego; są to białka konstytutywne. Pozostałe pojawiają się dopiero wraz z inicjacją mitozy/mejozy; nadano im nazwę fakultatywne lub przejściowe (tab. 1; ref. [33]).

Nazwy nadawane są białkom centromerowym w sposób dowolny, niezależnie od już istniejących terminów. Np. nazwa CENP-A, nadana białku zastępującemu histon H3 w nukleosomach chromatyny centromerowej, odnosi się do człowieka, myszy i *Xenopus*. Homologiczne białka u innych gatunków to u: *Saccharomyces cerevisiae* – Cse4, *Schizosaccharomyces pombe* – Cnp1, *Drosophila* – Cid, *Caenorhabditis elegans* – HCP-3, *Arabidopsis thaliana* i inne rośliny wyższe – CENH3 (*CEN*trimeric-specific histone **H3**) i jego wariant HTB12. Wykaz nazw niektórych innych białek kompleksu centromer/kinetochor podane są w tabeli 1 w artykule Houbena i Schuberta [12]. Dla uproszczenia w niniejszym artykule używane są nazwy nadawane ludzkim białkom z grupy CENP.

TABELA 1. Białka centromerowe (*CENTromeric Proteins*) konstytutywne

Nazwa w odniesieniu do człowieka	Wykryte homologie (rzędu 48–75%)	Funkcja
CENP-A	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Schizosaccharomyces pombe</i> <i>Caenorhabditis elegans</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Zea mays</i> mysz	zastępuje H3 w nukleosomach DNA centromerowego; mutacje powodują nondysjunkcję u drożdży, myszy i <i>C. elegans</i> , brak jest letalny
CENP-B	liczne Eukaryota <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Triticeae</i> <i>Phaseolus vulgaris</i>	wiąże się z określonymi sekwencjami DNA centromerowymi; brak genu nie zakłóca ani powstawania kinetochorów, ani przebiegu mitozy
CENP-C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Schizosaccharomyces pombe</i> <i>Caenorhabditis elegans</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Zea mays</i>	wiąże się bezpośrednio z DNA centromerowym; uszkodzenie genu powoduje zakłócenie segregacji chromosomów
CENP-I	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Schizosaccharomyces pombe</i> kur domowy szczur	niezbędne do prawidłowej lokalizacji CENP-F w kinetochorze; brak powoduje zakłócenia w przebiegu mitozy

U wyższych Eukaryota ewolucję niektórych CENP badano porównując % homologii struktury I-rzędowej kodujących je genów, sekwencji aminokwasów oraz efektywność wiązania metodą *in situ* znakowanych przeciwciał przeciwko wybranym CENP uzyskanych z odległych gatunków.

Najwięcej uwagi poświęcono białku CENP-A, zapewne ze względu na jego podstawową rolę w powstawaniu chromatyny centromerowej (tab. 1). Różnica między histonem H3 a CENP-A i jego homologami polega na wysokiej dywergencji CENP-A w jego krańcu N-terminalnym, który może znacznie różnić się pod względem długości i składu aminokwasowego, nawet wśród blisko spokrewnionych organizmów [14, 40]. O homologii różnych wariantów decyduje więc domena rdzeniowa tego białka, wykazująca 30–60% homologii, jak to wykazano u wszystkich badanych gatunków [40, 42].

CENP-B nie jest białkiem powszechnie występującym we wszystkich funkcjonalnych kompleksach centromer/kinetochor (tab. 1; por. niżej Montowane kompleksu centromer/kinetochor). CENP-B wykazuje znaczną homologię do białek związanych z ruchomymi elementami obecnymi w DNA centromerowym, co skłania do sugestii, że CENP-B może pochodzić z transpozazy [11].

Homologię między CENP-C a białkami obecnymi w kompleksie centromer/kinetochor stwierdzono u *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Caenorhabditis elegans*, kręgowców, *Zea mays* i *Arabidopsis thaliana* (ref. [42]). U kukurydzy znaleziono trzy różne klasy cDNA dla homologów CENP-C (ref. [30]). Metodami *in*

TABELA 2. Białka centromerowe – CENP fakultatywne

Nazwa w odniesieniu do człowieka	Wykryte homologie	Funkcja
CENP-E	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Vicia faba</i> <i>Hordeum vulgare</i>	pośredniczy w przemieszczaniu się chromosomów do strefy równikowej w prometafazie
CENP-F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Caenorhabditis elegans</i> <i>Vicia faba</i> <i>Hordeum vulgare</i>	obecne w kinetochorze wczesna profaza-wczesna anafaza, współdziała z CENP-E
CENP-G	wykryte tylko u ssaków	motoryczna
CENP-H	ptaki, ssaki	motoryczna

situ wykazano istnienie sygnału immunofluorescencyjnego przeciwciała przeciwko ludzkiemu CENP-C w regionie centromerowym bobu. Przeciwciała przeciwko CENP-C z kukurydzy dawały sygnał fluorescencyjny w chromosomach jęczmienia i bobu, ale nie było znakowania w chromosomach człowieka. Brak sygnału może być spowodowany przez udział innych epitopów z CENP-C w stosowanych przeciwciałach [41]. Ludzki CENP-I składa się z 756 aminokwasów. Białko to wykazuje 72% homologii do CENP-I szczura i 56% do tego białka u kurczęcia oraz ograniczone podobieństwo do centromerowych białek Ctf3 u *Saccharomyces cerevisiae* i do Mis6 u *Schizosaccharomyces pombe* [20].

CENP-E (białko fakultatywne) jest jednym z białek kinetochorowych, zaangażowanych w ruchy chromosomów (tab. 2). W jego cząsteczce, podobnie jak w CENP-F, znajduje się domena kinezynowa. Oba te białka są obecne również u roślin. Zidentyfikowano podobne do CENP-E białko u jęczmienia – Cpel1 i Cpe12. Cpe12 stanowi prawdopodobnie homolog CENP-E; Cpel1 wykazuje podobieństwo do jednej z domen w CENP-E, ale nie zawiera domeny kinezynowej [41], (ref. [12]). Metodami immunocytochemicznymi wykazano, że przeciwciała przeciwko ludzkiemu CENP-E dawały słaby sygnał w regionie centromerowym chromosomów bobu, ale silny – u jęczmienia. Podobnie silny sygnał oznakowanego fluorescencyjnie przeciwciała przeciwko ludzkiemu CENP-F był w chromosomach bobu [41].

U wyższych Eukaryota stwierdzono obecność białek niezaliczanych do CENP, zidentyfikowanych u drożdży i uczestniczących w funkcjonowaniu kompleksu centromer/kinetochor (por. niżej, Montowanie kompleksu centromer/kinetochor). Przepuszczalne homologie centromerowego czynnika wiążącego CBF5 i drożdżowego SKP1, który jest częścią kompleksu CBF2, są obecne w roślinnych kinetochorach oraz u *Metazoa* (ref. [12, 30]).

Z przytoczonych danych wynika, że białka kompleksu centromer/kinetochor nie są konserwatywne w sposób doskonały. Wiele z nich zawiera długie sekwencje odmienne, a podobieństwo jest ograniczone tylko do pewnych domen. Mimo tych różnic, ich funkcja w

procesie prawidłowej segregacji chromatyd jest podobna, o czym świadczy defektywna segregacja w przypadku centromerów i kinetochorów pozbawionych nawet jednego z tych białek.

MONTOWANIE KOMPLEKSU CENTROMER/KINETOCHOR

Jak wspomniano wyżej, u *Saccharomyces cerevisiae* centromer jest zbudowany tylko z sekwencji DNA zwanych CDEI, CDEII i CDEIII o poznanej strukturze I-rzędowej. CDEII, ok. 125 pz, oflankowana jest przez sekwencje CDEI i CDEIII. Do CDEIII wiąże się kompleks wielobiałkowy CBF3, składający się z czterech rozmaitych białek, w tym homologu CENP-C; brak tego kompleksu powoduje utratę funkcji przez kinetochor i zerwanie wszystkich interakcji białek kinetochoru z centromerem. Inny kompleks wielobiałkowy zawierający białko Ndc80p w połączeniu z trzema innymi tworzy ewolucyjnie konserwatywną część kinetochoru i jest, podobnie jak kompleks CBF3, istotny dla poprawnej segregacji chromosomów [31].

Szczególną cechą chromatyny centromerowej jest zastąpienie w jej nukleosomach histonu H3 przez białko CENP-A. W przeciwieństwie do chromatyny pozacentromerowej, synteza histonów oraz CENP-A lub jego homologów nie jest sprzężona z replikacją DNA. U człowieka mRNA dla CENP-A pojawia się dopiero w fazie G2 [36] lub w późnej fazie S i w G2, ale połączenie CENP-A z nukleosomami centromerowej chromatyny zachodzi dopiero w fazie G2 (ref. [39]). Opóźnione wobec replikacji DNA synteza i montowanie białek Cid (homologów CENP-A) stwierdzono również u *Drosophila*; warunkiem ich deponowania wydaje się być wyłączenie histonu H3 [1].

CENP-A i jego homologi odgrywają podstawową rolę w montowaniu kompleksu centromer/kinetochor. Wprowadzenie tego białka na miejsce histonu H3 stanowi pierwszy sygnał warunkujący powstanie centromerów, jak np. w przypadku neocentromerów. Zakłócenia w strukturze CENP-A powodują powstanie defektywnych centromerów. Wprowadzenie fuzyjnego białka Cenpa-GFP (*Green Fluorescence Protein*) do centromerów myszy, mimo braku wykrywalnych zmian w strukturze nukleosomów, powoduje zakłócenie segregacji chromosomów [15]. Podobny efekt powoduje całkowite wyciszenie (*knockout*) genu *cenpa* (ref. [39]). Brak lub uszkodzenie CENP-A powoduje błędną lokalizację wielu białek centromerowych i kinetochorowych [39]. Nie jest wykluczone, że depozycja CENP-A/CENH3 (ta druga nazwa dotyczy CENP-A roślin) odbywa się za pośrednictwem transkrypcji z retroelementów DNA centromerowego [14]. Wyniki badań metodą immunoprecypitacji wykazały, że ludzkie CENP-A łączy się z α -satelitarnym DNA centromerów, a u *Saccharomyces cerevisiae* homolog CENP-A – Csc4 – z centralnie zlokalizowaną sekwencją DNA centromerowego CDEII, zaś u kukurydzy homolog CENH3 – z centromerową sekwencją CentC i z centromerowymi retrotranspozonomami, ale nie współdziała z neocentromerowym DNA, pozbawionym tej sekwencji (ref. [45]).

Obecność CENP-B, jak wspomniano wyżej, nie jest konieczna dla prawidłowego funkcjonowania kompleksu centromer/kinetochor, o czym świadczy brak tego białka w normalnych centromerach u wielu gatunków, a także w neocentromerach (ref. [33]).

17-nukleotydowy motyw w DNA występujący w α -satelitarnych DNA centromerów człowieka oraz u *Arabidopsis thaliana*, wiążący CENP-B, nie jest obecny w DNA centromerowym u wielu obiektów, w tym u trzech innych gatunków *Arabidopsis* [11], por. [33]. Białko CENP-B znajduje się w centralnej płytce kinetochoru.

Obecność CENP-A w nukleosomach chromatyny centromerowej jest niezbędna dla ulokowania innego istotnego białka centromerów – CENP-C [28], które wiąże się z DNA i znajduje się na styku chromatyny centromerowej i wewnętrznej płytki kinetochoru. Jeżeli chromatyna centromerowa pozbawiona jest CENP-A w wyniku wycięcia tego genu lub podania odpowiedniego RNAi, CENP-C jest błędnie lokalizowane [32, 38]. U *Caenorhabditis elegans* usunięcie CENP-A lub CENP-C, a także zmniejszenie ilości tych białek, powoduje powstanie fenotypu „*kinetochore null*”, charakteryzującego się brakiem mitotycznej segregacji oraz całkowitą niezdolnością do gromadzenia białek kinetochoru i montowania mechanicznie stabilnego wrzeciona. U tego nicienia usunięcie CENP-C nie powoduje braku CENP-A [32], natomiast obecność homologu CENP-C, HCP-4, jest niezbędna dla wprowadzenia do kinetochoru homologu CENP-F – HCP-1 [29].

Wyniki badań przeprowadzonych na komórkach człowieka wskazują, że konstytutywne białko CENP-I jest niezbędne dla ulokowania w kinetochorze białka fakultatywnego CENP-F i białek punktu kontrolnego kinetochoru – MAD1 i MAD2. CENP-I jest prawdopodobnie zlokalizowane blisko wewnętrznej płytki kinetochoru, tj. przy chromatynie centromerowej. Usunięcie tego białka lub zablokowanie przez podanie odpowiedniego RNAi lub przeciwciał przeciwko CENP-I powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w G2 oraz pojawianie się monopolarnych chromosomów, tj. przyłączonych tylko do jednego bieguna wrzeciona, ponieważ tylko jedna siostrzana chromatyda ma sprawnie funkcjonujący system centromer/kinetochor [20].

Z przytoczonych danych wynika, że białka konstytutywne CENP-A, CENP-C i CENP-I wydają się być na szczycie hierarchii czynników współdziałających w montowaniu kinetochorów. Poprawne montowanie innych – poza wspomnianym wyżej CENP-F – białek fakultatywnych również zależy od obecności i prawidłowej lokalizacji białek konstytutywnych. Usunięcie białka fakultatywnego CeINCEP (*IN*ner *CEN*trometric *Protein*), por. [33] u *Caenorhabditis elegans* – Ce – przez podanie RNAi powoduje całkowity brak segregacji chromosomów w obecności mechanicznie stabilnego wrzeciona [32].

Metodami immunocytochemicznymi wykazano obecność topoizomerazy II (topo II) w aktywnych centromerach i neocentromerach ssaków zarówno w chromosomach mejotycznych, jak i mitotycznych (ref. [2, 7]), co może wskazywać, że jej obecność jest konieczna w procesie montowania kinetochorów. Topo II akumuluje się w centromerach podczas wczesnych etapów mitozy i zanika w anafazie [2]. Jednak brak jest wykrywalnych ilości topoII w chromosomach Y u myszy z funkcjonalnym centromerem (ref. [7]), co wskazuje, że topoII mogłaby brać udział w tworzeniu i/lub podtrzymywaniu właściwej struktury chromatyny centromerowej, ale nie jest konieczna do montowania kinetochorów [7]. Przy pomocy metody SPRINS stwierdzono, że obecna w centromerach chromosomów mitotycznych topoII jest katalitycznie aktywna [2]. W wyniku zablokowania jej aktywności przez specyficzny inhibitor ICRF-187, topoII nie akumuluje się w centromerach i struktura kinetochorów nie jest prawidłowa (ref. [7]).

Ostatnio opracowano metodę umożliwiającą badanie oderwanych centromerów wraz z kinetochorami, pochodzących z mitotycznych komórek HeLa. Wykazano w tych strukturach obecność DNA o długości 130–160 kbp oraz CENP-B i CENP-C w wewnętrznej płytce kinetochoru, a także CENP-E w jego zewnętrznej płytce [3]. U kukurydzy pęknięcie chromosomu w obrębie centromeru może prowadzić do powstania chromosomu telocentrycznego, ponieważ „gojenie” chromosomu polega na dobudowywaniu sekwencji telomerowych, a naruszony centromer zachowuje pełną sprawność [16].

KOMPLEKS KOHEZYJNY I MECHANIZMY JEGO ROZPADU

Kompleks kohezyjny zapewnia przyleganie siostrzanych chromatyd wzdłuż ich ramion i centromerów. Oddzielenie ramion chromatyd następuje w czasie profazy i metafazy mitozy, natomiast w obszarze centromeru sygnalizuje początek anafazy (ref. [18, 33]). Zakłócenia w przebiegu procesu separacji chromatyd w mitozie i podczas II podziału mejozy oraz chromosomów homologicznych w podziale I mejozy prowadzą, podobnie jak w przypadku niesprawnego systemu centromer/kinetochor, do aneuploidalności, tj. poważnych zakłóceń w strukturze i funkcji genomu.

Rozpoznane dotąd białka wchodzące w skład kompleksu kohezyjnego są konserwatywne. Jednym ze składników tego kompleksu są białka zwane Scc, przy czym szczegółowa terminologia jest różnorodna, w zależności od organizmu, u którego były badane (ref. [4, 43]). Montowanie kohezyjnego następuje już w fazie S, w miarę postępującej replikacji DNA. Centromer jest miejscem, w którym deponowane są znacznie większe ilości kohezyjnego niż wzdłuż ramion chromatyd. Jest to przypisywane szczególnie obfitemu nagromadzeniu heterochromatyny w centromerze; również wzdłuż ramion chromosomów kohezyjna wiąże się w większych ilościach przy regionach heterochromatynowych [4]. Jednym z warunków kohezji siostrzanych chromatyd podczas mitozy i metafazy II podziału mejozy jest fosforylacja histonu H3. Ta potranskrypcyjna modyfikacja zachodzi powszechnie u zwierząt i roślin. U roślin seryny 10. i 28. są silnie ufosforylowane w regionie przycentromerowym (ref. [12]).

Redukcja kohezji zaczyna się podczas profazy i następuje w wyniku odłączenia kohezyjnego od chromatyny jako rezultat fosforylacji białek wchodzących w jej skład. Fosforylacja odbywa się z udziałem szczególnych dwóch kinaz, których aktywność jest najwyższa podczas mitozy. Są to: kinaza Aurora, niezbędna dla tworzenia dwubiegunowego wrzeciona podziałowego i poprawnej segregacji chromatyd, degradowana po zakończeniu mitozy [19] i kinaza Polo, której aktywność jest również jednym z czynników warunkujących formowanie prawidłowego wrzeciona podziałowego; kinaza Polo uczestniczy w aktywacji APC (*Anaphase Promoting Complex*) [9]. Kinazy Polo stanowią ewolucyjnie konserwatywną rodzinę ważnych regulatorów cyklu komórkowego [35]. Ostateczne i nieodwracalne rozdzielenie

siostrzanych chromatyd w obszarze centromeru ma miejsce na początku anafazy. Enzym proteolityczny separaza tnie podjednostki Scc lub ich homologi, przy czym następuje defosforylacja białek kompleksu kohezyny. Przedwczesnemu działaniu separazy zapobiega sekuryna (por. niżej) (ref. [27, 43]). Rezultaty badań z zastosowaniem kwasu okaidowego, inhibitora fosfataz białkowych, sugerują, że zahamowanie ich aktywności zakłóca normalną równowagę kinaza-fosfataza, w wyniku czego następuje u myszy przedwczesna separacja chromatyd w mitozie i w II podziale mejozy, a także chromosomów homologicznych w I podziale mejozy, co prowadzi do aneuploidalności [22]. Regulacja aktywności separazy odbywa się przez sekurynę, funkcjonującą jako inhibitor separazy. Rozpad sekuryny przez proteasomy, poprzedzony ubikwitynizacją, jest istotnym elementem zakończenia rozdziału chromatyd (ref. [43]).

Porównanie rozmieszczenia kohezyny u drożdży i wyższych Eukaryota wskazuje na co najmniej dwie wspólne cechy: 1 – kohezyna jest wiązana głównie przez regiony bogate w AT; 2 – kohezyna w większych ilościach łączy się z regionem centromerowym niż wzdłuż ramion chromatyd. Natomiast różnice dotyczą kolejności dysocjacji kohezyny wzdłuż chromatyd. U *Saccharomyces cerevisiae* proteoliza Scc1 i jego oddysocjowanie od ramion i centromerów chromatyd są osiągnięte przez pojedynczy ogólny mechanizm. Natomiast u *Metazoa* kohezyna jest usuwana stopniowo: podczas profazy/prometafazy niezależnie od systemu APC, którego aktywacja prowadzi do rozdzielenia siostrzanych chromatyd w regionie centromeru (ref. [4]).

WNIOSKI

W ciągu minionych kilku lat dokonano znacznego postępu w poznaniu struktur i mechanizmów warunkujących poprawną segregację siostrzanych chromatyd. Zgromadzono wystarczającą liczbę faktów stanowiących podstawę dla wysunięcia wniosków dotyczących istoty struktury i funkcji kompleksu centromer/kinetochor:

- struktura I-rzędowa DNA ulega szybkiej ewolucji, a więc nie tylko nie jest konserwatywna, ale bywa specyficzna gatunkowo i chromosomowo;
- układ tandemowy DNA, typowy dla centromerów, nie jest bezwzględnie konieczny dla ich funkcjonowania, ponieważ neocentromery mogą powstawać w obrębie odcinków euchromatynowych chromosomów;
- białka – zarówno konstytutywne, jak i fakultatywne – wykazują znaczny stopień konserwatywności; niezależnie od pozycji w drabinie ewolucyjnej i przynależności taksonomicznej (grzyby – zwierzęta – rośliny) pewne ich domeny wykazują znaczną homologię;
- hierarchiczny plan budowy kompleksu centromer/kinetochor, mimo pewnych różnic, jest podobny u drożdży i wyższych Eukaryota.

Aby wyjaśnić funkcję kompleksu centromer/kinetochor, a szczególnie określić minimalną długość lub liczbę kopii DNA niezbędną dla realizacji tej funkcji, powinny być konstruowane sztuczne chromosomy (AC) [30]. Dotąd z powodzeniem skonstruowano sztuczny chromosom drożdży (YAC – *Yeast Artificial Chromosome*).

Czynione są liczne próby konstruowania AC z użyciem DNA centromerowego człowieka (głównie z chromosomu X) i roślin (przede wszystkim z DNA centromerowym *Arabidopsis thaliana*). Konstrukcja AC z DNA wyższych Eukaryota napotyka na znaczne trudności ze względu na bardzo złożone i długie układy DNA centromerowego. Biorąc pod uwagę znaczenie AC w biotechnologii i terapii (głównie jako wektory przenoszące wybrane geny), można oczekiwać w najbliższym czasie znacznego postępu w tej dziedzinie badań.

LITERATURA

- [1] AHMAD K, HENIKOFF S. Centromeres are specialised replication domains in heterochromatin. *J Cell Biol* 2001; **153**: 101–109.
- [2] ANDERSEN U, WANDALL A, KJELDSEN C, KOCH J. Active, but not inactive, human centromeres display topoisomerase II activity *in vivo*. *Chrom Res* 2002; **10**: 305–312.
- [3] BALCZON R, WILSON M, BHATNAGAR YM. Analysis of detached human kinetochores. *Chromosoma* 2003; **112**: 96–102.
- [4] BERNARD P, ALLSHIRE RC. Centromeres become unstuck without heterochromatin. *Trends Cell Biol* 2002; **12**: 419–424.
- [5] CHENG ZJ, MURATA M. A centromeric tandem repeat family originating from a part of Ty 3/*gypsy* retroelement in wheat and its relatives. *Genetics* 2003; **164**: 665–672.
- [6] CHOO KH. Centromerisation. *Trends Cell Biol* 2000; **10**: 182–188.
- [7] COBB J, MIYAIKE M, KIKUCKI A, HANDEL MA. Meiotic events at the centromeric heterochromatin: histone H3 phosphorylation, topoisomerase II α -localization and chromosome condensation. *Chromosoma* 1999; **108**: 412–425.
- [8] COPENHAVER GP. Using *Arabidopsis* to understand centromere function: progress and prospects. *Chrom Res* 2003; **11**: 255–262.
- [9] do CARNO AVIDES M, TAVARES A, GLOVER DM. Polokinasz i Asp są potrzebne do promowania aktywności centrosom. *Nature Cell Biol* 2001; **3**: 421–424.
- [10] HENIKOFF S. Near the edge of a chromosome's „black hole”. *Trends Genet* 2002; **18**: 165–167.
- [11] HESLOP-HARRISON JS, BRANDES A, SCHWARZACHER T. Tandemly repeated DNA sequences and centromeric chromosomal regions of *Arabidopsis* species. *Chrom Res* 2003; **11**: 241–253.
- [12] HOUBEN A, SCHUBERT I. DNA and proteins of plant centromeres. *Curr Opin Plant Biol* 2003; **6**: 554–560.
- [13] JASENCAKOVA Z, SOPPE WJJ, MEISTER A, GERNAND D, TURNER BM, SCHUBERT I. Histone modifications in *Arabidopsis* – high methylation of H3 lysine 9 is dispensable for constitutive heterochromatin. *Plant J* 2003; **33**: 471–480.
- [14] JIANG J, BIRCHLER JA, PARROT WA, DAWE RK. A molecular view of plant centromeres. *Trends Plant Sci* 2003; **8**: 570–575.
- [15] KALITIS P, FOWLER KJ, EARLE E, GRIFFITH B, HOWMAN E, NEWSON AJ, CHOO KH. Partially functional *Cenpa-GFP* fusion protein causes increased chromosome missegregation and apoptosis during mouse embryogenesis. *Chrom Res* 2003; **11**: 345–357.
- [16] KASZÁS E, KATO A, BIRCHLER JA. Cytological and molecular analysis of centromere misdivision in maize. *Genome* 2002; **45**: 759–768.
- [17] KURATA N, NOMOMURA K-J, HARUSHIMA Y. Rice genome organization: the centromere and genome interactions. *Ann Bot* 2002; **90**: 427–435.
- [18] KURLANDZKA A. Tworzenie i rozpad kompleksu kohezyjnego chromatyd siostrzanych. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 261–272.
- [19] LITTLEPAGE LE, RUDERMAN JV. Identification of a new APC/C recognition domain, box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitosis. *Genes Dev* 2002; **16**: 2274–2285.
- [20] LIU S-T, HITTLE JC, JABLONSKI S.A., CAMPBELL MS, YODA K, YEN TJ. Human CENP-I specifies localization of CENP-F, MAD1 and MAD2 to kinetochores and is essential for mitosis. *Nature Cell Biol* 2003; **5**: 341–345.

- [21] LO AWI, CRAIG JMC, SAFFERY R, KALITSIS P, IRVINE RV, EARLE E, MAGLIANO DJ, CHOO KHD. A 330 kb CENP-A binding domain and altered replication timing at a human neocentromere. *EMBO J* 2001; **20**: 2087–2096.
- [22] MAILHES JB, HILLIARD C, FUSELER JW, LONDON SN. Okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatase 1 and 2A, induces premature separation of sister chromatids during meiosis I and aneuploidy in mouse oocytes *in vitro*. *Chrom Res* 2003; **11**: 619–631.
- [23] MALIK HS, HENIKOFF S. Conflict begets complexity: the evolution of centromeres. *Curr Opin Genet Dev* 2002; **12**: 711–718.
- [24] MANDRIOLLI M, MANICARDI GC, MAREC F. Cytogenetic and molecular characterization of the MBSAT1 satellite DNA in holokinetic chromosomes of the cabbage moth, *Mamestra brassicae* (Lepidoptera). *Chrom Res* 2003; **11**: 51–56.
- [25] MANZANERO S, PUERTAS MJ. Rye terminal neocentromeres: characterization of the underlying DNA and chromatin structure. *Chromosoma* 2003; **111**: 408–415.
- [26] MANZANERO S, VEGA JM, HOUBEN A. Characterization of the constriction with neocentric activity of 5RL chromosome in wheat. *Chromosoma* 2002; **111**: 228–235.
- [27] McHUGH B, HECK MMS. Regulation of chromosome condensation and segregation. *Curr Opin Genet Dev* 2003; **13**: 185–190.
- [28] MELLONE BG, ALLSHIRE RC. Stretching it: putting the CEN(P-A) in centromere. *Curr Opin Genet Dev* 2003; **13**: 191–198.
- [29] MOORE LL, ROTH MB. HCP-4, a CENP-C-like protein in *Caenorhabditis elegans*, is required for resolution of sister centromeres. *J Cell Biol* 2001; **153**: 1199–1207.
- [30] MURATA M. Telomeres and centromeres in plants. *Curr Genomics* 2002; **3**: 527–538.
- [31] MÜLLER-REICHERT T, SASSONI I, O'TOOLE F, RAMAO M, ASHFORD AJ, HYMAN AA, ANTONY C. Analysis of the distribution of the kinetochore protein Ndc10p in *Saccharomyces cerevisiae* using 3-D modelling of mitotic spindles. *Chromosoma* 2003; **111**: 417–428.
- [32] OEDEGENA K, DESAI A, RYBINA S, KIRKHAM M, HYMAN AA. Functional analysis of kinetochore assembly in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 2001; **153**: 1209–1225.
- [33] OLSZEWSKA MJ. DNA i białka centromerowe. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 167–185.
- [34] PIDOUX AL., ALLSHIRE KC. Centromeres: getting a grip of chromosomes. *Curr Opin Cell Biol* 2000; **12**: 308–319.
- [35] QUIAN Y-W, ERICHSON E, TAIEB FE, MALLER JL. The Polo-like kinase Plx1 is required for activation of the phosphatase Cdc25C and cyclin B-Cdc2 in *Xenopus* oocytes. *Mol Biol Cell* 2001; **12**: 1791–1799.
- [36] SHELBY RD, MONIER K, SULLIVAN KF. Chromatin assembly at kinetochores is uncoupled from DNA replication. *J Cell Biol* 2000; **151**: 1113–1118.
- [37] STRATIKOPULOS EE, AUGUSTINOS AA, GARIOU-PAPALAXIOU A, ZACHOROPOULOU A, MATIOPOULOS KD. Identification and partial characterization of a new *Ceratitidis capitata*-specific 44bp pericentromeric repeat. *Chrom Res* 2002; **10**: 287–295.
- [38] SULLIVAN KF. A solid foundation: functional specialization of centromeric chromatin. *Curr Opin Genet Dev* 2001; **11**: 182–188.
- [39] SULLIVAN BA, BLOWER MD, KARPEN GH. Determining centromere identity: cyclical stories and forking paths. *Nature Rev* 2001; **2**: 584–596.
- [40] TALBERT PB, MASNELLI R, TYAGI AP, HENIKOFF S. Centromeric localization and adaptive evolution of an *Arabidopsis* histone H3 variant. *Plant Cell* 2002; **14**: 1053–1066.
- [41] ten HOOPEN R, SCHLEKER T, MANTEUFEL R, SCHUBERT I. Transient CENP-E-like kinetochore proteins in plants. *Chrom Res* 2002; **10**: 561–570.
- [42] TYLER-SMITH C, FLORIDA G. Many paths to the top of the mountain: diverse evolutionary solutions to centromere structure. *Cell* 2000; **102**: 5–8.
- [43] UHLMANN F. Chromosome cohesion and separation: from men to molecules. *Curr Biol* 2003; **13**: 104–114.
- [44] VOLPE T, SCHRANKE V, HAMILTON G, WHITE SA, TENG G, MARTIENSSEN RA, ALLSHIRE RC. RNA interference is required for normal centromere function in fission yeast. *Chrom Res* 2003; **11**: 137–146.
- [45] ZHONG CX, MARSHALL JB, TOPP C, MROCZEK R, KATO A, NAGAKI K, BIRCHLER JA, JIANG J, DAWE RK. Centromeric retroelements and satellites interact with maize kinetochore protein CENH3. *Plant Cell* 2002; **14**: 2825–2836.

BIOLOGIA MOLEKULARNA ROŚLIN ERY POSTGENOMOWEJ

MOLECULAR BIOLOGY OF PLANTS IN POSTGENOMIC ERA

Andrzej B. LEGOCKI

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN Poznań

Streszczenie: Niezwykle osiągnięcia współczesnej genomiki w przybliżaniu architektury i budowy pełnych zestawów chromosomów organizmów haploidalnych wytyczyły nowe kierunki rozwoju nauk przyrodniczych na najbliższe dekady. Opierają się one na łączeniu w zespolone nurty badawcze fragmentarycznych dotąd opisów i podejść jednostkowych. Adresowanie istotnych kwestii poznawczych związanych z wyjaśnianiem fundamentalnych problemów rozwoju i różnicowania roślin, z uwzględnieniem zmiennych warunków środowiska, wymaga wielo-nurtowych podejść opartych na kompletnych zestawach genów bezpośrednio lub pośrednio uczestniczących w tych procesach. Jednym z zasadniczych celów badań opartych na zdobyciach genomiki jest przypisanie funkcji biologicznej wszystkim genom strukturalnym i rozpoznanie ich udziału w złożonych zjawiskach biologicznych. Ciekawą koncepcją metodyczną jest wprowadzenie pojęcia tzw. genomu minimalnego, a także genomu LUCA (*Last Universal Common Ancestor*). W biologii molekularnej roślin rolę podstawowego organizmu modelowego pełni, jak wiadomo, *Arabidopsis thaliana*. Dla zespolonego podjęcia analizy ekspresji genów roślinnych w skali globalnej, poznanie dynamiki proteomu oraz dla zrozumienia funkcji 25 000 genów roślin kwiatowych w kontekście komórkowym, organizmalnym (swoistości gatunkowej) i ewolucyjnym (adaptacji środowiskowych) powstał duży program badawczy „*Arabidopsis 2010*”. Jednocześnie z wykorzystaniem metod matematycznych i komputerowych podejmowane są prace symulacyjne nad modelowaniem roślin wirtualnych, w których można drogą symulacji analizować przebieg szlaków metabolicznych w trakcie interakcji roślin z innymi organizmami i w czasie ich odpowiedzi na bodźce środowiska. Tworzone są w ten sposób podstawy dla globalnego i precyzyjnego charakteryzowania procesów życiowych oraz poznawania mechanizmów warunkujących różnorodność biologiczną.

A.B. Legocki

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań

legocki@ibch.poznan.pl

JAK KOMÓRKA WYBIERA KIERUNKI PRZESTRZENI W SWOIM ROZWOJU ZNACZENIE WIELKOŚCI TENSOROWYCH*

HOW DOES A CELL RECOGNIZE SPATIAL DIRECTIONS
IN ITS DEVELOPMENT
THE IMPORTANCE OF TENSORIAL QUANTITIES

Zygmunt HEJNOWICZ

Katedra Biofizyki i Biologii Komórki, Uniwersytet Śląski, Katowice

Streszczenie Istnieją wielkości o innej naturze niż gradienty (wektory), które mogą być i są źródłem informacji kierunkowej. Są nimi wielkości tensorowe, takie jak np. naprężenie mechaniczne (σ) albo szybkość wzrostu (ω). Tensor wyróżnia w przestrzeni trzy kierunki ortogonalne, w których przyjmuje wartości ekstremalne. Są to Główne Kierunki tensora (PD-esy). Podczas gdy wektor ma kierunek i zwrot, PD ma tylko kierunek. Najważniejsza różnica między wektorem a tensorem dotyczy jednak symetrii; tensor cechuje się symetrią zwierciadlaną. PD-esy tensorów σ i/lub ω przejawiają się: w układzie komórek w merystemach, w ukierunkowaniu podziałów komórek roślinnych, w układzie trabekul w kości gąbczastej, w zachowaniu się komórek zwierzęcych na elastycznym podłożu. PD-esy tensora σ są szczególnie predestynowane do tworzenia układu odniesienia w powstawaniu wzoru budowy ciała w embrio- i morfogenezie, bowiem trajektorie PDs, zwykle krzywoliniowe, tworzą ortogonalny układ, a jeden PD_o jest ortogonalny do powierzchni ciała (tym samym dwa pozostałe są styczne do powierzchni). Znana jest (dla komórek roślinnych) liniowa zależność między szybkością wzrostu objętościowego i ciśnieniem turgorowym, gdzie współczynnikiem proporcjonalności jest podatność izotropowej ściany. Jest to zależność na poziomie skalarnym. Tej zależności odpowiada na poziomie tensorowym zależność między szybkością wzrostu elementów liniowych a naprężeniem z czynnikiem proporcjonalności w formie tensora czwartego rzędu (podatność anizotropowej ściany). Ten tensor jest zespołem parametrów zależnych od informacji genetycznej. Równanie na poziomie tensorowym mówi nam, że dane pole naprężenia może prowadzić do różnych form ciała w zależności od informacji genetycznej. Sygnalizowane są również wyniki badań własnych nad reorientacją układu mikrotubul kortykalnych (MTC) w komórkach epidermy w zależności od naprężenia i auksyny. Wynika z nich, że: cykl

*Praca dofinansowana przez KBN w ramach projektu 6P04C 040 21; ** Autor dziękuje Pani dr Krystynie Hejnowicz i Panu mgr Jerzemu Karczewskiemu za cenne uwagi merytoryczne oraz za pomoc w przygotowaniu maszynopisu.

reorientacji MTc jest rotacyjny (a nie oscylacyjny); prędkość kątowna reorientacji zależy od orientacji względem PD_{σ} -esów, w szczególności cykl może być tak szybki, że skacze przez jeden lub oba PD_{σ} -esy; układ MTc zależy od tego przez który PD_{σ} cykl przeskakuje; orientacja PD_s zależy od stanu naprężeń; wybór przeskakiwanego PD_{σ} ($PD_{\max,\sigma}$ lub $PD_{\min,\sigma}$) zależy od poziomu auksyny.

Słowa kluczowe: gradient, wektor, główne kierunki tensora, układ odniesienia, naprężenie, szybkość wzrostu, kierunki podziałów, mikrotubule kortykalne

Summary The directional information may originate not only from gradients of scalar fields or other vectors, but also from tensors such as the tensor of mechanical stress (σ) and the tensor of growth rate (ω). A tensor (except for spherical) distinguishes in space three mutually orthogonal directions along which the tensor values are extremal. These are the Principal Directions (PDs) of the tensor. While a vector specifies an orientation with a sense, the PD specifies only an orientation. However, the main difference between a vector and a tensor concerns symmetry; tensor has a mirror symmetry. PDs of the tensor σ or/and ω are manifested in: the cell wall arrangement in meristems (the pattern of periclinal and anticlinal); the orientation of plant cell divisions; the arrangement of trabeculae in the cancellous tissue of bones; and the behaviour of animal cells on elastic substrata. The PDs of the stress tensor are especially predestined to provide coordinate systems in embryo- and morphogenesis, because their trajectories in the growing body, usually curvilinear, are mutually orthogonal, and one of the PD_{σ} s is orthogonal to the body surface. The proportional relation between relative rate of volumetric growth and turgor pressure (above a yield threshold) with the extensibility of isotropic cell wall as the proportionality coefficient, is well known. When this proportionality is transferred on the tensor level, it gives the relation between the second order tensor of growth rate and the same rank tensor of stress in the cell wall. This relationship is mediated by a fourth-order tensor of anisotropic cell wall extensibility. The latter tensor is an array of mechanical parameters dependent on genetic information of the growing cells. This relation on the tensor level shows that a particular field of stresses can lead to different forms of the growing body depending on the genetic information. The studies on reorientation of cortical microtubules (cMT) in epidermal cells allowed the author to draw following conclusions: the cMT reorientation cycle is rotary instead of oscillatory; the angular velocity of the cycle depends on the orientation of cMTs with respect to PD_{σ} s, in particular, the cycle jumps through one or two PD_{σ} s; the cMT orientation depends on which of the PD_{σ} s the cycle jumps through; the orientation of the PD_{σ} s depends on the stress state in cell wall; the choice of the PD_{σ} to be jumped through, either $PD_{\max,\sigma}$ or $PD_{\min,\sigma}$, depends on the auxin level.

WSTĘP

Uważa się powszechnie, że podstawową rolę w wyznaczaniu kierunku w komórce lub w organizmie odgrywają gradienty czynników o działaniu sygnałowym, np. gradient morfogenu [18,36].

Gradient jest wektorem, a więc ma kierunek ze zwrotem i wartość. Kierunek gradientu czynnika X jest tym kierunkiem, wzdłuż którego X zmienia się najsilniej. Na przykład, gradient wysokości biegnie wzdłuż stoku, a prostopadle do poziomicy; gradient stężenia (koncentracji) jest prostopadły do linii jednakowego stężenia. Gradient stężenia substancji A jest więc wektorem, którego orientacja jest zgodna z kierunkiem największej zmiany stężenia, wartość jest proporcjonalna do różnicy koncentracji na jednostkę długości w danym miejscu pola stężenia A, zaś zwrot zależy od konwencji, np. w stronę rosnącej wartości stężenia.

Czynnik, którego gradient wyznacza kierunek w organizmie, niekoniecznie musi być substancją, może być natężeniem światła, temperaturą, potencjałem elektrycznym

albo grawitacyjnym itp. Należy podkreślić, że czynnik ten, sam przez się, jest wielkością skalarną, to znaczy do jego opisu w danym miejscu i czasie wystarcza liczba. Gradient powstaje wtedy, gdy dany czynnik skalarny jest ciągłą funkcją położenia, czyli istnieje pole skalarne (tego czynnika). Pole skalarne może więc być źródłem informacji kierunkowej za pośrednictwem gradientu jako wektora. Niekiedy, mówi się wręcz o wektorze, a nie o gradiencie. Np. wektor przyspieszenia grawitacyjnego (g) – bardzo ważne źródło informacji kierunkowej na Ziemi – jest gradientem potencjału grawitacyjnego. Niewątpliwie gradienty (wektory) to bardzo ważne źródło informacji kierunkowej, ale nie jedyne. Celem tego artykułu jest pokazanie, że mogą istnieć ukierunkowane wielkości o innej naturze niż gradienty (wektory), które mogą być (i jak to zostanie pokazane *sq*) również źródłem informacji kierunkowej dla komórek. Chodzi o wielkości tensorowe, takie jak np. naprężenie mechaniczne albo szybkość wzrostu.

TENSORY I GŁÓWNE KIERUNKI TENSORA

Podczas gdy wektor jest wielkością, która ma określoną wartość dla jednego kierunku, tensor (II- rzędu) ma wartości dla wszystkich kierunków. Wektor jest symbolizowany przez strzałkę wystawioną w danym punkcie pola. Tensor jest symbolizowany przez pewną zamkniętą, symetryczną powierzchnię taką, że jej odległość od punktu w danym kierunku, jest proporcjonalna do wartości tensora w tym kierunku. Powierzchnia ta nazywana jest kwadryką, albo (z angielskiego) indykatrą tensora. Kwadryka może być sferyczna – wtedy wszystkie kierunki są równoważne. Na ogół jednak nie jest sferyczna, choć zawsze ma przynajmniej zwierciadlaną symetrię. Gdy nie jest sferyczna, wyróżnione są trzy kierunki ortogonalne, w których tensor przyjmuje wartości ekstremalne. Są to Główne Kierunki tensora (PD-esy od *Principal Directions*). W jednym z tych kierunków wartość tensora jest maksymalna, PD_{max} , w drugim jest minimalna, PD_{min} . W trzecim kierunku wartość tensora osiąga maximum w płaszczyźnie prostopadłej do płaszczyzny wyznaczonej przez PD_{max} i PD_{min} (jak np. w przypadku spłaszczonej elipsoidy w przekroju prostopadłym do osi elipsoidy).

Podczas gdy wektor ma kierunek i zwrot, PD ma tylko kierunek, ale nie jest to różnica zasadnicza, bowiem wartość tensora może być dodatnia albo ujemna i można umówić się, że znak wartości (albo + albo –) oznacza zwrot na danym kierunku. Również pod względem kierunku istnieje podobieństwo między wektorem a tensorem, co najłatwiej uchwycić w przypadku gradientu; kierunek gradientu w polu skalarniej wielkości A w danym punkcie to ten kierunek, w którym A zmienia się wraz z położeniem najsilniej. Nic więc dziwnego, że jak to będzie objaśnione poniżej, wektor jest również tensorem, ale pierwszego rzędu. Najważniejsza różnica między tensorem II rzędu a wektorem dotyczy symetrii; tensor cechuje się symetrią zwierciadlaną względem każdej płaszczyzny wyznaczonej przez dwa PD-esy.

Wielkościami tensorowymi II rzędu, które w przypadku komórek mogą wchodzić w grę jako źródło informacji kierunkowej są: naprężenie mechaniczne (σ), odkształcenie

elastyczne, czyli odwracalne (ϵ) oraz szybkość wzrostu (względna, elementarna), która jest szybkością odkształcania nieodwracalnego (oznaczymy ją dla celów niniejszego artykułu literą ω).

Na przykładzie szybkości wzrostu jakiejś wielkości x można objaśnić rząd tensora. Mianowicie, względna szybkość wzrostu bardzo małego elementu tej wielkości, Δx (w danym punkcie), $\text{RER}G_x$ (od *Relative Elemental Rate of Growth of x*), gdzie:

$$\text{RER}G_x \equiv \lim_{\Delta x, \Delta t \rightarrow 0} \frac{\Delta(\Delta x)}{\Delta x \Delta t}$$

(to równanie definiujące) może oznaczać skalar, wektor lub tensor, w zależności od tego, czym jest x . Jeżeli x jest skalar, wtedy również jego $\text{RER}G$ będzie skalar, jeżeli jest wektorem, wtedy $\text{RER}G$ może być tensorem charakteryzowanym przez kwadrykę. Niech elementem będzie masa. Jest ona proporcjonalna do objętości (vol albo V). Mamy wtedy do czynienia z szybkością wzrostu masy lub objętości, a ściślej z :

$$\text{RER}G_v = \frac{\Delta(\Delta V)}{\Delta V \Delta t}.$$

Element masy lub objętości V jest skalar, $\text{RER}G_v$ jest więc też skalar, bo liczba przez liczbę jest tylko liczbą. Gdy jednak mówimy o szybkości wzrostu elementów liniowych (rozmyślnie unikamy określenia wzrost liniowy, bowiem mógłby mylić się ze *wzrostem proporcjonalnym*),

$$\text{RER}G_l = \frac{\Delta(\Delta l)}{\Delta l \Delta t}$$

w danym punkcie, to mamy na uwadze elementy liniowe Δl , które w tym punkcie można wystawić w różnych kierunkach. Zarówno $\Delta(\Delta l)$, jak również Δl są wektorami, a iloraz dwu wektorów to „skomplikowana” wielkość. Na dodatek $\text{RER}G_l$ musi być wielkością niezależną od wyboru układu współrzędnych. Okazuje się, że $\text{RER}G_l$ to tensor II rzędu. Widzimy więc, że w zależności od tego, czym jest rosnący element, otrzymujemy wielkości różnej rangi w naszym przypadku: skalar lub tensor. Można je wszystkie nazwać tensorami, ale różnego rzędu, definiując tensor zerowego rzędu jako skalar, tensor I rzędu jako wektor, tensor II rzędu jako tę wielkość, którą reprezentuje kwadryka. Wprowadzony poprzednio symbol ω będzie używany w znaczeniu $\text{RER}G_l$.

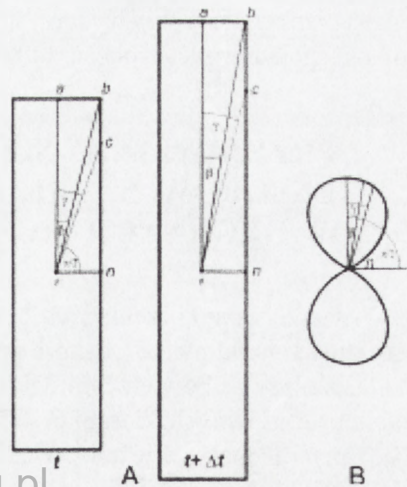
Formalnie, tensory są wielkościami, które nie zależą od wyboru układu współrzędnych, a więc na których można opierać prawa fizyczne (i biologiczne).

Tensor zerowego rzędu (w fizycznym znaczeniu) w danym punkcie pola, to pojedyncza liczba mianowana, czyli wzięta w proporcji do przyjętej jednostki miary. Tensor pierwszego rzędu, czyli wektor, to (w przestrzeni trójwymiarowej) zespół trzech

liczb mianowanych, opisujących składowe wektora w układzie współrzędnych: $\mathbf{W} = a_1 \mathbf{i} + a_2 \mathbf{j} + a_3 \mathbf{k}$, gdzie $\mathbf{i}, \mathbf{j}, \mathbf{k}$ – to wektory jednostkowe. Wektor jest więc jednoznacznie opisany przez trójkę liczb a_1, a_2, a_3 , co formalnie możemy zapisać jako tensor I rzędu \mathbf{W}_p , gdzie p przebiega od 1 do 3. Gdy układ współrzędnych dobrany jest tak, że wektor leży na jednej z osi układu współrzędnych, to dwie liczby w trójce są zerami, a niezerowa liczba podaje od razu długość wektora (w poprzednim przypadku ta sama długość była sumą trzech składowych). Zawsze można tak obrócić układ współrzędnych, aby wektor leżał na jednej z osi układu.

Tensor drugiego rzędu jest jednoznacznie opisany przez 9 liczb tworzących kwadratową macierz, co formalnie zapisuje się \mathbf{T}_{ps} z dziewięcioma składowymi t_{ps} , gdzie $p, s = 1, 2, 3$. Tensory tego typu co szybkość wzrostu linearnego lub naprężenia są symetryczne, co się wyraża tym, że $t_{ps} = t_{sp}$. Gdy osie układu pokrywają się z PD-esami tensora, wtedy tylko liczby na przekątnej głównej, czyli t_{pp} są różne od zera, a $t_{ps} = 0$ dla $p \neq s$. W dalszym ciągu tensor II rzędu dla uproszczenia będzie nazywany tensorem.

Mogłoby się wydawać, że jeżeli komórka albo organ jedynie wydłużają się (wzrost elongacyjny), to RERG₁ takiej komórki (organu) jest w pełni scharakteryzowany przez wektor (który można by nazwać „wektorem wydłużania”). Byłoby tak, gdyby komórka była tworem jednowymiarowym. Rzeczywista komórka na rysunku 1 jest tworem dwuwymiarowym. Jeżeli od środka takiej komórki, który oznaczymy literą o , poprowadzimy promienie w różnych kierunkach (rys. 1 A), to przetną one powierzchnię komórki w różnych punktach, a, b, c, \dots, n . i pojawią się odcinki $oa, ob \dots on$. Niech odcinki oa i on będą prostopadłe, czyli kąt między nimi wynosi $\pi/2$. Odcinek oa w czasie wydłużania rośnie, odcinek on nie rośnie. Ale rosną również wszystkie odcinki skośne między oa i on , czyli „wzrost elongacyjny” wcale nie jest „wzrostem jednokierunkowym” i do jego opisu nie wystarcza „wektor wydłużania”, potrzebny jest tensor. Trzeba się dalej liczyć z przypadkiem wydłużania komórki, któremu towarzyszy zwięzanie. Wydłużanie komórki można porównać z wydłużaniem pręta pod wpływem rozciągania; z reguły rozciągany pręt robi się cieńszy. Charakterystyka wydłużania



RYCINA 1. Schemat wydłużania (wzrostu elongacyjnego) komórki (A) oraz kwadryka tego wzrostu (B). Pokazane są dwa stadia: w czasie t i $t + \Delta t$. Wydłużanie następuje w pionie (oa), ale zwróć uwagę, że odcinki skośne (ob i oc) również rosną, nie rośnie jednak wymiar poprzeczny. Współrzędnymi punktów (a, b, c, n) na powierzchni komórki są kąty $\beta, \gamma, \pi/2$ i szybkości wzrostu dla tych współrzędnych (kierunków) pokazuje kwadryka której ekstremalne wartości przypadają na kąty 0 i $\pi/2$. W tych kierunkach wydłużanie ma główne kierunki szybkości wzrostu

komórki przy pomocy tensora od razu bierze pod uwagę to, co się dzieje z wymiarem poprzecznym, tak jak w przypadku rozciągania pręta. Dalej, przyjmując „wektor wydłużania”, pojawia się pytanie, w którą stronę nadać mu zwrot. Kierujemy go wzdłuż komórki, ale w stronę którego końca nadać mu zwrot? Takich kłopotów nie mamy z tensorem opisującym wydłużanie. Kwadryka tego tensora (w naszych dwu wymiarach odpowiadających przekrojowi osiowemu rzeczywistej komórki) jest ósemkową linią (rys. 1 B) (w przypadku gdy nie ma zwężania). Zatem, wydłużanie jest to taki wzrost, w którym REG_1 w kierunku dwu PD-esów jest zerowe (lub ujemne, gdy wydłużaniu towarzyszy zwężanie).

Warto jeszcze raz podkreślić, że gdy myślimy o wektorze, to mamy na uwadze kierunek i zwrot. Oczywiście można się od zwrotu uwolnić traktując go jako znak przy wartości wektora. Gdy myślimy o tensorze – mamy tylko kierunek (-ki) (osiowość, *axiality*), czego dobrą ilustracją jest wzrost wydłużeniowy. Ktoś mógłby powiedzieć, że wydłużanie, np. koleoptyla, powoduje ukierunkowane (ze zwrotem) przesunięcie końca koleoptyla. Tak, ale przesunięcie to nie jest REG_1 , lecz cała REG_1 po całej długości koleoptyla i całym czasie, a zwrot jest konsekwencją unieruchomienia podstawy koleoptyla (gdyby unieruchomić jego szczyt wystąpi przesunięcie podstawy).

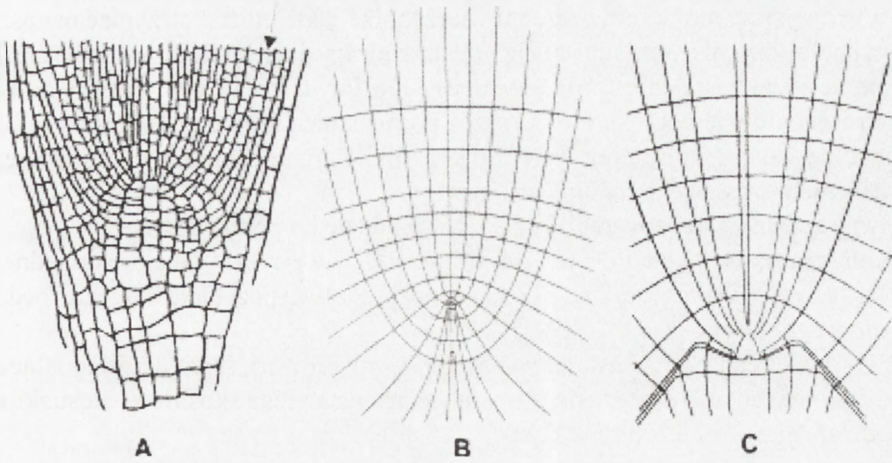
Prędkość przesuwania (V , od *displacement velocity*) danego punktu względem wybranego punktu odległego o l jest ilorazem przyrostu tej odległości do przyrostu czasu; $V = \Delta l / \Delta t \rightarrow dl / dt$. Prędkość przesuwania jest oczywiście wektorem. W rosnącej komórce, albo organie, mamy więc pewne pole wektorowe prędkości V przesuwania punktów względem punktu wybranego. Matematycznie, REG_1 w kierunku k jest wynikiem pewnej operacji matematycznej nad prędkością przesuwania V ;

$$REG_{1(k)} \equiv \lim_{\Delta l, \Delta t \rightarrow 0} \frac{\Delta(\Delta l)}{\Delta l \Delta t} = \frac{d(dl / dt)}{dl} = \frac{dV_k}{dl} \quad (\text{równanie 1})$$

gdzie V_k jest składową wektora prędkości przesuwania V w kierunku k . Równanie 1 można przekształcać przy wykorzystaniu formalizmu analizy wektorowej, co prowadzi do koncepcji tensora szybkości wzrostu [16].

PRZEJAWIANIE SIĘ GŁÓWNYCH KIERUNKÓW TENSORÓW SZYBKOŚCI WZROSTU I NAPRĘŻEŃ W ORGANACH ROŚLINNYCH I ZWIERZĘCYCH

W wierzchołku korzenia (rys.2 A) ściany układają się wzdłuż linii znanych jako perykliny i antykliny [15], a które są wzajemnie ortogonalne. Najbardziej zewnętrzna peryklina leży na powierzchni. Układ podobny do układu peryklin i antyklin tworzą trajektorie głównych kierunków tensora, bowiem też są wzajemnie ortogonalne. Zauważmy jednak, że jeżeli perykliny i antykliny miałyby przedstawiać trajektorie



RYCINA 2 Schematy peryklin i antyklin w układzie komórek (A) oraz trajektorie głównych kierunków wzrostu (B,C) wyrysowane przez komputer dla dwu różnych tensorów szybkości wzrostu z grubsza pasujących do tensorów szybkości wzrostu wierzchołka korzenia [14]. Strzałka w A wskazuje na jedną ze ścian antyklinalnych.

głównych kierunków tensora, to musiałby być to tensor taki, że jego PD-esy na powierzchni organu są albo styczne, albo ortogonalne do powierzchni. Takim tensorem jest zawsze tensor naprężenia mechanicznego (σ), co wynika z prawa Laplace'a, które mówi, że „na powierzchni ciała naprężenia ścinające znikają” oraz z faktu, że naprężenia ścinające są zerowe (znikają) jedynie na powierzchni wyznaczonej przez dwa PD $_{\sigma}$ -esy.

Nasze badania wykazały [14, 24], że układ peryklin i antyklin może odpowiadać również trajektoriom głównych kierunków tensora szybkości wzrostu linearnego, czyli PD $_{\omega}$ -esom. Wprawdzie nie ma żadnego ogólnego prawa dopasowującego PD $_{\omega}$ -esy do powierzchni rosnącego organu, to jednak w organie rosnącym w ustalony (*steady*) sposób, czyli tak, że pole tensora szybkości wzrostu nie zmienia się w czasie (*steady growth*), PD $_{\omega}$ -esy są dopasowane do powierzchni. Organem rosnącym w ten sposób jest właśnie wierzchołek korzenia w wodzie lub wilgotnym powietrzu (nie tworzy zawiązków liści, nie musi przeciskać się między ziarnami gleby, zmiany pola ω związane z rozwojem postępują tak wolno, że w pierwszym przybliżeniu można je pominąć). Niżej będzie mowa o tym, że główne kierunki tensora naprężeń w organie roślinnym na ogół pokrywają się (albo prawie pokrywają się) z PD-esami tensora szybkości wzrostu. W konsekwencji, układ peryklin i antyklin, przynajmniej w przybliżeniu, odpowiada trajektoriom PD $_{\omega}$ -esów w rosnącym wierzchołku (rys 2B, C). Gdy rozpatrujemy centralny przekrój podłużny przez wierzchołek korzenia, perykliny są trajektoriami PD $_{\max, \omega}$, zaś antykliny, to jeden z dwu pozostałych PD-esów (niekoniecznie PD $_{\min, \omega}$).

Szybkość wzrostu linearnego w dwu wymiarach, np. ściany komórkowej na powierzchni wierzchołka pędu, można charakteryzować tak zwanym „krzyżem” – ustawienie krzyża charakteryzuje orientację PD-esów, a długości ramion charakteryzują szybkości wzrostu w tych kierunkach, czyli główne wartości tensora szybkości wzrostu. Znane są techniki wyznaczania PD-esów dla szybkości wzrostu komórek na powierzchni

rosnącego organu. Jedną z takich technik, w zastosowaniu do merystemu wierzchołka pędu, wykorzystuje repliki powierzchni wierzchołka, jakie można otrzymać nanosząc na wierzchołek odpowiednią substancję (nie uszkadzającą wierzchołek) w fazie ciekłej i zdejmując ją po zestaleniu (polimeryzacji) [20]. Powtarzając tę procedurę na tym samym rosnącym wierzchołku można przez porównanie replik uzyskać „krzyże” dla szybkości wzrostu; komputer wylicza kierunki największego i najmniejszego odkształcenia wzrostowego replik.

Główne kierunki wzrostu przejawiają się w układzie komórek, bowiem:

1. Komórki rozpoznając PD_{σ} -esy lub PD_{ω} -esy dzielą się ortogonalnie do jednego PD_{ω} , a tym samym w płaszczyźnie wyznaczonej przez dwa pozostałe PD_{ω} -esy (będzie o tym mowa poniżej);

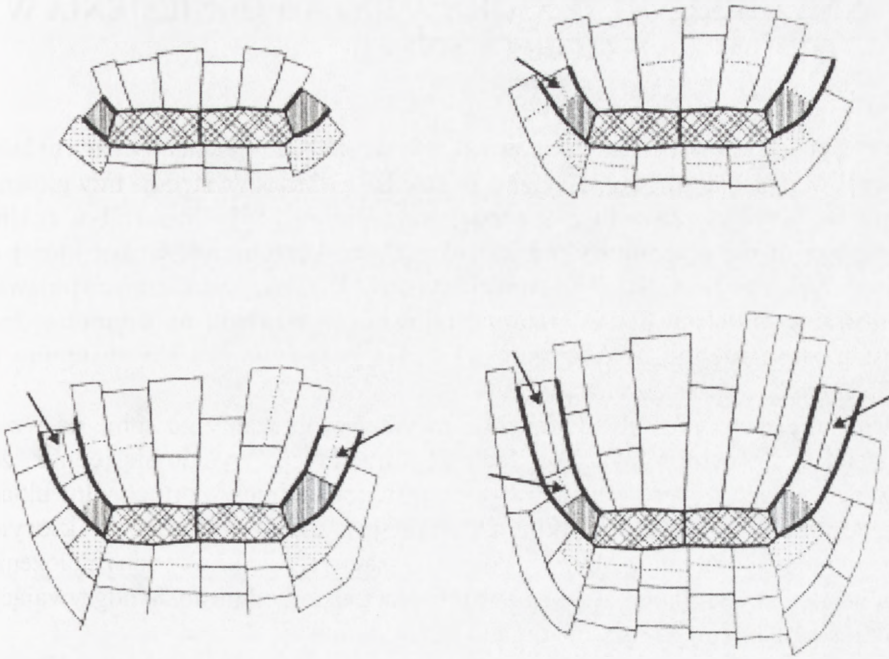
2. W organie rosnącym w ustalony sposób (*steady growth*), ściany ortogonalne do PD_{ω} zachowują ten układ w czasie wzrostu (ściana ustawiona skośnie w stosunku do PD_{ω} w dalszym wzroście zmienia skos).

Ściana wskazana przez strzałkę na rycinie 2A jest prostopadła do PD_{max} tensora szybkości wzrostu, czyli $PD_{max,\omega}$. Jest to ściana, która powstała w wyniku podziału komórki w płaszczyźnie prostopadłej do $PD_{max,\omega}$ i to początkowe położenie zachowała. To samo można powiedzieć o innych antyklinalnych ścianach. Ściany peryklinalne biegną ogólnie wzdłuż $PD_{max,\omega}$, ale zygakiem wynikającym z tendencji do tworzenia kąta 120° między ścianami trzech sąsiednich komórek. Na ogół są to ściany, które powstały dawno z podziałów prostopadłych do $PD_{min,\omega}$, ale które rosnąc zachowały ogólnie (z pominięciem „zygaku”) peryklinalny kierunek.

Interesujący jest przypadek mutacji wpływającej na przejawianie się PD-esów tensora szybkości wzrostu lub naprężenia w wierzchołku korzenia *Arabidopsis*. Wierzchołek ten ma dwuwarstwową korę pierwotną, która powstaje w wyniku podziałów peryklinalnych w komórkach wytworzonych przez komórki zaczątkowe kory (pierzścień komórek na brzegu *quiescent centre*), w rezultacie ich podziałów antyklinalnych (ryc. 3). Wewnętrzna warstwa nowopowstałych komórek staje się endodermą. U mutantu *scr* kora jest jednowarstwowa [31]. Komórki zaczątkowe kory dzielą się antyklinalnie (poprzecznie i podłużno-radialnie), ale nie peryklinalnie. U mutantu nie występują ściany zaznaczone strzałkami na rycinie 3. Defekt mutantu *nie* polega więc na braku zdolności do podziałów w ogóle, ale jedynie na braku podziałów peryklinalnych (prostopadłych do $PD_{min,\omega}$). Można więc wnioskować, że gen *SCR* jest w jakiś sposób zaangażowany w rozpoznawaniu PD-esów, a w szczególności defekt w nim powoduje, że jedna z płaszczyzn wyznaczana przez PD-esy, a mianowicie peryklinalna, nie jest wykorzystywana do podziału komórki.

Wspomniano już, że nowotworzona ściana wstawiana jest ortogonalnie do jednego z PD-esów tensora szybkości wzrostu lub tensora naprężenia. Fakt ten oraz istnienie takich układów komórek, jak w merystemie wierzchołkowym korzenia świadczy o tym, że komórki w jakiś sposób rozpoznają PD-esy tych tensorów albo przynajmniej jednego z nich. Wrócimy do tej sprawy.

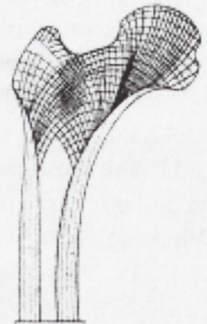
Główne kierunki tensora przejawiają się również w strukturach zwierzęcych. Mianowicie, od dawna wiadomo, że beleczki blaszek kostnych (trabekule) w kości



RYCINA 3 Schemat wykształcania kory pierwotnej i czapeczki w wierzchołku korzenia *Arabidopsis* w centralnym przekroju podłużnym w kolejnych stadiach wzrostu. Komórki *quiescent centre* (dwie poprzecznie ustawione komórki, które nie rosną) są skośnie zakratkowane, komórki zapoczątkowujące korę są zakreskowane. Strzałki wskazują ściany, których brak u mutantu *scr*

gąbczastej ułożone są według głównych kierunków naprężenia (rys. 4). Stwierdzenie to stanowi treść tzw. „prawa Woffa” [37]. Wynika z niego, że osteocyty rozpoznają główne kierunki naprężenia i wykorzystują tę informację w tworzeniu kości gąbczastej. Reakcja kości na stan naprężenia jest intensywnie badana ze względu na ortopedyczne znaczenie takiej reakcji [9, 25, 34] i jest dobrze znana specjalistom „od tkanki kostnej”, ale wydaje się, jest niedoceniana przez (ogólnych) biologów komórek zwierzęcych. W niewielkim stopniu wyniki badań nad układami trabekul wpływają na ogólne koncepcje rozwoju komórek.

Zdaniem autora, struktura i rozwój kości oraz wierzchołka korzenia są szczególnymi przypadkami przejawu znaczenia głównych kierunków tensora w rozwoju komórek i organów, zarówno zwierzęcych, jak i roślinnych. W przypadku kości, te przejawiające się PD-esy należą do tensora naprężenia (σ), a przejaw dokonuje się na tej zasadzie, że PD _{σ} -esy w kości wpływają na rozwój i sekrecję osteocytów. W przypadku merystemu są to prawdopodobnie również PD _{σ} -esy w ścianach komórkowych, które wyznaczają PD-esy szybkości wzrostu i kierunki podziałów.



RYCINA 4 Schemat układu trabekul w główce kości udowej [35]

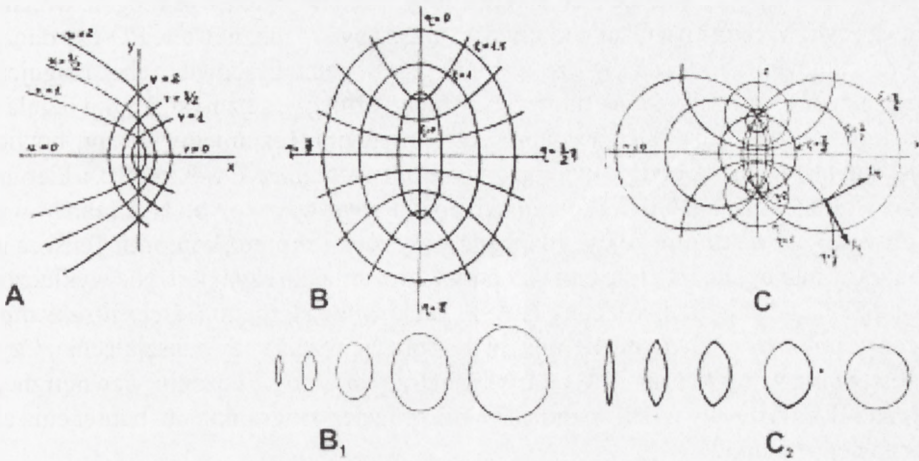
GŁÓWNE KIERUNKI TENSORA A UKŁAD ODNIESIENIA W MORFOGENEZIE

Wiemy z podstaw morfogenezy, że powstawanie wzoru budowy ciała wymaga układu odniesienia w postaci głównych osi ciała. W zarodku zwierząt występują trzy główne osie: przednio-tylna, grzbieto-brzuszna i lewo-prawa [36]. W zarodku roślin odpowiednikiem osi przednio-tylnej jest oś pędowo-korzeniowa, wokół której u nagonasiennych istnieje na ogół symetria obrotowa [28]. U okrytonasiennych pojawia się oś grzbieto-brzuszna już w komórce jajowej, ze względu na asymetryczne rozmieszczenie synergid, szczególnie wyraźnie przejawiająca się następnie u jednoliściennych, a zwłaszcza u traw [29].

Główne osie tworzą układ ortogonalny. Zwykle wyobrażamy go sobie na wzór kartezjańskiego (prostoliniowego) układu współrzędnych. Wydaje się jednak, że właściwszym układem dla wzoru budowy ciała jest krzywoliniowy, ortogonalny układ współrzędnych. Najprostszym takim układem jest układ walcowy, w którym współrzędnymi są: położenie wzdłuż osi, położenie (kątowe) wzdłuż obwodu i położenie radialne względem osi. Jedno nie ulega wątpliwości, układ odniesienia odgrywający rolę w określaniu budowy i rozwoju organu jest ortogonalny.

Prostokątny układ kartezjański jest szczególnym przypadkiem układów ortogonalnych, obok niego jest mnóstwo możliwych układów krzywoliniowych ortogonalnych [1,13]. Byłoby dziwne, gdyby morfogeneza wykorzystywała ten szczególny układ, jakim jest układ ściśle prostoliniowy. Wzrost organu cylindrycznego i położenie w nim są znacznie efektywniej opisane przez układ walcowy, w przypadku organu kulistego – przez układ sferyczny, w przypadku wierzchołka korzenia – przez układ dający na przekroju osiowym linie takie jak na rycinie 5 A, w przypadku organu typu owoc dyni – przez układ sferoidalny na rycinie 5 B, w przypadku owocu jabłka – przez układ toroidalny na rycinie 5 C. W każdym przypadku układ odniesienia w rozwijającym się organie jest ortogonalny, to znaczy linie „współrzędnych” w każdym punkcie przecinają się pod kątem prostym. Linie te ogólnie są zakrzywione. Układy odniesienia odgrywające rolę w morfogenezie są zapewne wymyślnie pozakrzywiane, ale na pewno nie "byłe jak".

Krzywoliniowe, ortogonalne układy współrzędnych w rozwijającym się ciele mogą się wydawać bardzo formalną konstrukcją. Autor stawia tezę, że są naturalną konstrukcją; odzwierciedlają bowiem nieodłączną cechę żywej struktury, jaką jest działanie w takiej strukturze wielkości tensorowych, czyli przejawianie się w tej strukturze głównych kierunków tych wielkości. Główne kierunki tensora przecinają się pod kątem prostym w każdym punkcie ciała, w którym pole tensorowe działa. Trajektorie tych kierunków w ciele tworzą więc naturalną sieć ortogonalnych linii współrzędnych. Wielkość tensorowa występująca w ciele, a której PD-esy są rozpoznawane przez komórki, jest więc naturalnym kandydatem dla tworzenia ortogonalnego układu odniesienia dla wzoru budowy ciała. Szczególną rolę pod tym względem prawdopodobnie odgrywa tensor naprężeń. Mianowicie, jak już wspomniano, PD-esy tego tensora są dopasowane do powierzchni naprężonego ciała: jeden z nich jest do



RYCINA 5 Przykłady krzywoliniowych, ortogonalnych układów współrzędnych; A – paraboloidalny, B – elipsoidalny, B – sekwencja kształtów owocu rosnącego z elipsoidalnym układem odniesienia; C – toroidalny, C₂ – sekwencja kształtów owocu rosnącego z toroidalnym układem odniesienia

niej prostopadły, dwa pozostałe są styczne (prawo Laplace'a). Tensor naprężenia uwzględnia więc aktualny kształt ciała i z tego względu jest wyróżniony wśród tensorów mogących mieć lub mających wpływ na kierunkową sygnalizację w komórce lub organie. Nic więc dziwnego, że coraz bardziej doceniana jest rola naprężeń mechanicznych w kształtowaniu układu odniesienia w embriogenezie zwierząt [2].

Główne kierunki tensora, jako naturalny układ współrzędnych, nie tylko zapewniają ortogonalność układu, ale również jego zwierciadlaną symetrię. Być może, symetria organizmów jest w pierwszym rzędzie konsekwencją tensorowego poziomu regulacji ich wzrostu i rozwoju.

Czy można utworzyć układ odniesienia w rozwijającym się ciele na zasadzie gradientów? Oczywiście można i tak zapewne większość biologów rozwoju wyobraża sobie powstawanie układu odniesienia w zarodku czy w merystemie wierzchołkowym. Aby powstał trójwymiarowy układ, potrzebne są nałożone na siebie pola trzech czynników gradientowych, np. trzech różnych substancji. Jednakowoż, cechą takiego układu, znacznie bardziej prawdopodobną niż ortogonalność, byłaby nieortogonalność. Jeśli układ odniesienia określający położenie w planie budowy jest tworzony na zasadzie gradientów, najczęściej byłby to układ nieortogonalny. Ponieważ wydaje się, że zawsze są to układy ortogonalne, dochodzimy do wniosku, że tworzone są na innej zasadzie niż gradienty. Autor stawia hipotezę, że są oparte na głównych kierunkach wielkości tensorowych.

Główne kierunki naprężenia lub szybkości wzrostu potencjalnie mogą służyć do tworzenia układu odniesienia dla planu budowy ciała. Z tego oczywiście nie wynika, że ta możliwość jest przez Naturę wykorzystana. Ale trzeba przynajmniej badać, czy czasem tak nie jest. Jeśli tak jest, to musi być spełniony warunek: główne kierunki danego tensora są rozpoznawane przez komórki (dla wygody dalszego wywodu nazwijmy

go warunkiem Ω). Aby warunek ten był spełniony, komórki muszą być w ogóle wrażliwe na tensorowe wielkości, a w tej wrażliwości muszą być rozpoznawane PD-esy danego tensora. Intuicyjnie „nie czujemy”, że warunek Ω jest spełniony, bowiem choć reagujemy na taką tensorową wielkość jak naprężenie, to nie czujemy, że zmysł dotyku działa na zasadzie rozpoznawania PD-esów naprężenia. Intuicyjnie rozumiemy wektor, bowiem zmysł dotyku reaguje na bodźce ukierunkowane ze zwrotem, czyli wektorowe, a kierunek i zwrot bodźca, np. ustawienie szpilki poznajemy wzrokowo. Nie mamy więc wątpliwości, że wektor może być rozpoznawany również przez komórki. Tensora nie rozumiemy intuicyjnie i stąd się biorą kłopoty w zrozumieniu czym jest. Nie wykluczone jednak, że nasz najgorzej poznany zmysł czucia wewnętrznego (*visceral sensation*) ma coś wspólnego z głównymi kierunkami tensora naprężenia czy odkształcenia. Czym np. jest wyczuwany kierunek w bólu wewnętrznym albo w uczuciu wewnętrznego skurczu? Być może wynika z rozpoznawania głównego kierunku, np. naprężenia czy odkształcenia tkanki?

Co na temat warunku Ω mówi empiria, a w szczególności eksperyment? Rozważmy najpierw komórki zwierzęce, choć to, co istotnie nowe w tym artykule dotyczy komórek roślinnych.

ROZPOZNAWANIE GŁÓWNYCH KIERUNKÓW PRZEZ KOMÓRKI

A. Komórki zwierzęce

Przynajmniej niektóre komórki tkanki nabłonkowej (w dalszym ciągu nazywane komórkami nabłonkowymi) oraz tkanki łącznej, takie jak fibroblasty, są wrażliwe na naprężenie i cechują się zdolnością wyczuwania naprężenia (*mechanosensing*). Komórki przylegające do podłoża testują substancję, do której przylegają nie tylko pod względem chemicznym, ale również mechanicznym. Wiadomo, że w procesie przylegania (adhezji) ważną rolę odgrywają integryny – transbłonowe białka, które po stronie zewnętrznej wiążą komórkę do macierzy pozakomórkowej, zwykle za pośrednictwem odpowiednich białek (laminina, fibronektyna), zaś po stronie wewnętrznej wiążą się z elementami układu cytoszkieletu za pośrednictwem takich białek, jak: vinculina, talina, tensyna, aktynina itd.[4, 30]. Najczęściej integryny traktuje się jako receptory sygnałów chemicznych (ligandów), którymi są odpowiednie grupy białek macierzy, np. grupa RGD fibronektyny. Okazuje się jednak, że sygnał chemiczny „nie załatwia wszystkiego”. Np. przyłączenie RGD zapobiega apoptozie komórek nabłonkowych, ale tylko wtedy, gdy RGD jest unieruchomione na macierzy i komórki mogą się rozpląszczać [5]. RGD podane na powierzchni maleńkich kuleczek szklanych nie zapobiega apoptozie [27] i nie zmienia kształtu komórek z kulistego na płaski. Integryny są więc nie tylko receptorami sygnałów chemicznych z macierzy pozakomórkowej, są również receptorami (przekaznikami) sygnałów mechanicznych. Integryny zakotwiczone na macierzy umożliwiają powstanie stanu naprężenia w kurczliwych elementach układu cytoszkieletu

(np. wiązek filamentów aktynowych oddziałujących ze sobą za pośrednictwem miozyny), z którymi są połączone po drugiej stronie błony komórkowej. Przenoszą one naprężenia powstające w cytoszkielecie poprzez błonę na macierz, jeżeli tylko ta ostatnia jest dostatecznie sztywna. Grupowanie integrzyn prowadzące do tworzenie miejsc adhezji (*focal contacts*) zależy nie tylko od sygnałów chemicznych ze strony macierzy, ale również od mechanicznego stanu macierzy. Miejsca adhezji komórek na macierzy mogą się w pełni wykształcić tylko wtedy, gdy macierz jest dostatecznie usztywniona przy tym samym chemicznym składzie [26]. Chemiczne właściwości macierzy są ważne, ale równie ważne, a czasem ważniejsze są jej właściwości fizyczne. Wiadomo obecnie, że fizyczny stan macierzy ma nawet wpływ na jej skład chemiczny, bo wydzielanie macierzy zależy od fizycznego stanu poprzednio wydzielonej macierzy [19]. Komórki w warstwie żelu, uzyskanego z macierzy i przychepionego do powierzchni naczynia, tworzyły miejsca adhezji, wykształcały w sobie pęki filamentów aktynowych (*stress fibers*) i tworzyły wokół siebie włókienka fibronektyny, podczas gdy w grudkach żelu zawieszonych w pożywce takich zdolności nie miały [10]. Komórki naniesione na powierzchnie „nadrukowane” w różny sposób cząsteczkami, do których mogą się przyłączać integryny [33], zachowują się różnie w zależności od gęstości „punktów druku”, przy tym samym stopniu wysycenia miejsc przyłączania integrzyn. Np., gdy punkty „druku” są skupione, jak w czarnej plamce zwykłego druku, komórki się nie rozplaszczają i ulegają apoptozie, podczas gdy przy odpowiednim rozproszeniu punktów na powierzchni, jak w szarym tle druku, komórki się rozplaszczają i przeżywają [5].

Nabłonkowe komórki z aorty hodowane na warstwie żelu zawierającej kolagen IV i lamininę naciągają włókna kolagenu siłami generowanymi w cytoszkielecie. W żelu tworzy się płaska poligonalna sieć „włókien” silniej naciągniętych z węzłami w miejscach początkowych skupień komórek, wywołujących naciąganie. Są to włókna wyróżnione naprężeniem rozciągającym, a więc „wyprostowane”. Następnie komórki migrują wzdłuż tych „włókien”, łączą się i tworzą kapilary (angiogeneza) [23]. Gdy jednak żel jest zbyt sztywny komórki rozplaszczają się równomiernie na jego powierzchni i angiogeneza nie występuje.

Wspomniane wyżej włókna naprężeniowe w warstwie żelu odpowiadają fałdkom silniejszego naciągnięcia, jakie łatwo wywołać w błonce, gdy przyłoży się do niej końce pęsetki i ściągnie się nimi błonkę. Fibroblasty naniesione na cienką błonkę silikonową na powierzchni pożywki napinają błonkę wywołując w niej fałdki silniejszego naprężenia, które łatwo można uwidocznic w mikroskopie interferencyjno-polaryzacyjnym. Te fałdki są przejawem pola naprężeń w błonce. Za pomocą „fałdek” i „włókien” komórki są w stanie oddziaływać na siebie nawet na duże odległości [11]. Takie eksperymenty uświadamiają, że naprężenia mogą tworzyć długozasięgowe pola sygnalizacji. Przecież naprężenie linki rozprzestrzenia się na całą jej długość! Rzadko bierzemy pod uwagę dalekodystansowe działanie naprężeń, bo choć w praktyce często posługujemy się linkami do przesyłania sygnałów, to jednak linki najczęściej nie są zbyt długie. Aby przesyłały sygnały muszą być napięte, a utrzymywanie tego stanu jest tym trudniejsze im są dłuższe. Lejce – klasyczna struktura przenosząca sygnały kierunkowe od woźnicy do konia – nie są zbyt długie. Ale już zwieszające się pod własnym ciężarem linki latawca, a więc

stale napięte, mogą być bardzo długie, a jednak skuteczne w przenoszeniu sygnałów kierunkowych na równie duże odległości.

Już w 1983 r. Haston et al. [12] pokazali, że fibroblasty na cienkiej błonce kolagenowej orientują się w głównym kierunku naprężenia rozciągającego w błonce. Fibroblasty w żelu kolagenowym nie tylko „naciągają” żel, ale ustawiają się wzdłuż kierunków maksymalnego naprężenia i równoległe do swobodnej powierzchni żelu, samoorganizując swój układ w żelu [8].

Fibroblasty hodowane na podłożu (substracie), na którym mogą rozpląszczać się i wywierać nań siły, rozwijają w sobie zupełnie inne układy elementów cytoszkieletu niż na substracie, z którym oddziałują tylko chemicznie. [26]

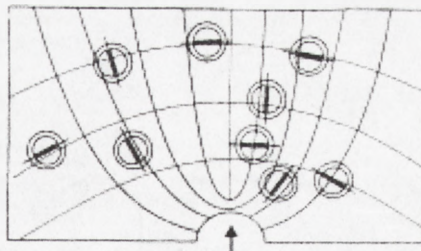
Gdy podłoże jest zróżnicowane, przylegające do niego komórki nabłonkowe mają tendencje do przemieszczania się w kierunku gradientu sztywności, a gdy sztywność zależy tylko od modułu Younga - w kierunku wzrastającego modułu Younga [3, 21]. Tak samo zachowują się komórki mięśni gładkich [38]. Ludzkie komórki nabłonka żylnego hodowano na silikonowym pasie, do którego przylegały, a który poddawano cyklicznemu naprężaniu z 20% powiększeniem długości, 52 cykli na min [32]. Komórki przylegały do błony tworząc warstwę. Podczas gdy na błonie nienaprężanej komórki były równowymiarowe, na błonie naprężanej były silnie wydłużone w kierunku prostopadłym do kierunku naprężania, a mikrofilamenty aktynowe tworzyły „*stress fibers*” (SF) w tym samym kierunku. W nie naprężanych pasach, SF występowały w znacznie mniejszej liczbie, a ich orientacja była przypadkowa. Eksperymenty z forskoliną, stymulatorem syntezy cAMP, która zaburza utrzymywanie SF pokazały, że grupowanie mikrofilamentów w SF jest warunkiem tworzenia układu wydłużonych komórek, ale SF nie są potrzebne do utrzymywania tego układu [32]. W konkluzji można stwierdzić, że badania nad komórkami zwierzęcymi wykazują ich wrażliwość mechaniczną i zdolność rozpoznawania głównych kierunków naprężenia.

KOMÓRKI ROŚLINNE

Wskazano już na to, że komórki merystemu dzielą się w kierunkach wyznaczonych przez główne kierunki tensora szybkości wzrostu. Jeżeli tak, to rozpoznają PD-esy szybkości wzrostu, albo innego tensora, którego PD-esy pokrywają się z PD_{ω} -esami. Już to wskazuje, że warunek Ω jest spełniony u roślin. Takim tensorem, którego PD-esy mogą się pokrywać z PD_{ω} -esami jest naprężenie mechaniczne ściany komórkowej. PD-esy naprężenia i PD-esy szybkości wzrostu albo się pokrywają, albo są o niewielki kąt obrócone w zależności od tekstury ścian komórkowych. Niepokrywanie się PD-esów nie jest zapewne większe niż niepokrywanie się helikalnych linii układu chloroplastów z kierunkiem podłużnym u *Nitella*, a prawdopodobnie helikalne linie reprezentują $PD_{\max, \omega}$, podczas gdy PD-esy są na pewno podłużne i poprzeczne, bowiem są wynikiem ciśnienia turgorowego w cylindrycznej komórce.

Są dwa typy pokrywania się PD-esów tensorów naprężenia i szybkości wzrostu: (1) PD-esy pokrywają się, ale ekstrema, które reprezentują, są różnego typu, np. $PD_{\max, \omega}$

RYCINA 6 Kierunki podziałów komórkowych w zawiesinie komórek w płytce zestalonej agarozy, na którą naciskano pręcikiem w miejscu wskazanym strzałką. Na pierwszy rzut oka nie widać regularności w kierunkach podziałów. Gdy jednak uwzględnimy główne kierunki naprężeń (wyznaczone metoda elasto-optyczną), widać że podziały zachodzą w kierunkach wyznaczonych przez: $PD\sigma$ -esy



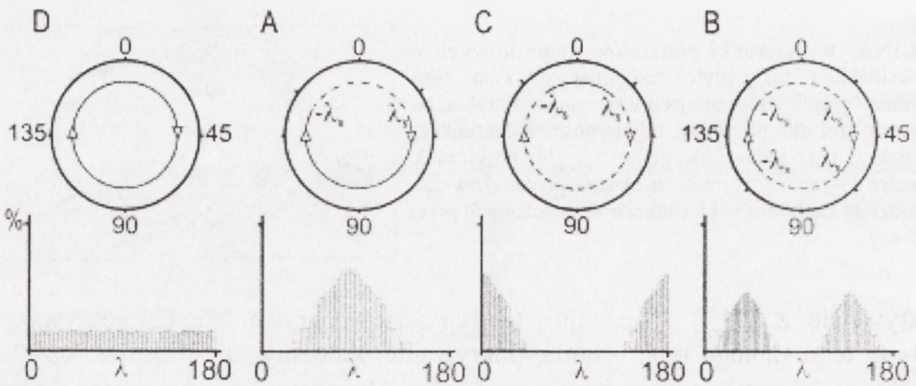
pokrywa się z $PD_{\min,\sigma}$ – nazwijmy ten typ hetero-pokrywaniem; (2) pokrywają się PD -esy tego samego typu – homo-pokrywanie. Załóżmy, że znamy „krzyże” dla szybkości wzrostu na powierzchni wierzchołka. Można wyobrazić sobie też „krzyże” dla naprężenia, choć aktualnie nie dysponujemy techniką umożliwiającą ich uzyskanie dla ścian komórkowych na powierzchni wierzchołka. W przypadku hetero-pokrywania się PD -esów dla szybkości wzrostu i naprężenia „krzyże” są równoległe, ale długie ramie jednego odpowiada krótkiemu ramieniu drugiego.

Na podstawie rozszerzonego prawa Hooke’a można oczekiwać, że w merystemie wierzchołkowym korzenia PD -esy dla szybkości wzrostu i naprężenia pokrywają się, ściśle albo prawie, według typu hetero, albo homo. Jeżeli tak jest, to perykliny podłużne, czyli te, które są widoczne na przekroju osiowym, stanowią trajektorie PD_{\max} dla szybkości wzrostu i zarazem trajektorie jakiegoś głównego kierunku naprężenia. Poprzedni wniosek, wynikający z badania układu komórek, że podziały komórkowe zachodzą ortogonalnie do PD -esów szybkości wzrostu, jest więc równoważny wnioskowi, że zachodzą ortogonalnie do PD -esów naprężenia.

Istnieje piękne eksperymentalne potwierdzenie tezy, że komórki rozpoznają PD -esy naprężenia i według nich ukierunkowują podziały. Chodzi o wyniki eksperymentu przeprowadzonego już parę lat temu przez Lintilhaac i współpracowników [22] o olbrzymim znaczeniu poznawczym, a stale niedocenianym. Mianowicie, badali oni podziały w zawiesinie protoplastów (w początkowym stadium tworzenia ściany, ale dla uproszczenia będziemy je nazywali „protoplastami”) w medium o odpowiednim składzie. Do medium dodawali agarozę, otrzymując w ten sposób zawiesinę dzielących się protoplastów w żelu. Do żelu przykładali lokalnie siłę naciskającą żel i wprawiającą go w stan naprężenia. Podziały protoplastów zorientowane były pozornie chaotycznie, gdy jednak metodą elasto-optyczną wyznaczono główne kierunki naprężenia w żelu, kierunki podziałów odpowiadały tym PD -esom (ryc. 6).

Bardzo silne poparcie tezy, że komórki roślinne rozpoznają $PD\sigma$ -esy dostarczają wyniki własnych badań autora przeprowadzonych w ramach dopiero co zakończonego grantu KBN, jeszcze nie opublikowane. Dotyczyły one układu mikrotubul korykalnych (MTc) pod zewnętrzną ścianą epidermy hipokotyla słonecznika i wpływu naprężenia mechanicznego oraz auksyny na ten układ. Pierwsza część badań doprowadziła do odkrycia, że:

1. Cykle reorientacji (MTc) (zmiana kąta λ , pod jakim nachylone są równoległe ułożone MTc względem kierunku podłużnego w komórce) mają charakter rotacyjny, a nie oscylacyjny (ryc. 7);



RYCINA 7 Schematy podstawowych typów układów MTc charakteryzowanych przez histogramy (dolny rząd) oraz odpowiadających im cykli rotacyjnych. Histogram podaje procent komórek (oś pionowa), w których wzajemnie równoległe ustawione MTc tworzyły z kierunkiem podłużnym kąt wskazany na osi poziomej. Kąt 0° lub 180° odpowiada orientacji podłużnej (wzdłuż długiej osi komórek), kąt 90° – orientacji poprzecznej. Histogram typu D charakteryzuje się równomiernym rozkładem kątów; A – maksimum dla orientacji poprzecznej; C – maksimum dla orientacji podłużnej; B – maksima dla orientacji skośnych. Cykl reorientacji jest charakteryzowany przy pomocy dwu okręgów: zewnętrzny podaje współrzędną kątową (fazę), wewnętrzny – podaje prędkość kątową jako ciągłą linię, gdy prędkość jest mała oraz jako przerywaną linię, gdy prędkość jest duża, czyli gdy cykl skacze przez dany zakres. Zauważ, że przeskoki dokonują się między przeciwnymi kątami λ_s i $-\lambda_s$.

2. Prędkość (V) zmian kąta λ ($V = d\lambda/dt$) jest funkcją λ , $V = V(\lambda)$;

3. Prędkość V , gdy λ zbliża się do zakresu kąтового, zawierającego kierunek podłużny, albo poprzeczny, może znacznie wzrastać, po czym cykl skacze przez ten zakres, a na histogramie częstości występowania λ zakres przeskoku jest pusty (minimum częstości).

4. Występuje zwierciadlana symetria kątów, między którymi cykl skacze (λ_σ i $-\lambda_\sigma$). Na tej podstawie wysunięto hipotezę, że morfologiczne kierunki w komórce (podłużny, poprzeczny), względem których kąt λ jest wyznaczany, odpowiadają głównym kierunkom (PD-esom) jakiegoś tensora działającego w ścianie, a regulującego układ MTc za pośrednictwem funkcji V i przeskoków przez PDs w cyklu reorientacji MTc.

W drugiej części badań, izolowane pasy epidermy poddawano podłużnemu naprężaniu (aby przywrócić podłużne naprężenia tkankowe usunięte wskutek izolacji) oraz działaniu auksyny. Stwierdzono, że tensorem, który reguluje cykl reorientacji MTc, jest naprężenie (σ) w ścianie komórkowej, pod którą znajduje się rozważany układ MTc. Główne kierunki naprężenia zależą od ciśnienia turgorowego i podłużnego naprężenia przyłożonego do izolowanego pasa epidermy. W nie naprężanych pasach $PD_{\sigma, \max}$ jest zorientowane poprzecznie (ze względu na cylindryczny kształt komórek epidermy). W naprężanych pasach $PD_{\sigma, \max}$ jest zorientowane podłużnie. Przy braku egzogennej auksyny cykl reorientacji skacze przez $PD_{\min, \sigma}$, co w izolowanych, nie naprężanych pasach epidermy daje poprzeczno-skośny układ MTc, zaś w pasach naprężanych układ podłużno-skośny. W obecności auksyny, w naprężanych pasach cykl skacze przez $PD_{\max, \sigma}$, dając poprzeczno-skośny układ mikrotubul ($PD_{\max, \sigma}$ jest w kierunku

podłużnym), zaś w pasach nie naprężanych układ jest podłużno-skośny. Uzyskane wyniki prowadzą do hipotezy, że podniesienie poziomu auksyny zmienia wybór głównego kierunku naprężenia (PD_{σ}), przez który skacze rotacyjny cykl reorientacji MTc w komórkach epidermy. Wszystkie uzyskane wyniki dają się konsekwentnie objaśnić na podstawie wymienionych hipotez, a zarazem hipotezy nie są falsyfikowane przez dane z literatury.

Na podstawie przedstawionych argumentów (układ komórek w merystemie wierzchołkowym, badania Grupy Lintilhaac, wyniki badań nad układami MTc) można więc wnioskować, że komórki roślinne rozpoznają główne kierunki tensora naprężenia i wykorzystują je jako źródło informacji kierunkowej. Biorąc pod uwagę, że również komórki zwierzęce cechują się podobną zdolnością, w odpowiedzi na pytanie postawione w tytule należy stwierdzić „w rozpoznawaniu kierunków ważną rolę odgrywają główne kierunki tensora naprężeń”.

TENSOR NAPRĘŻEŃ WE WZROŚCIE I KSZTAŁTOWANIU FORMY ORGANU ROŚLINNEGO

Rozważmy tensorowe ujęcie problemu wzrostu i formy. „On Growth and Form” stanowi tytuł dzieła D’Arcy Thompson’a [35], które daje podstawę dla tensorowego ujęcia tego problemu, jednak do takiego ujęcia jeszcze nie doprowadziło.

W przypadku roślin wzrost i kształtowanie formy sprowadza się głównie do wzrostu powierzchniowego ścian komórkowych. Wiadomo, że wzrost ściany komórkowej jest „napędzany” jej naprężeniem rozciągającym. Ściana komórkowa, aby rosnąć, musi być naprężona i naprężenie musi przekraczać pewną wartość progową, powyżej której pojawia się odkształcenie nieodwracalne ściany, czyli to, co nazywamy wzrostem [6,7]. Gdy przyłożymy naprężenie rozciągające do ściany i stopniowo powiększamy je, pojawia się najpierw odkształcenie elastyczne – naprężenie powoduje elastyczne powiększenie ściany – ale to jeszcze nie jest wzrostem. Gdy naprężenie przekroczy wartość progową dla „płynięcia”, wtedy pojawia się nieodwracalne powiększenie ściany i dopiero to nieodwracalne odkształcenie jest wzrostem. Zależy ono jednak również od czasu. Nie ma więc żadnej określonej zależności między nieodwracalnym odkształceniem a naprężeniem. Istnieje jednak określona zależność między szybkością nieodwracalnego odkształcania, czyli szybkością wzrostu, a naprężeniem (σ). Mianowicie, mamy dobrze znaną zależność między szybkością wzrostu objętości (V) a ciśnieniem turgorowym (P)

$$\Delta V/V \Delta t = \Phi(P - P_0) \quad (\text{równanie 2})$$

gdzie F jest współczynnikiem proporcjonalności (*extensibility*), który określa „podatność” izotropowej ściany na powiększanie powierzchni pod wpływem ciśnienia turgorowego, gdy przekracza ono pewną wartość progową P_0 (*yield threshold*). Jest to

proporcjonalna zależność między wielkościami skalarnymi, czyli równanie (2) jest na poziomie tensorów zerowego rzędu; po obu stronach znaku równości mamy tylko liczby. W przypadku szybkości wzrostu linearnego, który jest tensorem drugiego rzędu, domyślamy się podobnej zależności $RER G_1 = \Phi (\sigma - \sigma_0)$, albo w notacji tensorowej $G_{ij} = F(S_{kl} - S_{0kl})$, gdzie G_{ij} symbolizuje tensor szybkości wzrostu, a S_{kl} – tensor naprężenia, (S_0 jest tensorem naprężenia o progowej wartości). Czym jest czynnik Φ ? Znak równości oznacza, że tensor drugiego rzędu pomnożony przez Φ daje tensor tego samego rzędu. Analiza tensorowa wskazuje, że to jest możliwe tylko wtedy, gdy Φ jest albo skalarem, albo tensorem czwartego rzędu. Pierwszy przypadek odpada, bowiem nie ma tak prostej zależności między tensorami odkształcenia i naprężenia. W drugim przypadku, Φ jako tensor IV rzędu jest wielkością opisywaną przez 3^4 liczb (macierz utworzona z 81 liczb), z których większość ze względu na symetrię to zera (od 60 do 72 zer). Wstawiając $\Phi = F_{ijkl}$ otrzymujemy

$$G_{ij} = F_{ijkl} (S_{kl} - S_{0kl}) \quad (\text{równanie 3})$$

Równanie to mówi nam, że dane (takie samo) pole naprężenia (S_{kl}) może prowadzić do różnych pól szybkości wzrostu linearnego w zależności od pola tensora F_{ijkl} . Jak już wspomniano, F_{ijkl} to zestaw różnych liczb, czyli parametrów. W przypadku komórki można przyjąć, że parametry te zależne są głównie od informacji genetycznej, takiej jak dla tekstury ściany, jej uplastyczniana, np. za pośrednictwem ekspansyn itd. W różnych komórkach albo w różnych fazach rozwoju tej samej komórki w danym miejscu ściany komórkowej, zestawy F_{ijkl} mogą być różne. Równanie (3) mówi więc nam, że takie samo pole naprężenia, może prowadzić do różnych form ciała, w zależności od informacji genetycznej. Forma ciała bowiem sprowadza się do jego wymiarów w ortogonalnych kierunkach na różnych poziomach, a wymiary są całkami szybkości wzrostu wzdłuż linii współrzędnej odpowiadającej danemu wymiarowi oraz w czasie. Równanie (3) przedstawia więc najogólniej, w jaki sposób naprężenie jako czynnik napędzający wzrost, np. naprężenie turgorowe, a zarazem jako czynnik dostarczający informacji kierunkowej, może prowadzić do różnych form w zależności od informacji genetycznej. W tym ujęciu forma jako całka (po przestrzeni i czasie) tensora szybkości wzrostu, jest produktem działania informacji genetycznej i tensora naprężenia. Pole tego ostatniego w danym momencie zależy od aktualnej formy komórek, bowiem tensor naprężenia ściany komórki znajdującej się pod ciśnieniem turgorowym zależy od kształtu komórki.

LITERATURA

- [1] ANTOSIEWICZ J. Tablice funkcji dla inżynierów. PWN 1969.
- [2] BELOUSSOV LV. Mechanical stresses in animal development: patterns and morphogenetic role. [w] Alt W, Deutsch A, Dunn G.[red] Dynamics of Cell and Tissue Motion. Basel, Berlin: Birkhäuser 1997: 221-228.
- [3] BISCHOFFS IB, SCHWARZ US. Cell organization in soft media due to active mechanosensing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 9274-9279.

- [4] BŁASIAK J, NIEWIAROWSKA J, CIEŚLAK M, CIERNIEWSKI CS. Integryna i ich znaczenie w progresji nowotworów złośliwych. *Post Biochem* 1991; **45**: 239-248.
- [5] CHEN CS, MRKSICH M, HUANG S, WHITESIDES GM, INGBER DE. Geometric control of cell life and death. *Science* 1997; **276**: 1425.
- [6] COSGROVE DJ. Wall relaxation and the driving force for cell expansive growth. *Plant Physiol* 1987; **84**: 561-564.
- [7] COSGROVE DJ. Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases for extensible cell walls and cell enlargement. *Plant Cell* 1997; **9**: 1031-1041.
- [8] EASTWOOD M, MUDERA VC, MCGROUTHER D, BROWN RA. Effect of precise mechanical loading on fibroblast populated lattices: morphological changes. *Cell Motil Cytoskeleton* 1998; **40**: 13-21.
- [9] GOMBERG BR, SAHA PK, WEHRLI FW. Topology-based orientation analysis of trabecular bone networks. *Med Phys* 2003; **30**: 1-11.
- [10] HALLIDAY NL, TOMASEK JJ. 1995 Mechanical properties of the extracellular matrix influence fibronectin fibril assembly *in vitro*. *Exp Cell Res* 1995; **217**: 109-117.
- [11] HARRIS AK, WILD P STOPAK D. Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science*, 1980; **208**: 177-179.
- [12] HASTON WS, SHIELDS JM, WILKINSON PC. The orientation of fibroblasts and neurofils on elastic substrata. *Exp Cell Res* 1983; **146**: 117-126.
- [13] HEJNOWICZ Z. Trajectories of principal directions of growth, natural coordinate system in growing plant organ. *Acta Soc Bot Pol* 1984; **53**: 29-42.
- [14] HEJNOWICZ Z. Differential growth resulting in the specification of different types of cellular architecture in root meristem. [w] Barlow W (red) Differential growth in plants. Oxford: Pergamon Press 1989: 85-93.
- [15] HEJNOWICZ Z. Anatomia i histogeneza roślin naczyniowych. PWN 2002.
- [16] HEJNOWICZ Z, ROMBERGER JA. Growth tensor of plant organs. *J theor Biol* 1984; **110**: 93-114.
- [17] HEJNOWICZ Z, SIEVERS A. Tissue stresses in organs of herbaceous plants. I. Poisson ratios of tissue and their role in determination of the stresses. *J Exp Bot* 1995; **289**: 1035-1043.
- [18] KACZANOWSKI A, KACZANOWSKA J. Mechanizmy przestrzennego różnicowania zarodka. *Post Biol Kom* 2001; **28**: 69-98.
- [19] KATZ BZ, ZAMIR E, BARSCHANSKY A, KAM Z, YAMADA KM, GEIGER B. Physical state of extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions. *Mol Biol Cell* 2000; **11**: 1047-1060.
- [20] KWIATKOWSKA D. Surface growth at the reproductive shoot apex of *Arabidopsis thaliana* pin-formed *l* and wild type. *J Exp Bot* 2004; **55** (w druku)
- [21] LO C-M, WANG H-B, DEMBO M, WANG Y-L. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J* 2000; **79**: 144-152.
- [22] LYNCH TM, LINTILHAAC PM Mechanical signals in plant development: a new method for single cell studies. *Develop Biol* 1997; **181**: 246-256.
- [23] MANOUSSAKI D, LUBKIN SR, VERNON RB, MURRAY JD. A mechanical model for the formation of vascular networks *in vitro*. *Acta Biotheoretica* 1996; **44**: 271-282.
- [24] NAKIELSKI J, BARLOW PW. Principal directions of growth and the generation of cell patterns in wild-type and gib-1 mutant roots of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) grown *in vitro*. *Planta* 1995; **196**: 30-39.
- [25] ODGAARD A, KABEL J, VAN RIETBERGEN B, DALSTRA M, HUISKES R. Fabric and elastic principal directions of cancellous bone are closely related. *J Biomechanics* 1996; **30**: 487-495.
- [26] PELHAM RJ Jr, WANG Y. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 13661-13665.
- [27] RE F, ZANETTI A, SIRONI M, POLENTARUTTI N, LAFRANCONE L, DEJANA E, COLOTTA F. Inhibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells. *J Cell Biol* 1994; **127**: 537-546.
- [28] RODKIEWICZ B. Embriologia roślin nagozalążkowych. PWN 1984.
- [29] RODKIEWICZ B, ŚNIEŻKOR, FYK B, NIEWĘGŁOWSKA B, TCHÓRZEWSKA D. Embriologia *Angiospermae* rozwojowa i eksperymentalna, Lublin: Wydawn. UMC-S 1996.
- [30] SCHWARTZ MA. Integrin signaling revisited. *Trends Cell Biol* 2001; **11**: 466-470.
- [30a] SHERES B, DI LAURENZIO L, WILLEMSSEN V, HAUSER MT, JAUMAAT K, WEISBEEK P, BENFEY PN. Mutations affecting the radial organisation of *Arabidopsis* root display specific defects through the embryonic axis. *Development* 1995; **121**: 53-62.

- [31] SHIRINSKY V, ANTONOV AS, BIRUKOV KG, SOBOLEVSKY AV, ROMANOV YA, KABEVA NV, ANTONOVA GN, SMIRNOV VN. Mechano-chemical control of human endothelium orientation and size. *J Cell Biol* 1989; **109**:331-339.
- [33] SROKA J. Zjawisko naprowadzania komórek zwierzęcych przez kontakt z podłożem- wykorzystanie w praktyce klinicznej. *Post Biol Kom* 2001; **28**: Suppl 16: 63-80.
- [34] TERRIER A. Adaptation of bone to mechanical stress: theoretical model, experimental identification and orthopedic applications. École Polytechnique Fédérale de Lausanne 1999.
- [35] THOMPSON D'ARCY W. On Growth and Form. Vol.I i II. Cambridge: University Press 1952
- [36] TWYMAN RM. Biologia rozwoju PWN, 2003 (przekład: Instant notes. Developmental biology 2001).
- [37] WOLFF J. Das Gesetz der Transformation der Knochen. Hirschwald, Berlin 1892.
- [38] WONG JY, VALASCO A, RAJAOPALAN P, PHAM Q. Directed movement of vascular smooth muscle cells on gradient-compliant hydrogels. *Langmuir* 2003; **19**: 1908-1913.

Zygmunt Hejnowicz

Katedra Biofizyki i Biologii Komórki, Uniwersytet Śląski,

ul. Jagiellońska 28, 40 032 Katowice,

E-mail khejn@us.edu.pl

AUKSYNA – CZYNNIK KOMUNIKACJI W PROCESACH FUNKCJONALNEGO RÓŻNICOWANIA UKŁADU PONADKOMÓRKOWEGO ROŚLINY

AUXIN – THE COMMUNICATION FACTOR IN THE PROCESS OF PLANT SUPRACELLULAR SPECIALIZATION

Tomasz Józef WODZICKI

Katedra Botaniki Leśnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego,
Warszawa

Streszczenie: Procesy sygnalizacji auksynowej stanowią mechanizm przekazu informacji o zasobach, warunkach i gradientach czynników środowiska do systemu informacji morfogenetycznej koordynującego wzrost i rozwój wielokomórkowego organizmu rośliny w tym ekspresji rozwojowych programów genetycznych. System komunikacji kontrolowany przez auksynę na różnych poziomach organizacji ciała rośliny uwarunkowany jest strukturalną polarnością komórek (szczególnie w obszarze tkanek merystatycznych), co umożliwia bazypetalny transport tego fitohormonu. Niemal każdy tydzień przynosi postęp w badaniach kolejnych molekularnych procesów percepcji i transdukcji w systemie sygnałowym auksyny na poziomach komórkowym i subkomórkowym. Pomimo tych rozległych badań wciąż obserwuje się mały postęp znajomości procesów z udziałem auksyny integrujących poziomy komórkowy i ponadkomórkowe. Do dyskusji w tym referacie wybrałem niewielką grupę publikacji dotyczących poziomu molekularnego regulacji auksynowej, jako że są one dość szeroko omawiane w artykułach przeglądowych literatury światowej, w tym także polskich autorów. Zamiast tego, uwagę skupiłem na systemie autokontroli auksyny w procesie swego własnego transportu. W tym aspekcie przedstawione zostały także wnioski i niektóre wyniki uzyskane w Katedrze Botaniki Leśnej SGGW w czasie zakończonych kilka lat temu, kontynuowanych przez wiele lat studiów nad polarnym transportem auksyny w wycinkach pni drzewa obejmujących tylko pojedynczy osiowy szereg komórek strefy kambialnej. Dało mi to okazję, aby przedstawić kilka sugestii dalszych badań w kierunku poznania molekularnego mechanizmu kontrolującego oscylację ekspresji polarności w transporcie auksyny jako podstawy tworzenia i propagacji w układzie ponadkomórkowym odkrytych wcześniej fal auksyny.

Słowa kluczowe: auksyna, mechanizm regulacji, polarny transport.

Summary: Auxin signalling processes provide mechanism integrating environmental effects and genetic programs into a system of morphogenetic information for coordinated growth and development of the multicellular plant organism. Auxin controlled system of communication at various levels of plant body organization depends upon structural polarity of the individual cells (especially in the meristema-

tic regions), which allows basipetal transport of this phytohormone. Nearly every week extends the knowledge concerning auxin signal perception and transduction at the cell molecular level. In spite of these very extensive research programs there is still little progress in knowledge of the auxin regulated processes integrating the cellular and supracellular levels. For the discussion in this paper I selected only small group of papers concerning the molecular level of auxin regulation which otherwise are extensively reviewed in the world literature including the Polish authors. Instead, the attention has been focused upon the system of autocontrol by auxin of its own polar transport. In this aspect, there are included also some of our own last results obtained in the Forest Botany Department SGGW, during just ended (but continued for many years before 2000) studies on the auxin polar transport in which we used small stem sections of large trees consisting only a single axial cell layer of the cambial region. This gave me a chance to present also few suggestions of future investigations concerning the possible molecular mechanisms responsible for oscillation of the cell polarity expression in auxin transport which can be useful in explaining formation and propagation of the discovered earlier supracellular auxin waves.

Key words: auxin, control mechanism, polar transport.

Okrycie i identyfikacja chemiczna auksyny jako kwasu indolilo-3-ocetowego w połowie lat dwudziestych ubiegłego stulecia poprzedzone było co najmniej półwieczem obserwacji lub doświadczeń nad reakcjami wzrostowymi u roślin oraz spekulacji uczonych na temat tajemniczego regulatora wzrostu. Dotyczyło przecież jednego z procesów fizjologii roślin najbardziej interesujących hodowców roślin użytkowych, a przy tym kusilo stosunkowo dużą łatwością pomysłowych eksperymentów. Zainicjowało więc lawinę badań i rozważań teoretycznych, angażując najświatlejsze umysły oraz znaczny potencjał laboratoryjny instytutów badawczych i uniwersytetów świata. Tak więc, gdy w połowie lat sześćdziesiątych przy pomocy mojej żony Aliny, po raz pierwszy dołączyłem do licznego w tym czasie grona badaczy reakcji auksynowych, istniała już ogromna bibliografia dokumentująca poznane dotąd reakcje wzrostowe związane z funkcją auksyny jako przENOŚNIKA informacji w procesach rozwojowych roślin [40, 41]. Główne wnioski wynikające z tej, nazwałbym ją inicjalnej fazy poznawania roli auksyny, na tle równoległe rozwijających się badań innych fitohormonów i mechanizmów komunikowania się roślin ze swym środowiskiem lub ich komórkowych podukładów pomiędzy sobą, dadzą się uogólnić w stwierdzeniu, że nie ma takiego procesu w cyklu życiowym rośliny, który byłby wolny od regulacyjnego udziału auksyny [42]. Nie pretendując do wyczerpującego podsumowania, wydaje się, że na wyróżnienie zasługują następujące z tych wczesnych wniosków:

1. Zadaniem auksyny jest przenoszenie informacji w układach ponadkomórkowych rośliny. Jedynym poznany bliżej sygnałem w procesie przekazu informacji przez auksynę jest zmiana stężenia tego fitohormonu. Jednostkami przenoszącymi sygnały auksynowe są komórki połączone apoplastem.
2. Komórki wyróżniające się zdolnością zinterpretowania sygnału auksynowego otrzymują ten sygnał bezpośrednio ze ściany komórkowej komórek sąsiednich w drodze dyfuzji i transportu molekularnego przez błonę komórkową. O rodzaju reakcji tych komórek decyduje historia ich wcześniejszego molekularnego różnicowania i położenie względem układu ponadkomórkowego. To znaczy, że prawdopodobnie jednym z głównych czynników kompetencji komórek, w których zachodzi transdukcja sygnału auksynowego jest informacja pozycyjna związana z konfiguracją pola morfogenetycznego.

3. Najbardziej charakterystyczną reakcją na działanie auksyny jest stymulacja wzrostu objętościowego komórek, czemu towarzyszy wiele różnych procesów na poziomie subkomórkowym.
4. Specyficznymi przejawami regulacji wzrostu przy udziale auksyny są dominacja wierzchołkowa i korelatywne hamowanie ustalające proporcje rozwoju poszczególnych części organizmu rośliny w stosunku do głównych osi polarności środowiska.
5. Auksyna jest głównym czynnikiem funkcjonowania systemu polarności fizjologicznej roślin lądowych jako, że biegunowe zróżnicowanie struktury błony komórkowej (zapoczątkowane polaryzacją zygoty), odnawiane przez całe życie organizmu w czasie podziałów komórek merystematycznych, służy wyłącznie bazypetalnemu transportowi molekuł tego fitohormonu. Dzięki temu prędkość sygnalizacji auksynowej wielokrotnie przewyższa dyfuzję, która decyduje w komunikacji tylko sąsiednich komórek.
6. Synteza auksyny jest procesem towarzyszącym aktywności merystematycznej komórek, a informacja o tych procesach oznaczających (między innymi) zmiany stężenia auksyny, osiąga komórki kompetentne bez względu na ich położenie względem źródła produkcji tego fitohormonu, mimo bazypetalnego transportu molekuł kwasu indolilo-3-ocowego.

System sygnałowy z udziałem auksyny lub substancji auksynopodobnych jest prawdopodobnie bardzo starym sposobem komunikowania między komórkami jako podstawowymi jednostkami życia niekoniecznie będącymi w bezpośrednim kontakcie [39]. Produkcja tych substancji znana jest u prokariotów [31, 35]. Znane jest też pośrednictwo takich substancji w interakcjach roślin z grzybami [9, 27, 32, 33]. Sądzi się też, że system auksynowy ewoluował w sukcesji analogicznej roli pełnionej pierwotnie przez aminokwasy aromatyczne [18], z których wywodzą się także najwcześniej wykorzystane w konstrukcji pamięci genetycznej puryny i pirymidyny, a później także morfogeny, fitohormony, neurotransmitery i regulatory ekspresji wrażeń w systemach zwierzęcych np. związki pokrewne tryptofanu, melatonina, tryptamina, serotonina. Ewolucja procesu regulacji auksynowej była warunkiem adaptacji fotosyntetyzujących autotrofów na lądzie, gdzie niezbędnym jest stała orientacja i dopasowywanie różnicowania funkcjonalnego organizmu względem wektorów siły grawitacji ziemskiej, określającego miejsce gromadzenia wody i strumienia fotonów w promieniowaniu słonecznym. Nic więc dziwnego, że równocześnie z odkrywaniem coraz to nowych zależności procesów rozwojowych roślin wyższych od auksyny, podejmowano i podejmuje się próby objaśnienia mechanizmów fizjologicznych tego uniwersalnego systemu sygnałowego.

To okazało się wciąż wyjątkowo trudne mimo sformułowania już dawno kilku pełnych twórczego optymizmu teorii [8, 20, 36, 41, 44, 51]. Każde pokolenie auksynologów pozostawia jednak następnym nie tylko postęp teorii, ale rozwija nowe metody umożliwiające studiowanie mechanizmu regulacji auksynowej na innych poziomach organizacji ciała rośliny. Sukcesywnie badacze podzielili się na tych, którzy potencjał poznawczy ześrodkowali na procesie percepcji sygnału auksynowego, [14, 45, 46] lub białkowych przekaźników auksyny [16, 29], kontroli potencjału błony komórkowej [6, 10, 21], jego transdukcji na subkomórkowym poziomie molekularnym [1, 12, 13, 30]

lub też polarnym transporcie auksyny [19, 22]. W każdym z tych obszarów w ostatnim 10-leciu opublikowano wiele wyników szczegółowych badań, a także prac przeglądowych [23, 30, 63]. Czy jednak można powiedzieć, że istnieje już wiarygodna teoria regulacji auksynowej uwzględniająca w pełni funkcje auksyny w życiu roślin? Na pewno jeszcze nie. Na bardziej szczegółowe badania oczekuje na przykład wciąż mało poznany aspekt biofizyczny działania mechanizmu sygnałowego auksyny. Studiowano już wprawdzie wpływ zmiany stężenia auksyny na niektóre cechy fizyczne ściany komórkowej [5, 7], ale znacznie mniej wiadomo o epigenetycznej kontroli struktury różnych ponadmolekularnych struktur protoplastu (na przykład chromatyny), a szczególnie zmian energii układu na komórkowym i wyższych poziomach organizacji ciała rośliny. Postęp w tej dziedzinie oczekuje wciąż na rozwój nowych metod.

W podsumowaniu części aktualnego stanu wiedzy odwołam się do opracowania młodszych ode mnie wielce utalentowanych polskich autorów: profesora Stanisława Kowalczyka i doktor Elżbiety Zielińskiej z Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, którzy uprzejmie wyrazili zgodę na zacytowanie pełnego streszczenia z artykułu pt. „Percepcja i transdukcja sygnału auksynowego” opublikowanego w 27. tomie *Postępów Biologii Komórki* (2000). Cytuję:

„Szlak transdukcji sygnału auksynowego z miejsca percepcji fitohormonu do miejsca, gdzie następuje odpowiedź komórki, nie został jeszcze ostatecznie poznany. Szereg wyników sugeruje, że białko wiążące auksyny – ABP1, związane z błonowym białkiem dokującym, jest receptorem współdziałającym z białkiem G. Szlak transdukcji sygnału obejmuje aktywację fosfolipazy A2, która uwalnia wtórne przekaźniki pochodzenia lipidowego aktywujące kinazę białkową, regulującą w drodze fosforylacji plazmatyczną H⁺-ATPazę. W coraz liczniejszych doniesieniach wiąże się łańcuch transdukcji sygnału auksynowego z funkcjonowaniem kaskady kinaz MAP. Badania mutantów auksynowych (*axr1*, *tir1*, *sur1*) *Arabidopsis thaliana* zwróciły uwagę badaczy na zależną od systemu ubikwitynowego regulację cyklu komórkowego jako biochemiczną odpowiedź na auksynę. Zmiany w ekspresji niektórych genów należą do najwcześniejszych odpowiedzi auksynowych. Geny z rodziny *Aux/IAA* są obecnie najlepiej poznanymi genami wczesnych odpowiedzi auksynowych. Szereg wyników wskazuje, że niektóre białka z tej rodziny są związane z kontrolą transkrypcji. Analiza funkcjonalna promotorów niektórych genów auksynowych umożliwia poznanie kilku elementów odpowiedzi auksynowych (Aux RE) i domen odpowiedzi auksynowych (Aux RD). Poznanie Aux RE umożliwiło klonowanie i zsekwencjonowanie szeregu czynników transkrypcyjnych (ARF).”

Przytaczając tu podsumowanie wyjęte z bardzo starannego opracowania przeglądowego polskich autorów, pragnę też zwrócić uwagę na chlubną ciągłość tradycji badań Polaków nad systemem regulacji auksynowej, które zapoczątkował Teofil Ciesielski [4] ponad 130 lat temu (1872), a współcześnie rozwijały z powodzeniem szkoły badaczy kierowane przez Roberta Bandurskiego, Mariana Michniewicza, Jana Kopcewicza.

W nawiązaniu do artykułu polskich Autorów, pragnę skierować uwagę zainteresowanych także na opracowanie pani Ottoliny Leyser z Department of Biology, University of York w Wielkiej Brytanii, pt. „*Molecular Genetics of Auxin Signalling*”,

opublikowanym w *Annual Review of Plant Biology*, 2002 [23]. Warte przytoczenia są tu wnioski zawarte w podsumowaniu tego artykułu, które w wolnym tłumaczeniu można przedstawić następująco:

- ◆ Po pierwsze, istnieje potrzeba poznania czynników łączących auksynę ze zmianami stabilności białek związanych z genami pierwotnych odpowiedzi auksynowych (z rodziny *Aux/IAA*), to jest tych białek, których degradacja pod wpływem auksyny stanowi podstawową część procesu reakcji auksynowej.
- ◆ Po drugie, chociaż proponowany obecnie model regulacji uwzględniający tylko te znane już dziś różne białka z klasy *Aux/IAA*, (których tylko u *Arabidopsis thaliana* wyróżniono jak dotąd co najmniej 24) i inne białka, tak zwane czynniki odpowiedzi auksynowej, typu ARF (*auxin response factor*) lub ARF-BP (*auxin response factor – binding protein*), może być wykorzystany do wyjaśnienia różnorodnych reakcji auksynowych, ale nie znany jest sposób (lub kod), według którego zachodzi wybór każdej ze specyficznych reakcji.
- ◆ Po trzecie, konsekwentnie, istnieje potrzeba poznania mechanizmów, poprzez które zaindukowane zmiany ekspresji genów pośredniczą w specyficznych reakcjach auksynowych.
- ◆ Po czwarte, pewne reakcje auksynowe wydają się być niezależne od systemu ubiquitynowego, w którym kluczową rolę spełnia złożony kompleks białkowy SCF pełniący funkcje ligazy (enzymu E3) we wspomnianym systemie.

Niemal każdy tydzień przynosi postęp w badaniach kolejnych molekularnych procesów percepcji i transdukcji w systemie sygnałowym auksyny na poziomie komórkowym i subkomórkowym. Wypada jednak w tym miejscu powrócić do istoty regulacji auksynowej jako systemu komunikacji umożliwiającego specjalizację i integrację funkcjonalną wszystkich podukładów ponadkomórkowych w celu najpełniejszego wykorzystania dostępnych zasobów środowiska i propagacji genotypu. W tym złożonym procesie wyróżnić można przynajmniej trzy elementy dostrzeżone zresztą jeszcze przed zidentyfikowaniem IAA. Pierwszy dotyczy miejsca i mechanizmu inicjacji sygnału, drugi – mechanizmu przesyłowego, a więc kodu sygnałowego (języka) i sposobu propagacji informacji oraz trzeci – systemu określającego miejsca odczytania informacji. Najskuteczniej jak dotąd badano mechanizm przesyłowy, jako że zidentyfikowanie chemiczne IAA połączono z już wcześniej zdobytą przez zoologów wiedzą o przewodzeniu informacji w systemie hormonalnym u zwierząt. Utrwaliło to powszechny pogląd, że nośnik informacji, molekuly auksyny, podobnie jak hormony zwierzęce, docierają z miejsca ich syntezy (odpowiednik gruczołu) do miejsca ich zadziałania (komórek kompetentnych). Dla roślin bardzo drobnych rozmiarów, a w fazie rozwoju embrionalnego dla wszystkich roślin, odległość między tymi szczególnymi miejscami systemu komunikacji jest tak niewielka, że przemieszczanie sygnału o charakterze molekularnym może realizować się w drodze dyfuzji. Rzecz w tym, że system auksynowy działa z powodzeniem dalej, w późniejszych fazach rozwojowych oraz regulacji procesów sezonowych, gdy droga przesyłania informacji może osiągać dziesiątki, a w szczególnych przypadkach przekraczać nawet granicę stu metrów pokonując wówczas bariery dziesiątek tysięcy ścian i błon

komórkowych inaczej niż w zwierzęcych systemach cyrkulacji. Badania hipotez zakładających propagację bodźca auksynowego w postaci zmiany potencjału elektrycznego lub akcyjnego, jak dotąd nie znalazły uzasadnienia, nic więc dziwnego, że cała niemal uwaga uczonych koncentruje się na nieporównywalnie szybszym od dyfuzji, polarnym transporcie molekularnym auksyny. Wyniki badań referowane są w wielu pracach przeglądowych [11, 15, 24, 26]. Do najważniejszych odkryć w tym procesie należą:

- 1) w transporcie polarnym auksyny najprawdopodobniej nie uczestniczą plazmo-de-smy,
- 2) zaangażowany jest specyficzny kompleks białkowy zlokalizowany głównie w bazalnej części błony komórkowej i
- 3) auksyna może stymulować polarny transport auksyny.

Na tę ostatnią właściwość mechanizmu transportu auksyny teoretycznie zwrócił uwagę niemiecki fizjolog H.Söding [37, 38] już w pierwszej połowie ubiegłego stulecia. Sugerował on, że sezonowa zmiana (podwyższenie) stężenia auksyny na wiosnę postępująca bazypetalnie w kambium pnia drzew ma charakter reakcji łańcuchowej, to jest że auksyna syntetyzowana w komórkach dystalnych osiowego układu merystematycznego indukuje syntezę auksyny w najbliższych komórkach proksymalnych. Uwzględniając współczesną wiedzę, system ten w odniesieniu do jednej pary strukturalnie polarnych komórek pędu rośliny można przedstawić następująco:

Komórka	Procesy na poziomie komórkowym	Fazy przekazu sygnału auksynowego
Dystalna	wzrost syntezy i eksportu IAA przy końcu bazalnym	glandularna
	wzrost stężenia IAA w apoplacie i przestrzeni peryplazmatycznej do poziomu sygnałowego	dyfuzja
Proksymalna (ale dystalna w kolejnej parze)	percepcja wzrostu stężenia IAA w układzie błon cytoplazmatycznych	I-szy etap ekspresji kompetencji
	transdukcja sygnału IAA na procesy fizjologiczne w obrębie komórki – wzrost objętościowy – podział – różnicowanie funkcjonalne	II-gi etap ekspresji kompetencji
	– zwiększenie eksportu IAA przy końcu bazalnym związane z syntezą <i>de novo</i> lub też uwolnieniem rezerwy (uruchomienie fazy glandularnej)	glandularna
	osiągnięcie krytycznego stężenia IAA uruchomienie hamowania zwrotnego (syntezy lub uwalniania z rezerwy) i ograniczenie bazypetalnego eksportu	glandularna (III-ci etap ekspresji kompetencji)

Tak pojmowany system przekazu sygnału auksynowego umożliwia, na przykład, funkcjonowanie falowego pola morfogenetycznego [60, 61, 62], o którym dyskutowałem na konferencjach poświęconych mechanizmom regulacji morfogenezy roślin w Rogowie [52, 53, 54, 59] i 14-tym Kongresie Biochemicznym w Pradze [58]. Przedstawiłem wówczas wyniki eksperymentów potwierdzających taką możliwość. System powiązany z propagacją częstych zmian stężenia auksyny tworzących fale przemieszczające się zarówno bazy- jak akropetalnie z prędkością kilkakrotnie przewyższającą prędkość polarnego transportu, charakteryzuje się oczywiście nieporównywalnie większą pojemnością informacyjną i sprawnością sygnałową niż gradienty liniowe stężenia, lub ustabilizowany bazypetalny przepływ molekularny. Sam mechanizm transdukcji informacji morfogenetycznej z wykorzystaniem potencjału informatycznego wynikającego z propagacji fal auksyny nie doczekał się niestety dalszych badań, chociaż tworzenie takich fal jest wynikiem zmian ekspresji polarności komórek w stosunku do transportu tego fitohormonu [56], a więc związanym z procesem od dawna uważanym za kluczowy w regulacji wzrostu i rozwoju roślin [17, 19, 28, 47, 48, 49]. Uzyskaliśmy natomiast pewien postęp w badaniu przekazu sygnału auksynowego w systemie osiowym komórek merystemu wtórnego pędu wykorzystując wycinki strefy kambialnej zawierające tylko jeden szereg komórek [50]. Wykazano, że podwyższenie stężenia IAA wyłącznie przy końcu apikalnym w ciągu ok. 30-45 minut stymuluje wypływ naturalnego IAA przy końcu bazalnym, a reakcja ta nie jest hamowana przez inhibitory białkowego przENOŚNIKA auksyny w polarnym transporcie (tab. 1). Inne niż IAA fitohormony lub tryptofan nie powodują analogicznej stymulacji bazypetalnego eksportu auksyny. Stwierdzono ponad to, że stymulacji auksynowej nie ogranicza wysokie stężenie auksyny w apoplacie nawet w obecności inhibitora polarnego transportu, a ubytki komórkowej puli IAA związane z bazypetalnym eksportem są na bieżąco rekompensowane [55]. Badania wstępne ze znakowanym tryptofanem wskazują jednak, że stymulacja wypływu naturalnej auksyny przez IAA nie ma bezpośredniego związku z kontrolą ścieżki syntezy IAA związanej z tryptofanem jako prekursorem.

Wstępne wyniki uzyskane w innych badaniach, wydają się wskazywać na słaby związek tej autostymulacji polarnego transportu auksyny z mechanizmem kontroli bilansu wapniowego komórki, ale chociaż W7 (N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphtalene sulfonamide, hydrochloride) inhibitor kompleksu Ca-kalmodulina nie ogranicza istotnie tej reakcji to jednak redukuje znacząco wielkość polarnego transportu auksyny w ogóle [25, 55]. I wreszcie, w badanym jednocześnie materiale tkankowym nie wykryto także puli koniugatów IAA, która sugerowałaby uwalnianie IAA z rezerwy cytoplazmatycznej (tab. 2).

Te drobne kroki badań cytofizjologicznych wydają się przybliżać czas poznania mechanizmu sygnałowego, w którym auksyna jest równocześnie stymulatorem propagacji sygnału w układzie ponadkomórkowym i czynnikiem indukcji procesów rozwojowych. Wyniki tych badań sugerują też następne pytania oczekujące odpowiedzi, a mianowicie, jak powiązany jest proces syntezy IAA z jej bazypetalnym eksportem z komórki lub jaka jest natura hamowania zwrotnego obu tych procesów. Być może odkrycie przez badaczy amerykańskich ze szkoły Hagen i Guilfoile z Uniwersytetu

TABELA 1. Stymulacja bazypetalnego wypływu auksyny z komórek rejonu kambialnego pnia sosny przez apikalnie przyłożony roztwór 0.ppm IAA w 1% wodnym żelu agarowym (45 min)

(Objekt badań: 6-mm wycinki, w których 89% nieprzeciętych, ściśle przylegających stycznie komórek wrzecionowatych merystemu i ich różnicujących się pochodnych stanowi osiowo pojedyncze szeregi) Substancje wprowadzone do żelu: IAA – kwas indolilo-3-octowy, GA – kwas giberelinowy, ZEA – zeatina, TRP – tryptofan, NPA – kwas naftyloflalamidowy, Istotność różnic przy poziomie : $\alpha < 0,01^{**}$; $\alpha < 0.05^{*}$)			
Substancje przyłożone (ppm) przy końcu		Wpływ auksyny mierzony przy końcu bazalnym	
apikalnym	bazalnym	Eqv. pg IAA	% kontroli 0
0	0	272	100
IAA	0	338	125**)
GA	0	266	98
ZEA	0	252	93
TRP	0	265	97
IAA + GA(0,1)	0	342	124**)
IAA + ZEA(0,1)	0	321	118**)
IAA + TRP(0,1)	0	341	124**)
0	0	255	100
IAA	0	300	118**)
NPA	0	180	70
IAA + NPA(10)	0	320	125**)
0	0	284	100
IAA	0	357	126**)
0	IAA(0.01)	337	100
IAA	IAA(0.01)	469	139**)
0	IAA(0.2)	1459	100
IAA	IAA(0.2)	1622	111*)
0	0	346	100
IAA	0	482	139**)
0	IAA(0.1)+NPA(10)	213	100
IAA	IAA(0.1)+NPA(10)	266	124**)
0	0	Wpływ auksyny mierzony przy końcu apikalnym	
0	IAA(0.1)	58	100
		55	95

Missouri, że stabilność i aktywność białek aux/IAA, które są czynnymi represorami, modulowana jest przez samą auksynę [43], okaże się tu bardzo pomocne. Wyniki te inspirują bowiem do zaproponowania hipotezy, że białko receptorowe (tzw. ABP 1) po przejęciu sygnału auksynowego (to jest przyłączeniu IAA z apoplastu) uczestniczy w indukcji syntezy nie tylko auksyny, ale też membranowego kompleksu białkowego eksportującego auksynę (tzw. *IAA efflux carrier* lub ABP 3), a może też uczestniczyć w procesie segregacji tego białka w układzie diktiosomalnym i ukierunkowanym włączaniu go do błony komórkowej głównie przy końcu bazalnym komórki.

TABELA 2. Wynik badania ekstraktu (ekw. 50 mg) tkanki z rejonu kambialnego pnia sosny w celu określenia obecności koniugatów IAA (roztwory ekstrakcji 80% metanol lub 70% aceton warunki HPLC [57], warunki hydrolizy i oddzielania koniugatów [2, 3])

Lp.	Substrat testowany	Eqv. pg IAA	S.E.
1.	Ekstrakt metanолоwy nieoczyszczony (filtrowany FH, PVP)	3226	330
2.	Ekstrakt acetonowy nieoczyszczony (filtrowany FH, PVP)	3012	422
3.	Ekstrakt metanолоwy HPLC (I) frakcja Rt 4.5-11 min koniugaty)	87	4
4.	Ekstrakt acetonowy HPLC (I) frakcja Rt 4.5-11 min (koniugaty)	98	3
5.	Ekstrakt metanолоwy HPLC (I) frakcja Rt 11-14.5 min (lok.IAA)	6292	790
6.	Ekstrakt acetonowy HPLC (I) frakcja Rt 11-14.5 min (lok.IAA)	7785	848
7.	Ekstrakt metanолоwy HPLC (II) frakcja Rt 12-16 min (lok.IAA) z frakcji octanowej po rozdziale kwaśnym hydrolizatu 1N KOH /1 godz. / 28°C frakcji Rt 4.5-11 min (koniugaty) z HPLC (I)	67	3
8.	Ekstrakt metanолоwy HPLC (III) frakcja Rt 12-16 min (lok.IAA), po hydrolizie 7N KOH / 3 godz. / 28°C frakcji Rt 4.5-11 min (koniugaty) z HPLC (II) frakcji octanowej hydrolizowanej na zimno	121	4

Uwzględniając też wyniki innej grupy badaczy amerykańskich z Indiana University [34] można zbadać ewentualny związek autoregulacji polarnego transportu auksyny z ekspresją genów TIR (*Transport Inhibitor Response*), które kontrolują białko NBP (*NPA Binding Protein*) z kompleksu ABP 3. Nie można też wykluczyć bardziej bezpośredniego oddziaływania ABP 1 po przyjęciu sygnału auksynowego na ekspresję aktywności białka eksportującego IAA poza centrum wrażliwego na inhibitory polarnego transportu. Być może hipotezy te wzbudzą zainteresowanie polskich auksynologów, którzy uczynią kolejny krok ku rozwiązaniu zagadki mechanizmu sygnałowego auksyny. Chciałoby się, aby także biofizyczne aspekty kontroli morfogenezy roślin przez auksynę stały się przedmiotem dociekliwych badań podążających choćby śladem szkoły koncepcyjnej Zygmunta Hejnowicza. Na odpowiedź oczekuje wciąż podstawowe pytanie, ile w wyborze drogi rozwojowej komórek tworzących tkanki i organy rośliny zależy od wcześniej ukształtowanej kompetencji komórkowej, a ile od sensu lub inaczej specyfiki informacji przekazywanej przez system sygnałowy związany z transportem auksyny.

Moja przygoda z auksyną, przeżyta w niezwykłych okolicznościach obcowania z olbrzymami świata istot żywych, to jest drzewami, a szczególnie wędrowanie po szlakach komunikacji fizjologicznej w kambium drzew i po rozległych obszarach tkanek pochodnych, przywiodła mnie do ważnego, jak mi się wydaje, spojrzenia na zjawisko życia w ogóle. A więc, można by rozpatrywać życie jako złożony splot procesów

komunikacji. Komunikacji między molekułami, organelami, komórkami, organami, organizmami, populacjami organizmów między sobą i ze środowiskiem abiotycznym, a może też komunikacji z Bogiem. Ewolucja tego splotu procesów komunikacji umożliwia stały postęp w ograniczaniu entropii układu z wykorzystaniem mechanizmów jego reprodukcji. Na ziemi, gdzie środowisko wodne stwarza szczególnie dogodne warunki fizyczne dla komunikowania się molekuł lub makromolekuł rozpuszczalnych związków węglowych i azotowych, głównym nurtem ewolucji języka i pamięci, niezbędnych w systemie komunikacji zwanym życiem, są pierwsze pochodne tych związków, a więc aminokwasy, a szczególnie ich formy aromatyczne. W tym biologicznym systemie komunikacji, kody, sylaby, słowa i zdania wywodzące się z alfabetu aminokwasów, informujące o strukturze, zachowaniu i możliwościach powstawania nowych sposobów ich wykorzystania w komunikacji istot żywych wykształciła się materialna podstawa ewolucji języków i pamięci pozagenetycznych przekazujących doświadczenie behawioralne pokoleń – a więc, podstawę rozwoju cywilizacji i kultury na ziemi. Jeśli tak spojrzeć na istotę ewolucji życia na ziemi, to można by wyobrazić sobie w innych niż woda środowiskach wszechświata ewolucję systemu komunikacji, bazującego na innych elementarnych nośnikach informacji niż rozpuszczalne w wodzie związki organiczne, innych językach i pamięci dających szansę zachowania i reprodukcji informacji o strukturze układu, aż do poziomu kreującego twórczą świadomość.

W realizowanym przez nas w Katedrze Botaniki Leśnej SGGW wieloletnim programie badań nad różnicowaniem drewna wtórnego u drzew leśnych (wspieranym w okresie 1964–1980 serią grantów Departamentu Rolnictwa USA) studia nad znaczeniem auksyny w ksylogeniezie stawały się coraz bardziej centralną ich częścią. Dzięki tym grantom powstała możliwość włączania do realizacji różnych części rozwijającej się koncepcji naszych badań nad mechanizmem regulacji auksynowej, kolejnych osób, wówczas doktorantów lub młodych pracowników nauki, Stefana Zajączkowskiego, Jacka Zakrzewskiego, Doroty Kubowicz, Krzysztofa Rakowskiego, Jacka Adamczyka i Katarzyny Marciszewskiej. Im wszystkim zawdzięczam, że moja i Aliny miłość do auksyny pogłębiała się i urodziła nowe hipotezy testowane przez nas następnie także za granicą, gdyż wzbudziły one zainteresowanie innych badaczy fitohormonów w ich doskonale wyposażonych laboratoriach w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej, Wielkiej Brytanii, Holandii i Kanady. Przyczyniło się to do stworzenia przy pomocy Ministerstwa Rolnictwa, Leśnictwa i Ochrony Środowiska w latach 1987–1994 nowoczesnego warsztatu badań nad auksyną w Katedrze Botaniki Leśnej SGGW i następnie dzięki poparciu Dyrekcji Generalnej Lasów Państwowych do kontynuowania tych badań aż do końca 1999 r. Wymienienie tu naszych sponsorów wydaje się być szczególnie ważne wobec faktu, że Komitet Badań Naukowych w połowie lat dziewięćdziesiątych odmówił poparcia naszego programu badań nad mechanizmem sygnałowym auksyny, mimo że w tym etapie już od szeregu lat dotyczył on niezwykle ciekawej, a mało dotąd poznanej funkcji tego fitohormonu w określaniu czasu i miejsca apoptozy komórek drewna, to jest procesu bliskiego obszarowi wiedzy biologicznej, w którym w roku 2002 przyznano nagrodę Nobla. W ciągu tych wielu lat pracy badawczej doświadczyłem zaszczytu prawdziwej przyjaźni – szlachetnej i zapewniającej mi

możliwość rzetelnej, a najbardziej kompetentnej weryfikacji wartości mojej drogi twórczej. Mówię tu o przyjaźni wybitnych polskich uczonych botaników, światowej sławy profesorów Marii Olszewskiej, Zygmunta Hejnowicza, Mariana Michniewicza i nieobecnych już Henryka Teleżyńskiego, Alicji i Jerzego Szweykowskich, Bohdana Rodkiewicza, Adama Paszewskiego, Tadeusza Sulmy, Andrzeja Środonia. Dzięki tej właśnie przyjaźni miałem też zaszczyt opowiedzieć dziś o kilku aspektach wielce fascynującej roli auksyny w systemie regulacji wzrostu i rozwoju roślin. Za danie mi tej szansy, właśnie teraz gdy moja przygoda z auksyną dobiegła już końca, bardzo gorąco dziękuję Pani Profesor Marii Olszewskiej i Organizatorom Konferencji.

LITERATURA

- [1] BANDURSKI RS, DESROSIERS MF, JENSEN P, PAWLAK M, SCHULZE A. Genetics, chemistry and biochemical physiology in the study of hormonal homeostasis. [w] Karssen MC, van Loon CL, Vreghdenhil D [red.] Boston, London: Kulver Academic Publ Dodrecht, 1992: 1–12.
- [2] BIAŁEK K, COHEN J. Isolation and partial characterization of the major amidelinked conjugate of indole-3-acetic acid from *Phaseolus vulgaris*. L. *Plant Physiol* 1986; **80**: 99–104.
- [3] BIAŁEK K, COHEN J. Free and conjugated indole-3-acetic acid in developing bean seeds. *Plant Physiol* 1989; **91**: 775–779.
- [4] CIESIELSKI T. Beitr Bio Pflanzen 1872; 1:1 [wg] Bandurski RS. Chemistry and Physiology of Conjugates of indole-3-acetic acid. [w] Bhushan Mandala [red.] Plant Growth regulators, ACS Symposium Series 1979; **111**: 1–17.
- [5] CLELAND RE. Cell wall extension. *Annu Rev Plant Physiol* 1971; **22**: 197–222.
- [6] CLELAND RE. Auxin-induced hydrogen ion excretion: correlative with growth and control by external pH and water stress. *Planta* 1975; **127**: 233–242.
- [7] COSGROVE DJ. Wall relaxation and the driving forces for cell expansive growth. *Plant Physiol* 1987; **84**: 561–564.
- [8] CZAJA AT. Wurzelwachstum, Wuchsstoff und die Theorie der Wuchsstoff wirkung. *Ber deutsch Bot Ges* 1935; **53**: 221–245.
- [9] EK M, LJUNGQUIST PD, STENSTRÖM E. Indole-3-acetic acid production by mycorrhizal fungi determined by gas chromatography-mass spectrophotometry. *New Phytol* 1983; **94**: 401–407.
- [10] FENSOM DS. Electrical and magnetic stimuli. [w] Hormonal Regulation of evelopment III B. Heidelberg, New York, Tokyo: Springer-Verlag, 1980; 625–652.
- [11] GOLDSMITH MHM. The polar transport of auxin. *Ann Rev Plant Physiol* 1977; **28**: 439–478.
- [12] HAGEN G, GUILFOYLE TJ. Rapid induction of selective transcription by auxins. *Mol Cell Biol* 1985; **5**: 1197–1203.
- [13] HAGEN G. Molecular approaches to understanding auxin action. *New Biol* 1989; **1**: 19–23.
- [14] HERTEL R, THOMSON L, RUSSO VEA. *In vitro* auxin binding to particulate cell fractions from corn coleoptiles. *Planta* 1972; **107**: 325–340.
- [15] HERTEL R. The mechanism of auxin transport as a model for auxin action. *Zeitsch Pflanzenphysiol* 1983; **112**: 53–67.
- [16] HERTEL R. Auxin transport: binding of auxins and phyto tropins to the carriers. Accumulation into and efflux from membrane vesicles. [w] Klambt D [red.] Plant hormone receptors. NATO ASI Series vol H10. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1987: 81–92.
- [17] HERTEL R. Transport and action of auxin are closely related. Proc 8th FESPP Congr Antwerpen, Session: Signal transduction mechanisms 1992.
- [18] IRAQUII, VISSERS S, BERNARD F, DECRAENE JO, BOLES E i in. Amino acid signalling in *Saccharomyces cerevisiae*: a permease-like sensor of external amino acids and F-box protein Grr1p are the *AGP* gene, which encodes a broad-specificity amino acid permease. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 898–1001.

- [19] JACOBS WP. Regulation of development by the differential polarity or various hormones as well as by effects of one hormone on the polarity of another. [w] Schutte HR, Gross D [red.] Regulation and of developmental processes in plants. Jena: VEB Gustav Fisher Verlag, 1978: 361–380.
- [20] JACOBS WP. Plant hormones and development. Cambridge: Cambridge Univ Press, 1979.
- [21] KUDOJAROVA GR, USMANOV IJ, GULI-ZADE WZ, FATTAHUTDINOV EG, VESELOV SJ. Vzaimodejstvo nprostorno razobshennykh organov rastenij. Cootnoshenie elektricheskikh i gormonalnykh signalov. *Fizjologija Rastenii. Dok Acad Nauk SSSR* 1990; **310**: 1511–1514
- [22] LEOPOLD AC. The transport of auxin. [w] Ruhland E W [red.] *Encycl Plant Physiol* vol 14. Springer-Verlag 1961; **14**: 671–682.
- [23] LEYSER O. Molecular genetics of auxin signaling. *Annu Rev Plant Biol* 2002; **53**: 377–398.
- [24] LOMAX TL, MUDAY GK, RUBERY PH. Auxin transport. [w] Davies PJ [red.] *Plant hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. The Netherlands, Dordrecht 1995: 509–530.
- [25] MARCISZEWSKA KD. Mechanizm działania auksyny jako czynnika powstawania i modulacji fali auksynowej w rejonie kambialnym pędów *Acer pseudoplatanus* L. i *Fraxinus excelsior* L. Praca doktorska wykonana w Katedrze Botaniki Leśnej, SGGW 1998.
- [26] MUDAY GK. Auxin and tropisms. *J Plant Growth Regul* 2001; **20**: 226–243.
- [27] NIEMI K, VOURINEN T, ERNSTSEN A, HAGGMAN H. Ectomycorrhizal fungi and exogenous auxins influence root and mycorrhiza formation of Scots pine hypocotyl cuttings in vitro. *Tree Physiol* 2002; **17**: 1231–1239.
- [28] OSBORNE DJ. A theoretical model for polar auxin transport. [w] Vardar Y [red.] Amsterdam, North Holland: Proc NATO/EGE Univ. Summer Instr. 1968: 97–107.
- [29] PALME K, DIEFENTHAL T, HESSE T, BAUW G, PUYPE M, VANDEKERCKHOVE J, SCHELL J. Auxin binding proteins from maize coleoptiles: Purification and molecular properties. [w] Roberts JA, Kirk C, Venis M [red.] Hormone perception and signal transduction in animals and plants. *Symposia Soc Expt Biol* 1990; **64**: 299–313.
- [30] PALME K. Approaches to signal transduction in higher plants. [w] V Ogólnopolska Konferencja: Mechanizmy regulacji morfogenezy roślin oraz ich funkcjonowanie w warunkach stresowych i zanieczyszczenia środowiska. Rogów 1992: 79–94.
- [31] PEGG GF. Pathogenic nad nonpathogenic microorganisms nad insects. [w] Pharis RP, Reid DM [red.] Hormonal regulation of development. III. *Encycl Plant Physiol New series* vol 11, Berlin: Springer-Verlag, 1982: 599–624.
- [32] RUDAWSKA M, BERNILLON J, GAY G. Indole compounds released by the ectomycorrhizal fungal strain MtgX isolated from a pine nursery. *Mycorrhiza* 1992; **2**: 17–23.
- [33] RUDAWSKA M, KIELISZEWSKA-ROKICKA B. Mycorrhiza formation by *Paxillus involutus* strains in relation to their IAA-synthesizing activity. *New Phytol* 1997; **137**: 509–517.
- [34] RUEGGER M, DEWEY E, HOBBIE 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 auxin transport and diverse morphological defects. *Plant Cell* 1997; **9**: 745–757.
- [35] SERDYUK O, SMOLYGINA L, RABAYA N, ADANIN V, MUZAFAROV E. Exometabolites with phytohormonal activities synthesized by phototrophic purple bacteria *Rhodospirillum rubrum*. *Plant Physiol Biochem*, Special issue 1996: **199**.
- [36] SNOW R. A hormone for correlative inhibition. *New Phytol* 1940; **39**: 177–184.
- [37] SÖDING H. Wuchsstoff und Kambiumtätigkeit der Bäume. *Jahr Wiss Bot* 1937; **80**: 639–670.
- [38] SÖDING H. Weitere Untersuchungen über die Wuchsstoffregulation der Kambiumtätigkeit. *Zeit Bot* 1940/41; **36**: 113–141.
- [39] SZTEIN AE, COHEN JD, COOKE TJ. Evolutionary patterns in the auxin metabolism of green plants. *Int J Plant Sci* 2000; **161**: 859–859.
- [40] THIMANN KV. Growth and growth hormones in plants. *Amer J Bot* 1957; **44**: 49–55.
- [41] THIMANN KV. The natural plant hormones. [w] Steward SC [red.] *Plant Physiology a Treatise*. New York, London: Acad Press 1972; **68**: 3–365.
- [42] THIMANN NKV. Hormone action in the whole life of plant. Amherst: Univ. Massachusetts Press, 1977.
- [43] TIWARI SB, WANG XJ, HAGEN G, GUILFOYLE TJ. AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin. *Plant Cell* 2001; **13**: 2819–2822.
- [44] TREWAVAS A. Understanding the control of plant development nad the role of growth substances. *Austr J Plant Physiol* 1986; **13**: 447–457.

- [45] VENIS MA, NAPIER RM. Characterization of auxin receptors. [w] Roberts JA, Kirk C, Venis M [red.] Hormone perception and signal transduction in animals and plants. *Symposia Soc Expt Biol* 1990; **64**: 55–65.
- [46] VENIS MA, NAPIER RM. Auxin receptors nad auxin binding proteins. *Crit Rev Plant Sci* 1995; **14**: 27–47.
- [47] WEIJ HC VAN DER. Der mechanismus der wuchsstofftransportes. I. *Rec Trav Bot Neerl* 1932; **29**: 379–496.
- [48] WEIJ HC VAN DER. Der mechanismus der wuchsstofftransportes. II. *Rec Trav Bot Neerl* 1934; **31**: 810–857.
- [49] WENT FW. Polarity of auxin transport in inverted *Tagetes* cuttings. *Bot Gaz* 1941; **103**: 386–567.
- [50] WODZICKI AB, WODZICKI TJ, GESSEL S. Bioassay for investigation of auxin transport in single cell layers. *Acta Soc Bot Pol* 1997; **66**: 355–364.
- [51] WODZICKI TJ. Auxin apical control of the auxin polar transport and its oscillation – a suggested cellular transduction mechanism. *Acta Soc Bot Pol* 1993; **62**: 37–41.
- [52] WODZICKI TJ. Oscylacyjno-falowy mechanizm polarnego transportu auksyny a morfogeneza roślin. [w] II Ogólnopolska Konferencja: Mechanizmy regulacji morfogenezy roślin, Rogów 1980: 67–74.
- [53] WODZICKI TJ. Źródła i rola polarności w układzie roślinnym. [w] III Ogólnopolska Konferencja. Mechanizmy regulacji morfogenezy układów roślinnych. Rogów 1984: 95–117.
- [54] WODZICKI TJ. Systemy informacji pozycyjnej w morfogenezie roślin – wnioski z badań nad polarnym transportem auksyny. [w] IV Ogólnopolska Konferencja. Mechanizmy regulacji morfogenezy układów roślinnych. Rogów 1988: 71–77.
- [55] WODZICKI TJ, WODZICKI AB, ADAMCZYK J. Auxin signal transduction into a quantitative change in natural auxin polar transport in Pine cambium. *Acta Soc Bot Pol* 1999; **68**: 201–209.
- [56] WODZICKI TJ, WODZICKI AB, BROWN CL. Oscillation of stem polarity expression in transport of natural auxin of pine cambium. *Acta Soc Bot Pol* 1988; **57**: 165–176.
- [57] WODZICKI TJ, WODZICKI AB. Auxin transport polarity changes in the stem cambial region of *Pinus silvestris* L. associated with ageing. [w] Paschalis P, Zajączkowski S [red.] Biodiversity protection of Białowieża primeval forest. 1996; 23–34.
- [58] WODZICKI TJ, ZAJĄCZKOWSKI S. Auxin waves in cambium and morphogenetic information in plants. [w] Krekule J., Seidlová, F [red.] Proc Sect.32. Biochemical Congress (1988) in Prague. The Hague: SPB Academic Publishing, 1989: 45–64.
- [59] WODZICKI TJ, ZAJĄCZKOWSKI S. Co nowego wnosi odkrycie fali auksynowej do koncepcji regulacji morfogenezy roślin. [w] V Ogólnopolska Konferencja: Mechanizmy regulacji morfogenezy roślin oraz ich funkcjonowanie w warunkach stresowych i zanieczyszczenia środowiska. Rogów 1992: 99–108.
- [60] ZAJĄCZKOWSKI S, WODZICKI TJ, ROMBERGER JA. Auxin waves and plant morphogenesis. [w] Scott TK [red.] Hormonal regulation of development II. *Encycl Plant Physiol New Series* vol 10, Berlin: Springer-Verlag, 1984; 244–262.
- [61] ZAJĄCZKOWSKI S, WODZICKI TJ. Auxin and plant morphogenesis – a model of regulation. *Acta Soc Bot Pol* 1978; **47**: 233–243.
- [62] ZAJĄCZKOWSKI S, WODZICKI TJ. On the question of stem polarity with respect to auxin transport. *Physiol Plant* 1978; **44**: 122–126.
- [63] ZIELIŃSKA E, KOWALCZYK S. Percepcja i transdukcja sygnału auksynowego. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 155–183.

T. J. Wodzicki

ul. J. Bruna 4a m. 80, 02-594 Warszawa

ANATOMIA MOLEKULARNA POŁĄCZEŃ MIĘDZYKOMÓRKOWYCH W ŚRÓDBŁONKU NACZYŃ KRWIONOŚNYCH MÓZGU

MOLECULAR ANATOMY OF INTERCELLULAR JUNCTIONS
IN THE BRAIN VASCULAR ENDOTHELIUM

Andrzej W. VORBRODT

New York State Institute for Basic Research in Developmental Disabilities
1050 Forest Hill Road, Staten Island, New York 10314, USA

Streszczenie: Mózg ssaków jest chroniony przed wniknięciem jonów oraz różnych substancji krążących w krwi przez specjalnego typu sieć naczyńową będącą siedliskiem bariery krwio-mózgowej (w skrócie BKM). Przedmiotem tego referatu jest próba przedstawienia obecnego stanu wiedzy na temat rozmieszczenia białkowych składników połączeń międzykomórkowych śródbłonka naczyń krwionośnych mózgu, które utrzymują szczelność tej bariery. Wśród omawianych połączeń rozróżniamy dwa podstawowe typy: połączenia przylegające, określane w literaturze naukowej anglojęzycznej mianem *adherens junctions* (AJs), oraz połączenia ścisłe (barierowe) znane jako *tight junctions* (TJs). Każdy typ połączeń ma specyficzne składniki białkowe, których rozmieszczenie na poziomie ultrastruktury badaliśmy w skrawkach mózgu myszy, szczura i człowieka przy pomocy metody immunocytochemicznej z zastosowaniem przeciwciał znakowanych złotem koloidalnym oraz mikroskopii elektronowej. Główna uwaga w tym opracowaniu jest zwrócona na obecność i rozmieszczenie zarówno wewnętrznych (łączyjących błony sąsiednich komórek, czyli *transmembrane proteins*) białek typowych dla połączeń ścisłych (TJs): okludyny, kładyny i JAM, oraz typowych dla połączeń przylegających (AJs): kadheryn, jak również tzw. białek peryferyjnych reprezentowanych przez białka strefy zamykającej (*zonula occludens-1*, czyli ZO-1, głównie w TJs) oraz katenin (w połączeniach przylegających, AJs). Ta ostatnia grupa białek peryferyjnych łączy wewnętrzne białka z mikrofilamentami aktynowymi cytoszkieletu. Przedstawione wyniki świadczą o tym, że oba rodzaje połączeń są rozmieszczone obok siebie (przeplatają się) w śródbłonkach naczyń reprezentujących BKM. Jednakże tylko białka związane ze ścisłymi połączeniami, jak np. okludyna i ewentualnie kładyna wraz z peryferyjnym białkiem ZO-1, mogą służyć jako markery (wskaźniki) pomocne przy odróżnieniu normalnej lub zaburzonej czynności bariery naczyńowej mózgu.

Słowa kluczowe: bariera krwio-mózgowa, metoda immunocytochemiczna, białka strefy zamykającej (ZO-1).

Abstract: In this article, the current knowledge on the distribution of important molecular components of interendothelial junctions – both tight junctions (TJs) and adherens junctions (AJs) – in the blood-brain barrier (BBB) type of microvascular network is presented. We applied immunogold procedure to ultrathin

sections of brain samples obtained from mice, rats, and human and embedded at low temperature in hydrophilic resin Lowicryl K4M. The results of our observations performed with transmission electron microscopy (EM) are discussed and compared with findings of other authors. The main structures responsible for the barrier and fence functions of the BBB appear to be TJs. Nevertheless, our main attention is focused on the presence and distribution of both intrinsic, i.e. integral membrane (transmembrane) molecules such as occludin, claudins, and junctional adhesion molecules (JAM-1) in TJs, and cadherins in AJs, as well as peripheral molecules of both types of junctions, e.g. zonula occludens (ZO-1) proteins and catenins. The latter group of molecules connects transmembrane proteins with the endothelial cell cytoskeleton. A close spatial association of the TJ proteins with those of AJs indicates that both junctional types are intermingled in the BBB type of endothelium. The data presented suggest, that some TJ-specific, transmembrane proteins, especially occludin and claudin-5, together with the peripheral ZO-1 molecules can be used as sensitive markers of normal or disturbed functional state of the BBB.

Key words: blood-brain barrier, transmission electron microscopy, zonula occludens (ZO-1).

WSTĘP

Sieć drobnych naczyń krwionośnych (głównie włosowatych) mózgu ssaków posiada specjalne cechy czynnościowe i anatomiczne, określane mianem bariery krwio-mózgowej. Dla uproszczenia możemy ją krótko nazwać BKM (bariera krew-mózg), podobnie jak w języku angielskim nazywamy ją BBB (*blood-brain barrier*). Bariere tę określa się jako ograniczony i kontrolowany ruch (wymiana) rozpuszczalnych w wodzie substancji (*solutes*) drobno- oraz wielkocząsteczkowych między krwią a płynem śródtkankowym mózgu [1].

Ograniczona przepuszczalność lub brak przepuszczalności naczyń mózgowych w stosunku do związków wielkocząsteczkowych (np. białek) może być oceniona metodami morfologicznymi (mikroskopowymi) przy zastosowaniu cytochemii lub immunocytochemii. Wstrzyknięcie do krwiobiegu białka roślinnego peroksydazy chrzanowej (HRP) i obserwacja produktu reakcji cytochemicznej przy pomocy mikroskopu elektronowego umożliwiło określenie anatomicznej lokalizacji BKM [14]. W ostatnim dziesięcioleciu została wprowadzona wygodniejsza metoda wykorzystująca własną (endogenną) albuminę obecną w surowicy krwi jako wielkocząsteczkowy znacznik (*tracer*). Metoda ta umożliwia badanie szczelności bariery w stosunku do wielkocząsteczkowych substancji białkowych nawet w operacyjnie pobranych skrawkach mózgu ludzkiego [18]. Użycie immunocytochemii i złota koloidalnego oraz mikroskopii elektronowej i morfometrii umożliwia wykonanie obliczeń ilościowych nasilenia wycieku albuminy przez ściankę naczyń włosowatych mózgu [19].

W chwili obecnej panuje uzasadniony pogląd, że jednym z podstawowych składników budulcowych odpowiedzialnych za szczelność naczyń reprezentujących BKM są połączenia międzykomórkowe śródbłónka małych naczyń krwionośnych (głównie włosowatych) mózgu. Dlatego przedmiotem niniejszego referatu jest rozmieszczenie na poziomie ultrastrukturalnym, a więc dostrzegalnym przy pomocy mikroskopu elektronowego, cząstek białkowych będących typowymi składnikami tych połączeń. Wyniki badań wykonanych głównie w przeciągu ostatniego dziesięciolecia wykazały

obecność wielu substancji białkowych wchodzących w skład i odpowiedzialnych za tworzenie połączeń międzykomórkowych.

Chociaż znamy szereg typów tych połączeń w różnych komórkach nabłonkowych, gruczołowych i śródbłonkowych, ograniczymy się tylko do dwóch, które spotykamy w śródbłonku naczyń mózgowych. Jeden rodzaj połączeń to tak zwane połączenia barierowe, czyli szczelne lub ściste (TJ – *tight junctions*), które tworzą tzw. strefy zamykające (*zonula occludens*). Drugi rodzaj, to połączenia przylegające (AJ – *adherens junctions*) z występującymi w nich strefami przylegania (*zonula adherens*).

Poza czynnością barierową, połączenia międzykomórkowe (głównie ściste) spełniają jeszcze funkcję swojego rodzaju płotu lub przegrody (*fence function*), która zapobiega przesuwaniu się (dyfuzji) cząsteczek białkowych wzdłuż błony komórki śródbłonka. Wynikiem tego jest asymetria, czyli biegunowość komórek śródbłonka objawiająca się występowaniem innych cech biochemicznych błony przyszczytowej zwróconej do światła naczynia (*apical or luminal plasmalemma*) w porównaniu z błoną przypodstawno-boczną (*baso-lateral plasmalemma*). Morfologicznie dostrzegalnym (przy pomocy ME) dowodem tej asymetrii jest m.in. dodatni odczyn na fosfatazę zasadową w błonie przyszczytowej lub dodatni odczyn na 5'-nukleotydazę oraz ATPazę sodowo-potasową w błonie komórkowej przypodstawnej [17]. Podobną asymetrię obserwujemy też przy badaniu lokalizacji transportera glukozy (GLUT-1), którego cząsteczki w błonie przypodstawnej są około trzykrotnie liczniejsze niż w błonie wierzchołkowej komórek śródbłonka naczyń mózgowych [2, 20].

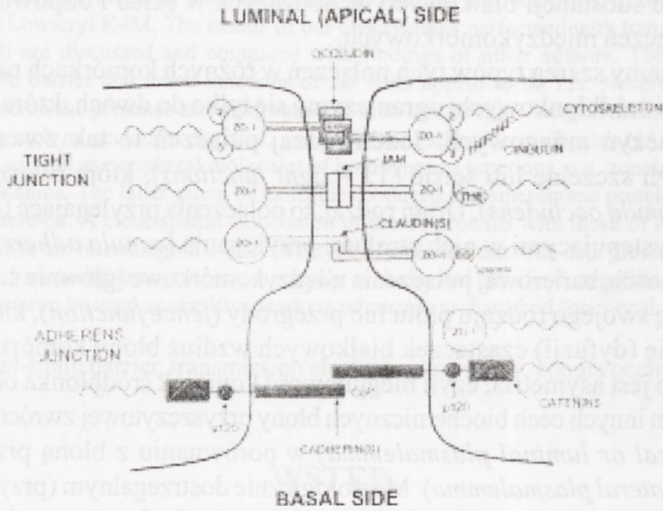
ROZMIESZCZENIE SKŁADNIKÓW BIAŁKOWYCH POŁĄCZEŃ KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA

A) Połączenia barierowe, czyli ściste (*Tight Junctions*, TJs)

a) Białka integralne (*Integral, transmembrane proteins*)

Okludyna (*occludin*). Okludyna jest pierwszym i prawdopodobnie najlepiej poznanym białkiem połączeń ścisłych, bezpośrednio warunkującym ich barierową i "odgrodeniową" rolę. Zostało ono opisane i scharakteryzowane w roku 1993, a nazwa pochodzi od łacińskiego słowa *occludere* – zamykać, zatykać [5]. Cząsteczki okludyny o masie około 65 kDa przenikają przez błony sąsiadujących z sobą komórek i łącząc się tworzą strefę zamykającą (*zonula occludens*), która szczelnie zatyka przestrzeń (szczelinę) międzykomórkową. Cytoplazmatyczne odcinki okludyny dochodzą do białek peryferyjnych ZO-1 (opisane poniżej), które z kolei łączą je z aktynowymi włókiemkami cytoszkieletu (rys. 1).

Sygnaty immunologiczne dla okludyny, reprezentowane przez ziarenka koloidalnego złota, są stosunkowo liczne (u myszy 4,8, u szczura 6,5, u człowieka ~5 ziaren złota na 1 μm długości połączenia międzykomórkowego). W kilku naszych publikacjach znajdują się elektronogramy przedstawiające rozmieszczenie okludyny w połączeniach



RYCINA 1. Schemat przedstawiający rozmieszczenie białek wewnętrznych (transbłonowych) i periferyjnych w połączeniach międzykomórkowych typu ścisłego (*tight junction*) oraz przylegającego (*adherens junction*). Ponieważ nie wszystkie przedstawione na schemacie białka występują równocześnie we wszystkich układach komórkowych, wobec tego niektóre z nich mogą nie znajdować się w omawianych połączeniach międzykomórkowych śródbłonka sieci naczyniowej mózgu

międzykomórkowych śródbłonek naczyń krwionośnych mózgu człowieka [22], myszy [20,21] oraz szczura [3]. Interesujący jest fakt, że podczas “dojrzewania” i końcowego formowania się bariery mózgowej u myszy po urodzeniu (od 1. do 14. dnia życia) wzrasta ilość cząstek okludyny umiejscowionych głównie w szczelinie połączeniowej i w ograniczających ją błonach sąsiadujących komórek śródbłonka [20].

W badaniach mechanizmu otwarcia bariery mózgowej u szczura pod wpływem działania wstrzykniętego do tętnicy szyjnej hyperosmotycznego roztworu arabinozy, daje się zauważyć szybkie zmniejszenie nasilenia odczynu immunocytochemicznego na okludynę [3]. Upoważnia to do wyciągnięcia wniosku, że okludyna wykrywana zastosowaną metodą immunozłotową (*immunogold*) może być dobrym wskaźnikiem (markerem) uszkodzenia funkcji BKM.

Połączeniowa cząsteczka przylegania (*Junctional adhesion molecule, JAM-1*). W niniejszym opracowaniu celowo używane są nazwy angielskie cząsteczek białkowych, ponieważ właśnie takie nazwy stale napotykamy w literaturze światowej, przy czym nadawanie nazw polskich niektórym białkom sprawia często duże trudności. Dlatego też, dla uniknięcia ewentualnych nieporozumień, omawiane białko należałoby nazywać jedynie skrótem JAM-1.

Wyniki naszych badań opisane i przedstawione w odnośnych publikacjach niewądnacnie wykazują słabszą niż okludyna ekspresję tego białka (2,3–4,3 ziaren złota na 1 μm) w połączeniach międzykomórkowych śródbłonka naczyń barierowych mózgu zarówno ludzkiego, jak i myszy [21, 22] oraz szczura [3]. Można to wytłumaczyć pewną specyfiką tkankową, gdyż białko to było po raz pierwszy otrzymane nie z

barierowych naczyń mózgu, lecz z naczyń serca i płuc oraz z komórek nabłonkowych hodowanych *in vitro* [9]. Obserwacje nasze wskazują jednak na niewątpliwą obecność cząstek tego białka w połączeniach międzykomórkowych śródbłonna naczyń barierowych mózgu.

Klaudyna -5 (*Claudin-5*). Klaudyny, podobnie jak okludyna i JAM, są uważane za białka związane ze strukturą tzw. splotów (*strands*) wchodzących w skład ścisłych (barierowych) połączeń międzykomórkowych. Szereg klaudyn, numerowanych od 1 do 15, zostało wyizolowanych z tego typu połączeń badanych w różnego rodzaju komórkach nabłonkowych. Wśród nich, klaudyna-5 okazała się być białkiem najbardziej związanym z połączeniami komórek śródbłonkowych naczyń krwionośnych [11]. Zdaniem niektórych badaczy białko to bierze udział w kontroli przepuszczalności naczyń barierowych mózgu [6].

Nasze obserwacje immunocytochemiczne również wskazują na obecność klaudyny-5 w połączeniach międzykomórkowych śródbłonnów naczyń w mózgu człowieka [22], myszy [21] oraz szczura [3], jakkolwiek nasilenie odczynu wyrażone gęstością ziarenek złota jest nieco mniejsze niż w przypadku okludyny (2,0–4,5 ziaren złota na 1 μm długości połączenia międzykomórkowego). Po otwarciu osmotycznym naczyń mózgowych szczura, ekspresja tego białka jest wyraźnie zmniejszona, co wyraża się zmniejszeniem o połowę ilości immunosygnaliów w uszkodzonych połączeniach międzykomórkowych [3].

b) Białka peryferyjne (*Peripheral protein molecules*)

Białko strefy zamykającej ZO-1 (*zonula occludens protein-1*). Typowym białkiem peryferyjnym połączeń barierowych są cząsteczki ZO-1 o masie 210–225 kDa. To ufosforylowane białko było pierwszym wyodrębnionym z połączeń barierowych różnych komórek nabłonkowych tworzących strefy zamykające (*zonula occludens*), od których uzyskało swoją nazwę ZO [15]. Późniejsze badania wykazały obecność podobnych, satelitarnych cząstek białka, którym nadano dalsze kolejne numery: ZO-2 oraz ZO-3 [8]. Wszystkie te białka występują razem i ich główną rolą jest wytworzenie rusztowania łączącego właściwe (integralne) białka (np. okludynę lub klaudynę-5) z aktywnymi mikrowłóknkami cytoszkieletu [4]. Warto podkreślić, że chociaż początkowo uważano ZO-1 za specyficzny marker połączeń ścisłych (barierowych) zarówno nasze obserwacje [21], jak i badania innych autorów [7] wskazują na związek tego białka również z połączeniami przylegającymi.

Odczyn immunocytochemiczny z użyciem złota koloidalnego jest zawsze dość silny w połączeniach międzykomórkowych śródbłonna naczyń barierowych zarówno w mózgu człowieka [22], jak i szczura [3] oraz myszy [20, 21]. Nasilenie tego odczynu wyrażone ilością ziarenek złota na 1 μm połączenia międzykomórkowego wynosi średnio u człowieka $\sim 6,5$ [22], a u szczura $\sim 5,3$ [3]. W naczyniach niebarierowych mięśnia sercowego lub szkieletowego, wartości te wahają się od 2,5 do 5,9 [21]. Warto podkreślić, że w tych naczyniach odczyn na okludynę jest śladowy lub całkowicie ujemny. Podobne odczyny, to znaczy dodatni na ZO-1 i ujemny na okludynę, obserwowaliśmy też w śródbłonnku okienkowanym (niebarierowym) naczyń splotu naczyńniówkowego [21]. Jest

to dowód, że cząsteczki białkowe ZO-1 są obecne zarówno w połączeniach międzykomórkowych ścisłych (TJs) jak i w połączeniach przylegających (AJs).

B) Połączenia przylegające (*Adherens junctions*, AJs)

a) Białka integralne (*Transmembrane proteins*)

Kadheryny (*cadherins*). Tworzenie stref przylegania komórki do komórki (*zonula adhaerens*), a więc i tworzenie połączeń międzykomórkowych polegających na przyleganiu (AJs) jest uzależnione od obecności błonowych glikoproteidów zwanych kadherynami. Ta wielka rodzina białek występujących w połączeniach przylegających, reprezentuje w pewnym sensie podobne cechy strukturalne oraz czynnościowe, jakie spełniają okludyna, czy np. klaudyny w połączeniach barierowych. Różnica polega jednak na tym, że kadheryny reagują między sobą w sposób homotypowy jedynie w obecności jonów wapnia. Ich odcinki cytoplazmatyczne natomiast łączą się z białkami peryferyjnymi, głównie kateninami, które z kolei (podobnie jak ZO-1) łączą się z aktywnymi mikrofilamentami cytoszkieletu.

Jakkolwiek istnieje wiele odmian kadheryn, w niniejszym opracowaniu zajmujemy się wyłącznie tą, która występuje w śródbłonkach naczyń krwionośnych i dlatego jest określana literami VE (*vasculo-endothelial-cadherin*) lub *cadherin-5*, a którą nazwijmy VE-kadheryną [12]. Prawdopodobnie, VE-kadheryna wykazuje pewną specyfikę gatunkową [21, 22] objawiającą się silniejszą reakcją immunocytochemiczną w połączeniach międzykomórkowych śródbłonka mózgu człowieka (3,9–6,5 ziarenek złota na 1 μm) niż w mózgu myszy i szczura (~3,2 ziarenek/ μm). Być może, zjawisko to wynika z faktu, że według danych producenta (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) przeciwciała te są wytwarzane przeciwko ludzkiej VE-kadherynie, i w wyniku tego wykazują wyższą specyfikę w stosunku do ludzkiego niż do mysiego czy też szczurzego antygeny.

b) Białka peryferyjne (*Peripheral protein molecules*)

Kateniny (*Catenins*). Główna rola katenin polega na połączeniu kadheryny (lub kadheryn) z aktywnymi mikrofilamentami cytoszkieletu, i jak to już podkreślaliśmy uprzednio, odpowiada pod tym względem roli ZO-1 w połączeniach ścisłych. Uważa się, że β -katenina oraz γ -katenina (plakoglobina) łączą kadherynę z α -kateniną, która dopiero łączy ten kompleks z mikro włókienkami aktyny [13]. Podwójna lokalizacja w połączeniach międzykomórkowych oraz w jądrach komórkowych β -kateniny nasuwa przypuszczenie o jej raczej złożonej roli. Uważa się, że jest ona również zaangażowana w przekazywaniu sygnałów (*signal transduction*) z komórki do komórki oraz w ekspresji genów i w procesach transkrypcji [16]. Te czynności β -kateniny są regulowane przez stopień ufosforylowania obecnych w jej cząsteczce aminokwasów seryny i tyrozyny. Pod tym względem, ten mechanizm regulacji jest podobny do mechanizmów regulacji innych białek połączeniowych, włączając białko ZO-1 [10].

Odczyny immunocytochemiczne z użyciem złota koloidalnego wskazują, że α -katenina jest rozmieszczona wzdłuż szczeliny połączeniowej, zwykle po cytoplazmatycznej stronie błon komórek śródbłonka tworzących połączenie międzykomórkowe.

Ilość immunosygnatów jest jednak znacznie niższa niż dla ZO-1, okludyny lub VE-kadheryny. W naczyniach mózgowych człowieka gęstość immunosygnatów w połączeniach komórek śródbłónka wynosi od 1,45 do 2,51 ziaren złota/ μm [22]. Cechą charakterystyczną tego białka jest jego obecność w połączeniach międzykomórkowych śródbłónka naczyń mięśnia szkieletowego oraz mięśnia sercowego. Rozmieszczenie i gęstość ziarenek złota w tych niebarierowych naczyniach jest podobna do obserwowanych w naczyniach mózgu [21]. Jest to zrozumiałe gdy uwzględnimy fakt, że kateniny są składnikami białkowymi połączeń przylegających, a nie barierowych.

Podobne do powyżej opisanych obrazy obserwujemy przy immunocytochemicznym badaniu rozmieszczenia β -kateniny. Zarówno w naczyniach barierowych mózgu, jak i w naczyniach niebarierowych mięśnia szkieletowego lub sercowego nasilenie reakcji jest nieco słabsze niż w przypadku α -kateniny. W naczyniach mózgowych człowieka gęstość ziarenek złota na 1 μm długości połączenia międzykomórkowego wynosiła od 1,36 do 1,47 [22].

UWAGI KOŃCOWE I WNIOSKI

Przedstawione powyżej w krótkości dane uzyskane w ciągu ostatnich kilku lat wykazały, że większość ważnych białkowych składników budulcowych tak delikatnych i skomplikowanych struktur, jakimi są połączenia międzykomórkowe śródbłónków naczyń krwionośnych, utrzymuje swoje właściwości antygenowe po odpowiednim utrwaleniu i zatopieniu wycinków tkanki mózgowej.

Wykonanie odczynów immunocytochemicznych z użyciem złota koloidalnego pozwala nie tylko na precyzyjne zlokalizowanie badanych białek na poziomie ultrastrukturalnym, ale przy zastosowaniu morfometrii umożliwia określenie gęstości ziaren złota, a więc i względnej ilości danego białka w substrukturach połączeń komórkowych.

Doświadczenia wykonane podczas rozwoju i dojrzewania czynnościowego siatki naczyniowej mózgu oraz obserwacje zmian towarzyszących doświadczalnemu uszkodzeniu (otwarciu) bariery przez szok osmotyczny pozwoliły znaleźć białka, które mogą spełniać rolę markerów (wyznaczników) prawidłowej lub nieprawidłowej czynności barierowej naczyń. Do nich należą w pierwszym rzędzie okludyna, kładyna-5, ZO-1 i ewentualnie VE-kadheryna lub kateniny. Posiadanie takich biomarkerów wykrywalnych metodami morfologicznymi ma duże znaczenie praktyczne. Markery te mogą być wykorzystane zarówno przy określaniu stanu bariery naczyniowej w różnych sytuacjach doświadczalnych oraz przy badaniu efektów działania nowych środków leczniczych w schorzeniach mózgu.

Wysiłki i koszty poniesione przy tego typu badaniach są niewątpliwie opłacalne, ponieważ pomagają one w poznaniu i zrozumieniu strukturalno-czynnościowych współzależności w zespołach połączeniowych śródbłónka naczyń krwionośnych, a zatem mogą dostarczyć cennych informacji odnośnie ich roli w patologii mózgu.

Artykuł niniejszy jest skrótownym przedstawieniem wyników ostatnio prowadzonych badań i nie zawiera elektronogramów ilustrujących rozmieszczenie omawianych białek na poziomie ultrastruktury połączeń międzykomórkowych. Elektronogramy te można znaleźć w naszych opublikowanych [20, 21], oraz będących obecnie w druku artykułach naukowych [3, 22].

LITERATURA

- [1] BRADBURY, M. The concept of a blood-brain barrier. New York, Wiley & Sons 1979.
- [2] DOBROGOWSKA, DH, VORBRODT, A.W. Quantitative immunocytochemical study of blood-brain barrier glucose transporter (GLUT-1) in four regions of mouse brain. *J Histochem Cytochem* 1999; **47**: 1021–1029.
- [3] DOBROGOWSKA, DH, VORBRODT, AW. Immunogold localization of tight junctional proteins in normal and osmotically-affected rat blood-brain barrier. *Histochem J* 2004; in press.
- [4] FANNING, AS, JAMESON, BJ, JESAITIS, LA, ANDERSON, JM. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 1998; **273**: 29745–29753.
- [5] FURUSE, M, HIRASE, T, ITOH, M, NAGAFUCHI, A, YONEMURA, S, TSUKITA, S, TSUKITA, S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 1993; **123**: 1777–1788.
- [6] GLOOR, SM, WACHTEL, M, BOLLIGER, MF, ISHIHARA, H, LANDMANN, R, FREI, K. Molecular and cellular permeability control at the blood-brain barrier. *Brain Res Rev* 2001; **36**: 258–264.
- [7] ITOH, M, NAGAFUCHI, A, MOROI, S, TSUKITA, S. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell Adhesion through its direct binding to β -catenin and actin filaments. *J Cell Biol* 1997; **138**: 181–192.
- [8] ITOH, M, FURUSE, M, MORITA, K, KUBOTA, K, SAITOU, M, TSUKITA, S. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2 and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* 1999; **147**: 1351–1363.
- [9] LIU, Y, NUSRAT, A, SCHNELL, FJ, REAVES, TA, WALSH, S, POCHET, M, PARKOS, CA. Human junction adhesion molecules regulates tight junction resealing in epithelia. *J Cell Sci* 2000; **113**: 2363–2374.
- [10] MORIN, PI. Beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays* 1999; **21**: 1021–1030.
- [11] MORITA, K, SASAKI, H, FURUSE, M, TSUKITA, S. Endothelial claudin: Claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol* 1999; **147**: 185–194.
- [12] NAVARRO, P, RUCO, L, DEJANA, E. Differential localization of VE-cadherin and N-cadherin in human endothelial cells: VE-cadherin competes with N-cadherin for junctional localization. *J Cell Biol* 1998; **140**: 1475–1484.
- [13] NIESET, JE, REDFIELD, AR, JIN, F, KNUDSEN, KA, JOHNSON, KR, WHEELOCK, MJ. Characterization of the interactions of alpha-catenin with alpha-actinin and beta-catenin/plakoglobin. *J Cell Sci* 1997; **110**: 1013–1022.
- [14] REESE, TS, KARNOVSKY, MJ. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 1967; **34**: 207–217.
- [15] STEVENSON, BR, SILICIANO, JD, MOOSEKER, MS, GOODENOUGH, DA. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 1986; **103**: 755–766.
- [16] TAKEMARU, KI, MOON, RT. The transcriptional coactivator CBP interacts with b-catenin to activate gene expression. *J Cell Biol* 2000; **149**: 249–254.
- [17] VORBRODT, AW. Morphological evidence of the functional polarization of brain microvascular endothelium. [w] Partridge WM [ed.] *The Blood-Brain Barrier*. New York, Raven Press 1993: 137–164.
- [18] VORBRODT, AW. The application of quantitative immunocytochemistry for the evaluation of blood-brain barrier (BBB) to endogenous albumin. [w] J. Greenwood et al. [eds] *New Concepts of a Blood-Brain Barrier*. New York, Plenum Press 1995: 39 – 46.
- [19] VORBRODT, AW, DOBROGOWSKA, DH. Immunocytochemical evaluation of blood-brain barrier to endogenous albumin in adult, newborn and aged mice. *Folia Histochem Cytobiol* 1994; **32**: 63–70.

- [20] VORBRODT, AW, DOBROGOWSKA, DH, TARNAWSKI, M. Immunogold study of interendothelial junction-associated and glucose transporter proteins during postnatal maturation of the mouse blood-brain barrier. *J Neurocytol* 2001; **30**: 705–716.
- [21] VORBRODT, AW, DOBROGOWSKA, DH. Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist's view. *Brain Res Rev* 2003; **42**: 221–242.
- [22] VORBRODT, AW, DOBROGOWSKA, DH. Molecular anatomy of interendothelial junctions in human blood-brain barrier microvessels. *Folia Histochem Cytobiol* 2004; **42**: 67–75.

Andrzej W. Vorbrodt

*New York State Institute for Basic Research in Developmental Disabilities,
1050 Forest Hill Road*

Staten Island, New York 10314, USA

E-mail adres: dobrogowska@msn.com (A.W.Vorbrodt)

WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI
WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI
WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI
WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI
WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI
WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI
WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI
WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI
WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI
WYKAZ TWÓRCÓW I WYDAWÓCZKI

MECHANIZMY IMMUNOLOGICZNE W NOWOTWORACH I PRÓBY WYKORZYSTANIA ICH W IMMUNOTERAPII

IMMUNOLOGICAL MECHANISMS IN CANCER AND LIKELIHOOD
OF THEIR USE IN IMMUNOTHERAPY

J. KAWIAK¹, I.HUS³, J. ROLIŃSKI², G.HOSER¹, A.DMOSZYŃSKA³

Zakład Cytologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego,
Warszawa¹, Klinika Hematologii AM w Lublinie³ i Zakład Immunologii AM, Lublin²

Streszczenie. Jednym z mechanizmów nadzoru immunologicznego chroniącym organizm człowieka przed rozwojem nowotworu jest obecność naturalnych przeciwciał monoklonalnych IgM w krążeniu. Okresowa immunosupresja stanowi okazję sprzyjającą kancerogenezie. Taki stan zachodzi np. po zakażeniach wirusowych bądź jest wywołany paleniem papierosów. Ponadto rozwijający się nowotwór indukuje tolerancję immunologiczną. Możliwość wykorzystania immunoterapii w leczeniu nowotworów dotyczy: zmniejszenia masy komórek nowotworowych np. przez użycie swoistych przeciwciał monoklonalnych, oraz zwiększenia ilości swoistych klonów limfocytów T cytotoksycznych odpowiednimi szczepieniami.

Słowa kluczowe: prezentacja antygenów, komórki dendrytyczne, tolerancja immunologiczna, terapia.

Summary. One of important mechanisms of immunosurveillance against cancer in human organism is presence of natural, monoclonal IgM antibodies in circulation. Immunosuppression after viral infections or induced by cigarette smoking may concord the cancerogenesis. Moreover, the developing cancer itself develops immunological tolerance. The likelihood of immunotherapy of cancer is directed on use of specific monoclonal antibodies to decrease the mass of the tumor and vaccinations to increase T lymphocyte clones cytotoxic against cancer cells.

Key words: antigen presentation, dendritic cells, immunological tolerance, therapy.

WSTĘP

Organizm nasz jest zbudowany z bilionów komórek. Na organizm człowieka składa się około 10^{14} komórek (dla porównania, ludzi na ziemi żyje około 10^9). Komórki te stale są w kontakcie bezpośrednim bądź porozumiewają się za pomocą różnych

cząsteczek sygnałowych – interleukin, czynników wzrostowych, czynników przeżycia. Komórki, których przeżywanie i podziały nie zależą od sygnałów przekazywanych z innych komórek organizmu są niebezpieczne dla całego organizmu. Takimi są komórki nowotworowe, bądź komórki w trakcie kancerogenezy, w których wiele genów podlega mutacjom. Również wirusy mogą indukować w komórce ekspresję białek onkogennych. Zmiany w genomie komórek najczęściej są wykrywane i korygowane przez układy reperacji DNA [9,26]. Niektóre komórki organizmu mogą jednak przeniknąć przez barierę mechanizmów kontrolnych i prowadzić biosyntezę zmienionych, zmutowanych białek [20,22]. Komórki z ekspresją zmienionych białek są na ogół rozpoznawane przez układ odpornościowy organizmu i są usuwane. Te komórki, którym uda się „ukryć” przed układem immunologicznym i mają zachowaną zdolność proliferacji tworzą klon zmienionych, przednowotworowych komórek mających jakąś przewagę nad innymi komórkami organizmu. Na przykład komórki te mogą dzielić się bez sygnału od innych komórek, są odporne na sygnały do apoptozy, „unikają” kontroli układu odpornościowego. W komórce takiego klonu prawdopodobieństwo następnej trwałej zmiany genetycznej jest małe, ale w końcu po latach może ona nastąpić. Kolejne 3 lub 4 mutacje uniezależniają komórkę od sygnałów zewnętrznych i umożliwiają rozwój klonów komórek nowotworowych. Zwykle niestabilność genetyczna [40] takich zmutowanych komórek nasila się w miarę upływu czasu „życia” klonu komórek nowotworowych (rozwoju nowotworu), co stanowi dodatkowe niebezpieczeństwo dla organizmu. Komórki nowotworowe mogą lepiej i szybciej dostosować się do zmian otoczenia, np. wpływu leku niż komórki prawidłowe.

CO CHRONI NAS PRZED NOWOTWORAMI, A CO SPRZYJA ROZWOJOWI KLONÓW KOMÓREK NOWOTWOROWYCH?

U ludzi zdrowych jak i chorych na raka (nowotwory pochodzenia nabłonkowego) izolowano tysiące różnych naturalnych przeciwciał monoklonalnych wiążących się z komórkami nowotworowymi [5]. Przeciwciała te były wyłącznie klasy IgM. Zbadane przeciwciała IgM nie wykazywały mutacji łańcuchów Ig (linia zarodkowa komórek produkujących), wiązały się z cukrami na modyfikowanych antygenach (receptorach) swoistych nowotworowo i indukowały apoptozę komórek. Ustalono, że IgM są produkowane przez limfocyty B CD5+. Wydaje się, że produkcja naturalnych przeciwciał IgM jest ważnym mechanizmem biorącym udział w ochronie przed nowotworami nabłonkowymi.

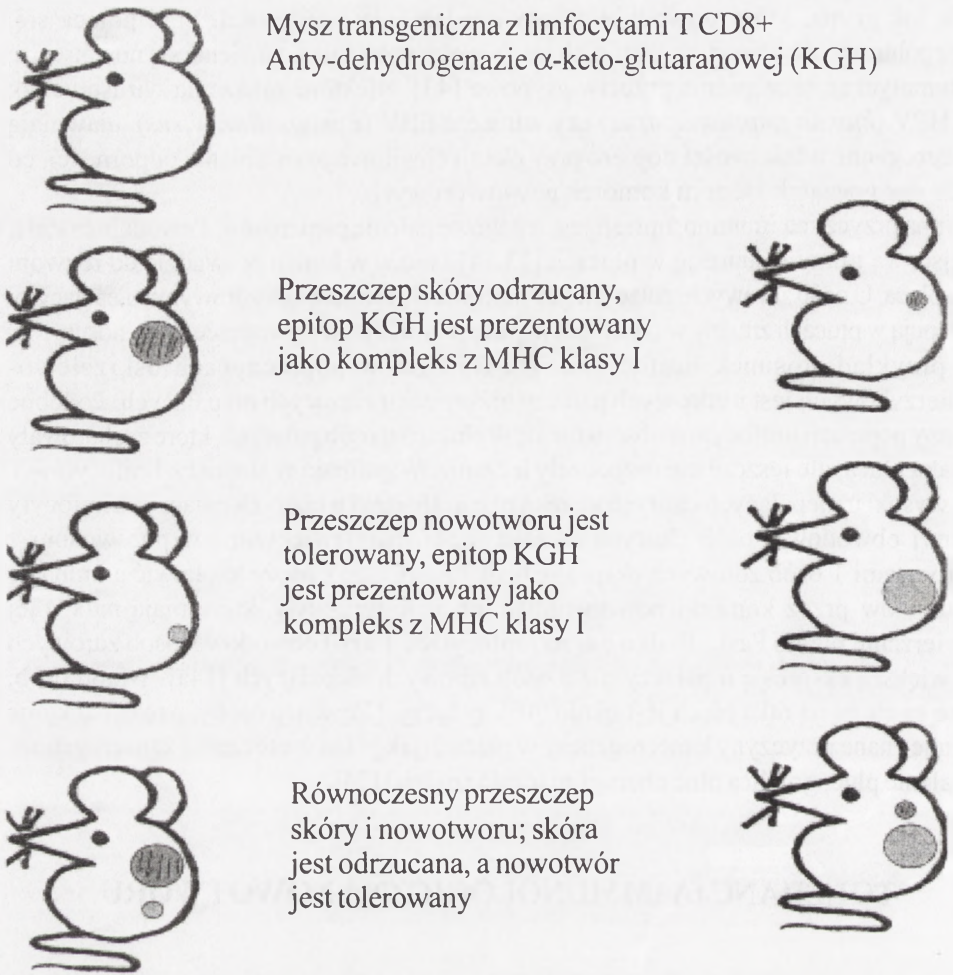
Wydaje się raczej pewne, że czynniki osłabiające funkcje kontrolne układu odpornościowego są istotne dla możliwości rozwoju zmienionych nowotworowo komórek. Osoby poddane immunosupresji przez długi okres np. po przeszczepie nerki są bardziej narażone na pojawienie się nowotworu niż osoby nie poddane immunosupresji [38]. Jest więc ważne, by ustalić czynniki sprzyjające osłabieniu funkcji układu

odpornościowego. Jednymi z wielu czynników są zakażenia wirusowe, nawet banalne takie jak grypa, które powodują czasowe osłabienie odporności. Stąd poleca się, szczególnie u osób starszych, u których jest większa szansa na pojawienie się nowotworu, systematyczne szczepienia przeciw grypowe [43]. Niektóre zakażenia wirusowe jak np. HPV (*human papiloma virus*) czy wirusem EBV (*Epstein-Barr virus*) ujawniają kancerogenne właściwości dopiero przy okazji chwilowego osłabienia odporności, co może dać początek klonom komórek nowotworowych.

Inną przyczyną immunosupresji jest nałogowe palenie papierosów. Powoduje to stałą, miejscową immunosupresję w płucach [13,14] i może w końcu prowadzić do rozwoju raka płuca. U osób zdrowych, palących gdy porówna się je z osobami zdrowymi, niepalącymi następują w płucach zmiany w odsetkach populacji limfocytów dowodzące immunosupresji. Na przykład stosunek limfocytów T CD4/CD8 w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych jest u zdrowych palaczy niższy niż u zdrowych niepalących. Podobne zmiany populacji limfocytów obserwuje się w płucach u osób palących, które zachorowały na raka płuca, ale jeszcze nie rozpoczęły leczenia. Wspomniany stosunek limfocytów T jest wysoki u niepalących chorych na raka płuca, ale niski u chorych palaczy. Limfocyty T krwi obwodowej osób chorych na raka płuca mają zwiększoną w porównaniu z limfocytami T osób zdrowych ekspresję białka Fas(CD95). Może to ułatwić eliminację limfocytów przez komórki nowotworowe lub inne limfocyty, które mają na swojej powierzchni białko FasL. Białko Fas na limfocytach T krwi obwodowej osób zdrowych ma większą ekspresję u palaczy niż u osób zdrowych niepalących [14a]. Wśród osób, które są chore na raka płuca jest około 90% palaczy. Niepalące osoby, nawet narażone na inne znane przyczyny kancerogenezy w płucach jak praca w otoczeniu kancerogenów, zapalenie płuc, gruźlica płuc chorują znacznie rzadziej [24].

TOLERANCJA IMMUNOLOGICZNA NOWOTWORU

Wzrost nowotworu w organizmie jest możliwy, gdy zachodzi tolerancja immunologiczna zmienionych komórek. Dobrze ilustruje to doświadczenie Wick i wsp. [44] (ryc.1). Transgeniczne myszy z delecją dehydrogenazy α -ketoglutaranu (DHG) nie przyjmują przeszczepów skóry od myszy z takim samym układem MHC klasy I, ale z ekspresją dehydrogenazy. Przeszczep skóry jest odrzucany 12–13 dnia. U myszy pozbawionej DHG występują bowiem limfocyty T cytotoksyczne niszczące komórki z ekspresją białka DHG rozpoznawanego jako białko „obce”. Komórki zawierające ten enzym są rozpoznawane i są usuwane. Jednak syngeniczny przeszczep nowotworu mający zachowaną ekspresję DHG rozwija się progresywnie i jest letalny dla myszy, które giną 27–33 dnia z powodu rozwoju nowotworu. Dlaczego komórki nowotworu z takim samym układem MHC klasy I i również zawierające dehydrogenazę jak komórki skóry nie są usuwane? Równoczesne odrzucanie przeszczepu skóry przy braku eliminacji komórek nowotworowych sugeruje, że nie jest to brak swoistych limfocytów T cytotoksycznych rozpoznających komórki nowotworowe zawierające dehydrogenazę.



RYCINA 1. Schemat doświadczenia opisanego przez Wick i wsp. [44], który ilustruje tolerancję immunologiczną nowotworu. Tolerancja nie jest spowodowana brakiem cytotoksycznych limfocytów T CD8+. Opisy na rycinie

Rozwój nowotworu nie jest powodowany wyczerpaniem się klonów limfocytów T cytotoksycznych, ani też ogólną anergią. W tym przypadku komórki nowotworowe są tolerowane przez układ odpornościowy, a nie ma tego zjawiska w przypadku komórek skóry. Podobne obserwacje przeprowadzono u osób chorych na nowotwór melanoma, czerniaka [49]. W krwi chorych są liczne limfocyty T CD8+ skierowane swoiście przeciw antygenowi czerniaka Melan-A/MART-1. Te limfocyty krwi obwodowej zabijają komórki autogenicznego nowotworu, ale podobne limfocyty T CD8+ izolowane z nowotworu albo drenujących guz węzłów chłonnych nie są cytotoksyczne dla komórek melanoma. Limfocyty T CD8+ w węzle chłonnym i pozostające w obrębie nowotworu tolerują komórki nowotworowe. rcin.org.pl

Przyczyny tolerancji mogą być różne. Niektóre komórki nowotworowe nie mają ekspresji głównych białek układu zgodności tkankowej (MHC – *major histocompatibility complex*; HLA – *human leukocyte antigens*) [23]. Takie komórki nowotworowe nie prezentują limfocytom T antygenów pochodzących z własnych białek cytoplazmatycznych. Białka cytoplazmatyczne mają określony czas życia w komórce, co zapobiega gromadzeniu uszkodzonych cząsteczek. W pewnym okresie są one znakowane ubikwityną, co kieruje te białka do proteasomu, gdzie są cięte na peptydy 8–10-aminokwasowe [11,27]. Peptydy następnie najczęściej są transportowane układem TAP (*transporter associated with antigen processing*) [1] do siateczki śródplazmatycznej, gdzie wiążą się z cząsteczkami MHC klasy I. Peptydowe fragmenty wraz z cząsteczkami MHC klasy I są następnie przenoszone na powierzchnię komórki i prezentowane limfocytom T. Limfocyty T cytotoksyczne rozpoznające „obce” peptydy nowotworowe lub wirusowe proliferują, a następnie atakują i zabijają prezentujące je komórki. Komórki nowotworowe mogą mieć jednak małą ekspresję bądź ekspresję niefunkcjonalnych cząsteczek MHC klasy I [16,46,47]. Unikają wtedy kontroli układu immunologicznego, są więc tolerowane. Może też brak prezentacji peptydów pochodzących z własnych cytoplazmatycznych białek komórki nowotworowej wynikać ze zmian w funkcjonowaniu układu transportującego peptydy do siateczki śródplazmatycznej (układ TAP) [22,36]. Niska ekspresja TAP koreluje u chorych na czerniaka z częstością przerzutów nowotworu [17].

EKSPRESJA ZMIENIONYCH BIAŁEK KOMÓREK NOWOTWOROWYCH UŁATWIA DIAGNOZĘ

Niektóre komórki nowotworowe mają zwiększoną albo zmniejszoną ekspresję określonych białek w porównaniu z odpowiednimi komórkami prawidłowymi [46]. Komórki nowotworowe mogą też syntetyzować nieprawidłowe białka np. w szpiczaku plazmocytowym.

Obecnie jest znanych wiele peptydów, powtarzających się w pewnych nowotworach np. w melanoma. [8,39] i białaczkach [33], co określa się „podpisem nowotworowym”. Znajomość takich zapisów genomowych ma potencjalne znaczenie w diagnostyce i w terapii nowotworów. Przykładem może być przewlekła białaczka limfocytowa B-komórkowa (B-PBL). Na podstawie stanu mutacji genów dla zmiennego regionu łańcucha ciężkiego immunoglobulin (IgV_H) wyróżniono dwie postacie tej choroby. W typie 1 stwierdzono obecność niezmutowanych genów dla IgV_H w komórkach białaczkowych; ten typ białaczki cechuje bardziej agresywny przebieg kliniczny i krótszy czas przeżycia chorych. Typ 2 dotyczy chorych, u których komórki białaczkowe mają geny kodujące VH zmutowane. W tym typie białaczki jest łagodny przebieg kliniczny i długi czasem przeżycia chorych. Przy ustaleniu rokowania u chorych na B-PBL pomocne jest także określenie ekspresji genów kodujących białka markerowe. Ustalenie takiej prognozy wspomagają białka określane jako ZAP-70, IM1286077 i AICTL (*activation-induced c-type lectin*) [33].

PREZENTACJA ANTYGENÓW KOMÓREK NOWOTWOROWYCH LIMFOCYTOM T POWODUJĄCA ICH AKTYWACJĘ

Prezentacja własnych, nowotworowych antygenów limfocytom T pomocniczym może odbywać się bezpośrednio co może sprzyjać rozwojowi nowotworu. Na przykład komórki przewlekłej białaczki limfatycznej B-komórkowej, najczęstszej białaczki ludzi dorosłych, prezentują własne, zmienione białka limfocytom T pomocniczym, które produkują czynniki przeżycia sprzyjające komórkom białaczkowym [35]. Prezentacja antygenów limfocytom T może też odbywać się pośrednio, przy udziale komórek dendrytycznych (DC) w procesie tzw. prezentacji krzyżowej [31,32]. Komórki w procesie apoptozy albo nekrozy, bądź ich fragmenty są wtedy endocytowane przez DC tkankowe. Białka pobranych komórek po pocięciu na peptydy, mogą być prezentowane na powierzchni DC wraz z cząsteczkami MHC klasy I i II. DC przebywają w tkankach w stanie niedojrzałym, mają dużą zdolność pobierania antygenów, ale małą stymulacji limfocytów T [7]. Komórki dendrytyczne dojrzewają po endocytozie apoptotycznych lub nekrotycznych komórek i w obecności cytokin zapalnych takich jak interleukina-1 β , TNF albo stymulatory bakteryjne. Wtedy zwiększają ekspresję cząsteczek B7 oraz MHC i przenoszą się do regionalnych węzłów chłonnych, gdzie są dobre warunki do prezentacji pobranych antygenów limfocytom T odwiedzającym węzły [4]. DC zyskują tam dużą i długotrwałą ekspresję kompleksów peptyd-MHC. To indukuje proliferację klonów swoistych limfocytów T skierowanych przeciw komórkom zawierającym pobrane przez DC nieprawidłowe białka. Aktywowane limfocyty T z kolei stymulują DC, głównie przez oddziaływanie CD40 na limfocytach z CD40L na DC, powodując uwalnianie cytokin przez DC (IL-12, IL-15, IL-18). Tym sposobem DC jeszcze bardziej zwiększają funkcje stymulujące limfocyty T. Pojawia się wiele klonów limfocytów T swoiście rozpoznających antygeny (peptydy) pobranych komórek w apoptozie/nekrozie. Jednak u chorych z nowotworem, DC w obrębie guza pozostają często w stanie niedojrzałym i nie są zdolne do tego by migrować do węzłów. Czynniki uwalniane przez komórki nowotworowe takie jak transformujący czynnik wzrostu β (TGF β), IL-10 [37] i czynnik wzrostowy śródbłonna naczyń (VEGF) [6] mogą hamować dojrzewanie DC i zmniejszać ich funkcje stymulujące. Ponadto DC pod wpływem wspomnianych czynników mogą włączać niewłaściwą odpowiedź np. odpowiedź limfocytów Th-2 produkujących cytokiny (IL-10) albo limfocytów Tr1 wydzielających dalsze porcje TGF β i IL-10. Stałe uwalnianie przez nowotwór wspomnianych czynników rozpuszczalnych może wywoływać często opisywaną ogólną immunosupresję u chorych na nowotwór [12,35].

Tolerancja immunologiczna może być też spowodowana złożonością realizacji pełnej odpowiedzi immunologicznej limfocyta T (ataku przeciw komórce nowotworowej). Oprócz rozpoznania nieprawidłowych peptydów na komórce nowotworowej, jeżeli ta je prezentuje, limfocyt T dla pełnej odpowiedzi cytotoksycznej musi otrzymać sygnały kostymulujące. Odbywa się to przez oddziaływanie cząsteczek CD28 na limfocytach

T z cząsteczkami B7 na komórkach docelowych (nowotworowych). Jednak komórki nowotworowe mogą nie mieć ekspresji cząsteczek B7 i stąd nie mogą być skutecznie atakowane przez limfocyty T cytotoksyczne [47]. Komórki nowotworowe mogą też wpływać na ekspresję CD28 na limfocytach T powodując zastąpienie ich cząsteczkami CTLA4 [34,35], co prowadzi do anergii klonów limfocytów T swoistych przeciw komórkom nowotworowym. Cząsteczki CTLA4 mają bardzo podobną budowę do CD28 [41] i większe powinowactwo do cząsteczek B7 niż CD28, ale oddziałując z B7 nie przekazują limfocytowi T sygnału do ataku. Ponadto komórki rozwiniętego już nowotworu podlegają częstym mutacjom, co zmniejsza możliwości rozpoznania przez limfocyty T zmieniających się antygenów nowotworowych. Mutacje mogą też modulować oddziaływania peptyd-cząsteczka MHC oraz wiązanie kompleksu MHC-peptyd przez receptor limfocyta T (TCR). Zjawisko to opisywane jest jako dryfowanie antygenów komórki nowotworowej, co powoduje brak jej rozpoznania przez limfocyty T swoiste [3]. Stąd wydaje się oczywiste, że przerwanie tolerancji immunologicznej jest wstępnym, koniecznym etapem wykorzystania układu immunologicznego w leczeniu nowotworów, tzw. immunoterapii.

SPOSOBY IMMUNOTERAPII

Są różne próby wykorzystania układu immunologicznego w terapii nowotworów. Pierwszym, bardzo ważnym stwierdzeniem jest, że taka terapia może być skuteczna jedynie, gdy masa nowotworu jest mała. Większość niepowodzeń klinicznych z próbami immunoterapii wynika z tego, że układ immunologiczny może skutecznie usunąć tylko określoną, niewielką masę komórek nowotworowych. Tak więc wstępnym etapem poprzedzającym immunoterapię powinno być zmniejszenie masy nowotworu takim sposobem, który jednak nie uszkadza poważnie układu immunologicznego np. przez zabieg chirurgiczny. Temu celowi mogą też służyć przeciwciała monoklonalne wykorzystywane do zmniejszenia masy nowotworów komórek hemopoetycznych. Przeciwciała takie wykorzystywane klinicznie są zwykle cząsteczkami hybrydowymi, gdzie część wiążąca antygen pochodzi z mysich immunoglobulin, a część stała jest ludzką immunoglobuliną [28]. Ma to zapewnić dłuższy czas działania podawanych przeciwciał przez zmniejszenie odpowiedzi immunologicznej gospodarza na obce gatunkowo białko. Z takimi przeciwciałami mającymi części stałe łańcuchów człowieka mogą też zachodzić normalne funkcje efektorowe gospodarza takie jak cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał (*ADCC antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) czy cytotoksyczność przy udziale dopełniacza. Terapia taka zastosowana jako jedyne leczenie daje na jakiś czas poprawę stanu chorego i jest stosowana w chłoniakach i białaczkach [28,30].

Immunoterapia ma na celu zwiększenie klonów limfocytów T cytotoksycznych skierowanych przeciw komórkom nowotworowym. Najprostszym sposobem jest szczepienie chorego jego własnymi komórkami nowotworowymi po indukcji w tych

komórkach apoptozy i nekrozy. Ten sposób opracowany w doświadczeniach na zwierzętach [19], był stosowany u chorych z rakiem jelita grubego po operacji chirurgicznej [45], w melanoma [2] oraz w przewlekłej białaczce limfatycznej [21]. Taki sposób zwykle nie prowadzi do wyleczenia, ale często za rzymuje na jakiś czas wzrost nowotworu. U chorych z przerzutami melanoma w stadium III po chirurgicznym usunięciu przerzutu i leczeniu immunoterapeutycznym podawaniem napromieniowanych autologicznych komórek nowotworowych obserwowano 5-letni okres przeżycia u 48% chorych [2]. Jeszcze innym sposobem immunoterapii jest wzmożenie produkcji cytotoksycznych limfocytów T przez podawanie choremu DC „nakarmionych” *in vitro* komórkami nowotworowymi w apoptozie/nekrozie, lizatami komórek nowotworowych [15], albo peptydami, które pojawiają się w określonych nowotworach [8,39]. Komórki dendrytyczne można otrzymać z monocytów krwi chorego (układ autogeniczny) albo monocytów innej osoby (układ allogeniczny komórek DC) hodowanych *in vitro* w obecności czynników GM-CSF i IL-4 [10,25,42,48]. Zaletą szczepienia chorych komórkami DC hodowanymi *in vitro* jest to, że dojrzewanie DC może odbywać się w środowisku pozbawionym wspomnianych już czynników immunosupresorowych jakie towarzyszą dojrzewaniu *in vivo*, w organizmie chorego. „Dokarmianie” DC odbywa się przez dodanie do hodowli *in vitro* komórek nowotworowych w apoptozie lub ich fragmentów (lizatu komórek) oraz cytokin zapalnych np. TNF α [10,25]. Antygen można dowolnie dobierać. Może nim być białko, peptyd, lizat komórek nowotworowych bądź komórki w apoptozie, a stężenie antygeny podawanego *in vitro* może być duże, trudno osiągalne w warunkach *in vivo*. Późniejsze podanie w celach terapeutycznych dojrzałych komórek DC choremu, w którego organizmie są produkowane i wydzielane liczne rozpuszczalne czynniki immunosupresyjne stanowi ryzyko ponownej anergii [18]. Doświadczenie dotychczasowe z terapią komórkami DC jest zbyt krótkie, by ocenić jej skuteczność leczniczą, chociaż wydaje się, że podobnie jak bezpośrednie szczepienie daje to u niektórych chorych zatrzymanie rozwoju nowotworu [15].

PODSUMOWANIE

W chorobach nowotworowych obserwuje się tolerancję immunologiczną. Mimo obecności cytotoksycznych limfocytów T skierowanych przeciw komórkom nowotworowym, te ostatnie nie są atakowane i zabijane bo indukują tolerancję. Immunoterapia ma na celu przerwanie tolerancji immunologicznej oraz zwiększenie liczby klonów limfocytów T skierowanych przeciw komórkom nowotworowym. Jednakże może ona być skuteczna jedynie przy małej masie nowotworu.

LITERATURA

- [1] ANDROLEWICZ MJ, ANDERSON KS, CRESSWELL P. Evidence that transporters associated with antigen processing translocate a major histocompatibility complex class I-binding peptide into the endoplasmic reticulum in an ATP-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 9130–9134
- [2] BAARS A, CLAESSEN AM, VAN DEN EERTWEGH AJ, GALL HE, STAMAG, MEIJER S, GIACCONE G, MEIJER CJ, SCHEPER RJ, WAGSTAFF J, VERMORKEN JB, PINEDO HM. Skin tests predict survival after autologous tumor cell vaccination in metastatic melanoma: experience in 81 patients. *Ann Oncology* 2000; **11**: 965–970.
- [3] BAI XF, LIU J, LI O, ZHENG P, LIU Y. Antigenic drift as a mechanism for tumor evasion of destruction T lymphocytes. *J Clin Invest* 2003; **111**: 1487–1496.
- [4] BANCHEREAU J, STEINMAN RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; **392**: 245–251.
- [5] BRANDLEIN S, POHLE T, RUOFF N, WOZNIAK E, MULLER-HERMELINK HK, VOLLMERS HP. Natural IgM antibodies and immunosurveillance mechanisms against epithelial cancer cells in humans. *Cancer Res* 2003; **63**: 7995–8005.
- [6] BRIVIO F, LISSONI P, ROVELLI F, NESPOLI A, UGGERI F, FUMAGALLI L, GARDANI G. Effects of IL-2 preoperative immunotherapy on surgery-induced changes in angiogenic regulation and its prevention of VEGF increase and IL-12 decline. *Hepatology* 2002; **49**: 385–387.
- [7] CERUNDOLO V, HERMANS IF, SALIO M. Dendritic cells: a journey from laboratory to clinic. *Nature Immun* 2004; **5**: 7–10.
- [8] COULIE PG, KARANIKAS V, COLAU D, LURQUIN C, LANDRY C, MARCHAND M, DORVAL T, BRICHARD V, BOON T. A monoclonal cytolytic T-lymphocyte response observed in a melanoma patient vaccinated with a tumor-specific antigenic peptide encoded by gene MAGE-3. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 10290–10295.
- [9] FRIEDBERG EC. DNA damage and repair. *Nature* 2003; **421**: 436–440.
- [10] GODDARD R, PRENTICE A, COPPLESTONE A, KAMINSKI E. A study of the proteins responsible for stimulating B-CLL-specific T-cell responses by autologous dendritic cells pulsed with tumor cell lysate. *Hematology J* 2003; **4**: 271–277.
- [11] HERSHKO A, CIECHANOVER A. The ubiquitin system. *Ann Rev Biochem* 1998; **67**: 425–479.
- [12] HOFFMAN TK, MULLER-BERGHHAUS J, FERRIS RL, JOHNSON JT, STORKUS WJ, WHITESIDE TL. Alterations in the frequency of dendritic cell subsets in the peripheral circulation of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2002; **8**: 1787–1793.
- [13] HOSER G, DOMAGAŁA-KULAWIK J, DROSZCZ P, DROSZCZ W, KAWIAK J. Lymphocyte subsets differences in smokers and nonsmokers with primary lung cancer: a flow cytometry analysis of bronchoalveolar lavage fluid cells. *Med Sci Monitor* 2003; **9**: 310–315.
- [14] HOSER G, KAWIAK J, DOMAGAŁA-KULAWIK J, et al. Flow cytometric evaluation of lymphocyte subpopulations in the BALF of healthy smokers and nonsmokers. *Folia Histochem Cytobiol* 1999; **37**: 25–30.
- [14a] HOSER G, WASILEWSKA D, DOMAGAŁA-KULAWIK J. Expression of Fas receptor on peripheral blood lymphocytes from patients with non small cell lung cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 2004 (w druku)
- [15] HUS I, ROLIŃSKI J, TABARKIEWICZ J, WOJASK, DMOSZYŃSKA A, WĄSIK-SZCZEPANEK E. Immunotherapy of patients with B-CLL in early stage with allogeneic dendritic cells pulsed with tumor lysates-preliminary report. X Internat Workshop on CLL 2003; Oct 10-12, Stresa, Lake Maggiore, Włochy.
- [16] KAKLAMANIS L, LEEK R, KOUKOURAKIS M, GATTER K, HARRIS AL. Loss of transporter in antigen processing 1 transport protein and major histocompatibility complex class I molecules in metastatic versus primary breast cancer. *Cancer Res* 1995; **55**: 5191–5194.
- [17] KAMARASHEV J, FERRONE S, SEIFERT B, BONI R, NESTLE FO, BURG G, DUMMER R. TAPI down-regulation in primary melanoma lesions: an independent marker of poor prognosis. *Int J Cancer* 2001; **95**: 23–28.
- [18] KAMINSKI ER, GODDARD RV, PRENTICE AG. Dendritic cells and their potential therapeutic role in haematological malignancy. *Leukemia Lymphoma* 2003; **44**: 1657–1666.
- [19] KAWALEC M, SKORSKI T, KAWIAK J. Successful chemoimmunotherapy of murine L1210 lymphatic leukemia with cyclofosfamide and mafosfamide-treated leukemia cells. *Invest New Drugs* 1988; **6**: 169–172.
- [20] KAWIAK J, HOSER G. Niektóre mechanizmy immunologiczne w nowotworach. *Post Biol Kom* 2000; **27**; supl.15: 91–118.

- [21] KAWIAK J, ROLIŃSKI J, HUS I, TABARKIEWICZ J, WOJAS K, HOSER G, DMOSZYŃSKA A. Analysis of peripheral blood lymphocyte count in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-cell CLL) treated (vaccinated) with own irradiated mononuclear cells. The case report. *Acta Haematol Pol* 2003; **34**, suppl.1,129.
- [22] KAWIAK J, ZABEL M. Kancerogeneza, w *Seminaria z cytofizjologii*, (red.) J.Kawiak, M.Zabel, Wrocław: Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner 2002: 345–363.
- [23] KORKOLOPOULOU P, KAKLAMANIS L, PEZZELLA F, HARRIS AL, GATTER KC. Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer. *Br J Cancer* 1996; **73**: 148–153.
- [24] KREUZER M, HEINRICH J, KREINBROCK L, ROSARIO AS, GERKEN M, WICHMANN HE. Risk factors for lung cancer among nonsmoking women. *Int J Cancer* 2002; **100**: 706–713.
- [25] LANZAVECCHIA A. Mechanisms of antigen uptake for presentation. *Cur Opin Immunol* 1996; **8**: 348–354.
- [26] LINDAHL T, WOOD RD. Quality control by DNA repair. *Science* 1999; **286**: 1897–1905.
- [27] LIU CW, CORBOY MJ, DEMARTINO GN, THOMAS PJ. Endoproteolytic activity of the proteasome. *Science* 2003; **299**: 408–411.
- [28] LUNDIN J, KIMBY E, BJORKHOLM M, BROLIDEN PA, CELSING F, HJALMAR V, MOLLGARD L, REBELLO P, HALE G, WALDMANN H, MELLSTEDT H, OSTERBORG A. Phase II trial of subcutaneous anti-CD52 monoclonal antibody alemtuzumab (Campath-1H) as first-line treatment for patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood* 2002; **100**: 768–773.
- [29] MAKARENKOVA VP, SHURIN GV, TURKOVA IL, BALKIR L, PIRTSKHALAISHY G, PEREZ L, GEREIN V, SIEGFRIED JM, SHURIN MR. Lung cancer-derived bombesin-like peptides down-regulate the generation and function of human dendritic cells. *J Neuroimmunology* 2003; **145**: 55–67.
- [30] McLAUGHLIN P, GRILLO-LOPEZ AJ, LINK BK, LEVY R, CZUCZMAN MS, WILLIAMS ME, HEYMAN MR, BENICE-BRUCKLER I, WHITE CA, CABANILLAS F, JAIN V, HO AD, LISTER J, WEY K, SHEN D, DALLAIRE BK. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: Half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 1998; **16**: 2825–2833.
- [31] NIEDA M, NICOL A, KIKUCHI A et al. Dendritic cells stimulate the expansion of *bcr-abl* specific CD8+ T cells with cytotoxic activity against leukemic cells from patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 1998; **91**: 977–983.
- [32] REID CDL. Dendritic cells and immunotherapy for malignant disease. *Br J Haematology* 2001; **112**: 874–888.
- [33] ROSENWALD A, ALIZADEH AA, WILHOPF G et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exper Med* 2001; **194**: 1639–1647.
- [34] SHRIKANT P, KHORUTS A, MESCHER MF. CTLA-4 blockade reverses CD8+ T cell tolerance to tumor by a CD4+ T cell- and IL-2-dependent mechanism. *Immunity* 1999; **11**: 483–493.
- [35] SCRIVENER S, GODDARD RV, KAMINSKI ER, PRENTICE AG. Abnormal T-cell function in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Lymphoma* 2003; **44**: 383–389.
- [36] SELIGER B, MAEURER MJ, FERRONE S. TAP off-tumors on. *Immunol Today* 1997; **18**: 292–299
- [37] SHURIN MR, YURKOVETSKY ZR, TURKOVA IL, BALKIR L, SHURIN GV. Inhibition of CD40 expression and CD40-mediated dendritic function by tumor-derived IL-10. *Intern J Cancer* 2002; **101**: 61–68.
- [38] SNANOUDJ R, KRIAA F, ARZOUK N, BEAUDREUIL S, HIESSE C, DURRBACH A, CHARPENTIER B. Single-center experience with cyclosporine therapy for kidney transplantation: analysis of twenty-year period in 1200 patients. *Transplantation Proc* 2004; **36**,suppl 2, 83S–88S.
- [39] SPEISER DE, LIENARD D, PITTET MJ, BATARD P, RIMOLDI D, GUILLAUME P, CEROTTINI JC, ROMERO P. *In vitro* activation of melanoma-specific CD8(+) T cells by endogenous tumor antigen and peptidic vaccines. A comparison to virus-specific T cells. *Eur J Immunol* 2002; **32**: 731–741.
- [40] STEMBAŁSKA-KOZŁOWSKA A, SMIGIEL R, SCHLADE-BARTUSIAK K, DUS D, SAŚIADEK M. Niestabilność genetyczna w nowotworach. II. Niestabilność mikrosatelitarna i utrata heterozygotyczności. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 635–646.
- [41] SUWALSKA K, TUTAK A, FRYDECKA I. Polimorfizm genu CTLA-4 kodującego antygen supresorowy - ryzyko autoimmunizacji. *Post Biol Kom* 2000; **30**: 549–562.
- [42] TABARKIEWICZ J. Ocena odpowiedzi cytotoksycznej przeciwko komórkom nowotworowym indukowanej przy pomocy komórek dendrytycznych stymulowanych antygenami nowotworowymi. Rozpr doktorska Zakład Immunologii Klinicznej AM w Lublinie, 2004

- [43] TRZONKOWSKI P. Ocena zjawisk immunologicznych towarzyszących szczepieniom przeciw wirusowi grypy u ludzi w wieku starszym. Rozprawa doktorska, Katedra Histologii i Immunologii AM w Gdańsku, 2003.
- [44] WICK M, DUBEY P, KOEPPEN H, SIEGEL CT, FIELDS PE, CHEN L, BLUESTONE JA, SCHREIBER H. Antigenic cancer cells grow progressively in immune hosts without evidence for T cell exhaustion or systemic anergy. *J Exp Med* 1997; **186**: 229-238.
- [45] VERMORKEN JB, CLAESSEN AM, VAN TINTEREN H, GALL H, EZINGA R, MEIJER S, SCHEPER RJ, MEIJER CJL, BLOEMENA E, RANSOM JH, HANNA JR MG, PINEDO HM. Active specific immunotherapy for stage II and stage III human colon cancer. A randomised trial. *Lancet* 1999; **353**: 345-350.
- [46] ZHENG P, GUO Y, NIU QT, LEVY DE, DYCK JA, LU S, SHEINMAN LA, LIU Y. Proto-oncogene PML control genes devoted to MHC class I antigen-presentation. *Nature* 1998; **396**: 373-376.
- [47] ZHENG P, SARMA S, GUO Y, LIU Y. Two mechanisms for tumor evasion of preexisting cytotoxic T-cell responses. Lessons from recurrent tumors. *Cancer Res* 1999; **59**: 3461-3467.
- [48] ZHOU LJ, TEDDER TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 2588-2592.
- [49] ZIPPELIUS A, BATARD P, RUBIO-GODOY V, BIOLEY G, LIENARD D et al. Effector function of human tumor-specific CD8 T cells in melanoma lesions: a state of local functional tolerance. *Cancer Res* 2004; **64**: 2865-2873.

Jerzy Kawiak

ul. Marymoncka 99, 01`-813 Warszawa

e-mail: jkawiak@cmkp.edu.pl

TRANSGENIC PLANT DERIVED, BIOLOGICALLY ACTIVE PROTEINS FOR IMMUNOTHERAPY OF MINIMAL RESIDUAL CANCER

Zenon STĘPLEWSKI

Biotechnology Foundation Laboratories, Thomas Jefferson University,
Philadelphia, Pennsylvania, USA

Summary: The early diagnosis, treatment and prevention of cancer recurrence are the major priorities in future oncology. An increasing number of cases are surgically cured as a result of early diagnosis and novel approaches to chemo and radiotherapy. However, a significant percentage of these patients will develop recurrent and/or metastatic disease. The prognosis for patients with metastatic breast, lung and colorectal cancers at diagnosis or as a cancer recurrence are poor. Thus, about fifty percent of high risk adenocarcinoma patients, dependent on tumor type and staging, will develop recurrent disease in 5 years. It is therefore hypothesized that improved adjuvant treatment will be of significant value for the treatment of minimal residual disease and prevention of cancer recurrence. Among the potential target antigens in lung, breast and colorectal cancers are: GA73-3 (EpCAM) antigen as defined by monoclonal antibody (MAb) CO17-1A, a blood group related oligosaccharide LewisY (LeY) defined by MAb BR55-2 and an Epithelial Growth Factor Receptor (EGFr) defined by MAb 425. All three MAb's were the first murine antibodies shown to mediate ADCC with murine and human effector cells. Their IgG2a and IgG3 isotypes are highly active in CDC and ADCC and all effectively inhibit human tumor growth in xenografted nude mice. All three MAb's were shown to be safe in a clinical setting. There is evidence that adjuvant immunotherapy in conventionally treated high risk patients can mediate micrometastatic tumor cell destruction and prevent adenocarcinoma recurrence. Passive immunotherapy may not be a sufficient approach to eradicate all tumor cells for extended periods of time. We are therefore also developing cancer vaccines based on the antigens defined by MABs. The development of polypeptides that mimic oligosaccharides (LeY and LeX) is in the advanced stages. We expect that these molecules used as vaccines will induce not only humoral but also strong cellular responses in high risk cancer patients. To address and expedite the production of reliable and efficacious immunoproteins (antibodies and vaccines) modern, plant-based protein expression systems are used.

Key words: plant derived active proteins, immunotherapy, cancer

MINIMAL RESIDUAL DISEASE

The early diagnosis, treatment and prevention of recurrence of adenocarcinomas are a major priority in cancer therapy. Until now, surgery, chemotherapy and radiotherapy

have remained the mainstay of current treatment. The major limitation of chemo- and radiotherapy is their narrow therapeutic index between cancer and normal cells. The tumor cells need to be in mitosis in order to be susceptible to treatment and dormant cells escape the assault. The prognosis for patients with metastatic disease at diagnosis or as a cancer recurrence are poor. At diagnosis, 90 to 95% of surgically treated patients have no clinical or pathological signs of metastasis, but metastatic disease develops in about half of these patients in 5 years. In the new more specific modalities of treatment, various immunotherapeutic methods have been tried. A review of clinical trials of antibody-based cancer therapies reveals that this approach can, in rare cases, induce complete remission in individual patients with cancer. Since these trials usually involved patients with large tumor masses, tumor cell inaccessibility is probably the major reason for the prevailing failures. It is hypothesized that improved biological adjuvant treatments will be of significant value for the treatment of minimal residual disease [16, 17, 21, 30]. Minimal residual disease, the stage when tumor cells are few and dispersed, should therefore be a more promising target for therapeutic antibodies.

PASSIVE IMMUNOTHERAPY

It is now increasingly recognized that patients presenting with minimal cancer burden or micrometastatic disease will experience the greatest benefit from treatment with monoclonal antibodies. The first proof of efficacy of monoclonal antibodies in minimal residual disease was observed with MAb CO17-1A (Panorex) in patients with colorectal cancer stage III after complete resection of the primary tumor [32]. The result is similar to the benefit obtained in (radio)chemotherapy trials, however with notably lesser toxicity. It is clear from past experience that all currently available treatment modalities for cancer are far from perfect. However, since treatment modalities may be complementary in the control of tumor growth, the next logical step is to rationally design clinical approaches that combine conventional treatments with immunotherapy.

Among antigens expressed on adenocarcinomas that may have clinical significance are antigen GA73-3 targeted by IgG2a MAb CO17-1A, EGF receptor targeted by antibody 425 (IgG2a) and the histo-blood group related Lewis antigens [11, 12, 13, 33, 34, 40, 42]. The blood group-related carbohydrate structures Lex, sialyl-LeX and LeY are examples of terminal carbohydrate structures related to tumor prognosis. All three targets have already been exploited in clinical settings and all three MAb's were used in multiple Phase I and Phase II trials [8, 9, 35, 36, 37, 38, 41]. The CO17-1A (Panorex) is now in the final stages of Phase III trials.

ACTIVE IMMUNOTHERAPY

Minimal residual cancer is a promising target not only for passive, but also for active immunotherapy [43]. The non-specific active immunotherapy has quite a long history including the application of BCG [4, 27], IL-2 [26] or IFNalpha [2, 20]. The characterization of a series of tumor-associated antigens by monoclonal antibodies

introduced an era of specific active immunotherapy. Since the advent of murine monoclonal antibodies into clinical trials, the anti-idiotypes, as cancer antigen internal images, have been recommended as anti-cancer vaccines [6, 28]. This approach is continued by many groups, while others pursue the application of tumor antigen-derived polypeptides.

One of the antigens used as an immunogenic source of polypeptides for immunization in colorectal cancer is Ep-CAM [3, 5]. This antigen was characterized as GA73-3 antigen defined by monoclonal antibody CO17-1A by Szala et al.[42]. Carbohydrate anti-cancer vaccines were found to be poorly immunogenic [22, 23], difficult to purify in large quantities and difficult to synthesize. They induce mostly short-lived IgM antibodies and are mostly T cell independent.

Using molecular mimicry of LewisY oligosaccharide defined by monoclonal antibody BR55-2 [7, 34, 40], we have designed peptides that consist of carbohydrate-mimicking motifs presented as multiple-antigen peptides (MAPs). These were found to be effective inducers of T cell-dependent immune responses [1, 14, 15, 24, 31].

SOURCES OF ANTIGENS AND ANTIBODIES FOR IMMUNOTHERAPY

There are multiple protein expression systems available for the production of polypeptide antigens and monoclonal antibodies, all with their own advantages and disadvantages [10]. At present, antibodies are produced in cultures of transgenic mammalian cells [29] in expensive fermentation facilities. More recently, transgenic plants are used for expression of mammalian antibodies [25]. Plant-derived monoclonal antibodies retain their biological function, although their glycosylation is quite different. Ko et al. [19] have shown that transgenic plant-derived anti-rabies virus antibody was as effective at neutralizing the activity of rabies virus as the mammalian-derived antibody. The transgenic plant-derived antibody glycosylation was mainly with oligomannose type N-glycans and had no potentially antigenic alpha (1-3)-linked fucose residues [19]. Recently it was also shown [44] that transgenic plant-derived GA73-3 (EpCAM) antigen retained its ability to induce both humoral and cellular immune responses in animals.

It is now sufficiently clear that plant-derived mammalian molecules retain their biological activities despite the differences in their glycosylation patterns.

REFERENCES

- [1] AGADJANYAN M, LUO P, WESTERINK MAJ, CAREY LA, HUTCHINS W, STEPLEWSKI Z, WEINER DB, KIEBER-EMMONS T. Peptide mimicry of carbohydrate epitopes on human immunodeficiency virus. *Nature Biotech* 1997; **15**: 547-551.
- [2] AGARVALA SS, KIRKWOOD JM. Update on adjuvant interferon therapy for high-risk melanoma. *Oncology* 2002; **16**: 1177-1187.
- [3] ARMSTRONG A, ECK SL, EP. CAM: A new therapeutic target for an old cancer antigen. *Cancer Biol Ther* 2003; **2**: 320-326.
- [4] BASSI P. BCG (Bacillus of Calmette Guerin) therapy of high-risk superficial bladder cancer. *Surg Oncol* 2002; **11**: 77-83.

- [5] BALZAR M, WINTER MJ, DEBOER CJ, LITVINOV SV. The biology of 17-1A antigen (EpCAM) *J Mol Med* 1999; **77**: 699-712.
- [6] BHATTACHARYA-CHATTERJEE M, CHATTERJEE SK, FOON KA. Anti-idiotype vaccine against cancer. *Immunol Lett* 2000; **74**: 51-58.
- [7] BLASZCZYK-THURIN M, MURALI R, WESTERINK MAJ, STEPLEWSKI Z, KIEBER-EMMONS T. Molecular recognition of the Lewis Y antigen by monoclonal antibodies. *Protein Engineering* 1996; **9**: 447-459.
- [8] BRADY LW, MIYAMOTO C, WOO DV, RACKOVER M, EMRICH J, BENDER H, DAPARVAR S, STEPLEWSKI Z, KOPROWSKI H, BLACK P, LAZZARO B, NAIR S, MCCORMACK T, NIEVES J, MORABITO M, ESHLEMAN J. Malignant astrocytomas treated with Iodine 125 labeled monoclonal antibody 425 against Epidermal Growth Factor receptor. A Phase II *Trial Int J Rad Oncol Biol Phys* 1991; **22**: 225-230.
- [9] DERUI L, WOO DV, EMRICH J, STEPLEWSKI Z, RODECK U, HERLYN D, KOPROWSKI H, MIYAMOTO C, BRADY LW. Radiotoxicity of ¹²⁵I-labeled monoclonal antibody 425 against cancer cells containing Epidermal Growth Factor receptor. *Am J Clin Oncol* 1992; **15**: 288-294.
- [10] DOVE A. Uncorking the biomanufacturing bottleneck. *Nature Biotech* 2002; **20**: 777-779.
- [11] HERLYN M, STEPLEWSKI Z, HERLYN D, KOPROWSKI H. Colorectal carcinoma-specific antigen : Detection by means of monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; **76**: 1438-1442.
- [12] HERLYN D, HERLYN M, STEPLEWSKI Z, KOPROWSKI H. Monoclonal antibodies on cell-mediated cytotoxicity against human melanoma and colorectal carcinoma. *Eur J Immunol* 1979; **9**: 657-659.
- [13] HERLYN D, STEPLEWSKI Z, HERLYN M, KOPROWSKI H. Inhibition of colorectal carcinoma tumor growth in nude mice by monoclonal antibody. *Cancer Res* 1980; **40**: 717-721.
- [14] KIEBER-EMMONS T, AGADJANYAN M, HUTCHINS W, WESTWRINK MAJ, STEPLEWSKI Z. Peptide mimicry of tumor associated carbohydrate antigens. *Hybridoma* 1997; **16**: 3-10.
- [15] KIEBER-EMMONS T, LUO P, QIU J, CHANG TY, BLASZCZYK-THURIN M, STEPLEWSKI Z. Vaccination with carbohydrate peptide mimotope promotes anti-tumor responses. *Nature Biotech* 1999; **17**: 660-665.
- [16] KLEIN CA. The biology and analysis of single disseminated tumor cells. *Trends Cell Biol* 2000; **10**: 489-493.
- [17] KLEIN CA, BLANKENSTEIN TJF, SCHMIDT-KITTLER O, PETRONIO M, POLZER B, STOECKLEIN NH, RIETHMULLER G. Genetic heterogeneity of single disseminated tumor cells in minimal residual disease. *Lancet* 2002; **9334**: 683-689.
- [18] KOPROWSKI H, STEPLEWSKI Z, MITCHELL K, HERLYN M, HERLYN D, FUHRER JP. Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somat Cell Genet* 1980; **5**: 957-972.
- [19] KO K, TAKEOAH Y, RUDD PM, HARVEY DJ, DWEK RA, SPITZIN S, HANLON CA, RUPRECHT C, DIETZSCHOLD B, GOLOVKIN M, KOPROWSKI H. Function and glycosylation of plant-derived antiviral monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 8013-8018
- [20] KYLE RA. Maintenance therapy and supportive care for patients with multiple myeloma. *Semin Oncol* 1999; **26**: 35-42.
- [21] LINDEMANN F, SCHLIMOK G, DIRSCHIEDL P, WITTE J, RIETHMULLER G. Prognostic significance of micrometastatic tumor cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet* 1992; **340**: 685-689.
- [22] LIVINGSTON PO, ZHANG S, LLOYD KO. Carbohydrate vaccines that induce antibodies against cancer. 1. Rationale. *Cancer Immunol Immunother* 1997; **45**: 1-8
- [23] LIVINGSTON PO, RAGUPATHI G. Carbohydrate vaccines that induce antibodies against cancer. 2. Previous experience and future plans. *Cancer Immunol Immunother* 1977; **45**: 10-19.
- [24] LUO P, AGADJANYAN M, QIU J-P, WESTERINK MAJ, STEPLEWSKI Z, KIEBER-EMMONS T. Antigenic and immunological mimicry of peptide mimotopes of adenocarcinoma associated carbohydrate antigens. *Mol Immunol* 1998; **17**: 3125-3135.
- [25] MA JK-C, HIATT A, HEIN M, VINE N, WANG F, STABILA P, VADOLLEWEERD C, MOSTOV K, LEHNER T. Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science* 1995; **268**: 716-719.
- [26] MALAGUARNERA M, FERLITO L, GULIZIA G, DIFAZIO I, PISTONE G. Use of interleukin-2 in advanced renal carcinoma: meta-analysis and review of the literature. *Eur J Clin Pharmacol* 2001; **57**: 267-273
- [27] MATHE G, HULLE-PANNENKO O, BOURAT C. BCG in cancer immunotherapy : results obtained with various BCG preparations in a screening study for systemic adjuvants applicable to cancer immunoprophylaxis or immunotherapy. *Natl Cancer Inst Monogr* 1973; **39**: 107-113.

- [28] MOSOLITS S. Natural and induced immunity against the tumour-associated antigen Ep-CAM. 2003; Doctoral Dissertation, Stockholm, Sweden: Dept. Oncology-Pathology, Karolinska Institute.
- [29] NESBIT M, FU ZF, MCDONALD-SMITH J, STEPLEWSKI Z, CURTIS P. Production of a functional monoclonal antibody recognizing human colorectal carcinoma cells from baculovirus expression system. *J Immunol Meth* 1992; **151**: 201-208.
- [30] PANTEL K, COTE RJ, FODSTAND O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst* 1999; **91**: 1113-1124.
- [31] QIU J-P, LUO P, WASMUND K, STEPLEWSKI Z, KIEBER-EMMONS T. Towards the development of peptide mimotopes of carbohydrate antigens as cancer vaccines. *Hybridoma* 1999; **18**: 102-112.
- [32] RIETHMULLER G, HOLZ E, SCHLIMOK G, SCHMIEGEL W, RAAB R, HOFFKEN K, GRUBER R, FUNKE I, PICHLMAIER H, HIRCHE H, BUGGISCH P, WITTE J, PICHMAYR R. Monoclonal antibody therapy for resected Dukes C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol* 1988; **16**: 1788-1794.
- [33] RODECK U, HERLYN M, HERLYN D, MOLTHOFF C, ATKINSON B, VARELLO M, STEPLEWSKI Z, KOPROWSKI H. Tumor growth modulation by a monoclonal antibody to the Epidermal Growth Factor receptor: Immunologically mediated and effector cell independent effects. *Cancer Res* 1987; **47**: 3692-3696.
- [34] SCHOLZ D, LUBECK M, LOIBNER H, MCDONALD-SMITH J, KIMOTO Y, KOPROWSKI H, STEPLEWSKI Z. Biological activity in the human system of isotype switch variants of oligosaccharide Y specific murine MAbs. *Cancer Immunol Immunother* 1991; **33**: 153-157.
- [35] SEARS HF, ATKINSON B, MATTIS J, ERNST C, HERLYN D, STEPLEWSKI Z, HAYRY P, KOPROWSKI H. Phase-I clinical trial of monoclonal antibody treatment of gastrointestinal tumour. *Lancet* 1982; **1**: 762-765.
- [36] SEARS HF, HERLYN M, STEPLEWSKI Z, GROTZINGER P, KOPROWSKI H. Ex-vivo perfusion of human colon with monoclonal colorectal cancer antibodies. *Cancer* 1982; **49**: 1231-1235
- [37] SEARS HF, HERLYN D, STEPLEWSKI Z, KOPROWSKI H. Effects of monoclonal antibody immunotherapy on patients with gastrointestinal adenocarcinoma. *J Biol Resp Mod* 1984; **3**: 138-150.
- [38] SEARS HF, HERLYN D, STEPLEWSKI Z, KOPROWSKI H. Phase II clinical trial of a murine monoclonal antibody cytotoxic for gastrointestinal adenocarcinoma. *Cancer Res* 1985; **45**: 5910-5913.
- [39] STEPLEWSKI Z. Monoclonal antibodies to human tumor antigens. *Transplant. Proc* 1980; **12**: 384-387
- [40] STEPLEWSKI Z, BLASZCZYK-THURIN M, LUBECK M, LOIBNER H, SCHOLZ D, KOPROWSKI H. Oligosaccharide Y specific monoclonal antibody and its isotype switch variants. *Hybridoma* 1990; **9**: 201-210
- [41] STEPLEWSKI Z, SEARS HF, KOPROWSKI H. Monoclonal antibody infusion in gastrointestinal cancer patients. *Recent Results in Cancer Res* 1986; **100**: 321-323.
- [42] SZALA S, FROEHLICH M, SCOLLON M, KASAI Y, STEPLEWSKI Z, KOPROWSKI H, LINNENBACH A. Molecular cloning of cDNA for the carcinoma-associated antigen GA73-3. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 3542-3546.
- [43] WALLACK MK, STEPLEWSKI Z, KOPROWSKI H, ROSATO E, GEORGE J, HULIHAN D, JOHNSON J. A new approach in specific active immunotherapy. *Cancer* 1977; **39**: 560-564.
- [44] VERCH T, HOOPER DC, KIYATKIN A, STEPLEWSKI Z, KOPROWSKI H. Immunization with a plant-produced colorectal cancer antigen. *Cancer Immunol Immunother* 2004; **53**: 92-99.

Zenon Steplewski
Biotechnology Foundation Laboratories
Thomas Jefferson University
1020 Locust Street
Jefferson Alumni Hall Room # 471
Philadelphia PA 19107, USA
E-mail: _zsteplewski@msn.com

1910
1911
1912
1913
1914
1915
1916
1917
1918
1919
1920
1921
1922
1923
1924
1925
1926
1927
1928
1929
1930
1931
1932
1933
1934
1935
1936
1937
1938
1939
1940
1941
1942
1943
1944
1945
1946
1947
1948
1949
1950
1951
1952
1953
1954
1955
1956
1957
1958
1959
1960
1961
1962
1963
1964
1965
1966
1967
1968
1969
1970
1971
1972
1973
1974
1975
1976
1977
1978
1979
1980
1981
1982
1983
1984
1985
1986
1987
1988
1989
1990
1991
1992
1993
1994
1995
1996
1997
1998
1999
2000
2001
2002
2003
2004
2005
2006
2007
2008
2009
2010
2011
2012
2013
2014
2015
2016
2017
2018
2019
2020
2021
2022
2023
2024
2025

KAWEOLINA, KAWEOLE I TRANSFORMACJA NOWOTWOROWA

CAVEOLIN, CAVEOLAE AND NEOPLASTIC TRANSFORMATION

Wanda Małgorzata KRAJEWSKA, Izabela MASŁOWSKA

Katedra Cytobiochemii, Uniwersytet Łódzki, Łódź

Streszczenie: Białka należące do rodziny kaweolin są głównymi składnikami mikrodomen błon komórkowych zwanych kaweolami. Wyniki szeregu badań sugerują, że kaweolina-1 hamuje transformację nowotworową. Obniżenie lub brak ekspresji kaweoliny-1 wydaje się odgrywać istotną rolę w przekształceniu komórki prawidłowej w nowotworową. Niemniej jednak nabywaniu przez komórki nowotworowe fenotypu złośliwego wydaje się towarzyszyć wzrost poziomu kaweoliny-1. Pozwala to przypuszczać, że zaburzenia ekspresji kaweoliny-1 zaangażowane są zarówno w tworzenie guza, jak i progresję nowotworu.

Słowa kluczowe: kaweolina, kaweole, transdukcja sygnału, transformacja nowotworowa, progresja i przerzutowanie

Summary: Caveolin family proteins are major component of plasma membrane microdomains called caveolae. Several lines of evidence suggest that caveolin-1 belongs to tumour suppressors. Thus down-regulation of caveolin-1 expression may be critical for neoplastic transformation. Paradoxically elevated level of caveolin-1 appears to be associated with malignant phenotype. These apparently contradictory results may reflect the relative importance of caveolin-1 in primary tumour formation and progression of the disease.

Key words: caveolin, caveolae, signal transduction, neoplastic transformation, progression and metastasis

1. WSTĘP

Kaweole, mikrodomeny błony komórkowej reprezentujące nieopłaszczone klatryną wpuklenia (zagłębienia) do wnętrza komórki o średnicy 50–100 nm, zidentyfikowano w większości typów komórek. Ich obecność wydaje się być typowa szczególnie dla ostatecznie zróżnicowanych komórek nabłonka, śródbłonka, mięśni, fibroblastów czy adipocytów. Kaweole charakteryzują się wysoką zawartością cholesterolu i sfingo-

lipidów. Cechą pozwalającą na odróżnienie kaweoli od mikrodomen błony komórkowej określanych jako tratwy lipidowe (ang. *lipid rafts*) jest obecność w nich kaweoliny. Jest to białko o masie cząsteczkowej 18–24 kDa, w którego strukturze wyodrębnia się hydrofobową domenę centralną oddziałującą z błoną komórkową oraz hydrofilowe domeny N- i C-terminalne zlokalizowane w cytoplazmie.

U ssaków zidentyfikowano trzy geny kodujące odpowiednio kaweolinę-1, -2 i -3. Zarówno kaweolina-1, jak i kaweolina-2 występują jako izoformy α i β będące wynikiem alternatywnego miejsca inicjacji transkrypcji bądź translacji. W większości komórek ma miejsce koekspresja kaweoliny-1 i kaweoliny-2, natomiast kaweolina-3 wydaje się być typowa dla komórek mięśni. Tworzenie kaweoli warunkuje ekspresja kaweoliny-1 lub kaweoliny-3, podczas gdy kaweolina-2 uznawana jest za białko pomocnicze kaweoliny-1. Kaweoliny tworzą homo- i heterooligomery o masie cząsteczkowej 200–600 kDa opłaszczające kaweole.

Kaweolina obok funkcji strukturalnej wydaje się być zaangażowana w modulację sygnalizacji komórkowej. Wykazano, że kaweolina oddziałuje i reguluje aktywność szeregu białek uczestniczących w przekazywaniu sygnału. Należą do nich między innymi receptory czynników wzrostu, receptory hormonów sterydowych, receptory oddziałujące z białkami G, integryny, kinazy Src, Fyn, Yes, FAK, białka G, białka Ras, kinazy białkowe typu A i C, syntazy tlenu azotu. Regionem kaweoliny-1 wchodzącym w bezpośrednią interakcję z tymi białkami jest domena CSD (ang. *caveolin scaffolding domain*) obejmująca aminokwasy 82–101, a motywem wiążącym się z kaweoliną zidentyfikowanym w większości białek zasocjowanych z kaweolami jest sekwencja

(F/Y/W)X(F/Y/W)XXXX(F/Y/W), (F/Y/W)XXXX(F/Y/W)XX(F/Y/W)

lub

(F/Y/W)X(F/Y/W)XXXX(F/Y/W)XX(F/Y/W).

Kaweole obok udziału w kompartmentalizacji i regulacji kompleksów sygnałowych uczestniczą w szeregu procesach biologicznych, w tym w niezależnej od klatryny endocytozie, potocytozie, transcytozie i homeostazie cholesterolu, a także oporności wielolekowej, inwazji bakterii, wirusów i prionów. Funkcja kaweoli wydaje się zależeć od typu komórki i jej stanu fizjologicznego [13, 39, 52, 59, 78].

2. KAWEOLINA I HAMOWANIE TRANSFORMACJI NOWOTWOROWEJ

Geny dla kaweoliny-1 i kaweoliny-2 zlokalizowane są w dłuższym ramieniu chromosomu 7, w regionie q31.1, którego delecje mają miejsce w przypadku różnych nowotworów [18]. Analiza utraty heterozygotyczności (LOH) sugeruje, że region 7q31.1 odgrywa ważną rolę w patogenezie między innymi nowotworów sutka, jajników, prostaty, jelita grubego czy trzustki, a zlokalizowany w tym regionie gen/geny ma charakter genu supresorowego należącego do jednego z najczęściej inaktywowanych podczas transformacji nowotworowej (tab. 1).

Sugestię tę potwierdzają wyniki badań ekspresji kaweoliny na poziomie mRNA i białka. Obniżenie lub brak ekspresji kaweoliny-1 obserwuje się zarówno w liniach komórek nowotworowych, jak i nowotworach pierwotnych [47, 63]. Dalsze badania wykazały, że obniżenie ekspresji kaweoliny jest cechą fenotypu nowotworowego zarówno raków, jak i mięsaków [2, 3, 4, 85, 86]. W przypadku pęcherzykowego raka tarczycy zidentyfikowano obniżenie ekspresji kaweoliny-1 i kaweoliny-2 na poziomie mRNA w 79%

badanych przypadków, a obniżenie ekspresji kaweoliny-1 na poziomie białka w 84% badanych przypadków [2]. Wysoka częstość tego zdarzenia wydaje się być zjawiskiem powszechnym. W nowotworach jelita grubego stwierdzono średnio około 4-krotne obniżenie ekspresji kaweoliny-1 na poziomie mRNA i białka w 70% badanych przypadków [4]. Indukcja transformacji nowotworowej w komórkach NIH3T3 poprzez aktywację takich onkogenów, jak: *H-Ras (G12V)*, *Abl (v-Abl, Bcr-Abl)*, *c-Neu*, *c-Myc*, *v-Src*, *v-Raf*, prowadzi również do obniżenia lub braku ekspresji mRNA i białka kaweoliny-1, a także zaniku kaweoli [17, 38, 60, 69]. Interesujący wydaje się fakt, że indukcja transformacji nowotworowej nie powoduje zmian w poziomie ekspresji kaweoliny-2. Podobnie obniżenie ekspresji kaweoliny-1 obserwowane w przypadku szeregu linii komórek nowotworowych, czy też wywołane przez strategię antysensów pozostaje bez wpływu na ekspresję kaweoliny-2 [17, 23]. Chociaż pozbawienie myszy genu kaweoliny-1 prowadzi do degradacji kaweoliny-2, to inaktywacja genu kaweoliny-2 wykazuje niewielki lub brak wpływu na ekspresję kaweoliny-1 i formowanie kaweoli [67, 68]. Sugeruje to zróżnicowaną funkcję kaweoliny-1 i kaweoliny-2 w komórkach w warunkach zarówno fizjologicznych, jak i patologicznych.

Fenotypowo obniżenie lub brak ekspresji kaweoliny-1 manifestuje się zwiększeniem aktywności proliferacyjnej komórek, a zjawisko to nie wydaje się być ograniczone do komórek nowotworowych. W przypadku łuszczyca w nadmiernie proliferującym naskórku, a głównie w komórkach warstwy podskórnej naskórka stwierdzono również obniżenie/brak ekspresji kaweoliny-1 [8]. Zaangażowanie kaweoliny-1 w negatywną regulację proliferacji potwierdzono w eksperymentach wykorzystujących komórki czy zwierzęta z wyłączonym genem tego białka [9, 46, 67]. U myszy pozbawionych genu kaweoliny-1 obserwuje się hiperplazję gruczołu mlekowego i komórek naskórka, a jak wykazano w przypadku fibroblastów embrionów myszy zwiększona zdolność do proliferacji ulega rewersji w wyniku ekspresji zrekombinowanego cDNA kaweoliny-1. Pozbawienie myszy genu kaweoliny-1 prowadzi nie tylko do hiperplazji komórek naskórka i braku kaweoli, ale również zwiększa kilkanaście/kilkadziesiąt razy wrażliwość na indukowaną DMBA (7,12-dimetylobenzantracen) karcynogenezę skóry [9].

TABELA 1. Utrata heterozygotyczności (LOH) w regionie genów kaweoliny-1 i kaweoliny-2

Linia komórek nowotworowych/ Nowotwór pierwotny	7q31.1/D7S522	Piśmiennictwo
Głowa i szyja	16–53%	[54, 80, 93]
Jajnik	31–78%	[35, 37, 94]
Jelito grube	~ 80%	[93]
Nerka	~ 24%	[72]
Prostata	30–83%	[33, 92]
Sutek	~ 83%	[91]
Tarczycza	~ 35%	[2]
Trzustka	~ 80%	[1]

Supresja transformacji nowotworowej przez kaweolinę-1 wydaje się być wynikiem hamowania szlaków sygnalizacyjnych uruchamianych przez mitogeny. Wykazano, że kaweolina-1 wchodzi w interakcję i negatywnie reguluje liczne białka promujące kaskady sygnalizacyjne prowadzące do proliferacji. Należą do nich między innymi receptorowe kinazy tyrozynowe, np. receptory dla czynnika wzrostu naskórka EGFR (ErbB1) i Neu (ErbB2), receptorowe kinazy serynowo-treoninowe, np. receptor typu pierwszego dla TGF β (ang. *tumour growth factor* β), niereceptorowe kinazy tyrozynowe, np. rodziny Src i FAK (ang. *focal adhesion kinase*), kinazy aktywowane przez sygnały zewnątrzkomórkowe, np. MAPK (ang. *mitogen activated protein kinase*) typu ERK (ang. *extracellular signal regulated kinase*) czy białka G, H-Ras, Raf, Grb7 [6, 9, 15, 17, 24, 40, 49, 51, 67].

Obniżenie ekspresji kaweoliny-1 okazało się wystarczające dla indukcji transformacji nowotworowej i konstytutywnej aktywacji kaskady sygnalizacyjnej kinazy p42/44 (ERK1/ERK2) MAP [23, 28, 61, 79]. Z kolei wprowadzenie zrekombinowanego genu kaweoliny-1 do stransformowanych komórek NIH3T3 jest wystarczające do zahamowania transdukcji sygnału *via* receptor Neu [15, 17, 22]. Efektem zablokowania ekspresji kaweoliny-1 w komórkach NIH3T3 techniką antysensów jest rozrost komórek w wyniku utraty inhibicji kontaktu oraz tworzenie guza. Proces ten jest całkowicie hamowany po przywróceniu prawidłowego poziomu kaweoliny. Wykazano, że wprowadzenie kaweoliny-1 do komórek nowotworowych sutka T47D zmniejsza około 2-krotnie tempo proliferacji i około 15-krotnie zdolność do tworzenia kolonii [47]. Podobnie indukcja ekspresji kaweoliny-1 hamuje proliferację i zmniejsza zdolność do tworzenia guza w przypadku komórek nowotworowych jajnika (IGROV1) i jelita grubego (HT29, DLD1), sugerując co najmniej częściową regresję fenotypu nowotworowego [3, 4]. Ekspresja kaweoliny-1 w komórkach nowotworowych sutka MCF-7 i MTLn3 hamuje nie tylko stymulowany EGF (ang. *epidermal growth factor*) wzrost, ale także wydłużanie lamellipodii i zdolności do migracji jak również aktywację kinaz ERK1/2 [22, 95]. Pozbawiając genu kaweoliny-1 transgeniczne myszy MMTV-PyMT stanowiące model do badania transformacji nowotworowej gruczołu mleko-wego stwierdzono, że całkowity brak ekspresji kaweoliny-1 w zasadniczy sposób przyspiesza tworzenie się ognisk dysplastycznych gruczołu *in vivo* potwierdzając tym samym hipotezę o roli kaweoliny-1 we wczesnych etapach transformacji nowotworowej [87].

Sugestię o udziale kaweoliny-1 w negatywnej modulacji proliferacji może potwierdzać jej niski poziom w komórkach nowotworowych, a wysoki w komórkach ostatecznie zróżnicowanych. Wzrost ekspresji kaweoliny-1 wydaje się być odpowiedzialny za zmniejszanie i ostatecznie brak odpowiedzi na sygnały mitogenne także starzejących się komórek. Obniżenie poziomu kaweoliny-1 w starzejących się diploidalnych fibroblastach za pomocą antysensów i małych interferujących RNA (siRNA) przywraca wrażliwość komórek na czynniki wzrostu i w konsekwencji uruchomienie cyklu komórkowego [11, 61].

Regulatorową rolę kaweoliny-1 w odpowiedzi komórek na sygnały mitogenne potwierdzają badania wykazujące supresję proliferacji i migracji indukowanej EGF po związaniu kaweoliny-1 z receptorem EGF (EGFR). Badania te sugerują udział kaweoliny-1 w inaktywacji EGFR i jej dysocjacji podczas aktywacji receptora. Fosforylacja

kaweoliny-1 indukowana EGF nie tylko powoduje dysocjację kompleksu z receptorem, ale też udział ufosforylowanej formy w rekrutacji składników szlaku sygnalizacyjnego kinaz p42/44 MAP [36, 45, 49, 81, 95].

Wyniki badań wskazują, że kaweolina-1 obok kaskady kinaz aktywowanych przez mitogeny może być zaangażowana w regulację sygnalizacji z udziałem β -kateniny. β -katenina uczestniczy w adhezji komórkowej poprzez wiązanie kadheryny E z cytoszkieletem, a zwłaszcza filamentami aktynowymi oraz w szlaku sygnalizacyjnym Wnt (ang. *wingless type*). Aktywacja tej kaskady prowadzi do akumulacji i translokacji do jądra komórkowego β -kateniny, która w kompleksie z czynnikami transkrypcyjnymi z rodziny Tcf/Lef-1 (ang. *T cell factor/lymphoid enhancer factor-1*) reguluje ekspresję określonych genów. Wykazano, że indukcja ekspresji kaweoliny-1 hamuje aktywację szlaku Wnt/ β -katenina/Lef-1 powodując gromadzenie się β -kateniny w kaweolach. Pozwala to sugerować, że kaweolina-1 uczestniczy w szlaku Wnt poprzez regulację wewnątrzkomórkowej lokalizacji β -kateniny [25, 31]. Zmniejszenie lub brak ekspresji kaweoliny-1 może promować transformację nowotworową poprzez uruchomienie sygnalizacji komórkowej z udziałem β -kateniny.

Regulacja adhezji komórkowej i oddziaływań komórek z macierzą zewnątrzkomórkową w wyniku modulacji szlaków sygnalizacyjnych prowadzących do proliferacji, różnicowania czy migracji komórek wydaje się być krytyczna dla fenotypu nowotworowego. Białkami oddziałującymi z kaweoliną-1 okazały się również integryny uczestniczące w oddziaływaniach komórkowych, adhezji komórek, ukierunkowanej migracji komórek, a także pośredniczące w przekazie informacji z macierzy zewnątrzkomórkowej do komórki oraz z wnętrza komórki na zewnątrz. Wykazano, że kaweolina-1 odgrywa kluczową rolę w wiązaniu i aktywacji kinazy Fyn, należącej do niereceptorowych kinaz tyrozynowych z rodziny Src, z podjednostką α integryn, a w konsekwencji fosforylacji cytoplazmatycznego białka adaptorowego Shc (ang. *Src homology/collagen*) i aktywacji szlaku Ras-MAPK. Obniżenie poziomu kaweoliny strategią antysensów powoduje odłączenie kinaz z rodziny Src od integryn typu $\beta 1$, czego efektem jest brak indukowanej ligandem aktywacji/fosforylacji kinazy FAK i adhezji komórkowej [10,82–84].

Supresorowa funkcja kaweoliny-1 może również wynikać z udziału w represji genu cykliny D1. Stwierdzono, że poziom ekspresji kaweoliny-1 jest odwrotnie proporcjonalny do poziomu cykliny D1, a transkrypcja genu cykliny D1 jest hamowana przez kaweolinę-1 w drodze zależnej od wzmacniającej sekwencji regulatorowej wiążącej czynnik transkrypcyjny Tcf/Lef-1. Mutacje w obrębie tej sekwencji uniemożliwiają wiązanie się białek Tcf/Lef-1 znoszą efekt hamujący kaweoliny-1. Obniżeniu poziomu kaweoliny-1 towarzyszy wzrost poziomu cykliny D1, która w kompleksie z kinazami zależnymi od cyklin CDK4/6 fosforyluje i inaktywuje białko Rb i w konsekwencji promuje fazę S cyklu komórkowego [31, 87]. Wykazano, że ekspresja kaweoliny-1 jest regulowana w cyklu komórkowym [26]. W fazie G_0/G_1 , ma miejsce wzrost, a w fazie S spadek ekspresji kaweoliny-1. Ekspresja zrekombinowanego genu kaweoliny-1 i kaweoliny-3 prowadzi do zatrzymania komórek w fazie G_0/G_1 w drodze zależnej od białek p53/p21. Obniżenie lub brak ekspresji kaweoliny-1 w znaczący sposób zmniejsza liczbę komórek w fazie

G_0/G_1 . Jednocześnie wydaje się, że obniżenie ekspresji kaweoliny-1 hamuje apoptozę [15]. Wyniki badań apoptozy indukowanej staurosporyną w fibroblastach NIH3T3 i komórkach nowotworowych pęcherza moczowego T24 sugerują, że kaweolina-1 pełni funkcję proapoptotyczną poprzez hamowanie kinazy PI3 (fosfatydyloinozytolo-3-kinazy) [50]. Również Zundel i wsp. [96] wykazali, że ekspresja kaweoliny-1 hamuje aktywność kinazy PI3 i pełni funkcję proapoptotyczną w szlaku indukowanym ceramidami. Udział kaweoliny-1 w apoptozie wydaje się być jednak bardziej złożony. Timme i wsp. [77] stwierdzili, że kaweolina-1 hamuje apoptozę indukowaną *c-myc* w komórkach nowotworowych prostaty LNCaP. Także wyniki wskazujące, że kaweolina-1 hamuje apoptozę komórek nowotworowych sutka MCF-7 indukowaną utratą kontaktu z macierzą zewnątrzkomórkową (ang. *anoikis*) pozostają w zgodzie z sugestią o negatywnym wpływie kaweoliny-1 na śmierć komórki [22].

Złożoność mechanizmów odpowiedzialnych za transformację nowotworową, w których uczestniczy kaweolina-1, potwierdzają wyniki badań Hurlstone'a i wsp. [32]. Wykazali oni, że poziom ekspresji kaweoliny-1 nie koreluje z utratą heterozygotyczności w locus kaweoliny-1 w przypadku szeregu linii komórek nowotworowych. Zaobserwowali ponadto brak ekspresji *in vivo* kaweoliny-1 w prawidłowych komórkach nabłonkowych przewodów gruczołu mlekowego i pierwotnych rakach przewodowych sutka. Wysoką ekspresję kaweoliny-1 zidentyfikowali natomiast w komórkach nieepitelialnych sutka i nowotworach wywodzących się z tych komórek. Podobnie około 2-krotnie podwyższony poziom mRNA kaweoliny-1 i kaweoliny-2 Hu i wsp. [30] stwierdzili w liniach komórek nowotworowych i nowotworach pierwotnych przełyku.

3. KAWEOLINA I PROGRESJA NOWOTWORÓW

Na podstawie badań zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* stwierdzono, że nowotwory złośliwe i przerzuty do węzłów chłonnych między innymi prostaty, sutka i jelita grubego charakteryzują się wzrostem poziomu kaweoliny-1 [4, 21, 57, 74, 75, 88, 89]. Za pomocą przeciwciał przeciwko kaweolinie-1 Young i wsp. [89] zidentyfikowali obecność tego białka w 78–93% przypadków złośliwych nowotworów sutka. W nowotworach prostaty wykazano, że liczba pozytywnych przypadków wzrasta z 29% do 56% w komórkach przerzutujących. Podobnie stwierdzono, że poziom kaweoliny-1 rośnie wraz ze stopniem odróżnicowania nowotworów pęcherza moczowego, czy zdolnością do przerzutowania do regionalnych węzłów chłonnych nowotworów płuc [29, 64], co sugeruje, że podwyższony poziom kaweoliny może być związany z progresją nowotworów.

Sugestię tę potwierdzają obserwacje o ekspresji kaweoliny-1 w konstytutywnie zaktywowanych liniach komórek leukemicznych wywodzących się z limfocytów T, które w warunkach fizjologicznych nie wykazują ekspresji tego białka ani obecności kaweoli [27]. Wzrost ekspresji kaweoliny i liczby kaweoli stwierdza się również w przypadku nabywania oporności wielolekowej przez komórki nowotworowe [42–44]. Wzrost

ekspresji kaweoliny-1 na poziomie mRNA i białka zidentyfikowano w komórkach nowotworowych sutka MCF-7 AdrR opornych na adriamycynę, jelita grubego HT-29-MDR opornych na kolchicynę, jajnika SKVLB1 opornych na winblastynę czy płuc A549 opornych na taksol [41, 88]. W rosnących w obecności metotreksatu klonach komórek nowotworowych jelita grubego HT29, czy komórkach zdolnych do przerzutowania L_0V_0 ekspresja kaweoliny-1 okazała się znacznie wyższa niż w macierzystych komórkach HT29 czy L_0V_0 sugerując, że może to być cecha komórek nowotworowych o wyższym stopniu złośliwości [4]. Ekspresja kaweoliny-1 może więc promować klonalny rozrost komórek nowotworowych, które wyłamały się nie tylko spod mechanizmów regulujących proliferację, ale i różnicowanie, mechanizmów prowadzących do przekształcenia nowotworów nieinwazyjnych w nowotwory inwazyjne.

Wzrost ekspresji kaweoliny-1 w nowotworach prostaty wydaje się być odpowiedzialny nie tylko za przerzuty do węzłów chłonnych, ale także za pojawianie się niewrażliwości na androgeny. Obniżenie ekspresji kaweoliny-1 strategią antysensów w hormononiezależnych, inwazyjnych liniach komórek nowotworowych prostaty myszy prowadzi do ich przekształcenia w fenotyp zależny od androgenów [58, 75, 76]. Z drugiej strony zaobserwowano, że testosteron indukuje transkrypcję genu kaweoliny-1 poprzez mechanizm zależny od receptora androgenowego, a wzrost ekspresji kaweoliny-1 prowadzi do aktywacji receptora androgenowego w drodze zależnej od liganda. Aktywacja ta jest wynikiem bezpośredniego oddziaływania między N-terminalnym regionem kaweoliny-1 i domenami transaktywującą (N-terminalną) i wiążącą hormon (C-terminalną) receptora androgenowego [48, 53, 62]. Również w przypadku nowotworów sutka kaweolina-1 okazała się być pozytywnym regulatorem transdukcji sygnału przez receptor estrogenowy typu α ($ER\alpha$). Wykazano, że ekspresja kaweoliny-1 w zależnych od estrogenów komórkach linii MCF-7 powoduje niezależną od hormonu aktywację i translokację $ER\alpha$ do jądra komórkowego i w konsekwencji transkrypcję genów regulowanych przez sekwencje odpowiedzi na estrogeny (ERE) w drodze zależnej i niezależnej od liganda. Aktywacja $ER\alpha$ przez kaweolinę-1 jest wynikiem bezpośredniej interakcji między regionem obejmującym aminokwasy 82–101 (domena CSD) kaweoliny-1 i regionem obejmującym aminokwasy 1–282 $ER\alpha$. Efektem tej interakcji jest fosforylacja domeny AF-1 $ER\alpha$ w drodze niezależnej od kinaz ERK1/2 [70, 71]. Razandi i wsp. [65] stwierdzili ponadto, że kaweolina-1 zaangażowana jest w translokację $ER\alpha$ do błony komórkowej i jego lokalizację w kaweolach, gdzie receptor estrogenowy może uczestniczyć w modulacji sygnalizacji komórkowej, między innymi kinaz ERK przez estrogeny. Wykazano, że nadekspresja kaweoliny-1 hamuje aktywację ERK przez estradiol, a z kolei estradiol hamuje syntezę kaweoliny-1 i asocjację receptora, prowadząc do aktywacji ERK.

Ekspresja kaweoliny-1 wydaje się być nie tylko cechą charakterystyczną nowotworów złośliwych, ale może stanowić potencjalny marker progresji transformacji nowotworowej. Wyniki badań nowotworów przełyku i trzustki sugerują, że obecność kaweoliny-1 w nowotworach pierwotnych wskazuje na przerzuty do węzłów chłonnych i złe rokowania dla pacjentów [34, 73]. W przypadku nowotworów prostaty obserwacje te potwierdzają nie tylko wyniki badań immunohistochemicznych, ale zidentyfikowanie

obecności kaweoliny w surowicy pacjentów z inwazyjnymi nowotworami [74, 90]. Tahir i wsp. [74] sugerują, że kaweolina-1 jest autokrynnym/parakrynnym czynnikiem wydzielanym przez komórki inwazyjnych nowotworów prostaty stymulującym wzrost komórek wrażliwych na androgeny charakteryzujących się niskim poziomem kaweoliny-1 oraz stymulującym zdolność do przerzutowania komórek niewrażliwych na androgeny.

Udział kaweoliny w progresji nowotworów może zależeć jednak od typu komórek. Morgan i wsp. [56] w przypadku złośliwych guzów naczyniowych skóry stwierdzili obniżenie poziomu ekspresji kaweoliny-1. Z kolei Fine i wsp. [21], chociaż na podstawie badań immunohistochemicznych, zidentyfikowali wysoki poziom ekspresji kaweoliny-1 w gruczolakorakach jelita grubego w porównaniu z gruczolakami i prawidłową śluzówką tego narządu, charakteryzującymi się brakiem lub niskim poziomem kaweoliny-1, to jednak nie zaobserwowali istnienia korelacji pomiędzy ekspresją tego białka i stopniem zaawansowania nowotworu.

4. POTENCJALNE MECHANIZMY WARUNKUJĄCE UDZIAŁ KAWEOOLINY W FENOTYPIE NOWOTWOROWYM

Mutacje

Chociaż mutacje są jednym z podstawowych mechanizmów molekularnych transformacji nowotworowej, to Hurlstone i wsp. [32] na podstawie sekwencjonowania DNA wykazali brak mutacji w regionie kodującym genu kaweoliny-1 w komórkach wywodzących się z nowotworów różnych tkanek i organów, takich jak: pęcherz moczowy, szyjka macicy, sutek, jajnik, fibroblasty (A1698, A1698R, HeLa, MDA-MB-231, OVCAR5, SUSM-1). Podobnie Aldred i wsp. [2] nie stwierdzili występowania mutacji genu *CAV-1* w nowotworach tarczycy. Tym niemniej Hayashi i wsp. [28] i Lee i wsp. [46] sugerują, że mutacje genu kaweoliny-1 mogą odgrywać rolę w progresji nowotworów sutka. Hayashi i wsp. [28] zidentyfikowali mutację punktową P → L w kodonie 131 genu *CAV-1* w 16% (15/92) pierwotnych ludzkich nowotworów sutka. Nie stwierdzono występowania takiej mutacji w przypadku osób zdrowych, jak również w materiale pochodzącym z granicy czystości onkologicznej resekowanych nowotworów. Mutację zidentyfikowano głównie w inwazyjnych rakach sutka, takich jak: rak włóknisty. W celu określenia znaczenia mutacji P → L dla transformacji nowotworowej do komórek NIH3T3 wprowadzono zmutowaną lub dziką formę kaweoliny-1. Zaobserwowano, że ekspresja zmutowanej formy kaweoliny-1 indukuje transformację komórek NIH3T3 i aktywację szlaku sygnałowego kinaz MAP. Ponadto zmutowana kaweolina-1 wydaje się promować właściwości inwazyjne, wpływać na szkielet aktynowy komórki, jak również powodować retencję formy dzikiej kaweoliny w aparacie Golgiego [46]. Badania te sugerują, że mutacje genu kaweoliny-1 mogą w sposób dominujący negatywny uczestniczyć w transformacji nowotworowej i progresji. Analogiczną mutację zidentyfikowano w genie

kaweoliny-3 (P104L) pacjentów z autosomalnie dominującą formą kończynowo-obrzeczowej dystrofii mięśniowej (LGMD-1C) [55].

Metylacja DNA

Obecność wysp CpG w pierwszym i drugim eksonie genów kaweoliny-1 i kaweoliny-2 sugeruje, że jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za poziom ekspresji tych białek może być metylacja DNA, stanowiąca epigenetyczny mechanizm inaktywacji genów supresorowych. Engelman i wsp. [18] w badaniach *in vitro* wykazali metylację wysp CpG w regionie promotorowym genu *CAV-1* w przypadku dwóch linii ludzkich komórek nowotworowych sutka (MCF-7, T47D), w których nie stwierdzono ekspresji kaweoliny-1. W przeciwieństwie, w prawidłowych komórkach nabłonkowych sutka (NHMECs) nie obserwowano metylacji tych regionów. Podobne wyniki badań nowotworów prostaty i jajnika sugerują, że metylacja wysp CpG może być odpowiedzialna za obniżenie ekspresji kaweoliny-1 [14, 85]. Sugestii tej nie potwierdzają jednak Hurlstone i wsp. [32], którzy wykazali brak metylacji DNA zarówno w pierwotnych nowotworach jajnika, jak i różnych liniach komórek nowotworowych sutka, jajnika i trzustki (MCF-7, ZR-75, A2780, CH1, OVCAR3, OVCAR4, COLO357), w których ekspresja kaweoliny jest niska lub niewy-krywalna. Również w przypadku nowotworów tarczycy wykazano brak korelacji między metylacją promotora genu *CAV-1* i poziomem ekspresji [2]. Metylacja nie wydaje się być zatem głównym czy jedynym mechanizmem odpowiedzialnym za inaktywację transkrypcji i w konsekwencji obniżenie poziomu białka kaweoliny. Ponadto udział metylacji wysp CpG w regulacji ekspresji kaweoliny-1 może być różny w różnych tkankach. Wyniki badań z wykorzystaniem inhibitora metylacji DNA - 5-aza-2'-deoksycytydyny sugerują, że o ile w rakach jajnika metylacja może być jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za obniżenie ekspresji kaweoliny-1, to w przypadku mięsaków znaczenie tego mechanizmu wydaje się być marginalne [85, 86].

Regulacja ekspresji

W regulację ekspresji kaweoliny-1 wydają się być zaangażowane co najmniej dwa szlaki przekazywania sygnału w komórce. Jeden to szlak kinaz białkowych aktywowanych przez mitogeny: Ras-kinazy p42/44(ERK1/ERK2) MAP, a drugi to szlak kinazy białkowej A: PKA [19, 66]. Wyniki badań wskazują, że oba szlaki stanowią niezależne mechanizmy hamujące transkrypcję genu kaweoliny. Aktywacja PKA powoduje obniżenie ekspresji zarówno kaweoliny-1, jak i kaweoliny-2, podczas gdy aktywacja protoonkogenu *Ras* pozostaje bez wpływu na ekspresję kaweoliny-2. Z drugiej strony okazało się, że kaweolina-1 wywiera efekt hamujący na szereg składników kaskady MAPK i PKA. Pozwala to sugerować, że ekspresja kaweoliny-1 oraz kaskady MAPK i PKA podlegają wzajemnej negatywnej regulacji. Wykazano, że zahamowanie lub obniżenie ekspresji kaweoliny-1 techniką antysensów prowadzi do konstytutywnej aktywacji kinaz p42/44 MAP, natomiast ekspresja kaweoliny-1 w wyniku transdukcji zrekombinowanego genu kaweoliny-1 prowadzi do obniżenia aktywności kinaz p42/44 MAP [12, 16, 23]. Z kolei zahamowanie za pomocą inhibitora fosforylacji/aktywacji

kinazy białkowej MAPK (PD98059) w transformowanych onkogenem *Ras* lub *Raf* komórkach NIH3T3 prowadzi do reekspresji kaweoliny-1 [15, 19, 86]. Podobna wzajemna negatywna regulacja została zidentyfikowana *in vitro* i *in vivo* pomiędzy ekspresją kaweoliny-1 i zaktywowanym protoonkogenem *Neu (c-ErbB2)* należącym do rodziny *ErbB*, którego produkt białkowy o funkcji receptorowej kinazy tyrozynowej zaangażowany jest w przekazywanie sygnałów mitogennych [17].

Wyniki badań sugerują również, że produkt białkowy protoonkogenu *c-Myc* prowadzi do represji kaweoliny na poziomie transkrypcji [60]. Jakkolwiek działanie białka *Myc* ma charakter plejotropowy, to przypuszcza się, że jego funkcja jako represora jest krytyczna dla transformacji nowotworowej.

Innym mechanizmem regulacji transkrypcji genu kaweoliny-1 może być także regulacja przez białko SREBP-1 (ang. *SRE-binding protein 1*) wiążące się z sekwencją SRE-like (ang. *sterol regulatory element*), zidentyfikowaną w regionie promotorowym genu kaweoliny-1 w pozycji -395 par zasad. Wykazano, że białko SREBP w przeciwieństwie do efektu stymulującego w przypadku genów zaangażowanych w homeostazę cholesterolu hamuje transkrypcję genu kaweoliny [5, 20].

5. UWAGI KOŃCOWE

Wyniki badań sugerują, że kaweolina może być zaangażowana w mechanizmy odpowiedzialne za fenotyp nowotworowy, odgrywając podwójną rolę jako supresor transformacji nowotworowej i jako promotor metastazy. Obniżenie ekspresji kaweoliny obserwowane podczas transformacji nowotworowej nie wydaje się być procesem nieodwracalnym, skoro nabyciu zdolności do przerzutowania czy oporności wielolekowej towarzyszy reekspresja tego białka. Funkcja kaweoliny może być zróżnicowana nie tylko w zależności od poziomu zaawansowania procesu nowotworowego, ale także od typu komórki czy tkanki. Zaburzenie ekspresji kaweoliny zidentyfikowane tak w nowotworach, jak i w innych chorobach, w tym neurodegeneracyjnych czy dystrofiach mięśniowych, wskazują na nowe, potencjalne możliwości w terapii tych patologii [7].

Podziękowanie

Autorzy składają serdeczne podziękowanie Panu mgr Janowi Gierakowi za edycję komputerową pracy.

LITERATURA

- [1] ACHILLE A, BIASI MO, ZAMBONI G, BOGINA G, MAGALINI AR, PEDERZOLI P, PERUCHO M, SCARPA A. Chromosome 7q allelic losses in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 1996; **56**: 3808–3813.
- [2] ALDRED MA, GINN-PEASE ME, MORRISON CD, POPKIE AP, GIMM O, HOANG--VU C, KRAUSE U, DRALLE H, JHIANG SM, PLASS C, ENG C. *Caveolin-1* and *Caveolin-2*, together with three bone morphogenetic protein-related genes, may encode novel tumor suppressors down-regulated in sporadic follicular thyroid carcinogenesis. *Cancer Res* 2003; **63**: 2864–2871.
- [3] BAGNOLI M, TOMASSETTI A, FIGINI M, FLATI S, DOLO V, CANEVARI S, MIOTTI S. Downmodulation of caveolin-1 expression in human ovarian carcinoma is directly related to α -fotale receptor overexpression. *Oncogene* 2000; **19**: 4754–4763.

- [4] BENDER FC, REYMOND MA, BRON C, QUEST AFG. Caveolin-1 levels are down-regulated in human colon tumors, and ectopic expression of caveolin-1 in colon carcinoma cell lines reduces cell tumorigenicity. *Cancer Res* 2000; **60**: 5870–5878.
- [5] BIST A, FIELDING PE, FIELDING CJ. Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 10693–10698.
- [6] CAMPBELL L, HOLLINS AJ, AL-EID A, NEWMAN GR, VON RUHLAND C, GUMBLETON M. Caveolin-1 expression and caveolae biogenesis during cell transdifferentiation in lung alveolar epithelial primary cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **262**: 744–751.
- [7] CAMPBELL L, GUMBLETON M, RITCHIE K. Caveolae and the caveolins in human disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; **49**: 325–335.
- [8] CAMPBELL L, LAIDLER P, WATSON REB, KIRBY B, GRIFFITHS CEM, GUMBLETON M. Downregulation and altered spatial pattern of caveolin-1 in chronic plaque psoriasis. *Brit J Dermatol* 2002; **147**: 701–709.
- [9] CAPOZZA F, WILLIAMS TM, SCHUBERT W, MCCLAIN S, BOUZAHZAH B, SOTGIA F, LISANTI MP. Absence of caveolin-1 sensitizes mouse skin to carcinogen-induced epidermal hyperplasia and tumor formation. *Am J Pathol* 2003; **162**: 2029–2039.
- [10] CHAPMAN HA, WEI Y, SIMON DI, WALTZ DA. Role of urokinase receptor and caveolin in regulation of integrin signaling. *Thromb Haemost* 1999; **82**: 291–297.
- [11] CHO KA, RYU SJ, PARK JS, JANG IS, AHN JS, KIM KT, PARK SC. Senescent phenotype can be reversed by reduction of caveolin status. *J Biol Chem* 2003; **278**: 27789–27795.
- [12] COHEN AW, PARK DS, WOODMAN SE, WILLIAMS TM, CHANDRA M, SHIRANI J, DE SOUZA AP, KITSIS RN, RUSSELL RG, WEISS LM, TANG B, JELICKS LA, FACTOR SM, SHTUTIN V, TANOWITZ HB, LISANTI MP. Caveolin-1 null mice develop cardiac hyperthrophy with hyperactivation of p42/44 MAP kinase in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; **284**: C457–C474.
- [13] COUET J, BELANGER MM, ROUSSEL E, DROLET M-C. Cell biology of caveolae and caveolin. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; **49**: 223–235.
- [14] CUI J, ROHR R, SWANSON G, SPEIGHTS VO, MAXWELL T, BROTHMAN AR. Hypermethylation of the Caveolin-1 gene promoter in prostate cancer. *Prostate* 2001; **46**: 249–256.
- [15] ENGELMAN JA, WYKOFF CC, YASUHARA S, SONG KS, OKAMOTO T, LISANTI MP. Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth. *J Biol Chem* 1997; **272**: 16374–16381.
- [16] ENGELMAN JA, CHU C, LIN A, JO H, IKEZU T, OKAMOTO T, KOHTZ DS, LISANTI MP. Caveolin-mediated regulation of signaling along the p42/44 MAP kinase cascade in vivo. A role for the caveolin-scaffolding domain. *FEBS Lett* 1998; **428**: 205–211.
- [17] ENGELMAN JA, LEE RJ, KARNEZIS A, BEARSS DJ, WEBSTER M, SIEGEL P, MULLER WJ, WINDLE JJ, PESTELL RG, LISANTI MP. Reciprocal regulation of neu tyrosine kinase activity and caveolin-1 protein expression *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* 1998; **273**: 20448–20455.
- [18] ENGELMAN JA, ZHANG XL, LISANTI MP. Sequence and detailed organization of the human caveolin-1 and -2 genes located near the D7S522 locus (7q31.1). *FEBS Lett* 1999; **448**: 221–230.
- [19] ENGELMAN JA, ZHANG XL, RAZANI B, PESTELL RG, LISANTI MP. p42/44 MAP kinase-dependent and -independent signaling pathways regulate caveolin-1 gene expression. *J Biol Chem* 1999; **274**: 32333–32341.
- [20] FIELDING CJ, FIELDING PE. Caveolae and intracellular trafficking of cholesterol. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; **49**: 251–264.
- [21] FINE SW, LISANTI MP, GALBIATI F, LI M. Elevated expression of caveolin-1 in adenocarcinoma of the colon. *Am J Clin Pathol* 2001; **115**: 719–724.
- [22] FIUCCI G, RAVID D, REICH R, LISCOVITCH M. Caveolin-1 inhibits anchorage-independent growth, anoikis and invasiveness in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncogene* 2002; **21**: 2365–2375.
- [23] GALBIATI F, VOLONTÉ D, ENGELMAN JA, WATANABE G, BURK R, PESTELL RG, LISANTI MP. Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade. *EMBO J* 1998; **17**: 6633–6648.
- [24] GALBIATI F, VOLONTÉ D, ENGELMAN JA, SCHERER PE, LISANTI MP. Targeted down-regulation of caveolin-3 is sufficient to inhibit myotube formation in differentiating C2C12 myoblasts. *J Biol Chem* 1999; **274**: 30315–30321.

- [25] GALBIATI F, VOLONTÉ D, BROWN AMC, WEINSTEIN DE, BEN-ZE'EV A, PESTELL RG, LISANTI MP. Caveolin-1 expression inhibits Wnt/ β -Catenin/Lef-1 signaling by recruiting β -catenin to caveolae membrane domains. *J Biol Chem* 2000; **275**: 23368–23377.
- [26] GALBIATI F, VOLONTÉ D, LIU J, CAPOZZA F, FRANK PG, ZHU L, PESTELL RG, LISANTI MP. Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G_0/G_1 arrest via a p53/p21^{WAF1/Cip1}-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 2001; **12**: 2229–2244.
- [27] HATANAKA M, MAEDA T, IKEMOTO T, MORI H, SEYA T, SHIMIZU A. Expression of caveolin-1 in human T cell leukemia cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **253**: 382–387.
- [28] HAYASHI K, MATSUDA S, MACHIDA K, YAMAMOTO T, FUKUDA Y, NIMURA Y, HAYAKAWA T, HAMAGUCHI M. Invasion activating caveolin-1 mutation in human scirrhous breast cancers. *Cancer Res* 2001; **61**: 2361–2364.
- [29] HO C-C, HUANG P-H, HUANG H-Y, CHEN Y-H, YANG P-C, HSU S-M. Up-regulated caveolin-1 accentuates the metastasis capability of lung adenocarcinoma by inducing filopodia formation. *Am J Pathol* 2002; **161**: 1647–1656.
- [30] HU YC, LAM KY, LAW S, WONG J, SRIVASTAVA G. Profiling of differentially expressed cancer-related genes in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) using human cancer cDNA arrays: Overexpression of oncogene *MET* correlates with tumor differentiation in ESCC. *Clin Cancer Res* 2001; **7**: 3519–3525.
- [31] HULIT J, BASH T, FU M, GALBIATI F, ALBANESE C, SAGE DR, SCHLEGEL A, ZHURINSKY J, SHTUTMAN M, BEN-ZE'EV A, LISANTI MP, PESTELL RG. The cyclin D1 gene is transcriptionally repressed by caveolin-1. *J Biol Chem* 2000; **275**: 21203–21209.
- [32] HURLSTONE AFL, REID G, REEVES JR, FRASER J, STRATHDEE G, RAHILLY M, PARKINSON EK, BLACK DM. Analysis of the *CAVEOLIN-1* gene at human chromosome 7q31.1 in primary tumours and tumour-derived cell lines. *Oncogene* 1999; **18**: 1881–1890.
- [33] JENKINS R, TAKAHASHI S, DELACEY K, BERGSTRALH E, LIEBER M. Prognostic significance of allelic imbalance of chromosome arms 7q, 8p, 16q, and 18q in stage T3N0M0 prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; **21**: 131–143.
- [34] KATO K, HIDA Y, MIYAMOTO M, HASHIDA H, SHINOHARA T, ITOH T, OKUSHIBA S, KONDO S, KATO H. Overexpression of caveolin-1 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis and pathologic stage. *Cancer* 2002; **94**: 929–933.
- [35] KERR J, LEARY JA, HURST T, SHIH YC, ANTALIS TM, FRIEDLANDER M, CRAWFORD E, KHOO SK, WARD B, CHENEVIX-TRENCH G. Allelic loss on chromosome 7q in ovarian adenocarcinomas: two critical regions and a rearrangement of the *PLANH1* locus. *Oncogene* 1996; **13**: 1815–1818.
- [36] KIM Y-N, WIEPZ GJ, GUADARRAMA AG, BERTICS PJ. Epidermal growth factor--stimulated tyrosine phosphorylation of caveolin-1. *J Biol Chem* 2000; **275**: 7481–7491.
- [37] KOIKE M, TAKEUCHI S, YOKOTA J, PARK S, HATTA Y, MILLER CW, TSURUOKA N, KOEFFLER HP. Frequent loss of heterozygosity in the region of the D7S523 locus in advanced ovarian cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; **19**: 1–5.
- [38] KOLESKE AJ, BALTIMORE D, LISANTI MP. Reduction of caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 1381–1385.
- [39] KRAJEWSKA WM, MASŁOWSKA I. Caveolins: structure and function in signal transduction. *Cell Mol Biol Lett* 2004; **9**: w druku.
- [40] LABRECQUE L, ROYAL I, SURPRENANT DS, PATTERSON C, GINGRAS D, BÉLIVEAU R. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 activity by caveolin-1 and plasma membrane cholesterol. *Mol Biol Cell* 2003; **14**: 334–347.
- [41] LAVIE Y, FIUCCI G, LISCOVITCH M. Up-regulation of caveolae and caveolar constituents in multidrug-resistant cancer cells. *J Biol Chem* 1998; **273**: 32380–32383.
- [42] LAVIE Y, FIUCCI G, CZARNY M, LISCOVITCH M. Changes in membrane micro-domains and caveolae constituents in multidrug-resistant cancer cells. *Lipids* 1999 (Suppl); **34**: S57–S63.
- [43] LAVIE Y, LISCOVITCH M. Changes in lipid and protein constituents of rafts and caveolae in multidrug resistant cancer cells and their functional consequences. *Glycoconj J* 2000; **17**: 253–259.
- [44] LAVIE Y, FIUCCI G, LISCOVITCH M. Upregulation of caveolin in multidrug resistant cancer cells: functional implications. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; **49**: 317–323.
- [45] LEE H, VOLONTE' D, GALBIATI F, IYENGAR P, LUBLIN DM, BREGMAN DB, WILSON MT, CAMPOS-GONZALEZ R, BOUZAHZAH B, PESTELL RG, SCHERER PE, LISANTI MP. Constitutive and growth factor-regulated phosphorylation of caveolin-1 occurs at the same site (Tyr-14) *in vivo*: identification of a c-Src/Cav-1/Grb7 signaling cassette. *Mol Endocrinol* 2000; **14**: 1750–1775.

- [46] LEE H, PARK DS, RAZANI B, RUSSELL RG, PESTELL RG, LISANTI MP. Caveolin-1 mutations (P132L and null) and the pathogenesis of breast cancer. *Am J Pathol* 2002; **161**: 1357–1369.
- [47] LEE SW, REIMER CL, OH P, CAMPBELL DB, SCHNITZER JE. Tumor cell growth inhibition by caveolin re-expression in human breast cancer cells. *Oncogene* 1998; **16**: 1391–1397.
- [48] LI L, YANG G, EBARA S, SATOH T, NASU Y, TIMME TL, REN C, WANG J, TAHIR SA, THOMPSON TC. Caveolin-1 mediates testosterone-stimulated survival/clonal growth and promotes metastatic activities in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2001; **61**: 4386–4392.
- [49] LIU J, RAZANI B, TANG S, TERMAN BI, WARE JA, LISANTI MP. Angiogenesis activators and inhibitors differentially regulate caveolin-1 expression and caveolae formation in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1999; **274**: 15781–15785.
- [50] LIU J, LEE P, GALBIATI F, KITSIS RN, LISANTI MP. Caveolin-1 expression sensitizes fibroblastic and epithelial cells to apoptotic stimulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; **280**: C823–C835.
- [51] LIU J, WANG XB, PARK DS, LISANTI MP. Caveolin-1 expression enhances endothelial capillary tubule formation. *J Biol Chem* 2002; **277**: 10661–10668.
- [52] LIU P, RUDICK M, ANDERSON RGW. Multiple functions of caveolin-1. *J Biol Chem* 2002; **277**: 41295–41298.
- [53] LU ML, SCHNEIDER MC, ZHENG Y, ZHANG X, RICHIE JP. Caveolin-1 interacts with androgen receptor. *J Biol Chem* 2001; **276**: 13442–13451.
- [54] MATSUURA K, SHIGA K, YOKOYAMA J, SAIJO S, MIYAGI T, TAKASAKA T. Loss of heterozygosity of chromosome 9p21 and 7q31 is correlated with high incidence of recurrent tumor in head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 1998; **18**: 453–458.
- [55] MINETTI C, SOTGIA F, BRUNO C, SCARTEZZINI P, BRODA P, BADO M, MASETTI E, MAZZOCCO M, EGEO A, DONATI MA, VOLONTE' D, GALBIATI F, CORDONE G, BRICARELLI FD, LISANTI MP, ZARA F. Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nature Genetics* 1998; **18**: 365–368.
- [56] MORGAN MB, STEVENS GL, TANNENBAUM M, SALUP R. Expression of the caveolins in dermal vascular tumors. *J Cutan Pathol* 2001; **28**: 24–28.
- [57] MOURAVIEV V, LI L, TAHIR SA, YANG G, TIMME TL, GOLTSOV A, REN C, SATOH T, WHEELER TM, ITTMANN MM, MILES BJ, AMATO RJ, KADMON D, THOMPSON TC. The role of caveolin-1 in androgen insensitive prostate cancer. *J Urol* 2002; **168**: 1589–1596.
- [58] NASU Y, TIMME TL, YANG G, BANGMA CH, LI L, REN C, PARK SH, DELEON M, WANG J, THOMPSON TC. Suppression of caveolin expression induces androgen sensitivity in metastatic androgen-insensitive mouse prostate cancer cells. *Nat Med* 1998; **4**: 1062–1064.
- [59] OKAMOTO T, SCHLEGEL A, SCHERER PE, LISANTI MP. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing “Preassembled signaling complexes” at the plasma membrane. *J Biol Chem* 1998; **273**: 5419–5422.
- [60] PARK DS, RAZANI B, LASORELLA A, SCHREIBER-AGUS N, PESTELL RG, IAVARONE A, LISANTI MP. Evidence that Myc isoforms transcriptionally repress caveolin-1 gene expression via an INR-dependent mechanism. *Biochemistry* 2001; **40**: 3354–3362.
- [61] PARK W-Y, PARK J-S, CHO K-A, KIM D-I, KO Y-G, SEO J-S, PARK SC. Up-regulation of caveolin attenuates epidermal growth factor signaling in senescent cells. *J Biol Chem* 2000; **275**: 20847–20852.
- [62] PFLUG BR, REITER RE, NELSON JB. Caveolin expression is decreased following androgen deprivation in human prostate cancer cell lines. *The Prostate* 1999; **40**: 269–273.
- [63] RACINE C, BELANGER M, HIRABAYASHI H, BOUCHER M, CHAKIR J, COUET J. Reduction of caveolin 1 gene expression in lung carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **255**: 580–586.
- [64] RAJJAYABUN PH, GARG S, DURKAN GC, CHRLTON R, ROBINSON MC, MELLON JK. Caveolin-1 expression in associated with high-grade bladder cancer. *Urology* 2001; **58**: 811–814.
- [65] RAZANDI M, OH P, PEDRAM A, SCHNITZER J, LEVIN ER. ERs associate with and regulate the production of caveolin: Implication for signaling and cellular actions. *Mol Endocrinol* 2002; **16**: 100–115.
- [66] RAZANI B, RUBIN CS, LISANTI MP. Regulation of cAMP-mediated signal transduction via interaction of caveolins with the catalytic subunit of protein kinase A. *J Biol Chem* 1999; **274**: 26353–26360.
- [67] RAZANI B, ENGELMAN JA, WANG XB, SCHUBERT W, ZHANG XL, MARKS CB, MACALUSO F, RUSSELL RG, LI M, PESTELL RG, DI VIZIO D, HOU H, Jr, KNEITZ B, LAGAUD G, CHRIST GJ, EDELMANN W, LISANTI MP. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem* 2001; **276**: 38121–38138.
- [68] RAZANI B, WANG XB, ENGELMAN JA, BATTISTA M, LAGAUD G, ZHANG XL, KNEITZ B, HOU H, Jr, CHRIST GJ, EDELMANN W, LISANTI MP. Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 2329–2344.

- [69] SCHERER PE, LEWIS RY, VOLONTÉ D, ENGELMAN JA, GALBIATI F, COUET J, KOHTZ DS, Van DONSELAAR E, PETERS P, LISANTI MP. Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. *J Biol Chem* 1997; **272**: 29337–29346.
- [70] SCHLEGEL A, WANG C, KATZENELLENBOGEN BS, PESTELL RG, LISANTI MP. Caveolin-1 potentiates estrogen receptor α (ER α) signaling. *J Biol Chem* 1999; **274**: 33551–33556.
- [71] SCHLEGEL A, WANG C, PESTELL RG, LISANTI MP. Ligand-independent activation of oestrogen receptor α by caveolin-1. *Biochem J* 2001; **359**: 203–210.
- [72] SHRIDHAR V, SUN QC, MILLER OJ, KALEMKERIAN GP, PETROS J, SMITH DI. Loss of heterozygosity on the long arm of human chromosome 7 in sporadic renal cell carcinomas. *Oncogene* 1997; **15**: 2727–2733.
- [73] SUZUOKI M, MIYAMOTO M, KATO K, HIRAOKA K, OSHIKIRI T, NAKAKUBO Y, FUKUNAGA A, SHICHINOHE T, SHINOHARA T, ITOH T, KONDO S, KATOH H. Impact of caveolin-1 expression on prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2002; **87**: 1140–1144.
- [74] TAHIR SA, YANG G, EBARA S, TIMME TL, SATOH T, LI L, GOLTSOV A, ITTMANN M, MORRISSETT JD, THOMPSON TC. Secreted caveolin-1 stimulates cell survival/ clonal growth and contributes to metastasis in androgen-intensivite prostate cancer. *Cancer Res* 2001; **61**: 3882–3885.
- [75] THOMPSON TC. Metastasis-related genes in prostate cancer: The role of caveolin-1. *Cancer Metastasis Rev* 1999; **17**: 439–442.
- [76] THOMPSON TC, TIMME TL, LI L, GOLTSOV A. Caveolin-1, a metastasis-related gene that promotes cell survival in prostate cancer. *Apoptosis* 1999; **4**: 233–237.
- [77] TIMME TL, GOLTSOV A, TAHIR S, LI L, WANG J, REN C, JOHNSTON RN, THOMPSON TC. Caveolin-1 is regulated by c-myc and suppresses c-myc-induced apoptosis. *Oncogene* 2000; **19**: 3256–3265.
- [78] VAN DEURS B, ROEPSTORFF K, HOMMELGAARD AM, SANDVIG K. Caveolae: anchored, multi-functional platforms in the lipid ocean. *Trends Cell Biol* 2003; **13**: 92–100.
- [79] VOLONTÉ D, GALBIATI F, LISANTI MP. Visualization of caveolin-1, a caveolar marker protein, in living cells using green fluorescent protein (GFP) chimeras. *FEBS Lett* 1999; **445**: 431–439.
- [80] WANG XL, UZAWA K, MIYAKAWA A, SHIIBA M, WATANABE T, SATO T, MIYA T, YOKOE H, TANZAWA H. Localization of a tumour-suppressor gene associated with human oral cancer on 7q31.1. *Int J Cancer* 1998; **75**: 671–674.
- [81] WANG X-Q, SUN P, PALLER AS. Ganglioside induces caveolin-1 redistribution and interaction with the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 2002; **277**: 47028–47034.
- [82] WARY KK, MAINIERO F, ISAKOFF SJ, MARCANTONIO EE, GIANCOTTI FG. The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell* 1996; **87**: 733–743.
- [83] WARY KK, MARIOTTI A, ZURZOLO C, GIANCOTTI FG. A requirement of caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* 1998; **94**: 625–634.
- [84] WEI Y, YANG Z, LIU Q, WILKINS JA, CHAPMAN HA. A role for caveolin and the urokinase receptor in integrin-mediated adhesion and signaling. *J Cell Biol* 1999; **144**: 1285–1294.
- [85] WIECHEN K, DIATCHENKO L, AGOULNIK A, SCHARFF KM, SCHOBBER H, ARLT K, ZHUMABAY-EVA B, SIEBERT PD, DIETEL M, SCHÄFER R, SERS C. *Caveolin-1* is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene. *Am J Pathol* 2001; **159**: 1635–1643.
- [86] WIECHEN K, SERS C, AGOULNIK A, ARLT K, DIETEL M, SCHLAG PM, SCHNEIDER U. Down-regulation of caveolin-1, a candidate tumor suppressor gene, in sarcomas. *Am J Pathol* 2001; **158**: 833–839.
- [87] WILLIAMS TM, CHEUNG MW-C, PARK DS, RAZANI B, COHEN AW, MULLER WJ, Di VIZIO D, CHOPRA NG, PESTELL RG, LISANTI MP. Loss of caveolin-1 gene expression accelerates the development of dysplastic mammary lesions in tumor-prone transgenic mice. *Mol Biol Cell* 2003; **14**: 1027–1042.
- [88] YANG C-P, GALBIATI F, VOLONTÉ D, HORWITZ SB, LISANTI MP. Upregulation of caveolin-1 and caveolae organelles in taxol-resistant A549 cells. *FEBS Lett* 1998; **439**: 368–372.
- [89] YANG G, TRUONG LD, TIMME TL, REN C, WHEELER TM, PARK SH, NASU Y, BANGMA CH, KATTAN MW, SCARDINO PT, THOMPSON TC. Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer. *Clin Cancer Res* 1998; **4**: 1873–1880.
- [90] YANG G, TRUONG LD, WHEELER TM, THOMPSON TC. Caveolin-1 expression in clinically confined human prostate cancer: A novel prognostic marker. *Cancer Res* 1999; **59**: 5719–5723.
- [91] ZENKLUSEN JC, BIČHE I, LIDEREAU R, CONTI CJ. (C-A)_n microsatellite repeat D7S522 is the most commonly deleted region in human primary breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 12155–12158.

- [92] ZENKLUSEN JC, THOMPSON JC, TRONCOSO P, KAGAN J, CONTI CJ. Loss of heterozygosity in human primary prostate carcinomas: a possible tumor suppressor gene at 7q31.1. *Cancer Res* 1994; **54**: 6370–6373.
- [93] ZENKLUSEN JC, THOMPSON JC, KLEIN-SZANTO AJ, CONTI CJ. Frequent loss of heterozygosity in human primary squamous cell and colon carcinomas at 7q31.1: evidence for a broad range tumor suppressor gene. *Cancer Res* 1995; **55**: 1347–1350.
- [94] ZENKLUSEN JC, WEITZEL JN, BALL HG, CONTI CJ. Allelic loss at 7q31.1 in human primary ovarian carcinomas suggests the existence of a tumor suppressor gene. *Oncogene* 1995; **11**: 359–363.
- [95] ZHANG W, RAZANI B, ALTSCHULER Y, BOUZAHZAH B, MOSTOV KE, PESTELL RG, LISANTI MP. Caveolin-1 inhibits epidermal growth factor-stimulated lamellipod extension and cell migration in metastatic mammary adenocarcinoma cells (MTLn3). *J Biol Chem* 2000; **275**: 20717–20725.
- [96] ZUNDEL W, SWIERSZ LM, GIACCIA A. Caveolin 1-mediated regulation of receptor tyrosine kinase-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity by ceramide. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 1507–1514.

Wanda M. Krajewska,
Katedra Cytobiochemii UŁ,
S. Banacha 12/16, 90-237 Łódź,
e-mail: wmkraj@biol.uni.lodz.pl

...the study of aging and the elderly. The research was conducted in a community center in a large city in the United States. The study was designed to explore the experiences of older adults and their families. The researchers used a qualitative approach to gather data through interviews and focus groups. The findings of the study suggest that older adults experience a variety of challenges, including social isolation, financial difficulties, and health problems. The researchers also found that family members often play a significant role in supporting older adults, but they may also experience stress and burnout. The study highlights the need for more research on the needs of older adults and their families, and the importance of providing support and resources to help them cope with the challenges of aging.

...the study of aging and the elderly. The research was conducted in a community center in a large city in the United States. The study was designed to explore the experiences of older adults and their families. The researchers used a qualitative approach to gather data through interviews and focus groups. The findings of the study suggest that older adults experience a variety of challenges, including social isolation, financial difficulties, and health problems. The researchers also found that family members often play a significant role in supporting older adults, but they may also experience stress and burnout. The study highlights the need for more research on the needs of older adults and their families, and the importance of providing support and resources to help them cope with the challenges of aging.

WIELKOŚĆ GENOMU ROŚLINNEGO

PLANT GENOME SIZE

Jolanta MAŁUSZYŃSKA, Dorota SIWIŃSKA

Katedra Anatomii i Cytologii Roślin, Uniwersytet Śląski, Katowice

Streszczenie: Wielkość genomu roślin okrytonasiennych, chociaż określona tylko dla 1,4% opisanych gatunków, jest bardzo zróżnicowana. Porównawcze badania genomów wykazały, że różnice w wielkości genomu wynikają głównie z różnic w ilości sekwencji powtarzalnych, podczas gdy liczba genów jest podobna. Rola niekodujących sekwencji powtarzalnych jest kontrowersyjna. Są hipotezy wskazujące na ich pasożytniczy charakter, jak również dane o ich adaptacyjnym znaczeniu. Niewyjaśnione są mechanizmy prowadzące do zwiększania wielkości genomu, a tym bardziej do jego redukcji. Badania molekularne przypisują istotną rolę w tym procesie sekwencjom ruchomym szczególnie retrotranspozonom. Wielkość genomu jest cechą charakterystyczną dla danego gatunku, ale może podlegać zmianom. Znajomość wielkości genomu jest ważna nie tylko z punktu widzenia podstawowych badań biologicznych, ale może mieć również znaczenie praktyczne.

Słowa kluczowe: C DNA, cytometria, endoreduplikacja, sekwencje powtarzalne, wielkość genomu.

Summary: Genome size of angiosperms estimated for only 1.4% of species is highly variable. Comparison of small and large plant genomes has shown that differences in genome size can mainly be attributed to varying proportion of repeated DNA sequences though the number of genes is similar. The function of noncoding, repetitive sequences are controversial. DNA amount is relatively constant and tends to be highly characteristic for a species but can change. Mechanisms of genome variation, especially genome size decrease is not clear. Molecular investigations indicated the significant role of retrotransposons in such process. Genome size is an important biodiversity character whose study provides a strong unifying element in basic biology and practical use.

Key words: C DNA, cytometry, endoreduplication, repetitive sequences, genome size.

1. WSTĘP

Wielkość genomu jest to zawartość DNA w jądrze wyrażona w jednostkach wagowych (pg) lub w liczbie par zasad (Mpz) (0,1 pg = ~100 Mpz). Swift [38] wprowadził termin C (*constant*) dla określenia zawartości DNA w niezreplikowanym,

podstawowym, gametycznym zespole chromosomów danego gatunku. 1C DNA odpowiada ilości DNA w gamecie, podczas gdy somatyczne komórki diploidalne posiadają 2C DNA lub 4C DNA w zależności od fazy cyklu komórkowego, odpowiednio przed i po replikacji. Znajomość wielkości i struktury genomu jest podstawą dla zrozumienia jego funkcji i mechanizmów filogenetycznych, jest ona wykorzystywana w biologii molekularnej, taksonomii i ekologii.

W Polsce, w badaniach dotyczących wielkości genomu roślinnego ogromne zasługi ma Profesor Maria J. Olszewska. Wykonane pod jej kierunkiem porównawcze badania wielu gatunków roślin reprezentujących różne grupy taksonomiczne i stopnie pokrewieństw oraz różniących się formą życiową dostarczyły nie tylko informacji o zawartości DNA, ale również wielu interesujących spostrzeżeń odnośnie procesu endoreduplikacji podczas różnicowania komórek roślinnych i weszły na stałe do literatury specjalistycznej [25, 26, 28, 29].

W ciągu przeszło 50-letnich badań zawartość jądrowego DNA określona została u kilku tysięcy organizmów, w tym roślin okrytonasiennych. Dane te zostały opublikowane w kolejnych listach [2, 4], a obecnie dostępne są w bazach danych na stronach internetowych (<http://www.rbgekew.org.uk/cval/homepage.html>). Ogromna rozpiętość w zawartości jądrowego DNA, szczególnie u roślin okrytonasiennych, nasunęła wiele pytań na temat mechanizmów prowadzących do zmian wielkości i struktury genomu oraz roli powtarzalnych sekwencji niekodujących w genomie, które decydują o tych różnicach. Badania molekularne i cytologiczne ostatnich lat pozwoliły lepiej zrozumieć niektóre z tych problemów. Przedstawiany przegląd badań wielkości genomu ograniczony jest do roślin okrytonasiennych.

2. OKREŚLANIE WIELKOŚCI GENOMU

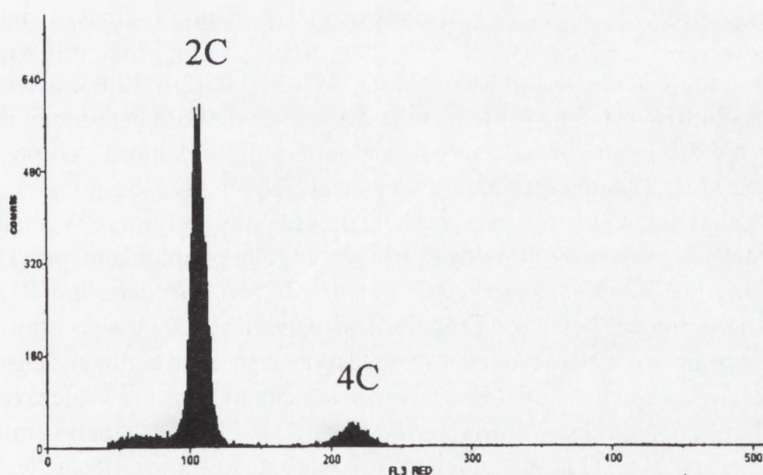
Wielkość genomu można określać na podstawie pomiaru zawartości jądrowego DNA metodami molekularnymi lub cytometrycznymi. Najczęściej stosowane metody cytometryczne opierają się na stechiometrycznym, specyficznym barwieniu cząsteczek DNA, pomiarze parametrów optycznych wybarwionych jąder i obliczeniu bezwzględnej wielkości genomu w pg lub ilości par zasad. Można wyróżnić dwie grupy metod – fluorymetryczne i densytometryczne.

Pierwsze polegają na pomiarze intensywności światła fluorescencyjnego emitowanego przez jądra wybarwione fluorochromem (np. jodkiem propidyny, bromkiem etydydy). Pomiarów dokonuje się w fotometrze sprzężonym z mikroskopem lub coraz powszechniej w cytometrze przepływowym [8]. Drugie wykorzystują zjawisko pochłaniania światła w zależności od gęstości optycznej wybarwionych jąder (powszechnie stosowanym barwieniem jest reakcja Feulgena). Do pomiarów służą fotometry zwane również mikrodensytometrami lub mikrospektrofotometrami coraz częściej zastępowane przez komputerowy system analizy obrazu (*image cytometry*) [42].

Wszystkie wymienione metody pozwalają określić wielkość genomu w jednostkach względnych i wymagają zastosowania standardu (jąder o znanej wielkości genomu) do

obliczenia bezwzględnej zawartości DNA w jądrze. Wybór odpowiedniego standardu jest bardzo istotny dla wiarygodności i powtarzalności pomiarów. Idealnym standardem jest gatunek, który daje bardzo zbliżone wyniki pomiarów wykonanych różnymi metodami, ma dość jednorodną chromatynę, łatwo barwi się fluorochromami i odczynnikiem Feulgena, jest łatwy w hodowli i pozyskiwaniu nasion.

Najdogodniejszą i ostatnio najczęściej stosowaną metodą określania wielkości genomu jest cytometria przepływowa. Próbkę do badań w cytometrze przepływowym musi mieć postać zawiesiny pojedynczych cząstek – jąder komórkowych. Pomiaru dokonuje się podczas przepływu jąder przez komorę cytometru, metoda jest niezwykle szybka i pozwala analizować dużą liczbę jąder (kilka tysięcy jąder w ciągu kilku minut). Na histogramie otrzymuje się charakterystyczne piki odpowiadające liczbie jąder o danym poziomie C DNA. W młodych liściach (najodpowiedniejszy materiał do badania wielkości genomu) obserwujemy najczęściej dwa piki (ryc. 1). Duży pik odpowiada jądrum o zawartości DNA 2C oraz mały odpowiadający jądrum o zawartości DNA 4C. Średnia wartość intensywności fluorescencji dla każdego piku (wyrażona w jednostkach względnych) jest skorelowana z ilością jądrowego DNA. Aby określić wielkość genomu badanego gatunku, porównujemy intensywność fluorescencji jąder wyizolowanych z tkanki jego liścia z intensywnością fluorescencji jąder komórkowych wyizolowanych z liści gatunku o znanej wielkości genomu – standardu. Jako standard najlepiej wybrać gatunek o wielkości genomu zbliżonej do wielkości genomu gatunku badanego, lecz na tyle różnej, aby otrzymać oddzielne piki. Na wynik pomiaru może mieć wpływ zawartość cytozolu uwalniania w trakcie izolacji jąder. Niektóre substancje, takie jak np. polifenole czy kofeina obecne w cytosolu, mogą zmieniać dostępność DNA dla fluorochromu, co może być przyczyną błędów [24].



RYCINA 1. Histogram z młodego liścia *Lycopersicon esculentum* – duży pik 2C i mały 4C obrazują odpowiednio jądra wyizolowane z komórek będących w fazie G1 i G2 cyklu komórkowego, oś X – intensywność fluorescencji, oś Y – liczba jąder

Metody densytometryczne są bardziej czasochłonne, z uwagi na procedurę przygotowania i barwienia preparatów jak również dłuższy czas pomiaru. W metodach tych w przeciwieństwie do cytometrii przepływowej można stosować materiał utrwalony i dłużej przechowywany. Stosując analizę jąder profazowych (4C) i telofazowych (2C) można łatwo określić poziomy 2C i 4C DNA pozostałych jąder. Również i w tych metodach należy rozważać wpływ czynników cytozolowych. Istotne znaczenie może mieć wybór odpowiedniego utrwalacza (np. formaldehyd zapobiega uwalnianiu polifenoli z wakuoli w przeciwieństwie do powszechnie stosowanej mieszaniny metanolu i kwasu octowego).

Metodą łączącą niektóre cechy wszystkich wymienionych technik jest laserowa cytometria skaningowa. Łączy ona szybkość pomiarów z możliwością lokalizacji każdego z nich na preparacie mikroskopowym oraz umożliwia ponowne barwienie i pomiar. Podobnie jak w przypadku cytometrii przepływowej mierzona jest intensywność fluorescencji jąder wybarwionych fluorochromem, a podobnie jak w metodzie densyto-metrycznej jądra umieszczone są na preparacie. Szybkość pomiarów zapewnia sprzężenie mikroskopu fluorescencyjnego z laserowym systemem skanującym. Wielkość genomu określona różnymi, lecz zoptymalizowanymi dla danego materiału metodami jest zbliżona lub taka sama. Wybór metody zależy, więc w głównej mierze od możliwości sprzętowych laboratorium.

Wielkość genomu określa się na podstawie pomiaru ilości DNA w komórkach somatycznych, a następnie oblicza wartość 1C DNA, która odpowiada zawartości DNA w niezreplikowanych gametach. U roślin diploidalnych wielkość pojedynczego genomu odpowiada dokładnie wartości 1C DNA. Sprawa jest bardziej skomplikowana w przypadku poliploidów, a szczególnie allopoliploidów. Poliploidy w gametach mają więcej niż jeden genom, oczywiście dzieląc wartość 4C DNA, otrzymaną z pomiaru, przez stopień poliploidalności [3] otrzymujemy wartość 1C DNA pojedynczego genomu. Jednak tak obliczona wielkość genomu dla allopoliploida jest średnią z wielkości genomów ancestralnych. W ten sposób określona wielkość genomu allopoliploidów jest mniejsza od wartości 1C DNA. Przykładem mogą być gatunki *Triticum*, u diploida, *T. monococcum* $2C = 12,45$ pg, 1C DNA wynosi, więc $6,23$ pg i taka jest wielkość genomu; u tetraploida *T. dicoccum* $2C = 24,05$, $1C = 24,05/2 = 12,03$, a wielkość genomu wynosi $24,05/4 = 6,0$ pg [35]. Wynika z tego, że wielkość genomu może być obliczana jedynie dla gatunków o znanym poziomie poliploidalności, co postulują niektórzy autorzy [3]. Badania ostatnich lat wykazały, że większość gatunków roślin okrytonasiennych w swojej historii przechodziła proces poliploidyzacji. Wiadomo, że gatunki powszechnie uważane za diploidy są faktycznie paleopoliploidami, przykładem może być kukurydza, *Arabidopsis*, *Brassica campestris*, *B. oleracea* lub *B. nigra*. Dlatego stosowanie pojęcia “wielkość genomu” jako zawartości DNA w podstawowym genomie (x) jest trudne i nie odzwierciedla stanu faktycznego. Tym bardziej, że genomy ancestralne w czasie specjacji uległy różnego typu przemianom, o czym świadczą badania allotetraploidalnego gatunku *Nicotina tabacum* [23] lub mieszańców międzygatunkowych *Brassica* [6]. Odpowiedniejsze jest, więc stosowanie pojęcia “wielkość genomu” w odniesieniu do danego gatunku, niezależnie od jego poliploidalności lub allopoliploidalności jako ilość DNA w niezreplikowanej gamecie oznaczane jako 1C DNA tego gatunku. Natomiast liczba i rodzaj genomów ancestralnych są istotne w badaniach taksonomicznych, filogenetycznych lub genetycznych.

3. WIELKOŚĆ GENOMU JĄDROWEGO ROŚLIN OKRYTONASIENNYCH

Bioróżnorodność roślin dotyczy nie tylko ich cech fenotypowych, ale również różnic w wielkości genomu i liczbie chromosomów. Te dwie cechy genomu nie są ze sobą ściśle skorelowane i mogą podlegać przemianom niezależnie. Najmniejsza opisana dla roślin okrytonasiennych liczba chromosomów wynosi $2n = 4$ (np. *Haplopappus gracilis*), a największa około $2n = 640$ (*Sedum suaveolens*) [21]. Wielkość genomu określona jest dla około 3500 gatunków, co stanowi około 1,4% opisanych gatunków roślin kwiatowych i reprezentuje około 48% rodzin okrytonasiennych [35]. Wartości 1C DNA roślin okrytonasiennych charakteryzują się dużą rozpiętością. Najmniejsza zawartość jądrowego DNA określona dla *Cardamine amara* z rodziny *Brassicaceae* wynosi $1C = 0,05$ pg, a największa dla *Fritillaria assyriaca* (*Liliaceae*) wynosi $1C = 127,4$ pg, jednak większość roślin okrytonasiennych ma małe genomy między 0,1 i 3,5 pg [35].

Analizując wartości 1C DNA dla przeszło 2800 gatunków okrytonasiennych określono wartość modalną równą 0,7 pg. Na tej podstawie zaproponowano podział gatunków w zależności od wielkości genomu. Gatunki z zawartością 1C DNA mniejszą lub równą wartości 1,4 pg (dwukrotność wartości modalnej) jako mające bardzo małe genomy; gatunki z zawartością $\leq 3,5$ pg (pięciokrotność wartości modalnej) jako małe genomy. Gatunki z wielkością genomu $\geq 14,0$ pg i ≥ 35 pg określono jako mające odpowiednio genomy duże i bardzo duże [22].

3.1. Paradoks C DNA

Gatunki należące do jednej jednostki taksonomicznej, takiej jak rodzaj czy rodzina, są podobne morfologicznie i nie tylko zawierają takie same geny, ale ich układ w chromosomach jest również podobny (kolinearny). Wielkość genomów natomiast może się różnić wielokrotnie, nawet między blisko spokrewnionymi gatunkami, na przykład w rodzinie *Gramineae* (*Poaceae*) żyto (9300 Mbp) ma 16 razy większy genom niż ryż (580 Mbp) [19]. Nasuwa się pytanie, dlaczego żyto potrzebuje tyle razy więcej DNA w stosunku do ryżu, chociaż oba gatunki mają podobny typ rozwoju. Jednoznacznej odpowiedzi na to pytanie nie ma. Wiadomo jedynie, że o tak dużej rozpiętości w wielkości genomów decyduje głównie obecność niekodujących sekwencji powtarzalnych, jako że minimalna liczba genów potrzebna do wzrostu i rozwoju roślin jest podobna. Zjawisko nadmiaru zawartości jądrowego DNA w stosunku do podstawowego zespołu genów oraz brak zależności między poziomem rozwoju ewolucyjnego organizmu i wielkością genomu nazwane zostało paradoksem C-DNA [39]. Ostatnio ze względu na złożoność problemu niektórzy autorzy proponują określenie "C-value enigma" [11].

3.2. Nukleotyp

DNA jądrowy wpływa na fenotyp organizmu w dwojaki sposób, w wyniku ekspresji zawartych genów i fizycznie, jako efekt posiadanej masy i objętości. Bennett [1] wprowadził termin nukleotyp dla określenia czynników wynikających z ilości jądrowego

DNA, które wpływają na cechy rośliny niezależnie od informacji genetycznej. Dobrze znana jest korelacja między zawartością DNA a suchą masą oraz objętością jądra i komórki. Nuklotypowy charakter mają takie cechy, jak: długość cyklu komórkowego, czas trwania mejozy i cykl życiowy rośliny. Na podstawie zawartości jądrowego DNA można przewidywać długość czasu trwania mejozy u danego gatunku, jak również wnioskować o wielkości genomu podstawie długości cyklu życiowego rośliny; np.: krótki cykl życiowy i mały genom u *Arabidopsis thaliana* [1]. Analizowano wielkość genomów roślin okrytonasiennych wyróżniając spośród nich powszechnie znane chwasty, które aby przeżyć i wydać nasiona, muszą się charakteryzować szybkim wzrostem, krótkim cyklem życiowym, produkcją dużej liczby małych nasion. Wiadomo, że cechy te skorelowane są z niską zawartością C DNA. Okazało się, że średnia zawartość 4C DNA chwastów wynosi 11,74 pg, podczas gdy innych okrytonasiennych 28,13 pg [3].

3.3. Powtarzalne sekwencje DNA głównym składnikiem genomu roślinnego

Geny i sekwencje regulatorowe stanowią bardzo niewielką część całkowitej zawartości DNA, i tak u *Fritillaria assyriaca* (rośliny z bardzo dużym genomem) sekwencje kodujące stanowią 0,02%; u *Nicotiana tabaccum* (3,9 pg) 0,7% i 31% u roślin *Arabidopsis thaliana* mających bardzo mały genom (0,2 pg). Główną frakcją genomu stanowią sekwencje powtarzalne, które nie będą tu szczegółowo omawiane, gdyż były przedmiotem wielu artykułów przeglądowych [17, 27]. Sekwencją powtarzaną mogą być odcinki DNA o długości od 2 do kilku tysięcy par zasad i powtórzone w kilkuset lub kilku milionach kopii. Sekwencje te różnią się także organizacją, rozmieszczeniem w genomie oraz homologią. Niektóre sekwencje są konserwatywne i występują u większości gatunków, a inne są gatunkowo, a nawet chromosomowo specyficzne. Sekwencje powtarzalne można podzielić na dwie główne kategorie, sekwencje występujące tandemowo i sekwencje rozproszone. Pierwsze mają zwykle określoną lokalizację w genomie, mogą być z łatwością wykrywane w drodze hybrydyzacji *in situ*, podczas gdy drugie są rozproszone w całym genomie, jednak w niektórych przypadkach mają charakterystyczny wzór rozmieszczenia w chromosomach. Względny udział poszczególnych typów powtarzalnego DNA w genomie jest trudny do określenia, z wyjątkiem kilku gatunków, u których sekwencjonowanie genomu zostało ukończone, a to nie pozwala jeszcze na ogólniejsze wnioski.

Rola powtarzalnego DNA, szczególnie niekodującego, jest ciągle kontrowersyjna. Część powtarzalnego DNA stanowią geny występujące w setkach, a czasem w tysiącach kopii. Należą do nich geny rRNA, tRNA i geny kodujące histony stanowiąc istotną część genomu. Wśród sekwencji niekodujących można wyróżnić niekodujące, ale funkcjonalne DNA, które składa się z sekwencji regulatorowych, promotorowych, DNA związanego ze strukturą macierzy jądrowej oraz sekwencji funkcjonalnych chromosomów, tj. sekwencji telomerowych, centromerowych i inicjacji replikacji DNA. Jednak funkcja dużej części niekodujących sekwencji DNA jest nieznaną i często są one określane jako „*junk DNA*”, lub samolubne DNA. Według jednej hipotezy te nietranskrybowane sekwencje są bezużytecznym DNA, biernie przenoszonym przez chromosomy. Alternatywna hipoteza postuluje adaptacyjną funkcję niekodujących sekwencji DNA

poprzez efekt nukleotypowy [30]. Jednym z ważniejszych typów powtarzalnego DNA mającego bezpośredni lub pośredni udział w zmianie wielkości genomu i jego ewolucji są elementy ruchome. Ich transpozycja i amplifikacja może powodować wiele zmian, od jednonukleotydowych delecji, insercji lub substytucji, poprzez przemiany chromosomowe, do zmiany wielkości całego genomu. Rozmieszczenie

elementów ruchomych i ich transpozycja w genomie roślinnym nie jest przypadkowe i zależy od ich typu. Retroelementy, które powszechnie występują u roślin, są rozproszone wzdłuż chromosomów, ale mogą być preferencyjnie związane z określonym regionem genomu. U niektórych roślin stwierdzono mniej retroelementów (*gypsy* i *copla-like*) w centromerach i organizatorach jąderka niż w innych regionach chromosomów. Retroelementy u pewnych gatunków są amplifikowane w sekwencjach niekodujących, takich jak: sekwencje międzygenowe, heterochromatyna lub często sekwencje innych retrotranspozonów. U kukurydzy elementy te wbudowywane są najczęściej w długie terminalne powtórzenia (LTR) podobnych retroelementów [5]. Inne elementy ruchome wbudowywane są głównie w niezmetylowane i aktywne genetycznie, euchromatynowe regiony genomu. Przykładem może być element ruchomy kukurydzy – *Mutator* (*Mu*), który włączany jest do sekwencji genów lub innych sekwencji unikatowych. Ten typ elementów występuje raczej w małej liczbie kopii, co można tłumaczyć negatywną selekcją genomów z transpozycją w regiony bogate w geny [17]. Liczba retrotranspozonów, jak i liczba ich kopii jest różna u różnych gatunków i może stanowić przeszło 60% całkowitej zawartości jądrowego DNA u gatunków z dużym genomem, takich jak: kukurydza, pszenica lub jęczmień [33]. Porównawcza analiza udziału elementów ruchomych w wielkości genomu wykazała, że odgrywa on stosunkowo większą rolę u roślin z dużym genomem (>500 Mpz) niż u gatunków z małym genomem (<500 Mpz) (tab. 1) [17].

TABELA 1. Wielkość genomu i udział elementów ruchomych u wybranych gatunków roślin okrytonasiennych. (wg Kidwell 2002)

Gatunek	Wielkość genomu (Mpz)	Udział elementów ruchomych (%)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	125	14
<i>Oryza sativa</i>	430	14
<i>Zea mays</i>	2500	60
<i>Hordeum vulgare</i>	5000	55

4. ZMIENNOŚĆ ZAWARTOŚCI JĄDROWEGO DNA

4.1. Endoreduplikacja

U większości roślin okrytonasiennych wzrostowi i różnicowaniu komórek może towarzyszyć zwiększanie zawartości jądrowego DNA w procesie endoreduplikacji (endopoliploidyacji). Proces ten polega na podwajaniu chromosomów w kolejnych rundach syntezy DNA bez podziału jądra, kondensacji i dekontensacji chromatyny, prowadząc do powstania komórek endopoliploidalnych. W wyniku takiego procesu

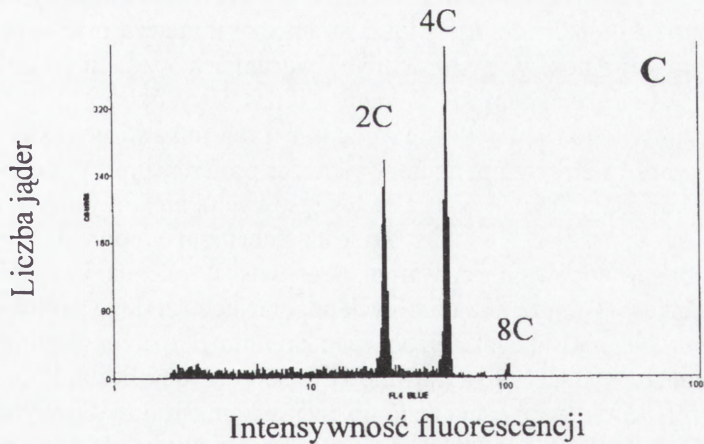
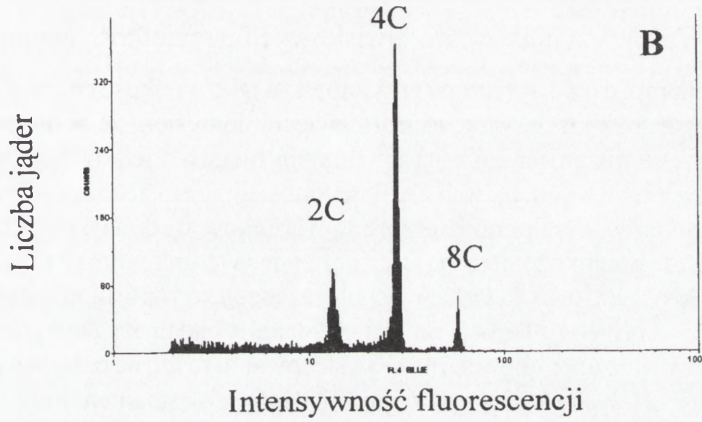
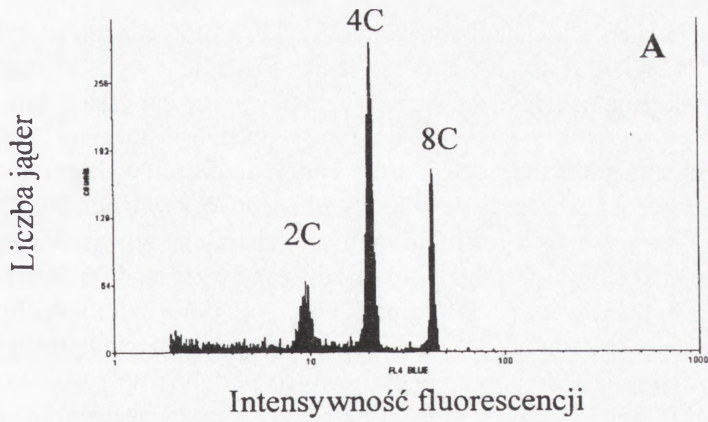
tkanki składają się z komórek o różnej zawartości DNA, są miksploidalne, inaczej polisomatyczne. Poszczególne gatunki roślin, charakteryzują się organo-specyficznym wzorem endopoliploidyacji, tzn. w poszczególnych organach występują z określoną częstotliwością komórki posiadające jądra o różnych poziomach poliploidyacji [13]. Zawartość DNA w niektórych komórkach somatycznych może dochodzić do 32 lub 64C. W komórkach o specjalnej funkcji i bardzo wysokim stopniu poliploidalności, takich jak: komórki wieszadełka, bielma lub synergidy, poliploidalność może dochodzić do kilku tysięcy C DNA, np. jądra endospermu *Arum maculatum* mają 24776 C DNA [40].

Pierwsze cykle endoreduplikacyjne mogą wystąpić już w zarodku podczas dojrzewania nasion, następnie podczas kiełkowania w liścieniach i hipokotylu, a potem w kolejnych organach wegetatywnych. Poziom endoreduplikacji wzrasta z wiekiem organu i może dochodzić nawet do 128C DNA np. w starzejących się ogonkach liściowych pomidora [34]. Endoreduplikacji nie stwierdzono w organach generatywnych, mimo jej występowania w komórkach łodygi [10].

Wykorzystanie cytometrii przepływowej umożliwiło szybkie i oparte na dużej liczbie komórek określenie wzoru endoreduplikacji dla wielu różnych gatunków roślin. Porównawcza analiza endoreduplikacji u roślin diploidalnych i autopoliploidalnych *Lycopersicon esculentum* [34] oraz diploidalnych i allotetraploidalnych gatunków *Brassica* (Siwińska, Bernaś, Małuszyńska, w przygotowaniu) rosnących w tych samych warunkach wykazała, że wzór ten jest podobny niezależnie od poziomu poliploidalności roślin (ryc. 2). Oznacza to, że komórki organów w podobnym stadium rozwoju przechodzą taką samą liczbę endocykli.

Niektóre gatunki roślin przechodzą prawidłowy wzrost i rozwój bez endoreduplikacji, są to rośliny niepolisomatyczne. Analizując zawartość DNA w jądrach komórkowych wyizolowanych z różnych tkanek tych roślin obserwujemy jądra o poziomie 2C i 4C DNA, z ogromną przewagą tych pierwszych. Przykładem może być *Crepis capillaris* lub *Helianthus annuus* (Siwińska, niepublikowane). Nasuwa się więc pytanie, jakie jest znaczenie endoreduplikacji w rozwoju roślin. W czasie tego procesu komórki amplifikują swój genom bez kondensacji chromatyny, segregacji chromosomów, cytokinezy i bez przerwy w procesach transkrypcji i translacji, która występuje podczas mitozy. W rezultacie powstają komórki z większą liczbą kopii genów i większą aktywnością metaboliczną, odpowiadającą kilku komórkom diploidalnym. Innym czynnikiem, który może mieć znaczenie w rozwoju i wzroście rośliny, jest pozytywna korelacja między rozmiarem komórki i zawartością jądrowego DNA. Komórki poliploidalne mogą osiągać większe rozmiary powodując szybszy wzrost organu i całej rośliny. Dowodem na to może być np. wyższy poziom endoreduplikacji stwierdzony w komórkach hipokotylu etiolowanych siewek *Arabidopsis thaliana* w porównaniu z rosnącymi na świetle [37]. Jednak szybki wzrost komórek roślinnych może być osiągnięty również "tańszym kosztem" przez tworzenie dużej centralnej wakuoli, ale ten sposób nie zapewnia intensywnego metabolizmu. Istnieje wiele koncepcji dotyczących roli endoreduplikacji w rozwoju roślin, które wymagają dalszych badań i uściśleń [36].

Nie są wyjaśnione molekularne mechanizmy kontroli procesu endoreduplikacji. Lepsze zrozumienie zasad regulacji cyklu mitotycznego u roślin powinno pomóc w analizie procesów związanych z endoreduplikacją [20]. Szczególnie interesujące i ważne



RYCINA 2. Wzór endopoliploidalności w liściach gatunków *Brassica*: diploidalnych: A – *B. campestris*, B – *B. oleracea* i allopoliploidalnym: C – *B. napus*

wydaje się wyjaśnienie mechanizmu zmiany cyklu mitotycznego w cykl endoreduplikacyjny. Niewiele jest danych na ten temat. Badania z wykorzystaniem kultur tkankowych wskazują na udział substancji wzrostowych w procesach indukcji endoreduplikacji, a szczególnie na działanie kinetyny w obecności auksyny [15]. W innych próbach wyjaśnienia molekularnych podstaw endoreduplikacji wykorzystano mutanty *Arabidopsis thaliana*. Dwa karłowe mutanty, *hypocotyl6* i *root hairless2*, osiągające wzrost około 10% wysokości roślin normalnych, charakteryzowały się ograniczoną endoreduplikacją. Rośliny te przechodziły tylko dwie pierwsze rundy endoreduplikacyjne osiągając poziom 8C zawartości DNA, podczas gdy w typie dzikim dochodził on do 32C. Liczba i wielkość komórek organów wegetatywnych tych mutantów była znacznie zredukowana, natomiast organów generatywnych podobna do roślin kontrolnych. Badania molekularne tych mutantów dostarczyły danych wskazujących na rolę topoizomerazy VI w procesie endoreduplikacji u *A. thaliana* [37].

4.2. Wpływ czynników środowiskowych na wielkość genomu

Wielość genomu jest powszechnie przyjmowana jako wielkość charakterystyczna i stała dla danego gatunku, jest jednak coraz więcej doniesień, że podlega ona wewnątrzgatunkowej zmienności i nie jest wynikiem błędów metodycznych. Wielkość genomu, oprócz zmian wynikających z endoreduplikacji w czasie rozwoju rośliny, może podlegać zmianom w wyniku oddziaływania warunków środowiskowych. Jednym z takich czynników jest położenie geograficzne, a więc warunki klimatyczne, w których rosną rośliny. Jest wiele danych wskazujących na tendencję wzrostu zawartości C DNA wraz z szerokością geograficzną. Są jednak dane z badań na *Dactylis glomerata* wykazujące odwrotną prawidłowość przy występowaniu roślin na dalszych północnych szerokościach [32]. Negatywna korelacja między wielkością genomu i wysokością nad poziomem morza była wykazana między innymi dla europejskich populacji *Festuca arundinacea* i uprawnych odmian kukurydzy w Ameryce Północnej oraz różnych populacji *Dactylis glomerata*. Zależności te autorzy tłumaczą przewagą selekcyjną roślin z małym genomem w ekstremalnych warunkach wzrostu i krótkim okresie wegetacji, charakterystycznym dla północy i dużych wysokości [32]. Stwierdzono również zależność między wielkością genomu i warunkami wzrostu, takimi jak: wilgotność, żyzność gleby i temperatura, wykazując preferencyjne występowanie roślin z mniejszą zawartością DNA w warunkach stresowych i niekorzystnych dla rozwoju [41]. Obserwacje te nasuwają pytanie, jaki jest mechanizm odpowiedzialny za zmiany wielkości genomu w odpowiedzi na warunki środowiska. Kalendar i wsp. [16] wykazali zmienność wielkości genomu w naturalnych populacjach dzikiego gatunku jęczmienia *Hordeum spontaneum* rosnących na zboczach kanionu o różnym stopniu wilgotności i nasłonecznienia. W pracy tej wykazano korelację między liczbą kopii LTR-retrotranspozonu (*BARE-1*), wielkością genomu i warunkami środowiskowymi, w których rosły rośliny jęczmienia, sugerując indukowaną stresem aktywność retrotranspozonów. Analiza liczby kopii i wzoru ich insercji wykazała nie tylko wzrost, ale również ich redukcję. Wykazano to na podstawie obecności pojedynczych sekwencji LTR powstałych w wyniku rekombinacji. Redukcja wielkości genomu wystąpiła u roślin rosnących wyżej

i narażonych na większą suszę. Różnice w liczbie kopii retrotranspozonu były trzykrotne przy średniej liczbie kopii 14 tysięcy na genom. Obserwacje te, mimo że dotyczą małego obszaru, pokazują, jak komórki mogą rearanżować swój genom w odpowiedzi na niekorzystne warunki środowiska.

Niewiele jest eksperymentalnych danych odnośnie wpływu poszczególnych czynników środowiskowych na wielkość C DNA, ale badania przeprowadzone na roślinach słonecznika *Helianthus annuus* w warunkach laboratoryjnych, a następnie potwierdzone w doświadczeniu polowym wykazały zależność zawartości jądrowego DNA od intensywności i długości fali świetlnej [31]. Najwyższą średnią zawartość DNA stwierdzono w zarodku, a następnie jej redukcję w siewkach, jeżeli wzrost był przy pełnym świetle, natomiast przy wroście w warunkach dużej zawartości podczerwieni lub w cieniu zawartość DNA pozostawała na wysokim poziomie. Autorzy sugerują, że rośliny w zacienionych warunkach mają ograniczoną fotosyntezę, a wzrost rośliny jest oparty głównie na elongacji większych, wolno dzielących się komórek, tym samym komórki z większym genomem są preferowane.

Warunki środowiskowe mogą mieć również wpływ na przebieg procesu endoreduplikacji w czasie różnicowania komórek. Porównanie wzoru endopoliploidyzacji roślin pomidora rosnących w warunkach *in vitro* i *in vivo* w szklarni wykazało wyższy poziom endopoliploidalności w komórkach roślin *in vivo* [34]. Autorzy wiążą te różnice z reakcją na warunki oświetlenia, co zgadza się z wcześniej obserwowanym wyższym poziomem endopoliploidalności w epikotylach grochu rosnącego w ciemności, a ostatnio potwierdzono również taki efekt na etiolowanych siewkach *Arabidopsis* [37].

Analizując wielkość genomu, a szczególnie jego zmienność wewnątrzgatunkową należy pamiętać również, że stan fizjologiczny tkanek może mieć wpływ na wynik barwienia jąder, a tym samym na wynik pomiaru zawartości DNA. Takie czynniki, jak: kondensacja chromatyny lub obecność wtórnych metabolitów, mogą zmieniać intensywność barwienia. Należy również wykluczyć lub ograniczyć inne błędy metodyczne, które mogą być przyczyną "plastyczności" genomu [12].

5. EWOLUCJA WIELKOŚCI GENOMU

Analiza baz danych dotyczących wielkości genomu pozwoliła na postawienie tezy, że przodkowie roślin okrytonasiennych miały małe genomy i tym można tłumaczyć ich sukces w konkurencji z innymi roślinami, gdyż mały genom jest skorelowany z szeregiem korzystnych cech, takich jak: szybkie kiełkowanie, krótki cykl życiowy i duża zdolność reprodukcji [22]. Nasuwa się zatem pytanie, dlaczego tyle roślin ma jednak duże i bardzo duże genomy. Porównania wielkości genomów u poszczególnych grup systematycznych roślin okrytonasiennych wykazały, że gatunki jednoliścienne mają wyraźnie wyższą zawartość DNA niż dwuliścienne, zarówno zakres wielkości jak i średnia zawartość jest wyższa [14]. Jednoznacznej odpowiedzi na postawione pytanie nie ma, podobnie jak i na kolejne, jakie są mechanizmy wzrostu lub zmniejszania się wielkości genomu. Oczywiście wzrost zawartości jądrowego DNA może być wynikiem poli-

ploidyzacji, obecności chromosomów B lub amplifikacji retrotranspozonów. Mniej wyjaśnione są procesy prowadzące do redukcji wielkości genomu. Analiza blisko trzystu retrotranspozonów w genomie *Arabidopsis* wykazała obecność tylko 30% całkowitych sekwencji, a pozostałe były zdegradowane, w tym wiele pojedynczych sekwencji LTR (solo LTRs). Autorzy sugerują, że istotnym mechanizmem prowadzącym do redukcji genomu może być nieuprawniona rekombinacja niezależnie od rekombinacji homologicznej [7]. Wiele badań wskazuje na bezpośrednią zależność ewolucji genomu od wielkości i częstotliwości występowania małych insercji i delecji określanymi jako "indel"[11]. Wykazano, że delecje prowadzące do redukcji wielkości genomu są lepiej tolerowane przez organizmy z mniejszym genomem. Stwierdzono, że utrata DNA jest 40 razy mniejsza u świerszcza niż u *Drosophila*, chociaż jego genom jest 11 razy większy [30]. U roślin wykazano więcej delecji w czasie procesu naprawy indukowanych uszkodzeń DNA u *Arabidopsis*, gatunku o bardzo małym genomie niż u tytoniu o genomie 20 razy większym [18]. W dalszych badaniach wykazano, że procesy naprawy pęknięć DNA u tytoniu odbywają się znacznie częściej w drodze homologicznej rekombinacji niż u roślin *Arabidopsis*, u których przeważa naprawa typu – łączenie końców niehomologicznych prowadząc do częstszych delecji. Jednocześnie należy podkreślić, że endoreduplikacja u *Arabidopsis* ma wyższy poziom niż u tytoniu. Tak więc istnieją zasadnicze różnice nie tylko w wielkości genomów tych gatunków, ale również sposobie ich reakcji na uszkodzenia, które z kolei mogą mieć wpływ na zmianę wielkości genomu [9]. Inni autorze sugerują, że sama wielkość genomu determinuje w jakiś sposób ilość traconego DNA, hamując mechanizmy prowadzące do utraty DNA i zmniejszania genomu [14].

6. PODSUMOWANIE

Wielkość genomu decyduje o nukleotypie, który jest skorelowany z fenotypem rośliny, a zarówno nukleotyp jak i fenotyp są pod presją środowiska i podlegają modyfikacjom. Trudno jest jednoznacznie ustalić przyczynę zmienności wielkości genomu zarówno tej dużej między gatunkami jak i tej niewielkiej, ale istotnej, wewnątrzgatunkowej. Jaka jest w tym rola niekodujących sekwencji powtarzalnego DNA i w jakim stopniu zmiany w zawartości niekodującego DNA mają znaczenie adaptacyjne, a w jakim regulujące ekspresję genów, rekombinację i naprawę? Adaptacyjny charakter niekodujących sekwencji DNA stał się ostatnio jednym z bardziej intrygujących problemów podobnie jak w ubiegłym stuleciu były sekwencje kodujące. Innym zagadnieniem jest poznanie procesu regulacji endoreduplikacji w rozwoju roślin, które ma istotne znaczenie nie tylko ze względów poznawczych, ale również może mieć znaczenie praktyczne, na przykład w regulacji niepożądanego zmienności somaklonalnej i poliploidalności roślin zregenerowanych lub transformowanych.

LITERATURA

- [1] BENNETT MD. The nucleotype, the natural karyotype and the ancestral genome. [w] Heslop-Harrison JS [red.] *Unifying Plant Genomes*. The Company of Biologists Limited Cambridge 1996: 45–52.
- [2] BENNETT MD, LEITCH IJ. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Ann Bot (Lond)* 1995; **76**: 113–176.
- [3] BENNETT MD, LEITCH IJ, HANSON L. DNA amounts in two samples of angiosperm weeds. *Ann Bot (Lond)* 1998; **82A**: 121–134.
- [4] BENNETT MD, SMITH JB. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philos Trans R Soc London Ser B* 1976; **274**: 227–274.
- [5] BENNETZEN JL. Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Mol Biol* 2000; **42**: 251–269.
- [6] COMAI L. Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. *Plant Mol Biol* 2000; **43**: 387–399.
- [7] DEVOS KM, BROWN JKM, BENNETZEN JL. Genome size reduction through illegitimate recombination counteracts genome expansion in Arabidopsis. *Genome Res* 2002; **12**: 1075–1079.
- [8] DOLEŽEL J. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. *J App Genet* 1997; **38**: 285–302.
- [9] FLIKOWSKI J, KOVALCHUK O, KOVALCHUK I. Dissimilar mutation and recombination rates in Arabidopsis and tobacco. *Plant Sci* 2003; **166**: 265–272.
- [10] GALBRAITH DW, HARKINS KR, KNAPP S. Systemic endopolyploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 1991; **96**: 985–989.
- [11] GREGORY TR. Is small indel bias a determinant of genome size? *Trends Genet* 2003; **19**: 485–488.
- [12] GREILHUBER J. Intraspecific variation in genome size: a critical reassessment. *Ann Bot (Lond)* 1998; **82A**: 27–35.
- [13] HAJDERA I, SIWINSKA D, HASTEROK R, MALUSZYNSKA J. Molecular cytogenetic analysis of genome structure in *Lupinus angustifolius* and *Lupinus cosentinii*. *Theor Appl Genet* 2003; **107**: 988–996.
- [14] HANSON L, BROWN RL, BOYD A, JOHNSON MAT, BENNETT MD. First nuclear DNA C-values for 28 angiosperm genera. *Ann Bot (Lond)* 2003; **91**: 31–38.
- [15] JOUBES J, CHEVALIER C. Endoreduplication in higher plants. *Plant Mol Biol* 2000; **43**: 735–745.
- [16] KALENDAR R, TANSKANEN J, IMMONEN S, NEVO E, SCHULMN AH. Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) *BARE-1* retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 6603–6607.
- [17] KIDWELL M. Transposable elements and evolution of genome size in eukaryotes. *Genetics* 2002; **115**: 4963.
- [18] KIRIK A, SALOMON S, PUCHTA H. Species-specific double-strand break repair and genome evolution in plants. *EMBO J* 2000; **19**: 5562–5566.
- [19] KUBIS S, SCHMIDT T, HESLOP-HARRISON JS. Repetitive DNA Elements as a major component of plant genomes. *Ann Bot (Lond)* 1998; **82A**: 45–55.
- [20] LARKINS BA, DILKES BP, DANTE RA, COELHO CM, WOO Y, LIU Y. Investigating the hows and whys of DNA endoreduplication. *J Exp Bot* 2001; **52**: 189–192.
- [21] LEITCH LJ, BENNETT MD. Polyploidy in angiosperms. *Trends Plant Sci* 1997; **2**: 470–476.
- [22] LEITCH IJ, CHASE MW, BENNETT MD. Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for small ancestral genome size in flowering plants. *Ann Bot (Lond)* 1998; **82A**: 85–94.
- [23] LIM KY, MATYASEK R, LICHTENSTEIN CK, LEITCH AR. Molecular cytogenetic analyses and phylogenetic studies in the *Nicotiana* section *Tomentosae*. *Chromosoma* 2000; **109**: 245–258.
- [24] NOIROT M, BARRE P, LOUARN J, DUPERRAY CH, HAMON S. Nucleus-cytosol interactions – a source of stoichiometric error in flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Ann Bot (Lond)* 2000; **86**: 309–316.
- [25] OLSZEWSKA MJ, KONONOWICZ AK. Can induced autopolyploidy replace naturally occurring endopolyploidization in roots? [w] Brouwer R i in. [red.] *Structure and Function of Plant Roots*. The Hague, Boston, London: Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publ. 1981: 49–51.
- [26] OLSZEWSKA MJ, KONONOWICZ H, JANAS K. In situ ³H rRNA/DNA hybridization and silver staining of NORs during growth and differentiation of root cortex cells in the presence or absence of DNA endoreduplication. [w] Brouwer R i in. [red.] *Structure and Function of Plant Roots*. The Hague, Boston, London: Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publ. 1981: 53–57.
- [27] OLSZEWSKA MJ, MAŁUSZYŃSKA J. Cytogenetyka molekularna w ustalaniu cech gatunkowych oraz ich zmienności w analizie pokrewieństwa roślin okrytozalążkowych. *Post Biol Kom* 2001; **28**: 197–218.

- [28] OLSZEWSKA MJ, OSIECKA R. The relationship between 2C DNA content, life cycle, systematic position, and the level of DNA endoreplication in nuclei of parenchyma cells during growth and differentiation of roots in some monocotyledonous species. *Biochem Physiol Pflanzen* 1982; **177**: 319–336.
- [29] OLSZEWSKA MJ, OSIECKA R. The relationship between 2CNA content, life cycle type, systematic position and the dynamics DNA endreduplication in parenchyma nuclei during growth and differentiation of roots in some dicotyledonous herbaceous species. *Biochem Physiol Pflanzen* 1983; **178**: 581–599.
- [30] PETROV DA. Evolution of genome size: new approaches to an old problem. *Trends Genet* 2001; **17**: 23–28.
- [31] PRICE HJ, MORGAN PW, JOHNSTON JS. Environmentally correlated variation in 2C nuclear DNA content measurements in *Helianthus annuus* L. *Ann Bot (Lond)* 1998; **82A**: 95–98.
- [32] REEVES G, FRANCI D, DAVIS MS, ROGERS HJ, HODKINSON TR. Genome size is negatively correlated with altitude in natural population of *Dactylis glomerata*. *Ann Bot (Lond)* 1998; **82A**: 99–105.
- [33] SANMIGUEL P, BENNETZEN JL. Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons. *Ann Bot (Lond)* 1998; **82A**: 37–44.
- [34] SMULDERS MJM, RUIJ-KORTEKAAS W, GILISSEN LJW. Development of polysomaty during differentiation in diploid and tetraploid tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants. *Plant Sci* 1994; **97**: 53–60.
- [35] SOLTIS DE, SOLTIS PS, BENNETT MD, LEITCH IJ. Evolution of genome size in the angiosperms. *Am J Bot* 2003; **90**: 1596–1603.
- [36] SUGIMOTO-SHIRASU K, ROBERTS K. “Big it up” endoreduplication and cell-size control in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2003; **6**: 544–553.
- [37] SUGIMOTO-SHIRASU K, STACEY NJ, CORSAR J, ROBERTS K, MCCANN MC. DNA topoisomerase VI is essential for endoreduplication in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 2002; **12**: 1782–1786.
- [38] SWIFT H. The constancy of deoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 1950; **36**: 643–654.
- [39] THOMAS CA. The genetic organization of chromosomes. *Annu Rev Genet* 1971; **5**: 237–256.
- [40] TRASS J, HÜLSKAMP M, GENDREAU E, HÖFTE H. Endoreduplication and development: rule without dividing? *Curr Opin Plant Biol* 1998; **1**: 498–503.
- [41] TURPEINEN T, KULMALA J, NEVO E. Genome size variation in *Hordeum spontaneum* populations. *Genome* 1999; **42**: 1094–1099.
- [42] VILHAR B, GREILHUBER J, KOCE JD, TEMSCH EM, DERMASTIA M. Plant genome size measurement with DNA image cytometry. *Ann Bot (Lond)* 2001; **87**: 719–728.

J. Maluszyńska

ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice,

e-mail: maluszyzn@us.edu.pl

CHROMOSOMY HOLOKINETYCZNE U ROŚLIN

HOLOKINETIC CHROMOSOMES IN PLANTS

Elżbieta KUTA¹, Ewa DUBAS², Agata MADEJ³

¹Zakład Cytologii i Embriologii Roślin, Uniwersytet Jagielloński,

²Zakład Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego, Polska Akademia Nauk, Kraków

Streszczenie: Artykuł dotyczy chromosomów holokinetycznych (holocentrycznych) roślin. Chromosomy holokinetyczne mają kinetochor dyfuzyjny rozciągający się na całej długości chromatyd. Dzięki takiej strukturze kinetochoru chromosomy holokinetyczne mogą podlegać fuzji (częściowa lub całkowita symploidalność) bądź ulegać fragmentacji (częściowa lub całkowita agmatoploidalność) bez negatywnego wpływu na przebieg mitozy. W pracy przedstawiono i przedyskutowano zagadnienia związane ze strukturą kompleksu centromer/kinetochor, zachowaniem się chromosomów holokinetycznych w mitozie i mejozie, mutacjami strukturalnymi i genomowymi *in vivo* i *in vitro* (w kulturze kalusa wypróbowanego z merystemu liściowego). Ponadto zaprezentowano wyniki badań nad ilością jądrowego DNA w odniesieniu do mutacji strukturalnych chromosomów holokinetycznych (fuzje, fragmentacje), zmienności w liczbach chromosomów (aneuploidalność *sensu stricto*) i mutacji genomów (całkowita agmatoploidalność bez zwiększenia ilości DNA; całkowita symploidalność bez zmniejszenia ilości DNA oraz poliploidalność, której towarzyszy zwielokrotnienie ilości DNA).

Słowa kluczowe: chromosomy holokinetyczne, kompleks centromer/kinetochor, mutacje strukturalne chromosomów, poliploidalność, ilość jądrowego DNA.

Summary: The article concerns holokinetic (holocentric) chromosomes in plants. Holokinetic chromosomes possess diffuse kinetochore spread out through the length of the chromatids. Such kinetochore structure allows holokinetic chromosomes fuse (complete or partial symploidy) or undergo fragmentation (complete or partial agmatoploidy) with no influence on regular mitotic divisions (each chromosome fragment behaves as chromosome). Several aspects of holokinetic chromosomes are presented such as: structure of centromere/kinetochore complex, behavior of holokinetic chromosomes in meiosis and mitosis, structural chromosome mutations and genome mutations *in vivo* and *in vitro* (in callus cells obtained from different tissues of plants with holokinetic chromosomes). Additionally, nuclear DNA amount in relation to chromosome mutations (fusion, fission), numerical chromosome variation (aneuploidy *sensu stricto*) and genome mutations (total agmatoploidy with no DNA gain; total symploidy with no DNA loss; polyploidy accompanied by DNA multiplication) and discussed.

Key words: holokinetic chromosomes, centromere/kinetochore complex, structural chromosome mutations, polyploidy, nuclear DNA amount.

WSTĘP

U większości organizmów występują chromosomy monocentryczne (monokinetyczne), posiadające przewężenie pierwotne i kinetochor zlokalizowany w jego rejonie. Nieliczni przedstawiciele świata zwierzęcego i roślinnego mają chromosomy bez charakterystycznego przewężenia pierwotnego, a kinetochor rozciąga się wzdłuż całej długości chromosomu. Taki typ chromosomu został określony jako holocentryczny (holokinetyczny) [57], a kinetochor jako dyfuzyjny (rozproszony) lub niezlokalizowany [67].

Występowanie chromosomów z kinetochorem rozproszonym u różnych taksonów, należących do odrębnych, nie spokrewnionych ze sobą rodzin, nasuwa pytanie o pochodzenie tego typu kinetochoru. Istnieją dwa możliwe kierunki ewolucji kinetochoru, a tym samym chromosomów:

(1) z chromosomów holokinetycznych, poprzez stadia pośrednie, doszło do powstania chromosomów monocentrycznych;

(2) proces przebiegał odwrotnie – z chromosomów monokinetycznych wykształciły się chromosomy holokinetyczne.

Zwolennicy pierwszej teorii twierdzili, że chromosomy monokinetyczne stanowią końcową formę w stopniowym przekształcaniu się prymitywnego chromosomu holokinetycznego. Świadczy o tym występowanie szeregu form pośrednich oraz szerokie rozpowszechnienie w przyrodzie chromosomów monokinetycznych [33,71,77]. Według Vaaramy [77] małe holokinetyczne chromosomy wykazywały tendencję do łączenia się w dłuższe jednostki, a kinetyczna aktywność ulegała stopniowej koncentracji w telomerach. Jones [33] z kolei podkreślał brak specjalizacji funkcji kinetochorowej w chromosomach holokinetycznych oraz wskazywał na podobieństwa w zachowaniu się centromerów i telomerów, świadczące o ich wspólnym pochodzeniu; te cechy miały świadczyć o prymitywnym charakterze chromosomów holokinetycznych. Sybenga [73] swoje wnioski oparł na podstawie analizy zachowania się chromosomów podczas mejozy. Autor wyróżnił cztery typy przebiegu mejozy, które stanowią kolejne stopnie w specjalizacji aktywności kinetycznej. Według niego chromosomy holokinetyczne, które są funkcjonalnie monokinetyczne przynajmniej w jednym z podziałów, stanowią ogniwo pośrednie pomiędzy chromosomami monokinetycznymi a holokinetycznymi; chromosomy takie mają chiazmy zlokalizowane na jednym końcu, a kinetochor na drugim.

Przeciwną hipotezę na temat ewolucji kinetochoru przedstawił Bauer [3], twierdząc, że chromosomy holokinetyczne są bardziej zaawansowane ewolucyjnie bowiem skutki mutacji strukturalnych chromosomów (np. fuzji, translokacji, fragmentacji), czyli nowe typy chromosomów, nie są eliminowane. W przypadku chromosomów monocentrycznych fragmenty pozbawione centromeru, jak również chromosomy dicentryczne najczęściej ulegają eliminacji w czasie podziału, bądź zakłócają jego przebieg. Podobną opinię prezentował cytogenetyk roślinny Greilhuber [20], uznając kinetochor dyfuzyjny za cechę zaawansowaną, występującą u roślin kwiatowych. Założenie to opierał na braku potwierdzonych dowodów na występowanie tego typu chromosomów u taksonów reprezentujących niższy stopień zawansowania ewolucyjnego np. u glonów, mszaków, paproci czy roślin nagonasiennych. Jego zdaniem u roślin okrytonasiennych kinetochor dyfuzyjny i chromosomy holokinetyczne można uznać za paralelizm ewolucyjny bowiem ten typ chromosomu wystąpił kilkakrotnie, niezależnie w różnych grupach taksono-

micznych. Stąd można uznać kinetochor dyfuzyjny w połączeniu z odwróconą mejozą za jedyną, dotyczącą chromosomów, cechę synapomorficzną na wyższym szczeblu taksonomicznym dla roślin jednoliściennych. Trudno przyjąć bez zastrzeżeń powyższe rozważania, ponieważ, wprawdzie brak jest dowodów na istnienie chromosomów z kinetochorem rozproszonym w wyżej wspomnianych grupach roślin, ale być może wynika to z faktu, że chromosomy wielu roślin nie były badane szczegółowo pod względem określania typu kinetochoru. Są natomiast doniesienia o policentrycznych chromosomach u glonów z rodzaju *Spirogyra* [52] oraz o dyfuzyjnym kinetochorze w chromosomach wątrobowców np. u *Marchantia* [72]. Również dyskutowane było istnienie kinetochoru półzlokalizowanego u mchu *Pleurozium schreberi* [77]. Zupełnie przeczy tej hipotezie występowanie chromosomów holokinetycznych u zwierząt, bowiem nie opisano do tej pory tego typu chromosomów u kręgowców. Natomiast są liczne doniesienia o ich obecności u niższych taksonów takich jak protista zwierzęce, robaki obłe, owady, pajęczaki [zob. 44 i cyt. tam lit.].

Model organizacji centromeru zaproponowany przez Zinkowskiego i współaut. [86] wyjaśnia kilka aspektów ewolucji chromosomu; rzuca także nowe światło na powstanie oraz ewolucję kinetochoru niezlokalizowanego. Podjednostki kompleksu centromer/kinetochor prawdopodobnie rozmieszczone są wzdłuż chromosomu [36]. Jednak sposób ich rozmieszczenia nie jest wyjaśniony. Godward [17] i Greilhuber [20] zauważyli, że powielanie, a następnie rozprzestrzenienie się elementów transpozonowych zawierających przypadkowo sekwencje centromerowe wzdłuż całego chromosomu, poza rejonem centromeru, mogło doprowadzić do powstania wtórnie, z kinetochoru zlokalizowanego, kinetochoru dyfuzyjnego. Zachowanie się takich elementów byłoby takie samo jak zachowanie się innych powtarzalnych sekwencji rozproszonych po całym genomie. Ponadto większość roślin z kinetochorem dyfuzyjnym ma małe chromosomy. Rozprzestrzenienie się jednostek kinetochorowych mogło nastąpić szybciej w małych chromosomach i mieć mniej negatywnych konsekwencji dla organizacji chromosomów niż w przypadku dużych chromosomów. Eksperymenty z zastosowaniem promieniowania X, w których wykazano, że fragmenty chromosomów z kinetochorem dyfuzyjnym nie są eliminowane, oprócz fragmentów najmniejszych, są dowodem na wysoki stopień rozproszenia sekwencji centromerowych w tych chromosomach.

KOMPLEKS CENTROMER/KINETOCHOR

Ze względu na ściśle powiązanie strukturalne i funkcjonalne, termin kinetochor był pierwotnie używany jako synonim centromeru. Terminy te oznaczały miejsce przyczepu chromosomów do wrzeciona mitotycznego [17,44].

Molekularną strukturę centromeru poznano dobrze u trzech gatunków drożdży, u *Drosophila* i u człowieka [zob.1,28,69,84 i cyt. tam lit.], w mniejszym stopniu w chromosomach roślinnych [10,25,26,27,29,58,66]. Obecnie nie ma wątpliwości, że kinetochor jest wyspecjalizowaną strukturą, której podłożem jest centromer, będący kompleksem nukleoproteinowym zlokalizowanym w regionie przewężenia pierwotnego (chromosomy monokinetyczne), odpowiedzialną za przyłączanie mikrotubul wrzeciona

podziałowego do chromosomu. Jest związany z molekularnym mechanizmem ruchu chromosomów w trakcie podziału komórki oraz aktywnie uczestniczy w ruchu chromosomów [1,65,44,45]. Spośród opisanych białek centromerowych (CENP – *CENTromeric Proteins*) zarówno konstytutywnych (CENP-A, CENP-B, CENP-C), jak i fakultatywnych (CENP-E, CENP-F, CENP-G, CENP-H) białko CENP-A jest uznawane za element determinujący lokalizację kinetochorów, a białko CENP-E za pośredniczące w przemieszczaniu się chromosomów do strefy równikowej wrzeciona kariokinetycznego w czasie prometafazy mitotycznej [58,75,76].

Kompleks kinetochor/centromer został zlokalizowany przy użyciu przeciwciał antykinetochorowych w chromosomach człowieka, kilku gatunków ssaków, w tym u myszy, chomika chińskiego, mundzaka chińskiego i indyjskiego [zob. 44 i cyt. tam lit], u owadów [70,85] oraz u roślin: *Haemanthus katherinae* Bak. [51], *Tradescantia virginiana* [37, 39,60,61], *Vicia faba* [27]. Występowanie białek rozpoznawalnych przez przeciwciała CREST w obszarze kinetochorów odległych filogenetycznie organizmów wskazuje na wysoki konserwatyzm białek tego regionu w trakcie ewolucji.

Ważnym momentem w zrozumieniu zagadnień związanych ze strukturą kinetochoru zarówno zlokalizowanego, jak i rozproszonego było opracowanie modelu organizacji kompleksu centromer/kinetochor [86]. Specjalne techniki: indukowane kofeiną odłączanie niezreplikowanych kinetochorów oraz hipotoniczne rozciąganie kinetochorów w połączeniu z analizą mikroskopową, zastosowaniem przeciwciał CREST, antytubulinowych i antydyneinowych oraz hybrydyzacją *in situ* syntetycznych sekwencji centromerowych, pozwoliły na opracowanie uniwersalnego modelu, tłumaczącego strukturalną i ewolucyjną zmienność kinetochoru oraz jego związek z centromerem. Na przykładzie trójwarstwowego kinetochoru ssaków (chomika, mundzaka japońskiego i mundzaka chińskiego) potwierdzono, że składa się on z funkcjonalnie podobnych, powtarzających się podjednostek ułożonych wzdłuż ciągłej nici DNA. Podjednostki te mają zdolność do wiązania tubuliny oraz mikrotubul, a na ich zewnętrznej powierzchni stwierdzono obecność cytoplazmatycznych dynein, białek związanych z ruchem chromosomów. Pewne elementy tego modelu zostały w późniejszych badaniach podważone np: obecność DNA potwierdzono jedynie w wewnętrznej płytce kinetochoru, a nie w obu płytkach, jak przyjmował model [9], ponadto nowsze badania wykazały, że rozmieszczenie elementów fibrylarnych o grubości 10-20 nm jest w dużym stopniu nieregularne, podczas gdy model zakładał regularne ułożenie elementów w zewnętrznej płytce kinetochoru [50]. Model Zinkowskiego [86] został potwierdzony doświadczalnie przez Khodjakova i współaut. [34]. Połączenie się pojedynczego kinetochoru z mikrotubulami biegnącymi z dwóch przeciwstawnych biegunów wrzeciona i osiągnięcie przez chromosom kongresji wskazało, że pojedynczy kinetochor złożony jest z wielu domen. Domeny te mogą znajdować się w różnym stanie funkcjonalnym, jedne związane są z ruchem dobiegunowym, a więc ze skracaniem mikrotubul, inne z ruchem odbiegunowym czyli z wydłużaniem się mikrotubul. Działanie poszczególnych domen jest więc niezależne od siebie.

CHROMOSOMY HOLOKINETYCZNE I KINETOCHOR ROZPROSZONY

Występowanie

Kinetochor niezlokalizowany został opisany zarówno u zwierząt jak i roślin. Stwierdzano jego obecność w chromosomach niektórych gatunków robaków obłych, pajęczaków z rzędu *Acarina*, owadów z rzędów *Hemiptera*, *Lepidoptera*, *Trichoptera*, a także u protistów zwierzęcych (orzęski) [zob. 44 i cyt. tam lit.]. W świecie roślin obecność kinetochoru niezlokalizowanego podawano zarówno dla protistów roślinnych (*Spirogyra*), niektórych rodzajów *Desmidiaceae*, jak i u roślin kwiatowych [zob. 44 i cyt. tam lit.]. Wśród roślin jednoliściennych chromosomy holokinetyczne opisywano w rodzinach: *Cyperaceae* w rodzajach: *Eleocharis*, *Cyperus*, *Carex*, *Rhynchospora* [6,22,40,41,43,78-81], *Juncaceae* w rodzaju *Luzula* [5,6,7,55,56] oraz *Liliaceae* u *Chionographis* [74]. U roślin dwuliściennych zostały opisane u *Myristicaceae* [14], *Cuscutaceae* [16,21,62,63,] i *Droseraceae* [68].

Sugerowano również występowanie kinetochoru dyfuzyjnego u innych organizmów roślinnych i zwierzęcych np.: u glonów z rodziny *Zygnemaceae*, u roślin wyższych z rodzin *Musaceae* i *Zingiberaceae*, u wijów z rzędu *Chilopoda*, owadów z rzędów *Odonata*, *Mallophaga*, *Anoplura* i *Dermaptera* oraz u pajęczaków z rzędów *Scorpionidea* i *Acarina* jednak informacje te nie zostały udokumentowane [zob. 44 i cyt. tam lit.]

Budowa chromosomu holokinetycznego i rozmieszczenie heterochromatyny

Większość badań nad kinetochorami dotyczyła chromosomów z kinetochorem zlokalizowanym u ssaków, stąd też kinetochor niezlokalizowany jest poznany w znacznie mniejszym stopniu. Jego pochodzenie, struktura, występowanie stanowią wciąż otwarty problem.

Pierwsze obserwacje nad chromosomami holokinetycznymi prowadzone były przy użyciu mikroskopu świetlnego i dotyczyły chromosomów mitotycznych i mejotycznych. W latach 70-tych zaczęto analizować strukturę kinetochoru niezlokalizowanego w mikroskopie elektronowym. Do badań tych należą m. in. obserwacje kinetochoru *Luzula purpurea* i *Cyperus alternifolius*, *Oncopeltus fasciatus*, *Spirogyra majuscula*, *Luzula nivea*, *Luzula echinata*, *Bombyx mori* i *B. mandarina*, *Eumeta variegata*, *Caenorhabditis elegans*, *Agallia constricta*, *Parascaris equorum* [zob. 44 i cyt. tam lit.]

Morfologia kinetochoru niezlokalizowanego jest różnorodna. Zazwyczaj kinetochor rozproszony przyjmuje postać materiału fibrylarnego, mniej elektronowo gęstego niż chromatyna, rozciągającego się w formie pręta wzdłuż chromosomu. U *Luzula purpurea*, *L. echinata* i *L. nivea* dobrze widoczny materiał kinetochorowy jest umiejscowiony we wgłębieniach chromatyny; u *Cyperus alternifolius* materiał kinetochorowy jest trudny do zaobserwowania [6,7,5,44,45]. Kinetochor dyfuzyjny może mieć taką samą, bądź odmienną strukturę w chromosomach mitotycznych i mejotycznych. Zagadnienia te zostały szczegółowo omówione w pracy przeglądowej [44].

Późniejsze badania wykazały znaczące różnice w składzie makromolekularnym między kinetochorem zlokalizowanym i niezlokalizowanym [19]. Autorzy stwierdzili brak DNA w trójwarstwowym dyfuzyjnym kinetochorze *Graphosoma italicum* oraz różnice w proporcji białek w poszczególnych warstwach tego kinetochoru. Natomiast ilość rybonukleoprotein była podobna.

Analiza kariotypu ma duże znaczenie w badaniach nad mechanizmami ewolucji. Umożliwia ustalenie przyczyn zmian strukturalnych chromosomów, co z kolei pozwala określić kierunki różnicowania się kompleksów chromosomowych w różnych grupach roślin.

Ze względu na brak centromeru, a często także przewężenia wtórnego w chromosomach holokinetycznych, opracowanie kariotypu w celach diagnostycznych, przy zastosowaniu metod standardowych, jest praktycznie niemożliwe, sprowadza się jedynie do ustalenia długości chromosomów. Podjęto więc prace nad zbadaniem struktury chromosomów holokinetycznych, wykorzystując metody różnicowego barwienia. Badania te miały także odpowiedzieć na pytanie, czy w drodze ewolucji prowadzącej do powstania chromosomów holokinetycznych, zmieniała się ilość i rozmieszczenie heterochromatyny oraz jej molekularny skład. Szczególnie interesujące jest zagadnienie dotyczące braku heterochromatyny centromerowej, wynikające z nieobecności przewężenia pierwotnego w tym typie chromosomów. Wiadomo bowiem, że w odcinkach przy centromerze u wielu roślin występuje wyraźny blok heterochromatyny.

Zastosowano wiele różnorodnych technik różnicowego barwienia do analizy struktury chromosomów holokinetycznych u zwierząt, w tym prążki C, G, R, NOR, CMA3, DAPI [4,48,49]. Znacząca okazała się również metoda wysrebrzania organizatorów jąderki (NOR).

Wśród roślin analizowano rozmieszczenie heterochromatyny w chromosomach holokinetycznych *Luzula* [8,64], *Drosera* [68], *Rhynhospora* [78] oraz *Cuscuta* [21]. W przypadku *Luzula* wyniki znacznie odbiegały od podawanych dla *Drosera*, *Rhynhospora* i *Cuscuta* oraz dla organizmów zwierzęcych. Różnice dotyczyły lokalizacji heterochromatyny. Z badań nad *Luzula* wynikało, że liczba prążków C jest zmienna. W profazie i prometafazie liczba prążków była wyższa niż w metafazie, co wynikało wg autorów z faktu, że prążki C uległy fuzji w metafazie, natomiast w mniej skróconych chromosomach profazowych i prometafazowych były rozproszone. Wydaje się, że zastosowane metody barwienia były niedopracowane, a uzyskane wyniki nieprawidłowe. Inne prace donoszą, że w chromosomach holocentrycznych bloki heterochromatynowe mają ściśle określoną lokalizację w regionach telomerowych, w telomerach, jak również w partiach centralnych chromosomów (w przypadku chromosomów holokinetycznych nie można określać prążków rozmieszczonych wzdłuż chromosomu jako prążków interkalarnych, bowiem ten typ chromosomu nie ma wyodrębnionych ramion) np. u *Drosera* [68], *Rhynhospora* [78], *Cuscuta* [21] oraz *Luzula* (niepublikowane dane autorów niniejszej pracy). Taka lokalizacja prążków C nawiązuje do wzoru rozkładu heterochromatyny w chromosomach monocentrycznych.

Chromosomy holokinetyczne różnych taksonów roślinnych zostały zbadane również pod względem składu i rozmieszczenia sekwencji tandemowych DNA (rDNA) oraz sekwencji telomerowych [8,21].

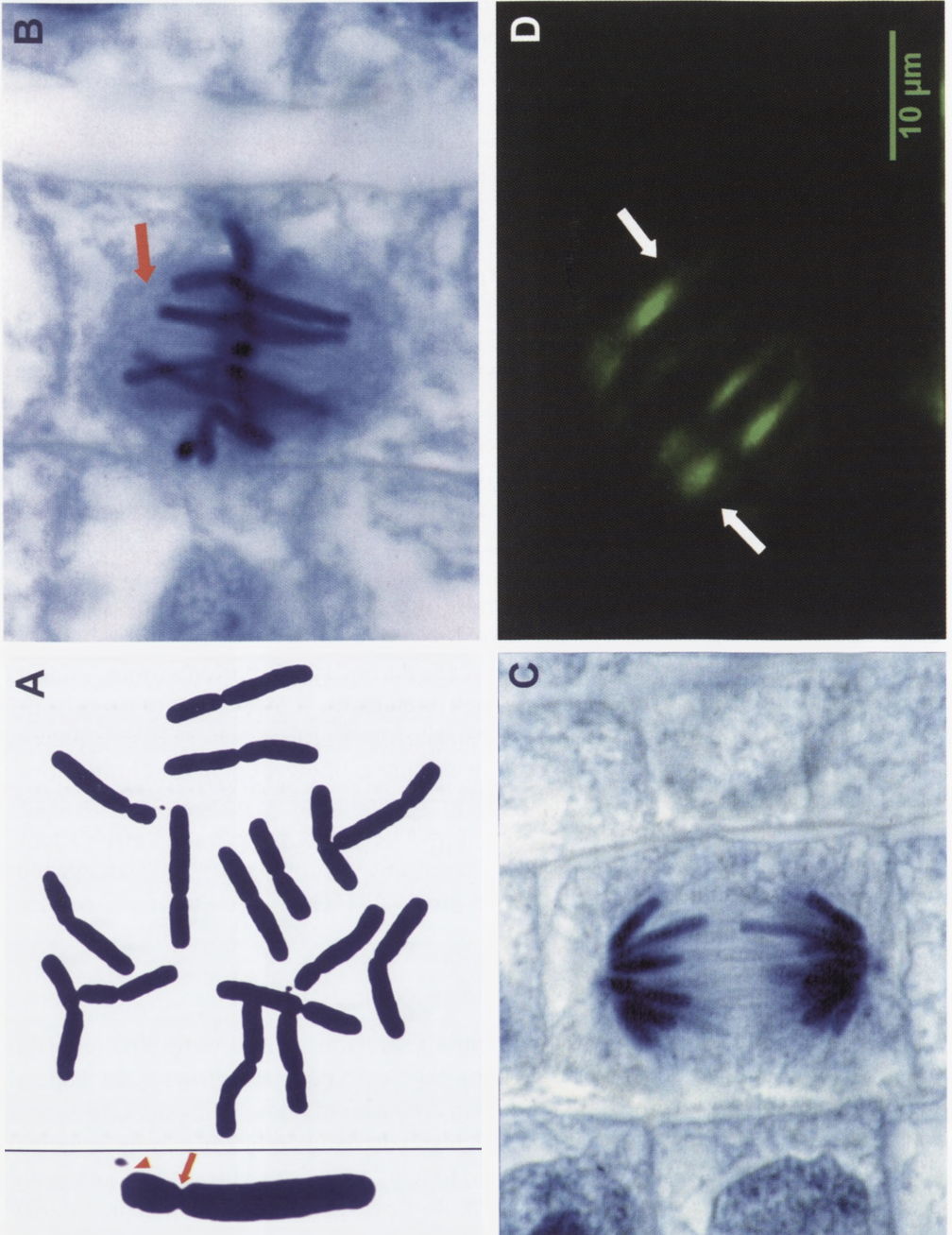
Zachowanie się chromosomów holokinetycznych w mitozie

Podczas mitozy chromosomy holokinetyczne zachowują się odmiennie od chromosomów monocentrycznych (ryc. 1, 2), co wynika z miejsca przyczepu mikrotubul. W chromosomach monocentrycznych mikrotubule są przyczepione w rejonie przewężenia pierwotnego (ryc. 1D); w czasie anafazy chromatydy mają charakterystyczny kształt litery U (ryc. 1B, C). W chromosomach holokinetycznych mikrotubule są rozmieszczone wzdłuż całego chromosomu (ryc. 2B, D), co wynika z położenia kinetochoru; w anafazie chromatydy są ułożone równolegle do płaszczyzny równikowej wrzeciona (ryc. 2B, C). Ponadto, chromosomy holokinetyczne są ze sobą ściśle połączone, tworząc w metafazie pojedynczą płytkę umiejscowioną w płaszczyźnie równikowej (ryc. 2B). We wczesnej anafazie płytka ta dzieli się synchronicznie wzdłuż swojej osi na dwie siostrzane płytki (ryc. 2C). W trakcie anafazy płytki przesuwają się równolegle do siebie, a prostopadle do osi wrzeciona. Struktura płytki utrzymuje się aż do telofazy [zob. 44,45 i cyt. tam lit.].

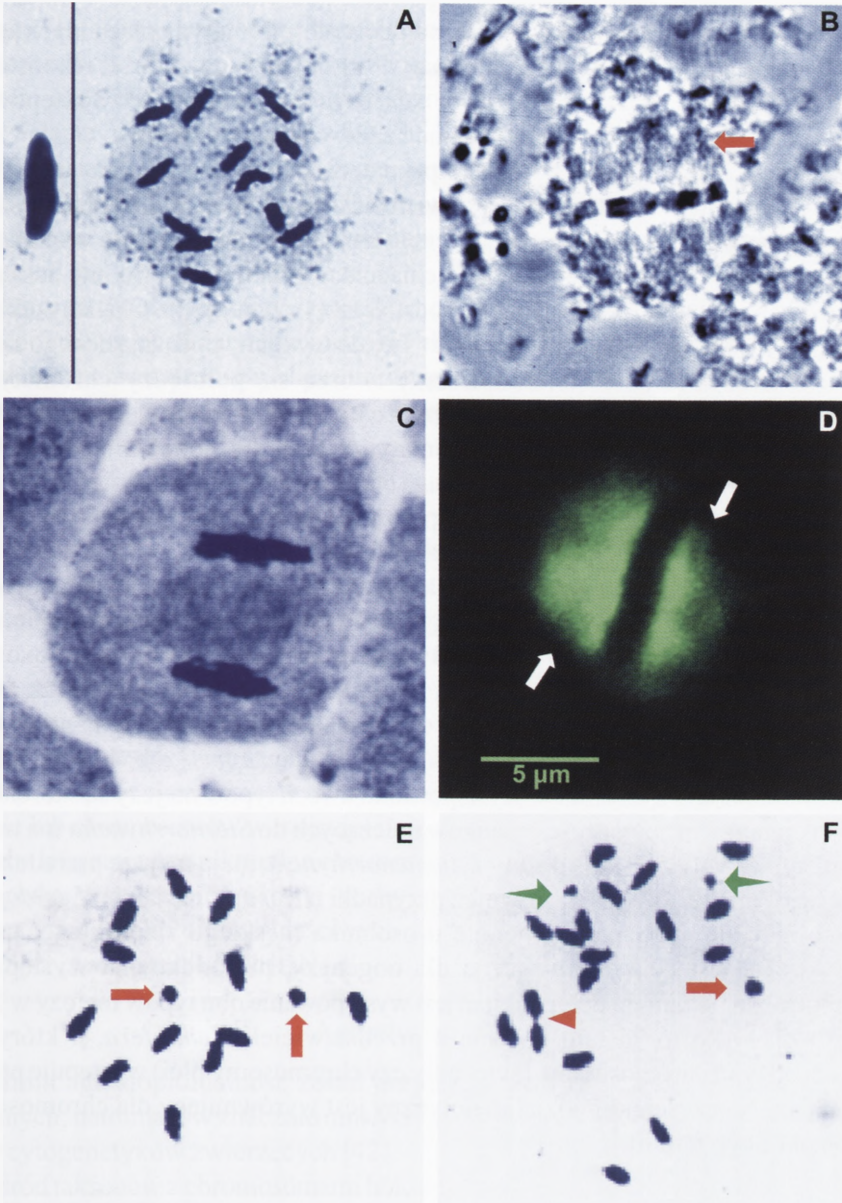
Barwienie immunofluorescencyjne tubuliny zastosowane do analizy mitozy chromosomów mono- i holokinetycznych, uwidoczniło mikrotubule wrzeciona podziałowego, potwierdzając charakterystyczne dla obu typów chromosomów miejsca przyczepu mikrotubul [45]. W komórkach metafazowych *A. cepa* (chromosomy monocentryczne) mikrotubule skupione w wiązki o różnej grubości (ryc. 1D)) znajdowały się w płaszczyźnie równikowej komórki, w rejonie zajmowanym przez chromosomy metafazowe. Większość wiązek mikrotubul przebiegało symetrycznie po obu stronach płaszczyzny równikowej, co świadczy o przynależności wiązek do kinetochorów siostrzanych. Mikrotubule wrzeciona *L. luzuloides* (chromosomy holokinetyczne) odznaczały się małą długością i równomiernym rozmieszczeniem wzdłuż płaszczyzny równikowej komórki (ryc. 2D).

Mejoza odwrócona

U organizmów z monocentrycznymi chromosomami mejoza określana jest jako preredukcyjna, ponieważ podział redukcyjny poprzedza podział wyrównujący. Podział redukcyjny odnosi się do podziału, w którym chromosomy homologiczne koniugują i rozdzielają się. W rezultacie w anafazie dochodzi do redukcji liczby chromosomów o połowę. U organizmów z kinetochorem dyfuzyjnym zaobserwowano, że kolejność podziałów w mejozie jest odwrócona [zob. 44 i cyt. tam lit.]. W tym typie mejozy chromatydy siostrzane segregują w podziale pierwszym (podział wyrównujący), a chromatydy homologiczne w drugim podziale mejotycznym (podział redukcyjny). Taki przebieg mejozy potwierdzają liczne obserwacje cytologiczne. Chromosomy homologiczne koniugują w profazie, w diakinezie obserwowane są chiazmy (zob. 44 i cyt. tam lit). Całkowita terminalizacja chiazm następuje dopiero w metafazie I. W tej



RYCINA 1. Chromosomy monocentryczne *Allium cepa* ($2n = 16$) w mitozie: A – płytka metafazowa; w powiększeniu chromosom akrocentryczny z widocznym przewężeniem pierwotnym (strzałka) i przewężeniem wtórnym (główka strzałki); B – metafaza, charakterystyczny układ chromosomów w płytce metafazaowej, widoczne włókna wrzeciona (strzałka); C – anafaza; D – mikrotubule wrzeciona (strzałki) uwidocznione przy zastosowaniu przeciwciał anty- α -tubulinowych (wg Madej 1998 za zgodą redakcji *Acta Biol Cracov Bot*)



RYCINA 2. Chromosomy holokinetyczne *Luzula* w mitozie: A – płytkę metafazowa *L. nivea* ($2n = 12$); w powiększeniu chromosom holokinetyczny bez przewężenia pierwotnego; B – metafaza w mikroskopie kontrastowo-fazowym, charakterystyczny układ chromosomów w płytce metafazowej, widoczne włókna wrzeciona (strzałka); C – anafaza; D – mikrotubule wrzeciona (strzałki) uwidocznione przy zastosowaniu przeciwciał anti- α -tubulinowych; E-F – chromosomy metafazowe *L. luzuloides* w komórkach kalusa: E – $2n = 16$, widoczne chromosomy BL (czerwone strzałki) powstałe w wyniku fragmentacji chromosomów standardowych AL; F – $2n = 21$, widoczny chromosom BL (czerwona strzałka) oraz mniejsze chromosomy CL powstałe w wyniku fragmentacji chromosomów BL (zielone strzałki); widoczna fuzja *end-to-end* dwóch chromosomów (główka strzałki). Ryc. B oraz D-F, odpowiednio wg Madej 1998 i Madej, Kuta 2001 za zgodą redakcji *Acta Biol Cracov Bot.*

fazie mejozy dochodzi do przedwczesnego rozdziału chromatyd, w wyniku czego biwalenty są widoczne w postaci czterech, oddzielnych chromatyd połączonych ze sobą jedynie telomerami. Taką odrębność chromatyd siostrzanych potwierdza rekonstrukcja kolejnych skrawków biwalentu *Luzula echinata* wskazująca na występowanie niezależnych obszarów kinetochorowych na każdej chromatydzie [6].

W anafazie I, pary chromatyd leżące po przeciwstawnych stronach płaszczyzny równikowej przyjmują kształty będące ich zwierciadlanym odbiciem. Taki obraz wskazuje na wyrównujący typ podziału. Pozostałości chiazmy są jeszcze widoczne w anafazie I i zostały nazwane przez Nordenskiöld [57] chiazmami reliktowymi. Są one następnym dowodem przemawiającym za pierwszym podziałem wyrównującym. Chiazmy reliktowe świadczą o tym, że chromatydy, w których doszło do wymiany podążają do tego samego bieguna. Ponieważ uważa się, że chiazmy tworzą się pomiędzy chromatydami niesiostrzanych, to w tym przypadku segregacja chromatyd w miejscu powstania chiazmy dotyczyła chromatyd siostrzanych. Chromatydy łączą się ponownie w interfazie. Postredukcja wynika z odpowiedniego ułożenia chromosomów w metafazie I określanego jako auto-orientacja (*auto-orientation*) lub położenie równikowe: biwalenty ułożone są pod kątem prostym do dłuższej osi wrzeciona [zob. 44 i cyt. tam lit.].

Ogólnie uznaje się, że mejoza postredukcyjna jest ściśle związana z kinetochorem niezlokalizowanym. Jak od każdej reguły, są wyjątki, czego potwierdzeniem jest występowanie z jednej strony tego zjawiska u organizmów z chromosomami monocentrycznymi np. u pluskwiaka *Dysdercus intermedius*, z drugiej zaś brak mejozy odwróconej u niektórych organizmów z chromosomami holokinetycznymi np. u dwóch gatunków jedwabników oraz u dwóch gatunków *Chionographis* [zob. 44 i cyt. tam lit.]. U owadów z *Homoptera*, różnice w występowaniu dwóch typów mejozy są skorelowane z grupą taksonomiczną np. część gatunków należących do *Sternorrhyncha* ma mejozę postredukcyjną, podczas gdy taksony z *Auchenorrhyncha* mają mejozę prereduksyjną [zob. 44 i cyt. tam lit.]. Znanie są również przypadki u *Hemiptera*, jak i u *Lepidoptera*, u których mejoza przebiega odmiennie u osobnika męskiego i żeńskiego; mejoza postredukcyjna jest charakterystyczna dla oogenezy, prereduksyjna występuje w spermatogenezie. Skrajnym przypadkiem jest występowanie obu typów mejozy w jednej komórce. Zjawisko to zostało opisane u przedstawicieli *Hemiptera*, u których w zależności od typu chromosomów (autosomy czy chromosomy płci) występuje pre- lub postredukcja. Najczęściej I podział mejotyczny jest wyrównujący dla chromosomów płci [zob. 44 i cyt. tam lit.].

MUTACJE STRUKTURALNE I LICZBOWE CHROMOSOMÓW HOLOKINETYCZNYCH *IN VIVO*

Chromosomy holokinetyczne podlegają mutacjom punktowym oraz powszechnym aberracjom strukturalnym charakterystycznym dla chromosomów monokinetycznych, do których należą delecje i deficjencje, translokacje, duplikacje. Ponadto chromosomy holokinetyczne mogą ulegać fragmentacji (agmatoploidność) i fuzjom (symploidność).

Mechanizm agmatoploidalności oraz symploidalności nie jest jeszcze dokładnie poznany. Interesujące jest, że agmatoploidalność pierwotnie uważano za proces fragmentacji chromosomów na dwa równe fragmenty [42]. Jednakże badania wpływu promieni X na chromosomy holokinetyczne *Drosera* i *Luzula* dowiodły, że możliwe jest powstanie fragmentów różnej wielkości [42,68]. Z analizy cytologicznej merystemu liściowego i kalusa *L. luzuloides* wynika, że rzeczywiście fragmentacja może prowadzić do powstania dwóch fragmentów o nierównej długości [46]. Sheikh i Kondo [68] wykazali, że chromosomy *Drosera* mają „słabe punkty”, w których łatwo może dochodzić do pęknięć. Być może te „słabe punkty” odpowiadają segmentom heterochromatynowym, które wykazują podatność na pęknięcia. Ponadto badania lokalizacji heterochromatyny w rodzaju *Drosera* [68] oraz *L. sylvatica* [dane niepubl.] dowodzą, że chromosomy tych roślin mają zarówno heterochromatynę telomerową, jak i w innych regionach chromosomu, która teoretycznie mogłaby być odpowiedzialna za ich fragmentację.

Telomerowe segmenty heterochromatynowe wpływają także na formowanie się asocjacji *end-to-end* oraz chromosomów policentrycznych, często bez widocznego ubytku w zawartości heterochromatyny. Istnienie interkalarnych sekwencji telomerowych, będących konsekwencją fuzji chromosomów monocentrycznych, stwierdzono u niektórych organizmów roślinnych i zwierzęcych zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* [15,32].

Organizmy z chromosomami holokinetycznymi podlegają również mutacjom liczbowym genomu polegającym na zmniejszeniu, bądź zwiększeniu liczby chromosomów o pojedyncze chromosomy, prowadzącym do aneuploidalności. U podstaw aneuploidalności *sensu stricto* (z wyłączeniem częściowej agmatoploidalności i symploidalności) leży aneusomatyczność (zmiany w liczbie chromosomów są wynikiem zakłóceń w rozchodzeniu się chromatyd w mitozie lub chromosomów w mejozie) oraz dysploidalność zstępująca lub wstępująca (u podstaw leżą zmiany strukturalne chromosomów prowadzące odpowiednio do obniżenia bądź podwyższenia podstawowej liczby chromosomów). Znane są również przykłady występowania poliploidów właściwych (zwielokrotnienie liczby genomów, któremu towarzyszy zwiększenie ilości DNA).

Agmatoploidalność

Termin agmatoploidalność został przyjęty i jest stosowany przez cytogenetyków roślinnych, natomiast w znacznie mniejszym stopniu pojęcie to zostało zaakceptowane przez cytogenetyków zwierzęcych [42].

Wśród taksonów z chromosomami holokinetycznymi oprócz poliploidów właściwych i aneuploidów występują agmatoploidy częściowe, będące skutkiem fragmentacji pojedynczych chromosomów holokinetycznych oraz agmatoploidy całkowite, powstające w wyniku fragmentacji całych genomów [42]. W konsekwencji, zjawisko to powoduje wzrost liczby odpowiednio mniejszych o połowę chromosomów i powstanie nowego cytotypu, różniącego się zarówno liczbą jak i wielkością chromosomów od blisko spokrewnionych gatunków (cytotypów) z niższymi liczbami chromosomów. Zależność tą w rodzaju *Luzula* opisała Nordenskiöld [55,56].

Ze względu na występowanie agmatoploidalności, ustalenie samej liczby chromosomów okazuje się niewystarczające do wyznaczenia poziomu ploidalnego gatunków. Wiele gatunków np. w rodzaju *Luzula* posiada tetraploidalną liczbę chromosomów $2n = 24$, ale należą one do poziomu diploidalnego, ponieważ wszystkie chromosomy są o połowę mniejsze od chromosomów standardowych. W przypadku *Luzula* ploidalność badanych gatunków ustalano różnymi metodami. Jedną z nich było mierzenie długości chromosomów; można również obliczać objętość genomu, ustalając zawartość jądrowego DNA mikrodensytometrycznie, bądź cytometrycznie [35]. U diploidów i właściwych poliploidów chromosomy metafazowe powinny być mniej więcej tej samej długości (określane w rodzaju *Luzula* jako AL), podczas gdy u agmatoploidów znacznie krótsze (o połowę w przypadku chromosomów BL; w przypadku chromosomów CL stanowią 1/4 chromosomu AL).

Holokinetyczna natura chromosomów umożliwia istnienie agmatoploidów, bowiem zapobiega eliminacji nowo powstałych fragmentów. Rolę agmatoploidalności w powstawaniu nowych gatunków i cytotypów potwierdzają obserwacje mejozy. W mejozie mieszańców międzygatunkowych *Luzula* o tym samym lub różnym stopniu ploidalności i różnej wielkości chromosomów [56] oraz u gatunków *Carex*, posiadających nieparzyste, aneuploidalne liczby chromosomów [40,41], tworzą się multiwalenty złożone z większego chromosomu i dwóch lub większej liczby odpowiednio mniejszych chromosomów.

W rodzaju *Carex* znane są liczby chromosomów dla wielu gatunków [zob. 24 i cyt. tam lit.]. Wykazano, że tworzą one rozległe serie aneuploidalne (od $n = 6$ do $n = 68$), co wskazuje na ważną rolę tego zjawiska w ewolucji rodzaju *Carex*. Na podstawie analizy morfologii i zachowania się chromosomów w mejozie stwierdzono, że aneuploidalność u *Carex* jest wynikiem agmatoploidalności.

Fragmentacja/fuzja chromosomów nie jest jednakowo rozpowszechniona wśród organizmów z chromosomami holokinetycznymi. Agmatoploidalność częściowa i symploidalność częściowa występuje z dużą częstotliwością u *Carex* [41], ale nie obserwuje się tych zjawisk u *Rhynchospora* [43] i *Cuscuta* [62]. Agmatoploidalność całkowita jest typowa dla rodzaju *Luzula*. U *Droseraceae* sugeruje się występowanie agmatoploidalności częściowej w przypadku niektórych gatunków [68].

Związek agmatoploidalności i ewolucji nie jest jasny. Jedynie z badań cytologicznych nad japońskimi populacjami *Carex conica*, $2n = 32, 34, 36-38$ [24] oraz hiszpańskimi populacjami *C. laevigata*, $2n = 69-80$ [41] można wnioskować o adaptacyjnej wartości agmatoploidalności: rozmieszczenie poszczególnych cytotypów jest silnie skorelowane z szerokością geograficzną.

Symploidalność

Na zmienność kariologiczną organizmów posiadających chromosomy holokinetyczne mają także wpływ fuzje chromosomów określane jako zjawisko symploidalności. Podobnie jak agmatoploidalność zjawisko to dotyczy pojedynczych chromosomów w kompleksie, wówczas nosi nazwę symploidalności częściowej lub dotyczy wszystkich chromosomów, co określa się mianem symploidalności całkowitej [42].

U danego gatunku może dojść zarówno do fragmentacji jak i do fuzji chromosomów, co odzwierciedla się w liczbie chromosomów i kariotypie. Na przykład *Carex divulsa* posiada trzy cytotypy $2n = 57, 58, 59$, przy czym liczba chromosomów $2n = 57$ powstała w wyniku symploidalności częściowej, a $2n = 59$ w wyniku agmatoploidalności częściowej. W przypadku niektórych kariotypów nie jest pewne, czy powstały one w wyniku fragmentacji chromosomów należących do kariotypu o niższej liczbie chromosomów, czy w wyniku fuzji z kariotypu o wyższej liczbie chromosomów. Tak jest w przypadku *L. oresta* $2n = 20, 22$, czy *L. spicata* $2n = 12, 14, 24$.

Symploidalność całkowita prawdopodobnie doprowadziła do powstania gatunków z bardzo niską liczbą chromosomów. U *L. purpurea* ($2n = 6$) chromosomy są trzykrotnie większe od chromosomów gatunków z $2n = 12$ [55,56]. Rośliną z najniższą liczbą chromosomów holokinetycznych jest *Rhynchospora tenuis* ($2n = 4$). Liczba ta powstała z cytotypu $2n = 8$ przez symploidalność całkowitą [79]. W rodzaju *Rhynchospora* (*Cyperaceae*) przyczyną powstawania serii aneuploidalnych są strukturalne zmiany wywołane przez fuzję chromosomów [41].

CHROMOSOMY HOLOKINETYCZNE W KULTURZE KALUSA

Badania cytologiczne kalusa uzyskanego w kulturach *in vitro* różnych tkanek roślinnych dotyczą głównie gatunków roślin posiadających chromosomy monocentryczne. Niestabilność chromosomów w kulturach tkanek *in vitro*, jak również hipotezy dotyczące mechanizmów warunkujących zmienność genetyczną komórek, zostały przedstawione w licznych artykułach przeglądowych [zob. 46 cyt. tam lit.]. Zmienność indukowana w kulturach *in vitro* obejmuje powstanie komórek poliploidalnych, haploidalnych, aneuploidalnych, strukturalne mutacje chromosomów, mutacje genowe, różnicową replikację DNA oraz zakłócenia procesu mitozy.

Bardzo nieliczne są doniesienia o różnicowaniu kariologicznym w komórkach kalusa wyprowadzonego z tkanek taksonów mających chromosomy holokinetyczne i dotyczą one głównie rodzaju *Luzula* [46,71]. W komórkach kalusa, uzyskanego z merystemu liściowego przedstawicieli rodzaju *Luzula*, obserwowano dużą zmienność kariologiczną. U *L. multiflora* ($2n = 36$) występowały komórki aneuploidalne i mutacje strukturalne chromosomów; u diploidalnego gatunku *L. luzuloides* ($2n = 12$) występowały dodatkowo komórki poliploidalne, a zakres liczb chromosomów w komórkach kalusa wahał się od $2n = 7$ do $2n = 48$. Z danych tych wynika, że chromosomy z kinetochorem dyfuzyjnym nie wykazują większej stabilności w kulturze kalusa od chromosomów monocentrycznych [46]. Mutacje strukturalne chromosomów wraz z zaburzeniami przebiegu mitozy doprowadziły do powstania aneuploidalnych liczb chromosomów (aneuploidalność *sensu lato* obejmuje aneusomatyczność, dysploidalność, agmatoploidalność częściową, symploidalność częściową) reprezentowanych przez różne kariotypy. Obok liczb aneuploidalnych na poziomie diploidalnym i poliploidalnym, w komórkach kalusa występowały liczby poliploidalne (euploidalne) powstałe w wyniku

poliploidalności właściwej (autopoliploidalności) i agmatoploidalności, przy czym zjawisko agmatoploidalności całkowitej występowało z niską frekwencją [46]. Rzadkość tego zjawiska w komórkach kalusa wskazuje, że chociaż jest to zjawisko typowe dla *Luzula in vivo* (obserwowane było we wszystkich sekcjach rodzaju), to w warunkach hodowli *in vitro* odgrywa marginalną rolę. Prawdopodobnie też różne gatunki *Luzula* wykazują różną tendencję do fragmentacji całego zestawu chromosomów.

Do najczęściej obserwowanych mutacji strukturalnych chromosomów w komórkach kultury *in vitro* roślin z chromosomami monocentrycznymi zalicza się aberracje chromosomowe typu: asocjacje *end-to-end*, powstawanie chromosomów dicentrycznych, policentrycznych, charakterystycznych chromosomów pierścieniowych, ponadto zdarzają się delecje, duplikacje, translokacje. Znacznie rzadziej występują aberracje chromatydowe [11-13, 31,32, 82,83]. W komórkach kalusa *L. luzuloides* obserwowano większość z powyższych mutacji, w tym asocjacje *end-to-end*, fragmentacje (agmatoploidalność), delecje, translokacje, fuzje chromosomów (symploidalność) [46].

W komórkach kalusa *L. luzuloides* na szczególną uwagę zasługują agmatoploidalność częściowa i symploidalność częściowa, a więc odpowiednio fragmentacja i fuzja chromosomów (ryc. 2E,F). W przypadku chromosomów monocentrycznych fragmentacja chromosomów często prowadzi do powstania licznych wtórnych aberracji. Wiąże się to z powstaniem wolnych końców chromosomów i skłonnością do fuzji z innymi fragmentami chromosomów, w wyniku czego tworzą się chromosomy dicentryczne, które najczęściej prowadzą do powstania mostów w anafazie i wchodzi w cykl pęknięcie-fuzja-most. Konsekwencją fragmentacji jest też powstanie mikrojąder widocznych w jądrach interfazowych. Wykazano, że pęknięcia dotyczą określonych chromosomów i następują w specyficznych miejscach chromosomu, szczególnie w rejonie zawierającym heterochromatynę [82,83,87]. Mechanizmem prowadzącym do pęknięć jest wg Lee i Phillips [38] opóźniona replikacja heterochromatyny. Warunki *in vitro* często prowadzą do rozsynchronizowania przebiegu fazy S cyklu mitotycznego. Na niedokończenie replikacji DNA narażone są głównie regiony heterochromatynowe. Wiele wskazuje, że mechanizm agmatoploidalności i symploidalności zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* może opierać się na udziale heterochromatyny w samoistnych pęknięciach i fuzjach chromosomów. Wahania w częstotliwości tych zjawisk w warunkach kultury kalusa mogą dodatkowo wynikać z opóźnionej replikacji heterochromatyny na skutek zmian metabolicznych komórek, a więc i zaburzeń w fazie S.

W większości badań przeprowadzonych na różnych gatunkach roślin z chromosomami monokinetycznymi, w kulturach długoterminowych, zmienność genetyczna komórek nasila się w miarę trwania kultury [18,30,32,46,47,82,83]. Zjawisko to może dotyczyć frekwencji aberracji chromosomowych, jak również poziomu i częstotliwości pojawiania się komórek poliploidalnych. Ograniczenie, bądź wzmoczenie proliferacji określonych linii komórkowych (linii o określonym składzie komórkowym) warunkuje w dużym stopniu skład pożywki, a także fizyczny stan pożywki. W rezultacie linie o danym kariotypie uzyskują przewagę liczbową w danych warunkach hodowli.

Odminną sytuację stwierdzono w przypadku komórek kalusa *L. luzuloides*. Nie obserwowano stopniowego wzrostu udziału komórek z jakimkolwiek typem zmienności. Nie występowała liniowa zależność między zmiennością liczbową (poliploidalność,

aneuploidalność), czy strukturalną (agmatoploidalność, symploidalność) a czasem trwania hodowli. Liczba komórek z kariotypem standardowym zmniejszyła się gwałtownie w kilku analizowanych próbach, jednak w następnych miesiącach znów była wysoka i dominująca nad komórkami ze zmienionymi kariotypami. Skoki liczby komórek z poszczególnymi typami zmienności stanowią zasadniczą różnicę w porównaniu z kulturami *in vitro* roślin z chromosomami monocentrycznymi [46].

MUTACJE LICZBOWE CHROMOSOMÓW HOLOKINETYCZNYCH A ILOŚĆ DNA

Większość prac nad zawartością jądrowego DNA dotyczy taksonów z chromosomami monocentrycznymi; stosunkowo niewiele wiadomo o zmienności w ilości jądrowego DNA u roślin z chromosomami holokinetycznymi, chociaż stanowią bardzo ciekawy obiekt takich badań, bowiem dla chromosomów holokinetycznych charakterystyczne są mutacje strukturalne chromosomów podwyższające liczbę chromosomów (agmatoploidalność), bądź obniżające liczbę chromosomów (symploidalność), czemu nie towarzyszą zmiany w ilości jądrowego DNA. Wiele prac poświęcono kariologicznemu różnicowaniu taksonów roślinnych z chromosomami holokinetycznymi [zob. 35,46 i cyt. tam lit.] natomiast jest bardzo mało danych na temat korelacji tego różnicowania ze zmiennością w ilości jądrowego DNA. Prace na ten temat dotyczyły głównie gatunków z rodzaju *Luzula*. Chociaż badano ilość jądrowego DNA u tych samych gatunków, to podawane wartości jądrowego DNA (2C) były różne w zależności od autorów, co wynikało głównie z zastosowanych technik. Powszechnie wiadomo, że różnice w ilości jądrowego DNA mogą wynikać z zastosowanej metody, a szczególnie użytych barwników, a nie z faktycznej zmienności [59]. Halkka [23] podał wielkość genomu (2C) dla dwóch gatunków *Luzula*: *L. luzuloides* ($2n = 12$; 3.338 pg) i *L. multiflora* ($2n = 36$; 6.264 pg). Nieco później Barlow and Nevin [2] ustalili dla tych samych gatunków zupełnie inne wartości 2C. Dla *L. luzuloides* wartość 2C była niższa i wynosiła 2.34 pg zaś dla *L. multiflora* prawie trzykrotnie niższa niż podał Halkka [23] i wynosiła 1.90 pg (1964). Dodatkowo autorzy podali wartość 2C dla *L. nivea* (1.84 pg). Sen i współaut. [71] ustalili ilość jądrowego DNA dla 6 gatunków *Luzula*, podając 3.025 pg dla *L. nivea* i 3.515 pg dla *L. luzuloides*. Równocześnie autorzy zaobserwowali niską zmienność w wielkości genomu u *L. nivea* natomiast bardzo wysoką u *L. luzuloides* (i 4 pozostałych gatunków). Takie same wyniki dla *L. luzuloides* i *L. nivea* uzyskali Mukherjee i współaut. [53]. Należy podkreślić, że autorzy powyższych prac ustalali ilość jądrowego DNA cytofotometrycznie, stosując barwienie wg metody Feulgena. na podstawie danych dotyczących liczb chromosomów i ilość DNA w komórkach kalusa i korzenia badanych gatunków *Luzula*, Sen i współaut. [71] stwierdzili, że dużemu różnicowaniu kariologicznemu nie towarzyszy zmienność w ilości DNA, stąd wynikało jasno, że zmienność w liczbach chromosomów związana jest z fragmentacją bądź fuzją chromosomów kompleksu, bowiem tego typu mutacje nie mają wpływu na wartość DNA.

Ostatnio, do ustalenia ilości jądrowego DNA stosuje się bardziej precyzyjne techniki, do których zaliczyć należy cytometrię przepływową z wykorzystaniem barwników fluorescencyjnych (jodek propidyny, DAPI) [54,59].

Ilość jądrowego DNA ustalona przy wykorzystaniu cytometrii przepływowej i barwieniu jąder jodkiem propidyny i DAPI dla trzech, uprzednio badanych, gatunków *Luzula* (*L. luzuloides*, *L. nivea*, *L. multiflora*) wynosiła: 1.584 pg dla *L. luzuloides*, 1.566 pg dla *L. nivea* i 3.034 pg dla *L. multiflora*. Wyraźnie widać, że wartości te są dla *L. luzuloides* i *L. nivea* prawie dwukrotnie niższe w stosunku do wyników poprzednich badaczy, oraz że zmienność w ilości jądrowego DNA była również dużo niższa niż podawano uprzednio [35]. W przypadku dwóch gatunków diploidalnych (*L. luzuloides* i *L. nivea*) nie stwierdzono znaczących różnic w ilości jądrowego DNA; ustalone wartości były prawie takie same, co koresponduje z identyczną liczbą chromosomów u obu taksonów ($2n = 12$) i prawie taką samą długością chromosomów. Natomiast wartość jądrowego DNA u heksaploidalnego gatunku *L. multiflora* ($2n = 36$) była prawie dwukrotnie wyższa, co potwierdza hipotezę o poliploidalnym (zwiększeniu ilości chromosomów towarzyszy zwiększenie ilości DNA), a nie agmatoploidalnym pochodzeniu tego taksonu (zwiększeniu liczby chromosomów nie towarzyszy zwiększenie ilości DNA).

PERSPEKTYWY

Informacje dotyczące chromosomów holokinetycznych przedstawiają obecny stan wiedzy na temat tego typu chromosomów u roślin. Na szereg pytań ciągle nie ma odpowiedzi, co z kolei wskazuje kierunki dalszych badań. Do najważniejszych można zaliczyć udokumentowanie rozmieszczenia białek kinetochorowych przy wykorzystaniu określonych przeciwciał, co pozwoliłoby ostatecznie stwierdzić czy kinetochor jest rozciągnięty na całej długości chromosomu holokinetycznego, czy są fragmenty (końcowe bądź w innych regionach chromosomu) bez kinetochoru, jak również wykazanie rozmieszczenia sekwencji centromerowych DNA metodą hybrydyzacji *in situ* oraz białek centromerowych metodami immunofluorescencyjnym. Takie badania nie były prowadzone do tej pory na roślinnych chromosomach holokinetycznych.

LITERATURA

- [1] AULT JG, RIEDER CL. Centrosome and kinetochore movement during mitosis. *Curr Opin Cell Biol* 1994; **6**: 41-49.
- [2] BARLOW PW, NEVIN D. Quantitative karyology of some species of *Luzula*. *Plant Syst Evol* 1976; **125**: 77-86.
- [3] BAUER H. Die kinetische Organisation der Lepidopteren-Chromosomen. *Chromosoma* 1967; **22**: 101-125.
- [4] BIZZARO D, MANICARDI GC, BIANCHI U. Chromosomal localization of highly repeated *EcoRI* DNA fragment in *Megoura viciae* (Homoptera, Aphididae) by nick translation and fluorescence in situ hybridization. *Chrom Res* 1996; **4**: 392-396.

- [5] BOKHARI FS, GODWARD MBE. The ultrastructure of the diffuse kinetochore in *Luzula nivea*. *Chromosoma* 1980; **79**: 125-136.
- [6] BRASELTON JP. The ultrastructure of the non-localized kinetochores of *Luzula* and *Cyperus*. *Chromosoma* 1971; **36**: 89-99.
- [7] BRASELTON JP. The ultrastructure of meiotic kinetochores of *Luzula*. *Chromosoma* 1981; **82**: 143-151.
- [8] COLLET C, WESTERMAN M. Interspersed distribution patterns of C-bands and satellite DNA in the holocentric chromosomes of *Luzula flaccida* (Juncaceae). *Genetica* 1984; **63**: 175-179.
- [9] COOKE CA, BAZETT-JONES DP, EARNSHAW WC, RATTNER JB. Mapping DNA within the mammalian kinetochore. *J Cell Biol* 1993; **120**: 1083-1091.
- [10] COPENHAVER GP. Using *Arabidopsis* centromere function: Progress and prospects. *Chrom Res* 2003; **11**: 255-262.
- [11] D'AMATO F. Somatic nuclear mutations *in vivo* and *in vitro* in higher plants. *Caryologia* 1990; **43**: 191-204.
- [12] D'AMATO F. Nuclear changes in cultured plant cells. *Caryologia* 1991; **44**: 217-224.
- [13] D'AMATO F. Aneusomy *in vivo* and *in vitro* in higher plants. *Caryologia* 1995; **48**: 85-103.
- [14] FLACH M. Diffuse centromeres in a dicotyledonous plant. *Nature* 1966; **209**: 1369-1370.
- [15] FUCHS J, BRANDES A, SCHUBERT I. Telomere sequence localization and karyotype evolution in higher plants. *Pl Syst Evol* 1995; **196**: 227-241.
- [16] GARCIA MA. A new western Mediterranean species of *Cuscuta* (Convolvulaceae) confirms the presence of holocentric chromosomes in subgenus *Cuscuta*. *Bot J Linn Soc* 2001; **135**: 169-178.
- [17] GODWARD MBE. The kinetochore. *Int Rev Cyt* 1985; **94**: 77-105.
- [18] GOLCZYK H. Cytological changes in tissue culture of *Allium sibiricum* L. *Acta Biol Cracov Bot* 1994; **36**: 31-36.
- [19] GONZÁLEZ-GARCÍA JM, BENAVENTE R, RUFAS JS. Cytochemical and immunocytochemical characterization of kinetochores in the holocentric chromosomes of *Graphosoma italicum*. *Eur J Cell Biol* 1996; **70**: 352-360.
- [20] GREILHUBER J. Chromosomes of the monocotyledons (general aspects). [w] Rudal PJ, Cribb PJ, Cutler DF, Humphries CJ [red.] Monocotyledons: Systematics and Evolution. Kew: Royal Botanic Gardens 1995: 379-414.
- [21] GUERRA M, GARCIA MA. Heterochromatin and rDNA sites distribution in the holocentric chromosomes of *Cuscuta approximata* Bab. (Convolvulaceae) 2004; **47**: 134-140.
- [22] HÅKANSSON A. Meiosis and pollen mitosis in X-rayed and untreated spikelets of *Eleocharis palustris*. *Hereditas* 1954; **40**: 325-345.
- [23] HALKKA O. A photometric study of the *Luzula* problem. *Hereditas* 1964; **52**: 81-88.
- [24] HOSHINO T. Karyomorphological and cytogenetical studies on aneuploidy in *Carex*. *J Sci Hiroshima Univ B2* 1981; **17**: 155-238.
- [25] HOUBEN A, SCHUBERT I. DNA and proteins of plant centromeres. *Curr Opin Plant Biol* 2003; **6**: 554-560.
- [26] HOUBEN A, BRANDES A, PICH U, MANTEUFFEL R, SCHUBERT I. Molecular-cytogenetic characterization of a higher plant centromere/kinetochore complex. *Theor Appl Genet* 1996; **93**: 477-484.
- [27] HOUBEN A, GUTTENBACH M, KREB W, PICH U, SCHUBERT I, SCHMID M. Immunostaining and interphase arrangement of field bean kinetochores. *Chrom Res* 1995; **3**: 27-31.
- [28] HYMAN AA, SORGER PK. Structure and function of kinetochores in budding yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; **11**: 471-495.
- [29] JIANG JM, BIRCHLER JA, PARROTT WA, DAWE RK A. Molecular view of plant centromeres. *Trends Plant Sci* 2003; **38**: 570-575.
- [30] JOACHIMIĄK A, ILNICKI T. Wpływ różnych stężeń 2,4-D na zróżnicowaną proliferację linii komórkowych obcych w kalusie *Allium fistulosum*. *Zeszyty Nauk Akad Rol H Kółtąja w Krakowie* 1997; **50**: 339-344.
- [31] JOACHIMIĄK A, PRZYWARA L, ILNICKI T, KOWALSKA A. Megachromosomes in tissue culture of *Allium*. *Genetica* 1993; **90**: 35-40.
- [32] JOACHIMIĄK A, ILNICKI T, KOWALSKA A, PRZYWARA L. Chromosome alterations in tissue culture cells of *Allium fistulosum*. *Genetica* 1995; **96**: 191-198.
- [33] JONES K. Aspects of chromosome evolution in higher plants. *Adv Bot Res* 1978; **6**: 120-194.
- [34] KHODJAKOV A, COLE R W, MCEWEN BF, BUTTLE KF, RIEDER CL. Chromosome fragments possessing only one kinetochore can congress to the spindle equator. *J Cell Biol* 1997; **136**: 229-240.

- [35] KUTA E, BOHANEC B, DUBAS E, VIŽINTIN L, PRZYWARA L. Chromosome and nuclear DNA study on *Luzula* – a genus with holokinetic chromosomes. *Genome* 2004; **47**: 246-256.
- [36] LAMBERT A-M, VANTARD MSCHMIT A-C, STOECKEL H. Mitosis in plants. [w] Lloyd CW [red.] The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form. Academic Press 1991: 199-208.
- [37] LARSEN PM, WOLNIAK SM. Asynchronous entry into anaphase induced by okadaic acid: spindle microtubule organization and microtubule/kinetochore attachments. *Protoplasma* 1993; **177**: 53-65.
- [38] LEE M, PHILLIPS RL. The chromosomal basis of somaclonal variation. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1988; **39**: 413-437.
- [39] LIU B, PALEVITZ BA. Kinetochore fiber formation in dividing generative cells of *Tradescantia*. Kinetochore reorientation associated with the transition between lateral microtubule interactions and on-kinetochore fibers. *J Cell Sci* 1991; **98**: 475-482.
- [40] LUCEÑO M. Chromosome studies on *Carex* L. section *Mitratæ* Kükenth. (*Cyperaceae*) in the Iberian Peninsula. *Cytologia* 1993; **58**: 321-330.
- [41] LUCEÑO M, CASTROVIEJO S. Agmatoploidy in *Carex laevigata* (*Cyperaceae*). Fusion and fission of chromosomes as the mechanism of cytogenetic evolution in Iberian populations. *Pl Syst Evol* 1991; **177**: 149-159.
- [42] LUCEÑO M, GUERRA M. Numerical variations in species exhibiting holocentric chromosomes: a nomenclatural proposal. *Caryologia* 1996; **49**: 301-306.
- [43] LUCEÑO M, VANZELA ALL, GUERRA M. Cytotaxonomic studies in Brazilian *Rhynchospora* (*Cyperaceae*), a genus exhibiting holocentric chromosomes. *Can J Bot* 1998; **76**: 440-449.
- [44] MADEJ A. Kinetochor dyfuzyjny. *Kosmos* 1997; **46**: 193-202.
- [45] Madej A. Spindle microtubules and chromosome behaviour in mitosis of *Luzula luzuloides* – species with holokinetic chromosomes. *Acta Biol Cracov Bot* 1998; **40**: 61-67.
- [46] MADEJ A, KUTA E. Holokinetic chromosomes of *Luzula luzuloides* (*Juncaceae*) in callus culture. *Acta Biol Cracov Bot* 2001; **43**: 33-43.
- [47] MAŁUSZYŃSKA J, FRAŚ A. *Arabidopsis thaliana* w kulturach *in vitro*. *Zeszyty Nauk Akad Rol H Kółłataja w Krakowie* 1997; **50**: 13-21.
- [48] MANICARDI GC, BIZZARO D, GALLIE, BIANCHI U. Heterochromatin heterogeneity in the holocentric X chromatin of *Megoura viciae* (*Homoptera, Aphididae*). *Genome* 1996; **39**: 465-470.
- [49] MANICARDI GC, BIZZARO D, MANDRIOLI M, BIANCHI U. Silver staining as a new banding technique to identify aphid chromosomes. *Chrom Res* 1998; **6**: 55-57.
- [50] McEWEN BF, ARENA JT, FRANK J, RIEDER CL. Structure of the colcemid-treated PtK₁ kinetochore outer plate as determined by high voltage electron microscopic tomography. *J Cell Biol* 1993; **120**: 301-312.
- [51] MOLÉ-BAJER J, BAJER AS, ZINKOWSKI RP, BALCZON RD, BRINKLEY BR. Autoantibodies from a patient with scleroderma CREST recognised kinetochores of the higher plant *Haemanthus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 3599-3603.
- [52] MUGHAL S, GODWARD MBE. Kinetochore and microtubules in two members of *Chlorophyceae*, *Cladophora fracta* and *Spirogyra majuscula*. *Chromosoma* 1973; **44**: 213-229.
- [53] MUKHERJEE S, SEN J, SHARMA AK. Cytophotometric DNA estimation in *Luzula* species. *Curr Sci* 1993; **65**: 987-989.
- [54] NOIROT M, BARRE P, LOUARN J, DUPERRAY C, HAMON S. Consequences of stoichiometric error on nuclear DNA content evaluation in *Coffea liberica* var. *dewevrei* using DAPI and propidium iodide. *Ann Bot* 2002; **89**: 385-389.
- [55] NORDENSKIÖLD H. The somatic chromosomes of some *Luzula* species. *Bot Not* 1949; **1**: 81-92.
- [56] NORDENSKIÖLD H. Cyto-taxonomical studies in the genus *Luzula*. I. Somatic chromosomes and chromosome numbers. *Hereditas* 1951; **37**: 325-355.
- [57] NORDENSKIÖLD H. A study of meiosis in the progeny of X-irradiated *Luzula purpurea*. *Hereditas* 1963; **49**: 33-47.
- [58] OLSZEWSKA MJ. DNA i białka centromerowe. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 167-185.
- [59] OLSZEWSKA MJ, MAŁUSZYŃSKA J. Cytogenetyka molekularna w ustalaniu cech gatunkowych oraz ich zmienności w analizie pokrewieństwa roślin okrytozalążkowych. *Post Biol Kom* 2001; **28**: 197-218.
- [60] PALEVITZ BA. Kinetochore behavior during generative cell division in *Tradescantia virginiana*. *Protoplasma* 1990; **157**: 120-127.
- [61] PALEVITZ BA. Potential significance of microtubule rearrangement, translocation and reutilization in plant cells. [w] Lloyd CW [red.] The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form. Academic Press 1991: 45-55.

- [62] PAZY B, PLITMANN U. Holokinetic chromosome behaviour in *Cuscuta* (*Cuscutaceae*). *Pl Syst Evol* 1994; **191**: 105-109.
- [63] PAZY B, PLITMANN U. Chromosome divergence in the genus *Cuscuta* and its systematic implications. *Caryologia* 1995; **48**: 173-180.
- [64] RAY JH, VENKETESWARAN S. Constitutive heterochromatin distribution in monocentric and polycentric chromosomes. *Chromosoma* 1978; **66**: 341-350.
- [65] RIEDER CL, SALMON ED. Motile kinetochores and polar ejection forces dictate chromosome position on the vertebrate mitotic spindle. *J Cell Biol* 1994; **124**: 223-233.
- [66] ROSE A, MANIKANTAN S, SCHRAEGLE SJ, MALOY MA, STAHLBERG EA, MEIER I. Genome-wide identification of arabidopsis coiled-coil proteins and establishment of the ARABI-COIL database. *Plant Physiol* 2004; **134**: 927-939.
- [67] SCHRADER F. Notes on the mitotic behavior of long chromosomes. *Cytologia* 1935; **6**: 422-430.
- [68] SHEIKH SA, KONDO K. Differential staining with orcein, Giemsa, CMA, and DAPI for comparative chromosome study of 12 species of Australian *Drosera* (*Droseraceae*). *Am J Bot* 1995; **82**: 1278-1286.
- [69] SHAW DD. Centromeres: moving chromosomes through space and time. *TREE* 1994; **9**: 170-175.
- [70] SHAW DD, CONTRERAS N, MACLEAN V. The genomic and molecular organisation of centromeres in the genus *Caledia*. [w] Brandham PE, Bennett MD [red] Kew Chromosome Conference IV. Kew: Royal Botanic Gardens 1995: 119-132.
- [71] SEN J, MUKHERJEE S, SHARMA AK. Study of chromosomes, DNA amount, and *in vitro* growth in different species of *Luzula*. *Genome* 1990; **33**: 143-147.
- [72] STEER MW. Mitosis in Bryophytes. *Adv Bryol* 1985; **2**: 1-23.
- [73] Sybenga J. Specialization in the behaviour of chromosomes on the meiotic spindle. *Genetica* 1981; **57**: 143-151.
- [74] TANAKA N, TANAKA N. Chromosome studies in *Chionographis* (*Liliaceae*) I. On the holokinetic nature of chromosomes in *Chionographis japonica* Maxim. *Cytologia* 1977; **42**: 753-763.
- [75] TEN HOOPEN R, SCHLEKER T, MANTEUFFEL R, SCHUBERT I. Transient CENP-E-like kinetochore proteins in plants. *Chrom Res* 2002; **10**: 561-570.
- [76] TEN HOOPEN R, MANTEUFFEL R, DOLEZEL J, MALYSHEVA L, SCHUBERT I. Evolutionary conservation of kinetochore protein sequences in plants. *Chromosoma* 2000; **109**: 482-489.
- [77] VAARAMA A. Cytological observations on *Pleurozium schreberi*, with special reference to centromere evolution. *Ann Bot Soc 'Vanamo'* 1954; **28**: 1-59.
- [78] VANZELA ALL, GUERRA M. Heterochromatin differentiation in holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (*Cyperaceae*). *Gen Mol Biol* 2000; **23**: 453-456.
- [79] VANZELA ALL, GUERRA M, LUCEÑO M. *Rhynchospora tenuis* Link (*Cyperaceae*), a species with the lowest number of holocentric chromosomes. *Cytobios* 1996; **88**: 219-228.
- [80] VANZELA ALL, LUCEÑO M, GUERRA M. Karyotype evolution and cytotaxonomy in Brazilian species of *Rhynchospora* Vahl (*Cyperaceae*). *Bot J Linn Soc* 2000; **134**: 557-566.
- [81] VANZELA ALL, CUADRADO A, JOUVE N, LUCEÑO M, GUERRA M. Multiple locations of rDNA sites in holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (*Cyperaceae*). *Chrom Res* 1998; **6**: 345-349.
- [82] WINFIELD M, DAVEY MR, KARP A. A comparison of chromosome instability in cell suspensions of diploid, tetraploid and hexaploid wheats. *Heredity* 1993; **70**: 187-194.
- [83] WINFIELD M, KARP A, LAZZERI PA, DAVEY MR. Chromosome 5D instability in cell lines of *Triticum tauschii* and morphological variation in regenerated plants. *Genome* 1995; **38**: 737-742.
- [84] WITT M. Sekwencje alfoidalne jako element struktury centromeru. *Post Biol Kom* 1994; **21**: 93-96.
- [85] WOLF KW, MITCHELL A, NICOL L, JEPPESEN P. Analysis of centromere structure in the fly *Megaselia scalaris* (*Phoridae, Diptera*) using CREST sera, anti-histone antibodies, and a repetitive DNA probe. *Biol Cell* 1994; **80**: 11-23.
- [86] ZINKOWSKI RP, MEYNE J, BRINKLEY BR. The centromere-kinetochore complex: a repeat subunit model. *J Cell Biol* 1991; **113**: 1091-1110.
- [87] ZORINYANTS SE, NOSOV AV, BADAIEVA ED, SMOLENSKAYA IN, BADAIEV NS. Cytogenetic analysis of a long-term *Triticum timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. cell suspension culture. *Plant Breed* 1995; **114**: 219-225.

Elżbieta Kuta

Zakład Cytologii i Embriologii Roślin, Uniwersytet Jagielloński

Grodzka 52, 31-044 Kraków

PROGRAMOWANA ŚMIERĆ KOMÓRKOWA (PCD) W ROZWOJU ROŚLIN WYŻSZYCH

PROGRAMMED CELL DEATH IN HIGHER PLANT DEVELOPMENT

Maria CHARZYŃSKA

Zakład Anatomii i Cytologii Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej Roślin,
Uniwersytet Warszawski

Streszczenie: Termin „programowana śmierć komórkowa” lub „programowana śmierć komórki” (PCD, ang. *programmed cell death*) określa kontrolowany genetycznie proces śmierci komórek organizmów eukariotycznych, indukowany przez czynniki endogenne bądź egzogenne i realizowany dzięki uruchomieniu przez samą komórkę mechanizmów molekularnych, prowadzących do jej śmierci. PCD jest pojęciem szerszym niż apoptoza – śmierć komórki zwierzęcej o charakterystycznym morfotypie i internukleosomalnym cięciu nDNA, głównym wyznacznikiem biochemicznym fazy wykonawczej. Genetyczne mechanizmy PCD są silnie ewolucyjnie konserwowane u różnych grup zwierząt i dobrze opisane na poziomie molekularnych dróg jej realizacji. Aktualne jest pytanie, czy rośliny realizując PCD stosują te same silnie konserwowane mechanizmy molekularne jak świat zwierząt? Pytanie tym bardziej ważne, że w zsekwencjonowanym genomie *Arabidopsis thaliana*, nie znaleziono homologów genów kluczowych do realizacji programu śmierci u zwierząt. Badania cytologicznych i molekularnych aspektów PCD komórek, tkanek i organów, zachodzącej zgodnie z programem rozwojowym rośliny wyższej, w fazie wegetatywnej i generatywnej, z zastosowaniem nowych technik badawczych oraz w układach *in vitro*, zbliżają do zidentyfikowania genów sterujących procesami PCD. PCD charakteryzują cechy morfologiczne, które są wynikiem przeorganizowania molekularnej i strukturalnej organizacji przestrzennej wszystkich przedziałów komórki. Komórki podlegające PCD, zarówno roślinne jak zwierzęce, różnią się między sobą organizacją i nie może dziwić, że morfotyp PCD wszystkich typów komórek nie jest taki sam. Które komórki i tkanki podlegają PCD w rozwoju rośliny okrytonasiennej? Czy starzenie się organów rośliny uruchamia mechanizmy PCD? Jaka jest relacja między cyklem komórkowym a PCD? Czy różnicowanie i endoploidyzacja komórek roślinnych są warunkiem wejścia na drogę PCD? Czy mitochondria są jej elementem sprawczym? Czy PCD prowadzi zawsze do zupełnego unicestwienia komórki roślinnej? Czy PCD w organizmie rośliny pełni głównie rolę usuwania zbytecznych, położonych w niewłaściwym miejscu lub uszkodzonych komórek, jak definiuje wielu autorów? Jaka jest rola regulatorów wzrostu i rozwoju w koordynacji procesów PCD w obrębie ciała rośliny? To tylko niektóre z pytań, wymagających dyskusji.

Słowa kluczowe: programowana śmierć komórkowa (PCD), apoptoza, rośliny wyższe.

Summary: The term „programmed cell death” (PCD) defines a tightly genetically controlled process leading to cell destruction in eukaryotic organisms; the process is induced by endogenous or exogenous factors and proceeds due to molecular mechanisms that are triggered by the cell itself. PCD is a definition broader than apoptosis. The latter term defines the programmed death of animal cells with a characteristic morphotype and internucleosomal cleavage of nDNA, which is the main biochemical marker of the executive phase. Genetic mechanisms of PCD are markedly conserved during evolution of various groups of animals and the molecular PCD pathways have been described in detail. At present, the essential question is whether plants – when executing PCD – apply the same highly evolutionary conserved molecular mechanisms as the animal kingdom? The question is the more important that in the sequenced genome of *Arabidopsis thaliana*, no homologues were found of the key genes of the animal cell death program. Much present research concerns the cytological and molecular aspects of PCD in cells, tissues and organs, the PCD that takes place according to the developmental program of higher plants in the vegetative and generative phases. These experiments are carried out with the use of new techniques, in *in vitro* systems, and are aimed at identification of genes steering the PCD processes in plants. PCD is characterised by morphological features that result from reorganisation of the molecular and structural architecture of all cellular compartments. Plant and animal cells undergoing PCD differ in organisation, hence, no wonder that the morphotypes of PCD of various cell types show pronounced differences. Which cells and tissues undergo PCD in the development of an angiosperms plant? Does plant organ senescence involve PCD mechanisms? What is the relation between cell cycle and PCD? Is differentiation and polyploidization of plant cells the condition of entering the PCD pathway? Are mitochondria the causal factor in plant PCD? Does PCD always lead to complete destruction of the plant cell? Does PCD in the plant organism serve mainly the role of removing redundant, misplaced or damaged cells, as claimed by many authors? What is the role of growth and development regulators in coordination of PCD processes in the plant body? These are only some of the numerous questions which need to be discussed.

Key words: programmed cell death (PCD), apoptosis, higher plants.

M. Charzyńska

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

CYTOCHEMIA W BIOTECHNOLOGII ROŚLIN – SYSTEMY REPORTEROWE Z WYKORZYSTANIEM GENÓW KODUJĄCYCH β -GLUKURONIDAZĘ (GUS) I ZIELONO FLUORYZUJĄCE BIAŁKO (GFP)*

CYTOCHEMISTRY IN PLANT BIOTECHNOLOGY – APPLICATION
OF β -GLUCURONIDASE (GUS) AND GREEN FLUORESCENT
PROTEIN (GFP)-BASED REPORTER SYSTEMS

Andrzej Kiejstut KONONOWICZ, Aneta WIKTOREK-SMAGUR,
Katarzyna HNATUSZKO

Zakład Cytogenetyki i Biologii Molekularnej Roślin, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie: Transformacja genetyczna roślin odgrywa istotną rolę we współczesnej biotechnologii. Genetycznie modyfikowane rośliny budzą coraz większe zainteresowanie nie tylko jako rośliny uprawne, ale także jako potencjalne bioreaktory do produkcji naturalnych biofarmaceutyków i innych wartościowych metabolitów wtórnych oraz rekombinowanych białek znajdujących zastosowanie w terapii licznych chorób, jako szczepionki, enzymy diagnostyczne i przemysłowe. Trwają intensywne prace nad wykorzystaniem transgenicznych roślin w procesie fitoremediacji. Najnowsze, ale także klasyczne techniki i metody cytochemiczne wykorzystywane są na kolejnych etapach zarówno opracowywania technologii genetycznej transformacji roślin, jak i w trakcie ich realizowania. Przykładem takich zastosowań mogą być cytochemiczne metody analiz wykorzystujące tzw. geny reporterowe – *uidA* (*gusA*) i *gfp*, kodujące, odpowiednio, β -glukuronidazę (GUS) i zielono fluoryzujące białko (GFP).

Słowa kluczowe: biotechnologia roślin, β -glukuronidaza, GFP, GUS, techniki cytochemiczne, transformacja genetyczna roślin, *uidA*.

Summary: Genetic transformation of plants plays an important role in modern biotechnology. Genetically modified plants attract attention not only as cultivated plants (vegetables, grain crops) but also as bioreactors for production of valuable secondary metabolites, and recombinant proteins which can be used as pharmaceuticals, vaccines, antibodies and diagnostic or industrial enzymes. Moreover, since the middle 90' an extensive research has been done towards application of transgenic plants for phytoremediation technology. Several modern cytochemical techniques and methods are being used during both development of plant genetic transformation technologies as well as during their applications. Two reporter genes, *uidA* (*gusA*) and *gfp*, coding β -glucuronidase enzyme (GUS) and green fluorescent

* Dofinansowanie: KBN 6 P04B 003 18, KBN 6 P04G 112 20

protein (GFP), respectively, are an example of utilization of cytochemical tools in plant biotechnology.

Key words: β -glucuronidase, cytochemical techniques, GFP, GUS, plant biotechnology, plant genetic transformation, *uidA*.

Dynamiczny rozwój współczesnej biotechnologii ma swoje źródła w imponującym postępie badań i - w konsekwencji - w znaczących osiągnięciach wielu dyscyplin nauk przyrodniczych i technicznych. Jednym z imperatywów nowoczesnych badań naukowych jest ich charakter aplikacyjny. Biotechnologia, z definicji, zajmuje się nie tylko tworzeniem nowych technologii wykorzystujących żywe organizmy, ale także technologii modyfikujących te organizmy w celu wykreowania nowych szczepów, odmian, gatunków o unikalnych właściwościach użytkowych. Z tych względów, biotechnologie, z jednej strony ogniskują w sobie najnowsze osiągnięcia nauk przyrodniczych i technicznych, z drugiej zaś – właśnie w nich znajdują swoje odbicie osiągnięcia tych nauk. Interdyscyplinarność biotechnologii spełnia zarówno funkcję integrującą różne dyscypliny naukowe jak i stymulującą rozwój nauk biologicznych, matematyczno-fizycznych, chemicznych, inżynierjno-technicznych, informatyki etc. Więcej, biotechnologia jest jednym z czynników, które poszerzają horyzonty myślowe naukowców, inżynierów i technologów; jest impulsem, który stale pobudza ludzką wyobraźnię, pomysłowość, twórczą inwencję. Nieodłącznymi elementami biotechnologii znajdującymi zastosowanie w medycynie, rolnictwie, różnych gałęziach przemysłu i ochronie środowiska stały się inżynieria genetyczna i technologia genetycznej transformacji organizmów żywych. Jednym z kluczowych elementów technologii transformacji genetycznej są osiągnięcia w zakresie biologii komórki, a wśród nich – w zakresie cytochemii.

Techniki i metody cytochemiczne, także te uważane obecnie za klasyczne, znajdują liczne zastosowania w metodologii konstruowania genetycznie zmodyfikowanych organizmów [31, 47, 58, 62-64, 66, 71, 95, 97]. Stanowią one ciągle niezastąpione narzędzie badawcze w inżynierii syntetycznych genów [5, 53, 57], w monitorowaniu [9], korygowaniu i modyfikowaniu ich genomowej integracji [29, 60] oraz ich subkomórkowej, tkankowej i organowej ekspresji [34, 35, 55, 68, 92]. Są ważnym narzędziem wykorzystywanym podczas projektowania [32, 53, 78] oraz strukturalnego i funkcjonalnego optymalizowania genów „skrojonych na miarę” [5, 14, 23, 48, 57, 67, 69]. Znaczące miejsce wśród nich zajmują metody wykorzystujące geny, które w latach 80. ubiegłego stulecia, mając na względzie rolę jaką spełniały wtedy w procedurze transformacji genetycznej, nazwano genami reporterowymi. Szczególnie szerokie zastosowanie znalazły dwa z nich: *uidA* (*gusA*) i *gfp*.

Pierwszy z nich, *uidA* (*gusA*), wyizolowany z *Escherichia coli*, koduje enzym β -glukuronidazę (EC 3.2.1.31) hydrolizujący β -glukuronidy, a jego aktywność w komórce można wykryć przy użyciu prostego, a zarazem czułego testu wykorzystującego liczne dostępne komercyjnie chromogeniczne substraty [31, 47, 48]. GUS jest bardzo stabilnym enzymem w szerokim zakresie warunków fizjologicznych. O częstym wykorzystaniu GUS w transformacji genetycznej decydują w głównej mierze możliwości histochemicznej lokalizacji jego aktywności w tkankach i całych organizmach oraz ilościowego oznaczania jego aktywności relatywnie tanim i wysoce wrażliwym fluorogenicznym testem [31, 78]. W swej najprostszej formie, preintegracyjna, przejściowa (*ang. transient*), oraz

postintegracyjna, stabilna (*ang. stable*) ekspresja genu kodującego β -glukuronidazę znajdują szerokie zastosowanie w monitorowaniu procesu genetycznej transformacji [11–13, 31, 60, 68], w śledzeniu i poznawaniu czasowej i przestrzennej regulacji ekspresji genów na poziomach subkomórkowym i ponadkomórkowym [16, 53], w funkcjonalnej analizie całych promotorów lub ich składowych elementów regulatorowych [78], a wreszcie – w konstruowaniu syntetycznych genów i optymalizowaniu ich ekspresji [31]. Osobną grupę zastosowań *uidA* stanowią techniki wykorzystujące strategie translacyjnych fuzji genowych z wykorzystaniem systemu reporterowego β -glukuronidazy [20, 23, 31, 48, 77]. Spośród licznych zalet tego systemu przemawiających za jego wykorzystaniem w badaniach nad wewnątrzkomórkową migracją białek (np. *nuclear targeting*), oprócz już wcześniej zasygnalizowanych, wymienić trzeba brak wykrywalnej endogennej aktywności GUS u większości organizmów eukariotycznych oraz dużą stabilność nie tylko w komórkach, ale i ekstraktach [31, 47, 48]. Ponadto, ze względu na swoje relatywnie duże rozmiary GUS zachowuje się w komórce jak większość białek cytoplazmatycznych i nie dyfunduje do jądra komórkowego, natomiast w fuzji z sekwencją zawierającą funkcjonalny NLS (*ang. nuclear localization signal*) jest efektywnie transportowana z cytoplazmy do jądra komórkowego. Bardzo ważną zaletą GUS jest, że białko to wysoką aktywność enzymatyczną zachowuje w N- i C-końcowych fuzjach z heterologicznymi polipeptydami. Pozwala to na dużą swobodę projektowania fuzji genowych i stwarza możliwości ich licznych zastosowań – wymienić wystarczy mapowanie NLSów oraz analizę mechanizmów regulatorowych kontrolujących jądrowy transport [31, 68, 77].

GFP, zielono fluoryzujące białko (*Green Fluorescent Protein*), odkryte zostało u meduzy królewskiej (*Aequorea victoria*) [1, 8, 17, 65, 70]. Gen kodujący to niewielkie, liczące 238 aminokwasów białko [17, 76], był początkowo wykorzystywany jako marker reporterowy w transformacji genetycznej organizmów pro- i eukariotycznych, w tym także roślin [6, 10, 15, 26, 27, 37, 38, 49, 50, 56, 74, 86, 93, 95]. Główną zaletą GFP jest możliwość detekcji emitowanej fluorescencji w warunkach *in vivo*, po naświetleniu promieniami UV o długości fali 400 i 475 nm [7, 14, 25, 24, 36, 39–41, 62, 69, 72, 79, 80]. Modyfikacje sekwencji kodującej GFP pozwoliły zmienić szereg właściwości białka i umożliwiły jego nowe zastosowania [2, 9, 15, 18, 19, 22, 39, 61, 72, 73, 82, 87, 94], m.in. uzyskano kilka nowych wariantów spektralnych (BFP – *blue fluorescent protein*, CFP – *cyan fluorescent protein*, YFP – *yellow fluorescent protein*) [33, 36, 89, 97]. Badania z wykorzystaniem fuzji genowych GFP i jego wariantów spektralnych z innymi białkami znalazły szerokie zastosowanie w biologii komórki stanowiąc alternatywę badań biochemicznych i immunoznakowania. Fuzje te umożliwiają detekcję oraz subkomórkową i ponadkomórkową lokalizację badanych białek [25, 28, 30, 36, 43, 46, 81, 84, 85], obserwację ich wewnątrzkomórkowego transportu [51, 58], pozwalają na analizę biogenezy i dynamiki organelli komórkowych [21, 25, 33, 36, 42, 52, 54, 59, 83, 85, 91], detekcję chromatyny, macierzy jądrowej i chromosomów oraz analizę ich strukturalnej i funkcjonalnej organizacji [51, 58], jak również śledzenie dynamiki transportu białek w i pomiędzy żywymi komórkami [44, 45, 88, 90, 91, 96].

Należy sądzić, że kolejne osiągnięcia w dziedzinie biologii molekularnej i biologii komórki oraz dalsze doskonalenie komputerowych systemów detekcji i analizy GUS

oraz GFP i jego wariantów, znacznie poszerzą zakres wykorzystania tych białek w badaniach podstawowych i w biotechnologii.

LITERATURA

- [1] ANDERSON JM, CORMIER MJ. Lumisomes, the cellular site of bioluminescence in coelenterates. *J Biol Chem* 1973; **248**: 2937-2943.
- [2] ARMSTRONG CL, FRY JE, HINCHEE MAW, FROMM ME. An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plants. *Plant Physiol* 1996; **112**: 893-900.
- [3] ASPURIA ET, OOURA C, CHEN GQ, UCHIMIYA H, OONO Y. GFP accumulation controlled by an auxin-responsive promoter as a non-destructive assay to monitor early auxin response. *Plant Cell Rep* 2002; **21**: 52-57.
- [4] BATOKO H, ZHENG HQ, HAWES C, MOORE I. A rab1 GTPase is required for transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus and for normal Golgi movement in plants. *Plant Cell* 2000; **12**: 2201-2218.
- [5] BEJARNO LA, GONZALES C. Motif trap: a rapid method to clone motifs that can target proteins to defined subcellular localisations. *J Cell Sci* 1999; **112**: 4207-4211.
- [6] BELLUCCI M, DE MARCHIS F, MANNUCCI R, ARCIONI S. Jellyfish green fluorescent protein as a useful reporter for transient expression and stable transformation in *Medicago sativa* L. *Plant Cell Rep* 2003; **22**: 328-337.
- [7] BLUMENTHAL A, KUZNETZOVA L, EDELBAUM O, RASKIN V, LEVY M, SELA I. Measurement of green fluorescent protein in plants: quantification, correlation to expression, rapid screening, and differential gene expression. *Plant Sci* 1999; **142**: 93-99.
- [8] BOKMAN SH, WARD WW. Renaturation of *Aequorea* green fluorescent protein. *Biochem Biophys Res Com* 1981; **101**: 1372-1380.
- [9] BRANDIZZI F, FRICKER M, HAWES C. A greener world: the revolution in plant bioimaging. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; **3**: 520-529.
- [10] CARLSON AR, LETARTE J, CHEN J, KASHA KJ. Visual screening of microspore-derived transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) with green fluorescent protein. *Plant Cell Rep* 2001; **20**: 331-337.
- [11] CASAS AM, KONONOWICZ AK, BRESSAN RA, HASEGAWA PM. Cereal transformation through particle bombardment. [w:] JANICK J (red.). Plant Breeding Reviews, 13. New York: Wiley, 1995: 235-264.
- [12] CASAS AM, KONONOWICZ AK, HAAN TG, ZHANG L, TOMES DT, BRESSAN RA, HASEGAWA PM. Transgenic sorghum plants obtained after microprojectile bombardment of immature inflorescences. *In Vitro Cell Develop Biol - Plant* 1997; **33**: 92-100.
- [13] CASAS AM, KONONOWICZ AK, ZEHR UB, TOMES DT, AXTELL JD, BUTLER LG, BRESSAN RA, HASEGAWA PM. Transgenic sorghum plants via microprojectile bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 11212-11216.
- [14] CHALFIE M, TU Y, EUSKIRCHEN G, WARD WW, PRASHER DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 1994; **263**: 802-805.
- [15] CHIU WL, NIWA Y, ZENG W, HIRANO T, KOBAYASHI H, SHEEN J. Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr Biol* 1996; **3**: 325-330.
- [16] CHO MJ, CHOI HW, BUCHANAN BB, LEMAUX PG. Inheritance of tissue-specific expression of barley hordein promoter-*uidA* fusions in transgenic barley plants. *Theor Appl Genet* 1999; **98**: 1253-1262.
- [17] CODY CW, PRASHER DC, WESTLER WM, PRENDERGAST FG, WARD WW. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green fluorescent protein. *Biochemistry* 1993; **32**: 1212-1218.
- [18] CORMACK BP, VALDIVIA RH, FALKOW S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 1996; **173**: 33-38.
- [19] CRAMERI A, WHITEHORN EA, TATE E, STEMMER WPC. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat Biotechnol* 1996; **14**: 315-319.
- [20] CROSBY G, SELVARAJ A. A bifunctional fusion between β -glucuronidase and neomycin phosphotransferase: a broad-spectrum marker enzyme for plants. *Gene* 1991; **101**: 239-246.
- [21] CUTLER SR, EHRHARDT DW, GRIFFITTS JS, SOMERVILLE CR. Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at a high frequency. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 3718-3723.
- [22] DAVIS SJ, VIERSTRA RD. Soluble highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Mol Biol* 1998; **36**: 521-528.

- [23] DOBROWOLSKA A, KONONOWICZ AK. Expression of CaMV::*sak-gusA-mgfp* gene in tobacco plants. *World J Microb Biotechnol* 2004; **20**: 333-335.
- [24] EHRHARDT D. GFP technology for live cell imaging. *Curr Opin Plant Biol* 2003; **6**: 622-628.
- [25] ELLENBERG J, LIPPINCOTT-SCHWARTZ J, PRESLEY JF. Dual-colour imaging with GFP variants. *Trends Cell Biol* 1999; **9**: 52-56.
- [26] ELLIOTT AR, CAMPBELL JA, BRETTELL RIS, GROF CPL. *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarcane using GFP as a screenable marker. *Aust J Plant Physiol* 1998; **25**: 739-743.
- [27] ELLIOT AR, CAMPBELL JA, DUGDALE B, BRETTELL RIS, GROF CPL. Green-fluorescent protein facilitates rapid *in vivo* detection of genetically transformed plant cells. *Plant Cell Rep* 1999; **18**: 707-714.
- [28] ESCOBAR NM, HAUPT S, THOW G, BOEVINK P, CHAPMAN S, OPARKA K. High-throughput viral expression of cDNA-green fluorescent protein fusions reveals novel subcellular addresses and identifies unique proteins that interact with plasmodesmata. *Plant Cell* 2003; **15**: 1507-1523.
- [29] FANG YD, AKULA C, ALTPETER F. *Agrobacterium*-mediated barley (*Hordeum vulgare* L.) transformation using green fluorescent protein as a visual marker and sequence analysis of the T-DNA::barley genomic DNA junctions. *J Plant Physiol* 2002; **159**: 1131-1138.
- [30] FERRO M, SALVI D, RIVIERE-ROLLAND H, VERMAT T, SEIGNEURIN-BERNY D, GRUNWALD D, GARIN J, JOYARD J, ROLLAND R. Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: identification and subcellular localization of new transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 11487-11492.
- [31] GALLAGHER SR (red.). GUS Protocols. Using the GUS gene as a reporter of gene expression. San Diego: Academic Press, 1992.
- [32] GREBENOK RJ. Characterisation of the targeted nuclear accumulation of GFP within the cells of transgenic plants. *Plant J* 1997; **12**: 685-696.
- [33] HANSON MR, KOHLER RH. GFP imaging: methodology and application to investigate cellular compartmentation in plants. *J Exp Bot* 2001; **52**: 529-539.
- [34] HARPER BK, MABON SA, LEFFEL SM, HALFHILL MD, RICHARDS HA, MOYER KA, STEWART CN JR. Green fluorescent protein as a marker for expression of a second gene in transgenic plants. *Nat Biotechnol* 1999; **17**: 1125-1129.
- [35] HARPER BK, STEWART CN JR. Patterns of expression and fluorescence of green fluorescent protein in single transgenic plants. *Plant Mol Biol Rep* 2000; **18**: 141a-141i.
- [36] HASELOFF J. GFP variants for multispectral imaging of living cells. *Methods Cell Biol* 1999; **58**: 139-151.
- [37] HASELOFF J, AMOS B. GFP in plants. *Trends Genet* 1995; **11**: 328-329.
- [38] HASELOFF J, SIEMERING KR. The uses of GFP in plants. [w] Chalfie M, Kain SR (red.). Green fluorescent protein: properties, applications, and protocols. Chichester: Wiley, 1998: 191-220.
- [39] HASELOFF J, SIEMERING KB, PRASHER DC, HODGE S. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 2122-2127.
- [40] HEIM R, CUBITT AB, TSIEN RY. Improved green fluorescence. *Nature* 1995; **373**: 663-664.
- [41] HEIM R, TSIEN R. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths, and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol* 1996; **6**: 178-182.
- [42] HUSH JM, WADSWORTH P, CALLAHAN DA, HEPLER PK. Quantification of microtubule dynamics in living plant cells using fluorescence redistribution after photobleaching. *J Cell Sci* 1994; **107**: 775-784.
- [43] IMMINK RG, GADELLA TW JR, FERRARIO S, BUSSCHER M, ANGENENT GC. Analysis of MADS box protein-protein interactions in living plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 2416-2421.
- [44] ITAYA A, HICKMAN H, BAO Y, NELSON R, DING B. Cell-to-cell trafficking of cucumber mosaic virus movement protein: green fluorescent protein fusion produced by biolistic gene bombardment in tobacco. *Plant J* 1997; **12**: 1223-1230.
- [45] JANG IC, NAHM BH, KIM JK. Subcellular targeting of green fluorescent protein to plastids in transgenic rice plants provides a high-level expression system. *Mol Breed* 1999; **5**: 453-461.
- [46] KÖHLER RH, HANSON MR. Plastid tubules of higher plants are tissue-specific and developmentally regulated. *J Cell Sci* 2000; **113**: 81-89.
- [47] JEFFERSON RA. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 1987; **5**: 387-405.
- [48] JEFFERSON RA, RAVANAGH TA, BEVAN MW. GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 1987; **6**: 3901-3907.
- [49] JORDAN MC. Green fluorescent protein as a visual marker for wheat transformation. *Plant Cell Rep* 2000; **19**: 1069-1075.
- [50] KAEPLER HF, MENON GK, SKADSEN RW, NUUTILA AM, CARLSON AR. Transgenic oat plants via visual selection of cells expressing green fluorescent protein. *Plant Cell Rep* 2000; **19**: 661-666.

- [51] KATO N, LAM E. Detection of chromosomes tagged with green fluorescent protein in live *Arabidopsis thaliana* plants. *Genome Biol* 2001; **2**: 1–10.
- [52] KOHLER RH, ZIPFEL WR, WEBB WW, HANSON MR. The green fluorescent protein as a marker to visualize plant mitochondria *in vivo*. *Plant J* 1997; **11**: 613–621.
- [53] KONONOWICZ AK, NELSON DE, SINGH NK, HASEGAWA PM, BRESSAN RA. Regulation of the osmotin gene promoter. *Plant Cell* 1992; **4**: 513–524.
- [54] LEE MH, MIN MK, LEE YJ, JIN JB, SHIN DH, KIM DH, LEE KH, HWANG I. ADP-ribosylation factor 1 of *Arabidopsis* plays a critical role in intracellular trafficking and maintenance of endoplasmic reticulum morphology in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2002; **129**: 1507–1520.
- [55] LEFFEL SM, MABON SA, STEWART CN. Applications of green fluorescent protein in plants. *Biotechniques* 1997; **23**: 912–918.
- [56] LIZ, JAYASHANKAR S, BARNETT NJ, GRAY DJ. Characterization of *Agrobacterium*-mediated transformation of grape (*Vitis* spp.) using the green fluorescent protein (GFP) gene. *In Vitro Cell Dev Biol* 1999; **35**: 42A.
- [57] LI Z, JAYASANKAR S, GRAY DJ. Expression of a bifunctional green fluorescent protein (GFP) fusion marker under the control of three constitutive promoters and enhanced derivatives in transgenic grape (*Vitis vinifera*). *Plant Sci* 2001; **160**: 877–887.
- [58] LIPPINCOTT-SCHWARTZ J, PATTERSON GH. Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* 2003; **300**: 87–91.
- [59] LOGAN DC, LEAVER CJ. Mitochondria-targeted GFP highlights the heterogeneity of mitochondrial shape, size and movement within living plant cells. *J Exp Bot* 2000; **51**: 865–871.
- [60] MCCORMAC AC, WU H, BAO M, WANG Y, XU R, ELLIOTT MC, CHEN DF. The use of visual marker genes as cell-specific reporters of *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery to wheat (*Triticum aestivum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.). *Euphytica* 1998; **99**: 17–25.
- [61] MERCURI A, SACCHETTI A, DE BENEDETTI L, SCHIVA T, ALBERTI S. Green fluorescent flowers. *Plant Sci* 2001; **161**: 961–968.
- [62] MILLWOOD RJ, HALFHILL MD, HARKINS D, RUSSOTTI R, STEWART CN JR. Instrumentation and methodology of GFP quantification in intact plant organs. *Biotechniques* 2003; **34**: 638–643.
- [63] MISTELI T, SPECTOR DL. Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nat Biotechnol* 1997; **15**: 961–964.
- [64] MOLINIER J, HIMBER C, HAHNE G. Use of green fluorescent protein for detection of transformed shoots and homozygous offspring. *Plant Cell Rep* 2000; **19**: 219–223.
- [65] MORISE H, SHIMOMURA O, JOHNSON FH, WINANT J. Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry* 1974; **13**: 2656–2662.
- [66] MURRAY F, BRETTELL R, MATTHEWS P, BISHOP D, JACOBSEN J. Comparison of *Agrobacterium*-mediated transformation of four barley cultivars using the GFP and GUS reporter genes. *Plant Cell Rep* 2004; **22**: 397–402.
- [67] NAGATANI N, TAKUMI S, TOMIYAMA M, SHIMADA T, TAMIYA E. Semi-real time imaging of the expression of a maize polyubiquitin promoter-GFP gene in transgenic rice. *Plant Sci* 1997; **124**: 49–56.
- [68] NEHLIN L, MÖLLERS C, BERGMAN P, GLIMERLIUS K. Transient β -gus and *gfp* gene expression and viability analysis of microprojectile bombarded microspores of *Brassica napus* L. *J Plant Physiol* 2000; **156**: 175–183.
- [69] NIEDZ RP, SUSSMAN MR, SATTERLEE JS. Green fluorescent protein: an *in vivo* reporter of plant gene expression. *Plant Cell Rep* 1995; **14**: 403–406.
- [70] ORMO M, CUBITT AB, KALLIO K, GROSS LA, TSIEN RY, REMINGTON SJ. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 1996; **273**: 1392–1395.
- [71] OW DW, WOOD KV, DE LUCA M, DEWET JR, HELINSKI DR, HOWELL SH. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* 1986; **234**: 856–859.
- [72] PANG SZ, DEBOER DL, WAN Y, YE G, LAYTON JG, NEHER MK, ARMSTRONG CL, FRY JE, HINCHEE MAW, FROMM ME. An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plants. *Plant Physiol* 1996; **112**: 893–900.
- [73] POLLOK BA, HEIM R. Using GFP in FRET-based applications. *Trends Cell Biol* 1999; **9**: 57–60.
- [74] PRASHER DC. Using GFP to see the light. *Trends Genet* 1995; **11**: 320–323.
- [75] PONAPPA T, BRZOZOWSKI AE, FINER JJ. Transient expression and stable transformation of soybean using the jellyfish green fluorescent protein. *Plant Cell Rep* 1999; **19**: 6–12.
- [76] PRASHER DC, ECKENRODE VK, WARD WW, PRENDERGAST FG, CORMIER MJ. Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Gene* 1992; **111**: 229–233.
- [77] QUAEDVLIEG NEM, SCHLAMAM HRM, ADMIRAAL PC, WIJTING SE, STOUGAARD J, SPAINK HP. Fusions between green fluorescent protein and β -glucuronidase as sensitive and vital bifunctional reporters in plants. *Plant Mol Biol* 1998; **38**: 861–873.

- [78] RAGHOTHAMA KG, MAGGIO A, NARASIMHAN ML, KONONOWICZ AK, WANG G, PAINO D'URZO M, HASEGAWA PM, BRESSAN RA. Tissue specific activation of the osmotin gene by ABA, C₂H₄, and NaCl involves the same promoter region. *Plant Mol Biol* 1997; **34**: 393-402.
- [79] REICHEL C, MATHUR J, ECKES P, LANGENKEMPER K, KONCZ C, SCHELL J, REISS B, MAAS C. Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 5888-5893.
- [80] REMANS T, SCHENK PM, MANNERS JM, GROF CPL, ELLIOTT AR. A protocol for the fluorometric quantification of mGFP5-ER and sGFP(S65T) in transgenic plants. *Plant Mol Biol Rep* 2000; **17**: 385-395.
- [81] RICHARDS HA, HALFHILL MD, MILLWOOD R.J, STEWART CN JR. Quantitative GFP fluorescence as an indicator of recombinant protein synthesis in transgenic plants. *Plant Cell Rep* 2003; **22**: 117-121.
- [82] ROUWENDAL GJA, MENDES O, WOLBERT EJH, DEBOER AD. Enhanced expression in tobacco of the gene encoding green fluorescent protein by modification of its codon usage. *Plant Mol Biol* 1997; **33**: 989-999.
- [83] SAINT-JORE CM, EVINS J, BATOKO H, BRANDIZZI F, MOORE I, HAWES C. Redistribution of membrane proteins between the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum in plants is reversible and not dependent on cytoskeletal networks. *Plant J* 2002; **29**: 661-678.
- [84] SEKAR RB, PERIASAMY A. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *J Cell Biol* 2003; **160**: 629-633.
- [85] SHAW SL, KAMYAR R, EHRHARDT DW. Sustained microtubule treadmilling in *Arabidopsis* cortical arrays. *Science* 2003; **300**: 1715-1718.
- [86] SHEEN J, HWANG S, NIWA Y, KOBAYASHI H, GALBRAITH DW. Green fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *Plant J* 1995; **8**: 777-784.
- [87] SIEMERING KR, GOLBIK R, SEVER R, HASELOFF J. Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Curr Biol* 1996; **6**: 1653-1663.
- [88] SOHN EJ, KIM ES, ZHAO M, KIM SJ, KIM H, KIM YW, LEE YJ, HILLMER S, SOHN U, JIANG L. Rha1, an *Arabidopsis* Rab5 homolog, plays a critical role in the vacuolar trafficking of soluble cargo proteins. *Plant Cell* 2003; **15**: 1057-1070.
- [89] STAUBER RH, HORIE K, CARNEY P, HUDSON EA, TARASOVA NI, GAITANARIS GA, PAVLAKIS GN. Development and applications of enhanced green fluorescent protein mutants. *Biotechniques* 1998; **24**: 462-471.
- [90] STEWART CN JR. The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. *Plant Cell Rep* 2001; **20**: 376-382.
- [91] TAKEUCHI M, UEDA T, YAHARA N, NAKANO A. Arf1 GTPase plays roles in the protein traffic between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus in tobacco and *Arabidopsis* cultured cells. *Plant J* 2002; **31**: 499-515.
- [92] TIAN L, SEGUIN A, CHAREST PJ. Expression of the green fluorescent protein gene in conifer tissues. *Plant Cell Rep* 1997; **16**: 267-271.
- [93] VAIN P, WORLAND B, KOHLI A, SNAPE JW, CHRISTOU P. The green fluorescent protein (GFP) as a vital screenable marker in rice transformation. *Theor Appl Genet* 1998; **96**: 164-169.
- [94] VAN DER GEEST AHM, PETOLINO JF. Expression of a modified green fluorescent protein gene in transgenic maize plants and progeny. *Plant Cell Rep* 1998; **17**: 760-764.
- [95] WEIR B, GU X, WANG M, UPADHYAYA N, ELLIOTT AR, BRETTELL RIS. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of wheat using suspension cells as model system and green fluorescent protein as a visual marker. *Aust J Plant Physiol* 2001; **28**: 807-818.
- [96] WYMER CL, FERNÁNDEZ-ÁBALOS JM, DOONAN JH. Microinjection reveals cell-to-cell movement of green fluorescent protein in cells of maize coleoptiles. *Planta* 2001; **212**: 692-695.
- [97] ZHANG J, CAMPBELL RE, TING AY, TSIEN RY. Creating new fluorescent probes for cell biology. *Mol Cell Biol* 2002; **3**: 906-918.

Andrzej Kiejstut Kononowicz

Zakład Cytogenetyki i Biologii Molekularnej Roślin, Uniwersytet Łódzki,

ul. S. Banacha 12/16, 90-237 Łódź,

e-mail:kononow@biol.uni.lodz.pl

MECHANIZMY KONDENSACJI CHROMOSOMÓW

MECHANISMS OF CHROMOSOME CONDENSATION

Janusz MASZEWSKI i Dorota RYBACZEK

Katedra Cytofizjologii Uniwersytetu Łódzkiego

Streszczenie: Mitotyczna kondensacja i segregacja chromosomów to dwa procesy, które zapewniają prawidłowe dziedziczenie zreplikowanych sekwencji genomu. Choć od czasu publikacji Walthera Fleminga i zamieszczonych w niej pierwszych rysunków mitotycznych komórek salamandry minęło już ponad 120 lat, aktualny stan wiedzy wciąż jeszcze nie pozwala na stworzenie uniwersalnego modelu opisującego formowanie się i rozdział chromatyd siostrzanych. Badania molekularne wskazują, że w organizację tych struktur zaangażowane są co najmniej trzy kategorie białek: (1) podstawowe składniki kształtujące postać chromatyny interfazowej – histony rdzeniowe i histon H1, (2) cząsteczki związane z chromatyną w przebiegu całego cyklu komórkowego, lecz pełniące różne funkcje w jego kolejnych fazach, np. topoizomeraza II, oraz (3) kompleksy kohezyny i kondensyny, których nazwy wskazują na udział w procesach zespalania i kondensacji chromosomów. Wszystkie te białka, przy udziale innych, nie poznanych dotychczas czynników, uczestniczą w procesie formowania mitotycznej postaci chromatyny, bez konieczności wymiany podstawowych komponentów molekularnych, obecnych w jądrach interfazowych.

Słowa kluczowe: kondensacja chromosomów, mitoza, fosforylacja histonów H1 i H3, topoizomeraza II, kondensyna.

Summary: Mitotic condensation and segregation of chromosomes represent two fundamental processes ensuring the correct inheritance of the genomic DNA sequences replicated in the course of S-phase. Although Walther Fleming's first drawings of mitosis in salamander cells have been published over 120 years ago, our current knowledge still does not consent to construct a universal model showing definitively how the mitotic chromosome is formed and partitioned. Molecular studies indicate that at least three major classes of proteins take part in the composition of mitotic chromosomes: (1) the basic structural components of interphase chromatin such as core histones and histone H1, (2) molecules that are present on both interphase and mitotic chromosomes but whose activities are used differently at particular phases of the cell division cycle, e.g. topoisomerase II, and (3) the complexes of cohesin and condensin, with the names given to indicate their roles in chromosome cohesion and compaction. All these proteins, in cooperation with other factors, contribute to the organization of the mitotic structure of chromosomes, without obvious need to exchange basic molecular components of interphase chromatin.

Key words: chromosome condensation, mitosis, histone H1 and H3 phosphorylation, topoisomerase II, condensin

WSTĘP

Formowanie się odrębnych chromosomów mitotycznych z chromatyny interfazowego jądra komórkowego to wynik działania skomplikowanego układu regulacyjnego, dzięki któremu długie, zreplikowane cząsteczki DNA przyjmują postać chronioną przed uszkodzeniami i dostosowaną do biomechanicznych procesów kariokinezy. Stopień upakowania, jaki poprzez swoją organizację domenową osiąga chromatyna przed przejściem $G_2 \rightarrow M$ daleki jest od kulminacyjnego skondensowania metafazowego, które w większości komórek eukariotycznych wyraża się współczynnikiem 8000–12 000; kondensacja ta osiąga niemal maksymalny poziom jeszcze zanim chromatydy ulegną widocznemu rozdzieleniu (segregacji; [45]). Zmiany strukturalne obserwowane podczas profazy są efektem modyfikacji biochemicznych zachodzących zarówno w białkowym rusztowaniu formującego się chromosomu, jak i w zewnętrznych regionach pętli solenoidowych. Wyniki badań genetycznych i molekularnych wskazują, że oprócz podstawowych elementów kształtujących fibrylarną postać chromatyny interfazowej (m. in. histonów H1 oraz histonów rdzeniowych), a także topoizomerazy II (wielofunkcyjnego składnika nukleoszkieletu) [8, 22], w organizację skondensowanych struktur chromosomów mitotycznych zaangażowane są kompleksy kohezyjne, tworzące się przy udziale białek typu SMC (*structural maintenance of chromosomes*) i łączących się z nimi białek SCC (*sister chromatid cohesion*) [29, 31]. Identyfikacja pierwszego genu SMC – *smc1* (*stability of minichromosomes 1*) nastąpiła w czasie, gdy pierwsze bezkomórkowe ekstrakty cytoplazmatyczne (uzyskiwane przez zwirowywanie komórek jajowych *Xenopus*) stały się systemami doświadczalnymi *in vitro* do badań nad montażem „syntetycznych jąder” i przekształceń chromatyny plemników w postać chromosomów mitotycznych.

1. BIAŁKA HISTONOWE

Histon H1. Cząsteczki silnie lizynowych histonów rodziny H1 uczestniczą w stabilizacji (pozycjonowaniu) nukleosomów, a na wyższym poziomie strukturalnej organizacji chromatyny biorą udział w formowaniu solenoidowych włókien o średnicy 30 nm [51]. Zwiększając poziom upakowania DNA odgrywają one istotną rolę w ogólnej represji sekwencji genowych. Niska zawartość histonów H1 charakteryzuje regiony genów aktywnych, natomiast zupełny brak tych białek jest niezbędnym warunkiem transkrypcji *in vitro*. W kontekście inhibicyjnych oddziaływań histonów H1 wobec matrycowej aktywności DNA, powszechnie obserwowana jednoczesność superfosforylacji niemal wszystkich cząsteczek H1 oraz inicjacji początkowych stadiów mitozy, stała się podstawą hipotezy, według której obydwie procesy są powiązane zależnościami o charakterze przyczynowo-skutkowym. Znaczenie fosforylacji histonów H1 (obejmującej zarówno C-, jak i N-końcowe odcinki łańcucha polipeptydowego) w przebiegu mitozy, dokonującej się za pośrednictwem katalitycznej aktywności kinazy p34cdc2, pozostaje

jednak wciąż kwestią kontrowersyjną, a funkcjonalne aspekty tego procesu są niejasne. Podczas kondensacji chromosomów w cytoplazmatycznych ekstraktach z komórek jajowych *Xenopus*, białka te wydają się odgrywać tylko drugoplanową rolę. Ich całkowity brak u *Tetrahymena* nie wpływa w sposób istotny na zdolność przeżywania komórek i segregację chromosomów, natomiast w komórkach *S. cerevisiae* utrata jedynego genu kodującego histon H1 nie wywiera znaczącego wpływu na procesy wzrostu lub zdolność do koniugacji płciowej. Ponadto, kondensacja chromosomów w komórkach zwierzęcych może być wywołana eksperymentalnie w warunkach uniemożliwiających superfosforylację histonów H1. Tak więc, potranslacyjne modyfikacje cząsteczek H1, skorelowane w procesami inicjacji mitozy, stanowią być może mechanizm, który – wbrew dawnym poglądom – zwiększa dostępność innych, specyficznych czynników biochemicznych, natomiast kondensacja profazowa jest tylko wtórnym efektem ich bezpośredniego wiązania się z DNA lub chromatyną. Zgodnie z taką koncepcją wydają się być wyniki niektórych badań nad fosforylacją histonów H3 [21].

Histon H3. Ścisłą korelację z inicjalnymi stadiami mitotycznej kondensacji chromosomów wykazuje fosforylacja rdzeniowych histonów H3. Ta wysoce specyficzna, konserwatywna modyfikacja potranslacyjna, polegająca na przyłączeniu grupy fosforanowej do seryny 10 w N-końcowym regionie cząsteczki H3, dokonuje się przy udziale białkowej kinazy Aurora B (znanej także jako kinaza Ipl1 u *S. cerevisiae*, a AIR-2 u *C. elegans*) [23, 42], a także co najmniej dwóch innych białek tej samej rodziny, zidentyfikowanych w komórkach ssaków – kinazy Aurora A i Aurora C [7, 40]. Analogiczną funkcję katalityczną wobec histonów H3 u *Aspergillus nidulans* pełni kinaza – NimA [10]. Modyfikacja cząsteczek histonów H3 na serynie 10 obserwowana jest często już w początkowych stadiach fazy G2 (przed okresem maksymalnej aktywności kinazy p34cdc2) w regionach heterochromatyny okołocentromerowej i rozprzestrzenia się w kierunku telomerów, stopniowo obejmując cały obszar ramion chromosomu w okresie metafazy. Proces ten skorelowany jest ze zmianą lokalizacji, a tym samym, ze zmianą obszaru fizycznych interakcji kinazy Aurora B z N-końcowymi odcinkami histonów H3 [23]. Podstawienie alaniny w miejscu seryny 10 (S10A) u *Tetrahymena thermophila* prowadzi do zaburzeń w procesie mitotycznej kondensacji i segregacji chromosomów oraz do nieprawidłowego przebiegu cytokinezy [50]. Podobne efekty w komórkach *D. melanogaster* i *C. elegans* wywołują mogą mutacje lub eliminacja cząsteczek kinazy Aurora B przy udziale RNAi [1, 13]. W komórkach *S. cerevisiae*, charakteryzujących się naturalnie niskim poziomem upakowania chromatyny mitotycznej [28], wyraźne związki między nasileniem stopnia fosforylacji histonów H3 a kondensacją chromosomów obserwowane są jednak wyłącznie w przebiegu mejozy [23].

Fosforylacja cząsteczki histonu H3, wykazująca wyraźny związek z mitotyczną kondensacją chromosomów, następuje także na serynie 28 [14]. W przeciwieństwie do seryny 10 (zaangażowanej prawdopodobnie tylko podczas preprofazowej inicjacji procesu formowania się chromosomów, a nie w dalszych fazach ich kondensacji), fosforylacja seryny 28 ujawnia się dopiero we wczesnych stadiach mitozy. Asynchroniczność obu tych potranslacyjnych modyfikacji sugeruje, że wywołujące je sygnały molekularne mają charakter niezależny [7].

Zgodnie z najczęściej postulowanym modelem, fosforylacje N-końcowych fragmentów cząsteczek histonów H3 stanowią – przede wszystkim – wstępny sygnał molekularny, umożliwiający zainicjowanie procesu kondensacji chromosomów poprzez tworzenie warunków do montażu innych białek, bezpośrednio zaangażowanych w strukturalne przeobrażenia chromatyny (np. kompleksów kondensyny) [50]. Istotnym efektem fosforylacji histonów H3 jest więc prawdopodobnie dekompozycja interfazowego zestawu polipeptydów zasocjowanych z chromatyną (np. kompleksów ISWI), częściowa eliminacja niektórych elementów odpowiedzialnych za kohezję chromatyd siostrzanych, a także mitotyczne dojrzewanie struktur kinetochorowych [34]. Rola, jaką potranslacyjne modyfikacje histonów H3 odgrywają w procesie kondensacji mitotycznej, wciąż nie jest jasna. Wyniki badań przeprowadzonych z wykorzystaniem systemu RNAi wskazują, że w komórkach S2 *Drosophila* pozbawionych aktywności kinazy Aurora B, jedna z podjednostek kompleksu kondensyny (Barren) nie ulega prawidłowemu rozmieszczeniu wzdłuż fibryli chromatynowych, co prowadzi do zakłóceń w procesie segregacji chromosomów oraz powstawania licznych mostków anafazowych [13]. nierozwiązanym problemem pozostaje wciąż jednak znalezienie dowodu wskazującego, że obserwowane aberracje mitotyczne stanowią wyłącznie efekt deficytu ufosforylowanych cząsteczek H3, a nie są także (lub tylko) skutkiem zaburzeń innych mechanizmów molekularnych, odpowiedzialnych za przebieg procesu kondensacji w mitozie. W oczyszczonych systemach biochemicznych, fosforylacja lub brak fosforylacji seryny 10 nie wywiera żadnego wpływu na zdolność przyłączania kompleksów 16S kondensyny do nukleosomów immobilizowanych *in vitro* [26], natomiast w bezkomórkowych systemach cytoplazmatycznych z oocytów *Xenopus*, kondensyna wykazuje zdolność wiązania się z nukleosomami pozbawionymi N-końcowych fragmentów histonów rdzeniowych [9]. Ponadto, indukowana fosforylacja histonów H3 okazała się być warunkiem niewystarczającym do formowania kompleksów kondensyny z chromosomami [38]. Wyraźnie sprzeczne z rozpowszechnioną koncepcją, sugerującą kluczową rolę fosforylacji histonów H3 w procesie indukcji mitotycznej kondensacji chromosomów, są także wyniki badań wskazujących, że immunoprecypitacja kompleksów INCENP-Aurora B, drastycznie redukująca poziom tej fosforylacji w ekstraktach cytoplazmy *Xenopus*, nie wpływa na przebieg mitotycznej rekonstrukcji plemników [34]. Jak się wydaje, modyfikacje potranslacyjne cząsteczek H3 stanowią więc tylko jeden z wielu przejawów działania skomplikowanego mechanizmu regulacyjnego, który prowadzi do wzrostu upakowania chromatyny podczas profazowej kondensacji chromosomów. Pogląd taki zgodny jest z obserwacjami wskazującymi na znaczną asynchroniczność okresu nasilonej fosforylacji histonów H3 i początkowych stadiów mitotycznej kondensacji u różnych organizmów, a w komórkach roślinnych – na fosforylację cząsteczek H3 następującą dopiero w chromosomach już skondensowanych [24].

2. BIAŁKA NIEHISTONOWE

Opublikowane w 1977 r. przez Paulsona i Laemmliego mikroskopowo-elektronowe zdjęcia chromosomów metafazowych stały się inspiracją do badań nad rolą białek niehistonowych (NHC; *nonhistone chromatin*) w procesie formowania i segregacji chromatyny o wyższym poziomie skondensowania. Mikrofotografie te ujawniały sieci splątanych włókien – resztkowe „szkielety”, które stanowić miały strukturę organizującą solenoidowe włókna chromatyny w trakcie mitozy. Ponieważ ekstrakcja histonów przy użyciu wysokich stężeń soli pozostawiała ujemne ładunki DNA bez neutralizujących oddziaływań cząsteczek białkowych o charakterze zasadowym, formowanie się *in vivo* promienistych pętli wspartych na rusztowaniu z białek NHC stało się przedmiotem kontrowersji. Wkrótce jednak, badania nad strukturą chromosomów stopniowo ujawniały kolejne fakty potwierdzające „szkieletową” organizację ich budowy. Być może, jednym z najbardziej zaskakujących odkryć było wykazanie, że wśród komponentów budujących chromosomy znajdują się cząsteczki topoizomerazy IIa oraz jednej z kondensyn typu SMC (*structural maintenance of chromosomes*) [36].

Genomy eukariotyczne kodują co najmniej sześć podrodzin wysoce konserwatywnych białek SMC. Ponieważ każde z nich asocjować może tylko z określonym, specyficznym partnerem białkowym, heterodimery SMC klasyfikuje się zgodnie z podziałem na trzy grupy: SMC1-SMC3, SMC2-SMC4 i SMC5-SMC6. Aby utworzyć w pełni funkcjonalne holokompleksy SMC, każdy z tych heterodimerów asocjuje z różnymi podjednostkami białkowymi nie należącymi do rodziny SMC (podjednostek nie-SMC; „*non-SMC*”). Specyfika funkcji utworzonych tak kompleksów zależy od składu podjednostek SMC i „nie-SMC”. Łącząc się z podjednostkami nie-SMC, heterodimery SMC tworzą dwa podstawowe kompleksy białkowe – kohezyny i kondensyny [22, 39]. Poznanie struktury białek SMC ma kluczowe znaczenie dla zrozumienia dynamiki chromosomów, a ze względu na implikacje funkcjonalne dotyczące ich zróżnicowanych aktywności w przebiegu mitozy, szczególnie istotne staje się wyjaśnienie charakteru współdziałania kompleksów kohezyny i kondensyny [31, 32]. Ich interakcje wydają się być podstawą jednego z głównych mechanizmów molekularnych, dzięki któremu zreplikowane i odpowiednio zespolone cząsteczki genomu osiągają stan pełnej kondensacji, umożliwiającej – bez splątania i uszkodzeń – segregację chromatyd siostrzanych.

Kohezyna i kondensyna. Białko SMC jest długą (~135–155 kDa) cząsteczką o dwóch globularnych domenach N- i C-końcowych, które, aby ujawnić swoją aktywność ATPazową, musi wejść w związki wewnątrz- lub międzymolekularne. Strukturę pierwszorzędową SMC, zorganizowaną podobnie w komórkach bakteryjnych i ludzkich, tworzy 5 odrębnych domen. Dwa motywy wiążące nukleotydy – Walker A i Walker B – zlokalizowane są w konserwatywnych regionach N- i C-terminalnych. Centralną domenę globularną tworzy umiarkowanie zachowawcza sekwencja zawiasowa (*hinge*), umiejscowiona pomiędzy dwiema superhelisami (*coiled-coil motifs*). Na podstawie analiz sekwencji SMC sądzi się, że antyrównoległe (przeciwbieżne) fałdowanie wewnątrz- i międzymolekularne przybliżyła ku sobie krańcowe, katalityczne regiony globularne. Badania mikroskopowo-elektronowe SMC u bakterii wykazały, że superhelikalne

motywy powstające w wyniku antyrównoległego zestawienia cząsteczek, tworzą dwuramienną strukturę symetryczną [37]. Chociaż badania te sugerują możliwość dimeryzacji międzycząsteczkowej w postaci homodimerów (wszystkie organizmy prokariotyczne posiadają tylko pojedyncze kopie genów SMC), w komórkach eukariotycznych bardziej prawdopodobne wydaje się antyrównoległe fałdowanie wewnątrzcząsteczkowe [16, 20]. Hydrodynamiczne właściwości dimeru SMC okazały się zgodne z założeniem, że giętkość centralnego zawiasu powinna umożliwiać rozwieranie i zamykanie się obu ramion [19]. W tworzeniu się kompleksów kohezyny udział biorą zarówno białka typu SMC (SMC1 i SMC3), jak i białka podrodziny SCC (SCC1 lub rad21 oraz SCC3 lub SA), nie należące do kategorii SMC. Kompleksy te łączą się z chromatyną bezpośrednio po replikacji DNA i utrzymują chromatydy siostrzane w stanie kohezji aż do momentu ich segregacji w anafazie [36, 48, 49].

Kondensyna (określana także terminem kondensyna 13S) zidentyfikowana została po raz pierwszy u *X. leavis* jako holokompleks dwóch podjednostek SMC (SMC2/CAP-E i SMC4/CAP-C) oraz trzech podjednostek nie-SMC (CAP-D2, CAP-G i CAP-H). Białka CAP-D2 i CAP-G charakteryzują się obecnością motywów *HEAT repeats* – tandemowych powtórzeń strukturalnej podjednostki α -helikalnej. Ponieważ motywy te występują także w produktach genów *Scs2/Mis4* oraz *Pds5/BimD/Spo76*, zaangażowanych w zespalanie chromatyd siostrzanych, wymienia się je wśród tych elementów funkcjonalnej organizacji cząsteczek białkowych w strukturach chromosomów, które sugerują wspólny rodowód molekularnych czynników kondensacji i kohezji [22, 26]. Ani sam heterodimer SMC, ani kompleks białek typu „nie-SMC” nie wykazują zdolności indukowania kondensacji chromosomów [26]. Analogiczne interakcje zachodzą prawdopodobnie także w innych systemach komórkowych. Wykrycie kondensyny w bezkomórkowych ekstraktach cytoplazmy jajowej *Xenopus* umożliwiło podjęcie badań nad mechanizmami działania tego kompleksu białkowego w warunkach *in vitro*. Pierwotnie sądzono, że kondensyna – przy udziale ATP – indukuje formowanie się dodatnich superskrętów DNA, natomiast podjednostki niespokrewnione z SMC pełnią funkcje regulatorowe i są substratami w fosforylacjach zależnych od aktywności kinazy p34cdc2 [25, 36]. ATP-zależna, superhelikalna aktywność kondensyny (po jej związaniu z DNA plazmidowym) została potwierdzona dzięki zastosowaniu metody elektronowego obrazowania spektroskopowego [3]. Pojedynczy kompleks kondensyny ujawniał się wówczas w postaci zasocjowanej z dwiema domenami plazmidowego DNA. Kompleks ten zdolny był zarazem do indukcji dwu lub większej liczby dodatnich skrętów superhelikalnych w obrębie zamkniętej, kolistej cząsteczki DNA. Nie jest jednak jasne, czy spiralizacja tego typu zachodzić może także w natywnej chromatynie o strukturze nukleosomowej. Nierozstrzygniętą kwestią jest także gęstość rozmieszczenia kondensyny, istotna ze względu na potencjalny stopień skondensowania fibryli chromatynowej. Trudności przysparza także znalezienie dowodów eksperymentalnych potwierdzających udział podjednostek kondensyny w procesie formowania chromosomów *in vivo*. Chociaż mutacje „*barren*” (CAP-H) i „*gluon*” (SMC4) wyraźnie wskazują na znaczenie obu genów w procesie kondensacji chromatyny, to jednak – na skutek niedostatecznej segregacji obu chromatyd siostrzanych – prowadzą one zarazem do powstawania licznych mostków anafazowych [44]. Ponadto, odrębny mechanizm regulacyjny steruje lokalizacją

podjednostek kondensyny, różnicując ją w kolejno następujących po sobie fazach cyklu komórkowego; prawdopodobnie mechanizm ten wywiera wpływ na proces kierowania całych kompleksów kondensyny do jądra i na dynamikę ich wiązania się z chromatyną [36]. Na możliwość taką wydaje się wskazywać zdolność łączenia się w komórkach ludzkich *in vitro* C-końcowych odcinków białka hCAP-D2 z histonami H1 i H3 [2].

Przyżyciowe badania lokalizacji białka Smc4p połączonego z GFP (*green fluorescing protein*) w komórkach *S. cerevisiae* ujawniły wyraźny przyrost liczby kompleksów kondensyny w regionach rDNA podczas przejścia G2→M. U mutantów *smc2* i *smc4*, mitotyczna segregacja rDNA jest opóźniona w porównaniu z okołowcentromerowymi oraz dystalnymi fragmentami ramion chromosomów. Zgrupowania Smc4p-GFP utrzymują się także w interfazie; obserwacje te sugerują więc, że kondensyna jest czynnikiem obdarzonym specyficznymi funkcjami – zdolnością do przestrzennej reorganizacji wysoce powtarzalnych sekwencji o właściwościach heterochromatyny [12]. Wzrost liczebności podjednostek kondensyny obserwowano także w jąderkach komórek ludzkich [4].

Mutacje genów kodujących elementy kompleksów odpowiedzialnych za kohezję chromatyd siostrzanych prowadzą do poważnych zaburzeń w procesie kondensacji chromosomów. Pod względem fenotypowym zaburzenia te są nieodróżnialne od efektów mutacji w obrębie genów kondensyny [17, 18]. Obydwa kompleksy białkowe asocjują z chromatyną niezależnie od siebie [47]. Strukturalny i funkcjonalny stan zdecondensowanej chromatyny jest odmienny u mutantów pozbawionych cząsteczek kohezyny i mutantów wykazujących brak jednego z istotnych składników kondensyny. Badania Lavoie i wsp. [31], prowadzone z wykorzystaniem temperaturo-wrażliwych mutantów drożdży (*S. cerevisiae*) wykazały, że chociaż obecność kohezyny nie jest czynnikiem warunkującym aktywację enzymatycznych funkcji kondensyny (kondensować mogą chromosomy niezreplikowane, z definicji pozbawione kohezji), jednak wpływa ona w istotny sposób na oddziaływanie kondensyny i warunkuje prawidłowe fałdowanie cząsteczek chromosomowego DNA. Kompleksy kohezyny rozmieszczone są wzdłuż chromosomów w sposób regularny, w regionach oddalonych od siebie o ok. 10 000 par zasad [30], co odpowiada szacunkowej gęstości rozmieszczenia kondensyny w komórkach *S. pombe* (jeden kompleks co 8000–10000 par zasad) [46]. Korelacje te stały się podstawą atrakcyjnej hipotezy, zakładającej podwójną rolę kompleksów kohezyny: (1) jako spoiwa chromatyd siostrzanych, oraz (2) jako *cis*-determinantów procesu kondensacji chromosomów [31]. Zgodnie z proponowaną koncepcją, sąsiednie miejsca chromosomu wykazujące zdolność wiązania kompleksów kohezyny stają się kolejnymi punktami granicznymi, które wyznaczają długość odcinka fibryli chromatynowej wypętlanej przez pojedynczy kompleks kondensyny. Eliminacja kohezyny nie blokuje więc przebiegu procesu kondensacji (zależnego od kondensyny), lecz zaburza strukturę chromosomu.

Wydaje się, że proces kondensacji chromosomów nie jest uzależniony wyłącznie od funkcji samej tylko kondensyny i jej zmiennych kooperacji molekularnych z kompleksami kohezyny. Do czynników regulacyjnych zaangażowanych pośrednio w mitotyczną reorganizację fibryli chromatynowych należy AKAP95 – składnik macierzy jądrowej zakotwiczący kinazę białkową A (*A-kinase-anchoring protein 95*) [11]. W mitotycznych

ekstraktach komórek HeLa, po rozpadzie otoczki jądrowej, białko to łączy się z chromatyną i kieruje do niej podjednostki kondensyny – hCAP-D2 [43]. AKAP95 wyposażone jest w dwa motywy palców cynkowych (niezbędne podczas indukcji kondensacji), z których tylko jeden steruje lokalizacją białka hCAP-D2 [2, 11]. W procesie tym biorą udział także histony H1 i H3. Na podstawie badań *in vitro* nad interakcjami obu histonów z podjednostkami CNAP1/hCAP-D2/Eg7 kondensyny ludzkiej sądzi się, że AKAP95 uczestniczy w montażu kompleksów kondensyny na chromosomach mitotycznych. Interesujące zróżnicowanie funkcji regulacyjnych tego białka ujawnia się podczas mitozy w zygocytach komórek mysich. AKAP95 staje się wówczas czynnikiem niezbędnym do mitotycznej kondensacji oraz prawidłowej lokalizacji kondensyny, wyłącznie jednak w obrębie homologów pochodzących z gamet żeńskich, nie bierze natomiast udziału w formowaniu struktury chromosomów męskich [11].

Topoizomeraza II. Topoizomeraza II (topo II) została zidentyfikowana jako jeden z podstawowych, wielkocząsteczkowych elementów białkowego szkieletu chromosomów mitotycznych oraz macierzy utrzymującej pętle chromatyny w jądrach interfazowych. Jest ona zarazem enzymem katalizującym przejściowe nacięcia i łączenie obu nici DNA, przez co spełnia rolę czynnika relaksacji superhelikalnych naprężeń powstających w wyniku ruchu widełek replikacyjnych. Znaczenie topo II w procesie kondensacji mitotycznej ujawniono po raz pierwszy podczas badań nad aktywnością cytoplazmatycznych ekstraktów z komórek jajowych *Xenopus*, wykazując stechiometryczny udział tego białka w montażu struktur chromosomowych [8]. Obserwacje żywych komórek, w których fluorescencję kompleksów topo II α i β z GFP poddawano wytlumianiu laserowemu, pozwoliły na ukazanie dynamicznych translokacji tych białek w czasie interfazy i mitozy, sugerując zarazem, że ich biologiczna rola nie ogranicza się wyłącznie do kształtowania statycznych elementów szkieletu chromosomowego [5].

Mitotyczna kondensacja chromatyny w bezkomórkowych systemach *in vitro* uzależniona jest od biochemicznej aktywności topo II i kompleksów kondensyny. Brak kondensyny w ekstraktach komórek jajowych *Xenopus* utrzymuje chromatynę w postaci bezkształtnych mas, ale swoim wyglądem różnią się one znacznie od posklejanych, splecionych obszarów zwartej chromatyny, formującej się w bezkomórkowych ekstraktach pozbawionych topo II. Tak więc, udział kondensyny i topo II w procesie montażu chromosomów *in vitro* wiąże się z odrębnymi funkcjami mechanicznymi [22]. W czasie bezpośredniego przekształcania się niezreplikowanej chromatyny w postaci chromosomów jednochromatydowych, białka te muszą za sobą współdziałać, mimo że ich wędrówki w docelowe miejsca montażu przebiegają niezależnie. Podczas formowania się chromosomów, po zakończeniu biosyntezy DNA, zapotrzebowanie na topo II i kondensynę ulega rozdzieleniu w czasie. Centralna oś białkowa, bogata w topo II, może być wówczas obserwowana mimo braku kondensyny, a pojawienie się jej kompleksów uruchamia dalsze etapy przebudowy, organizujące typową strukturę chromosomu. Przebieg tego procesu w cytoplazmatycznych ekstraktach komórek jajowych *Xenopus* wydaje się wskazywać, że kondensyna indukuje tworzenie się superskrętów DNA, rozplatanych następnie przez topo II, co umożliwia zainicjowanie mitotycznej kondensacji [8].

Znaczenie topo II i jej interakcji z kompleksami kondensyny podczas mitozy zachodzącej w naturalnym środowisku komórki (*in vivo*) pozostaje wciąż kwestią nierozstrzygniętą. Prawdopodobnie, rola tego białka jako jednego z wielu molekularnych czynników kondensacji chromosomów zmienia się w zależności od podstawowej zawartości genomowego DNA i rozmiarów chromosomów [6, 8]. Ujawnienie specyficznych zależności funkcjonalnych między aktywnościami topo II i kondensyny w bezkomórkowych ekstraktach cytoplazmatycznych jest przykładem koordynacji mechanizmów kondensacji chromatyny z tymi procesami, które w przebiegu cyklu komórkowego znacznie wyprzedzają zjawiska mitotyczne. Do efektów fenotypowych prowadzą niektóre mutacje zaburzające przebieg replikacji DNA. Chociaż zaburzenia struktury genów kodujących białka kondensyny nie zawsze manifestują się pojawieniem nieprawidłowości w przebiegu kondensacji chromosomów, anomalie tego procesu opisywane są często jako bezpośrednie przyczyny letalnych mutacji mitotycznych u *Drosophila* [36]. Mutacje te modyfikują architekturę chromosomów ukazując zarazem ogromny stopień molekularnego skomplikowania tych struktur oraz złożoność mechanizmów biochemicznych, które decydują o ich funkcjach dynamicznych. Mutacje ORC2 (*origin recognition complex 2* – podjednostka 2 kompleksu rozpoznającego sekwencje origin) powodują utworzenie odcinków o niejednorodnym stopniu zagęszczenia chromatyny, powstawanie fragmentów niezdolnych do prawidłowej kondensacji i wykazujących szczególnie opóźnioną replikację DNA [33, 41]. Podobne defekty pojawiają się także w wyniku mutacji genów ORC3 i ORC5, co skłania do wniosku, że cały kompleks ORC odgrywa istotną rolę w procesie indukcji mitotycznej kondensacji chromosomów. Ponadto, ze względu na oddziaływanie zakłócające przebieg replikacji DNA, mutacje w obrębie RFC4 (podjednostki 4 kompleksu replikacyjnego czynnika C) prowadzą u *Drosophila* do przedwczesnej kondensacji chromosomów (w efekcie zaburzenia punktu kontrolującego integralność struktury DNA) i przedwczesnej separacji chromatyd [27]. Defekty te wynikają prawdopodobnie z zaburzeń w funkcjonowaniu dwóch „alternatywnych” kompleksów RFC, o istotnym znaczeniu w funkcjonalnej organizacji punktów kontrolnych [15], wykazujących zdolność do utrzymywania chromatyd siostrzanych w stanie kohezji [35].

Proces formowania się chromosomów mitotycznych związany jest z konstrukcją olbrzymich kompleksów makrocząsteczek, a ich montaż jest swoistym przejawem morfogenezy molekularnej. Kontrola nad przebiegiem tych skomplikowanych zjawisk dokonuje się na wielu płaszczyznach molekularnej organizacji chromatyny: poprzez asocjacje jej składników z macierzą jądrową, specyficzne fosforylacje i defosforylacje warunkowane zmianami aktywności kinaz i fosfataz białkowych, translokacje niektórych cząsteczek wzdłuż fibryli kondensującej chromatyny lub ramion już uformowanych chromosomów. Mimo ogromu informacji płynących z badań biochemicznych i genetycznych, wiedzy o sekwencjach genomów i rozwoju metod badawczych, wykonane przeszło 120 lat temu przed Edwarda Strasburgera rysunki kondensujących i dzielących się chromosomów w komórkach pręcikowych trzykrotki, również dzisiaj stanowią sekwencję obrazów skrywających jedno z najbardziej tajemniczych zjawisk biologicznych.

LITERATURA

- [1] ADAMS RR, MAIATO H, EARNSHAW WC, CARMENA M. Essential roles of *Drosophila* inner centromere protein (INCENP) and aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochore disjunction, and chromosome segregation. *J Cell Biol* 2001; **153**: 865-880.
- [2] BALL AR Jr, SCHMIESING JA, ZHOU C, GREGSON HC, OKADA Y, DOI T, YOKOMORI K. Identification of a chromosome-targeting domain in the human condensin subunit CNAP1/hCAP-D2/Eg7. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 5769-5781.
- [3] BAZETT-JONES DP, KIMURA K, HIRANO T. Efficient supercoiling of DNA by a single condensin complex as revealed by electron spectroscopic imaging. *Mol Cell* 2002; **9**: 1183-1190.
- [4] CABELLO OA, ELISEEVA E, HE W, YOUSOUFIAN H, PLON SE, BRINKLEY BR, BELMONT JW. Cell cycle-dependent expression and nucleolar localization of hCAP-H. *Mol Biol Cell* 2001; **12**: 3527-3537.
- [5] CHRISTENSEN MO, LARSEN MK, BARTHELMES HU, HOCK R, ANDERSEN CL, KJELDSSEN E, KNUDSEN BR, WESTERGAARD O, BOEGE F, MIELKE C. Dynamics of human DNA topoisomerases II α and II β in living cells. *J Cell Biol* 2002; **157**: 31-44.
- [6] CORTÉS F, PASTOR N, MATEOS S, DOMÍNGUEZ I. Roles of DNA topoisomerases in chromosome segregation and mitosis. *Mutation Res* 2003; **543**: 59-66.
- [7] CROSIO C, FIMIA GM, LOURY R, KIMURA M, OKANO Y, ZHOU H, SEN S, ALLIS CD, SASSONE-CORSI P. Mitotic phosphorylation of histone H3: Spatiotemporal regulation by mammalian aurora kinases. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 874-885.
- [8] CUVIER O, HIRANO T. A role of topoisomerase II in linking DNA replication to chromosome condensation. *J Cell Biol* 2003; **160**: 645-655.
- [9] de la BARRE A-E, GERSON V, GOUT S, CREAVEN M, ALLIS CD, DIMITROV S. Core histone N-termini play an essential role in mitotic chromosome condensation. *EMBO J* 2000; **19**: 379-391.
- [10] De SOUZA CPC, OSMANI AH, WU L-P, SPOTTS JL, OSMANI SA. Mitotic histone H3 phosphorylation by the NIMA kinase in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 2000; **102**: 293-302.
- [11] EIDE T, CARLSON C, TASKEN KA, HIRANO T, TASKEN K, COLLAS P. Distinct but overlapping domains of AKAP95 are implicated in chromosome condensation and condensin targeting. *EMBO Rep* 2002; **3**: 426-432.
- [12] FREEMAN L, ARAGON-ALCAIDE L, STRUNNIKOV A. The condensin complex governs chromosome condensation and mitotic transmission of rDNA. *J Cell Biol* 2000; **149**: 811-824.
- [13] GIET R, GLOVER DM. *Drosophila* aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J Cell Biol* 2001; **152**: 669-681.
- [14] GOTO H, TOMONO Y, AJIRO K, KOSAKO H, FUJITA M, SAKURAI M, OKAWA K, IWAMATSU A, OKIGAKI T, TAKAHASHI T, INAGAKI M. Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *J Biol Chem* 1999; **274**: 25543-25549.
- [15] GREEN CM, ERDJUMENT-BROMAGE H, TEMPST P, LOWNDES NF. A novel Rad24 checkpoint protein complex closely related to replication factor C. *Curr Biol* 2000; **10**: 39-42.
- [16] HAERING CH, LOWE J, HOCHWAGEN A, NASMYTH K. Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Mol Cell* 2002; **9**: 773-788.
- [17] HANNA JS, KROLL ES, LUNDBLAD V, SPENCER FA. *S. cerevisiae* CTF18 and CTF4 are required for sister chromatid cohesion. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 3144-3158.
- [18] HARTMAN T, STEAD K, KOSHLAND D, GUACCI V. Pds5p is an essential chromosomal protein required for both sister chromatid cohesion and condensation in *S. cerevisiae*. *J Cell Biol* 2000; **151**: 613-626.
- [19] HIRANO M, ANDERSON DE, ERICKSON HP, HIRANO T. Bimodal activation of SMC ATPase by intra- and inter-molecular interactions. *EMBO J* 2001; **20**: 3238-3250.
- [20] HIRANO M, HIRANO T. Hinge-mediated dimerization of SMC protein is essential for its dynamic interaction with DNA. *EMBO J* 2002; **21**: 5733-5744.
- [21] HIRANO T. Chromosome cohesion, condensation, and separation. *Annu Rev Biochem* 2000; **69**: 115-144.
- [22] HIRANO T. The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes Dev* 2002; **16**: 399-414.

- [23] HSU J-Y, SUN Z-W, LI X, REUBEN M, TATCHELL K, BISHOP DK, GRUSHCOW JM, BRAME CJ, CALDWELL JA, HUNT DF. Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* 2000; **102**: 279–291.
- [24] KASZÁS É, CANDE WZ. Phosphorylation of histone H3 is correlated with changes in the maintenance of sister chromatid cohesion during meiosis in maize, rather than the condensation of the chromatin. *J Cell Sci* 2000; **113**: 3217–3226.
- [25] KIMURA K, HIRANO M, KOBAYASHI R, HIRANO T. Phosphorylation and activation of 13S condensin by Cdc2 *in vitro*. *Science* 1998; **282**: 487–490.
- [26] KIMURA K, HIRANO T. Dual roles of the 11S regulatory subcomplex in condensin functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 11972–11977.
- [27] KRAUSE SA, LOUPERT M-L, VASS S, SCHOEFELDER S, HARRISON S, HECK MMS. Loss of cell cycle checkpoint control in *Drosophila* RFC4 mutants. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 5156–5168.
- [28] KOSHLAND D, STRUNNIKOV A. Mitotic chromosome condensation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996; **12**: 305–333.
- [29] KURLANDZKA A. Tworzenie i rozpad kompleksu kohezyjnego chromatyd siostrzanych. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 261–272.
- [30] LALORAYA S, GUACCI V, KOSHLAND D. Chromosomal addresses of the cohesin component Mcd1p. *J Cell Biol* 2000; **151**: 1047–1056.
- [31] LAVOIE BD, HOGAN E, KOSHLAND D. *In vivo* dissection of the chromosome condensation machinery: reversibility of condensation distinguishes contributions of condensin and cohesin. *J Cell Biol* 2002; **156**: 805–815.
- [32] LOSADA A, HIRANO M, HIRANO T. Cohesin release is required for sister chromatid resolution, but not for condensin-mediated compaction, at the onset of mitosis. *Genes Dev* 2002; **16**: 3004–3016.
- [33] LOUPART M-L, KRAUSE SA, HECK MMS. Aberrant replication timing induces defective chromosome condensation in *Drosophila* ORC2 mutants. *Curr Biol* 2000; **10**: 1547–1556.
- [34] MacCALLUM DE, LOSADA A, KOBAYASHI R, HIRANO T. ISWI remodeling complexes in *Xenopus* egg extracts: Identification as major chromosomal components that are regulated by INCENP-aurora B. *Mol Biol Cell* 2002; **13**: 25–39.
- [35] MAYER ML, GYGI SP, AEBERSOLD R, HIETER P. Identification of RFC(Ctf18p, Ctf8p, Dcc1p): an alternative RFC complex required for sister chromatid cohesion in *S. cerevisiae*. *Mol Cell* 2001; **7**: 959–970.
- [36] McHUGH B, HECK MMS. Regulation of chromosome condensation and segregation. *Curr Op Gen Dev* 2003; **13**: 185–190.
- [37] MELBY TE, CIAMPAGLIO CN, BRISCOE G, ERICKSON HP. The symmetrical structure of structural maintenance of chromosomes (SMC) and MukB proteins: long, antiparallel coiled coils, folded at a flexible hinge. *J Cell Biol* 1998; **142**: 1595–604.
- [38] MURNION ME, ADAMS RR, CALLISTER DM, ALLIS CD, EARNSHAW WC, SWEDLOW JR. Chromatin-associated protein phosphatase 1 regulates aurora-B and histone H3 phosphorylation. *J Biol Chem* 2001; **276**: 26656–26665.
- [39] NASMYTH K. Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. *Science* 2002; **297**: 559–565.
- [40] NIGG EA. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2001; **2**: 21–32.
- [41] PFLUMM MF, BOTCHAN MR. Orc mutants arrest in metaphase with abnormally condensed chromosomes. *Development* 2001; **128**: 1697–1707.
- [42] SPELIOTES EK, UREN A, VAUX D, HORVITZ HR. The survivin-like *C. elegans* BIR-1 protein acts with the auroralike kinase AIR-2 to control chromosome behavior and spindle midzone organization. *Mol Cell* 2000; **6**: 211–223.
- [43] STEEN RL, CUBIZOLLES F, Le GUELLEC K, COLLAS P. A kinase-anchoring protein (AKAP)95 recruits human chromosome associated protein (hCAP)-D2/Eg7 for chromosome condensation in mitotic extract. *J Cell Biol* 2000; **149**: 531–536.
- [44] STEFFENSEN S, COELHO PA, COBBE N, VASS S, COSTA M, HASSAN B, PROKOPENKO SN, BELLEN H, HECK MMS, SUNKEL CE. A role for *Drosophila* SMC4 in the resolution of sister chromatids in mitosis. *Curr Biol* 2001; **11**: 295–307.
- [45] SUMNER AT. Scanning electron microscopy of mammalian chromosomes from prophase to telophase. *Chromosoma* 1991; **100**: 410–418.

- [46] SUTANI T, YANAGIDA M. DNA renaturation activity of the SMC complex implicated in chromosome condensation. *Nature* 1997; **388**: 798–801.
- [47] TOTH A, CIOSK R, UHLMANN F, GALOVA M, SCHLEIFFER A, NASMYTH K. Yeast cohesin complex requires a conserved protein, Eco1p(Ctf7), to establish cohesion between sister chromatids during DNA replication. *Genes Dev* 1999; **13**: 320–33.
- [48] UHLMANN F. Chromosome cohesion and separation: From men and molecules. *Curr Biol* 2003; **13**: R104–R114.
- [49] VASS S, COTTERILL S, VALDEOLMILLOS AM, BARBERO JL, LIN E, WARREN WD, HECK MMS. Depletion of Drad21/Sccl in *Drosophila* cells leads to instability of the cohesin complex and disruption of mitotic progression. *Curr Biol* 2003; **13**: 208–218.
- [50] WEI Y, YU L, BOWEN J, GOROVSKY MA, ALLIS CD. Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* 1999; **97**: 99–109.
- [51] WOLFFE AP. Histone H1. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; **29**: 1463–1466.

Janusz Maszewski

90-231 Łódź, ul. Pilarskiego 14,

ZMIANY ULTRASTRUKTURY I ROZMIESZCZENIA PLAZMODESM A PROCES DYFERENCJACJI NA PRZYKŁADZIE ANTERYDIOSTANÓW GLONÓW Z RODZAJU *CHARA*

CHANGES IN THE ULTRASTRUCTURE AND OCCURRENCE
OF PLASMODESMATA VERSUS THE DIFFERENTIATION PROCESS
OF THE *CHARA* SPECIES ANTHERIDIA

Maria KWIATKOWSKA

Katedra Cytofizjologii Uniwersytetu Łódzkiego

Streszczenie. Opisano zmiany struktury i rozmieszczenia plazmodesm podczas rozwoju anterydiostanów *C. vulgaris* i *C. tomentosa* od momentu utworzenia 24-komórkowego ich zawiązka do powstania dojrzałych spermatozoidów. Zmiany te związane są ze ściśle określonymi etapami dyferencjacji i mogą świadczyć o dostosowaniu struktury i funkcji plazmodesm w komunikacji międzykomórkowej do zmieniającej się sytuacji morfogenetycznej. Wysłunięto przypuszczenie, że mechanizmy regulacji symplastycznej podczas rozwoju i funkcjonowania roślin mają charakter uniwersalny.

Słowa kluczowe: ultrastruktura plazmodesm, izolacja symplastyczna, różnicowanie anterydiostanów, spermatogeneza, spermiogeneza, *Chara*, gibereliny.

Summary. Changes in the ultrastructure and occurrence of plasmodesmata in *C. vulgaris* and *C. tomentosa* antheridia development starting from the 24-celled stage till the formation of mature spermatozoids were described. These changes are closely correlated with particular differentiation stages and may indicate adaptation of plasmodesmata structure and function in cell-to-cell communication to the changing morphogenetic situation. A hypothesis has been put forward that symplasmic regulation mechanisms during development and functioning of plants have a general character

Key words : plasmodesmata ultrastructure, symplasmic isolation, antheridia differentiation, spermatogenesis, spermiogenesis, *Chara*, gibberellins

„Communication is the key”

Bernard Perbal, 2003

WSTĘP

Komunikacja międzykomórkowa jest uniwersalna. Jest ona bezpośrednio związana z czasową oraz przestrzenną regulacją ekspresji genów i stanowi ogólnobiologiczny mechanizm kontroli programu rozwoju organizmów wielokomórkowych [78]. Sygnały rozwojowe i integracyjne mogą być przekazywane poprzez oddziaływanie systemu receptor-ligand zarówno u roślin, jak i u zwierząt, natomiast plazmodesmy występujące jedynie u roślin wyposażają je w unikalny system komunikacji międzykomórkowej, w której każda komórka może bezpośrednio łączyć się z sąsiednimi komórkami tworząc domenę komórek mających wspólne komponenty – plazmodesmy [97]. Dzięki plazmodesmom roślina tworzy ciągły symplast zanurzony i uwięziony w apopląście, tj. systemie ścian i przestworów międzykomórkowych.

Plazmodesmy są wyścielonymi błoną komórkową kanalikami, które przechodzą przez otwory w ścianie komórkowej łącząc cytoplazmę sąsiednich komórek. W kanaliku plazmodesmy znajduje się desmotubula utworzona z przylegających do siebie błon ER mających przedłużenie w ER poza plazmodesmą. Powierzchnię desmotubuli i błony komórkowej w obrębie plazmodesmy pokrywają ziarnistości około 3 nm średnicy [97]. Te dwa rodzaje błon są połączone delikatnymi włókiemkami, które prawdopodobnie odpowiadają miozynie VIII, a wokół desmotubuli występuje spiralnie owinięty filament aktynowy. Przypuszcza się, że struktury te mogą regulować przekrój czynny plazmodesmy (*size exclusion limit* – SEL) [76].

Plazmodesmy są strukturami widocznymi dopiero na poziomie mikroskopu elektronowego; mają one od 20 do 100 nm szerokości. Obecność nitkowatych połączeń między komórkami roślinnymi dostrzegł jednak już w 1879 roku Eduard Tangl [89], nazwę zaś wprowadził Strasburger [85] w 1901 roku. Struktury obserwowane w mikroskopie świetlnym były prawdopodobnie zgrupowaniami plazmodesm w rozumieniu współczesnym, które Hejnowicz [20] proponuje nazwać „makroplazmodesmami”.

Według Lucasa i współpracowników [61, 66] plazmodesmy to nadkomórkowe komponenty rośliny, która nie jest zbiorem komórek, ale organizmem nadkomórkowym (supracellular), rozwijającym się pod kontrolą nadkomórkowych sygnałów przekazywanych za pośrednictwem plazmodesm. Sygnałami tymi mogą być nie tylko małe cząsteczki przechodzące przez plazmodesmy w drodze dyfuzji, takie jak jony, niektóre hormony, metabolity, ale także makrocząsteczki: białka i różnego rodzaju RNA (mRNA, sygnały wyciszające geny, a także kwasy nukleinowe wirusów i ich białka), których transport związany jest z poszerzeniem SEL [18, 76, 97], oraz udziałem chaperonów [1].

Ostatnio poszukuje się białek specyficznych jedynie dla plazmodesm. Dla zrozumienia plazmodesmowego transportu białek i RNA duże znaczenie ma zidentyfikowanie nowego białka – NtNCAPP1 (*Nicotiana tabacum Non-Cell Autonomous Pathway Protein1*) wyizolowanego z frakcji ścian wzbogaconej w

plazmodesmy, dla którego „przynętą” było wcześniej poznane białko CmPP16 zdolne do przemieszczania się przez plazmodesmy [60]. Jak wykazały immunocytochemiczne badania na poziomie ME, białko to jest zlokalizowane na peryferii komórki w bliskim sąsiedztwie plazmodesm i w cysternach ER. Delecje w strukturze NtNCAPP1, albo wyciszenie jego genu, powoduje selektywne blokowanie transportu międzykomórkowego i głębokie zmiany fenotypowe transgenicznych roślin *N. tabacum* [60].

Plazmodesmy roślin wyższych stanowią ostatnio przedmiot żywego zainteresowania badaczy, którego przejawem są liczne artykuły przeglądowe opublikowane w latach 2000–2004 [3, 5, 6, 11, 18, 19, 24, 25, 26, 59, 76, 84, 96, 97, 98], oraz monografia pod redakcją van Bela i van Kesterena [92].

Przedmiotem obecnego przeglądu są plazmodesmy anterydiostanów ramienic – *C. vulgaris* i *C. tomentosa*. Różnią się one od plazmodesm roślin wyższych brakiem desmotubuli w świetle kanalika, chociaż niekiedy występują w nich cysterny ER nieprzekształcone w desmotubule [4, 13, 35, 37, 38, 43]. Immunologiczne badania sugerują obecność w nich aktyny i miozyny [2].

Badania anterydiostanów *C. vulgaris* zostały zainicjowane w Uniwersytecie Łódzkim przez Profesor dr hab. Marię J. Olszewską, która opublikowała w 1972 roku pierwszą pracę na temat cyklu komórkowego nici spermatogenicznych i wykazała w niej, że jest to cykl komórkowy pozbawiony fazy G1, (typu S+G2+M) [72]. Obiekt ten okazał się dogodny do badania cyklu komórkowego. W następnych latach ukazała się cała seria prac eksperymentalnych wykonanych przez M. J. Olszewską i Jej współpracowników, poświęconych mechanizmom regulacji podziałów komórkowych podczas przebiegu fazy proliferacyjnej nici spermatogenicznych w spermatogenezie [15, 63, 67, 68, 69, 70, 71, 74, 75] oraz procesowi różnicowania plemników [73].

Anterydiostany ramienic – *C. vulgaris* i *C. tomentosa* – są także dogodnym modelem badań związku pomiędzy zmianami w systemie połączeń symplastycznych i procesem morfogenezy. Są to gametangia składające się z komórek wyraźnie zróżnicowanych pod względem struktury i funkcji. Komórki te tworzą się w ściśle określony sposób i podlegają wyraźnym zmianom w trakcie rozwoju. Występowanie i ultrastruktura plazmodesm łączących poszczególne komórki zmienia się dynamicznie w zależności od specyficznej sytuacji morfogenetycznej.

W rozwoju anterydiostanów można wyróżnić następujące fazy:

- wczesny etap tworzenia się anterydiostanu;
- pojawianie się wolnej przestrzeni anterydiostanu i komórek inicjalnych nici spermatogenicznych;
- I etap spermatogenezy – proliferacja komórek nici spermatogenicznych;
- II etap spermatogenezy – różnicowanie spermatyd, tj. spermogeneza; poprzedza ją izolacja symplastyczna anterydiostanu od plechy.

WCZESNY ETAP TWORZENIA SIĘ ANTERYDIOSTANÓW

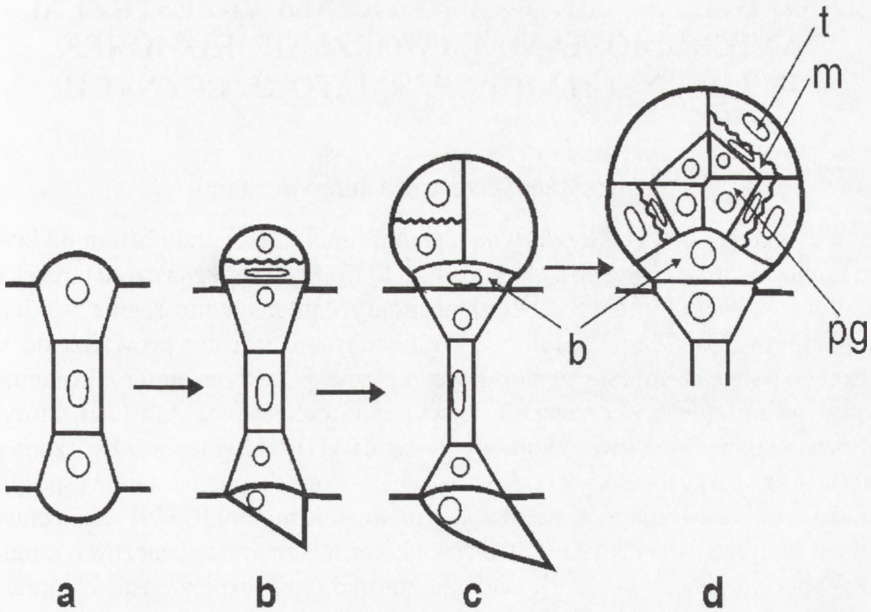
Ultrastrukturalne badania Pickett-Heapsa [79] wskazują, że anterydiostany *Chara* spp. rozwijają się z haploidalnych komórek węzłów bocznych ramion plechy, nazywanych

przez Ducreux [8] pleurydiami. W wyniku pierwszego podziału mitotycznego komórki inicjalnej, dolna komórka rozwija się w komórkę bazalną i nie dzieli się więcej, natomiast górna komórka przekształca się w komórkę macierzystą anterydiostanu (ryc. 1b). Bazalna komórka, która pozostaje pojedynczą, jednojądrową endopoliploidalną komórką [62], łączy anterydiostan z pleurydium. Inicjalna komórka anterydiostanu dzieli się trzykrotnie, podłużnie i poprzecznie (ryc. 1c). W efekcie tych podziałów powstaje 8 komórek połączonych wierzchołkami w centrum kuli. Kolejne podziały mitotyczne dokonują się w kierunku peryklinalnym – w każdym z oktantów powstają 3 komórki, tworząc kulę składającą się z 24 komórek (ryc. 1d, 2a) [45, 58, 79]. Zewnętrzne komórki przekształcają się w komórki tarczek, natomiast z 8 środkowych komórek rozwijają się manubria, zaś 8 wewnętrznych komórek, to pierwotne komórki główkowate, które dzieląc się tworzą komórki główkowate II i III rzędu. Do tego stadium wszystkie komórki są połączone plazmodesmami [79]. Dalszy rozwój anterydiostanu związany jest z likwidacją plazmodesmowych połączeń pomiędzy niektórymi komórkami. Plazmodesmy zanikają najpierw pomiędzy komórkami tarczek, następnie pomiędzy komórkami tarczek a komórką bazalną oraz pomiędzy manubriami, które oddzielają się od siebie i komórki bazalnej (ryc. 2b). To prowadzi do przerwania obwodowej komunikacji wewnątrz anterydiostanu i nadaje promienisty kierunek transportu symplastycznego *via* manubria i komórki główkowate, które zachowują połączenia plazmodesmowe z komórką bazalną.

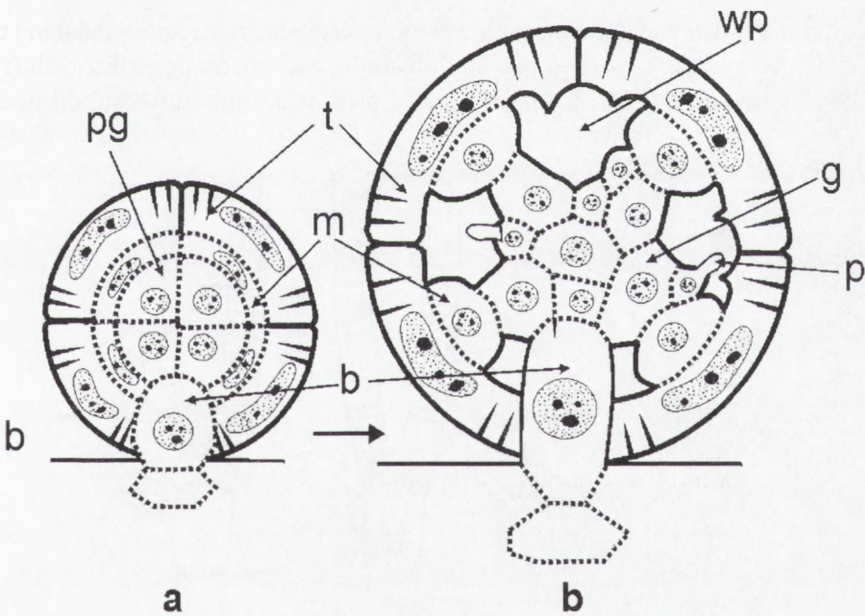
Rezultaty uzyskane za pomocą testów fizjologicznych są w pełni zgodne z obserwacjami ultrastrukturalnymi. Barwnik fluorescencyjny Lucifer Yellow wstrzykiwany do komórki tarczki nie przechodzi wprost do sąsiednich komórek tarczek, lecz wnika w głąb poprzez sąsiadujące z nią manubrium do komórek główkowatych, a następnie do sąsiednich manubriów i innych komórek tarczek [65].

Tarczki tworzą barwną okrywę anterydiostanu dzięki obecności chromoplastów usytuowanych blisko wewnętrznej ściany. Ich kolor zmienia się z jasno-żółtego na ciemno-oranżowy wraz z rozwojem anterydiostanu. Komórki tarczek determinują tempo wzrostu wewnętrznej przestrzeni anterydiostanów oraz modyfikują charakter światła wnikającego do nich. Ich aktywność translacyjna jest wysoka w trakcie proliferacji komórek nici spermatogenicznych i zmniejsza się znacznie po zakończeniu wzrostu wewnętrznej przestrzeni anterydiostanu w spermiogenezie. W tym okresie komórki tarczek stają się grubsze, w skutek czego znacznie powiększa się zewnętrzna powierzchnia anterydiostanu kontaktująca się ze środowiskiem [55, 58].

Manubria wydają się być głównymi elementami regulatorowymi anterydiostanu kooperującymi z komórkami główkowatymi [47, 48, 55, 57]. Transkrypcyjna i translacyjna aktywność obydwu typów komórek zwiększa się znacznie przed spermiogenezą i pozostaje wysoka do jej końca. Przejście ze stadium proliferacyjnego do spermiogenezy jest ponadto związane ze zmianami ultrastruktury manubriów i komórek główkowatych. Można więc przypuszczać, że ich metabolizm ulega wówczas zmianie [47, 48, 55, 57]. Jednocześnie plazmodesmy łączące manubria i komórki główkowate przekształcają się z prostych w złożone, co zdaje się dowodzić, że sposób transportu symplastycznego między nimi ulega modyfikacji (patrz poniżej).



RYCINA 1. Powstawanie komórki bazalnej i komórki inicjalnej anterydiostanu (b) oraz tworzenie się komórek tarczki, manubriów i pierwotnych komórek główkowatych (d). (wg [79], częściowo zmodyfikowane): b – komórka bazalna, t – komórka tarczki, m – manubrium, pg – pierwotna komórka główkowata



RYCINA 2. Występowanie: a – plazmodesm w anterydiostanie w stadium 24-komórkowym, w okresie tworzenia się wewnętrznej przestrzeni anterydiostanu oraz b – pęczków wyrastających z komórek główkowatych (wg [38], zmodyfikowane): linie kropkowane – ściany z plazmodesmami, linie ciągłe – ściany bez plazmodesm. b – komórki bazalne, t – komórki tarczki, m – manubria, pg – pierwotna komórka główkowata, g – komórka główkowata, p – pęczek, wp – wewnętrzna przestrzeń anterydiostanu

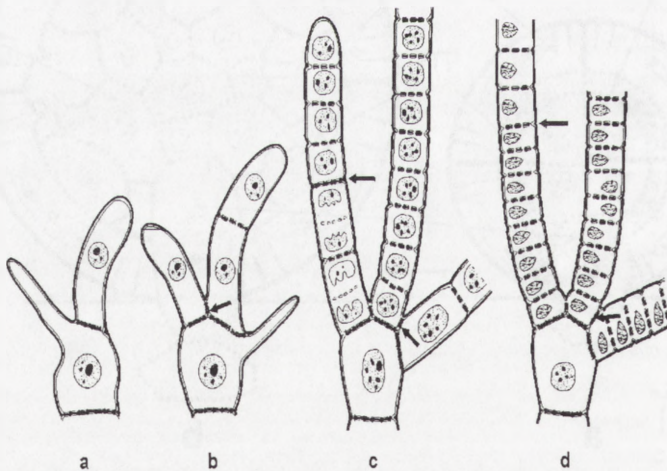
POJAWIANIE SIĘ WEWNĘTRZNEJ PRZESTRZENI ANTERYDIOSTANU I TWORZENIE KOMÓREK INICJALNYCH NICI SPERMATOGENICZNYCH

Wewnętrzna przestrzeń anterydiostanu

Pojawia się ona w wyniku odrywania się brzeżnej części manubrium od brzeżnej części komórki tarczki (ryc. 2b), która ma kształt trójkąta. Brzeżna część tarczki ulega podziałowi na niekompletne subkompartenty i intensywnie rośnie w kierunku tangencjalnym [58]. Zwiększanie się tempa wzrostu tarczki prowadzi do systematycznego powiększania się objętości wewnętrznej przestrzeni anterydiostanu, aż do początku spermiogenezy. Przestrzeń tę wypełnia pektynowy śluz [79], który daje pozytywną reakcję PAS (kwas nadjodowy – Schiff) [16]. Śluz ten jest tworzony przez manubria w drodze egzocytozy z udziałem pęcherzyków Golgiego i stanowi specyficzne środowisko dla rozwijających się nici spermatogenicznych [16, 79]. Koncentracja i ilość śluzu zwiększa się w czasie proliferacji komórek nici spermatogenicznych i zmniejsza podczas spermiogenezy [16, 17]. Badania autoradiograficzne z zastosowaniem ^3H -fukozy dowodzą, że śluz ten jest zużywany podczas rozwoju nici spermatogenicznych [17], najintensywniej podczas spermiogenezy [57].

Powstawanie komórek inicjalnych nici spermatogenicznych

Komórki główkowate graniczące z wewnętrzną przestrzenią anterydiostanu tworzą pączki dające początek 2-5 komórkom inicjalnym nici spermatogenicznych (ryc.2b, 3a). Po utworzeniu pączka, jądro komórki główkowej przesuwa się do podstawy



RYCINA 3. Lokalizacja plazmodesm zaczopowanych i nie zaczopowanych w kolejnych stadiach rozwoju nici spermatogenicznych: a, b – pączkowanie komórek główkowych, c – zaawansowana faza proliferacji, d – faza spermiogenezy; strzałkami oznaczono ściany, w których zaczopowane plazmodesmy ulegają w okresie spermiogenezy odczopowaniu (wg [38], zmodyfikowane)

pączka, gdzie ulega podziałowi mitotycznemu. Ściana komórkowa oddzielająca nowoutworzoną komórkę nici od komórki główkowej zaopatrzona jest w liczne plazmodesmy. Każda nowa komórka inicjalna oddziela się od komórki główkowej ścianą, która łączy się ze ścianą wcześniej utworzonej nici, poniżej jej połączenia ze ścianą komórki główkowej (ryc. 3b). W konsekwencji bazalne komórki wszystkich nici spermatogenicznych wyrastających z tej samej komórki główkowej są połączone ścianami, które są wyposażone w liczne pierwotne plazmodesmy (ryc. 3c) [46].

ZACZOPOWANE I NIEZACZOPOWANE PLAZMODESMY A ROZWÓJ NICI SPERMATOGENICZNYCH

I faza spermatogenezy – proliferacja nici spermatogenicznych

Inicjalne komórki nici spermatogenicznych ulegają podziałom mitotycznym i przekształcają się w nici spermatogeniczne. Kolejno pojawiające się inicjalne komórki przechodzą 7, 6 lub 5 podziałów u *C. vulgaris* [69] i *C. tomentosa* [64]. Liczba podziałów komórek nici spermatogenicznych jest gatunkowo specyficzna [64].

W pojedynczych niciach spermatogenicznych występuje synchronizacja podziałów mitotycznych [28,90]. W związku z tym dominująca populacja nici tworzy 2-, 4-, 8-, 16-, 32- i 64-komórkowe stadium. W wyniku procesu morfogenezy następuje redukcja długości komórek i zwiększenie poziomu metylacji DNA po kolejnych podziałach mitotycznych [71].

W czasie proliferacyjnej fazy spermatogenezy plazmodesmy pomiędzy różnymi komórkami anterydiostanu są zaczipowane elektronowo-gęstym materiałem, z wyjątkiem tych plazmodesm, które są obecne w ścianach pomiędzy całkowicie zsynchronizowanymi komórkami nici spermatogenicznych (ryc. 3c). Ich szeroki i otwarty kanalik umożliwia zachowanie ciągłości cytoplazmy pomiędzy sąsiednimi komórkami, dzięki czemu kolejne cykle komórkowe odbywają się synchronicznie. Można więc sądzić, że ten typ plazmodesm umożliwia swobodną wymianę substancji regulujących procesy rozwojowe, podobnie jak szerokie kanały łączące mejocyty na początku mikro-sporogenezy [22, 23, 93, 94, 95]. Sporadyczne występowanie zaczipowanych plazmodesm w specyficznych ścianach komórkowych nici spermatogenicznych powoduje podział nici na oddzielne asynchroniczne względem siebie domeny, przy czym w każdej z nich cykle komórkowe są synchroniczne (ryc. 3c). Zjawisko to było obserwowane zarówno u *C. vulgaris* [43, 45, 46], jak i *C. tomentosa* [54]. Zaczipowane plazmodesmy występują zwykle w najstarszych ścianach poprzecznych, które powstały w wyniku cytokinezy 1-komórkowych lub (rzadziej) 2-komórkowych nici spermatogenicznych. Ilościowe analizy nici w kolejnych stadiach proliferacji zdają się wskazywać, że pojawianie się zaczipowania w plazmodesmach jest pierwotną przyczyną desynchronizacji rozwoju komórek, ponieważ we wszystkich przypadkach asynchronicznego rozwoju występowały czopy w plazmodesmach, natomiast w bardzo nielicznych ścianach pomiędzy całkowicie synchronicznie rozwijającymi się komórkami (będącymi np. w metafazie) można było zaobserwować małe czopy *in statu nascendi* [43].

Ścisła korelacja pomiędzy zaczipowaniem plazmodesm i asynchronizacją cyklu komórkowego domen nici spermatogenicznych jednoznacznie wskazuje, że zaczipowane plazmodesmy są nieprzepuszczalne dla czynników regulatorowych, które synchronizują podziały komórek w nici. Plazmodesmowe połączenia pomiędzy bazalnymi komórkami nici spermatogenicznych wyrastających z tej samej komórki główkowej są także zaczipowane (rys. 3c). W konsekwencji w trakcie fazy proliferacji każda nić zachowuje swój własny rytm cyklu komórkowego.

Zaczipowane plazmodesmy niekoniecznie muszą być całkowicie nieprzepuszczalne. Małe cząsteczki Lucifer Yellow mogą przechodzić przez zaczipowane plazmodesmy młodych anterydiostanów, łączące komórki tarczek z manubriami i manubria z komórkami główkowatymi [65]. Czy odnosi się to także do zaczipowanych plazmodesm pomiędzy domenami nici spermatogenicznych nie zostało, jak dotąd, zbadane. Prawdopodobnie zaczipowane plazmodesmy wykazują transport selektywny, który umożliwia przechodzenie cząsteczek decydujących o tożsamości komórek nici spermatogenicznych, ale uniemożliwia wymianę międzykomórkową regulatorowych sygnałów warunkujących synchronizację rozwoju.

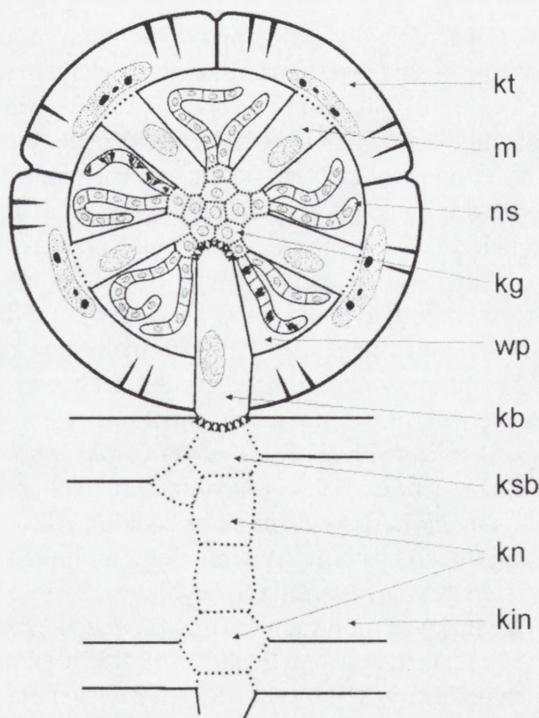
II faza spermatogenezy – spermioogeneza

Zaczipowanie plazmodesm jest procesem odwracalnym. Na początku spermioogenezy, zanika substancja, która czopuje plazmodesmy w ścianach komórkowych nici spermatogenicznych podzielonych na asynchroniczne względem siebie domeny oraz w ścianach pomiędzy bazalnymi komórkami nici spermatogenicznych zrosniętych z tą samą komórką główkową (ryc. 3d). Nie zaczipowane plazmodesmowe połączenia pomiędzy wymienionymi komórkami znajdującymi się w stadium spermatyd (które powstają w wyniku ostatniego podziału komórek nici spermatogenicznych związanego z zablokowaniem fazy S w telofazie) istnieją aż do końca spermioogenezy. Ulegają one przerwaniu po uformowaniu się spermatozoidu (stadium IX–X). W czasie spermioogenezy zakres synchronizacji rozszerza się z pojedynczej nici lub oddzielnej domeny nici na cały kompleks nici połączonych z tą samą komórką główkową (ryc. 3d) [45, 46]. Pozostałe plazmodesmy są zaczipowane przez cały okres spermatogenezy. Spermatydy w niciach spermatogenicznych połączonych z różnymi komórkami główkowatymi różnią się zwykle o 2-3 kolejne fazy spermioogenezy, w której na podstawie badań w mikroskopie świetlnym i elektronowym wyróżniono 10 faz [49]. Spośród 1400 analizowanych anterydiostanów całkowitą synchronizację spermioogenezy zaobserwowano jedynie w 17 anterydiostanach (znajdujących się w fazie I i X) (Kwiatkowska i współpracownicy, wyniki niepublikowane). Można przypuszczać, że jest to skutek istnienia czopów w plazmodesmach łączących komórki główkowe II i III rzędu przez cały okres spermioogenezy. Permanentnie zaczipowane plazmodesmy łączą także inne komórki: komórki nici spermatogenicznych z komórkami główkowatymi (rys. 3), komórki główkowe z manubriami, manubria z komórkami tarczek, komórki główkowe z komórką bazalną i komórkę bazalną z subbazalną [45, 46].

PRZEKSZTAŁCANIE PROSTYCH PLAZMODESM W PLAZMODESMY ROZGAŁĘZIONE

Do momentu pojawienia się nici spermatogenicznych wszystkie plazmodesmy w anterydiostanie oraz te, które łączą komórkę bazalną z pleurydium, są prostymi kanalikami. Ten typ plazmodesm jest także charakterystyczny dla połączeń pomiędzy komórkami węzła w plesze [12, 85]. Ich średnica wynosi od 20 do 80 nm. Najwęższe plazmodesmy znajdują się w młodym anterydiostanie utworzonym ze ściśle przylegających do siebie komórek. Najszerze plazmodesmy (średnio ok. 68 nm) łączą komórki nici spermatogenicznych [46].

W czasie pierwszych podziałów komórek nici spermatogenicznych plazmodesmy łączące komórkę bazalną z subbazalną stopniowo przekształcają się w zaczopowane plazmodesmy rozgałęzione [46]. Ten typ plazmodesm jest charakterystyczny dla połączeń pomiędzy komórkami międzywęzła i węzła plechy [85]. Powstają one przez rozszerzenie światła prostych plazmodesm w płaszczyźnie blaszki środkowej i tworzenie się zatoki środkowej [46], podobnie jak złożone plazmodesmy u niektórych roślin wyższych [31]. Po dalszych mitotycznych podziałach komórek nici spermatogenicznych podobne przekształcenie obserwuje się w zaczopowanych plazmodesmach pomiędzy komórką bazalną i komórkami główkowatymi anterydiostanu (ryc. 4). W trakcie spermiogenezy plazmodesmy łączące manubria z komórkami główkowatymi również przekształcają się z prostych w rozgałęzione i zaczopowane [46].



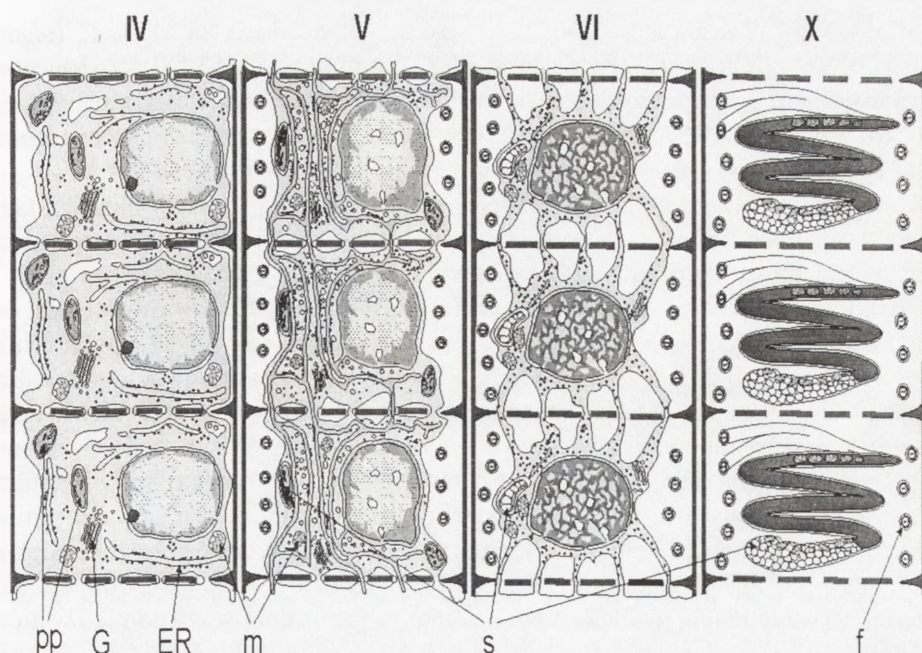
RYCINA 4. Anterydiostan w fazie proliferacji z fragmentem pleurydium, występowanie plazmodesm prostych (linie kropkowane) i rozgałęzionych (krzyżyki) (wg [38], zmodyfikowane): kt – komórka tarczki, m – manubrium, ns – nić spermatogeniczna, kg – komórka główkowata, wp – wewnętrzna przestrzeń, kb – komórka bazalna, kbs – komórka subbazalna, kn – komórki nodalne, kin – komórka intermodalna

Eksperymenty z zastosowaniem $^{14}\text{CO}_2$ wykazały, że anterydiostany *C. vulgaris* są bardzo aktywnym akceptorem asymilatów [82]. Wobec tego przez analogię z modyfikacjami struktury i funkcji plazmodesm w trakcie rozwoju liścia (ref.) [11], można przypuszczać, że w anterydiostanie *C. vulgaris* transformacja prostych plazmodesm w plazmodesmy złożone jest związana z tym, że w trakcie dynamicznego rozwoju staje się on silnym biorcą produktów fotosyntezy, natomiast pleurydium, z którym się łączy poprzez komórkę bazalną, jest aktywnym dawcą eksportowanych związków. Z drugiej strony, obserwacje przeprowadzone na komórkach warstwy aleuronowej ziarniaków jęczmienia wykazały, że zmiany w strukturze plazmodesm z prostych w rozgałęzione występują w rezultacie intensyfikacji transportu giberelin, które stymulują hydrolizę niecelulozowych składników ściany [27, 87, 88]. Pojawianie się rozgałęzionych plazmodesm pomiędzy komórką bazalną i subbazalną sugeruje, że komórki te mogą stanowić szlak transportu giberelin, którego dynamika prawdopodobnie zwiększa się stopniowo w czasie proliferacji komórek nici spermatogenicznych. Wyniki badań autoradiograficznych z zastosowaniem radioaktywnej gibereliny [33] zdają się potwierdzać taką hipotezę (patrz poniżej).

Funkcja rozgałęzionych plazmodesm, które pojawiają się pomiędzy manubriami i komórkami główkowatymi podczas spermiogenezy, gdy poziom GA_3 w anterydiostanie jest bardzo niski [30], nie jest jasna.

OKRESOWE WNIKANIE CYSTERN ER DO PLAZMODESM PODCZAS SPERMIOGENEZY

Tworzenie przegrody pierwotnej podczas cytokinezy w komórkach nici spermatogenicznych nie jest związane z pojawianiem się cystern ER w płaszczyźnie podziału [36, 37, 44], jak to ma miejsce u roślin wyższych [11, 21]. W nowoutworzonych plazmodesmach oraz w plazmodesmach ścian w pełni ukształtowanych, kanały niezaczopowanych plazmodesm są wypełnione jasną cytoplazmą zawierającą rybosomy, a czasami małe pęcherzyki i tylko rzadko są przenizane cysternami ER [43, 46]. W trakcie wczesnej spermiogenezy plazmodesmy łączące spermatydy w nici spermatogenicznej wyglądają tak samo. Spermiogeneza jest jednak bardzo skomplikowanym procesem [80] trwającym u *C. vulgaris* ok. 1 tydzień [14]. Bardzo istotnym zjawiskiem w trakcie spermiogenezy jest ekstremalna kondensacja chromatyny (5-krotnie silniejsza niż w chromosomach mitotycznych) związana z syntezą białek typu protamin i wymianą nukleohistonów na nukleoprotaminy, co zostało wykazane metodą analiz cytochemicznych dla *C. vulgaris* i *C. tomentosa* [81] i metodą elektroforezy kapilarnej dla *C. tomentosa* [29, 41]. Wymiana nukleohistonów na nukleoprotaminy u *C. vulgaris* i *C. tomentosa* rozpoczyna się w stadium, w którym obserwuje się rozbudowany system ER, którego cysterny wypełnione są drobnoziarnistą substancją podobną do tej, jaka występuje w przestrzeni międzybłonowej otoczki jądrowej spermatyd (ryc. 5, faza V). W związku z tym wysunięto przypuszczenie, że w ER odbywa się synteza białek typu protamin i ich transport do jądra [35, 49, 50]. Ponadto dla tej fazy charakterystyczne są plazmodesmy, w których świetle występują cysterny ER łączące ER sąsiednich



RYCINA 5. Fragmety nici spermatogenicznych w czterech spośród dziesięciu stadiów spermiogenezy (IV, V, VI i X) wyróżnionych na podstawie obserwacji w mikroskopie świetlnym i elektronowym (wg [38], zmodyfikowane): pp – protoplasty, G – struktury Golgiego, ER – retikulum endoplazmatyczne, m – mitochondria, s – skrobia, f – przekrój poprzeczny wici

spermatyd w ciągły system (ryc. 5, faza V). Cysterny te są wypełnione drobnoziarnistą substancją, nie są ściśnięte w obszarze plazmodymy i nie tworzą desmotubuli charakterystycznej dla plazmodesk roślin wyższych. Podobne obrazy zaobserwowano zarówno u *C. vulgaris* [35, 37, 38, 49], jak i *C. tomentosa* [38, 54]. Obrazy te sugerują, że ER wnika do plazmodesk, w których nie było ono wcześniej widoczne. Prawdopodobnie następuje wówczas intensyfikacja wymiany i transportu substancji za pośrednictwem ER, co może stanowić dodatkowy czynnik synchronizacji spermatyd, w tym stosunkowo krótkim, ale decydującym okresie morfogenezy. W późniejszych fazach spermiogenezy znowu nie obserwuje się cystern ER w plazmodeskach (ryc. 5, faza VI). Wobec tego wnikanie ER do plazmodesk jest ograniczone jedynie do stosunkowo krótkiego czasu.

PLAZMODESMY A INTEGRACJA PROCESU ROZWOJU ANTERYDIOSTANU

Rozwój nici spermatogenicznych jest ściśle skorelowany z rozwojem niegeneratywnych komórek anterydiostanu: komórek tarczek, manubriów i komórek główkowatych. W trakcie proliferacji komórek nici spermatogenicznych manubria i komórki tarczek stają się proporcjonalnie większe. Ich wzrost jest związany z dynamicznym procesem endoreplikacji

DNA [55]. Najwyższą zawartość DNA obserwuje się w komórkach tarczki. U *C. vulgaris* poziom DNA wynosi 16–64 C w tarczkiach oraz 8–32 C w manubriach [55, 58]. U *C. tomentosa* tworzącej szczególnie duże anterydiostany, komórki tarczki zawierają ok. 1024 C, a manubria ok. 128 C [64]. Czynniki modyfikujące liczbę podziałów w niciach spermatogenicznych równocześnie zmieniają poziom endopolipoidalności w komórkach niegeneratywnych [55].

W okresie proliferacji komórek nici spermatogenicznych, wrażliwym na działanie czynnika świetlnego, obserwuje się zmiany rytmu dobowego aktywności translacyjnej w anterydiostanie. Autoradiograficzne badania anterydiostanów *C. vulgaris* z zastosowaniem ^3H -leucyny wykazały istnienie ściślej korelacji funkcjonalnej pomiędzy manubriami, komórkami główkowatymi i niemi spermatogenicznymi [52, 53]. W rytmie dobowym syntezy białek przejawia się regulatorowa funkcja manubriów. Manubria wykazują szybki spadek aktywności translacyjnej w ciągu nocy i jej wzrost w ciągu dnia. Reakcja komórek główkowatych i komórek nici spermatogenicznych na zmiany dzień/noc jest opóźniona w porównaniu z reakcją manubriów. Wydaje się, że manubria odgrywają rolę oscylatorów (komórek starterowych) indukujących falę zmian aktywności translacyjnej w komórkach, z którymi są symplastycznie połączone poprzez proste, zaczopowane plazmodesmy. Komórki główkowate jednakże prawdopodobnie pośredniczą w wymianie regulatorowych sygnałów rytmu dobowego pomiędzy niemi spermatogenicznymi i manubriami. Jest charakterystyczne, że komórki tarczki, które łączą się bezpośrednio, *via* plazmodesmy z zewnętrznym końcem manubriów wykazują całkowicie różny, nisko amplitudowy rytm zmian aktywności translacyjnej [52].

Komórki główkowate usytuowane w centrum anterydiostanu i połączone ze sobą poprzez zaczopowane plazmodesmy, integrują wszystkie elementy anterydiostanu w jeden symplast. Mogą one umożliwiać wymianę różnych sygnałów pochodzących z otoczenia poprzez komórki tarczki i manubria oraz z plechy poprzez komórkę bazalną. Na ogół wszystkie spermatozoidy w anterydiostanie, niezależnie od tego z jakiego oktantu pochodzą, osiągają dojrzałość w tym samym momencie [32, 91] co wskazuje na integracyjną rolę komórek główkowatych.

ROLA SYMPLASTYCZNEJ IZOLACJI ANTERYDIOSTANU

Ultrastrukturalne badania anterydiostanów *C. vulgaris* wykazały, że przed inicjacją spermiogenezy plazmodesmy pomiędzy komórką bazalną i komórkami główkowatymi oraz komórką bazalną i subbazalną ulegają spontanicznie przerwaniu [32]. Dwa mitotyczne cykle podziałowe przed powstaniem spermatyd anterydiostan staje się izolowanym symplastem. Dojrzały anterydiostan *C. corallina* jest także całkowicie izolowany od symplastu plechy, ponieważ nie wnika do niego 6-karboksyfluoresceina [83].

Morfogenetyczne konsekwencje izolacji symplastycznej anterydiostanu od plechy zostały określone na podstawie skutków indukowanej plazmolizy izolacji symplastycznej w wyniku działania 20% glikolu polietylenu 6000 lub 0,2 M CaCl_2 [32, 51]. Autoradiograficzne badania wykazały, że indukowana izolacja symplastyczna powoduje: (1) zmiany we włączaniu ^3H -leucyny do manubriów i zanikanie rytmu dobowego syntezy białek po 10 do 20 godz. [51]; (2) blokowanie endomitotycznej syntezy DNA w młodych

manubriach po 24 godz. i w komórkach główkowatych po ok. 48 godz.; (3) zahamowanie wzrostu i podziałów komórek nici spermatogenicznych; (4) redukcję długości nici spermatogenicznych (2–4-krotną) wskutek eliminacji jednego lub dwu cykli komórkowych w fazie proliferacyjnej i (5) indukcję spermiogenezy w anterydiostanach, w których manubria osiągnęły dostateczny poziom endoreplikacji, to znaczy uzyskały stan kompetencji [32, 34]. W młodych antrydiostanach, które zostały izolowane od plechy zbyt wcześnie, nici spermatogeniczne przestają się rozwijać i degenerują [32].

Dyskusja na temat fizjologicznych konsekwencji izolacji symplastycznej powinna być poprzedzona pewnymi informacjami uzyskanymi z eksperymentów dotyczących roli giberelin w rozwoju anterydiostanu. Wykazano, że proliferacja komórek nici spermatogenicznych jest regulowana przez GA_3 , natomiast spermiogeneza jest na niego niewrażliwa [14]. Egzogenny GA_3 podwyższa poziom endoreplikacji w manubriach [56], dynamikę wzrostu komórek nici spermatogenicznych i liczbę cykli mitotycznych poprzedzających spermiogenezę [14, 40], jak również liczbę nici spermatogenicznych tworzonych przez komórki główkowate [14]. Zmniejszenie poziomu endogennych giberelin wywołane działaniem AMO1618 – inhibitora syntezy giberelin – powoduje efekty przeciwne: zmniejszenie poziomu DNA w manubriach [55] oraz skrócenie nici spermatogenicznych w wyniku redukcji liczby podziałów mitotycznych [40, 55]. Ponadto egzogenny GA_3 w stężeniu od 10^{-9} do 10^{-4} M proporcjonalnie hamuje wydłużanie pleurydiów, natomiast redukcja poziomu GA_3 przez AMO1618 10^{-4} M stymuluje je [39]. Oznacza to, że poziom GA_3 w pleurydiach jest supraoptymalny. Z drugiej strony eksperymenty te sugerują, że anterydiostan w proliferacyjnej fazie, w której zapotrzebowanie na gibereliny jest wysokie, importuje GA_3 z pleurydiów.

Drake i Carr [7] wysunęli przypuszczenie, że plazmodesmy są główną drogą przemieszczania się giberelin. W związku z tym podjęte zostały badania dotyczące wpływu izolacji symplastycznej na transport GA_3 do anterydiostanów.

Metodą autoradiografii wykazano, że zarówno spontaniczna jak i indukowana izolacja symplastyczna drastycznie zmniejsza wnikanie ^{14}C - GA_3 do anterydiostanów *C. vulgaris* [33] i 3H - GA_3 do anterydiostanów *C. contraria* [42], co świadczy o tym, że plazmodesmy są rzeczywiście główną drogą transportu GA_3 .

Rezultaty naszych badań autoradiograficznych zdają się być potwierdzone przez eksperymenty z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej. Wykazano mianowicie, że młode anterydiostany, których rozwój zależy od giberelin, zawierają ponad 5-krotnie więcej GA_3 w przeliczeniu na anterydiostan, niż symplastycznie izolowane anterydiostany w stadium spermiogenezy [30].

Plazmolitycznie indukowana izolacja symplastyczna anterydiostanu i inhibicja syntezy GA_3 powodowana przez AMO1618 wpływają na rozwój anterydiostanów w podobny sposób, tj. powodują ominięcie jednego lub dwu cykli komórkowych w fazie proliferacji komórek nici spermatogenicznych, poprzedzającej spermiogenezę. Wysunięto hipotezę, że w obydwu przypadkach efekt ten jest powodowany przez gwałtowne obniżenie poziomu GA_3 w anterydiostanach [34].

Można więc sądzić, że przerwanie lub redukcja liczby plazmodesm w trakcie morfogenezy stanowi, obok innych zjawisk, sygnał determinujący przestawienie metabolizmu komórki na nowe tory w odpowiedzi na zmianę poziomu giberelin.

PODSUMOWANIE

W trakcie rozwoju anterydiostanów zaobserwowano następujące zmiany w połączeniach symplastycznych: zanikanie plazmodesm zmieniające kierunek dróg transportu; przekształcanie prostych plazmodesm w plazmodesmy rozgałęzione; odwracalne czopowanie plazmodesm w ściśle określonych miejscach nici spermatogenicznych; zanikanie zaczipowania plazmodesm prowadzące do synchronizacji różnicowania spermatyd; okresową penetrację ER do plazmodesm nici spermatogenicznych w specyficznej fazie spermiogenezy; izolację symplastyczną całego anterydiostanu od plechy w rezultacie przerwania plazmodesm, która indukuje różnicowanie spermatyd.

Można sądzić, że zaobserwowane zmiany dostosowują funkcję plazmodesm w komunikacji międzykomórkowej do specyficznych sytuacji morfogenetycznych, umożliwiając prawidłowy przebieg rozwoju spermatozoidów powstających w anterydiostanie.

W ostatnich latach przedstawiono wiele nowych obserwacji potwierdzających wcześniejsze dane wskazujące, że podobne zjawisko regulacji połączeń symplastycznych, związanych z mechanizmami morfogenetycznymi, istnieje również w procesie dyferencjacji różnych tkanek roślin należących do okrytonasiennych (ref. [61, 76, 97, 98]). Z wyjątkiem nielicznych przypadków, w których stwierdzono przekształcanie się prostych plazmodesm w złożone (ref. [11]), czopowanie plazmodesm oddzielających różne domeny kallusa *Molinia caerulea* [9] oraz izolację symplastyczną (ref. [61]), u roślin wyższych na ogół obserwowano jedynie zmiany zdolności transportu plazmodesmowego dla różnego rodzaju znakowanych fluorochromami związków o różnych rozmiarach cząsteczki lub określonych czynników transkrypcyjnych, RNA, GFP (zielono fluoryzujące białko), oraz wirusów, bez wyraźnych zmian strukturalnych plazmodesm (ref. [10, 18, 60, 97])

Liczne obserwacje plazmodesm dowodzą jednoznacznie ich kluczowej roli jako dróg rozprzestrzeniania sygnałów regulujących i kontrolujących procesy rozwojowe oraz funkcjonowanie wielokomórkowego organizmu roślinnego. Stwarzają one perspektywę dalszych badań, celowych szczególnie obecnie, gdy możliwości warsztatowe zostały poszerzone o metody molekularne i genetyczne.

LITERATURA

- [1] AOKI K, KRAGLER F, XOCONOSTLE-CÁZARES B, LUCAS WJ. A subclass of plant heat shock cognate 70 chaperones carries a motif that facilitates trafficking through plasmodesmata. *Plant Biology* 2002; **99**: 16342–16347.
- [2] BLACKMAN LM, OVERALL RL. Immunolocalisation of the cytoskeleton to plasmodesmata of *Chara corallina*. *The Plant Journal* 1998; **14**: 733–741.
- [3] BLACKMAN LM, OVERALL RL. Structure and function of plasmodesmata. *Austr J Plant Physiol* 2001; **28**: 711–727.

- 4] COOK ME, GRAHAM LE, BOTHA CEJ, LAVIN CA. Comparative ultrastructure of plasmodesmata of *Chara* and selected bryophytes: toward an elucidation of the evolutionary origin of plant plasmodesmata. *Am J Bot* 1997; **84**: 1169–1178.
- [5] CRAWFORD KM, ZAMBRYSKI PC. Non-targeted and targeted protein movement through plasmodesmata in leaves in different developmental and physiological states. *Plant Physiol* 2001; **125**: 1802–1812.
- [6] DING B, ITAYA A, QI Y. Symplasmic protein and RNA traffic: regulatory points and regulatory factors. *Curr Opin Plant Biol* 2003; **6**: 596–602.
- [7] DRAKE GA, CARR DJ. Symplastic transport of gibberellins: evidence from flux and inhibitor studies. *J Exp Bot* 1979; **30**: 439–447.
- [8] DUCREUX G. Corrélations et morphogenese chez le *Chara vulgaris* L. cultivé *in vitro*. *Rev Gén Bot* 1975; **82**: 215–357.
- [9] EHLERS K, BINDING H, KOLLMANN R. The formation of symplasmic domains by plugging of plasmodesmata: a general event in plant morphogenesis? *Protoplasma* 1999; **209**: 181–192.
- [10] EHLERS K, KOLLMANN R. Synchronization of mitotic activity in protoplast-derived *Solanum nigrum* L. microcalluses is correlated with plasmodesmal connectivity. *Planta* 2000; **210**: 269–278.
- [11] EHLERS K, KOLLMANN R. Primary and secondary plasmodesmata: structure, origin and functioning. *Protoplasma* 2001; **216**: 1–30.
- [12] FISCHER RA, DAINTY J, TYREE MT. A quantitative investigation of symplasmic transport in *Chara corallina*. I. Ultrastructure of the nodal complex cells walls. *Can J Bot* 1974; **52**: 1209–1214.
- [13] FRANCESCHI VR, DING B, LUCAS WJ. Mechanism of plasmodesmata formation in characean algae in relation to evolution of intercellular communication in higher plants. *Planta* 1994; **192**: 347–358.
- [14] GODLEWSKI M, KWIATKOWSKA M. Effect of gibberellic acid on the formation and development of antheridia and oogonia in *Chara vulgaris* L. *Acta Soc Bot Pol* 1980; **49**: 459–469.
- [15] GODLEWSKI M, OLSZEWSKA MJ. Comparison of the duration of the cell cycle in successive generation of synchronously dividing antheridial filaments of *Chara vulgaris* as measured with ³H-thymidine. *Acta Soc Bot Pol* 1973; **42**: 121–131.
- [16] GOSEK A, KWIATKOWSKA M. Cytochemical studies on the antheridial mucilage and changes in its concentration and amount during the spermatogenesis in *Chara vulgaris* L. *Folia Histochem Cytobiol* 1991; **29**: 91–100.
- [17] GOSEK A, KWIATKOWSKA M. Autoradiographic studies on ³H-fucose incorporation into manubria and its translocation to antheridial space during spermatogenesis in *Chara vulgaris* L. *Folia Histochem Cytobiol* 1993; **31**: 233–237.
- [18] HAYWOOD V, KRAGLER F, LUCAS WJ. Plasmodesmata: pathways for protein and ribonucleoprotein signaling. *Plant Cell* 2002; Supplement 303–325.
- [19] HEINLEIN M. Plasmodesmata: dynamic regulation and role in macromolecular cell-to-cell signaling. *Curr Opin Plant Biol* 2002; **5**: 543–552.
- [20] HEJNOWICZ Z. Anatomia i histogeneza roślin naczyniowych. Warszawa: PWN 2002: 39–43.
- [21] HEPLER PK. Endoplasmic reticulum in the formation of the cell plate and plasmodesmata. *Protoplasma* 1982; **11**: 121–133.
- [22] HESLOP-HARRISON J. Cell walls, cell membranes and protoplasmic connections during meiosis pollen development. Linskens HF. [ed] *Pollen physiology and fertilization*. Amsterdam, North-Holland Publ. Co. 1964: 39–47.
- [23] HESLOP-HARRISON J. Synchronous pollen mitosis and formation of the generative cell in massulate orchids. *J Cell Sci* 1968; **3**: 457–466.
- [24] JACKSON D, KIM J-Y. Intercellular signaling: an elusive player steps forth. *Curr Biol* 2003; **13**: 349–350.
- [25] JACKSON D. Opening up the communication channels: recent insights into plasmodesmal function. *Curr Opin Plant Biol* 2000; **3**: 394–399.
- [26] JACKSON D. The long and the short of it: signaling development through plasmodesmata. *Plant Cell* 2001; **13**: 2569–2572.
- [27] JONES RJ. Fractionation of enzymes of the barley aleurone layer. Evidence for a soluble mode of enzyme release. *Planta* 1972; **103**: 95–109.
- [28] KARLING JS. Nuclear and cell division in the antheridial filaments of the *Characeae*. *Bull Torrey Club* 1928; **55**: 11–39.

- [29] KAŻMIERCZAK A. Electrophoretic analysis of qualitative and quantitative changes of basis proteins during spermiogenesis of *Chara*. *Acta Biol Crac Ser Botanica* 2000; 42 suppl 1: 45.
- [30] KAŻMIERCZAK A, KWIATKOWSKA M, POPŁOŃSKA K. GA_3 content in antheridia of *Chara vulgaris* at the proliferative stage and in spermiogenesis estimated by capillary electrophoresis. *Folia Histochem Cytobiol* 1999; 37: 49-52.
- [31] KOLLMANN R, GLOCKMANN C. Multimorphology and nomenclature of plasmodesmata in higher plants. [w] van Bel AJE, van Kesteren WJP [red.] Plasmodesmata structure, function, role in cell communication. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer 1999: 149-172.
- [32] KWIATKOWSKA M. Symplasmic isolation of *Chara vulgaris* antheridium and mechanisms regulating the process of spermatogenesis. *Protoplasma* 1988, 142:137-146.
- [33] KWIATKOWSKA M. Autoradiographic studies on the role of plasmodesmata in the transport of gibberellin. *Planta* 1991; 183: 294-299.
- [34] KWIATKOWSKA M. Effect of symplasmic isolation and antigibberellin treatment on morphogenesis in *Chara*. *Folia Histochem Cytobiol* 1995; 33: 133-137.
- [35] KWIATKOWSKA M. Changes in ultrastructure of cytoplasm and nucleus during spermiogenesis in *Chara vulgaris*. *Folia Histochem Cytobiol* 1996; 34: 41-56
- [36] KWIATKOWSKA M. PCC-like induction of mitosis in *Chara vulgaris* antheridia initiating differentiation of spermatozooids in the darkness. *Acta Soc Bot Pol* 1997; 66: 33-39
- [37] KWIATKOWSKA M. Plasmodesmal coupling and cell differentiation in algae. [w] van Bel AJE, van Kesteren WJP [red.] Plasmodesmata structure, function, role in cell communication. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer 1999: 206-222.
- [38] KWIATKOWSKA M. Plasmodesmal changes are related to different developmental stages of antheridia of *Chara* species. *Protoplasma* 2003; 222: 1-11.
- [39] KWIATKOWSKA M, GODLEWSKI M. Effects of gibberellic acid and AMO-1618 on the development of vegetative systems in generatively matured thalli of *Chara vulgaris* L. *Acta Soc Bot Pol* 1980; 49: 445-458.
- [40] KWIATKOWSKA M, GODLEWSKI M. Studies on the role of gibberellins in the regulation of spermatogenesis in *Chara vulgaris* L. *Acta Soc Bot Pol* 1988; 57: 547-553.
- [41] KWIATKOWSKA M, KAŻMIERCZAK A, POPŁOŃSKA K. Ultrastructural, autoradiographic and electrophoretic examinations of *Chara tomentosa* spermiogenesis. *Acta Soc Bot Pol* 2002; 71: 201-209.
- [42] KWIATKOWSKA M, MALINOWSKI S. The influence of the disappearance of plasmodesmal connections between antheridia and on $^3H-GA_3$ transport. *Folia Histochem Cytobiol* 1995; 33: 53-55.
- [43] KWIATKOWSKA M, MASZEWSKI J. Plasmodesmata between synchronously and asynchronously developing cells of the antheridial filaments of *Chara vulgaris* L. *Protoplasma* 1976; 87: 317-327.
- [44] KWIATKOWSKA M, MASZEWSKI J. Changes in the activity of the Golgi apparatus during the cell cycle in antheridial filaments of *Chara vulgaris* L. *Protoplasma* 1979; 99: 31-38.
- [45] KWIATKOWSKA M, MASZEWSKI J. Changes in ultrastructure of plasmodesmata during spermatogenesis in *Chara vulgaris* L. *Planta* 1985; 166: 46-50.
- [46] KWIATKOWSKA M, MASZEWSKI J. Changes in occurrence and ultrastructure of plasmodesmata in antheridia of *Chara vulgaris* L. during different stages of spermatogenesis. *Protoplasma* 1986; 132: 179-188.
- [47] KWIATKOWSKA M, MASZEWSKI J. Ultrastructural and autoradiographic studies of non-generative cells in the antheridium of *Chara vulgaris* L. I. Manubria. *Folia Histochem Cytobiol* 1987a; 25: 215-224.
- [48] KWIATKOWSKA M, MASZEWSKI J. Ultrastructural and autoradiographic studies of non-generative cells in the antheridium of *Chara vulgaris* L. II. Capitular cells. *Folia Histochem Cytobiol* 1987b; 25: 225-232.
- [49] KWIATKOWSKA M, POPŁOŃSKA K. Further ultrastructural research of *Chara vulgaris* spermiogenesis: endoplasmic reticulum, structure of chromatin, 3H -lysine and 3H -arginine incorporation. *Folia Histochem Cytobiol* 2002; 40: 85-97.
- [50] KWIATKOWSKA M, POPŁOŃSKA K. RER and protamine-type proteins during *Chara tomentosa* L. spermiogenesis. *Acta Soc Bot Pol* 2003; 72: 5-9.
- [51] KWIATKOWSKA M, POPŁOŃSKA K, GOSEK A. Disappearance of 3H -leucine incorporation circadian rhythm induced by symplasmic isolation of *Chara vulgaris* antheridium from thallus. *Folia Histochem Cytobiol* 1999; 37: 219-221.
- [52] KWIATKOWSKA M, POPŁOŃSKA K, GOSEK A, MALINOWSKI S. Differentiated reaction of different types of antheridial cells in *Chara vulgaris* to the changes in light conditions during 24 hours. *Folia Histochem Cytobiol* 1992; 30: 23-26.

- [53] KWIATKOWSKA M, POPŁOŃSKA K, GOSEK A, MALINOWSKI S. Circadian rhythm of protein synthesis in generative and non-generative antheridial cells of *Chara vulgaris* L. *Biol Rhythm Res* 1995; **26**: 55-67.
- [54] KWIATKOWSKA M, POPŁOŃSKA K, WOJTCZAK A. *Chara tomentosa* antheridial plasmodesmata at various stages of spermatogenesis. *Biol Plant* 2003; **46**: 233-238.
- [55] KWIATKOWSKA M, POPŁOŃSKA K, ŻYLIŃSKA K. Biological role of endoreplication in the process of spermatogenesis *Chara vulgaris* L. *Protoplasma* 1990; **155**: 176-187.
- [56] KWIATKOWSKA M, WOJTCZAK A, POPŁOŃSKA K. Effect of GA_3 treatment on the number of spermatozoids and endopolyploidy levels of non-generative cells in antheridia of *Chara vulgaris* L. *Plant Cell Physiol* 1998; **39**: 1388-1390.
- [57] KWIATKOWSKA M, WOJTCZAK A, POPŁOŃSKA K. Ultrastructural and autoradiographic study of *Chara vulgaris* L. manubria. *Acta Biol Cracov Ser Botanica* 2002; **44**: 99-105.
- [58] KWIATKOWSKA M, ŻYLIŃSKA K. Ultrastructural and autoradiographic studies of non-generative cells in the antheridium of *Chara vulgaris* L. III. Shield cells. *Folia Histochem Cytobiol* 1988; **26**: 225-236.
- [59] LEE J-Y, YOO B-CH, LUCAS WJ. Parallels between nuclear-pore and plasmodesmal trafficking of information molecules. *Planta* 2000; **210**: 177-187.
- [60] LEE J-Y, YOO B-CH, ROJAS MR, GOMEZ-OSPINA N, STAEHELIN LA, LUCAS WJ. Selective trafficking on non-cell-autonomous proteins mediated by NtNCAPP1. *Science* 2003; **299**: 392-396.
- [61] LUCAS WJ, DING B, VAN DER SCHOOT. Tansley review No. 58 Plasmodesmata and the supracellular nature of plants. *New Phytol* 1993; **125**: 435-476
- [62] MALINOWSKI S, MASZEWSKI J. DNA endoreduplication, RNA and protein synthesis during growth and development of the antheridial basal cell in *Chara vulgaris* L. *Folia Histochem Cytobiol* 1994; **32**: 137-142.
- [63] MARCINIAK K, OLSZEWSKA MJ. Cytochemical study of the content of lysine and arginine histone in late G_2 phase and arginine histone acetylation during interphase successive generations of antheridial filaments of *Chara vulgaris* L. *Folia Histochem Cytochem* 1979; **17**: 49-58.
- [64] MASZEWSKI J. Endopolyploidization patterns in non-generative antheridial cells in mono- and dioecious *Chara* spp. (*Characeae*) with different DNA C-values. *Plant Syst Evol* 1991; **177**: 39-52.
- [65] MASZEWSKI J, VAN BEL AJE. Different patterns of intercellular transport of Lucifer Yellow in young and mature antheridia of *Chara vulgaris* L. *Bot Acta* 1996; **109**: 110-114.
- [66] MEZITT LA, LUCAS WJ. Plasmodesmal cell-to-cell transport of proteins and nucleic acids. *Plant Mol Biol* 1996; **32**: 251-273.
- [67] OLSZEWSKA MJ. The binding of 3H - actinomycin D in synchronously dividing cells of antheridial filaments and during spermatids differentiation of *Chara vulgaris* L. *Bull Acad Pol Sci* 1974a; **XXIII**: 347-350.
- [68] OLSZEWSKA MJ. Antheridial filaments of *Chara vulgaris* – a model for study of mitotic cycle and cell differentiation. *Portug Acta Biol Ser A* 1974b; **XIV**: 313-322.
- [69] OLSZEWSKA MJ. Chromatin condensation in late G_2 phase as a factor related to the earlier initiation of mitosis in successive generations of antheridial filaments of *Chara vulgaris* L. *Microsc Acta* 1978; **80**: 115-126.
- [70] OLSZEWSKA MJ, BILECKA A, KURAN H, MARCINIAK K. Cell cycle control in synchronously dividing antheridial filaments of *Chara vulgaris* L as revealed by cycloheximide pulse treatment. *Folia Histochem Cytochem* 1982; **20**: 3-24.
- [71] OLSZEWSKA MJ, GERNAND D, GODLEWSKI M, KUNACHOWICZ A. DNA – methylation during antheridial filament development and spermiogenesis in *Chara vulgaris* (*Charophyceae*) analysed by *in situ* nick-translation driven by methylation-sensitive restriction enzymes. *Eur J Phycol* 1997; **32**: 287-291.
- [72] OLSZEWSKA MJ, GODLEWSKI M. An autoradiographic study of the synthesis of nucleic acids and protein during the cell cycle of synchronously dividing antheridial filaments in *Chara vulgaris* L. *Folia Histochem Cytochem* 1972; **10**: 245-256.
- [73] OLSZEWSKA MJ, GODLEWSKI M. A cytochemical study of spermatogenesis in *Chara vulgaris* L. *Folia Histochem Cytochem* 1973; **11**: 9-20.
- [74] OLSZEWSKA MJ, MARCINIAK K. The role of histones in restriction of chromatin activity in successive stages of development of the antheridial filaments of *Chara vulgaris* L. *Folia Histochem Cytochem* 1977; **15**: 109-119.
- [75] OLSZEWSKA MJ, MARCINIAK K. Role of SS bridges in mitotic condensation of chromatin. *Folia Histochem Cytochem* 1980; **18**: 23-32.

- [76] OPARKA KJ. Getting the message across: how do plant cells exchange macromolecular complexes? *Trends Plant Science* 2004; **9**: 33-41.
- [77] OPARKA KJ, ROBERTS AG, BOEVINK P, SANTA CRUZ S, ROBERTS I, PRADEL KS, IMLAU A, KOTLIZKY G, SAUER N, EPEL B. Simple, but not branched, plasmodesmata allow the nonspecific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell* 1999; **97**: 743-754
- [78] PERBAL B. Communications is the key. *Cell Comm Signal* 2003; **1**: 3:1-4.
- [79] PICKETT-HEAPS JD. Ultrastructure and differentiation in *Chara* sp. III. Formation of the antheridium. *Austr J Biol Sci* 1968a; **21**: 255-274.
- [80] PICKETT-HEAPS JD. Ultrastructure and differentiation in *Chara (fibrosa)* IV: spermatogenesis. *Austr J Biol Sci* 1968b; **21**: 655-690.
- [81] POPŁOŃSKA K. Cytochemical studies on histone-type and protamine-type proteins during spermiogenesis in *Chara vulgaris* and *Chara tomentosa*. *Folia Histochem Cytobiol* 2002; **40**: 233-234.
- [82] SCHULTE C, KIRST GO, WINTER U. Source-sink characteristic of photoassimilate transport in fertile and sterile plants of *Chara vulgaris* L. *Bot Acta* 1994; **107**: 362-368.
- [83] SHEPHERD VA, GOODWIN PB. Seasonal patterns of cell-to-cell communication in *Chara corallina* Klein. Ex Willd. II Cell-to-cell communication during the development of antheridia. *Plant Cell Environ* 1992; **15**: 151-162.
- [84] SOWIŃSKI P. Plazmodesmy, jako element systemu komunikacji w roślinach. *Post Biol Kom* 2002; **29**: 627-635.
- [85] SPANSWICK RM, COSTERTON JWF. Plasmodesmata in *Nitella translucens*: structure and electrical resistance. *J Cell Sci* 1967; **2**: 451-464.
- [86] STRASBURGER E. Ueber Plasmaverbindungen pflanzlicher Zellen. *Jb Wiss Bot* 1901; **36**: 493-610.
- [87] TAIZ L, JONES RL. Gibberellic acid, α -1 glucanase and the cell walls of barley aleurone layer. *Planta* 1970; **92**: 73-84.
- [88] TAIZ L, JONES RL. Plasmodesmata and an associated cell wall component in barley aleurone tissue. *Am J Bot* 1973; **60**: 67-75.
- [89] TANGL E. Ueber offene Communicationen zwischen den Zellen des Endospermes einiger Samen. *Jb Wiss Bot* 1879; **12**: 170-190
- [90] TELEŻYŃSKI H. Garnitures des chromosomes et synchronisme des divisions dans les filaments d'antherozoides chez certaines espèces du genre *Chara* Vřill. *Acta Soc Bot Pol* 1929; **6**: 230-247.
- [91] THURET G. Recherches sur les zoospores des Algues et les antheridies des Cryptogames. *Ann Sci Nat Bot III* 1851; **16**: 5-39.
- [92] VAN BEL AJE, VAN KESTEREN WJP. (eds) Plasmodesmata structure, function, role in cell communication. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer 1999.
- [93] WEILING F. Zur Feinstruktur der Plasmodesm und Plasmakanäle bei Pollenmutterzellen. *Planta* 1965; **64**: 97-118.
- [94] WHELAN EDP. Discontinuities in the callose wall, intermeiocyte connections, and cytomixis in angiosperm meicytes. *Canad J Bot* 1974; **52**: 1219-1224.
- [95] WHELAN EDP, HAGGIS GH, RORD EJ. Scanning electron microscopy of the callose wall and intermeiocyte connection and cytomixis in angiosperm meicytes. *Canad J Bot* 1974; **52**: 1215-1218.
- [96] WU X, WEIGEL D, WIGGE PA. Signaling in plants by intercellular RNA and protein movement. *Genes Develop* 2002; **16**: 151-158.
- [97] ZAMBRYSKI P. Cell-to-cell transport of proteins and fluorescent tracers via plasmodesmata during plant development. *J Cell Biol* 2004; **162**: 165-168.
- [98] ZAMBRYSKI P, CRAWFORD K. Plasmodesmata: gatekeepers for cell-to-cell transport of developmental signals in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; **16**: 393-421.

Maria Kwiatkowska,
 Katedra Cytofizjologii Uniwersytetu Łódzkiego,
 Piłarskiego 14, 90-231 Łódź
 e-mail: kwiat@biol.uni.lodz.pl

POTENCJALNE ZNACZNIKI BIAŁKOWE NOWOTWORÓW ZŁOŚLIWYCH TARCZYCY

POTENTIAL PROTEIN MARKERS FOR THYROID CANCERS

Anna LIPIŃSKA

Katedra Cytobiochemii, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie: Obecnie obserwuje się rosnące zainteresowanie badaniami zmierzającymi do określenia potencjalnych molekularnych znaczników nowotworów złośliwych tarczycy. Wiąże się to z problemami w diagnozowaniu nowotworów tarczycy, szczególnie gruczolaka i raka pęcherzykowego. W pracy przedstawiono ogólną charakterystykę nowotworów tarczycy i opisano najbardziej obiecujące markery raków tarczycy, tj. galektynę-1 i -3, białka HMGA(HMGI/Y), tymozynę β -10 oraz telomerazę.

Słowa kluczowe: nowotwory tarczycy, galektyna-1, galektyna-3, białka HMGA (HMGI/Y), tymozyna β -10, telomeraza.

Summary: Now, great interest is observed on studies directed toward characterization of potential molecular markers of malignant thyroid disorders. They seem to be of special value in diagnosis of follicular adenoma and carcinoma. In this review, general characterization of thyroid lesions and potential promising markers for thyroid carcinomas, i.e., galectin-1 and -3, HMGA (HMGI/Y) proteins, thymosin β -10 and telomerase are described.

Key words: thyroid tumors, galectin-1, galectin-3, HMGA (HMGI/Y) proteins, thymosin β -10, telomerase.

Wykaz stosowanych skrótów: **cDNA** – DNA komplementarny do mRNA, **HMG** – białka wysokiej ruchliwości elektroforetycznej, **RCF** – czynnik replikacji C, **PCNA** – antygen jądrowy komórki proliferującej, **PCR** – reakcja łańcuchowa polimerazy, **Rb** – retinoblastoma, **RT-PCR** – PCR po reakcji odwrotnej transkrypcji

1. WSTĘP

Tarczyca jest gruczołem wydzielania wewnętrznego zlokalizowanym w przednio-dolnej części szyi, nad wycięciem mostka. Zbudowana jest z dwóch płatów bocznych i łączącej je wężyny (cieśni); czasami występuje płat środkowy, zwany piramidowym.

U mężczyzn masa tarczycy wynosi średnio 17–20 g, natomiast u kobiet jest ona znacznie większa; z wiekiem różnica ta maleje. Cały gruczoł otacza dwuwarstwowa łącznotkankowa torebka, której wewnętrzna część wnika w obręb gruczołu i dzieli go na zraziki. Te natomiast zbudowane są z licznych wysłanych nabłonkiem sześciennym ściśle do siebie przylegających pęcherzyków (od 20 do 40) zawierających koloid tarczycowy. Tarczycza jest gruczołem bogato unaczynionym. Naczyniami tętniczymi zaopatrującymi ją w krew są: parzyste tętnice górne odchodzące od tętnicy szyjnej zewnętrznej, parzyste tętnice dolne biegnące od tętnic podobojczykowych oraz tętnica tarczowa najniższa odchodząca od aorty. Tętnice te tworzą zespolenie wewnątrz-torebkowe. Drogę odprowadzającą produkowane w tarczycy hormony: 3,5,3',5'-tetrajodotyroninę (T_4 , tyroksyna), 3,5,3'-trijodotyroninę (T_3) i kalcytoninę stanowi bogata sieć naczyń krwionośnych włosowatych. Gruczoł tarczowy zawiera komórki nabłonka pęcherzyków, czyli tyreocyty, komórki okołopęcherzykowe – komórki C, a ponadto limfocyty, histiocyty, fibroblasty i komórki endotelium. Każdy z wymienionych typów komórek może podlegać transformacji nowotworowej jednak najczęściej są nimi tyreocyty, z których wywodzą się gruczolaki pęcherzykowe, raki pęcherzykowe, brodawkowe i anaplastyczne oraz komórki C, z których powstaje rak rdzeniasty.

Raki tarczycy są najczęstszymi złośliwymi nowotworami układu endokrynnego. Ocenia się, że stanowią one w przybliżeniu 1% wszystkich nowotworów złośliwych człowieka. Z badań przeprowadzonych na terenie Europy i Stanów Zjednoczonych wynika, że u trzech osób na 100 000 może rozwinąć się złośliwy nowotwór tarczycy, chociaż obserwuje się znaczne regionalne różnice wynikające np. z braku w diecie dostatecznej ilości jodu. Raki tarczycy dużo częściej rozwijają się u kobiet niż u mężczyzn, średnio 2–3:1 [21, 37].

2. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA NOWOTWORÓW TARCZYCY

2.1. Gruczolak pęcherzykowy (*adenoma folliculare*)

Gruczolak pęcherzykowy jest to łagodny nowotwór tarczycy powstający w wyniku klonalnego rozrostu komórek nabłonka pęcherzyków. Stanowi około 90% wszystkich zmian nowotworowych tarczycy. Gruczolak pęcherzykowy jest zazwyczaj pojedynczą zmianą (o średnicy od kilku milimetrów do kilku centymetrów) rozwijającą się w bocznych płatach tarczycy, przeważnie w piątej i szóstej dekadzie życia kobiet i mężczyzn (częściej u kobiet). Gruczolak pęcherzykowy otoczony jest zwykle cienką torebką łącznotkankową o grubości poniżej 0,1 mm. Charakteryzuje się wzrostem rozprężającym powodując deformację lub zanik (z ucisku) pęcherzyków w otaczającym miększu tarczycy. Zazwyczaj jest zbudowany z populacji monomorficznych komórek pęcherzykowych, najczęściej o nieco innej morfologii niż komórki tarczycy otaczające zmianę. Od raka odróżnia go brak naciekania torebki lub naczyń. Ryzyko rozwinienia się raka na podłożu gruczolaka jest bardzo niskie [33, 47].

2.2. Rak pęcherzykowy (*carcinoma folliculare*)

Rak pęcherzykowy stanowi od 5 do 20% nowotworów złośliwych tarczycy i najczęściej występuje w piątej i siódmej dekadzie życia; częściej u kobiet niż mężczyzn. Rośnie w postaci guza otorebkowanego i różni się od gruczolaka pęcherzykowego poza atypią komórkową, naciekaniem naczyń i torebki guza. W odróżnieniu od raka brodawkowatego, rak pęcherzykowy jest prawie zawsze pojedynczy i nie przebiega w postaci raka utajonego. Rak pęcherzykowy daje przerzuty drogą krwionośną najczęściej do kości obręczy barkowej mostka, czaszki i kości biodrowej. W klasyfikacji Światowej Organizacji Zdrowia wyróżnia się 2 typy raka pęcherzykowego: postać o minimalnej i szerokiej inwazyjności. Postać raka pęcherzykowego o minimalnej inwazyjności jest otorebkowanym guzem litym. Jedynym kryterium pozwalającym na odróżnienie tej postaci raka pęcherzykowego od gruczolaka jest stwierdzenie naciekania torebki guza oraz inwazja do naczyń krwionośnych. Natomiast postać wysoce inwazyjna (szeroko inwazyjna lub masywnie naciekająca) cechuje się rozległym naciekaniem zdrowego mięszu tarczycy, tkanek sąsiednich oraz naczyń krwionośnych. Przerzuty do kości obręczy barkowej mostka, czaszki i kości biodrowej występują w 29–60% przypadków, natomiast do węzłów chłonnych w 13–24% przypadków. Do rzadko spotykanych raków pęcherzykowych należy rak wyspowy (*carcinoma insulare*). Jest on nisko zróżnicowaną odmianą raka pęcherzykowego, naciekającą w postaci ognisk (wysp). Do wariantów cytologicznych zalicza się raka pęcherzykowego z komórek oksyfilnych o kwasochłonnej i ziarnistej cytoplazmie (komórek Hürtle). Oba podstawowe typy raka pęcherzykowego różnią się rokowaniem. W przypadku raka szeroko inwazyjnego i wyspowego przeżycie 10-letnie wynosi 40–80%, a w przypadku raka minimalnie inwazyjnego – przekracza 80% [28, 33, 34, 47].

2.3. Rak brodawkowaty (*carcinoma papillare*)

Rak brodawkowaty jest najczęściej rozpoznawanym nowotworem układu endo-krynnego i stanowi 50–80% wszystkich złośliwych nowotworów tarczycy. Obejmuje wszystkie grupy wiekowe od dzieci po osoby w zaawansowanym wieku, ze szczytem zachorowalności powyżej 40. roku życia. Rak brodawkowaty rośnie w postaci guza nieotorebkowanego. Występujące w nim struktury brodawkowate to palczaste twory pokryte przeważnie nabłonkiem jednowarstwowym i wypełnione łącznotkankowym zrębem i zawierające widoczne naczynia. W diagnostyce tego raka istotną rolę odgrywają charakterystyczne cechy budowy jąder komórkowych: duże rozmiary, głębokie bruzdy i wpuklenia cytoplazmy, równomiernie rozproszona chromatyna (co daje obraz „matowej szyby”), brak jąderek. Dodatkowymi cechami pomocniczymi w diagnozowaniu raka brodawkowatego są swoiste dla tego typu nowotworu ciała piaszczakowate – kuliste zwapnienia występujące głównie u szczytu brodawek o charakterystycznym układzie koncentrycznym. Prawdopodobnie są one skutkiem zakrzepicy włósniczek lub uszkodzeń naczyń pod wpływem mikrourazów. Stopniowe poszerzanie się obszarów martwicy pociąga za sobą powolne wytrącanie związków wapnia, co prowadzi do wytworzenia charakterystycznej struktury warstwowej. Rak brodawkowaty daje przerzuty drogą naczyń limfatycznych do okolicznych węzłów chłonnych u 50% pacjentów. Przerzuty do kości czy płuc wykrywa się u 5–6% chorych.

Rokowanie w raku brodawkowatym generalnie jest dobre, około 95% chorych przeżywa 5 lat, a 90% – 20 lat [33, 34, 47, 48].

2.4. Rak anaplastyczny (*carcinoma anaplasticum*)

Rak anaplastyczny (niezróżnicowany) stanowi od 5 do 10% wszystkich nowotworów złośliwych tarczycy. Jest nowotworem wieku starszego i jednym z najbardziej złośliwych nowotworów człowieka. Cechuje go szybki wzrost i zdolność do naciekania otaczających tkanek. W chwili wykrycia prezentuje się jako duży, zazwyczaj nieoperacyjny guz. Na ogół rozwija się na podłożu raka brodawkowatego, pęcherzykowego lub rdzeniastego i często można stwierdzić towarzyszącą rakowi anaplastycznemu obecność utkania innego, lepiej zróżnicowanego raka. Rak anaplastyczny może być zbudowany z komórek olbrzymich, wielokształtnych lub wrzecionowatych, mięsakopodobnych. Daje on liczne odległe przerzuty do płuc i kości zarówno przez krew jak i limfę. Pięcioletnie przeżycie od wykrycia nowotworu jest mniejsze niż 5%, a 60% pacjentów umiera w ciągu roku od rozpoznania [28, 33, 34, 47].

2.5. Rak rdzeniasty (*carcinoma medullare*)

Rak rdzeniasty wywodzi się z komórek okołopęcherzykowych C produkujących kalcytoninę. Stanowi on 3–12% raków tarczycy. Wyróżnia się dwie postaci raka rdzeniastego: sporadyczną i dziedziczną. Postać sporadyczna stanowi około 80% wszystkich przypadków raka rdzeniastego (rozwijający się guz jest zazwyczaj jednoogniskowy), natomiast postać dziedziczna (rodzinna) – około 20%. Występuje u osób do 35. roku życia, w tym także u dzieci. Rak rdzeniasty dziedziczny bywa często wieloogniskowy i zajmuje oba płaty tarczycy. Postać dziedziczna może być składową zespołu wielogruczolakowatości wewnątrzwydzielniczej MEN (ang. *multiple endocrine neoplasia*). Rak rdzeniasty jest guzem litym nieotorebkowanym, najczęściej umiejscowionym w górnej połowie płatów bogatych w komórki C. Komórki nowotworu są zazwyczaj monomorficzne – okrągłe lub owalne o zasadochłonnej lub kwasochłonnej cytoplazmie. Rak rdzeniasty jest nowotworem o wysokim stopniu złośliwości. W około 50% przypadków w chwili rozpoznania stwierdza się przerzuty do okolicznych węzłów chłonnych, a w 15–20% przypadków – do płuc, wątroby i kości. Dziesięcioletnie przeżycie od momentu wykrycia nowotworu wynosi od 50 do 70–86%. Ujawnienie przerzutów w węzłach chłonnych w chwili rozpoznania nowotworu zmniejsza szanse na wyleczenie (10-letnie przeżycie) z 86 do 46% [1, 4, 20, 28, 34, 47].

3. POTENCJALNE BIAŁKOWE ZNACZNIKI NOWOTWORÓW ZŁOŚLIWYCH TARCZYCY

Biopsja aspiracyjna cienkoigłowa jest techniką powszechnie wykorzystywaną przy wstępnym diagnozowaniu łagodnych i złośliwych nowotworów tarczycy. Niemniej wiadomo, że metoda ta ma pewne ograniczenia ze względu na nakładanie się cech cytologicznych między łagodnymi i złośliwymi nowotworami pęcherzykowymi.

Morfologiczne odróżnienie gruczolaka, dobrze zróżnicowanego raka pęcherzykowego i pęcherzykowej odmiany raka brodawkowatego jest trudne nawet dla cytologów z wysoką znajomością biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej tarczycy. Konsekwencją tego jest to, że większość pacjentów z nowotworami tarczycy podlega leczeniu chirurgicznemu mimo, że mniej niż 10% jest definitywnie sklasyfikowana jako nowotwory złośliwe. Ponieważ w diagnozowaniu raka pęcherzykowego są wymagane specyficzne kryteria, szczególnie wyraźne zademonstrowanie naciekania torebki i inwazji do naczyń, histologiczne odróżnienie raka pęcherzykowego od gruczolaka może także być trudne [34]. Przedoperacyjna jednoznaczna diagnoza nowotworów tarczycy byłaby możliwa dzięki znalezieniu ich molekularnych znaczników. Wydaje się, że obiecującymi znacznikami złośliwych nowotworów tarczycy są galektyny: 1 i 3, białka HMGA (HMGI/Y), tymozyna β -10 oraz telomeraza.

3.1. Galektyna-1

Galektyny (jedna z 4 grup lektyn) są białkami występującymi w komórkach wielu zwierząt, a także człowieka. Wspólną ich cechą jest obecność przynajmniej jednej liczącej około 135 aminokwasów domeny wiążącej cukier, mającej powinowactwo do β -galaktozydów. Do tej pory zidentyfikowano 14 galektyn, z których najlepiej scharakteryzowano galektynę-1, -3 i -9. Każda z galektyn wykazuje specyficzną ekspresję w różnych komórkach zarówno prawidłowych, jak i patologicznych. Galektyny zlokalizowane są w cytoplazmie, jądrze komórkowym, na powierzchni komórek oraz w przestrzeni międzykomórkowej, co sugeruje wielofunkcyjność tych białek [5, 15, 16, 24–26, 29, 35, 39–41, 51].

Galektyna-1 w warunkach fizjologicznych występuje jako heterodimer, którego podjednostki mają masę cząsteczkową 14,5 kDa i składają się ze 134 aminokwasów tworzących 12 odcinków o konfiguracji β . Podjednostki galektyny-1 łączą się ze sobą dzięki oddziaływaniom między hydrofobowymi aminokwasami pierwszego i ostatniego od-cinka o strukturze β . Domena wiążąca cukier, ulokowana po przeciwnych stronach dimeru, składa się z trzech blisko siebie leżących odcinków o strukturze harmonijkowej. Obecność galektyny-1 stwierdzono w wielu narządach, tkankach i komórkach prawidłowych, np. w grasicy, węzłach chłonnych, śledzionie, jądrach, mięśniach gładkich i szkieletowych, wątrobie, jelitach, płucach, łożysku, komórkach ścian naczyń, skórze, sercu i neuronach węchowych. Jej ekspresję wykryto także w szeregu nowotworów: m.in. raku tarczycy, okrężnicy, jajnika oraz w czerniaku i chłoniaku. Podobnie jak galektyna-3, galektyna-1 występuje w cytoplazmie, jądrze komórkowym i na powierzchni komórki. Pełni rolę w wielu procesach fizjologicznych jak i patologicznych; do najważniejszych z nich należą: adhezja komórkowa, regulacja proliferacji i przeżywalności komórek, mechanizmy odpornościowe oraz procesy nowotworzenia i przerzutowania komórek nowotworowych [15, 29, 39–41].

Xu i wsp. [53] po raz pierwszy stwierdzili odmienną ekspresję galektyny-1 w nowotworach tarczycy oraz w tkance prawidłowej. Do badań techniką immunohistochemiczną i Western blot wykorzystano 16 preparatów raka brodawkowatego, 7 – pęcherzykowego, 8 – rdzeniastego oraz 10 preparatów gruczolaka pęcherzykowego i 1 przypadek zmiany nienowotworowej (*struma nodosa*). Jako kontrolę użyto 33

preparaty tkanki prawidłowej sąsiadującej ze zmianami patologicznymi. Zaobserwowano ekspresję galektyny-1 we wszystkich przypadkach raka pęcherzykowego i brodawkowatego oraz w 63% przypadków raka rdzeniastego. Natomiast nie stwierdzono jej ekspresji ani w preparatach gruczolaka, ani w sąsiadujących ze zmianami patologicznymi komórkach prawidłowych oraz zmianie nienowotworowej. Chiariotti i wsp. [12] do badań ekspresji galektyny-1 na poziomie mRNA i białka wykorzystali zarówno linie komórkowe, jak i preparaty nowotworów tarczycy po ocenie histologicznej. Analiza techniką Northern blot wykazała niski poziom mRNA galektyny-1 w prawidłowych tyreocytach z hodowli oraz w linii komórek pochodzącej z gruczolaka, natomiast wysoki we wszystkich 6 liniach raków tarczycy niezależnie od ich pochodzenia i potencjału nowotworowego (4 linie raka brodawkowatego, 1 – pęcherzykowego i 1 – anaplastycznego). Analogiczne wyniki otrzymano badając poziom galektyny-1 techniką Western blot. Podwyższony poziom mRNA galektyny-1 stwierdzono w 28 z 40 preparatów raka brodawkowatego (70%) i w 6 z 7 – raka anaplastycznego (86%) w porównaniu z tkanką prawidłową. Nie stwierdzono natomiast różnic w ekspresji mRNA galektyny-1 w przypadku 11 preparatów raka pęcherzykowego i 5 – gruczolaka. Udowodniono ponadto, że preparaty raka brodawkowatego, w których wykazano wysoki poziom mRNA galektyny-1, cechuje silna immunoreaktywność przy użyciu swoistych przeciwciał anty galektynie-1, co wskazywałoby na wysoki poziom białka. Słabą lub brak reakcji stwierdzono w przypadku tkanki prawidłowej.

Przedstawione wyniki, niestety nielicznych prac sugerują, że zwiększenie ekspresji galektyny-1 na poziomie mRNA i białka może być rozpatrywane jako dodatkowa cecha diagnostyczna raków złośliwych tarczycy.

3.2. Galektyna-3

Galektyna-3 (m.cz. 31 kDa) ma dwie funkcjonalne domeny: długą, giętką domenę N-końcową liczącą 100–150 aminokwasów (w zależności od pochodzenia) zawierającą 8–13 kopii 9-aminokwasowego modułu sekwencyjnego bogatego w prolinę, glicynę i tyrozynę oraz 135-aminokwasową domenę rozpoznającą i wiążącą cukier (β -galaktozę, laktozę, N-acetylolaktozaminę). Ekspresję galektyny-3 stwierdzono w makrofagach, eozynofilach, neutrofilach, komórkach tucznych, komórkach nabłonkowych przewodu pokarmowego i oddechowego, nerkach i pewnych neuronach czuciowych. Chociaż galektyna-3 jest zlokalizowana głównie w cytoplazmie, stwierdzono jej obecność w jądrze komórkowym, na powierzchni komórki oraz w przestrzeni międzykomórkowej. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja galektyny-3 jest związana z jej rolą w składaniu mRNA i zapobieganiu apoptozie (działa jako czynnik antyapoptotyczny). Natomiast jej obecność na powierzchni komórki i w matriks zewnątrzkomórkowej wskazuje na udział w interakcji komórka–komórka oraz komórka–matriks. Uważa się, że oprócz funkcji fizjologicznych galektyna-3 pełni także rolę w procesie transformacji nowotworowej i przerzutowaniu [15, 24–26, 35, 39, 41, 51].

W ciągu ostatnich lat opublikowano szereg prac dotyczących ekspresji galektyny-3 w łagodnych i złośliwych nowotworach tarczycy człowieka oraz w zmianach nienowotworowych i tkance prawidłowej [6, 13, 14, 17, 19, 23, 27, 36, 38, 44, 53].

TABELA 1. Ekspresja galektyny-3 w łagodnych i pierwotnych złośliwych nowotworach tarczycy (analiza immunohistochemiczna; a. liczba preparatów z ekspresją galektyny-3/całkowita liczba preparatów)

Rak brodawkowaty	Rak pęcherzykowy	Rak z komórek Hürtle	Rak anaplastyczny	Rak rdzeniasty	Guczolak pęcherzykowy	Piśmienictwo
16/16	7/7	–	–	3/8	0/10	[53]
18/18	4/8	1/1	5/5	3/6	0/8	[19]
18/18	17/17	–	–	–	3/29	[38]
45/45	8/8	–	5/5	–	0/25	[27]
–	–	–	–	16/20	–	[14]
–	16/17 ¹	–	–	–	–	[44]
241/259	43/46 ¹ 38/41 ²	–	19/21	3/7	9/195	[6]
33/45	2/3	5/8	1/2	1/1	3/8	[23]
–	–	–	–	23/25	–	[17]
28/28	3/5	1/1	1/1	–	17/27	[13]
12/12	18/20	–	–	–	14/31	[36]
Ogółem ³						
411/441 93%	156/174 90%	7/10 70%	31/34 91%	49/67 73%	46/333 14%	

1 Dane dotyczą raka pęcherzykowego o minimalnej inwazyjności

2 "–" o szerokiej inwazyjności

3 Nie uwzględniono pracy Kawachi i wsp. [30] ze względu na brak liczby przypadków z ekspresją galektyny-3

Ekspresję galektyny-3 analizowano technikami immunohistochemicznymi z wykorzystaniem parafinowych bloków komórkowych lub skrawków tkankowych. Badania te wykazały ekspresję galektyny-3 w prawie wszystkich przypadkach raka brodawkowego (93%), raka pęcherzykowego (90%), raka anaplastycznego (91%) i większości przypadków raka rdzeniastego (73%) oraz raka z komórek Hürtle (70%) w przeciwieństwie do gruczolaka pęcherzykowego (14%) (tab. 1). Niemniej Coli i wsp. [13] oraz Martins i wsp. [36] stwierdzili odpowiednio ekspresję galektyny-3 w 14 z 31 przypadków (45%) i w 17 z 27 przypadków (63%) gruczolaka. Przy ocenie diagnostycznej wartości immunodetekcji galektyny-3 w nowotworach tarczycy dyskutuje się sprawę wpływu czynnika subiektywnego obserwatora na interpretację wyników badania immunohistochemicznego. Zdaniem wielu badaczy bardziej obiektywną metodą jest analiza różnic poziomu mRNA galektyny-3 między różnymi typami nowotworów tarczycy techniką RT-PCR. Bernet i wsp. [7] stwierdzili wyższy poziom mRNA galektyny-3 w raku brodawkowym i gruczolaku pęcherzykowym w porównaniu z tkanką prawidłową. A ponadto ujawnili, że w raku pęcherzykowym poziom mRNA nie był wyższy w porównaniu z tkanką prawidłową i gruczolakiem. Ostatnio Feichenfeldt i wsp. [18] stwierdzili znaczny wzrost ekspresji galektyny-3 na poziomie mRNA i białka w raku brodawkowym tarczycy w porównaniu z gruczolakiem. Niespodziewanie,

nie zaobserwowali oni wzrostu poziomu mRNA i białka w raku pęcherzykowym. Kawachi i wsp. [30], wykazali znacznie wyższą ekspresję galektyny-3 w pierwotnym raku brodawkowatym dającym przerzuty w porównaniu z tym, który ich nie daje. Wysoką ekspresję galektyny-3 stwierdzono również w raku rdzeniastym tarczycy dającym przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych [14]. Jednakże zarówno w przypadku limfatycznych metastaz raka brodawkowego [30] jak i rdzeniastego [17] ekspresja galektyny-3 była w nich znacznie niższa niż w odpowiednich rakach pierwotnych. Opublikowane obserwacje pozwalają stwierdzić, że cytoplazmatyczna ekspresja galektyny-3 jest fenotypowo związana z transformacją nowotworową i progresją w kierunku nabywania zdolności do przerzutowania. Yoshii i wsp. [54] wykazali, że zahamowanie ekspresji galektyny-3 w komórkach raka brodawkowego tarczycy skutkuje znaczną redukcją fenotypu nowotworowego. Jest możliwe, że może to wynikać z działania galektyny-3 jako czynnika antyapoptotycznego. Ostatnio Takenaka i wsp. [50] udowodnili, że nadekspresja galektyny-3 w prawidłowych tyreocytach transfekowanych cDNA dla galektyny-3 prowadzi do nabycia przez nie fenotypu nowotworowego. Stwierdzili ponadto, że nadekspresji galektyny-3 towarzyszy wzrost ekspresji genów zaangażowanych w przejście od fazy G₁ do fazy S cyklu komórkowego (*Rb*, *PCNA*, *RCF*). Istnieje zatem możliwość, że galektyna-3 odgrywa rolę w regulacji cyklu komórkowego.

W świetle przedstawionych wyników badań należy uznać, że galektyna-3 nie jest uniwersalnym molekularnym znacznikiem nowotworów złośliwych tarczycy. Niemniej analiza ekspresji galektyny-3 może być pomocna w identyfikacji raka brodawkowego, ale nie w odróżnianiu raka pęcherzykowego od gruczolaka.

3.3. Białka HMGA

Niehistonowe białka chromatyny HMG (ang. *high mobility group*), tj. białka o wysokiej ruchliwości elektroforetycznej tworzą trzy rodziny, które według nowej terminologii są określane jako HMGA (HMGI/Y), HMGB (HMGI 1 i 2) oraz HMGN (HMGI 14 i 17). Rodzina białek HMGA licząca 4 przedstawicieli poza funkcją strukturalną pełni rolę w regulacji ekspresji szeregu genów *in vivo* i jest określana jako „architektoniczne czynniki transkrypcji”. W wyniku translacji alternatywnie złożonego mRNA kodowanego przez gen *HMGA1* (u człowieka *locus* 6p21) powstają trzy białka: HMGA1a (HMGI), HMGA1b (HMGY) oraz HMGA1c (HMGI/R). Białka te zawierają trzy charakterystyczne zasadowe motywy sekwencyjne (KRPRGRPK), dzięki którym przyłączają się one do bogatego w pary A–T mniejszego rowka DNA. Białka HMGA1a i HMGA1b są identyczne w sekwencji z wyjątkiem delekcji 11-aminokwasowego odcinka w białku HMGA1b między pierwszą a drugą domeną wiążącą DNA. W łańcuchu polipeptydowym HMGA1a (HMGI) znajduje się 107 aminokwasów (m.c. 11,7 kDa), natomiast w HMGA1b (HMGY) – 96 aminokwasów (m.c. 10,6 kDa). Białko HMGA1c (HMGI/R) zawiera 179 aminokwasów (m.c. 19,7 kDa). Białko HMGA2 (HMGI-C) liczące 109 aminokwasów (m.c. 12 kDa) jest kodowane przez oddzielny gen *HMGA2* (*HMGI-C*) ulokowany u człowieka w *locus* 12q14-15. Poziom ekspresji genów *HMGA* jest maksymalny podczas rozwoju embrionalnego, ale niski lub

niewykrywalny w całkowicie zróżnicowanych, niedzielących się komórkach dojrzałego organizmu, co implikuje zaangażowanie produktów ekspresji tych genów w regulację komórkowej proliferacji i wzrostu embrionalnego [42, 43, 52]. W nowo-tworowo zmienionych komórkach w przeciwieństwie do prawidłowych komórek somaty-cznych poziom produktów genów *HMGA* jest często wysoki; wzrost ich stężenia koreluje ze wzrostem zaawansowania choroby lub zdolnością do przerzutowania. Perfekcyjną korelację między nadekspresją białek HMGA o pełnej długości, a progresją nowotworu stwierdzono w raku jelita grubego, prostaty, sutka, płuc, a także tarczycy [52]. Chiappetta i wsp. [11] wykorzystując przeciwciała przeciwko specyficznemu peptydowi zlokalizowane-mu w N-końcowym regionie białek HMGA1a i HMGA1b zbadali immunohistochemicznie ich ekspresję w 358 preparatach nowotworów tarczycy. Stwierdzono brak ekspresji białek HMGA1a i HMGA1b w tkance prawidłowej i w prawie wszystkich zmianach nienowotworowych oraz 80% przypadków gruczolaka. Natomiast ekspresję tych białek zaobserwowano w jądrach komórkowych większości przypadków raków tarczycy: pęcherzykowego, brodawkowatego i niezróżnicowanego, tj. w 121 przypadkach ze 126 (95%) badanych. W celu uwiarygodnienia otrzymanych wyników równolegle w 50 immunohistochemicznie zbadanych próbkach analizowano poziom mRNA techniką RT-PCR stwierdzając silną korelację między wykrywanym mRNA a diagnozą raka. Ponadto ekspresję białek HMGA1a i HMGA1b analizowano techniką immuno-histochemiczną i RT-PCR w 12 preparatach cytologicznych po przeprowadzeniu biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej. Preparaty pochodziły od 10 pacjentów, których po diagnozie cytologicznej poddano tyreoidektomii, a ocena histologiczna wykazała u 4 pacjentów raka brodawkowatego lub pęcherzykowego, a u 6 – gruczolaka. We wszystkich przypadkach wykrywalna ekspresja HMGA1a i HMGA1b korelowała z diagnozą nowotworu złośliwego. Dwa preparaty zawierały prawidłowe tyreocyty. Wyniki szeroko zakrojonych w laboratorium Fusco [11] badaniach ekspresji białek HMGA w zmianach patologicznych tarczycy sugerują, że istnieje korelacja między ekspresją białek HMGA1a i HMGA1b a fenotypem raków tarczycy, co implikuje, że białka te można uznać za znaczniki nowotworów złośliwych tarczycy. Na korzyść tej sugestii przemawiają wyniki badań Kim i wsp. [31]. Stosując półilościową technikę RT-PCR stwierdzono niską ekspresję mRNA białek HMGA1a i HMGA1b w 10 preparatach tkanki prawidłowej, 3 – wola guzkowatego, oraz 6 – gruczolaka. Natomiast wysoki poziom ekspresji mRNA zaobserwowano w 11 z 13 preparatów raka brodawkowatego i w 5 z 5 – raka pęcherzykowego.

Hamowanie syntezy białek HMGA1a i HMGA1b reprezentuje nową i obiecującą strategię w terapii raków, w których ma miejsce nadekspresja genu *HMGA1*. Scala i wsp. [46] udowodnili, że adenowirus niosący gen *HMGA1* w orientacji antysensowej (Ad-Yas) hamuje syntezę białek HMGA1a i HMGA1b i wzrost komórek dwóch linii komórkowych raka anaplastycznego (ARO i FB-1). Wprowadzenie Ad-Yas myszom z nowotworem indukowanym przez komórki linii ARO powodowało jego drastyczną regresję. Hamowanie syntezy białek HMGA1a i HMGA1b przez Ad-Yas obniża wzrost komórek nowotworowych zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, pozostając bez wpływu na wzrost komórek prawidłowych. Terapia oparta na blokowaniu syntezy tych białek może

być ważna w leczeniu raka anaplastycznego tarczycy, który niezmiennie prowadzi do śmierci pacjentów w ciągu kilku miesięcy.

3.4. Tymozyna β -10

Tymozyny stanowią rodzinę małych (m.cz. ok. 12 kDa) białek (oryginalnie izolowanych z grasicy cielęcía), które ze względu na ich punkt izoelektryczny podzielono na 3 klasy – α , β , γ . Tymozyny- β stanowią rodzinę strukturalnie podobnych, wysoce konserwatywnych kwaśnych polipeptydów. Biologiczna funkcja tych białek jest wciąż nieznaną; jakkolwiek sugeruje się, że ekspresja tymozyn jest związana ze wzrostem i różnicowaniem wielu typów komórek. Uważa się, że tymozyna β -10 ma wpływ na cytoskielet, ponieważ przyłącza się do aktyny G [49, 55]. Santelli i wsp. [45] stwierdzili zwiększoną ekspresję genu tymozyny β -10 w szeregu nowotworach ludzkich: rakach jelita grubego, jajnika, sutka, nerek w porównaniu z tkanką prawidłową. Ten sam zespół badawczy stwierdził również wysoką ekspresję genu tymozyny β -10 w liniach komórkowych i preparatach klinicznych raka anaplastycznego i brodawkowatego, przy czym dużo wyższy poziom ekspresji obserwowano w przypadku raka anaplastycznego niż brodawkowatego. Natomiast ekspresja genu tymozyny β -10 była prawie niewykrywalna w prawidłowej tarczycy [9]. Takano i wsp. [49] w celu określenia użyteczności analizy tymozyny β -10 w odróżnianiu nowotworów złośliwych tarczycy od łagodnych, do badań poziomu mRNA tymozyny β -10 techniką RT-PCR wykorzystali 27 preparatów raka brodawkowatego, 12 – raka pęcherzykowego, 19 – gruczolaka pęcherzykowego, 5 – raka anaplastycznego i 21 preparatów tkanki prawidłowej. Stwierdzono wysoki względny poziom ekspresji mRNA tymozyny β -10 w stosunku do ekspresji mRNA β -aktyny w raku anaplastycznym. Był on również podwyższony w pewnych preparatach raka brodawkowatego i pęcherzykowego. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w ekspresji mRNA tymozyny β -10 w gruczolaku i raku pęcherzykowym. Ujawnienie podwyższonego poziomu mRNA tymozyny β -10 może być zatem użyteczne w diagnozowaniu raka anaplastycznego, ale nie w diagnozowaniu zróżnicowanych raków tarczycy.

3.5. Telomeraza

Telomeraza (m.cz. ok. 600 kDa), wyspecjalizowana odwrotna transkryptaza, zawiera w swojej cząsteczce komponent białkowy (podjednostkę katalityczną o m.cz. 127 kDa) oraz łańcuch RNA. W enzymie wyodrębnionym z komórek ludzkich RNA składa się z 450 nukleotydów, wśród których znajduje się 11-nukleotydowa sekwencja 5'-CUAACCCUAAC-3', której region centralny jest sekwencją odwrotnie komplementarną do powtarzalnej sekwencji telomerów ludzkich 5'-TTAGGG-3'. Telomeraza jest odpowiedzialna za utrzymanie długości chromosomowych telomerów przez dodawanie heksamerowych powtórzeń (TTAGGG) $_n$, co pozostaje w dynamicznej równowadze z utratą sekwencji podczas replikacji DNA. Obecność funkcjonalnej telomerazy może być konieczna dla zdolności proliferacyjnych komórek i zgodnie z tą hipotezą aktywność telomerazy stwierdzono w większości badanych typów nowotworów złośliwych człowieka [8]. Enzym ten nie jest wykrywany w prawidłowych komórkach

somatycznych, zatem ujawnienie aktywności telomerazy w preparatach tkanek ludzkich może mieć potencjalną wartość dla rozpoznania zmienionych nowotworowo komórek w preparatach klinicznych [8]. Aktywność telomerazy analizowano również w nowotworach tarczycy [2, 3, 10, 22]. Aogi i wsp. [3] do badań aktywności telomerazy wykorzystali 12 preparatów nowotworów złośliwych tarczycy, w tym: 5 – raka brodawkowatego, 3 – pęcherzykowego, 2 – anaplastycznego, 1 – rdzeniastego i 1 – z komórek Hürtle oraz 17 preparatów zmian łagodnych obejmujących gruczolaka i hiperplazję. Aktywność telomerazy stwierdzono w 9 z 12 (75%) preparatów raków złośliwych stosując metodę amplifikacji powtórzeń telomerowych (ang. *telomeric repeat amplification protocol*). Natomiast metodą RT-PCR stwierdzono obecność mRNA katalitycznej podjednostki holoenzymu telomerazy w 8 z 12 (67%) preparatów nowotworów złośliwych i w 5 z 17 (29%) zmian łagodnych tarczycy. Wyniki te pozostawały w zgodzie z poprzednimi doniesieniami [2, 10, 22] wykazującymi aktywność telomerazy w większości raków tarczycy w przeciwieństwie do gruczolaków i tkanki prawidłowej.

4. PODSUMOWANIE

Spośród opisanych białek, najlepszymi markerami nowotworów złośliwych tarczycy są białka HMGA1a i HMGA1b. Wydaje się jednak, że w diagnozowaniu nowotworów tarczycy oraz podjęciu trafnej decyzji co do sposobu leczenia pacjentów może okazać się niezwykle pomocną, z jednej strony łączna analiza ekspresji ich potencjalnych znaczników, z drugiej – nowotworowo-specyficznych antygenów powstałych w wyniku zmian glikozylacji białek. Wstępne wyniki naszych badań wskazują na różnice w glikozylacji białek cytosolowych nowotworów złośliwych w porównaniu z gruczolakami i patologicznymi zmianami tarczycy o charakterze nienowotworowym [32].

PODZIĘKOWANIE

Autorka składa serdeczne podziękowanie Panu mgr Janowi Gierakowi za komputerową edycję tego artykułu.

LITERATURA

- [1] ALSANEA O, CLARK OH. Familial thyroid cancer. *Curr Opin Oncol* 2001; **13**: 44–51.
- [2] AOGI K, KITAHARA K, BULEY I, TAHARA H, SUGINO T, TARIN D, GOODISON S. Telomerase activity in lesions of the thyroid: application to diagnosis of clinical samples including fine needle aspirates. *Clin Cancer Res* 1998; **4**: 1965–1970.
- [3] AOGI K, KITAHARA K, URQUIDI V, TARIN D, GOODISON S. Comparison of telomerase and CD44 expression as diagnostic tumor markers in lesions of the thyroid. *Clin Cancer Res* 1999; **5**: 2790–2797.
- [4] BACHELOT A, LOMBARDO F, BAUDIN E, BIDART J-M, SCHLUMBERGER M. Inheritable forms of medullary thyroid carcinoma. *Biochimie* 2002; **84**: 61–66.
- [5] BARONDES SH, COOPER DNW, GITT MA, LEFFLER H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem* 1994; **269**: 20807–20810.

- [6] BARTOLAZZI A, GASBARRI A, PAPOTTI M, BUSSOLATI G, LUCANTE T, KHAN A, INOHARA H, MARANDINO F, ORLANDI F, NARDI F, VECCHIONE A, TECCE R, LARSSON O. Application of an immunodiagnostic method for improving preoperative diagnosis of nodular thyroid lesions. *Lancet* 2001; **357**: 1644–1650.
- [7] BERNET VJ, ANDERSON J, VAISHNAV Y, SOLOMON B, ADAIR CF, SAJI M, BURMAN KD, BURCH HB, RINGEL MD. Determination of galectin-3 messenger ribonucleic acid overexpression in papillary thyroid cancer by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; **87**: 4792–4796.
- [8] BŁASIAK J. Telomeraza i rak. *Post Biochem* 1999; **45**: 228–238.
- [9] CALIFANO D, MONACO C, SANTELLI G, GIULIANO A, VERONESE ML, BERLINGIERI MT, DE FRANCISCIS V, BERGER N, TRAPASSO F, SANTORO M, VIGLIETTO G, FUSCO A. Thymosin beta-10 gene overexpression correlated with the highly malignant neoplastic phenotype of transformed thyroid cells in vivo and in vitro. *Cancer Res* 1998; **58**: 823–828.
- [10] CHENG AJ, LIN JD, CHANG T, WANG TC. Telomerase activity in benign and malignant human thyroid tissues. *Br J Cancer* 1998; **77**: 2177–2180.
- [11] CHIAPPETTA G, TALLINI G, DE BIASIO MC, MANFIOLETTI G, MARTINEZ-TELLO FJ, PENTIMALLI F, DE NIGRIS F, MASTRO A, BOTTI G, FEDELE M, BERGER N, SANTORO M, GIANCOTTI V, FUSCO A. Detection of high mobility group I HMGI(Y) protein in the diagnosis of thyroid tumors: HMGI(Y) expression represents a potential diagnostic indicator of carcinoma. *Cancer Res* 1998; **58**: 4193–4198.
- [12] CHIARIOTTI L, BERLINGIERI MT, BATTAGLIA C, BENVENUTO G, MARTELLI ML, SALVATORE P, CHIAPPETTA G, BRUNI CB, FUSCO A. Expression of galectin-1 in normal human thyroid gland and in differentiated and poorly differentiated thyroid tumors. *Int J Cancer* 1995; **64**: 171–175.
- [13] COLI A, BIGOTTI G, ZUCCHETTI F, NEGRO F, MASSI G. Galectin-3, a marker of well-differentiated thyroid carcinoma, is expressed in thyroid nodules with cytological atypia. *Histopathology* 2002; **40**: 80–87.
- [14] CVEJIC D, SAVIN S, GOLUBOVIC S, PAUNOVIC I, TATIC S, HAVELKA M. Galectin-3 and carcinoembryonic antigen expression in medullary thyroid carcinoma: possible relation to tumour progression. *Histopathology* 2000; **37**: 530–535.
- [15] DANGUY A, CAMBY I, KISS R. Galectins and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1572**: 285–293.
- [16] DRICKAMER K, TAYLOR ME. Biology of animal lectins. *Annu Rev Cell Biol* 1993; **9**: 237–264.
- [17] FAGGIANO A, TALBOT M, LACROIX L, BIDART JM, BAUDIN E, SCHLUMBERGER M, CAILLOU B. Differential expression of galectin-3 in medullary thyroid carcinoma and C-cell hyperplasia. *Clin Endocrinol* 2002; **57**: 813–819.
- [18] FEILCHENFELDT J, TOTSCH M, SHEU SY, ROBERT J, SPILIOPOULOS A, FRILLING A, SCHMID KW, MEIER CA. Expression of galectin-3 in normal and malignant thyroid tissue by quantitative PCR and immunohistochemistry. *Mod Pathol* 2003; **16**: 1117–1123.
- [19] FERNÁNDEZ PL, MERINO MJ, GÓMEZ M, CAMPO E, MEDINA T, CASTRONOVO V, SANJUÁN X, CARDESA A, LIU F-T, SOBEL ME. Galectin-3 and laminin expression in neoplastic and non-neoplastic thyroid tissue. *J Pathol* 1997; **181**: 80–86.
- [20] FRANZ MG. Medullary thyroid cancer. *Cancer Control J* 1997; **4**: 25–29.
- [21] GIMM O. Thyroid cancer. *Cancer Lett* 2001; **163**: 143–156.
- [22] HAUGEN BR, NAWAZ S, MARKHAM N, HASHIZUMI T, SHROYER AL, WERNES B, SHROYER KR. Telomerase activity in benign and malignant thyroid tumors. *Thyroid* 1997; **7**: 337–342.
- [23] HERRMANN ME, LIVOLSI VA, PASHA TL, ROBERTS SA, WOJCIK EM, BALOCH ZW. Immunohistochemical expression of galectin-3 in benign and malignant thyroid lesions. *Arch Pathol Lab Med* 2002; **126**: 710–713.
- [24] HUGHES RC. The galectin family of mammalian carbohydrate-binding molecules. *Biochem Soc Transact* 1997; **25**: 1194–1198.
- [25] HUGHES RC. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1473**: 172–185.
- [26] HUGHES RC. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie* 2001; **83**: 667–676.
- [27] INOHARA H, HONJO Y, YOSHII T, AKAHANI S, YOSHIDA J, HATTORI K, OKAMOTO S, SAWADA T, RAZ A, KUBO T. Expression of galectin-3 in fine-needle aspirates as a diagnostic marker differentiating benign from malignant thyroid neoplasms. *Cancer* 1999; **85**: 2475–2484.
- [28] JASTRZĘBSKA H. Rak tarczycy. [w] Zgłiszczyński S. (red.) Choroby tarczycy. Wrocław: Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, 1998: 187–199.

- [29] KASAI K, HIRABAYASHI J. Galectins: a family of animal lectins that decipher glycocodes. *J Biochem* 1996; **119**: 1–8.
- [30] KAWACHI K, MATSUSHITA Y, YONEZAWA S, NAKANO S, SHIRAO K, NATSUGOE S, SUEYOSHI K, AIKOU T, SATO E. Galectin-3 expression in various thyroid neoplasms and its possible role in metastasis formation. *Human Pathol* 2000; **31**: 428–433.
- [31] KIM SJ, RYU JW, CHOI DS. The expression of the high mobility group I(Y) mRNA in thyroid cancers: useful tool of differential diagnosis of thyroid nodules. *Korean J Intern Med* 2000; **15**: 71–75.
- [32] KRZEŚLAK A, POMORSKI L, GAJ Z, LIPIŃSKA A. Differences in glycosylation of intracellular proteins between benign and malignant thyroid neoplasms. *Cancer Lett* 2003; **196**: 101–107.
- [33] KUBIAK R. Tarczycza i przycarczycze. [w] Kordek R, Woźniak R, Biernat W. (red.) Nowotwory. Zarys patologii onkologicznej. Akademia Medyczna w Łodzi 2001: 301–315.
- [34] KUBICKI T. Biopsja aspiracyjna cienkoigłowa. [w] Zgliszczyński S. (red.) Choroby tarczycy. Wrocław: Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, 1998: 65–84.
- [35] LIU F-T, PATTERSON RJ, WANG JL. Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1572**: 263–273.
- [36] MARTINS L, MATSUO SE, EBINA KN, KULCSAR MAV, FRIGUGLIETTI CUM, KIMURA ET. Galectin-3 messenger ribonucleic acid and protein are expressed in benign thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; **87**: 4806–4810.
- [37] NOWAK M. Anatomia gruczołu tarczowego. [w] Zgliszczyński S. (red.) Choroby tarczycy. Wrocław: Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, 1998: 9–11.
- [38] ORLANDI F, SAGGIORATO E, PIVANO G, PULIGHEDDU B, TERMINE A, CAPPIA S, DE GIULI P, ANGELI A. Galectin-3 is a presurgical marker of human thyroid carcinoma. *Cancer Res* 1998; **58**: 3015–3020.
- [39] PERILLO NL, MARCUS ME, BAUM LG. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J Mol Med* 1998; **76**: 402–412.
- [40] RABINOVICH GA, BAUM LG, TINARI N, PAGANELLI R, NATOLI C, LIU F-T. IACOBELLI S. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol* 2002; **23**: 313–320.
- [41] RABINOVICH GA, RIERA CM, LANDA CA, SOTOMAYOR CE. Galectins: a key intersection between glycobiology and immunology. *Brazil J Med Biol Res* 1999; **32**: 383–393.
- [42] REEVES R. Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function. *Gene* 2001; **277**: 63–81.
- [43] REEVES R, BECKERBAUER L. HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. *Biochim Biophys Acta* 2001; **1519**: 13–29.
- [44] SAGGIORATO E, CAPPIA S, DE GIULI P, MUSSA A, PANCANI G, CARACI P, ANGELI A, ORLANDI F. Galectin-3 as a presurgical immunocytodiagnostic marker of minimally invasive follicular thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86**: 5152–5158.
- [45] SANTELLI G, CALIFANO D, CHIAPPETTA G, VENTO MT, BARTOLI PC, ZULLO F, TRAPASSO F, VIGLIETTO G, FUSCO A. Thymosin beta-10 gene overexpression is a general event in human carcinogenesis. *Am J Pathol* 1999; **155**: 799–804.
- [46] SCALA S, PORTELLA G, FEDELE M, CHIAPPETTA G, FUSCO A. Adenovirus-mediated suppression of HMGI(Y) protein synthesis as potential therapy of human malignant neoplasias. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 4256–4261.
- [47] SPORNY S. Cytodiagnostyka chorób tarczycy. Łódź: Studio Graficzne Sobiepański-Trocha S.C. 1999; 97–138, 147–174.
- [48] STĘPIEŃ HI, HAREZGA B. Nowotwory gruczołów wydzielania wewnętrznego. [w] Berner J, Liberski PP, Plużańska AI, Woźniak L. (red.) Zarys onkologii. Akademia Medyczna w Łodzi 1998; CCXXXI cz. II: 238–268.
- [49] TAKANO T, HASEGAWA Y, MIYAUCHI A, MATSUZUKA F, YOSHIDA H, KUMA K, AMINO N. Quantitative analysis of thymosin beta-10 messenger RNA in thyroid carcinomas. *Jpn J Clin Oncol* 2002; **32**: 229–232.
- [50] TAKENAKA Y, INOHARA H, YOSHII T, OSHIMA K, NAKAHARA S, AKAHANI S, HONJO Y,

- YAMAMOTO Y, RAZ A, KUBO T. Malignant transformation of thyroid follicular cells by galectin-3. *Cancer Lett* 2003; **195**: 111–119.
- [51] WADA J, MAKINO H. Galectins, galactoside-binding mammalian lectins: clinical application of multifunctional proteins. *Acta Med Okayama* 2001; **55**: 11–17.
- [52] WISNIEWSKI J, SCHWANBECK R. High mobility group I/Y: Multifunctional chromosomal proteins casually involved in tumor progression and malignant transformation. *Int J Mol Med* 2000; **6**: 409–419.
- [53] XU X-C, EL-NAGGAR AK, LOTAN R. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. *Am J Pathol* 1995; **147**: 815–822.
- [54] YOSHII T, INOHARA H, TAKENAKA Y, HONJO Y, AKAHANI S, NOMURA T, RAZ A, KUBO T. Galectin-3 maintains the transformed phenotype of thyroid papillary carcinoma cells. *Int J Oncol* 2001; **18**: 787–792.
- [55] YU FX, LIN SC, MORRISON-BOGORAD M, ATKINSON MA, YIN HL. Thymosin beta 10 and thymosin beta 4 are both actin monomer sequestering proteins. *J Biol Chem* 1993; **268**: 502–509.

Anna Lipińska,
Katedra Cytobiochemii, Uniwersytet Łódzki,
S. Banacha 12/16, 90-237 Łódź,
e-mail: annal@biol.uni.lodz.pl

ROLA CYNKU W MODULACJI PROCESU APOPTOZY

ROLE OF ZINC IN THE MODULATION OF APOPTOSIS

Zofia M. KILIAŃSKA

Zakład Biochemii Medycznej Katedry Cytobiochemii Uniwersytetu Łódzkiego

Streszczenie: Artykuł przedstawia aktualny stan wiedzy dotyczący cynku jako modulatora apoptozy. Ten ważny pierwiastek śladowy w formie dwuwartościowego kationu wykazuje wpływ zarówno jako inhibitor, jak i induktor procesu apoptozy. Udział jonów Zn^{2+} w regulacji śmierci programowanej nie jest wciąż w pełni poznany. Sugeruje się, że jony Zn^{2+} mogą oddziaływać w wielu miejscach komórki w kaskadowej sygnalizacji podczas apoptozy. Suplementacja cynku działa jako inhibitor apoptozy, podczas gdy jego usuwanie czy niski poziom indukuje śmierć programowaną w wielu komórkach. Na poziomie biochemicznym jony Zn^{2+} uczestniczą w supresji/aktywacji endonukleaz(y), które(a) dokonują apoptotycznej fragmentacji DNA, a także wpływają na aktywację kaspaz. W niektórych typach komórek cynk może stanowić włącznik apoptotycznych zdarzeń związanych z załamaniem transmembranowego potencjału mitochondriów z następczym uwalnianiem reaktywnych form tlenu.

Słowa kluczowe: apoptoza, cynk, endonukleazy, fragmentacja DNA, kaspazy, proteoliza, potencjał transbłonowy mitochondrium, ROS.

Summary: The review describes the current knowledge on zinc as modulator of apoptosis. This important trace element in divalent cation form has abilities both to inhibit and induce of apoptosis process. The commitment of Zn^{2+} to the regulation of programmed cell death still is not fully understood. It is suggested that Zn^{2+} may have multiple intracellular targets in the apoptotic signaling cascade. Zinc supplementation acts as an inhibitor of programmed cell death in many cells. At biochemical level zinc ions are involved in suppression/activation of endonuclease(s) which cause(s) apoptotic DNA fragmentation and also influenced on caspase activation. In some cell types zinc works as a possible trigger for apoptotic events associated with the breakdown of mitochondrial membrane potential with a subsequent release of reactive oxygen species.

Key words: apoptosis, zinc, endonucleases, DNA fragmentation, caspases, proteolysis, mitochondrial membrane potential, ROS.

1. WSTĘP

Liczne prace dotyczące przebiegu apoptozy wskazują na dwie główne tarcze docelowe w jej inicjacji, tj. receptory śmierci usytuowane w błonach komórkowych oraz mitochondria stanowiące jednocześnie podstawę do wyróżnienia odpowiednio szlaku receptorowego (zewnętrznego) i mitochondrialnego (wewnętrznego) [40, 41, 56, 62]. Przedstawiając w dużym uproszczeniu, szlak receptorowy zainicjowany pobudzeniem receptora śmierci (DR – ang. *death receptor*) przez sygnał – ligand (np. TNF, Fas-L, TRAIL) jest następnie przenoszony na białko/a adaptorowe, które wiąże się z kaspazą inicjującą (-8, -10 czy -2) formując tzw. kompleks DISC (ang. *death-inducing signaling complex*). W tym kompleksie cząsteczki kaspazy-8/10, -2 ulegają autokatalitycznej przemianie, w wyniku której tworzy się aktywna postać enzymu w formie tetrameru, zdolna do aktywacji tzw. kaspaz wykonawczych, np. prokaspazy-3. Na szlaku opisywanym jako wewnętrzny w przenoszeniu sygnału śmierci uczestniczą mitochondria, w których zmiany inicjowane, np. uszkodzeniami DNA, reaktywnymi formami tlenu, zaburzeniem homeostazy jonów Ca^{2+} doprowadzają do zmian strukturalnych i wypływu z nich proapoptotycznych cząsteczek, przede wszystkim cytochromu *c* (Apaf-2; ang. *apoptosis protease activating factor-2*). Uwolniony do cytoplazmy cytochrom *c* aktywuje białko Apaf-1 (ang. *apoptosis protease activating factor-1*) do utworzenia oligomerycznego kompleksu (m.c. ~700 kDa), zwanego apoptosomem, którego uformowanie wymaga nakładu energii (ATP/dATP). Z apoptosomem, dzięki oddziaływaniom białko-białko, wiąże się inicjująca ten szlak prokaspaza-9. Jej aktywacja rozpoczyna proteolityczną aktywację kaspaz wykonawczych (np. -3, -6 czy -7). Zatem w obydwu głównych szlakach apoptotycznych dochodzi do aktywacji kaspaz wykonawczych, które mogą bezpośrednio atakować, m.in. białka strukturalne (np. białka cyto- lub nukleoszkieletu), inne enzymy (np. endonukleazę DFF; ang. *DNA fragmentation factor*) czy białka związane z transdukcją sygnałów [41, 42]. Efektywna proteoliza prowadząca do załamania strukturalnej integralności komórki i jej śmierci przebiega ponadto dzięki tzw. kaskadzie kaspaz, której towarzyszy proteolityczna aktywność kalpajny, enzymów lizosomalnych oraz nukleoliza materiału genetycznego [41].

Proces śmierci komórek w całej swojej złożoności jest precyzyjnie regulowany przez białka rodziny Bcl-2, białka IAP (ang. *inhibitory apoptosis proteins*), inhibitory białek IAP, czy białko p53. Szersze opracowanie tego zagadnienia przedstawiono w kilku przeglądowych opracowaniach w języku polskim [7, 34, 42, 56].

Schematyczne przedstawienie głównych szlaków apoptozy i białek ważnych w przekazie sygnału śmierci w komórkach pozwolą Czytelnikowi na pełniejsze zrozumienie roli cynku jako modulatora tego procesu. Pierwszych dowodów dotyczących udziału cynku w regulacji apoptozy dostarczyła M.E. Elmes, która w 1977 roku zwróciła uwagę na wysoki poziom komórek apoptotycznych w kryptach jelita cienkiego szczurów pozostających na diecie ubogocynkowej [22]. Badaczka upatrywała przyczyn tak aktywnej apoptozy w zaburzeniu biosyntezy DNA. Zwiększoną częstość komórek apoptotycznych odnotowano w innych tkankach zwierząt dorosłych, karmionych niskocynkową dietą, a także w nabłonku układu nerwowego płodów szczurzych

rodzonych przez matki odżywiane tą dietą [22, 27, 28, 91]. Wstępne obserwacje wskazują, że podwyższony poziom apoptozy leukocytów krwi obwodowej pacjentów z zespołem Downa [3], a także zaburzenia skórno-jelitowe oraz zanik limfocytów T w zespole *acrodermatitis enteropathica* [72] są wynikiem niedoboru cynku. Wzmocniona apoptoza *in vivo* i *in vitro* wydaje się być wynikiem spadku wewnątrzkomórkowego poziomu cynku w komórkach, które „weszły” na szlak śmierci [10, 27, 28, 78, 82]. Wyniki licznych badań wskazują, że obniżony poziom tego pierwiastka uwrażliwia komórki na inne induktory apoptozy [1, 12, 53, 69, 92]. Z kolei suplementacja cynku prowadząca do wzrostu jego wewnątrzkomórkowego stężenia w wielu typach komórek stanowi czynnik ochraniający komórki przed apoptozą [15, 48, 65, 83, 87, 88].

2. HOMEOSTAZA CYNKU; SUBKOMÓRKOWA LOKALIZACJA

Wśród funkcji przypisywanych temu pierwiastkowi wymienia się udział w syntezie DNA i ekspresji genów, indukcji biosyntezy białek szoku cieplnego, katalizie enzymatycznej, regulacji metabolizmu węglowodanów, magazynowaniu i uwalnianiu hormonów, neurotransmisji, zapłodnieniu, procesach widzenia i pamięci [8, 10, 44, 49, 84]; jest niezbędny dla prawidłowego funkcjonowania układu odpornościowego [29, 30, 38]. Niedobór cynku osłabia aktywność wszystkich rodzajów komórek układu immunologicznego, m.in. ogranicza funkcje monocytów, zmniejsza aktywność cytotoksyczną komórek NK (ang. *natural killer*), osłabia zdolności fagocytarne obojętnochłonnych granulocytów. Niedobór tego metalu ogranicza prawidłową aktywność limfocytów linii T, ale zwiększa ich auto- i alloreaktywność. Z kolei limfocyty B w warunkach deficytu cynku ulegają apoptozie. Uzupelnienie niedoboru tego pierwiastka może skutecznie odwrócić te efekty. Natomiast zbyt wysoki poziom cynku okazuje niekorzystne działanie na komórki układu odpornościowego przypominające jego niedobór [38].

Wykazano aktywność antyoksydacyjną tego pierwiastka związaną z ograniczeniem generowania reaktywnych form tlenu, hamowaniem syntazy tlenu azotu [13, 18, 82]. Wykazuje on właściwości protekcyjne w stosunku do białek i kwasów nukleinowych, stabilizuje cytoszkielet i błony komórkowe [61, 84]. Cynk jest niezbędny dla przebiegu proliferacji i różnicowania [6]. Jego znaczenie dla prawidłowego wzrostu i proliferacji potwierdziły obserwacje opóźnienia wzrostu organizmów karmionych dietą bezcynkową lub z ograniczoną jego zawartością [6, 84]. Z kolei podwyższone stężenie cynku w układzie nerwowym może działać toksycznie, promując neurodegenerację i prawdopodobnie rozwój choroby Alzheimera, m.in. przez uszkodzenia oksydacyjne neuronów [14, 37, 43]. Wewnątrzkomórkowe stężenie tego pierwiastka wydaje się być istotnym czynnikiem decydującym o losie komórek, tj. proliferacji, różnicowaniu czy śmierci [13, 25, 39, 78]. W materiale biologicznym cynk występuje w formie stabilnego kationu Zn^{2+} nie ulegającego zmianom redox. Jony Zn^{2+} nie mogą przechodzić przez błony

komórkowe drogą prostej dyfuzji. Aktualnie akceptuje się pogląd, że w pobieraniu Zn^{2+} przez komórki ssaków uczestniczą białka transportujące z rodziny ZIP (ang. *Zrt/Itr-like proteins*), charakteryzujące się występowaniem w ich strukturze 8 transbłonowych domen. Z kolei w wewnątrzkomórkowym przemieszczaniu się jonów Zn^{2+} oraz ich eksporcie poza cytoplazmę opisano kilka białek ZnT (ang. *Zinc transporter /1-7/*), wśród których dla siedmiu poznano szcze-góły struktury pierwszorzędowej [13, 57, por. 82].

W komórkach ssaków współistnieją dwie pule cynku, tj. 1° konserwatywna, w której ten metal jest silnie związany w białkach (ponad 300 enzymów oraz w licznych czynnikach transkrypcyjnych zawierających motywy tzw. palców cynkowych) i 2° labilna, bardziej dynamiczna, w której pierwiastek ten jest luźno związany z białkami, lipidami lub pozostaje zamknięty w cytoplazmatycznych pęcherzykach – „cynkosomach” (ang. *zincosomes*). To właśnie ta ostatnia pula cynku pełni istotną rolę w cytoprotekcji, tkankowo- i komórko-wo-specyficznej transmisji sygnałów, w modulowaniu apoptozy [10, 79, 80, 82]. Niedobory cynku szybko odbijają się w spadku labilnej puli, podczas gdy jego poziom w puli konserwatywnej związanej w białkach zwykle pozostaje bez zmian [10].

Jak dotąd wciąż słabo poznana jest wewnątrzkomórkowa dystrybucja tego ważnego pierwiastka. Ocenia się, że 30–40% cynku występuje w jądrach komórkowych, 50% w cytosolu bądź w organellach komórkowych, natomiast reszta wiąże się z błonami [6, 84]. Główne białko wiążące jony Zn^{2+} w komórkach ssaków to metalotioneina, zbudowana z 60 aminokwasów, wśród których 25–30% stanowią cząsteczki cysteiny [16, 84]. Białko to może udostępniać Zn^{2+} enzymom czy czynnikom transkrypcyjnym, natomiast jako tioneina przyjmuje te jony z innych białek o względnie wysokim do nich powinowactwie [16, 26].

Wewnątrzkomórkowa homeostaza cynku w komórkach eukariotycznych jest sprawnie kontrolowana dzięki specyficznym białkom zaangażowanym w jego pobieranie, zamykanie w „cynkosomach”, jądrowo-cytoplazmatyczny przepływ oraz usuwanie [6, 10, 13].

Spośród różnych technik pozwalających określić dystrybucję luźno związanej puli Zn^{2+} na uwagę zasługuje opracowana w laboratorium P. Zalewskiego sonda fluorescencyjna – cynkina (ang. *Zinquin*) [92, 93]. W licznych liniach komórkowych znacznik ten wykazuje specyficzną fluorescencję lokalizującą Zn^{2+} głównie w cytosolu oraz w „cynkosomach”, podczas gdy jądra komórkowe pozostają praktycznie pozbawione fluorescencji [6]. Uważa się, że jony Zn^{2+} regulują aktywność niektórych białek, które po związaniu z nimi ulegają translokacji z cytosolu do błony komórkowej czy cytoszkieletu, jak to ma miejsce w przypadku kinazy białkowej bądź czynnika transkrypcyjnego MTF1 (ang. *metal response element binding transcription factor 1*) [17, 71, 90].

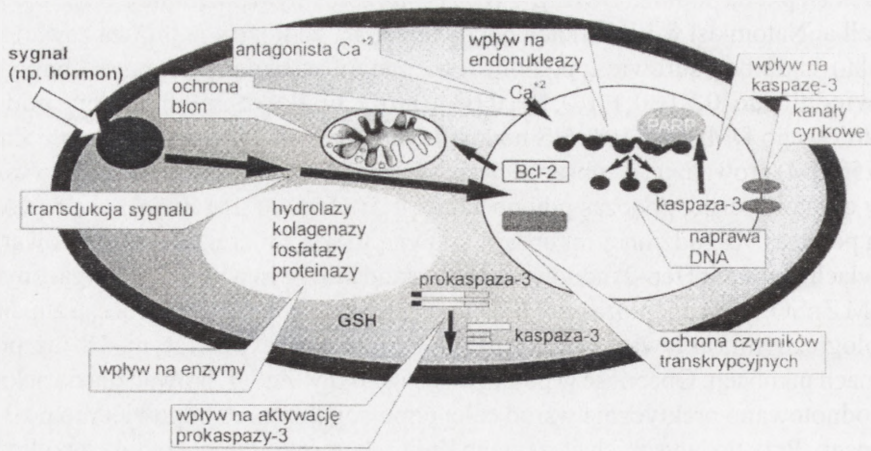
W 2003 roku Rudolf i wsp. [67] opublikowali wyniki doświadczeń dotyczące wewnątrzkomórkowego poziomu cynku w ludzkich komórkach krtani Hep-2 (linia wyprowadzona z raka krtani), hodowanych na podłożu o różnej zawartości surowicy wołu (ang. *bovine serum*; BS). W hodowlach tych komórek stosowano podłoże Dulbecco (ang. *Dulbecco's modified Eagle's medium*; DMEM) wzbogacone w 10, 5 i 1% BS oraz bez BS, zawierające odpowiednio $2,10 \pm 0,04$; $1,08 \pm 0,10$; $0,65 \pm 0,08$ i $0,29 \pm 0,02$ μM cynku/mg białka. Wewnątrzkomórkowe stężenie cynku, określone

metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej, utrzymywało się w ciągu 10 dni hodowli komórek Hep-2 na podłożu DMEM – 10% BS na zbliżonym poziomie – $0,88 \pm 0,09 \mu\text{g}/\text{mg}$ białka. Natomiast w komórkach hodowanych na podłożu z najniższą zawartością BS (1%) bądź bez surowicy, poziom tego metalu w badanym czasie obniżył się odpowiednio do $0,21 \pm 0,1$ i $0,18 \pm 0,08 \mu\text{g}/\text{mg}$ białka. Suplementacja podłoża standardowego DMEM – 10% BS hodowli tych komórek w rosnące stężenie ZnSO_4 ($1,5$ – $750 \mu\text{M}$) prowadziła do obserwacji, że stężenie tej soli powyżej $100 \mu\text{M}$ wywołuje efekty cytotoksyczne, podczas gdy obecność $1,5$; 15 i $100 \mu\text{M}$ ZnSO_4 nie powoduje zmian podczas 96-godzinnej inkubacji. Główną formą śmierci, którą odnotowano w hodowlach komórek Hep-2, hodowanych na standardowym podłożu wzbogaconym w $150 \mu\text{M}$ ZnSO_4 , była apoptoza udokumentowana typowymi dla tego procesu zmianami morfologicznymi, aktywacją prokaspazy-3, proteolizą cytokeratyny-18 już po 36 godzinach inkubacji. Obecność w podłożu 300 i $750 \mu\text{M}$ ZnSO_4 prowadziła do nekrozy, którą odnotowano praktycznie wśród całej populacji komórek odpowiednio po 24 i 2 godzinach. Przy tak wysokich stężeniach ZnSO_4 komórki traciły kontakt z podłożem, tworzyły liczne uwypuklenia, dochodziło w nich do załamania cytoszkieletu, chaotycznej fragmentacji oraz uwalniania ich zawartości do środowiska. Na podkreślenie zasługuje obserwacja, że obecność $1,5 \mu\text{M}$ ZnSO_4 w podłożu w nieznacznym stopniu wpływała na zwiększoną aktywność proliferacyjną komórek Hep-2. Wyniki przedstawionych badań [67] podkreślają znaczenie określenia wewnątrzkomórkowego stężenia cynku przy podejmowaniu analizy efektów tego pierwiastka na los komórek.

3. CYNK – MODULATOR APOPTOZY

Poznanie szczegółów szlaków apoptotycznych w wielu modelach komórkowych równoległe z rozwojem metod detekcji zdarzeń apoptotycznych pozwoliło powiązać działanie cynku z różnymi przedziałami w umierających komórkach, a także z jego wpływem na różne etapy przepływu sygnałów śmierci (ryc. 1). Na podstawie szeroko zakrojonych badań nad rolą jonów Zn^{2+} w przebiegu programowanej śmierci komórek akceptuje się pogląd, że pierwiastek ten odgrywa podwójną rolę w tym procesie. Okazało się, że zmniejszenie stężenia bądź usuwanie ze środowiska hodowlanego komórek Zn^{2+} , m.in. przez kompleksowanie za pomocą chelatorów przenikających np. TPEN [*N,N,N',N'*-tetrakis(2-pirydylometylo)-etylenodiamina] prowadzi do spadku ich wewnątrzkomórkowego poziomu i do apoptozy [10, 35, 45, 53, 67]. Niektórzy badacze zwracają uwagę, że jony Zn^{2+} mogą funkcjonować samodzielnie jako induktory apoptozy bądź modulować efekty innych czynników indukujących apoptozę, np. maślan sodu, kolchicyna, ditiokarbaminian piroolidyny, rycyna [10, 21, 24, 29, 74, 75]. Z kolei opublikowano liczne doniesienia dokumentujące, że suplementacja soli cynku ochrania wiele typów komórek przed śmiercią [2, 4, 13, 25, 30, 31, 65].

Początkowo główne docelowe miejsca działania tego metalu wiązano z blokowaniem aktywności endonukleaz, a zatem z późniejszym etapem śmierci komórek [2, 15, 31, 83]. Komórki ulegające apoptozie wykazują odmienne cechy morfologiczne, w tym



RYCINA 1. Główne miejsca modulacji przez cynk sygnalizacji apoptotycznej w komórce (opracowano na podstawie [25], zmodyfikowano)

kondensację chromatyny i jej marginalizację oraz fragmentację jąder, która stanowi wynik enzymatycznej degradacji. Na poziomie biochemicznym najważniejsze zmiany dotyczą fragmentacji DNA, która przebiega w dwóch etapach [66]. W pierwszej kolejności pojawiają się odcinki o wysokiej m.cz. – 200–300 i 20–50 kpz – HMW DNA (ang. *high mol-ecular weight* DNA). W dalszym etapie dochodzi do postępującej degradacji DNA, co w większości komórek apoptotycznych dostarcza fragmentów DNA oligo- i nukleosomowych – LMW DNA (ang. *low molecular weight* DNA). Produkty tej fragmentacji można zademonstrować podczas ich elektroforezy w żelu agarozowym jako tzw. drabinkę apoptotyczną (ang. *apoptotic ladder*), której szczeble odpowiadają około 200 pz i ich wielokrotności [41, 86]. Degradacja DNA podczas apoptozy angażuje wiele aktywności enzymatycznych, a jego fragmentacja doprowadzająca do odcinków nukleosomowych i ich wielokrotności przebiega głównie z udziałem endonukleazy DFF/CAD (ang. *DNA fragmentation factor/ caspase activated deoxyribonuclease*) [23, 50]. Enzym ten występuje w formie heterodimeru z inhibitorem – DFF45/ICAD, którego usunięcia dokonuje kaspaza-3 lub białko AIF (ang. *apoptosis-inducing factor*) [51, 62]. Obecnie akceptuje się, że rodzaj i siła bodźca apoptotycznego oraz typ komórek może warunkować odmienny obraz fragmentacji DNA [52].

3.1. Cynk – inhibitor apoptozy

Na antyapoptotyczne właściwości cynku jako pierwsi zwrócili uwagę w latach osiemdziesiątych ubiegłego wieku Cohen i Duke [15], którzy obserwowali w obecności tego pierwiastka ograniczoną degradację DNA wśród tymocytów myszy indukowanych do

apoptozy deksametazonem. Liczne późniejsze doniesienia wykazały, że w wielu typach komórek indukowanych do apoptozy przez różne czynniki, m.in. hormony, antybiotyki, H_2O_2 , donory NO, etopozyd, geranylogeraniol, rycynę, promieniowanie UVA, UVB, wysokie stężenia soli cynku (500–5000 μM) ochraniają komórki przed śmiercią apoptotyczną [2, 15, 25, 47, 70, 74].

3.1.1. Wpływ cynku na aktywność endonukleaz

W laboratorium Faviera [25] wykazano, że suplementacja soli cynku w hodowlach keratynocytów eksponowanych na promieniowanie UVB czy fibroblastów poddanych działaniu UVA efektywnie zmniejsza fragmentację DNA, a także zmniejsza liczbę podwójnych pęknięć w DNA, peroksydację lipidów oraz odsetek komórek ulegających apoptozie. W innym modelu, tj. w komórkach białaczki promielocytowej HL-60, w których apoptozę indukowano inhibitorem topoizomerazy II – etopozydem (10 $\mu g/ml$; 3 godz.) obecność równocześnie wprowadzonego $ZnSO_4$ (1 mM) przyczyniała się do hamowania apoptotycznej fragmentacji DNA, a także ograniczenia zmian morfologicznych typowych dla śmierci programowanej [70]. Na podkreślenie zasługuje obserwacja, że wprowadzenie soli cynku do hodowli komórek białaczkowych w 2 godziny po zainicjowaniu apoptozy przez etopozyd, nie chroniło komórek przed rozległą fragmentacją materiału genetycznego. Z kolei Aiuchi i wsp. [2] badali wpływ $ZnCl_2$ na komórki HL-60, w których apoptozę indukowano geranylogeraniolem (GGO; 50 μM). Ekspozycja komórek tej linii na GGO w ciągu 3 godzin prowadziła do rozległej (85%) fragmentacji DNA. Okazało się, że wprowadzenie soli cynkowej (0,2–0,9 mM) 1 godzinę przed induktorem apoptozy, w znacznym stopniu ograniczało aktywność endo-nukleazową oraz zmiany morfologiczne typowe dla apoptozy (kondensacja chromatyny, dezintegracja jąder komórkowych). Wielu badaczy tłumaczy inhibitorowe efekty Zn^{2+} na fragmentację DNA w komórkach realizujących program śmierci ograniczeniem aktywności głównie Ca^{2+}/Mg^{2+} – zależnych endonukleaz [2, 13, 15, 29, 32, 83]. Wydaje się jednak, że nie jest to główny mechanizm ochrony komórek przed apoptozą przez ten pierwiastek. Wyniki badań grupy Eastmana [54, 87] ujawniły, że sole cynku hamują apoptozę w komórkach nie zawierających (bądź wykazujących niewielką aktywność) Ca^{2+}/Mg^{2+} – zależnej endonukleazy. Działanie tego metalu wydaje się uczestniczyć w ograniczeniu spadku pH, które jest zjawiskiem towarzyszącym apoptozie [54]. Sole cynku nie okazują hamowania aktywności DNazy II w komórkach apoptotycznych [5].

3.1.2. Wpływ cynku na aktywność kaspaz

Rozwój technik detekcji sekwencji zdarzeń w transdukcji sygnału śmierci przyczynił się do wykazania, że sole cynku mogą oddziaływać na wcześniejsze etapy apoptozy niż fragmentacja DNA, do których należy modulacja aktywności proteaz cysteinowych, głównie kaspazy-3 [2, 12, 47, 65, 87]. To właśnie kaspaza-3 jest jednym z ważniejszych enzymów w przebiegu apoptozy u ssaków, pełniącym funkcję zbliżoną do produktu genu *CED-3* u nicienia *C.elegans* [89]. Białko to wykazuje wiele homologii z wykrytym nieco wcześniej enzymem ICE-1 β (ang. *interleukin-1 β converting enzyme*) dokonującym przekształcenia prekursorowej formy interleukiny-1 β w aktywne białko uczestniczące

w reakcjach zapalnych [77]. Kluczowym wydarzeniem w badaniach apoptozy było wykrycie, że specyficzne inhibitory prototypu proteazy ICE-1 β /CED-3 hamują zarówno proteolizę polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP), jak i fragmentację DNA, potwierdzając w ten sposób, że aktywacja endonukleaz(y) jest zdarzeniem następującym po aktywacji tego enzymu [60, 76]. Stąd obserwacje, że jony Zn²⁺ w pewnym zakresie stężeń hamują aktywację enzymu rodziny ICE – kaspazy-3/PPP-32 odnotowano jako istotne odkrycie [55, 65, 87].

Laboratorium Eastmana [87, 88] jako jedno z pierwszych dostarczyło eksperymentalnych dowodów, że Zn²⁺ wpływają na wcześniejsze niż fragmentacja DNA etapy apoptozy. Wykorzystując jako model doświadczalny ludzkie komórki białaczki ML-1, indukowane do śmierci epozydem (20 μ g/ml; 30 min) wykazano, że obecność ZnSO₄ (0–1 mM) ochrania je przed apoptozą. Stężenie soli cynku powyżej 0,1 mM zapobiega typowym wydarzeniom apoptotycznym, jak kondensacja chromatyny, proteoliza PARP, a także aktywacja kaspazy-3/PPP-32 [87]. Enzym naprawy DNA – PARP (m.c. 116/113 kDa) jest podczas apoptozy substratem głównie dla kaspazy-3 i -7. Jego proteoliza, uchodząca za znacznik apoptozy, dostarcza produktów o m.c. 85/89 kDa i 29/27 kDa. Aktywację kaspazy-3 podczas apoptozy zwykle wykrywa się poprzez immunodetekcję podjednostek – większej (α) o m.c. 17 kDa i/lub mniejszej (β) o m.c. 12 kDa [2]. Podczas przekazu sygnału śmierci aktywacja kaspazy-3 (czy innych kaspaz) doprowadza do utworzenia formy dojrzałej, która stanowi heterotetramer – $\alpha_2\beta_2$ (por. [41]). W komórkach M-1 ulegających apoptozie pod wpływem etopozydu, obecność ZnSO₄ (powyżej 0,1 mM) hamuje ponadto defosforylację białka Rb (produkt antyjonkogenu *Rb*). Wydaje się, że cynk może modulować aktywność fosfatazy/kinazy odpowiedzialnej za stan ufosforylowania białka Rb, głównego regulatora cyklu komórkowego [87]. Doświadczenia Wolfa i Eastmana [88] wykazały, że ZnSO₄ (3 mM) okazuje zdolność hamowania transdukcji sygnału śmierci w komórkach białaczki HL-60 i limfocytach T Jurkat, indukowanych do apoptozy odpowiednio staurosporyną (1 μ M; 4 godz.) i przeciwciałami antyFas (200 ng/ml; 5 godz.). To inhibitorowe działanie jonów Zn²⁺ dotyczy etapu przepływu sygnału śmierci po uwolnieniu cytochromu *c*, ale przed aktywacją kaspaz wykonawczych. Sól cynku o stężeniu 1 mM znacznie ogranicza, a przy 3 mM w pełni hamuje fragmentację DNA i proteolizę PARP. Istotna wydaje się obserwacja, że te stężenia ZnSO₄ nie zapobiegają wypływowi cytochromu *c* z mitochondriów – wydarzenia, które jest uznawane za wczesny znacznik apoptozy na szlaku mitochondrialnym.

Jony Zn²⁺ reprezentują efektywny inhibitor proteolizy PARP w komórkach białaczki Molt4, po ich preinkubacji z ZnCl₂ (100–300 μ M; 1 godz.), po której apoptozę indukowano etopozydem (20 μ M; 6 godz.) [65]. Akceptuje się opinię, że jony te są niezbędne do wiązania polimerazy PARP do uszkodzonego DNA. Wykorzystując ekstrakt z apoptotycznych komórek białczkowych wykazano, że zarówno ZnSO₄/ZnCl₂, jak i CuSO₄/CuCl₂ (10 μ M) powodują inhibicję proteolizy PARP, podczas gdy chlorki baru, manganu, wapnia czy żelaza w tym stężeniu takiego efektu nie wywołują. W układzie bezkomórkowym jony Zn²⁺ i Cu²⁺ silnie hamują proteolityczną degradację

PARP, indukowaną zarówno przez ekstrakt komórkowy zawierający kaspazę-3, jak i przez rekombinant tego enzymu [65].

W badaniach laboratorium Nakaya [2, 59] do indukcji apoptozy komórek białaczki promielocytowej HL-60 [2] oraz chłoniaka U937 [59] wykorzystano GGO (50 μM ; 3–4 godz.), po ich preinkubacji z ZnCl_2 (0–1 mM). Stężenie soli cynku – 0,2 mM (i wyższe) ogranicza znacznie fragmentację DNA, proteolizę PARP, wpływ cytochromu *c* z mitochondriów oraz aktywację kaspazy-3. Dodanie cytochromu *c* i dATP do frakcji cytosolowej komórek HL-60, w których indukowano apoptozę GGO, okazało się prostym rozwiązaniem pozwalającym wykazać aktywację kaspazy-3, która uprzednio jest proteolitycznie aktywowana przez kaspazę-9, inicjującą szlak mitochondrialny. Technika immunodetekcji formy prekursorowej kaspazy-3 (m.cz. 32 kDa) i jej podjednostek (m.cz. 17 bądź 12 kDa) służy do eksperymentalnego potwierdzenia aktywności tego enzymu. Aiuchi i wsp. [2] udowodnili, że wprowadzenie do opisanego wyżej układu ZnCl_2 (0,2 mM) hamuje aktywację kaspazy-3 w obecności cytochromu *c* i dATP, zatem pozwala przypuszczać, że jony Zn^{2+} mogą również ograniczać aktywność i/albo aktywację kaspazy-9. Ponadto wykazano, że inhibitory kaspaz (Z-Asp- CH_2 -DCB, Z-VAD-FMK; 50 μM) nie hamują uwalniania cytochromu *c* z przedziału międzybłonowego mitochondriów, natomiast ZnCl_2 (0,9 mM) i chelator jonów Ca^{2+} – BAPTA-AM (ang. *1,2-bis(2-O-aminophenoxy)ethane-N,N',N',N'-tetraacetic acid tetraacetoxymethyl ester*) blokują wpływ tego białka, kluczowego w powstawaniu apoptosomu [59]. Ochrona komórek przed śmiercią programowaną w obecności soli cynku zależy od stężenia tego pierwiastka, czynnika indukującego śmierć, a także od ich typu.

Indukcja apoptozy w komórkach białaczki ML-1 i limfocytach T Jurkat przez anisomycynę (10 $\mu\text{g/ml}$; 2 godz.) prowadziła do znacznych zmian, m.in. morfologicznych, fragmentacji DNA, cięcia proteolitycznego białka D4GDI (ang. *RhoDH guanine nucleotide dissociating inhibitor*; m.cz. 26 kDa) do produktu o m.cz. 22 kDa, aktywacji prokaspazy-3 i -8 oraz komórkowo-specyficznej aktywacji białek rodziny Bcl-2 [33]. Dodanie do traktowanych anisomycyną hodowli ZnSO_4 (0–10 mM – komórki ML-1; 0–1 mM – limfocyty T) prowadziło do odmiennych efektów zależnie od stężenia soli. Okazało się, że 0,1–0,3 mM ZnSO_4 hamuje translokację białka Bax i kolejne etapy apoptozy. W zainicjowanych do śmierci komórkach ML-1 obecność 0,2 mM ZnSO_4 powodowała hamowanie aktywacji kaspazy-3 i -8, ograniczenie formowania oligomerów przez białka Bax i Bak, brak proteolizy polipeptydu D4DGI, a także inhibicję fragmentacji DNA, natomiast nie odnotowano przemieszczania cytochromu *c* z mitochondriów do cytosolu. W hodowli limfocytów T, eksponowanych na działanie anisomycyny i ZnSO_4 , obserwowano podobne efekty z wyjątkiem zdarzeń dotyczących Bax, gdyż białko to nie ulega ekspresji w tych komórkach. W limfocytach T łatwo ulegających apoptozie na szlaku receptorowym, np. w wyniku indukcji przeciwciałami antyFas (200 ng/ml; 5 godz.), dopiero 10-krotnie wyższe stężenie ZnSO_4 (3 mM) w porównaniu z indukcją tych komórek przez anisomycynę (0,3 mM), powoduje hamowanie fragmentacji DNA czy proteolizy białka D4GDI. Hamowanie przez jony Zn^{2+} degradacji proteolitycznej D4DGI stanowi pośredni dowód blokowania aktywności

kaspazy-3. Stężenie 3 mM ZnSO_4 hamuje proteolizę prokaspazy-8, potwierdzoną detekcją wyłącznie prekursora tego enzymu w cytosolu. Uzyskane wyniki sugerują, że jony Zn^{2+} w komórkach ulegających apoptozie na szlaku receptorowym mogą zapobiegać uwalnianiu kaspazy-8 z kompleksu DISC. Na uwagę zasługuje obserwacja, że ZnSO_4 w szerokim zakresie stężeń (0,1–10 mM) nie hamuje oligomeryzacji białka Bak oraz nie blokuje wypływu cytochromu *c* z mitochondriów. Powyższe wyniki sugerują, że jony Zn^{2+} mogą hamować w opisywanym modelu komórkowym formowanie apoptosomów i aktywację prokaspazy-9. Limfocyty T Jurkat mogą realizować program apoptozy z udziałem białka rodziny Bcl-2 – Bid, które stanowi łącznik molekularny szlaku receptorowego i mitochondrialnego (tzw. komórki apoptotyczne typu II; por. [41]). W wyjaśnieniu inhibitorowych właściwości jonów Zn^{2+} nie można wykluczyć blokowania przez nie w komórkach apoptotycznych funkcji białka Smac/Diablo (ang. *second mitochondrial activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI*), uznanego inhibitora białek IAP [20, 33].

3.1.3. Cynk inhibitorem stresu oksydacyjnego

Suplementacja jonów Zn^{2+} , zarówno *in vivo* jak i *in vitro*, zapobiega apoptozie indukowanej przez różne czynniki, do których należą sole kadmu [71, 73]. Badania wpływu *in vitro* ZnCl_2 (0–100 μM) na komórki HeLa i komórki nabłonkowe tętnicy wołu, indukowane do apoptozy solami kadmu (0–100 μM CdCl_2 ; 24 godz.) wykazały, że 10 μM ZnCl_2 znacznie hamuje (1,2–2 razy) ich apoptozę. To stężenie ZnCl_2 przyczynia się do ograniczenia fragmentacji DNA, a także hamuje w obydwu modelach komórkowych powstawanie anionorodnika ponadtlenkowego (O_2^-) oraz H_2O_2 , czemu towarzyszy spadek wewnątrzkomórkowego gromadzenia się Cd^{2+} . Sole kadmu należą do czynników uszkadzających DNA, zaburzających proces jego naprawy. Ich toksyczność w pewnym stopniu wynika z uszkodzeń indukowanych przez reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*; ROS), powstające w komórkach w odpowiedzi na zmiany poziomu Cd^{2+} . Kadm stanowi czynnik hamujący enzymy antyoksydacyjne – dysmutazę ponadtlenkową – SOD (ang. *superoxide dismutase*), katalazę, peroksydazę glutationową. Cytotoksyczność CdCl_2 (20–50 μM), związana z generowaniem ROS i H_2O_2 , można powiązać z hamowaniem wewnątrzkomórkowego gromadzenia się jonów Zn^{2+} , co z kolei może ograniczać aktywność SOD. Jednym z protekcyjnych efektów działania Zn^{2+} w badanych komórkach indukowanych do apoptozy solami kadmu wydaje się być hamowanie generowania ROS [73].

3.2. Cynk – induktor apoptozy

3.2.1. Niedobór jonów Zn^{2+} induktorem apoptozy

Obecność chelatora Zn^{2+} – TPEN w mikromolowym stężeniu (20–50 μM) w hodowlach komórek prowadzi do szybkiego spadku tych jonów zarówno w cytoplazmie [12], jak i w jądrach [92]. Doniesiono, że ten chelator indukuje apoptozę wielu komórek, m.in. tymocytów [53], keratynocytów [25], neuronów [1], komórek glejowych [35], limfocytów [52], komórek nabłonkowych [11], hepatocytów [58], chondrocytów [69]. Proapoptotyczne efekty TPEN wydają się być wybiórczo związane ze spadkiem

wewnątrzkomórkowego poziomu Zn^{2+} (choć związek ten może chelatować np. Cu^{2+}) gdyż suplementacja soli cynku w środowisku hodowlanym komórek, traktowanych chelatorem, ogranicza pojawienie się cech apoptozy, jak fragmentacja DNA czy zmiany morfologiczne [12, 53, 59]. Na podkreślenie zasługuje, że inny chelator jonów Zn^{2+} , który nie penetruje błon komórek – DTPA (dietylenotriaminopentaocjan) nie wykazuje zdolności indukcji apoptozy, co przemawia za tym, że wiązanie wewnątrzkomórkowego cynku stanowi włącznik apoptozy [58].

Biochemicznym i morfologicznym potwierdzeniem indukcji apoptozy w limfocytach T krwi obwodowej człowieka, indukowanych *in vitro* w obecności TPEN (15 μM ; 0–18 godz.), była translokacja do cytosolu cytochromu *c* z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów wyprzedzająca aktywację kaspazy-3, -8 i -9 oraz fragmentacja DNA [45]. Śledzenie w czasie zdarzeń towarzyszących wprowadzeniu TPEN do hodowli tych komórek (z wykorzystaniem techniki Western blot i fluorometrycznej metody oznaczania aktywności kaspaz) ujawniło, że obecność induktora apoptozy już po 1 godzinie inkubacji, prowadzi do postępującego w czasie przemieszczania się cytochromu *c*, po którym odnotowuje się aktywację kaspazy-8, -9 i -3. Dodatkowym potwierdzeniem aktywacji głównego enzymu wykonawczego apoptozy – kaspazy-3 była proteoliza PARP wykrywana już po 2 godzinach, a której stopień wzrastał wraz z czasem inkubacji komórek z TPEN. Z kolei fragmentację DNA, określaną metodą TUNEL (ang. *terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling*) wykrywano po 4 godzinach, obserwując jej nasilanie się. Okazało się, że w ciągu pierwszych 6 godzin ekspozycji limfocytów na TPEN, kiedy duży ich odsetek ulega zmianom apoptotycznym, nie dochodzi do wzrostu przepuszczalności błon mitochondrialnych (fluorescencja z DiOC₆ – jodkiem 3,3'-diheksylooksokarboksycjanku, markerem depolaryzacji błon – utrzymuje się na zbliżonym poziomie). Wzrost przepuszczalności błon mitochondriów pojawia się w badanym modelu apoptozy później (po 12 godz.), kiedy proces ma już charakter masowy. Preinkubacja limfocytów z inhibitorem kaspaz o szerokim spektrum działania – Z-VAD-fmk (ang. *pan-caspase inhibitor*), poddanych traktowaniu TPEN, nie wpływa w ciągu pierwszych godzin eksperymentu na depolaryzację błon mitochondrialnych, ale blokuje pojawianie się apoptotycznych cech morfologicznych oraz fragmentację DNA. Szeroko przedstawione wyniki doświadczeń Kolenko i wsp. [45] dowodzą, że w limfocytach ulegających apoptozie po traktowaniu TPEN, uwalniany z mitochondriów cytochrom *c* w drodze niezależnej od depolaryzacji ich błon jest nieodzownym czynnikiem zdarzeń prowadzących do uruchomienia kaskady kaspaz. W opinii cytowanych badaczy to właśnie szlak mitochondrialny jest typową drogą apoptozy limfocytów T, inicjowany utratą przez nie wewnątrzkomórkowej puli Zn^{2+} .

Niedobór jonów Zn^{2+} spowodowany ich wiązaniem przez TPEN w komórkach HeLa prowadzi, m.in. do aktywacji kaspazy-3, -8 i -9, a także wywołanej głównie przez te proteazy cysteinowe degradacji PARP i czynników transkrypcyjnych z rodziny SP (SP1, SP3 i SP4) [12]. W zainicjowanych do apoptozy komórkach HeLa produkty proteolizy PARP wykrywa się po 3 godzinach od wprowadzenia TPEN i enzym ten ulega prawie w pełni degradacji po 6 godzinach, kiedy to białka rodziny SP stają się dostępne dla zaktywowanych cząsteczek kaspaz. Enzymatyczna degradacja czynników trans-

krypcyjnych SP może w części wyjaśniać ich zmniejszoną zdolność do interakcji z DNA, obserwowaną w komórkach apoptotycznych [12, 25]. Wydaje się, że zmiany w stężeniu jonów Zn^{2+} i/albo w ich wewnątrzkomórkowym rozmieszczeniu mogą stanowić główny włącznik kaskady zdarzeń prowadzących do apoptozy.

3.2.2. Niedobór cynku a zmiany stanu red-ox

Wśród doniesień dotyczących szlaków apoptotycznych w różnych typach komórek podkreśla się fakt, że spadek zredukowanego glutationu (GSH) oraz tioli komórkowych jest zjawiskiem wyprzedzającym bądź współwystępującym z kluczowymi zdarzeniami apopto-tycznymi. W żywych komórkach główną, ochronną rolę przed uszkodzeniami oksydacyjnymi sprawują naturalne antyoksydanty, takie jak GSH. Stąd w wielu typach komórek przejmujących sygnał śmierci dochodzi do spadku GSH [63, 64, 68]. Nakatani i wsp. [58] analizując *in vitro* los hepatocytów szczura, traktowanych chelatorami Zn^{2+} o odmiennych zdolnościach penetracji komórek, tj. TPEN (30 μ M; 10 godz.) i DTPA (600 μ M; 10 godz.) obserwowali wyłącznie w komórkach traktowanych TPEN pojawianie się apoptotycznych cech morfologicznych, aktywację kaspazy-3 oraz spadek wewnątrzkomórkowego poziomu GSH. Wprowadzenie do hodowli hepatocytów w 1 godzinę po indukcji apoptozy inhibitora kaspazy-3 – DEVD•CHO (70 μ M) w pełni hamowało aktywność tej kaspazy i ochraniało komórki przed utratą GSH. Suplementacja hodowli hepatocytów, traktowanych TPEN, 20 μ M $ZnSO_4$ hamowała powstawanie zmian morfologicznych, ochraniała komórki przed wpływem GSH oraz przywracała aktywność kaspazy-3 do poziomu kontroli. Dla potwierdzenia antyoksydacyjnych właściwości Zn^{2+} do hodowli hepatocytów eksponowanych na TPEN wprowadzono *N*-acetylo-*L*-cysteinę (NAC; 6 μ M) – prekursor glutationu [19]. Obecność tego antyoksydanta w środowisku blokowała ujawnienie morfologicznych cech apoptozy, choć nie wpływała na aktywność kaspazy-3. Porównanie kinetyki aktywacji kaspazy-3 i wpływu GSH z umierających komórek wykazało nieco wcześniejsze znikanie tripeptydu (przed 4. godz.) niż pojawianie się aktywnych cząsteczek enzymu (4–10 godz.). Spadek poziomu GSH odwracało dodanie $ZnSO_4$, a także inhibitora kaspazy-3. Natomiast obecność NAC nie wpływała na aktywność enzymu, co potwierdza sugestię, że kaspaza-3 nie jest kontrolowana przez zmiany red-ox. Wyniki tych doświadczeń sugerują, że to zmniejszenie wewnątrzkomórkowego poziomu jonów Zn^{2+} , wywołane ich chelatowaniem, wpływa na aktywację kaspazy-3, której aktywność wydaje się być sprzężona w bliżej nieokreślony sposób z poziomem GSH [58].

3.2.3. Konsekwencje niedoboru cynku w komórkach nabłonkowych dróg oddechowych

Wielokierunkowe badania laboratorium Zalewskiego [9, 11, 79, 81] podkreślają, że cynk pełni rolę ochronną – antyoksydacyjną i przeciwzapalną, zapewniając prawidłowe funkcje nabłonka dróg oddechowych. Niedobór tego pierwiastka wzmagą stany zapalne, stres oksydacyjny i uszkodzenie dróg oddechowych [81, 82]. Znakowanie sondą fluorescencyjną – cynkiną komórek nabłonka tchawicy owcy i jamy nosowej człowieka wykazało, że jony Zn^{2+} nagromadzają się w nich głównie u podstawy ciałek rzęskowych i w pęcherzykach zlokalizowanych w szczytowej warstwie cytoplazmy, skierowanej

do światła oraz w cytoplazmatycznych pęcherzykach na obrzeżach jąder. Carter i wsp. [9] przedstawili dowody wskazujące, że usuwanie wewnątrzkomórkowych jonów Zn^{2+} z komórek nabłonkowych tchawicy indukuje ich apoptozę, a jej poziom koreluje z indukcją stresu oksydacyjnego. W komórkach tych, traktowanych TPEN (25 μM , 7 godz.) oraz induktorem wolnych rodników – nadtlendioazotynem (500 μM , 18 godz.), przeprowadzono analizę aktywacji wybranych kaspaz. Okazało się, że obydwa związki indukują aktywację tych samych kaspaz, tj. kaspazy-2, -3 i -6 (bez większych zmian w aktywacji kaspazy-9). Podjęto ponadto analizę wpływu antyoksydantów na aktywację kaspaz w komórkach nabłonkowych eksponowanych na te induktory o szerokim zakresie stężeń (TPEN – 0–25 μM ; nadtlendioazotyn – 0–1000 μM). Dodanie do tak traktowanych komórek NAC prowadziło do efektów kompensujących utratę Zn^{2+} . Silne efekty protekcyjne odnotowano w przypadku NAC, a nieco słabsze w obecności witamin C i E. Zastosowanie wyznakowanych przeciwciał ujawniło intensywną fluorescencję prokaspazy-3 i enzymu antyoksydacyjnego – Cu/Zn dysmutazy ponadtlenkowej (Cu/ZnSOD) w apikalnych regionach komórek nabłonkowych w bezpośrednim sąsiedztwie ciałek rzęskowych, w których wykrywano również peroksydację lipidów. W tych regionach komórek obserwowano gwałtowny wzrost peroksydacji lipidów, zarówno po traktowaniu induktorem apoptozy – H_2O_2 (500 μM), jak i chelatorem jonów Zn^{2+} – TPEN. Gromadzenie jonów Zn^{2+} u podstawy ciałek rzęskowych i w pęcherzykach, rozmieszczonych w bliskim ich sąsiedztwie, sugeruje rolę tego pierwiastka w strukturalnej integralności rzęsek i/bądź w regulacji ich ruchu. Preferencyjna kolo-kalizacja jonów Zn^{2+} i Cu/ZnSOD w apikalnych obszarach komórek nabłonkowych pozwala przypuszczać, że jony te są włączone w regulację stanu red-ox. Prawdopodobnie niedobór/utrata obwodowo rozmieszczonych jonów Zn^{2+} w komórkach nabłonka dróg oddechowych, m.in. w stanach zapalnych (astma) czy podczas ich chelatowania *in vitro*, może promować w nich stres oksydacyjny [81, 82]. Charakterystyczna lokalizacja głównego enzymu wykonawczego apoptozy – prokaspazy-3 w obwodowych regionach cytoplazmy/błoni i w bliskości ciałek rzęskowych może mieć sens biologiczny w przestrzenno-czasowej aktywacji tej proteazy i śmierci komórek nabłonka. To właśnie ich powierzchnia, skierowana do światła dróg oddechowych, zawierająca liczne mitochondria dostarczające energii, m.in. dla ruchu rzęsek jest narażona na zanieczyszczenia, alergeny, oksydanty we wdychanym powietrzu i jest miejscem uwalniania wolnych rodników [82, 85]. Apikalna lokalizacja prokaspazy-3 może zapewniać komórkom nabłonka „szybki odbiór” sygnału śmierci, zanim dojdzie do rozległego zniszczenia nabłonkowej bariery dróg oddechowych. Wydaje się, że odpowiednie stężenie jonów Zn^{2+} może stanowić czynnik utrzymujący kaspazę-3 w formie proenzymu, a jego niedobór może stanowić włącznik aktywacji prokaspazy-3 [12, 82]. W żywych komórkach prokaspaza-3 jest prawdopodobnie stabilizowana albo przez bezpośrednie wiązanie Zn^{2+} albo pośredni wpływ tych jonów na stan redox. Ubytek Zn^{2+} zmniejsza ochronę antyoksydacyjną komórek, czyniąc je wrażliwymi na uszkodzenia przez wolne rodniki uwolnione z mitochondriów. Towarzysząca peroksydacja lipidów i oksydacja białek może prowadzić do wzmożonej rekrutacji cząsteczek apoptosomu i szybszej aktywacji prokaspazy-3 [9].

3.2.4. Uzupelnienie niedoboru cynku indukuje apoptozę komórek nowotworowych

Niedobór cynku w diecie gryzoni karmionych standardową dietą (po odstawieniu naturalnego karmienia mlekiem matki), ale zawierającą jedynie 3–4 ppm ZnCO_3 (ZD; ang. *zinc-deficient*) powoduje zwiększenie proliferacji komórek nabłonka przełyku i pojawianie się nowotworów tego odcinka przewodu pokarmowego u zwierząt po jednorazowej iniekcji *N*-nitrozometylobenzyloaminy (NMBA) [27, 28]. Fong i wsp. [27] odnotowali w grupie szczurów pozostających na diecie ZD, po iniekcji karcynogenu, wysoki odsetek – około 93% nowotworów przełyku. Uzupelnienie diety tych zwierząt 74–75 ppm ZnCO_3 (ZS; ang. *zinc-sufficient*) prowadziło do zmniejszonej liczby przypadków nowotworów. Okazało się, że szybsze uzupelnienie diety solą cynku po podaniu zwierzętom NMBA, tj. po 1, 24 i 72 godzinach zmniejsza odsetek występowania nowotworów odpowiednio do 8, 14 i 19%, podczas gdy po 432 godzinach (18 dni) do 48%. Analiza wykazała w grupie szczurów, którym uzupelniono dietę w wyższą zawartość ZnCO_3 , już po 24 godzinach od iniekcji karcynogenu wzrost poziomu komórek apoptotycznych i znaczne ograniczenie proliferacji wśród komórek nabłonka przełyku. W badanym materiale oceniono techniką immunocytochemiczną liczbę komórek, w których dochodziło do ekspresji białek rodziny Bcl-2 – Bax i Bcl-2 – odpowiednio promotora i inhibitora apoptozy oraz określono stosunek Bax/Bcl-2 – parametr, któremu przypisuje się znaczenie prognostyczne w niektórych nowotworach. Okazało się, że ekspresja obydwu białek w nabłonku przełyku szczurów po podaniu NMBA nie ulega znacznym zmianom w analizowanym czasie: 0, 24, 30 godzinach i 15 tygodniach, a stosunek Bax/Bcl-2 waha się od 0,3 do 0,5. Natomiast uzupelnienie soli cynku w diecie zwierząt traktowanych NMBA stymulowało wzrost ekspresji proapoptotycznego białka Bax, a blokowało w znacznym stopniu ekspresję inhibitora apoptozy – Bcl-2. Podwyższony stosunek Bax/Bcl-2 obserwowano już po 24 godzinach od uzupelnienia diety ZnCl_2 , a po 15 tygodniach parametr ten wzrósł około 3-krotnie osiągając wartość 1,5. Należy podkreślić, że dane epidemiologiczne wskazują, iż w rozwoju nowotworów przełyku ludzi istotne zagrożenie stanowią nitrozoaminy, w tym NMBA [27, 28]. Wyniki zaprezentowanych badań, wykorzystujących model karcynogenezy przełyku gryzoni, dostarczyły dowodów *in vivo*, że suplementacja cynku może stanowić istotny czynnik szybko włączający apoptozę komórek zmienionych nowotworowo i ograniczający wczesne etapy nowotworzenia tego odcinka przewodu pokarmowego.

3.2.5. Cynk jako induktor apoptozy

Na zdolności Zn^{2+} jako bezpośredniego induktora apoptozy zwrócili uwagę Paramantham i wsp. [63], którzy w komórkach wątroby traktowanych tymi jonami obserwowali zależną od ich stężenia fragmentację DNA, spadek wewnątrzkomórkowego GSH oraz pojawienie się apoptotycznych zmian morfologicznych.

Komórki mózgu są szczególnym modelem w badaniach toksyczności jonów Zn^{2+} z uwagi na ich nagromadzanie się w neuronach presynaptycznych i udział w neuronalnej sygnalizacji [35]. W neuronach kory mózgowej myszy eksponowanych na 30–35 μM ZnCl_2 (24 godz.) dochodzi do uszkodzeń i fragmentacji DNA, potwierdzonych elektroforetycznie i metodą TUNEL [43]. Analiza mikroskopowa ujawniła wśród

umierających neuronów wiele cech typowych zarówno dla apoptozy, jak i nekrozy, za które w znacznym stopniu mogą odpowiadać powstające wolne rodniki. Wprowadzenie do hodowli neuronów, eksponowanych na $ZnCl_2$, analoga witaminy E (Trolox, 100 μM) znacznie ograniczyło odsetek umierających komórek. Natomiast w lizatach komórek indukowanych do apoptozy $ZnCl_2$ dochodziło do znacznego wzrostu peroksydacji lipidów.

Komórki glejaka C6 stały się modelem doświadczalnym, który posłużył do wykazania, że istnieje w nich pewne graniczne stężenie Zn^{2+} , powyżej bądź poniżej którego dochodzi do indukcji apoptozy [35]. Inkubacja tych komórek z 150–300 μM $ZnCl_2$ bądź z chelatorem Zn^{2+} – TPEN (1–3 μM) indukuje internukleosomową fragmentację DNA, zmiany morfologiczne komórek z detekcją ciał apoptotycznych. W ocenie zdarzeń apoptotycznych w komórkach C6 wykorzystano szereg metod, dzięki którym wykazano, że najwcześniej dochodzi do załamania potencjału błon mitochondrialnych (6 godz.). Następnie odnotowano postępujące zmiany w objętości komórek z formowaniem uwypukleń ich błon (9 godz.), kondensację chromatyny i fragmentację jąder (16 godz.) oraz fragmentację DNA (24 godz.). W celu określenia czy jony Zn^{2+} oddziałują z innymi szlakami sygnalizacji komórkowej do badań włączono analizę aktywności enzymów w nie zaangażowanych. Okazało się, że indukowana jonami Zn^{2+} apoptoza komórek C6 jest niezależna od kinazy białkowej C (PKC), kinazy białkowej aktywowanej mitogenami – MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinase*) czy cykazy guanylanowej. Na przebieg apoptozy w tych komórkach nie wpływa inhibitor biosyntezy białka – cykloheksymid. Okazało się ponadto, że obecność soli lantanu ($LaCl_3$; 100 μM) w komórkach C6 indukowanych do apoptozy jest czynnikiem ułatwiającym wewnątrzkomórkowy dopływ jonów Zn^{2+} ze środowiska i jednocześnie ochrania te komórki przed apoptozą.

Z kolei w komórkach białaczkowych HL-60, poddanych równoczesnemu traktowaniu pyritionem (Py; ang. *pyrithione*) – jonoforem zwiększającym przepuszczalność błon dla Zn^{2+} oraz $ZnSO_4$ (0–200 μM), dochodzi do szeregu zmian warunkowanych poziomem jonów Zn^{2+} [46]. Analiza stężenia jonów Zn^{2+} wykazała, że obecność w środowisku hodowli $ZnSO_4$ o stężeniu 25 μM bądź samego Py (1 μM) nie wpływa na wewnątrzkomórkowy poziom Zn^{2+} (99,46±3,91 ng Zn/mg⁻⁴ białka). Natomiast łączna inkubacja komórek HL-60 z Py/ $ZnSO_4$ (1/25 μM) przyczyniała się do 2-krotnego wzrostu wewnątrzkomórkowego poziomu Zn^{2+} , powodując jednocześnie rozległą fragmentację DNA, proteolizę PARP katalizowaną przez kaspazy oraz aktywację kinazy p38^{MAPK}. Immunochemiczna analiza aktywacji p38^{MAPK} z użyciem przeciwciał rozpoznających ufosforylowaną formę tego enzymu wykazała, że jego fosforylacja wyprzedza (3 godz.) aktywację kaspaz wykrywaną po 6-godzinnej ekspozycji komórek na Py/ $ZnSO_4$. Preinkubacja hodowli komórek HL-60 z inhibitorem kaspaz – Z-Asp-CH₂-DCB, po której wprowadzano Py/ $ZnSO_4$, osłabiała proteolizę PARP i fragmentację DNA, ale nie hamowała fosforylacji p38^{MAPK}. Wyniki te stanowią potwierdzenie, że kluczowym etapem modulowanym na szlaku apoptozy uruchamianym przez Py/ $ZnSO_4$ jest aktywacja kaspaz. Z kolei preinkubacja badanych komórek z inhibitorem p38^{MAPK} – SB203580, poza blokowaniem aktywności kinazy, powodowała hamowanie ich apoptozy. Wydaje się, że gwałtowna fosforylacja p38^{MAPK}, wyprzedzająca aktywację

kaspaz, stanowi ważne wczesne ogniwo w przepływie sygnału śmierci, niezbędne dla aktywacji kaspaz. Jak dotąd nie wyjaśniono mechanizmu aktywacji kinazy p38^{MAPK} w sygnalizacji apoptotycznej, choć rozważa się udział w nim rosnącego poziomu reaktywnych form tlenu wywołany określonym stężeniem jonów Zn²⁺ [46].

W komórkach HL-60 inkubowanych z 1 μM Py i ZnSO₄ = 50 μM (50–200 μM; 6 godz.) główną wykrywaną formą śmierci była nekroza. Natomiast wśród komórek białaczki Molt4 ekspozycja na wyższe stężenia Zn²⁺ (100–300 μM; 24 godz.) prowadziła do mieszanego typu śmierci komórek (ang. *mixed type of cell death*) o cechach nekrozy i apoptozy, której przebieg wydaje się być niezależny od aktywacji kaspazy-3 [36].

4. UWAGI KOŃCOWE

Aktualnie przyjmuje się pogląd, że różne stężenia Zn²⁺ mogą w komórkach powodować odmienne efekty, tj. zarówno stymulację jak i hamowanie ich wzrostu czy śmierć w zależności od ich typu, siły bodźców indukujących, warunków fizjologicznych. Poznanie szczegółów licznych dróg apoptozy w różnych typach komórek pozwoliło powiązać wpływ tych jonów z różnymi przedziałami w umierających komórkach, a także na różnych etapach przepływu sygnału śmierci.

Wydaje się, że precyzyjnie modyfikowany i kontrolowany poziom tego niezbędnego składnika organizmów eukariotycznych o właściwościach anty- i proapoptycznych może znaleźć zastosowanie w terapii chorób, u podłoża których leży osłabiona bądź zbyt duża podatność na sygnały apoptotyczne.

PODZIĘKOWANIE

Autorka składa serdeczne podziękowanie Panu mgr Janowi Gierakowi za edycję komputerową pracy.

LITERATURA

- [1] AHN Y-H, KOH J-Y, HONG SH. Protein synthesis-dependent but Bcl-2 – independent cytochrome c release in zinc depletion-induced neuronal apoptosis. *J Neurosci Res* 2000; **61**: 508–514.
- [2] AIUCHI T, MIHARA S, NAKAYA M, MASUDA Y, NAKAJO S, NAKAYA K. Zinc ions prevent processing of caspase-3 during apoptosis induced by geranylgeraniol in HL-60 cells. *J Biochem* 1998; **124**: 300–303.
- [3] ANTONUCCI A, BALDASSARRE AD, GIACOMO FD, STUPPIA L, PALKA G. Detection of apoptosis in peripheral blood cells of 31 subjects affected by Down syndrome before and after zinc therapy. *Ultrastruct Pathol* 1997; **21**: 499–452.
- [4] BARBIERI D, TROIANO L, GRASSILLI E, AGNESINI C, CRISTOFALO EA, MONTI D, CAPRI M, COSSARIZZA A, FRANCESCHI C. Inhibition of apoptosis by zinc: a reappraisal. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **3**: 1256–1261.
- [5] BARRY MA, EASTMAN A. Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 1993; **300**: 440–450.

- [6] BEYERSMANN D, HASSE H. Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *BioMetals* 2001; **14**: 331–341.
- [7] BIELAK-ŻMIJEWSKA A. Mechanizmy oporności komórek nowotworowych na apoptozę. *Kosmos* 2003; **52**: 157–171.
- [8] BRAND IA, KLEINEKE J. Intracellular zinc movement and its effect on the carbohydrate metabolism of isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1996; **271**: 1941–1949.
- [9] CARTER JE, TRUONG-TRAN AQ, GROSSER D, HO L, RUFFIN RE, ZALEWSKI PD. Involvement of redox events in caspase activation in zinc-depleted airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **297**: 1061–1070.
- [10] CHAI F, TRUONG-TRAN AQ, HO LH, ZALEWSKI PD. Regulation of caspase activation and apoptosis by cellular zinc fluxes and zinc deprivation. *Immunol Cell Biol* 1999; **77**: 272–278.
- [11] CHAI F, TRUONG-TRAN AQ, EVDOKIOU A, YOUNG GP, ZALEWSKI PD. Intracellular zinc depletion induces caspase activation and p21 Waf1/Cip1 cleavage in human epithelial cell lines. *J Infect Dis* 2000; **181** (Suppl 1): S85–S92.
- [12] CHIMIANTI F, SEVE M, RICHARD S, MATHIEU J, FAVIER A. Role of cellular zinc in programmed cell death: temporal relationship between zinc depletion, activation of caspases, and cleavage of Sp transcription factors. *Biochem Pharmacol* 2001; **1**: 51–62.
- [13] CHIMIANTI F, AOUFFEN M, FAVIER A, SEVE M. Zinc homeostasis-regulating proteins: new drug targets for triggering cell fate. *Current Drug Targets* 2003; **4**: 323–338.
- [14] CHOIDW, YOKOYAMA M, KOH J. Zinc neurotoxicity in cortical cell culture. *Neuro-science* 1988; **1**: 67–79.
- [15] COHEN JJ, DUKE RC. Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol* 1984; **132**: 38–42.
- [16] COUSINS R, MCMAHON R. Integrative aspects of zinc transporters. *J Nutr* 2000; **130** (5 S Suppl): 1384S–1387S.
- [17] CSERMELY P, SZAMEL M, RESCH K, SAMOGI J. Zinc can increase the activity of protein kinase C and contributes to the binding to plasma membranes in T lymphocytes. *J Biol Chem* 1988; **263**: 6487–6490.
- [18] CUI L, OKADA A. Nitric oxide and manifestations of lesions of skin and gastrointestinal tract in zinc deficiency. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000; **4**: 247–252.
- [19] DRINGEN R, HAMPRECHT B. N-acetylcysteine but not methionine or 2-oxothiazolidine-4-carboxylate serves as cysteine donor for the synthesis of glutathione in cultured neurons derived from embryonal rat brain. *Neurosci Lett* 1999; **259**: 79–82.
- [20] DU C, FANG M, LI Y, WANG X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation during apoptosis. *Cell* 2000; **102**: 33–42.
- [21] DUFFY JY, MILLER CM, RUTSCHILLING GL, RIDDER GM, CLEGG MS, KEEN CL, DASTON GP. A decrease in intracellular zinc level precedes the detection of early indicators of apoptosis in HL-60 cells. *Apoptosis* 2002; **6**: 161–172.
- [22] ELMES ME. Apoptosis in the small intestine of zinc-deficient and fasted rats. *J Pathol* 1977; **123**: 219–223.
- [23] ENARI M, SAKAHIRA H, YOKOYAMA H, OKAWA K, IWAMATSU A, NAGATA S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; **391**: 43–50.
- [24] ERL W, WEBER C, HANSSON GK. Pyrrolidine dithiocarbamate-induced apoptosis depends on cell type, density, and the presence of Cu^{2+} and Zn^{2+} . *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; **278**: C1116–C1125.
- [25] FAVIER A. Is zinc a cellular mediator in the regulation of apoptosis. [w] Coltery P, Brätter P, Negretti de Bratter v, Khassanova L, Ettienne JC (red.) *Metal Ions in Biology and Medicine*. Paris: John Libbey Eurotext 1998: 164–167.
- [26] FISCHER EH, DAVIE EV. Recent excitement regarding metallothionein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 3333–3334.
- [27] FONG LYY, NGUYEN VT, FARBER JL. Esophageal cancer prevention in zinc-deficient rats: rapid induction of apoptosis by replenishing zinc. *J Natl Cancer Inst* 2001; **93**: 1525–1533.
- [28] FONG LYY, ISHII H, NGUYEN VT, VECCHIONE A, FARBER JL, CROCE CM, HUEBNER K. p53 deficiency accelerates induction and progression of esophageal and forestomach tumors in zinc-deficient mice. *Cancer Res* 2003; **63**: 186–195.
- [29] FRAKER PJ, TELFORD WG. A reappraisal of the role of zinc in life and death decisions of cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; **215**: 229–236.
- [30] FRAKER PJ, KING LE, LAAKKO T, VOLLMER TL. The dynamic link between the integrity of the immune system and zinc status. *J Nutr* 2000; **130**: 1399S–1406S.

- [31] FUKAMACHI Y, KARASAKI Y, SUGIURA T, ITOH H, ABE T, YAMAMURA K, HIGASHI K. Zinc suppresses apoptosis of U937 cells induced by hydrogen peroxide through an increase of the Bcl-2/Bax ratio. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **246**: 364–369.
- [32] GAIDO ML, CIDLOWSKI JA. Identification, purification, and characterization of a calcium-dependent endonuclease (NUC18) from apoptotic rat thymocyte. NUC18 is not H2B. *J Biol Chem* 1991; **266**: 18580–18585.
- [33] GANJU N, EASTMAN A. Zinc inhibits Bax and Bak activation and cytochrome c rele-ase induced by chemical inducers of apoptosis but not by death-receptor-initiated pathways. *Cell Death Differ* 2003; **10**: 652–661.
- [34] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Apoptoza i nowotwory. *Post Biol Kom* 2000; **27** (Suppl 15): 9–43.
- [35] HAASE H, WÄTJEN W, BEYERSMAN D. Zinc induces apoptosis that can be suppressed by lanthanum in C6 rat glioma cells. *Biol Chem* 2001; **382**: 1227–1234.
- [36] HAMATAKE M, IGUCHI K, HIRANO K, ISHIDA R. Zinc induces mixed types of cell death, necrosis, and apoptosis in Molt-4 cells. *J Biochem* 2000; **128**: 933–939.
- [37] HUANG X, CUAJUNGCO MP, ATWOOD CS, MOIR RD, TANZI RE, BUSH AI. Alzheimer's disease, beta-amyloid protein and zinc. *J Nutr* 2000; **130** (5S Suppl): 1488S–1492S.
- [38] IBS KH, RINK L. Zinc-altered immune function. *J Nutr* 2003; **133** (Suppl 1): 1452S–1456S).
- [39] IGUCHI K, HAMATAKE M, ISHIDA R, USAMI Y, ADACHI T, YAMAMOTO H, KOSHIDA K, UCHI-BAYASHI T, HIRANO K. Induction of necrosis by zinc in prostate carcinoma cells and identification of proteins increased in association with this induction. *Eur J Biochem* 1998; **253**: 766–770.
- [40] KASIBHATLA S, TSENG B. Why target apoptosis in cancer treatment? *Mol Cancer Therap* 2003; **2**: 573–580.
- [41] KILIAŃSKA ZM. Apoptoza organizmów eukariotycznych. [w] Cytobiochemia. Kłyszajko-Stefanowicz L, Warszawa: PWN 2002; 772–814.
- [42] KILIAŃSKA ZM, MIŚKIEWICZ A. Kaspazy kręgowców; ich rola w przebiegu apoptozy. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 129–152.
- [43] KIM YH, KIM EY, GWAG BJ, SOHN S, KOH JY. Zinc-induced cortical neuronal death with features of apoptosis and necrosis: mediation by free radicals. *Neuroscience* 1999; **89**: 175–182.
- [44] KLEIN C, SUNHARA RK, HUDSON TY, HEYDUK T, HOWLETT AC. Zinc inhibition of cAMP signaling. *J Biol Chem* 2002; **277**: 11859–11865.
- [45] KOLENKO VM, UZZO RG, DULIN N, HAUZMAN E, BUKOWSKI R, FINKE JH. Mechanism of apoptosis induced by zinc deficiency in peripheral blood T lymphocytes. *Apoptosis* 2001; **6**: 419–429.
- [46] KONDOH M, TASAKI E, ARARAGI S, TAKIGUCHI M, HIGASHIMOTO M, WATANABE Y, SATO M. Requirement of caspase and p38^{MAPK} activation in zinc-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells. *Eur J Biochem* 2002; **269**: 6204–6211.
- [47] LAMBERT JC, WANG G-W, KANG YJ. Zinc inhibition of caspase-3 does not protect HeLa cells from apoptosis cell death. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; **175**: 89–93.
- [48] LAMBERT JC, ZHOU Z, KANG YJ. Suppression of Fas-mediated signaling pathway is involved in zinc inhibition of ethanol-induced apoptosis. *Exp Biol Med* 2003; **228**: 406–412.
- [49] LENARTOWICZ E, DĘBSKA G. Oddziaływania jonów Zn²⁺ w zwierzęcych komórkach niebudliwych. *Post Biol Kom* 1999; **26**: 491–506.
- [50] LIU Z, ZOU H, SLAUGHTER G, WANG X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 1997; **89**: 175–184.
- [51] LORENZO HK, SUSIN SA, PENNINGER J, KROEMER G. Apoptosis inducing factor (AIF): A phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ* 1999; **6**: 516–524.
- [52] MARINI M, FRABETTI F, CANAIDER S, DINI L, FALCIERI E, POIRIER GG. Modulation of caspase-3 activity by zinc ions by the cell redox state. *Exptl Cell Res* 2001; **266**: 323–332.
- [53] MCCABE MJ, JIANG SA, ORRENIUS S. Chelation of intracellular zinc triggers apoptosis in mature thymocytes. *Lab Invest* 1993; **69**: 101–110.
- [54] MORANA S, LI J, SPRINGER EW, EASTMAN A. The inhibition of etoposide-induced apoptosis by zinc is associated with modulation of intracellular pH. *Int J Oncol* 1994; **5**: 153–158.
- [55] MORANA S, WOLF CM, LI J, REYNOLDS JE, BROWN MK, EASTMAN A. The involvement of protein phosphatases in the activation of ICE/CED-3 protease, intracellular acidification, DNA digestion, and apoptosis. *J Biol Chem* 1996; **271**: 18263–18271.
- [56] MRÓZ P, MŁYNNARCZYK I. Mechanizmy indukcji apoptozy i zastosowanie TRAIL w terapii nowotworów. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 113–128.

- [57] MURGIA C, VESPIGNANI I, CERASE J, NOBILI F, PEROZZI G. Cloning, expression, and vesicular localization of zinc transporter Dri 27/ZnT4 in intestinal tissue and cells. *Am J Physiol* 1999; **277**: 1231–1239.
- [58] NAKATANI T, TAWARAMOTO M, OPARE KENNEDY D, KOJIMA A, MATSUI-YUASA I. Apoptosis induced by chelation of intracellular zinc is associated with depletion of cellular reduced glutathione level in rat hepatocytes. *Chem Biol Interact* 2000; **125**: 151–63.
- [59] NAKAYA M, MASUDA Y, MIHARA S, AIUCHI T, SHIBAYAMA-IMAZU T, NAKAJO S, NAKAYA K. Analysis of caspases that are activated during apoptosis in leukemia U937 cells in response to geranylgeraniol. *Anticancer Res* 1999; **19**: 5063–5068.
- [60] NICHOLSON DW, ALI A, THORNBERRY NA, VAILANCORT JP, DING CK, GAL-LANT M, GAREAU Y, GRIFFIN PR, LABELLE M, LAZEBNIK YA, MUNDAY NA, RAJU SM, SMULSON ME, YAMIN T-T, YU V, MILLER DK. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995; **376**: 37–43.
- [61] O'DELL BL. Role of zinc in plasma membrane function. *J Nutr* 2000; **130** (5S Suppl): 1432S–1436S.
- [62] ORRENIUS S, ZHIVOTOVSKY B, NICOTERA P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature Reviews (Mol Cell Biol)* 2003; **4**: 552–565.
- [63] PARAMANANTHAM R, SIT KH, BAY BH. Adding Zn²⁺ induces DNA fragmentation and cell condensation in cultured human Chang liver cells. *Biol Trace Elem Res* 1997; **58**: 135–47.
- [64] PARAT MO, RICHARD MJ, BEANI JC, FAVIER A. Involvement of zinc in intracellular oxidant/antioxidant balance. *Biol Trace Elem Res* 1997; **60**: 187–204.
- [65] PERRY DK, SMYTH MJ, STENNICKE MR, SALVESEN GS, DURIEZ P, POIRIER GG, HANNUN YA. Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3. *J Biol Chem* 1997; **272**: 18530–18533.
- [66] ROBERTSON JD, ORRENIUS S, ZHIVOTOVSKY B. Nuclear events in apoptosis. *J Struct Biol* 2000; **129**: 346–358.
- [67] RUDOLF E, RUDOLF K, RADOCHA J, PEYCHL J, ČERVINKA M. The role of intracellular zinc in modulation of life and death of Hep-2 cells. *BioMetals* 2003; **16**: 295–309.
- [68] RYU JR, SHIN CY, CHOI J-W, MIN HW, RYU JH, CHOI CR, KO KH. Depletion of intracellular glutathione mediates zinc-induced cell death in rat primary astrocytes. *Exp Brain Res* 2002; **143**: 257–263.
- [69] SAUER GR, SMITH DM, CAHALANE M, WU LNY, WUTHIER RE. Intracellular zinc fluxes associated with apoptosis in growth plate chondrocytes. *J Cell Biochem* 2003; **88**: 954–969.
- [70] SHIMIZU T, KUBOTA M, TANIZAWA A, SANO M, KASAI Y, HASHIMOTO H, AKIYAMA Y, MIKAWA H. Inhibition of both etoposide-induced DNA fragmentation and activation of poly(ADP-ribose) synthesis by zinc ion. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; **3**: 1172–1177.
- [71] SMIRNOVA IV, BITTEL DC, RAVINDRA R, JIANG H, ANDREWS GK. Zinc and cadmium can promote rapid nuclear translocation of metal response element-binding transcription factor-1. *J Biol Chem* 2000; **275**: 9377–9384.
- [72] SOLOMONS NW. Zinc and cooper. [w] Shils ME, Young VR. (red.) *Modern Nutrition in Health and Disease*. Philadelphia: Lea Febiger 1988: 238–262.
- [73] SZUSTER-CIESIELSKA A, STACHURA A, SŁOTWIŃSKA M, KAMIŃSKA T, ŚNIEŻKO R, PADUCH R, ABRAMCZYK D, FILAR J, KANDEFER-SZERSZEŃ M. The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. *Toxicology* 2000; **145**: 159–171.
- [74] TAMURA T, SADAKATA N, ODA T, MURAMATSU T. Role of zinc ions in ricin-induced apoptosis in U937 cells. *Toxicol Lett* 2002; **132**: 141–151.
- [75] TELFORD W, FRAKER P. Zinc reversibility inhibits steroid binding to the murine glucocorticoid receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **238**: 86–91.
- [76] TEWARI M, QUAN LT, O'ROURKE K, DESNOYERS S, ZENG Z, BEIDLER DR, POIRIER GG, SALVESEN GS, DIXIT VM. Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose)polymerase. *Cell* 1995; **81**: 801–809.
- [77] THORNBERRY NA, BULL HG, CALAYCAY JR, CHAPMAN KT, HOWARD AD, KOSTURA MJ, MILLER DK, MOLINEAUX SM, WEIDNER JR, AUNINS J, ELLISTON KO, AYALA JM, CASANO FJ, CHIN J, DING GJ-F, EGGER LA, GAFFNEY EP, LIMJUCO G, PALLYHA OC, RAJU SM, ROLANDO AM, SALLEY JP, YAMIN T-T, LEE TD, SHIVELY JE, MCCROSS M, MUMFORD RA, SCHMIDT JA, TOCEI MJ. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 1992; **356**: 768–774.

- [78] TRUONG-TRAN AQ, HO LH, CHAI F, ZALEWSKI PD. Cellular zinc fluxes and the regulation of apoptosis/gene directed cell death. *J Nutr* 2000; **130** (5S Suppl): 1459S–1466S.
- [79] TRUONG-TRAN AQ, CARTER J, RUFFIN R, ZALEWSKI PD. New insight into the role of zinc in the respiratory epithelium. *Immunol Cell Biol* 2001; **2**: 170–177.
- [80] TRUONG-TRAN AQ, RUFFIN R, ZALEWSKI PD. The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death. *BioMetals* 2001; **14**: 315–330.
- [81] TRUONG-TRAN AQ, RUFFIN R, FOSTER PS, KOSKINEN AM, COYLE P, PHILCOX JC, ROFE AM, ZALEWSKI PD. Altered zinc homeostasis and caspase-3 activity in murine allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; **27**: 286–296.
- [82] TRUONG-TRAN AQ, GROSSER D, RUFFIN R, MURGIA C, ZALEWSKI PD. Apoptosis in the normal and inflamed airway epithelium: role of zinc in epithelial protection and procaspase-3 regulation. *Biochem Pharmacol* 2003; **66**: 1459–1468.
- [83] TORRIGLIA A, CHAUDUN E, COURTOIS Y, COUNIS MF. On the use of Zn^{2+} to discriminate endonucleases activated during apoptosis. *Biochimie* 1997; **79**: 435–438.
- [84] VALLEE BL, FALCHUK KH. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev* 1993; **73**: 79–118.
- [85] WALLACE DC. A mitochondrial paradigm for degenerative diseases and ageing. *Novartis Found Symp* 2001; **235**: 247–263.
- [86] WIDLAK P. Mechanizmy fragmentacji DNA i kondensacji chromatyny w komórkach ulegających apoptozie. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 583–597.
- [87] WOLF CM, MORANA SJ, EASTMAN A. Zinc inhibits apoptosis upstream of ICE/CED-3 proteases rather than at the level of an endonuclease. *Cell Death Differ* 1997; **4**: 125–129.
- [88] WOLF CM, EASTMAN A. The temporal relationship between protein phosphatase, mitochondrial cytochrome c release, and caspase activation in apoptosis. *Exp Cell Res* 1999; **247**: 505–513.
- [89] YUAN JY, SHAHAM S, LEDOUX S, ELLIS HM, HORVITZ HR. The *C.elegans* cell-death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1-beta-converting enzyme. *Cell* 1993; **75**: 641–652.
- [90] ZALEWSKI PD, FORBES IJ, GIANNAKIS C, COWLED PA, BETTS WH. Synergy between zinc and phorbol ester in translocation of protein kinase C to cytoskeleton. *FEBS Lett* 1990; **273**: 131–134.
- [91] ZALEWSKI PD, FORBES IJ. Intracellular zinc and the regulation of apoptosis. [w] Lavin M, Watters D. (red.) Programmed Cell Death: The Cellular and Molecular Biology of Apoptosis. Melbourne: Harwood Academic Publishers 1993: 73–86.
- [92] ZALEWSKI PD, FORBES IJ, BETTS WH. Correlation of apoptosis with change in intracellular labile Zn, using Zinquin, a new specific fluorescent probe for zinc. *Biochem J* 1993; **296**: 403–408.
- [93] ZALEWSKI PD, FORBES IJ, SEAMARK RF, BORLINGHAUS R, BETTS WH, LINCOLN SF, WARD AD. Flux of intracellular labile zinc during apoptosis (gene-directed cell death) revealed by a specific chemical probe, Zinquin. *Chem Biol* 1994; **1**: 153–161.

Zofia M. Kiliańska,

Zakład Biochemii Medycznej Katedry Cytobiochemii Uniwersytetu Łódzkiego,

S. Banacha 12/16, 90-237 Łódź,

e-mail: zkilian@biol.uni.lodz.pl

SZLAK SYGNALIZACYJNY HETEROTRIMEROWYCH BIAŁEK G U ROŚLIN

HETEROTRIMERIC G PROTEIN SIGNALING PATHWAY IN PLANTS

Mirosław GODLEWSKI, Aneta DOMAŃSKA, Patrycja ANIOŁ

Zakład Morfogenezy Roślin, Katedra Cytologii i Cytochemii Roślin,
Uniwersytet Łódzki

Streszczenie: U zwierząt liczne pozakomórkowe sygnały specyficznie modyfikują procesy komórkowe poprzez specyficzne receptory, które aktywują różne heterotrimerowe białka G. Aktywowane białka G są zdolne do indukcji wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych głównie poprzez aktywację efektorów katalizujących powstanie wtórnych przekaźników. U roślin zidentyfikowano pojedyncze lub nie więcej niż dwa białka (i kodujące je geny) o właściwościach podjednostek ($G\alpha$, $G\beta$ i $G\gamma$) heterotrimerowych białek G i chociaż nie wykryto ich asocjacji w heterotrimer, można przewidywać, że w transdukcji sygnału mogą uczestniczyć nieliczne rodzaje heterotrimerów białek G. Zidentyfikowano też nieliczne białka, których funkcja receptorowa i efektorowa, a także regulatorowa szlaku białek G wymaga potwierdzenia. Poznanie przebiegu i roli szlaku sygnalizacyjnego białek G u roślin można nadal określić jako fragmentaryczne. Opisanie tego szlaku wymaga więc dalszych intensywnych badań, w czym okolicznością sprzyjającą jest wykazanie, że farmakologiczna modyfikacja aktywności białek G wpływa zarówno na efekty powodowane przez fitohormony (i inne cząsteczki sygnałowe), jak i na liczne procesy fizjologiczne. Zakres podejść badawczych poszerzają też mutanty pozbawione podjednostek $G\alpha$ i $G\beta$, a także transformanty z nadekspresją tych białek.

Słowa kluczowe: Szlak białek G, GPCR, efekторы białek G, rośliny

Summary: In animals numerous extracellular signals specifically modify cell processes by specific receptors which activate different heterotrimeric G proteins. Activated G proteins are able to induce intracellular signaling pathways by activating effectors catalyzing production of secondary messengers. In plants only one or two proteins (and encoding genes) with properties characteristic of heterotrimeric G protein subunits ($G\alpha$, $G\beta$ and $G\gamma$) were discovered. Although no association in heterotrimers was observed it can be hypothesized that few types of G protein heterotrimers may be involved in signal transduction. Some proteins whose receptor and effector functions must be evidenced were also identified. The knowledge concerning the course and role of G protein signaling pathway in plants is far from comprehensive. Description of this pathway calls for further, intensive studies which can be helped by the fact that pharmacological modification of G protein activity influences both fitohormones (and other signaling molecule) effects and numerous physiological processes. Mutants deprived of $G\alpha$ and $G\beta$ subunits as well as transformants with protein overexpression can broaden scientific approach.

Key words: G protein pathway, GPCR, G protein effectors, plants

WSTĘP

Konieczność dostosowania fizjologii organizmu do zmieniających się warunków środowiskowych, oraz utrzymanie homeostazy i koordynacja funkcjonalna społeczeństwa komórek organizmów wielokomórkowych, wymaga sprawnie funkcjonujących systemów rozpoznawania sygnałów pozakomórkowych, ich transdukcji do wnętrza komórek i kaskad wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych zdolnych do modyfikowania procesów komórkowych. W części inicjującej szlaku sygnalizacyjnego zlokalizowane są białka pełniące rolę „włączników molekularnych”. Heterotrimerowe białka G oraz monomerowe małe białka G pełnią tę rolę dzięki zdolności do wiązania GTP, a ich endogenna aktywność GTPazowa pozwala na powrót do stanu wyjściowego.

Heterotrimerowe białka G (białka G) odgrywają istotną rolę w przekazywaniu przez błonę komórkową informacji niesionych przez pozakomórkowe cząsteczki sygnałowe do efektorów wewnątrzkomórkowych. Szlak sygnalizacyjny białek G jest jednym z najbardziej konserwatywnych mechanizmów sygnalizacji u *Eukaryota*, opisanym u bezkręgowców i kręgowców oraz u grzybów. Można więc było sądzić, że ma on podobny przebieg i pełni analogiczną funkcję także u roślin, gdzie może uczestniczyć w szlaku sygnalizacyjnym prowadzącym do reakcji komórek na fitohormony i inne czynniki sygnałowe. Uzyskane dotychczas dane eksperymentalne potwierdzają udział szlaku białek G w regulacji procesów fizjologicznych u roślin, jednak nadal poznanie molekularnego mechanizmu tego szlaku może być określone jako fragmentaryczne. Wykazano bowiem u *Arabidopsis thaliana* obecność homologów wszystkich trzech podjednostek białek G ($G\alpha$, $G\beta$ i $G\gamma$), ale nie wykryto ich połączenia w heterotrimer. Obecność przynajmniej niektórych podjednostek białek G i ich organowo- i rozwojowo-zależny poziom wykazano także u kilkunastu gatunków innych roślin okrytozalążkowych. Zidentyfikowano też nieliczne prawdopodobne receptory i efekторы oddziałujące z tymi białkami oraz cytoplazmatyczne białka regulatorowe modyfikujące przebieg szlaku, ale działanie tych białek wymaga molekularnego potwierdzenia *in vivo*. Dotychczas u roślin nie opisano oddziaływań cząsteczek uczestniczących w łańcuchu szlaku sygnalizacyjnego prowadzącego od określonej cząsteczki sygnałowej do molekularnej odpowiedzi komórek.

Ten przegląd jest podsumowaniem obecnego stanu poznania roślinnych heterotrimerowych białek G, receptorów związanych z tymi białkami, efektorów, z którymi one oddziałują oraz cytoplazmatycznych białek regulacyjnych, które mogą modyfikować szlak transdukcji sygnału białek G. Ograniczone ramy tego opracowania nie pozwalają na zreferowanie fizjologicznej roli szlaku sygnalizacyjnego białek G u roślin. Przedstawienie nagromadzonych, interesujących wyników badań dotyczących zaangażowania białek G w regulację procesów fizjologicznych w reakcji na egzogenne i endogenne czynniki sygnalizacyjne wymaga oddzielnego opracowania. Część z nich zawierają artykuły przeglądowe, które ukazały się w ostatnich latach [7, 21, 35, 45,

65]. W polskim piśmiennictwie problem heterotrimerowych białek G u zwierząt i roślin jest zawarty w artykule przeglądowym Tretyna [103].

HETEROTRIMEROWE BIAŁKA G U SSAKÓW

Ogólnie przyjmowany paradygmat transdukcji sygnału pozakomórkowego do wewnątrzkomórkowych efektorów przez heterotrimerowe białka G jest zwodniczo prosty: receptory błony komórkowej po związaniu odpowiedniej cząsteczki sygnałowej aktywują również związane z błoną białka G, które z kolei wpływają na aktywność efektorów. Efektorami w większości przypadków są także białka błonowe lub zlokalizowane na jej cytoplazmatycznej powierzchni. Obecnie wiadomo, że szlak sygnałowy białek G podlega regulacji przez liczne komórkowe białka regulacyjne [14].

Heterotrimerowe białka G składają się z trzech podjednostek: α ($G\alpha$), β ($G\beta$) i γ ($G\gamma$), które w stanie nieaktywnym tworzą heterotrimer $G\alpha\beta\gamma$ [52, 111]. Białka G w transdukcji sygnału pełnią rolę molekularnego przełącznika działającego w cyklu aktywacja/deaktywacja: aktywację powoduje wymiana GDP na GTP w podjednostce $G\alpha$, natomiast hydroliza GTP, dzięki endogennej aktywności GTPazowej tej podjednostki, powoduje powrót do stanu nieaktywnego. Szlak transdukcji i aktywacja białka G rozpoczyna się po związaniu ligandu (cząsteczki sygnałowej) przez receptor GPCR (ang. *G protein coupled receptor*). Uaktywniony receptor oddziałuje z podjednostką $G\alpha$ heterotrimeru powodując w niej wymianę GDP na GTP, co z kolei prowadzi do dysocjacji heterotrimeru na podjednostkę $G\alpha$ i heterodimer $G\beta\gamma$, które są zdolne do oddziaływania z białkami efektorowymi [33, 100]. Hydroliza GTP do GDP w podjednostce $G\alpha$ warunkuje reasocjację heterotrimeru i gotowość do nowego cyklu po aktywacji receptora [7, 35, 103]. Opisana u drożdży aktywacja efektora przez heterotrimer bez dysocjacji na $G\alpha$ i $G\beta\gamma$ jest sytuacją wyjątkową [51].

U ssaków zidentyfikowano geny kodujące liczne rodzaje każdej z trzech podjednostek białka G; ich genomy kodują: 23 różne podjednostki $G\alpha$, 6 podjednostek $G\beta$ i co najmniej 12 podjednostek $G\gamma$ [18, 73, 93, 109].

Cząsteczki podjednostek $G\alpha$ ssaków (39–46 kDa) są zróżnicowaną rodziną białek. Mają tylko około 20% wysoce konserwatywnych aminokwasów [73], jednak wszystkie zawierają identyczny, 43-aminokwasowy fragment na N-końcu polipeptydu. Ponadto charakteryzują się obecnością kilku ważnych strukturalnych domen, a mianowicie: domeny Ras-podobnej o aktywności GTPazowej, α -helikalnej domeny, która wpływa na tempo spontanicznego usuwania GDP oraz pętli bogatej w Asp/Glu, która uczestniczy w konformacyjnej zmianie po związaniu GTP [62, 75]. Te dwie ostatnie domeny odróżniają $G\alpha$ od małych białek G. W domenie Ras-podobnej zlokalizowane są pętle szkieletowe nazwane przełącznikami (ang. *switches*), których pozycja może się zmieniać zależnie od przyłączenia nukleotydu GDP czy GTP. Po wymianie GDP na GTP następuje ich reorientacja prowadząca do rozluźnienia oddziaływania między podjednostkami $G\alpha/G\beta$ i uwolnienia dimeru $G\beta\gamma$, a także do zmniejszenia powinowactwa do receptora. Odłączenie dimeru $G\beta\gamma$ odsłania też miejsce uczestniczące w oddziaływaniu podjednostki

G α z jej efektorami. Podjednostka G α dzięki kowalencyjnemu przyłączeniu lipidu jest zakotwiczona w dwuwarstwie błony komórkowej [15].

Podjednostki G β ssaków są rodziną polipeptydów (35-36 kDa) o dużej homologii (83-90%). Ich wspólną, charakterystyczną cechą jest obecność regionu składającego się z siedmiu lub dziewięciu tandemowych powtórzeń motywu WD-40 i konserwatywnego motywu Trp-Asp (WD) [55, 75, 99]. Podjednostki G γ ssaków są białkami (7-10 kDa) o małej konserwatywności, jednak wszystkie mają C-terminalne miejsce CaaX (gdzie „a” jest alifatycznym aminokwasem) dla izoprenylacji, dzięki której podjednostki G γ wiążą się z błoną komórkową. Podjednostki G β i G γ w heterotrimerze i po oddysocjowaniu od podjednostki G α tworzą nie ulegający dysocjacji dimer G $\beta\gamma$ dzięki bardzo ścisłemu oddziaływaniu strukturalnemu tworząc zwinięty zwój (ang. *coiled-coil*).

Podjednostki ssaków potencjalnie mogą utworzyć ponad tysiąc różnych heterotrimerów, jednak różnice w ekspresji białek G w różnych typach komórek i stwierdzony brak możliwości łączenia pewnych par podjednostek wskazuje, że w komórkach może jednak powstawać ponad sto różnych heterotrimerowych kompleksów białka G [45]. Na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasów oraz właściwości funkcjonalnych podjednostki G α utworzono cztery podrodziny białek G, tj.: G $_s$, G $_i$, G $_q$ i G $_{12}$ [62, 118]. Podrodziny białek G, a nawet należące do nich białka, różnią się funkcjonalnie, np. białka G $_s$ stymulują, natomiast G $_i$ hamują aktywność cykazy adenylanowej, białka G $_q$ stymulują aktywność fosfolipazy C- β (PLC- β), białka G $_{12}$ działają poprzez małe białka G z rodziny Rho, transducyny pośredniczą w sygnale świetlnym w siatkówce oka, białko G $_{olf}$ (podrodzina G $_s$) uczestniczy w transdukcji sygnału zapachu, a białko G $_{gust}$ (podrodzina G $_i$) w sygnale molekuł słodkich i gorzkich. Ostatnie badania wskazują, że specyficzność transdukcji sygnału może być też osiągnięta dzięki zakotwiczeniu białek G, specyficznego receptora i odpowiedniego efektoru do sygnałowych „tratw” (ang. *raft*), gdzie jest tworzony makromolekularny kompleks zawierający elementy systemu sygnałowego od receptora do efektoru [21].

HETEROTRIMEROWE BIAŁKA G U ROŚLIN

Szlak sygnalizacyjny heterotrimerowych białek G jest wysoce konserwatywnym systemem transdukcji pozakomórkowych sygnałów u *Eukaryota*. U ssaków białka G uczestniczą w przekazywaniu licznych sygnałów, wykazując funkcjonalną różnorodność i znaczną specyficzność tkankową. Spodziewano się więc nie tylko obecności białek G u roślin, ale i ich analogicznego zróżnicowania. Jednak dotychczasowe badania wskazują, że chociaż do błon komórek roślinnych docierają liczne cząsteczki sygnałowe, a substancje modyfikujące aktywność białek G mogą wpływać na różne procesy fizjologiczne, to w komórkach roślinnych prawdopodobnie funkcjonują nieliczne rodzaje heterotrimerowych białek G. U roślin zidentyfikowano bowiem pojedyncze lub podwójne kopie genów kodujących białka wykazujące homologię sekwencji z podjednostkami białek G u ssaków (tab. 1).

Genom *A. thaliana* zawiera tylko jeden gen kodujący typową podjednostkę $G\alpha$ [64], jeden gen kodujący podjednostkę $G\beta$ [115] i dwa geny kodujące podjednostki $G\gamma$ [69, 70] (ryc. 1). Dwa geny kodujące różne podjednostki $G\alpha$ stwierdzono u grochu [68], tytoniu [4, 89] i soi [31, 50]. Prawdopodobnie dwa geny kodujące podjednostki $G\beta$ zawiera genom dzikiego owsa [46].

Podjednostki $G\alpha$. Zidentyfikowany przez Ma i wsp. [64] gen *GPA1*, zlokalizowany w chromosomie 2 u *A. thaliana*, koduje białko GPA1, które jest w 38% identyczne z podjednostką $G\alpha$ białek G_i i transducyny (G_i) ssaków. GPA1 jest najbardziej podobne do podjednostki $G\alpha$ białka G_z należącego do podrodziny G_i , ponieważ podobnie jak białka G_z , białko *A. thaliana* nie ma C-terminalnej cysteiny, która może ulegać ADP-rybozylacji przez toksynę krztuśca (TPX) i zawiera specyficzny dla G_z motyw wiązania reszty kwasu mirystynowego. Białko GPA1, tak jak inne podjednostki $G\alpha$ ssaków, ma natomiast miejsce wrażliwości na toksynę cholery (CTX) [62, 64]. Rola białka G_z u ssaków jest wiązana z regulacją proliferacji i apoptozy komórek poprzez kontrolę aktywności kanałów potasowych, co może sugerować analogiczną rolę podjednostki $G\alpha$ u roślin.

Homologi *GPA1* sklonowane u innych gatunków roślin okrytonasiennych (tab. 1) wykazują 70–90% identyczność między sobą i mniejszą identyczność (34–42%) z podjednostką $G\alpha$ ssaków [83]. Oba zidentyfikowane geny soi (*SGA1* i *SGA2*) są ściśle homologiczne między sobą i z *GPA1 A. thaliana*, ale klon cDNA genu *AfG α 1*, uzyskany z komórek aleuronowych dzikiego owsa, wykazuje tylko 40% identyczności z *GPA1* [46].

Porównanie sekwencji aminokwasowych wskazuje na ściśle pokrewieństwo podjednostek $G\alpha$ u roślin [35]. W porównaniu z GPA1 różnice polegają na 30-aminokwasowej delecji u ryżu, 20-aminokwasowej delecji u *N. plumbaginifolia*, obecności prawdopodobnie alternatywnego kodonu dla inicjującej translację metioniny u *N. tabacum* a u ryżu na zmienionym motywie w C-terminalnej części polipeptydu. Zmiany w regionie C-terminalnym mogą wskazywać na funkcjonalną różnicę w oddziaływaniu z receptorem. Na znaczną homologię podjednostek $G\alpha$ u roślin wskazuje też porównanie sekwencji regionów G1, G2, G3 i G4, które są motywami konsensus w podjednostkach $G\alpha$ ssaków [100]. Różnice dotyczące motywu G5 mogą mieć wpływ na wiązanie GDP/GTP lub na aktywność GTPazową podjednostek $G\alpha$ u roślin w porównaniu z innymi *Eukaryota* [35]. Wykazano jednak, że rekombinanty *GPA1 A. thaliana* i jego homologi u ryżu i pomidora specyficznie, z nanomolarną stałą dysocjacji wiążą znakowane GTP i GTP γ S [1, 41, 94, 119]. Pomiar aktywności GTPazowej białek $G\alpha$ rekombinantów ryżu i pomidora [1, 41, 94] wykazały jednak, że wartości K_{cat} hydrolizy GTP przez roślinne $G\alpha$ są na ogół niższe w porównaniu z innymi *Eukaryota* [1].

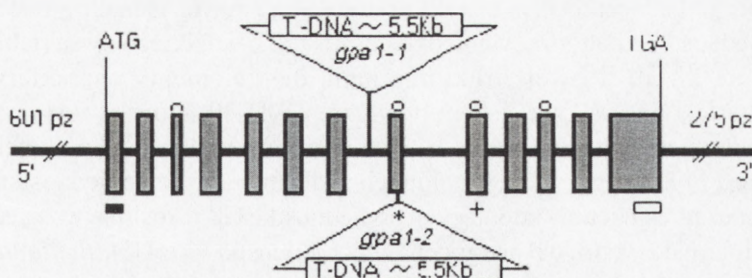
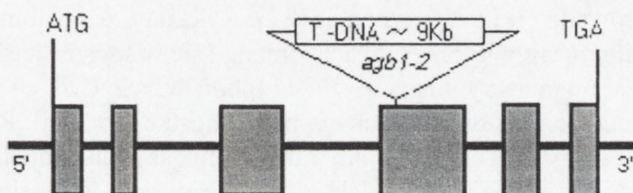
U *A. thaliana* transkrypt i białko kodowane przez *GPA1* są obecne we wszystkich tkankach oprócz nasion, przy czym ekspresja *GPA1* była najwyższa w tkance naczyniowej oraz aktywnie dzielących się komórkach merystemów (pędów, korzeni i kwiatów), młodych zarodkach i zawiązkach owoców [36, 114]. Podobny wzór poziomu transkryptu *SOGA1* obserwowano u szpinaku [79]. Metoda immunologicznej lokalizacji, którą zastosowano u ryżu, wykazała wyższy poziom ekspresji *RGAI* w młodych siewkach niż w dojrzałych roślinach, najwyższy w liściach siewek, a najniższy w dojrzałych korzeniach [30, 94].

TABELA 1. Zidentyfikowane geny podjednostek heterotrimerowego białka G u roślin

Gatunek rośliny	Gen G α	Gen G β	Gen G γ
<i>Arabidopsis thaliana</i>	GPA1 [64]	AGB1 [115]	AGG1 [69] AGG2 [70]
<i>Lycopersicon esculentum</i>	TGA1 [63]		
<i>Lotus japonicus</i>	LjGPA1 [85]		
<i>Oryza sativa</i> L.	RGA1 (D1) [39, 95]	RGB1 [40]	
<i>Glycine max</i> L.	SGA1 [50] SGA2 [31]		
<i>Nicotiana tabacum</i>	NtGP α 1 [89] NtGA2 [4]	TGB1 [53]	
<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	NPGPA1 [48]	NPGPB1 [48]	
<i>Lupinus luteus</i>	LGP α 1 [54]		
<i>Avena fatua</i>	AfG α 1 [46]	AfG β 1, AfG β 2 (?) [46]	
<i>Pisum sativum</i>	PGA1, PGA2 [68]		
<i>Spinacia oleracea</i>	SOGA1 [79]		
<i>Zea mays</i>		ZGB1 [115]	

Subkomórkowa lokalizacja roślinnych Ga jest podobna jak u innych *Eukaryota*. U ryżu obecność białka RGA1 stwierdzono w błonie komórkowej [41], białko GPA1 u *A. thaliana*, białko TGA1 u pomidora i białko NPGPA1 u *Nicotiana plumbaginifolia* są zlokalizowane w błonie komórkowej i błonach retikulum endoplazmatycznego [1, 48, 115]. U mchu *Physcomitrella patens* metodą immunologiczną zlokalizowano prawdopodobną podjednostkę G α w połączeniach komórek splątka, co sugeruje jej udział w regulacji transportu międzykomórkowego [38].

Ekspresja genu kodującego podjednostkę G α może być regulowana przez fitohormony i czynniki środowiskowe. W doświadczeniach prowadzonych na dyskach z liści *N. plumbaginifolia* stwierdzono, że poziom transkryptyu *NPGA1* ulegał zwiększeniu po inkubacji w auksynie, nie zmieniał się po stosowaniu gibereliny, uszkodzeniach mechanicznych i pod wpływem szoku osmotycznego, natomiast w obecności ABA obserwowano niewielkie, a w przypadku kwasu salicylowego znaczne obniżenie poziomu transkryptyu tego genu [48]. Stymulację ekspresji *RGA1* przez światło stwierdzono w tkankach wegetatywnych ryżu [95]. U tej rośliny prawdopodobnie także ABA może wpływać na transkrypcję genu *RGA1*, ponieważ jego promotor zawiera sekwencję reagującą na ABA (ABRE, ang. *ABA-responsive element*) [95]. Zwiększenie poziomu

G α **G β** **G γ** 

RYCINA 1. Geny *GPA1* ($G\alpha$), *AGB1* ($G\beta$) i *AGG1* ($G\gamma$) kodujące białka podjednostek heterotrimerowego białka G *A. thaliana* ze wskazaniem lokalizacji insercji T-DNA mutantów genu $G\alpha$ – *gpa1-1* i *gpa1-2* i mutantu genu $G\beta$ – *agb1-2*. W otwartych ramkach odczytu pionowymi prostokątami zaznaczono fragmenty DNA kodujące eksony, a łączącymi je liniami introny transkryptu. $G\alpha$: \circ – lokalizacja miejsc wiązania GTP w pętlach kodowanego polipeptydu; \bullet – prawdopodobne piąte miejsce wiązania GTP w kodowanym polipeptydzie; \blacksquare – lokalizacja sekwencji kodujących domeny wiązania z podjednostką $G\beta$ na N-końcu polipeptydu; \square – lokalizacja sekwencji kodujących przypuszczalną domę oddziaływania z efekтором na C-końcu polipeptydu; $*$ – lokalizacja sekwencji kodującej w polipeptydzie domę GTPazy przełącznika I i pętlę efektorową; $+$ – lokalizacja sekwencji kodujących w polipeptydzie przełącznik II. ($G\alpha$ – na podstawie [106], $G\beta$ – na podstawie [108], $G\gamma$ – na podstawie [69])

transkryptu *NtGPA2* stwierdzono w korzeniach włóknikowych tytoniu po infekcji przez *Agrobacterium rhizogenes* [4].

Podjednostki $G\beta$ Podobnie jak w przypadku podjednostki $G\alpha$ genom *A. thaliana* zawiera tylko jeden gen *AGB1* kodujący podjednostkę $G\beta$. Ta podjednostka wykazuje

około 42% podobieństwo do podjednostki G β ssaków (i około 50% identyczność sekwencji aminokwasowej z 2 i 3 podjednostką G β człowieka) [62, 70, 115]. Pojedyncze homologi podjednostki G β zidentyfikowano u kilku innych gatunków roślin; dwa białka tej podjednostki zidentyfikowano dotychczas tylko u dzikiego owsa (tab. 1). Roślinne podjednostki G β w swej strukturze mają dwa elementy charakterystyczne dla podjednostek G β ssaków: siedem powtórzeń WD-40, które są wykorzystywane do tworzenia specyficznego motywu oddziaływania białko-białko z efektozem, oraz sekwencję N-końcową, która jest potrzebna dla interakcji z podjednostką G α .

Wzór ekspresji genów kodujących podjednostkę G β w roślinie w znacznym stopniu jest podobny do wzoru ekspresji genów podjednostki G α . U *A. thaliana* i kukurydzy obecność transkryptu genów kodujących podjednostkę G β stwierdzono w korzeniach, pędach i w kwiatach [115]. Ekspresja *RGb1* w ryżu jest wyższa w korzeniach niż w liściach [40]. U tytoniu najniższy poziom białka G β stwierdzono w starzejących się liściach [80].

Badania prowadzone na *N. plumbaginifolia* wykazały, że poziom transkryptu genu *NPGPB1* po inkubacji w fitohormonach zmieniał się w sposób ściśle odpowiadający zmianom poziomu transkryptu genu *NPGAI* (podjednostki G α), co sugeruje podobny mechanizm regulacji genów kodujących podjednostkę G α i G β . Różnica dotyczyła wpływu ABA, który zwiększał poziom transkryptu genu dla podjednostki G β [48].

Podjednostki G β wykazują też podobną do podjednostek G α lokalizację komórkową. W błonach zlokalizowane jest białko AGB1 u *A. thaliana* [33, 76], w błonie komórkowej i retikulum endoplazmatycznym metodą immunologiczną zlokalizowano białko NPGPB1 u *N. plumbaginifolia* [48]. W komórkach liści tytoniu białko podjednostki G β zostało wykryte w błonie komórkowej i w izolowanych jądrach [80]. W badaniach prowadzonych na tytoniu stwierdzono preferencyjną lokalizację G β w unikalnie skomponowanych lipidowych „tratwach” błony komórkowej, które prawdopodobnie tworzą mikrokompartmenty wiążące także inne białka [81]. Wiązanie białek G α i G β z podobnymi „tratwami”, a także gromadzenie się białek G α w inwaginacjach błony komórkowej opisano u ssaków [77].

Podjednostki G γ . Geny *AGG1* i *AGG2* kodujące podjednostki G γ u *A. thaliana* zidentyfikowano nie na podstawie homologii sekwencji z G γ ssaków, ale na podstawie interakcji z białkiem podjednostki G β tytoniu w próbie podwójnej hybrydyzacji u drożdży [69, 70]. Wykazano też oddziaływanie białek *AGG1* i *AGG2* z podjednostką AGB1 *A. thaliana* zarówno u drożdży, jak i *in vitro* [69, 70]. Podjednostki G γ *A. thaliana* są w 48% identyczne między sobą i w 24–31% z podjednostkami G γ ssaków. Wspólnymi ich cechami są małe rozmiary (odpowiednio 10,8 i 11,1 kDa), C-końcowy motyw CaaX dla izoprenylacji i struktura odpowiedzialna za interakcję z podjednostką G β zlokalizowaną w regionie N-terminalnym [69, 70]. Transkrypty *AGG1* i *AGG2* stwierdzono we wszystkich tkankach ze wzorem ekspresji najbardziej podobnym do *AGB1* [69, 70].

Kompleks heterotrimeru roślinnych białek G. U zwierząt system przenoszenia pozakomórkowego sygnału do wewnątrzkomórkowych efektorów przez białka G jest związany z cykliczną dysocjacją i reasocjacją kompleksu heterotrimeru białek G. Jeśli taki system funkcjonuje u roślin, to podjednostki białek G powinny być obecne w

komórkach jako kompleks $G\alpha\beta\gamma$, a po jego dysocjacji jako wolne podjednostki $G\alpha$ i wolne dimery $G\beta\gamma$. Jednak chociaż u *A. thaliana* zidentyfikowano wszystkie trzy białka homologiczne z podjednostkami $G\alpha$, $G\beta$ i $G\gamma$ innych *Eukaryota*, dotychczas nie uzyskano potwierdzenia obecności w komórkach roślin ani kompleksu heterotrimeru białka G, ani dimeru $G\beta\gamma$. Istnieją jednak mocne przesłanki wskazujące na tego typu interakcje między podjednostkami, a mianowicie: a) wszystkie podjednostki białek G u roślin mają błonową lokalizację, b) analogicznie jak u ssaków, posiadają domeny służące do oddziaływania podjednostki $G\alpha$ z podjednostką $G\beta$, a podjednostki $G\beta$ z podjednostką $G\gamma$ oraz c) przeprowadzono modelowanie molekularne, które potwierdziło możliwość utworzenia heterotrimeru przez podjednostki białka G *A. thaliana*.

Heterotrimery białek G, podjednostki $G\alpha$ oraz dimery $G\beta\gamma$ u roślin, podobnie jak u ssaków, mogą uzyskiwać błonową lokalizację, ponieważ podjednostki $G\alpha$ i $G\gamma$ mają odpowiednie miejsca dla lipidowych modyfikacji, a także komórki roślinne zawierają enzymy, które mogą katalizować te procesy [7].

Poznanie sekwencji aminokwasowych i identyfikacja ważnych funkcjonalnie domen podjednostek $G\alpha$, $G\beta$ i $G\gamma$ u *A. thaliana* pozwoliły Ullah i wsp. [108] na podjęcie próby molekularnego modelowania poszczególnych podjednostek oraz utworzenia struktury całego kompleksu heterotrimeru białka G tej rośliny. Jako wzorec przyjęto strukturę 1GOT [Model Protein Data Bank (PDB), kod dostępu 1GOT] ssaków, która jest chimerowym heterotrimerem $G_{\tau}\alpha$ (wołu)/ $G_{\mu}\alpha$ (szczura), $G_{\tau}\beta 1$ (człowieka) i $G_{\tau}\gamma 1$ (wołu) [55]. Teoretycznie uzyskana struktura podjednostek $G\alpha$ i $G\beta$ *A. thaliana* w znacznym stopniu odpowiadała eksperymentalnie określonej strukturze obu podjednostek u ssaków. Pewne różnice były spowodowane niewielkimi insercjami w białkach *A. thaliana*, a mianowicie: średnio 5,0 reszt aminokwasowych w 5 insercjach w podjednostce $G\alpha$ i średnio 2,3 reszty w 10 insercjach w podjednostce $G\beta$. W modelu opracowanym dla heterotrimeru białka G *A. thaliana* odpowiednią przestrzenną lokalizację zachowały wszystkie ważne funkcjonalnie regiony kompleksu heterotrimeru białek G, a także reszty aminokwasów uczestniczących w interakcji białko-białko podjednostek (podjednostek $G\alpha/G\beta$ i podjednostek $G\beta/G\gamma$).

U *A. thaliana* i innych roślin zidentyfikowano nietypowe, $G\alpha$ -podobne białka. U *A. thaliana* oprócz podjednostki $G\alpha$ homologicznej z podjednostką $G\alpha$ innych *Eukaryota* wykryto regulatorowe białka, które poza zdolnością do wiązania i hydrolizy GTP (charakterystyczną także dla małych białek G), wykazują wiele właściwości wspólnych z „typową” podjednostką $G\alpha$.

W genomie *A. thaliana* zidentyfikowano trzy geny (*AtXG1*, *AtXG*-podobne i *G α -prawdopodobne*) kodujące białka około dwa razy większe od klasycznej podjednostki $G\alpha$, nazwane wielkocząsteczkowymi (ang. *extra-large*) białkami $G\alpha$ [7]. Analiza sekwencji wykazała, że białka *AtXG1*-podobne i *G α -prawdopodobne* wykazują 41 i 42% podobieństwo sekwencji do *AtXG1*, zaś białko *G α -podobne*, pomimo swej nazwy, jest bardziej podobne do *AtXG1* niż do *GPA1*. Wykazano ekspresję genu *ATXG1* w roślinie i bliżej scharakteryzowano jego produkt [58]. Białko *AtXG1* (99-kDa) ma około 29% identyczność sekwencji z *GPA1*, C-kończącą część homologiczną z białkiem $G\alpha$, zawiera motywy potrzebne dla wiązania GTP oraz pętlę bogatą w Asp/Glu, a także prawdopodobnie, charakterystyczną dla $G\alpha$, helikalną domene, której nie mają

małe białka G. Rekombinant białka AtXLG1 preferencyjnie wiąże GTP pomimo braku kilku reszt aminokwasowych uczestniczących w tym wiązaniu [58]. Wielkość cząsteczkowe białko $G\alpha$ ma powiększoną (o około 445 aminokwasów) część N-terminalną polipeptydu. Modelowanie i badania strukturalne wskazują, że może to powodować brak zdolności do interakcji z dimerem $G\beta\gamma$. Co prawda stwierdzono jego oddziaływanie z β -skretnym białkiem, jednak prawdopodobnie nie jest ono klasycznym białkiem $G\beta$. Próba funkcjonalnej interakcji tego wielkość cząsteczkowego białka z podjednostką $G\beta$ u *A. thaliana* nie powiodła się [44].

Innym dużym białkiem, z potencjalną zdolnością wiązania GTP u *A. thaliana*, jest kodowane przez gen *RHD3* białko RHD3 (ang. *root hair defective*). Ten gen pierwotnie zidentyfikowano dzięki mutantowi *rhd3*, charakteryzującemu się krótkimi korzeniami i krótkimi falistymi włosnikami [91]. Obecnie wiadomo, że białko RHD3 uczestniczy w regulacji wzrostu komórek pędów i korzeni, a redukcja o ponad połowę długości komórek hypokotyli u mutantu *rhd3* jest podobna do fenotypu obserwowanego u roślin pozbawionych transkryptu genu *GPA1* [78, 106]. Gen *RHD3* koduje białko 89-kDa z dwoma motywami charakterystycznymi dla białek wiążących GTP [112].

Innymi interesującymi białkami wiążącymi GTP wykazanymi u roślin są rozwojowo regulowane białka G (DRG, ang. *developmentally regulated G proteins*). Ekspresję tych białek stwierdzono we wszystkich tkankach, przy czym najwyższy poziom transkryptu i białka obserwowano w aktywnie rosnących tkankach, w wierzchołkach korzeni i młodych łodygach [24, 26]. Ekspresja genów *DRG* u grochu i *A. thaliana* wydaje się być regulowana zależnie od cyklu komórkowego [24], a immunologicznie badana lokalizacja sugeruje ich rolę w regulacji transportu pęcherzyków [26]. Jest interesujące, że większość właściwości tych białek G jest podobna do białek kodowanych przez sekwencje obecne w najstarszych prokariotycznych i eukariotycznych genomach. Świadczy to o powszechnej i fundamentalnej funkcji tej klasy białek wiążących GTP [60, 72]. Białko AtDRG1 jest w ponad 40% identyczne z analogicznym białkiem archebakterii.

Przesiew polipeptydów uzyskanych po ekspresji biblioteki klonów *A. thaliana*, w którym poszukiwano białek wiążących znakowane GTP pozwolił na zidentyfikowanie białka ATGB1 [9]. To białko, pomimo małych rozmiarów, wykazuje filogenetyczne podobieństwo do podjednostki $G\alpha$ i do nadrodziny białek ARF/ARL/Sar. Funkcja białka ATGB1 pozostaje nieznaną. U pomidora zidentyfikowano też inne małe białko ORFX kodowane w *locus fw2.2* [28]. Zidentyfikowano je jako regulujące rozmiar owocu, bowiem *locus fw2.2* z pomidora o małych owocach wprowadzony do odmiany wielkoowocowej powodował zmniejszenie rozmiarów owoców [3]. Masa cząsteczkowa ORFX wynosi tylko 22 kDa, ale ma ono zachowane regiony z domenami RAS/RAN/RAD i modelowanie molekularne wykazało ogólne podobieństwo jego struktury do podjednostki $G\alpha$. Alleliczna zmienność *fw2.2* wpływa na liczbę komórek w słupku i autorzy przypuszczają, że białko ORFX może wpływać na rozmiar owoców regulując podziały komórkowe, podobnie jak białko GPA1 u *A. thaliana* [28].

RECEPTORY ODDZIAŁUJĄCE Z HETEROTRIMEROWYMI BIAŁKAMI G U ROŚLIN

GPCR u zwierząt. Zgodnie z paradygmatem transdukcji pozakomórkowych sygnałów poprzez szlak heterotrimerowych białek G, kaskadę przekazywania sygnału rozpoczynają receptory aktywowane po związaniu cząsteczki sygnałowej. Receptory aktywujące białka G zwane receptorami heptahelikalnymi, receptorami 7-TM lub receptorami GPCR (ang. *G protein-coupled receptors*), są integralnymi białkami błonowymi o charakterystycznej budowie. W błonie komórkowej kotwiczy je siedem transbłonowych, α -heliksowych domen, poza komórkę jest skierowany N-terminalny fragment cząsteczki, a do wnętrza komórki jej część C-końcowa [12, 101]. Związanie liganda (lub fotoizomeryzacja rodopsyny, receptora sygnału świetlnego) prowadzi do konformacji cząsteczki receptora polegającej na zmianie pozycji pętli cytoplazmatycznej, co następuje po przesunięciu dwóch transmembranowych heliksów (71). Aktywowane GPCR indukują wymianę GDP na GTP w podjednostce $G\alpha$ kompleksu heterotrimeru białka G, co prowadzi do dysocjacji podjednostki $G\alpha$ i dimeru $G\alpha\beta$. Receptory GPCR należą więc do klasy białek, które są czynnikami wymiany nukleotydów guaninowych (GEF, ang. *guanine nucleotide exchange factor*).

Komórki zwierząt mogą odbierać i reagować na wielką liczbę sygnałów specyficznie wiązanych przez odpowiednio dużą liczbę GPCR. Nie jest więc zaskoczeniem, że GPCR są kodowane przez bardzo liczną nadrodzinę genów: genom człowieka zawiera ich ponad 800, co stanowi około 1% genomu, podobnie, geny kodujące te białka stanowią 1% genomu *Drosophila melanogaster*, a aż 5% niewielkiego genomu *Caenorhabditis elegans* [67]. U drożdży są znane tylko dwa systemy GPCR: szlak reakcji na feromony i system wrażliwości na Glc [110].

GPCR są najbardziej zróżnicowanym typem receptorów błonowych. Ich nadrodzina u ssaków jest dzielona na co najmniej 5 rodzin, przy czym receptory o odległym pokrewieństwie mogą mieć tylko 20–25% identyczności w transbłonowych domenach, które są najbardziej konserwatywnymi regionami tych białek [12, 101, 117]. Różne receptory GPCR mogą aktywować specyficznie różne rodzaje białek G, np. sygnał świetlny aktywuje białka G_t (należące do klasy G_p), receptory odbierające zapachy oddziałują z białkami G_{olf} (z podrodziny G_s), molekuly słodkie i gorzkie działają poprzez G_{gust} (z podrodziny G_i), zaś liczne hormony i neurotransmitery prowadzą do aktywacji licznych, różnych G_s .

Roślinne GPCR. Rośliny reagują na liczne sygnały, można więc było spodziewać się, że podobnie jak u zwierząt, także u roślin liczne receptory GPCR uczestniczą w ich percepcji. Z jednej strony wynikało to z licznych doniesień o modyfikowaniu funkcjonowania komórek po farmakologicznej ingerencji w cykl aktywacji-deaktywacji tych białek, z drugiej zaś z modyfikacji działania fitohormonów i innych sygnałów po stosowaniu substancji wpływających na aktywność heterotrimerowych białek G. Jednak dotychczas nie udało się u roślin zidentyfikować składników szlaku prowadzącego do aktywacji białka G i funkcjonowania szlaku: ligand→receptor→białko G.

W ostatnich latach wyizolowano i scharakteryzowano białka błonowe, które mogą być kandydatami do pełnienia funkcji GPCR, jednak nadal nie są znane aktywujące je ligandy, nie zostało też potwierdzone *in vivo* ich oddziaływanie z białkami G. Tymi kandydatami są białka Mlo i białko GCR1.

Wykrycie białek Mlo jest związane z badaniami mutantu *mlo* jęczmienia, który charakteryzuje się odpornością na patogenny grzyb *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. Obniżona wrażliwość na ten fitopatogen jest związana z zakłóceniem kontroli obumierania komórek, poza tym mutant przy braku patogena przejawia spontaniczną reakcję obumierania komórek w reakcji na sygnał rozwojowy lub abiotyczny [13, 97]. Devoto i wsp. [25], stosując dwie komplementarne techniki umożliwiające wykrycie białek o organizacji 7TM, zidentyfikowali białko Mlo u *A. thaliana*. Subkomórkowe frakcjonowanie wykazało lokalizację białka Mlo w błonie komórkowej, a szeroko-genomowa analiza politropowych białek błonowych pozwoliła na zidentyfikowanie u *A. thaliana* rodziny białek Mlo. Autorzy szacują, że genom *A. thaliana* ma od 25 do 35 homologów *Mlo*. Struktura genów homologów *Mlo* jest wysoce konserwatywna: mają podobną liczbę intronów (11–14) jak i podobne połączenia intron/ekson, posiadają też pojedynczy duży ekson kodujący C-końcowy ogon, który wykazuje znaczne zróżnicowanie sekwencji i długości. Białka Mlo są klasą białek z błonową organizacją podobną do receptorów serpentynowych. Tak więc, subkomórkowa lokalizacja, topologia w błonie i zakres zmienności sekwencji specyficznych domen sugeruje, że białka Mlo mogą pełnić funkcję receptorów GPCR, chociaż nie wykazują one znaczącego podobieństwa do GPCR ssaków.

Innym kandydatem do pełnienia funkcji GPCR u roślin jest białko o strukturze podobnej do receptorów 7TM, kodowane przez gen *GCR1*. Gen *GCR1* był zidentyfikowany i scharakteryzowany niezależnie i prawie w tym samym czasie przez Josefsson i Rask [47] i Plakidou-Dymock i wsp. [83]. Josefsson i Rask [47] wyizolowali i scharakteryzowali z biblioteki cDNA *A. thaliana* cDNA, który koduje białko zawierające sekwencje podobne do występujących u znanych GPCR. Plakidou-Dymock i wsp. [83] przeszukiwali bazę danych dbEST i zidentyfikowali siedem EST u *A. thaliana*, jeden u ryżu i jeden u sosny, których przewidywane produkty wykazują wysokie podobieństwo do receptorów 7TM. Wśród tych sekwencji zidentyfikowali gen *GCR1*, którego przewidywany produkt jest białkiem z siedmioma transbłonowymi domenami, pozakomórkowym końcem N i wewnątrzkomórkowym końcem C, posiadającym także ważne reszty aminokwasowe jak i pozakomórkowe miejsce glikozylacji, które występuje u wielu GPCR ssaków.

Analiza Southern blot wykazała, że genom *A. thaliana* zawiera pojedynczą kopię genu *GCR1*, a analiza fragmentów restrykcyjnych – jego lokalizację w chromosomie 5. Dla potwierdzenia, że *GCR1* jest genem obecnym nie tylko w genomie *A. thaliana* autorzy wyizolowali jego homolog u *Brassica napus*. Eksony genów u obu gatunków są w 91% identyczne ze 100% zachowaniem kodowania aminokwasów w badanych regionach [83]. Przewidywany produkt genu *GCR1*, w różnych fragmentach wykazuje podobieństwo do trzech rodzin nadrodziny receptorów GPCR: największy stopień podobieństwa do czterech członków rodziny receptorów E *Dictyostelium* (CAR1-4; identyczność rzędu 20–23% w regionie obejmującym 7TM), mniejsze chociaż znaczące

podobieństwo z rodziną receptorów B (dla czynnika uwalniania kortykotropiny i kalcytoniny) oraz z rodziną receptorów serotoniny i węchowych u ssaków [47, 83].

Badania funkcji *GCR1* przeprowadzone u roślin *A. thaliana* transformowanych konstrukcją antysensu cDNA pod kontrolą promotora 35S wirusa mozaiki kalafiora (CaMV) wykazały, że gen *GCR1* może odgrywać ważną rolę w rozwoju roślin [83]. Siewki i dorosłe rośliny transformantów miały zredukowany wzrost liścieni oraz liści i tworzyły pojedyncze łodygi kwiatowe już w stadium 7 liści. Ich fenotyp jest podobny do fenotypu cytokinino-opornego mutantu *cyr1* *A. thaliana*. Siewki z konstrukcją antysensu *GCR1* także wykazywały zredukowaną wrażliwość korzeni i pędów na benzyloadeninę przy braku wrażliwości na inne hormony. Jednak porównanie sekwencji *GCR1* u siewek homozygotycznych roślin *cyr1* i *CYR1* nie wykazało różnic w przewidywanej sekwencji aminokwasowej. Wskazuje to, że *GCR1* nie jest alleliczny w stosunku do zmutowanego genu *CYR1*, co potwierdziły podobne poziomy mRNA *GCR1* w homozygotycznych mutantach *cyr1* i u roślin typu dzikiego. Uzyskane dane sugerowały, że rośliny wyższe mają homolog receptora 7TM, który uczestniczy w sygnale cytokininy [83]. Jednak ostatecznie analizy wskazują, że fenotyp związany z cytokinina był spowodowany przez inną mutację, która nie jest związana z *GCR1* [37, 84].

Tak więc, bezpośredni lub pośredni udział GCR1 w szlaku regulacji procesów fizjologicznych przez cytokininy pozostaje problemem otwartym, nie neguje to jednak udziału tego białka w szlaku lub szlakach sygnalizacyjnych u roślin. Na znaczenie obecności tego receptora we wroście i rozwoju roślin wskazują badania Colucci i wsp. [17]. Autorzy wykazali, że u *A. thaliana* ekspresja białka GCR1 jest regulowana rozwojowo i że wyraźnie wyższymi jej poziomami charakteryzują się rosnące, w tym merystematyczne, części rośliny, co sugeruje rolę tego białka w regulacji proliferacji komórek. Badania roli GCR1 w regulacji cyklu komórkowego przeprowadzone na merystemach korzeni siewek *A. thaliana* i kulturach komórkowych BY-2 tytoniu transformowanych genem *GCR1* *A. thaliana* potwierdziły te sugestie. W cyklu komórkowym synchronizowanych afidikoliną merystemów korzeni siewek *A. thaliana* wzór ekspresji *GCR1* był podobny do wzoru ekspresji cykliny D2, a w kulturach komórek BY-2 z nadekspresją *GCR1* stwierdzono zwiększenie włączania ³H-tymidyny i wartości indeksu mitotycznego.

Fenotyp transgenicznych roślin *A. thaliana* z nadekspresją genu *GCR1* w porównaniu z fenotypem form dzikich charakteryzował się przyspieszonym kwitnieniem oraz znacznym zmniejszeniem głębokości stanu spoczynku nasion, co przejawiało się przyspieszonym kiełkowaniem świeżo zebranych, niestratyfikowanych nasion. Te efekty były związane ze zwiększeniem ekspresji genów uznawanych za markery tych procesów, a mianowicie: związanego z kwitnieniem genu *LFY* (*LEAFY*), który jest aktywowany w merystemie przez giberelinę, natomiast podczas kiełkowania nasion zwiększeniem ekspresji genu *AtMYB65* kodującego czynnik transkrypcyjny aktywowany przez GA, a także genu kodującego katalityczną podjednostkę fostafazy serynowo/treoninowej PP2A.

Cytowane wyniki badań Colucci i wsp., [17] sugerują powiązanie receptora GCR1 ze szlakiem działania GA, a dalsze badania prowadzone na roślinach *A. thaliana* i komórkach BY-2 tytoniu transformowanych genem *GCR1* wskazują, że białko GCR1 prawdopodobnie oddziałuje z podjednostką G α . We frakcji mikrosomowej z

transgenicznych roślin z nadekspresją GCR1 stwierdzono bowiem kilkakrotne zwiększenie wiązania $\text{GTP}\gamma\text{S}^{35}\text{S}$ (nie hydrolizowanego przez aktywność GTPazową $\text{G}\alpha$ analoga GTP) w porównaniu z typem dzikim (analogicznie uzyskana frakcja z mutantą *gpa1-2 A. thaliana* wiązała wyraźnie mniej tego analogu niż formy dzikie). Funkcjonalne powiązanie GCR1 z heterotrimerowym białkiem G wymaga jednak dalszych badań, ponieważ $\text{GTP}\gamma\text{S}$ mógł być wiązany częściowo przez małe białka G [10].

EFEKTORY ROŚLINNYCH BIAŁEK G

Podjednostki $\text{G}\alpha$ i dimery $\text{G}\beta\gamma$, uwolnione po dysocjacji heterotrimeru, mogą oddziaływać z licznymi efektorami inicjującymi wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne głównie dzięki indukcji syntezy wtórnych przekaźników. U ssaków podjednostka $\text{G}\alpha$ może aktywować cyklazę adenylanową i guanylanową, fosfodiesterazę cGMP, kinazę fosfoinozitolową 3 (PI3K), fosfolipazę fosfoinozitolową Cb (PI-PLCb), fosfolipazę D (PLD), nośniki wymiany Na^+/H^+ , czynnik transkrypcyjny TUBBY, kanały K^+ , Ca^{2+} oraz kanały Cl^- i Na^+ [73, 90]. Do efektorów dimeru $\text{G}\beta\gamma$ należą: fosfolipaza A_2 (PLA_2), kanały Ca^{2+} , niektóre izoformy cyklazy adenylanowej i PI-PLCb [19, 73, 109].

Specyficzność przeniesienia sygnału do różnych efektorów u ssaków jest związana ze znacznym zróżnicowaniem białek G. W genomach roślin zidentyfikowano tylko pojedyncze lub co najwyżej po dwa *loci* genów kodujących typowe podjednostki białka G i nawet jeśli uwzględni się różnice w strukturze cząsteczek wariantów podjednostek, można przewidywać, że u roślin mogą być tworzone nieliczne, „typowe” heterotrimery [29]. Czy więc u roślin pojedyncze białka G przekazują wszystkie sygnały, w które są zaangażowane te białka i czy oddziałują one, podobnie jak u ssaków, z licznymi efektorami?

Badania prowadzone nie tylko ze stosowaniem aktywatorów i inhibitorów białek G wykazały, że białka G bezpośrednio lub pośrednio uczestniczą w odpowiedzi roślin na szeroką gamę sygnałów, m.in.: auksyny, gibereliny, ABA, brassinosteroidy, światło niebieskie i czerwone, elicytory grzybów, czynniki Nod podczas tworzenia brodawek u bobowatych infekowanych *Rhizobium* [7, 23, 29, 65]. Z transdukcją sygnału przez białka G u roślin jest wiązany mechanizm regulacji licznych procesów fizjologicznych, m.in. regulacja otwierania aparatów szparkowych [49, 61, 113, 120], regulacja wzrostu łagiewki pyłkowej i włosników [7, 66], regulacja kiełkowania nasion i indukcji syntezy α -amylazy przez GA podczas tego procesu [46, 105, 107], regulacja przynajmniej inicjalnej fazy tworzenia brodawek u bobowatych infekowanych *Rhizobium* [23], regulacja reakcji obronnych roślin infekowanych patogennymi grzybami [8, 11]. Wykazano, że przynajmniej część efektów, w regulacji których może uczestniczyć białko G, może zależeć od aktywności kanałów jonowych, a szczególnie kanałów Ca^{2+} i kanałów wpływu K^+ [1, 7, 61]. Liczne obserwacje wskazują, że białka G mogą uczestniczyć w regulacji morfogenezy wpływając na proliferację komórek. Stwierdzono bowiem, że komórki merystematyczne wyróżniają się wysokim poziomem ekspresji podjednostek białek G (p. rozdz. 2), pozbawione białka $\text{G}\alpha$ mutanty *dl* ryżu [6, 30] i mutanty *gpa1* i *agb1 A. thaliana* [57, 106, 108] charakteryzują się między innymi karłowatym

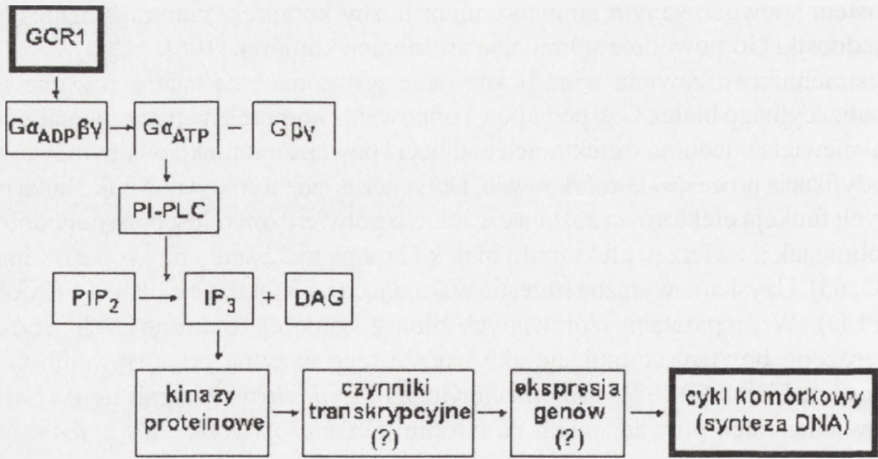
wzrostem spowodowanym zmniejszeniem liczby komórek, natomiast nadekspresja podjednostki $G\alpha$ powoduje stymulację proliferacji komórek [106].

Piśmiennictwo zawiera więc liczne dane wskazujące na zaangażowanie szlaku sygnalizacyjnego białek G w percepcję i odpowiedź komórek na różne sygnały, jednak nadal niewiele wiadomo o efektorach białek G i powiązaniu funkcjonalnym tych białek z modyfikacją procesów komórkowych. Dotychczas zidentyfikowano tylko kilka białek, których funkcja efektorowa została częściowo potwierdzona. Jest prawdopodobne, że podobnie jak u zwierząt, efektorami białek G mogą być kanały potasowe i wapniowe [7, 45, 65]. Uzyskano wyraźne sugestie wskazujące na interakcję białka G z fosfolipazą D (PLD). W preparatach izolowanych błon z komórek aleuronowych jęczmienia stwierdzono bowiem stymulację aktywności tego enzymu po stosowaniu $GTP\gamma S$, (aktywator białek G) [87], a interakcję $G\alpha$ z PLD *in vitro* wykazali Lein i Saalbach [59] w badaniach prowadzonych na tytoniu. U *Chlorogonium* i u *Euglena gracilis* analogi GTP wyraźnie zwiększały aktywność cykazy adenylanowej, enzymu indukującego u zwierząt ważny wtórny szlak sygnalizacyjny cAMP [32, 102].

Badania Lapik i wsp. [56] sugerują, że efekтором oddziałującym z podjednostką $G\alpha$ może być białko nazwane AtPirin i że to białko może pośredniczyć w transdukcji sygnału ABA i światła czerwonego w szlaku prowadzącym do regulacji transkrypcji. Zostało ono zidentyfikowane u *A. thaliana* dzięki zastosowaniu techniki dwu-hybrydowego przesiewu drożdży. Analiza sekwencji aminokwasowej białka AtPirin (31-kDa) wskazuje, że jest ono ortologiem białka piryny człowieka. Białko to ma zdolność interakcji z czynnikiem transkrypcji NFI/CTF1 wiążącym się z CCAAT box [116] dla interakcji z powtarzalnymi domenami ankirynowymi proto-onkoproteiny Bcl-3, która jest zlokalizowanym w jądrze komórkowym białkiem z rodziny czynników transkrypcji I_κB [22]. Białko AtPirin oddziałuje specyficznie z białkiem GAP1 zarówno *in vitro*, jak i u drożdży.

Zidentyfikowany gen *AtPirin* zawiera między innymi elementy ABRE-podobne, obecne w genach indukowanych przez ABA i stres. Białko AtPirin wykryto w siewkach i dojrzałych roślinach, a poziom transkryptu genu *AtPirin* był podwyższany przez ABA i przy słabym oświetleniu światłem czerwonym (światło niebieskie nie miało wpływu). Fenotyp mutantów genu *AtPirin* (*atpirin1-1* i *atpirin1-2*) w znacznym stopniu przypomina fenotyp mutantu *gpa1*. Mutanty *atpirin*, podobnie jak mutanty *gpa1*, różniły się od form dzikich wolniejszym kiełkowaniem niestratyfikowanych nasion, a także wcześniejszym rozwojem pierwotnych pędów i szybszym tworzeniem kwiatów. Oba mutanty charakteryzują się też większą, negatywną wrażliwością na egzogenny ABA podczas kiełkowania nasion i rozwoju siewek. Badania na mutantach potwierdzają możliwość funkcjonowania białek AtPirin i GPA1 w jednym szlaku sygnalizacyjnym w regulacji spoczynku nasion i rozwoju rośliny.

Identyfikacja efektorów białek G, podobnie jak receptorów oddziałujących z tymi białkami, warunkuje określenie fizjologicznej roli systemu transdukcji sygnału przez białka G. Krokiem w kierunku poznania etapów szlaku sygnalizacyjnego wiodącego od receptora do modyfikacji procesu komórkowego są badania Apone i wsp. [5]. Autorzy przeprowadzili badania na komórkach BY-2 tytoniu, w których porównywali efekty uzyskane u transformantów z nadekspresją *GCR1* (gen receptora typu GPCR) i



RYCINA 2. Przymyślaczalne etapy szlaku prowadzącego od GCR1 do syntezy DNA w komórkach BY-2 tytoniu (objaśnienia podano w tekście) (na podstawie danych [5])

komórkach transformowanych *GPA1* z *A. thaliana* (z nadekspresją $G\alpha$) z komórkami typu dzikiego. Badania wykazały, że aktywacja GCR1 powoduje stymulację syntezy DNA i że efektem podjednostki $G\alpha$ może być fosfolipaza C (PI-PLC). Fosfolipaza C, której regulacyjna rola w proliferacji komórek, ich różnicowaniu i metabolizmie jest dobrze poznana u ssaków, katalizuje powstanie z fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (PIP_2) wtórnych przekaźników inozytolo-(1,4,5)-trifosforanu (PI_3) i 1,2-diacyloglicerolu (DAG) [20]. PI_3 pośredniczy m.in. w uwalnianiu Ca^{2+} z zapasów wewnątrzkomórkowych [2, 96], natomiast DAG pozostaje w błonie plazmatycznej i może aktywować PKC [34] lub ulegać konwersji w inny wtórny przekaźnik, kwas fosfatydowy (PA) [74].

Przeprowadzone doświadczenia i analizy wykazały, że w komórkach BY-2: a) nadekspresja GCR1 prowadzi do zwiększenia aktywności PI-PLC, do zwiększenia poziomu wtórnego przekaźnika PI_3 , oraz tempa syntezy DNA, b) inhibitory PI-PLC hamowały tempo syntezy DNA zarówno w typie dzikim, jak i w komórkach z nadekspresją GCR1, c) w komórkach z nadekspresją GCR1 w porównaniu z typem dzikim stwierdzono zwiększoną ogólną aktywność kinaz proteinowych (m.in. PKA, PKC), d) aktywność PI-PLC i zawartość PI_3 są wyższe w komórkach z nadekspresją podjednostki $G\alpha$ i porównywalne z komórkami z nadekspresją GCR1. Stwierdzono też, że poziom PI_3 jest regulowany podczas cyklu komórkowego i że najwyższy poziom ten wtórny przekaźnik osiąga w okresie syntezy DNA.

Na podstawie uzyskanych wyników autorzy zaproponowali szlak sygnalizacyjny prowadzący od receptora do regulacji proliferacji komórek (ryc. 2). Według tej propozycji GCR1 aktywuje białka G, następnie podjednostka $G\alpha$ oddziałuje z PI-PLC, która katalizuje powstanie wtórnego przekaźnika PI_3 , a ten z kolei w drodze aktywacji kinaz i prawdopodobnie poprzez regulację ekspresji genów może wpływać na syntezę DNA.

Zaproponowany szlak sygnalizacyjny jest wysoce prawdopodobny, jednak wymaga dalszego molekularnego potwierdzenia oddziaływania białek uczestniczących w jego przebiegu; nie jest też znany ligand aktywujący GCR1 (p. rozdz. 3).

BIAŁKOWE REGULATORY SZLAKU BIAŁEK G U ROŚLIN

Zdolność komórek do modyfikowania procesów w odpowiedzi na pozakomórkowe sygnały przenoszone przez błonę komórkową poprzez białka G jest warunkowana obecnością białek zaangażowanych w szlaku transdukcji sygnału, a więc aktywacją genów kodujących receptory, podjednostki białek G i efekторы tych białek. U ssaków wykazano, że oprócz tego poziomu regulacji wrażliwości komórek, szlak transdukcji sygnału białek G może być regulowany przez cytoplazmatyczne białka enzymatyczne i nieenzymatyczne, które mogą zmieniać funkcjonalne właściwości receptorów, białek G i efektorów.

Zastosowanie techniki genetycznego przesiewu u drożdży pozwoliło na zidentyfikowanie u ssaków trzech białek AGS (ang. *activators of G protein signaling*), które nie są GPCR, a które są zdolne do aktywacji białka G [16]. AGS1 jest białkiem pokrewnym z Ras, które może funkcjonować jako GEF (zwiększając wiązanie GTP przez $G\alpha_i$), AGS2 jest składnikiem szlaku świetlnego białka motorycznego dyneiny i oddziałuje z dimerem $G\beta\gamma$, natomiast AGS3 jest białkiem (zawierającym motyw tetratrikopeptydowy), które może hamować dysocjację GDP z $G\alpha_i$. Białko AGS3 funkcjonuje więc jako inhibitor dysocjacji guaniny (GDI, ang. *guanine dissociation inhibitor*), podobnie do klasycznego białka zidentyfikowanego wcześniej tylko dla małych białek G. Związanie AGS3 poprzez $G\alpha$ nie tylko hamuje szlak białka G, ale także hamuje połączenie tej podjednostki z dimerem $G\beta\gamma$ i odtworzenie heterotrimeru, w ten sposób może przedłużać aktywność sygnału wolnych heterodimerów $G\beta\gamma$ [7].

Białka AGS nie zostały zidentyfikowane u roślin, chociaż obecność białka o znacznym pokrewieństwie z AGS1 wykazano w rodzinie małych białek G ROP [121]. Stwierdzono też, że genom *A. thaliana* zawiera sekwencję homologiczną z AGS2 [86]. Analiza genetyczna wykazała, że u *A. thaliana* ograniczoną homologię z AGS3 ma produkt genu *SPY* (*SPINDLY*), który działa jako negatywny regulator transdukcji sygnału GA [42, 43]. To białko, podobnie jak AGS3 ssaków, zawiera 10 powtórzeń tetratrikopeptydowych [43, 104], ale nadal nie wiadomo, czy SPY może modulować sygnał szlaku GA przez interakcję z białkiem G.

Zdolność komórek do odebrania sygnału pozakomórkowego może być regulowana na poziomie modyfikacji właściwości receptorów. U ssaków wykazano, że fosforylacja receptorów przez kinazy proteinowe (m.in. PKA, PKC) może redukować jego powinowactwo do białka G (desensytyzacja heterologiczna), natomiast kinaza GRK (kinaza GPCR) fosforyluje receptor związany z ligandem (desensytyzacja homologiczna). Fosforylacja receptora przez GRK wymaga obecności β -arestyn, które w ten sposób są inhibitorami kompleksu receptora [82]. Badania prowadzone na roślinach

sugerują obecność w komórkach mechanizmów nie tylko tkankowo-, ale i okresowo-specyficznej regulacji zdolności komórek roślinnych do reakcji na pozakomórkowe cząsteczki sygnałowe, która może być regulowana na poziomie receptorów, jednak te mechanizmy nie są znane.

U ssaków szlak transdukcji sygnałów przez białka G może być modyfikowany przez cytoplazmatyczne białka fosducyny (Phd) i jej izoformy [27]. Fosducyna ulega ekspresji w różnych komórkach ssaków, a szczególnie w komórkach fotoreceptorowych siatkówki. Białko to wykazuje wysokie powinowactwo do wolnego heterodimeru $G\beta\gamma$ i wiążąc się z nim zapobiega reasocjacji heterotrimeru [92]. Fosducyna jest więc negatywnym regulatorem transdukcji sygnału w komórkach fotoreceptorowych, a poza tym może pełnić inną rolę, m.in. w regulacji transkrypcji [122]. W ciemności fosducyna może być fosforylowana przez PKA, CaMK oraz GRK. W genomie *A. thaliana* zidentyfikowano dwie sekwencje, które mogą kodować białka z ograniczoną homologią z fosducynami ssaków, jednak nie zostały one scharakteryzowane i nie wiadomo, czy pełnią podobną funkcję jak fosducyny ssaków [7].

Rozpowszechnionym mechanizmem regulacji szlaku białek G u ssaków jest hamowanie (terminacja) sygnału przez związanie podjednostki $G\alpha$ z białkami GAP (ang. *GTPase-activating proteins*). GAP zwiększają tempo hydrolizy GTP przez podjednostkę $G\alpha$ nawet około 2000 razy [88]. Przyspiesza to terminację sygnału, ale obecność GAP może w ten sposób przyspieszać gotowość białek G do ponownej aktywacji. Stwierdzono, że poza tą rolą, pewne białka GAP mogą stanowić „rusztowanie” (ang. *scaffold*), które wiąże GPCR, białko G i GAP w stabilny, sygnałowy kompleks, nawet przy braku aktywacji receptora. Do białek typu GAP u ssaków należą m.in. PI-PLCb, białka RGS i p115RhoGEF [98]. Genom *A. thaliana* zawiera liczne geny kodujące PI-PLC, ale nie wiadomo, czy kodują one białko z aktywnością GAP. Białka RGS u ssaków są kodowane przez rodzinę ponad 20 genów i ich działanie, oprócz aktywności GAP, polega na regulacji białka G poprzez kompetycję w wiązaniu $G\alpha$ z jej efektorami [88]. W genomie *A. thaliana* nie zidentyfikowano jednak żadnego genu kodującego białka typu RGS [7]. Nie ma też dowodów obecności u roślin sekwencji homologicznych z innym GAP, z p115RhoGEF [7]. Z drugiej strony brak ortologicznych genów nie jest wystarczający, aby wykluczyć możliwość obecności u roślin białek funkcjonalnie analogicznych z białkami ROP, ponieważ mogą one mieć niewiele lub być pozbawione zupełnie sekwencji homologicznych ze znanymi GAP ssaków.

PODSUMOWANIE

Obecność u roślin białek homologicznych z podjednostkami białek G można byłoby uznać za dowód, że u roślin, podobnie jak i u innych *Eukaryota*, funkcjonuje system transdukcji pozakomórkowych sygnałów przez szlak białek G. Jednak ten dowód, chociaż znaczący, jest niewystarczający dla przyjęcia funkcjonowania u roślin systemu przetwarzania informacji przez ten szlak bez wykazania bezpośredniego związku między włączeniem, wyłączeniem lub modyfikacją procesu komórkowego w odpowiedzi na

określony sygnał, a także wykazanie nieodzowności udziału heterotrimerowych białek G w szlaku transdukcji tego sygnału. Na podstawie zgromadzonych dotychczas danych można jedynie powiedzieć, że funkcjonowanie szlaku sygnalizacyjnego białek G u roślin jest wysoce prawdopodobne.

Nie zostało jeszcze wykazane, że u roślin białka G funkcjonują jako molekularne łączniki w cyklu tworzenia heterotrimeru i funkcjonalnie aktywnych podjednostek $G\alpha$ i dimerów podjednostek $G\beta\gamma$. Zostały zidentyfikowane nieliczne białka o właściwościach GPCR, ale nie wiadomo, jakie cząsteczki sygnałowe mogą je aktywować i czy są GPCR, które w sposób bezpośredni lub pośredni są aktywowane przez fitohormony. Podobnie, uzyskano dane wskazujące na regulacyjne działanie szlaków wtórnych przekaźników w komórkach roślin, ale nie ma bezpośrednich, molekularnych dowodów ich indukcji poprzez efekторы białek G.

Dalszych badań wymaga problem wynikający z sugestii, że u roślin, w sytuacji wykrycia pojedynczych lub co najwyżej podwójnych kopii genów kodujących poszczególne podjednostki białka G, mogą być tworzone nieliczne heterotrimery białek G. To może wskazywać na ograniczoną rolę szlaku białek G w systemie transdukcji sygnałów u roślin, może też sugerować obecność u roślin białek funkcjonalnie odpowiadających podjednostkom białek G ssaków, ale o niewielkim stopniu identyczności sekwencji z tymi białkami.

Rozważenia wymaga przyczyna nadal niedostatecznego poznania szlaku białek G u roślin w porównaniu z dobrze opisanym jego funkcjonowaniem u ssaków. Czy tego przyczyną jest tylko ciągle niewystarczająca, zbyt mała ilość wyników badań, czy też przyczyną może być koncentrowanie się badań nad wykazaniem u roślin takich samych systemów sygnalizacji, które zostały opisane u zwierząt? Czy w poszukiwaniach mechanizmów wrażliwości komórek roślinnych na pozakomórkowe sygnały w dostatecznym stopniu uwzględniane są różnice w biologii zwierząt i roślin, które mogą także obejmować inne rozwiązania w systemach regulacyjnych? Wiadomo bowiem, że zwierzęta na zmiany środowiskowe reagują adaptacją funkcjonalną, natomiast u roślin odpowiedź polega przede wszystkim na reakcjach wzrostowych i rozwojowych. Wiadomo też, że rośliny i zwierzęta różnią się także organizacją transportu cząsteczek sygnałowych. U roślin znaczna liczba znanych cząsteczek sygnałowych przejawia działanie wewnątrz komórek, nie można więc wykluczyć możliwości, że błonowa lokalizacja systemu przetwarzania informacji z udziałem białek G jest w mniejszym stopniu wykorzystywana w reakcji na sygnały pozakomórkowe, natomiast może być utrwalonym ewolucyjnie sposobem mikrokompartymencji elementów tego systemu w komórkach.

LITERATURA

- [1] AHARON GS, GELLI A, SNEDDEN WA, BLUMWALD E. Activation of a plant plasma membrane Ca^{2+} channel by TGal, a heterotrimeric G protein α -subunit homologue. *FEBS Lett* 1998; **424**: 17-21.
- [2] ALEXANDRE J, LASSALLES JL, KADO RT. Opening of Ca^{2+} channels in isolated red beet root vacuole membrane by inositol 1,4,5-trisphosphate. *Nature* 1990; **343**: 567-570.

- [3] ALPERT KB, TANKSLEY SD. High-resolution mapping and isolation of a yeast artificial chromosome contig containing *tw2.2*, a major fruit weight quantitative trait locus in tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 15503-15507.
- [4] ANDO S, TAKUMI S, UEDA Y, UEDA T, MORI N, NAKAMURA C. *Nicotiana tabacum* cDNAs encoding α and β subunits of a heterotrimeric GTP-binding protein isolated from hairy root tissues. *Genes Genet Syst* 2000; **75**: 211-221.
- [5] APONE F, ALYESHMERNI N, WIENS K, CHALMERS D, CHRISPEELS MJ, COLUCCI G. The G-protein-coupled receptor GCR1 regulates DNA synthesis through activation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Plant Physiol* 2003; **133**: 571-579.
- [6] ASHIKARI M, WU J, YANO M, SASAKI A, YOSHIMURA A. Rice gibberellin-insensitive dwarf mutant gene *Dwarf1* encodes the α -subunit of GTP-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 10284-10289.
- [7] ASSMANN SM. Heterotrimeric and unconventional GTP binding proteins in plant cell signaling. *Plant Cell* 2002; **Suppl**: S355-S373.
- [8] BEFFA R, SZELL M, MEUWLY P, PAY A, VOGELI-LANGE R, METRAUX JP, NEUHAUS G, MEINS F, NAGY F. Cholera toxin elevates pathogen resistance and induces pathogenesis-related gene expression in tobacco. *EMBO J* 1995; **14**: 5753-5761.
- [9] BIERMANN B, RANDALL SK, CROWELL DN. Identification and isoprenylation of plant GTP-binding proteins. *Plant Mol Biol* 1996; **31**: 1021-1028.
- [10] BISCHOFF F, MOLENDIJK A, RAJENDRAKUMAR CSV, PALME K. GTP-binding proteins in plants. *Cell Mol Life Sci* 1999; **55**: 233-256.
- [11] BLUMWARD E, AHARON GS, LAM BCH. Early signal transduction pathway in plant-pathogen interaction. *Trends Plant Sci* 1998; **3**: 342-346.
- [12] BOCKEART J, PIN JP. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: An evolutionary success. *EMBO J* 1999; **18**: 1723-1729.
- [13] BÜSCHGES R, HOLLRICHER K, PANSTRUGA R, SIMONS G, WOLTER M, FRIJTERS A, VAN DA-ELEN R, VAN DER LEE T, DIERGAARDE P, GROENENDIJK J, TÖPSCH S, VOS P, SALAMINI F, SCHULZE-LEFERT P. The barley Mlo Gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* 1997; **88**: 695-705.
- [14] CABRERA-VERA TM, VANHAUWE J, THOMAS TO, MEDKOVA M, PREININGER A, MAZZONI MR, HAMM HE. Insight into G protein structure, function and regulation. *Endocr Rev* 2003; **24**: 765-781.
- [15] CASEY PJ. Lipid modifications of G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1994; **6**: 219-225.
- [16] CISMOWSKI MJ, TAKESONO A, BERNARD ML, DUZICE, LANIER SM. Receptor-independent activators of heterotrimeric G-protein. *Life Sci* 2001; **58**: 2301-2308.
- [17] COLUCCI G, APONE F, ALYESHMERNI N, CHALMERS D, CHRISPEELS MJ. GCR1, the putative Arabidopsis G protein-coupled receptor gene is cell cycle-regulated, and its overexpression abolishes seed dormancy and shortens time to flowering. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 4736-4741.
- [18] COOK LA, SCHEY KL, CLATOR JH, WILCOX MD, HILDEBRANDT JD. Identification of a region in G protein gamma subunits conserved across species but hypervariable among subunit isoforms. *Protein Sci* 2001; **10**: 2548-2555.
- [19] COREY S, CLAPHAM DE. The stoichiometry of G $\beta\gamma$ binding to G-protein-regulated inwardly rectifying K⁺ channels (girsks). *J Biol Chem* 2001; **276**: 11409-11413.
- [20] D'SANTOS CS, CLARKE JH, DIVECHA N. Phospholipid signaling in the nucleus. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1436**: 201-232.
- [21] DAVARE M, AVDONIN V, HALL D, PEDEN E, BURETTE A, WEINBERG R, HORNE M, HOSHI T, HELL JW. A β_2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca²⁺ channel Cav1.2. *Science* 2001; **293**: 98-101.
- [22] DECHEND R, HIRANO F, LEHMANN K, HEISSMEYER V, ANSIEAU S, WULCZYN FG, SCHEIDEREIT C, LEUTZ A. The Bcl-3 oncoprotein acts as a bridging factor between NF- κ B/Rel and nuclear co-regulators. *Oncogene* 1999; **18**: 316-3323.
- [23] DEN HARTOG M, VERHOEF N, MUNNIK T. Nod factor and elicitors activate different phospholipid signaling pathways in suspension-cultured alfalfa cells. *Plant Physiol* 2003; **132**: 311-317.
- [24] DEVITT ML, MAAS KJ, STAFSTROM JP. Characterization of DRGs, developmentally regulated GTP-binding proteins, from pea and *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 1999; **39**: 75-82.
- [25] DEVOTO A, PIFFANELLI P, NILSON I, WAILLIN E, PANSTRUGA R, VON HELJNE G, SCHULTZE-LEFERT P. Topology, subcellular localization, and sequence diversity of the Mlo family in plants. *J Biol Chem* 1999; **274**: 34994-35004.

- [26] ETHERIDGE N, TRUSOV Y, VERBELEN JP, BOTELLA JR. Characterization of AtDRG1, a number of a new class of GTP-binding proteins in plants. *Plant Mol Biol* 1999; **39**: 1113-1116.
- [27] FABCZAK H, SOBIERAJSKA K, FABCZAK S. Fosducyna i jej izoformy – regulatory białek G. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 745-761.
- [28] FRARY A, NESBITT TC, FRARY A, GRANDILLO S, CONG B, LIU J, MELLER J, ELBER R, ALPERT KB, TANKSLEY SD. fw2.2: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* 2000; **289**: 85-88.
- [29] FUJISAWA Y, KATO H, IWASAKI Y. Structure and function of heterotrimeric G proteins in plants. *Plant Cell Physiol* 2001; **42**: 789-794.
- [30] FUJISAWA Y, KATO T, OHKI S, ISHIKAWA A, KITANO H, SASAKI T, ASAH I, IWASAKI Y. Suppression of the heterotrimeric G protein causes abnormal morphology, including dwarfism, in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **95**: 7575-7580.
- [31] GOTOR C, LAM E, CEJUDO FR, ROMERO LC. Isolation and analysis of the soybean SGA2 gene (cDNA), encoding a new member of the plant G-protein family of signal transducers. *Plant Mol Biol* 1996; **32**: 1227-1234.
- [32] GROMES R, ZETSCHKE K. Evidence for a G-protein regulated adenylate cyclase and a Ca²⁺/calmodulin controlled phosphodiesterase in the phytoflagellate *Chlorogonium*. *Bot Acta* 1992; **105**: 395-399.
- [33] HAMM HE. The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem* 1998; **273**: 669-672.
- [34] HODGKIN MN, PETTITT TR, MARTIN A, MICHELL RH, PEMBERTON AJ, WAKELAM MJO. Diacylglycerols and phosphatidates: Which molecular species are intracellular messengers? *Trends Biochem Sci* 1998; **23**: 200-204.
- [35] HOOLEY R. A role for G proteins in plant hormone signalling? *Plant Physiol Biochem* 1999; **37**: 393-402.
- [36] HUANG H, WEISS CA, MA H. Regulated expression of the *Arabidopsis* G α gene *GPA1*. *Int J Plant Sci* 1994; **155**: 3-14.
- [37] HUMPHREY TV, BOTELLA JR. Re-evaluation of the cytokinin receptor role of the *Arabidopsis* gene *GCR1*. *J Plant Physiol* 2001; **158**: 645-653.
- [38] HUTTON JL, KNIGHT CD, MILLNER PA. The *Physcomitrella patens* GP α 1 homologue is located at protonemal cell junctions. *J Exp Bot* 1998; **49**: 1113-1118.
- [39] ISHIKAWA A, TSUBOUCHI H, IWASAKI Y, ASAH I. Molecular cloning and characterization of a cDNA for the alpha subunit of a G protein from rice. *Plant Cell Physiol* 1995; **36**: 353-359.
- [40] ISHIKAWA A, ISASAKI Y, ASAH I. Molecular cloning and characterization of a CDNA for the beta subunit of a G protein from rice. *Plant Cell Physiol* 1996; **37**: 223-228.
- [41] IWASAKI Y, KATO T, DAIDOH T, ISHIKAWA A, ASAH I. Characterization of putative a subunit of heterotrimeric G protein in rice. *Plant Mol Biol* 1997; **34**: 563-572.
- [42] IZHAKI A, SWAIN SM, TSENT TS, BOROCHOV A, OLSZEWSKI NE, WEISS D. The role of SPY and its TPR domain in the regulation of gibberellin action through the life cycle of *Petunia hybrida* plants. *Plant J* 2001; **28**: 181-190.
- [43] JACOBSEN SE, BINKOWSKI KA, OLSZEWSKI NE. SPINDLY, a tetratricopeptide repeat protein involved in gibberellin signal transduction in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 9292-9296.
- [44] JONES AM, ECKER JR, CHEN JG. A reevaluation of the role of the heterotrimeric G protein in coupling light responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2003; **131**: 1623-1627.
- [45] JONES AM. G-protein-coupled signaling in *Arabidopsis*. *Curr Opin Plant Biol* 2002; **5**: 402-407.
- [46] JONES HD, SMITH SJ, DESIKAN R, PLAKIDOU-DYMOCK S, LOVEGROWE A, HOOLEY R. Heterotrimeric G proteins are implicated in gibberellin induction of α -amylase gene expression in wild oat aleurone. *Plant Cell* 1998; **10**: 245-53.
- [47] JOSEFSSON L-G, RASK L. Cloning of a putative G-protein-coupled receptor from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem* 1997; **249**: 415-420.
- [48] KAYDAMOV D, TEWES A, ADLER K, MANTEUFFEL R. Molecular characterization of cDNAs encoding G protein α and β subunits and study of their temporal and spatial expression patterns in *Nicotiana glauca*. *Biochim Biophys Acta* 2000; **149**: 143-160.
- [49] KELLY WB, ESSER JE, SCHROEDER JI. Effects of cytosolic calcium and limited, possible dual effects of G protein modulators on guard cell inward potassium channels. *Plant J* 1995; **8**: 479-489.
- [50] KIM WY, CHEONG NE, LEE DC, JE DY, BAHK JD, HO MJ, LEE SY. Cloning and sequencing analysis of a full-length cDNA encoding a G protein α subunit, SGA1, from soybean. *Plant Physiol* 1995; **108**: 1315-1316.
- [51] KLEIN S, REUVENI H, LEVITZKI A. Signal transduction by a nondissociable heterotrimeric yeast G protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 3219-3223.

- [52] KNALL C, JOHNSON GL. G-Protein regulatory pathways: rocketing into the twenty-first century. *J Cell Biochem* 1998; **30-31(Suppl)**: 137-146.
- [53] KUSNETSOV VV, OELMÜLLER R. Isolation and characterization of cDNAs encoding the subunit β of heterotrimeric G proteins from *N. tabacum* (accession No. X98161). *Plant Physiol* 1996; **111**: 948.
- [54] KUSNETSOV VV, OELMÜLLER R. Isolation of cDNAs encoding the subunit α of heterotrimeric G proteins from *Lupinus luteus* (accession No. X99485). *Plant Physiol* 1996; **112**: 1399.
- [55] LAMBRIGHT DG, SONDEK J, BOHM A, SKIBA NP, HAMM HE, SIGLER PB. The 2.0 angstrom crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* 1996; **379**: 311-319.
- [56] LAPIK YR, KAUFMAN LS. The *Arabidopsis* cupin domain protein AtPirin1 interacts with the G protein α -subunit GPA1 and regulates seed germination and early seedling development. *Plant Cell* 2003; **15**: 1578-1590.
- [57] LEASE KA, WEN JQ, LI J, DOKE JT, LISCUM E, WALKER JC. A mutant *Arabidopsis* heterotrimeric G-protein β subunit affects leaf, flower, and fruit development. *Plant Cell* 2001; **13**(12): 2631-2641.
- [58] LEE YRJ, ASSMANN SL. *Arabidopsis thaliana* extra-large GTP-binding protein (AtXLG1): a new class of G-protein. *Plant Mol Biol* 1999; **40**: 55-64.
- [59] LEIN W, SAALBACH G. Cloning and direct G-protein regulation of phospholipase D from tobacco *Biochim Biophys Acta* 2001; **153**: 172-183.
- [60] LI B, TRUEB B. DRG represents a family of two closely related GTP-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1491**: 196-204.
- [61] LI W, ASSMANN SM. Characterization of a G-protein-regulated outward K^+ current in mesophyll cells of *Vicia faba* L. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 262-266.
- [62] MA H. GTP-binding proteins in plants: New members of an old family. *Plant Mol Biol* 1994; **26**: 1611-1636.
- [63] MA H, YANOFSKY MF, HUANG H. Isolation and sequence analysis of *TGA1* cDNAs encoding a tomato G protein α subunit. *Gene* 1991; **107**: 189-196.
- [64] MA H, YANOFSKY MF, MEYEROWITZ EM. Molecular cloning and characterization of *GPA1* a G-protein α subunit gene from *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 3821-3825.
- [65] MA H. Plant G proteins: The different faces of GPA1. *Curr Biol* 2001; **11**: R869-R871.
- [66] MA L, XU X, CUI S, SUN D. The presence of a heterotrimeric G protein and its role in signal transduction of extracellular calmodulin in pollen germination and tube growth. *Plant Cell* 1999; **11**: 1351-1363.
- [67] MARINISSEN MJ, GUTKIND JS. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 2001; **22**: 368-376.
- [68] MARSH JFI, KAUFMAN LS. Cloning and characterization of *PGA1* and *PGA2*: Two G protein α -subunits from pea that promote growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant J* 1999; **19**: 237-247.
- [69] MASON MG, BOTELLA JR. Completing the heterotrimer: Isolation and characterization of an *Arabidopsis thaliana* G protein γ -subunit cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 14784-14788.
- [70] MASON MG, BOTELLA JR. Isolation of a novel G-protein γ -subunit from *Arabidopsis thaliana* and its interaction with Gb. *Biochim Biophys Acta* 2001; **1520**: 147-153.
- [71] MENG EC, BOURNE H. Receptor activation: What does the rhodopsin structure tell us? *Trends Pharmacol Sci* 2001; **22**: 587-593.
- [72] MITTENHUBER G. Comparative genomics of prokaryotic GTP-binding proteins (the Era, Olg, IngA, ThdF (TrmE), YchF and YlhA families) and their relationship to eukaryotic GTP-binding proteins (the DRG, ARF, RAB, and RHO families). *J Mol Microbiol Biotechnol* 2001; **3**: 21-35.
- [73] MORRIS AJ, MALBON CC. Physiological regulation of G-protein-linked signaling. *Physiol Rev* 1999; **79**: 1373-1430.
- [74] MUNNIK T. Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends Plant Sci* 2001; **6**: 227-233.
- [75] NEER EJ. G proteins: Critical control points for transmembrane signals. *Protein Sci* 1994; **3**: 3-14.
- [76] OBRDLIK P, NEUHAUS G, MERCKLE T. Plant heterotrimeric G protein β subunit is associated with membranes via protein interaction involving coiled-coil formation. *FEBS Lett* 2000; **476**: 208-212.
- [77] OH P, SCHNITZER JE. Segregation of heterotrimeric G protein in cell surface microdomains. *Mol Biol Cell* 2001; **12**: 685-698.
- [78] OKAMOTO H, MATSUI M, DENG XW. Overexpression of the heterotrimeric G-protein α -subunit enhances phytochrome-mediated inhibition of hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2001; **13**(7): 639-1651.

- [79] PERROUD PF, DIOGON T, CREVECOUEUR M, GREPPIN H. Molecular cloning, spatial and temporal characterization of spinach SOGA1 cDNA, encoding an α subunit of G protein. *Gene* 2000; **248**: 191-201.
- [80] PEŠKAN T, OELMÜLLER R. Heterotrimeric G-protein β -subunit is localized in the plasma membrane and nuclei of tobacco leaves. *Plant Mol Biol* 2000; **42**: 915-922.
- [81] PEŠKAN T, WESTERMANN M, OELMÜLLER R. Identification of low-density Triton X-100-insoluble plasma membrane microdomains in higher plants. *Eur J Biochem* 2000; **267**: 6989-6995.
- [82] PIERCE KL, LEFKOWITZ RJ. Classical and new roles of β -arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Neurosci* 2001; **2**: 727-733.
- [83] PLAKIDOU-DYMOCK S, DYMOCK D, HOOLEY R. A higher plant seven-transmembrane receptor that influences sensitivity to cytokinins. *Curr Biol* 1998; **8**: 315-324.
- [84] PLAKIDOU-DYMOCK S, DYMOCK D, HOOLEY R. A higher plant seven-transmembrane receptor that influences sensitivity to cytokinins. *Curr Biol* 2001; **11**: 535.
- [85] POULSEN C, MAI XM, BORG S. A *Lotus japonicus* cDNA encoding an α subunit of a heterotrimeric G-protein. *Plant Physiol* 1994; **106**: 1453-1454.
- [86] REDDY AS, DAY IS. Analysis of the myosins encoded in the recently completed *Arabidopsis thaliana* genome sequence. *Genome Biology* 2001; **2**: 0024.1-0024.17.
- [87] RITCHIE S, GILROY S. Abscisic acid stimulation of phospholipase D in the barley aleurone G-protein-mediated and localized to the plasma membrane. *Plant Physiol* 2000; **124**: 693-702.
- [88] ROSS EM, WILKIE TM. GTPase activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu Rev Biochem* 2000; **69**: 795-827.
- [89] SAALBACH G, NATURA B, LEIN W, BUSCHMANN P, DAHSE I, NAGY F. The α -subunit of a heterotrimeric G-protein from tobacco, NtG α 1, functions in K⁺ channel regulation in mesophyll cells. *J Exp Biol* 1999; **50**: 53-61.
- [90] SANTAGATA S, BOGGON TJ, GOMEZ CA, ZHAO J, MYSZKA DG, SHAPIRO L. G-protein signalling through tubby proteins. *Science* 2001; **292**: 2041-2050.
- [91] SCHIEFELBEIN JW, SOMERVILLE C. Pollen tube and root hair tip growth is disrupted in a mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 1990; **2**: 235-243.
- [92] SCHULZ R. The pharmacology of phosducin. *Pharmacol Res* 2001; **43**: 1-10.
- [93] SEACK J, KRUSE J, MULLER WE. Evolutionary analysis of G-proteins in early metazoans: cloning of α and β subunits from sponge *Geodia cydonium*. *Biochim Biophys Acta* 1998; **141**: 93-103.
- [94] SEO H, CHOI CH, LEE S-Y, CHO M-J, BAHK J-D. Biochemical characteristics of a rice (*Oryza sativa* L. IR-36) G-protein α -subunit expressed in *Escherichia coli*. *Biochem J* 1997; **324**: 273-281.
- [95] SEO H-S, KIM H-Y, JEONG J-Y, LEE S-Y, CHO M-J, BAHK J-D. Molecular cloning and characterization of RGA1 encoding a G protein α subunit from rice (*Oryza sativa* L. IR-36). *Plant Mol Biol* 1995; **27**: 1119-1131.
- [96] SHEARS SB. The versatility of inositol phosphates as cellular signals. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1436**: 49-67.
- [97] SHIRASU K, NIELSEN K, PIFFANELLI P, OLIVER R, SCHULZE-LEFERT P. Cell-autonomous complementation of *mlo* resistance using a biolistic transient expression system. *Plant J* 1999; **17**: 293-299.
- [98] SIERRA DA, GILBERT DJ, HOUSEHOLDER D, GRISHIN NV, YU K, UKIDWE P, BARKER SA, HE W, WENSEL TG, OTERO G, BROWN G, COPELAND NG, JENKINS NA, WILKIE TM. Evolution of the regulators of G-protein signaling multigene family in mouse and human. *Genomics* 2002; **79**: 177-185.
- [99] SONDEK J, BOHM A, LAMBRIGHT DG, HAMM HE, SIGLER PB. Crystal structure of a G-protein $\beta\gamma$ dimer at 2.1 angstrom resolution. *Nature* 1996; **379**: 369-374.
- [100] SPRANG SR. G protein mechanisms: Insights from structural analysis. *Annu Rev Biochem* 1997; **66**: 639-678.
- [101] STRADER CD, FONG TM, TOTA MR, UNDERWOOD D, DIXON RAF. Structure and function of G protein-coupled receptors. *Ann Rev Biochem* 1994; **63**: 101-132.
- [102] TORRES-MARQUEZ ME, MACIAS-SIVA M, VEGA-SEGURA A. Identification of a functional Gs protein in *Euglena gracilis*. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1996; **115**: 233-237.
- [103] TRETYN A. Białka wiążące GTP: budowa i funkcje. *Post Biol Kom* 1996; **23**: 399-419.
- [104] TSENG TS, SWAIN SM, OLSZEWSKI NE. Ectopic expression of the tetratricopeptide repeat domain of SPINDLY causes defect in gibberellin response. *Plant Physiol* 2001; **126**: 1250-1258.
- [105] UEGUCHI-TANAKA M, FUJISAWA Y, KOBAYASHI M, ASHIKARI M, IWASAKI Y, KITANO H, MATSUOKA M. Rice dwarf mutant *dl*, which is defective in the α subunit of the heterotrimeric G protein, affects gibberellin signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 11638-11643.

- [106] ULLAH H, CHEN J-G, YOUNG JC, IM K-H, SUSSMAN MR, JONES AM. Modulation of cell proliferation by heterotrimeric G protein in *Arabidopsis*. *Science* 2001; **292**: 2066-2069.
- [107] ULLAH H, CHEN J-G, WANG S, JONES AM. Role of a heterotrimeric G protein in regulation of *Arabidopsis* seed germination. *Plant Physiol* 2002; **129**: 897-907.
- [108] ULLAH H, CHEN J-G, TEMPLE B, BOYES DC, ALONSO JM, DAVIS KR, ECKER JR, JONES AM. The β -subunit of the *Arabidopsis* G protein negatively regulates auxin-induced cell division and affects multiple developmental processes. *Plant Cell* 2003; **15**: 393-409.
- [109] VANDERBELD B, KELLY GM. New thoughts on the role of beta-gamma subunit in G protein signal transduction. *Biochem Cell Biol* 2000; **78**: 537-550.
- [110] VERSELE M, LEMAIRE K, THEVELEIN JM. Sex and sugar in yeast: two distinct GPCR systems. *Embo Rep* 2001; **2**: 574-579.
- [111] WALL MA, POSNER BA, SPRANG SR. Structural basis of activity and subunit recognition in G protein heterotrimers. *Structure* 1998; **6**: 1169-1183.
- [112] WANG H, LOCKWOOD SK, HOELTZEL MF. The ROOT HAIR DEFECTIVE 3 gene encodes an evolutionary conserved protein with GTP-binding motifs and is required for regulated cell enlargement in *Arabidopsis*. *Gene Develop* 1997; **11**: 799-811.
- [113] WANG XQ, ULLAH H, JONES AM, ASSMANN SM. G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Science* 2001; **292**: 2070-2072.
- [114] WEISS CA, HUANG H, MA H. Immunolocalization of the G protein α subunit encoded by the *GPA1* gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1993; **5**: 1513-1528.
- [115] WEISS CA, GARNAAT CW, MUKAI K, HU Y, MA H. Isolation of cDNAs encoding guanine nucleotide-binding protein β -subunit homologues from maize (ZGB1) and *Arabidopsis* (AGB1). *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 9554-9558.
- [116] WENDLER WM, KREMMER E, FORSTER R, WINNACKER EL. Identification of pirin, a novel highly conserved nuclear protein. *J Biol Chem* 1997; **272**: 8482-8489.
- [117] WESS J. G-protein-coupled receptors: Molecular mechanisms involved in receptor activity and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J* 1997; **11**: 346-354.
- [118] WILKIE TM, YOKOYAMA S. Evolution of the G protein α subunit multigene family. *Soc Gen Physiol* 1994; **49**: 249-270.
- [119] WISE A, THOMAS PG, CARR TH, MURPHY GA, MILLNER PA. Expression of the *Arabidopsis* G-protein GP α 1 Purification and characterization of the recombinant protein. *Plant Mol Biol* 1997; **33**: 723-726.
- [120] WU WD, ASSMANN SL. A membrane-delimited pathway of G-protein regulation of the guard cell inward K^+ channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 6310-6314.
- [121] YANG Z. Small GTPases: Versatile signaling switches in plants. *Plant Cell* 2002; **Suppl**: S375-S388.
- [122] ZHU X, CRAFT CM. The carboxyl terminal domain of phosphoducin functions as a transcriptional activator. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **270**: 504-509.

M. Godlewski

Zakład Morfogenezy Roślin, Katedra Cytologii i Cytochemii Roślin, Uniwersytet Łódzki,
90-237 Łódź, ul. Banacha 12/14,
e-mail: mgodlews@biol.uni.lodz.pl

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

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

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

Tabele, opisy schematów i rycin powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. **Barwne ryciny i zdjęcia są płatne.** Wymiary poszczególnych rycin, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmiennionej formie. Wszystkie załączniki, 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 odpowiadzą na list redaktora. Od stycznia 2003 r. Redakcja wprowadza **odpłatność 300,- zł za artykuł nie przekraczający 15 str. druku.**

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

Dołączono 2 kopie maszynopisu, tabel i rycin	Treść pracy nie była uprzednio publikowana,
Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę	nie została wysłana do innej redakcji
Jest zgoda osób, których informacje niepublikowane są zamieszczone w tekście	Dołączono kopię pracy wraz z rycinami na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM

Odpowiadam za całość pracy opisanej w załączonym maszynopisie

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

podpisy wszystkich autorów

TREŚĆ – CONTENT

Od Redakcji	2
Jubileusz Profesor Marii Olszewskiej	3
OLSZEWSKA M. J.: Struktura i ewolucja kompleksu centromer/kinetochor Structure and evolution of centromere/kinetochore complex	5
LEGOCKI A. B.: Biologia molekularna roślin ery postgenomowej Molecular biology of plants in postgenomic era	21
HEJNOWICZ Z.: Jak komórka wybiera kierunki przestrzeni w swoim rozwoju – znaczenie wielkości tensorowych How does a cell recognize spatial directions in its development – the importance of tensorial quantities	23
WODZICKI T. J.: Auksyna – czynnik komunikacji w procesach funkcjonalnego różnicowania układu ponadkomórkowego rośliny Auxin – the communication factor in the process of plant supracellular specialization	43
VORBRODT W.: Anatomia molekularna połączeń międzykomórkowych w śródbłonku naczyń krwionośnych mózgu Molecular anatomy of intercellular junctions in the brain vascular endothelium	57
KAWIAK J., HUS I., ROLIŃSKI J., HOSER G., DMOSZYŃSKA A.: Mechanizmy immunologiczne w nowotworach i próby wykorzystania ich w immunoterapii Immunological mechanisms in cancer and likelihood of their use in immunotherapy	67
STĘPLEWSKI Z.: Transgenic plant derived, biologically active proteins for immunotherapy of minimal residual cancer	79
KRAJEWSKA W. M., MASŁOWSKA I.: Kaweolina, kaweole i transformacja nowotworowa Caveolin, caveole and neoplastic transformation	85
MALUSZYŃSKA J., SIWIŃSKA D.: Wielkość genomu roślinnego – Plant genome size	101
KUTA E., DUBAS E., MADEJ A.: Chromosomy holokinetyczne u roślin Holokinetic chromosomes in plants	115
CHARZYŃSKA M.: Programowana śmierć komórkowa (PCD) w rozwoju roślin wyższych Programmed cell death in higher plant development	135
KONONOWICZ A. K., WIKTOREK-SMAGUR A., HNATUSZKO K.: Cytochemia w biotechnologii roślin – systemy reporterowe z wykorzystaniem genów kodujących β -glukuronidazę (GUS) i zielono fluoryzujące białko (GFP) Cytochemistry in plant biotechnology – application of β -glucuronidase (GUS) and green fluorescent protein (GFP)-based reporter systems	137
MASZEWSKI J., RYBACZEK D.: Mechanizmy kondensacji chromosomów Mechanisms of chromosome condensation	145
KWIATKOWSKA M.: Zmiany ultrastruktury i rozmieszczenia plazmodesm a proces dyferencjacji na przykładzie anterydiostanów glonów z rodzaju <i>Chara</i> Changes in the ultrastructure and occurrence of plasmodesmata versus the differentiation process of the <i>Chara</i> species antheridia	157
LIPIŃSKA A.: Potencjalne znaczniki białkowe nowotworów złośliwych tarczycy Potential protein markers for thyroid cancers	175
KILIAŃSKA Z. M.: Rola cynku w modulacji procesu apoptozy Role of zinc in the modulation of apoptosis	189
GODLEWSKI M., DOMAŃSKA A., ANIOŁ P.: Szlak sygnalizacyjny heterotrimerowych białek G u roślin – Heterotrimeric G protein signaling pathway in plants	209