

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
BIOLOGII  
KOMÓRKI

POLISH  
ANATOMICAL  
SOCIETY

POLISH SOCIETY  
FOR CELL  
BIOLOGY

VOL. 27, ISSUE 3/2000  
(293–464)

Postępy  
Biologii  
Komórki

Advances  
in Cell  
Biology

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

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

Redaguje Kolegium – Editors:

Szczepan BILINSKI – biologia rozwoju, embriologia, cytoszkielet, połączenia międzykomórkowe – developmental biology, embryology, cytoskeleton, cell junctions – *Inst. Zoologii UJ, 30-060 Kraków, Ingardena 6, Lilla HRYNIEWIECKA – energetyka komórki, mitochondria – cell energetics, mitochondria – Zakład Bioenergetyki, Uniwersytetu im. A. Mickiewicza, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*

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

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

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

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

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

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

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

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

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

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

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

*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.

## W tym Zeszycie Postępów Biologii Komórki

- W komórkach ssaków opłaszczone klatryną pęcherzyki uczestniczą w zależnym od receptorów procesie endocytozy. Układ kontrolujący tworzenie pęcherzyków, transport i fuzję wykazuje konserwatyzm ewolucyjny i zależy od sygnału tyrozynowego (sekwencja YXXØ) oraz dileucynowego (LL). Więcej na ten temat można znaleźć na stronie 295.
- Udział komórek tłuszczowych w regulacji angiogenezy omówiono na stronie 343. Opisano wpływ proteaz serynowych komórek tłuszczowych na substancję międzykomórkową, co może też mieć znaczenie w procesie unaczyniania guzów nowotworowych. Niestety Autorzy nie znają artykułów na temat komórek tłuszczowych wcześniej publikowanych w „Postęпах Biologii Koórki” (PBK 1997; 24:127; 1999; 26: 427).
- W regulacji cyklu komórkowego biorą udział kinazy białkowe zależne od cyklin (CDK) oraz cykliny (str. 377). Te aktywności białkowe hamują inhibitory CDK. Opisano też drobnocząsteczkowe inhibitory CDK, które mogłyby być użyte jako leki hamujące proliferację komórek. Wypróbowano je na zwierzętach i trwają ich badania kliniczne, aby określić, w jakim stopniu mogą być wykorzystane w leczeniu nowotworów.
- Komórki aleuronowe izolowane z nasion zbóż oraz uzyskane z nich protoplasty są użytecznym układem w doświadczalnych badaniach odbierania i transdukcji sygnału giberelinowego. Więcej na ten temat można przeczytać na stronie 397.







## WIELORAKIE FORMY PĘCHERZYKÓW OPŁASZCZONYCH KLATRYNĄ W ZALEŻNYM OD RECEPTORÓW TRANSPORCIE I SEGREGACJI MAKROMOLEKUŁ

### DIVERSE FORMS OF CLATHRIN COATED VESICLES IN RECEPTOR MEDIATED TRANSPORT AND SEGREGATION OF MACROMOLECULES

Katarzyna ROSZEK, Jadwiga GNIOT-SZULŻYCKA

Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej,  
Zakład Biochemii, Toruń

*Streszczenie:* W komórkach tkanek ssaków opłaszczone klatryną pęcherzyki uczestniczą w zależnych od receptorów procesach endocytozy, transportu i sortowania makromolekuł zarówno z aparatu Golgiego do systemu endocytarnego, jak również z błony plazmatycznej do endosomów i lizosomów. Złożony system białek kontrolujący wpuklanie pęcherzyków, transport, a następnie fuzję wykazuje znaczny konserwatyzm na szlaku endocytozy i sortowania. Endocytoza i wewnątrzkomórkowy transport zależne są odpowiednio od sygnału tyrozynowego (YXXØ) i dileucynowego (LL). Procesy te obejmują: interakcję liganda z receptorem, asocjację kompleksu ligand-receptor z odpowiednimi białkami adaptorowymi (AP-1, AP-2, AP-3, AP-4), opłaszczenie klatryną lub klatrynopodobnymi białkami, wpuklenie pęcherzyka i transport do miejsc przeznaczenia. W niniejszym artykule przedstawiono molekularne mechanizmy procesu endocytozy zależnej od receptorów i sortowania, w szczególności te zachodzące z udziałem białek adaptorowych AP-1 i AP-2.

(*Postępy Biologii Komórki* 2000; 27: 295–314)

*Słowa kluczowe:* endocytoza, transcytoza, klatryna, białka adaptorowe

*Summary:* In mammalian cells the clathrin coated vesicles participate in receptor mediated internalization, transport and sorting of macromolecules from the trans Golgi network to the endocytic pathway as well as from the plasma membrane to endosomes and lysosomes. The complex protein machinery controlling vesicle formation, transport and fusion are significantly conserved between the endocytic and sorting pathways. The internalization and intracellular transport are based respectively on tyrosine (YXXØ) and dileucine (LL) signals. The overall processes include: interaction between the ligand and

the membrane receptor, association of the ligand-receptor complex with appropriate adaptor protein (AP-1, AP-2, AP-3, AP-4), coating with clathrin or clathrin-like proteins, budding of the vesicle, sorting and interaction with the target membrane. Advances in understanding the molecular mechanisms of the receptor mediated endocytosis and sorting processes, especially those connected with AP-1 i AP-2 adaptor complexes are described in this paper.

(*Advances of Cell Biology* 2000; 27: 295–314)

*Key words:* endocytosis, transcytosis, clathrin, adaptor proteins

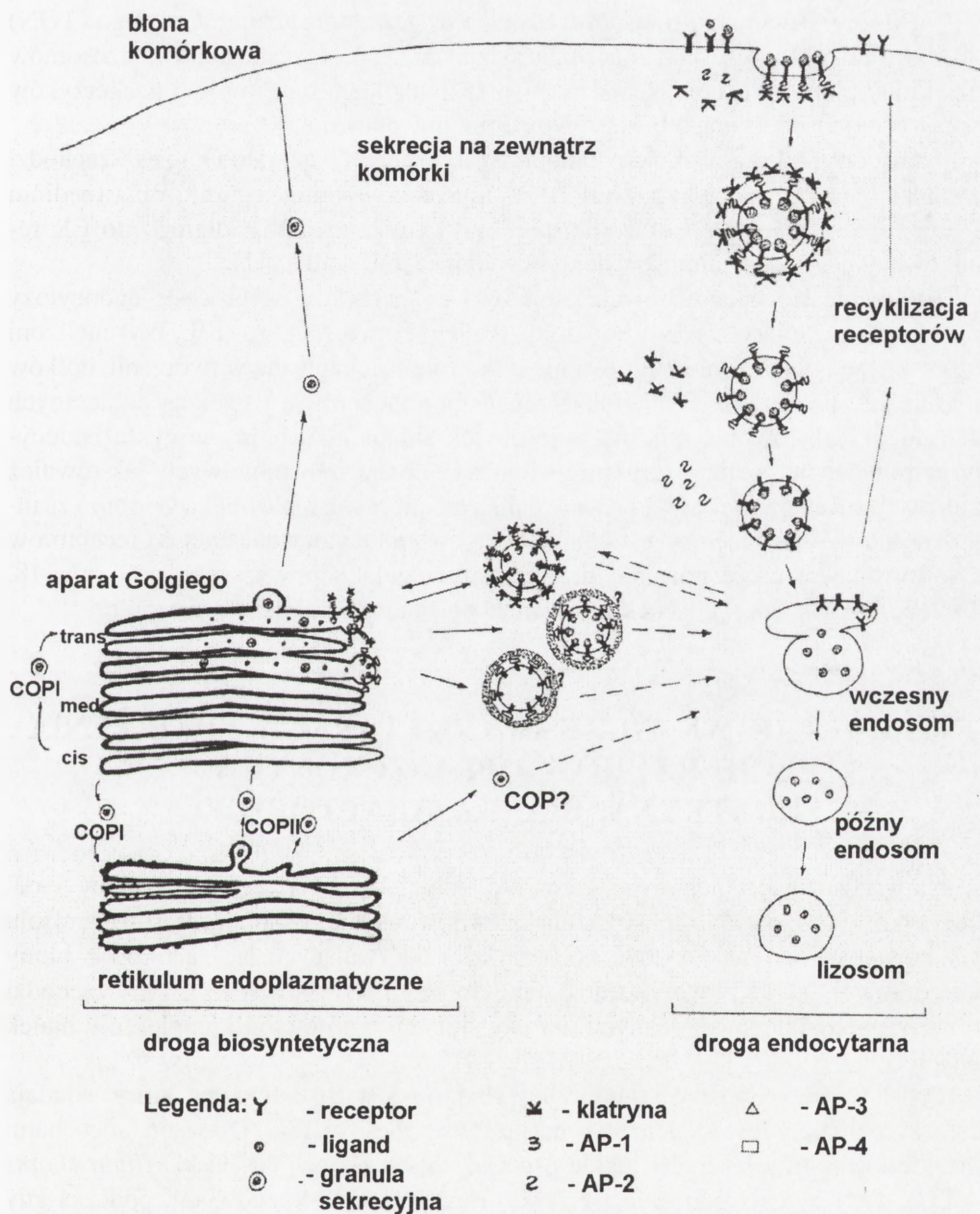
*Wykaz skrótów:* **TGN** – region trans aparatu Golgiego, **LDL** – lipoproteina o niskiej gęstości, **M6P** – mannozo-6-fosforan, **MPR<sup>CI</sup>** – receptor M6P niezależny od kationów dwuwartościowych, **MPR<sup>CD</sup>** – receptor M6P zależny od kationów dwuwartościowych, **IGF II** – insulinopodobny czynnik wzrostu, **ASGP** – asjaloglikoproteina, **EGF** – naskórkowy czynnik wzrostu, **HSC** (ang. *heat shock cognate*) – białka spokrewnione z białkami szoku termicznego HSP, **AP** – kompleks białek adaptorowych, **TGN38** – integralne białko błony kom. i błon TGN, marker błon TGN, **lamp**, **lgp** – białka integralne błony lizosomalnej, **Fc** – fragment immunoglobuliny G, **MHC** (ang. *major histocompatibility complex*) – główny kompleks zgodności tkankowej, **ARF** – czynnik ADP-rybozylacji, **GTPγS** – guanozyno 5-[γ-tio]trifosforan, **BFA** – brefeldyna A, **PtdIns(3)P** – fosfatydyloinozytolo-3-fosforan, **PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>** – fosfatydyloinozytolo-4,5-difosforan, **PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>** – fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforan, **Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>** – inozytolo-1,4,5-trifosforan, **Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>** – inozytolo-1,3,4,5-tetrafosforan

## WSTĘP

Endocytoza zależna od receptorów, zachodząca z udziałem pęcherzyków opłaszczonych klatryną jest jednym z procesów umożliwiających komórkom pobranie ze środowiska zewnętrznego substancji niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania (rys. 1) [13, 21, 24, 30, 41, 47]. Selektywność pobierania substancji zewnątrzkomórkowych zapewniają specyficzne dla określonych ligandów receptory na powierzchni błony komórkowej, na przykład receptor lipoprotein o niskiej gęstości (LDL), receptor transferyny, receptor asjaloglikoprotein (ASGP), receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGF), receptor mannozo-6-fosforanu i insulinopodobnego czynnika wzrostu (M6P/IGF II) [6, 8, 9, 14, 16, 21, 22, 35].

W wielkim uproszczeniu proces inicjacji endocytozy zależnej od receptorów polega na interakcji liganda z receptorem i gromadzeniu się kompleksów ligand-receptor w zagłębieniach plazmalemmy, które od strony cytosolowej wiążą klatrynę i inne specyficzne białka opłaszczenia [20, 24]. Kolejny etap procesu endocytozy to wpuklanie się opłaszczonych dołków do wnętrza komórki i oderwanie się ich od błony komórkowej w postaci pęcherzyków, niosących w swym świetle kompleksy ligand-receptor [13, 21]. Dalszy etap to zrzucenie opłaszczenia, umożliwiające pęcherzykowi połączenie się z endosomem, gdzie dochodzi do obniżenia pH. Powoduje to dysocjację kompleksu ligand-receptor, a w szczególnych przypadkach, na przykład przy endocytozie transferyny, dochodzi do oddzielenia żelaza od transportującej je glikoproteiny. W większości przypadków endocytozy ostatecznym miejscem przeznaczenia ligandów jest lizosom, gdzie podlegają one enzymatycznej degradacji;





RYSUNEK 1. Procesy transportu z udziałem opłaszczonych pęcherzyków



receptory natomiast cyklicznie powracają z powrotem do błony komórkowej lub także podlegają degradacji [47].

Niektóre mechanizmy transportu białek z cystern trans aparatu Golgiego (TGN) do określonych miejsc przeznaczenia i działania, np. do endosomów, lizosomów czy błony plazmatycznej, zachodzą również z udziałem receptorów i pęcherzyków opłaszczonych klatryną lub klatrynopodobnymi białkami.

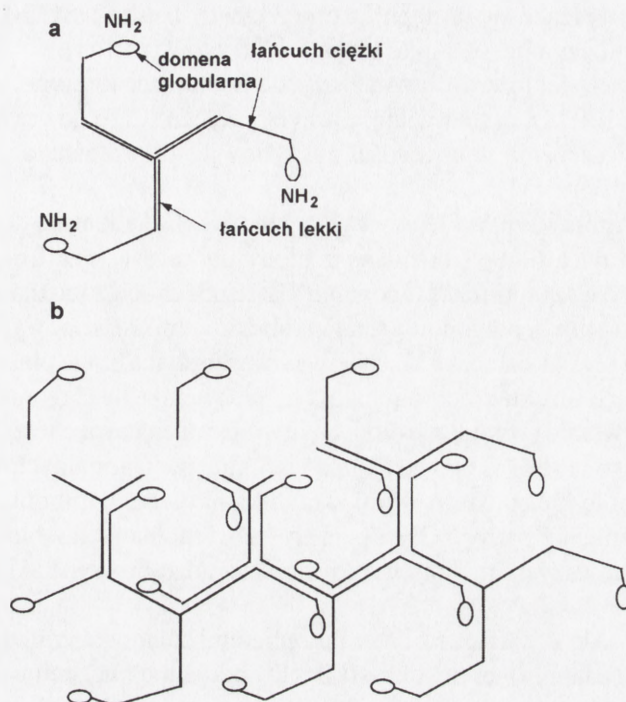
Transport białek z retikulum endoplazmatycznego do aparatu Golgiego zachodzi z udziałem pęcherzyków typu COP II, zaś transport w obrębie obszarów cis, medium i trans aparatu Golgiego oraz transport wsteczny z aparatu Golgiego do ER realizowany jest z udziałem pęcherzyków typu COP I [27, 42].

Tworzenie się opłaszczonych dołków i pęcherzyków w procesie endocytozy opisali po raz pierwszy w 1964 roku Roth i Porter [cyt. za 17]. Wyszuli oni hipotezę, że opłaszczenie odgrywa nie tylko rolę mechaniczną w tworzeniu dołków i odcinaniu pęcherzyków, ale także zapewnia koncentrację i selekcję pobieranych substancji, jak również minimalizuje ubytek składników błony w cyklu endocytarnym. Obecnie poznano strukturę wielu receptorów transbłonowych, jak również zidentyfikowano molekuły (klatryna, białka adaptorowe, małe białka G i inne) zaangażowane w realizację poszczególnych etapów endocytozy zależnej od receptorów i sortowania, a także poznano mechanizmy regulacji powyższych procesów [8, 15, 17, 18, 30, 36, 41]. Niektóre z nich opisano w niniejszym artykule.

## **INTERAKCJE WE WCZESNYCH ETAPACH TWORZENIA PĘCHERZYKÓW OPLASZCZONYCH – KLATRYNA, BIAŁKA ADAPTOROWE**

Najwcześniej i najlepiej poznanym składnikiem opłaszczonych dołków i pęcherzyków jest klatryna. Opłaszczenie klatrynowe asocjuje z błoną od strony cytosolu i stanowi zewnętrzną warstwę pęcherzyków odrywających się zarówno z błony komórkowej, jak i z błon cystern aparatu Golgiego. Przyłączenie klatryny zachodzi przy współudziale specyficznych dla określonych typów błon kompleksów białek adaptorowych (AP) [17, 18, 20, 24, 36, 41].

Podstawową jednostką strukturalną klatryny jest triskelion, na który składają się trzy polipeptydowe łańcuchy o masie cząsteczkowej 180 kD zwane łańcuchami ciężkimi oraz trzy łańcuchy lekkie o masie cząsteczkowej 30–36 kD (*light chains* – LC). Trzy łańcuchy ciężkie łączą się fragmentami C-końcowymi, podczas gdy ich N-końce pozostają wolne i tworzą globularne domeny. Łańcuchy lekkie układają się w triskelionie równolegle do regionów proksymalnych łańcuchów ciężkich klatryny (rys. 2a). Łańcuch ciężki klatryny jest białkiem o konserwatywnej budowie i znacznej homologii międzygatunkowej. Pełni on rolę strukturalną w tworzeniu



RYSUNEK 2. Struktura klatryny: a – triskelion, b – siateczka klatrynowa opłaszczająca błonę; struktura triskelionów klatryny jest powszechnie przedstawiana w licznych artykułach przeglądowych [13,17, 41], schematy te są odzwierciedleniem pierwszych obrazów mikroskopowych opublikowanych w 1980 roku przez Heusera i Evans [15]

siatki klatrynowej. W obrębie łańcucha ciężkiego zidentyfikowano dwa miejsca interakcji z kompleksami białek adaptorowych [17, 41].

Łańcuch lekki występuje w dwóch formach:  $LC_a$  i  $LC_b$ , będących produktami odrębnych genów, wykazujących 60% homologii. Zarówno  $LC_a$ , jak i  $LC_b$  wiążą się z podobnym powinowactwem z łańcuchami ciężkimi klatryny, ich obecność nie jest jednak warunkiem koniecznym dla utworzenia triskelionu oraz nie wpływa na wiązanie się AP z łańcuchami ciężkimi triskelionu klatryny [17, 41]. Takie właściwości łańcuchów lekkich, jak: fosforylacja reszt seryny czy obecność miejsc wiążących jony  $Ca^{2+}$  i kalmodulinę, sugerują ich rolę regulatorową w procesie asocjacji triskelionów [41]. Łańcuchy lekkie klatryny wykazują też zdolność wiązania z ATP-azą HSC 70 demontującą klatrynę.

Badania nad mechanizmami demontażu opłaszczenia klatrynowego doprowadziły do stwierdzenia udziału ATP-azy HSC 70 w tym procesie [17]. Hydroliza ATP przez HSC 70 jest niezbędna dla uwolnienia triskelionów klatryny z powierzchni



pęcherzyka, a tworzące się następnie kompleksy triskelion-HSC 70 uniemożliwiają ponowne organizowanie się opłaszczenia klatrynowego [41].

Niezbędnym kofaktorem dla ATP-azy demontującej klatrynę jest auksylina – białko o m. cz. 100 kD, umożliwiające przyłączenie HSC 70 do cząsteczek klatryny. Dysocjacja opłaszczenia w obecności auksyliny jest niezależna od udziału lekkich łańcuchów klatryny [51].

Badania Heusera i Evans [15] wykazały, że triskeliony klatryny tworzą regularną siatkę opłaszczającą błonę i odcinany z błony pęcherzyk (rys. 2b). W skład siatki wchodzi przede wszystkim heksagonalne klateczki, chociaż można stwierdzić także obecność penta- lub heptagonów. Analiza obrazów mikroskopowych doprowadziła do wniosku, że płaska siateczka klatrynowa opłaszczająca błonę plazmatyczną składa się wyłącznie ze struktur heksagonalnych. Konwersja heksagonów w pentagony inicjuje zakrzywienie i wpuklenie błony, ułatwiając odcięcie pęcherzyka. W odciętych pęcherzykach stwierdza się większą ilość struktur pentagonalnych w opłaszczeniu.

Różnice pomiędzy podstawowymi składnikami białkowymi opłaszczenia pęcherzyków odcinanych z błony TGN a pęcherzyków odcinanych z błony komórkowej, dotyczą przede wszystkim kompleksów białek adaptorowych AP-1 i AP-2 (tab. 1, rys. 3).

Kompleksy AP-1 i AP-2 są heterotetramerami zbudowanymi z dwóch dużych podjednostek (adaptyn) o m. cz. ~100 kD, podjednostki średniej o m. cz. ~50 kD i podjednostki małej o m. cz. ~20 kD. Użycie przeciwciał przeciwko dużym podjednostkom kompleksów AP-1 i AP-2 pozwoliło na wykazanie obecności kompleksu AP-1 w obszarze cystern aparatu Golgiego szczególnie w regionie trans (TGN), podczas gdy kompleks AP-2 występuje w połączeniu z błoną komórkową [8, 17, 18, 24, 36, 41].

W skład kompleksu AP-1 wchodzi dwie duże podjednostki  $\gamma$  i  $\beta_1$  (adaptyny) o m. cz. ~100 kD związane z podjednostką średnią  $\mu_1$  o m. cz. 47 kD oraz podjednostką małą  $\sigma_1$  o m. cz. 19 kD. Kompleks AP-2 jest złożony odpowiednio z podjednostek  $\alpha$  i  $\beta_2$  o m. cz. ~100 kD oraz podjednostki  $\mu_2$  o m. cz. 50 kD i  $\sigma_2$  o m. cz. 17 kD [18] (tab. 1, rys. 3).

Badania wykorzystujące techniki inżynierii genetycznej pozwoliły na ustalenie sekwencji aminokwasów poszczególnych podjednostek, a następnie na ich porównanie i określenie homologii między odpowiadającymi sobie podjednostkami obu kompleksów białek adaptorowych. Wśród najwcześniej poznanych  $\alpha$ -adaptyn kompleksu AP-2 wyróżnia się dwie izoformy:  $\alpha_A$  i  $\alpha_C$  wykazujące 84% homologii. Masa cząsteczkowa tych form wynosi odpowiednio 108 i 104 kD. Różnica między nimi dotyczy także występowania:  $\alpha_A$ -adaptyna występuje wyłącznie w mózgu, podczas gdy obecność  $\alpha_C$  stwierdzono w różnych tkankach ssaków [17].

Wśród  $\beta$ -adaptyn wyróżnia się dwie formy związane z różnymi kompleksami adaptorowymi AP. Podjednostka  $\beta_1$  wchodząca w skład AP-1 jest w 84% identyczna z podjednostką  $\beta_2$  kompleksu AP-2 [36]. Podjednostki  $\beta_2$  wyizolowane z komórek



TABELA 1. Kompleksy adaptorowe – budowa podjednostkowa i niektóre właściwości

Kom- pleks	Rodzaj transportu	Koloka- lizacja z klatryną	Wrażli- wość na BFA	Wymia- na GTP/ GDP	Łańcuchy duże	Łańcuch średni	Łańcuch mały
AP-1	TGN → endosom (lizosom)	+	+	+	$\gamma$ $\beta_1$	$\mu_1$	$\sigma_1$
AP-2	endocytoza	+	-	-	$\alpha_A$ $\alpha_C$ $\beta_2$	$\mu_2$	$\sigma_2$
AP-3	TGN → endosom (lizosom)	-	+	+	$\delta$ $\beta_3A$ $\beta_3B$	$\mu_3A$ $\mu_3B$	$\sigma_3A$ $\sigma_3B$
AP-4	TGN → endosom (lizosom)	-	+	+	$\epsilon$ $\beta_4$	$\mu_4$	$\sigma_4$

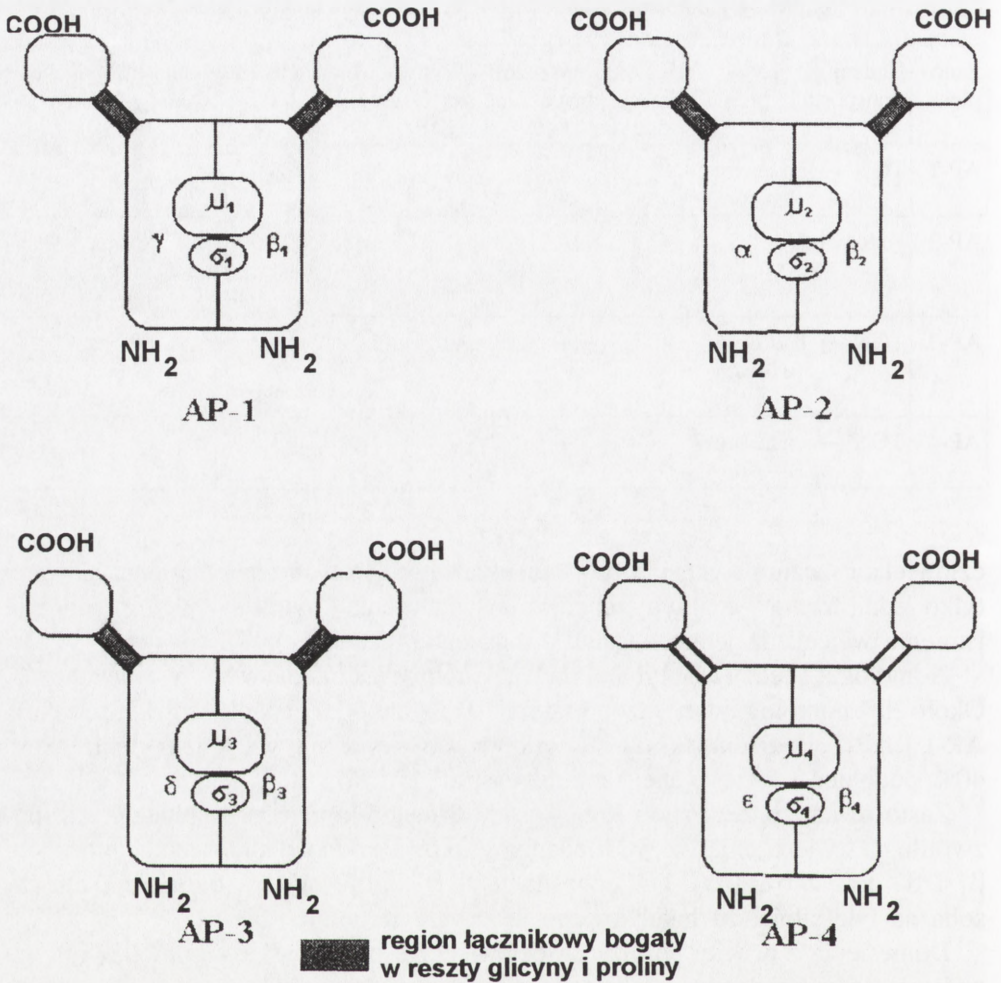
człowieka i szczura wykazują 100% identyczności. Dotychczas scharakteryzowano tylko jedną formę  $\gamma$ -adaptyny, chociaż doświadczenia (*Southern blotting*) sugerują istnienie więcej niż jednego genu kodującego  $\gamma$ -adaptyny [17].

Homologia między adaptynami  $\alpha$  i  $\beta_2$ , podobnie jak między  $\gamma$  i  $\beta_1$  jest nieznaczną. Około 25% homologii stwierdzono natomiast między  $\gamma$ - i  $\alpha$ -adaptynami kompleksów AP-1 i AP-2. Podjednostki  $\mu_1$  i  $\mu_2$  oraz  $\sigma_1$  i  $\sigma_2$  wykazują względem siebie około 40% podobieństwa sekwencji aminokwasów [17, 36].

Zastosowanie przez Page i Robinson [34] metod immunoprecypitacyjnych pozwoliło na stwierdzenie, że  $\gamma$ - i  $\alpha$ -adaptyny wiążą się odpowiednio z podjednostkami  $\beta_1$  i  $\beta_2$  oraz z  $\sigma_1$  i  $\sigma_2$ . Podjednostki  $\mu_1$  i  $\sigma_1$  oraz  $\mu_2$  i  $\sigma_2$  oddziałują między sobą na tyle silnie, że lokalizowano je zawsze wspólnie.

Doniesienia z drugiej połowy lat dziewięćdziesiątych wskazują między innymi na istnienie kompleksów białek spokrewnionych z adaptorami (*adaptor-related proteins*).

Pierwszymi odkrytymi białkami spokrewnionymi z adaptorami były homologi podjednostki średniej  $\mu$  nazwane początkowo p47A i p47B ze względu na ich masy cząsteczkowe, obecnie opatrzone nazwami  $\mu_3A$  i  $\mu_3B$ . Niemal równocześnie zidentyfikowano w komórkach nerwowych homolog dużej podjednostki  $\beta$ , białko  $\beta$ -NAP (*neuronal adaptin-like protein*) o masie cząst. 120 kD, zwany obecnie  $\beta_3B$  [17, 46]. Eksperymenty z użyciem przeciwciał przeciwko rekombinowanym podjednostkom  $\mu_3$  i  $\beta_3$  wykazały, że są one częścią tego samego heterotetramerycznego kompleksu wraz z towarzyszącymi im, nieznanymi wówczas białkami o m. cz. ~160 kD i ~25 kD. Podobieństwo struktury nowo odkrytego heterotetrameru do kompleksów AP-1 i AP-2 spowodowało, że kompleks ten nazwano AP-3 [45] (rys. 3). Ciekawą różnicę stanowi fakt, że kompleks ten nie wykazuje podobnej



RYСУNEK 3. Kompleksy białek adaptorowych [zmodyfikowane wg 13, 17, 18, 36, 46]

lokalizacji jak klatryna [11]. Niewykluczone jest natomiast, że miejsce klatryny zajmuje inne białko strukturalne o podobnej funkcji, choć niekoniecznie homologiczne. Kompleks AP-3 wiąże się, podobnie jak AP-1, z błoną TGN i prawdopodobnie uczestniczy w sortowaniu białek do endosomów i lizosomów.

Dalsze badania doprowadziły do poznania dwóch pozostałych podjednostek kompleksu AP-3. Drugą podjednostkę dużą nazwano δ (125 kD). Homologia podjednostki δ z odpowiadającymi jej podjednostkami γ i α kompleksów AP-1 i AP-2



wynosi około 15%.  $\delta$ -adaptyna wykazuje trójdomenową strukturę: N-końcowy fragment białka stanowi część rdzeniową kompleksu AP-3, łącznik bogaty jest w reszty proliny i glicyny oraz w aminokwasy kwaśne i zasadowe, C-koniec łańcucha polipeptydowego tworzy niewielką domenę globularną.

Białko  $\beta$ -NAP ( $\beta_3B$ ), specyficzne dla komórek nerwowych, oraz jego homolog  $\beta_3A$  powszechny w różnych tkankach, wykazują około 22% identyczności z odpowiadającymi im podjednostkami  $\beta_1$  i  $\beta_2$  z kompleksów AP-1 i AP-2. Najwyższy stopień homologii dotyczy domeny N-końcowej, podczas gdy region łącznika i domena C-końcowa wykazują niższy stopień homologii [46].

Podjednostka  $\sigma$  (22 kD) występuje w postaci dwóch izoform:  $\sigma_3A$  i  $\sigma_3B$ , które wykazują największą homologię w stosunku do swych odpowiedników  $\sigma_1$  i  $\sigma_2$  w kompleksach AP-1 i AP-2, sięgającą 30% [11].

Kompleks AP-3 jest wrażliwy na działanie brefeldyny A (BFA), zarówno *in vitro*, jak *in vivo* [46]. Obecność podjednostki  $\mu_3$  analogicznej z  $\mu_1$  i  $\mu_2$  kompleksów AP-1 i AP-2 wskazuje, że może ona odgrywać rolę w segregacji białek zawierających sygnał tyrozynowy. Wykazano wiązanie podjednostki  $\mu_3$  z domeną cytosolową białek TGN38 i Igp120, zawierającą sekwencję sygnałową z tyrozyną [11, 48]. Kompleks AP-3 pełni przypuszczalnie rolę w transportowaniu białek z udziałem pęcherzyków opłaszczonych z TGN do endosomów i lizosomów. Chociaż dla tej drogi transportu znane jest już opłaszczenie klatryna/AP-1, jednak jest możliwe, że alternatywne opłaszczenie z udziałem AP-3 odpowiada za segregację innego rodzaju cząsteczek [46].

AP-3 nie jest jedynym nowym kompleksem adaptorowym odkrytym w ostatnich latach. W 1997 roku zidentyfikowano białko  $\mu$ ARP2 (obecnie  $\mu_4$ ), które można zaliczyć do homologów podjednostek  $\mu$ . Dalsze badania zaowocowały poznaniem kolejnego kompleksu białek adaptorowych nazwanego AP-4 [12].

Kompleks AP-4 zbudowany jest, podobnie jak inne heterotetramery kompleksów AP, z dwóch podjednostek dużych  $\epsilon$  i  $\beta_4$  o m. cz. odpowiednio 140 i 83 kD, podjednostki średniej  $\mu_4$  (50 kD) oraz podjednostki małej  $\sigma_4$  (17 kD) (rys. 3). N-końcowe domeny podjednostek  $\epsilon$  i  $\beta_4$  wraz z podjednostkami  $\mu_4$  i  $\sigma_4$  tworzą rdzeń kompleksu AP-4, podczas gdy C-końce podjednostek  $\epsilon$  i  $\beta_4$  formują małe domeny globularne połączone z rdzeniem elastycznym łącznikiem. Podjednostka  $\beta_4$  wykazuje wysoką homologię z innymi podjednostkami  $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ) jedynie w obrębie N-końca białka, uczestniczącego w wiązaniu z pozostałymi podjednostkami kompleksu adaptorowego AP-4 [12]. Stwierdzono, że  $\mu_4$  wykazuje 31% homologii z  $\mu_1$  i  $\mu_2$  oraz około 24% homologii z  $\mu_3$ . Podjednostka  $\mu_4$  wiąże się słabo z białkami TGN38 i Igp120 zawierającymi sekwencję sygnałową z tyrozyną [48].

Kompleks AP-4 zlokalizowany został w obrębie błon TGN i występuje powszechnie w komórkach różnych tkanek ssaków. Wiązanie z błoną TGN jest hamowane przez brefeldynę A. Nie stwierdzono kolokalizacji AP-4 z klatryną, stąd



należy oczekiwać, że podobnie jak w przypadku AP-3 rolę klatryny spełnia inne białko [12]. Zbiorcze dane o podjednostkowym składzie kompleksów adaptorowych oraz niektórych ich właściwościach przedstawiono w tabeli 1.

Zidentyfikowanie poszczególnych podjednostek kompleksów białek adaptorowych oraz poznanie sposobu, w jaki wiążą się ze sobą, pozwoliło na określenie struktury kompleksów adaptorowych (rys. 3). Kompleksy AP-1, AP-2, AP-3 i AP-4 wykazują podobną organizację. Wyizolowane heterotetramery składają się z części rdzeniowej, zawierającej N-końcowe fragmenty dwóch dużych łańcuchów polipeptydowych adaptyn  $\gamma$  i  $\beta_1$ ,  $\alpha$  i  $\beta_2$ ,  $\delta$  i  $\beta_3$  oraz  $\epsilon$  i  $\beta_4$ , z którymi wiążą się odpowiednie podjednostki średnie  $\mu$  i małe  $\sigma$ . C-końcowe fragmenty adaptyn formują małe domeny globularne, po dwie w obrębie każdego tetrameru, które połączone są z częścią rdzeniową krótkimi elastycznymi łącznikami. Odcinki łącznikowe zawierają szczególnie dużo reszt glicyny i proliny i są wrażliwe na proteolizę [18, 36, 46].

Kompleksy białek adaptorowych AP-1 i AP-2 stanowią pomost łączący cząsteczki klatryny z błoną TGN lub z błoną komórkową, wiążąc się zarówno z klatryną, jak i z cytosolową domeną receptorów błonowych. Rola poszczególnych podjednostek wchodzących w skład kompleksów AP nie jest jednoznaczna. Podjednostki  $\beta_1$  i  $\beta_2$  kompleksów AP-1 i AP-2 łączą się z cząsteczkami klatryny zarówno *in vitro*, jak *in vivo*. Regionem bezpośrednio zaangażowanym w wiązanie klatryny jest region łącznika  $\beta$ -adaptyn [44].

Podjednostki  $\gamma$  i  $\alpha$  kompleksów AP-1 i AP-2 są zaangażowane w liczne interakcje w obrębie komórki [17]. Podjednostka  $\alpha$  AP-2 wiąże się z klatryną, amfifizyną, Eps 15, Grb2 i fosfatydylinozitolami. Szczególnie interesujący jest fakt, że  $\alpha$  AP-2 jest do tej pory jedynym białkiem specyficznie oddziałującym z fosfatydylinozitol-3-fosforanem (PtdIns(3)P) [10]. Przypuszcza się, iż przyłączenie fosfatydylinozitolu pozwala na utrzymanie się AP-2 w formie wolnej w cytosolu oraz zapobiega samoagregacji i wytwarzaniu się pustych pęcherzyków. PtdIns(3)P zwiększa także rozpoznawanie sygnału internalizacji YQRL przez podjednostkę  $\mu_2$  AP-2 [37].

Badania nad białkami chimerowymi pozwoliły na stwierdzenie, że domeny N-końcowe (a dokładniej ich 200-aminokwasowe fragmenty) podjednostek  $\gamma$  i  $\alpha$  decydują o tym, czy podjednostki te asocjują z  $\mu_1$  i  $\sigma_1$  czy też z  $\mu_2$  i  $\sigma_2$ , a tym samym o rodzaju tworzonego kompleksu i kierowaniu go do właściwej błony [34]. Brak natomiast danych o roli analogicznych podjednostek  $\delta$  i  $\epsilon$  kompleksów AP-3 i AP-4. Uzyskano dowody, że domeny C-końcowe podjednostek  $\mu_1$  i  $\mu_2$ , a także  $\mu_3$  i  $\mu_4$  są zaangażowane w wiązanie z odpowiednimi domenami cytosolowymi receptorów błonowych i uczestniczą w rozpoznawaniu sygnałów sortowania z resztą tyrozyny [5, 11, 33, 48].

Niewiele wiadomo dotychczas na temat roli podjednostek  $\beta$ , chociaż wysoki stopień ich homologii sugerować może ważną funkcję, na przykład pomoc w kierowaniu kompleksu AP do właściwej błony [34].

## SYGNAŁY WARUNKUJĄCE INTERNALIZACJĘ I SORTOWANIE

Efektywny proces endocytozy bądź właściwy transport wewnątrzkomórkowy w opłaszczonych klatryną pęcherzykach uwarunkowany jest obecnością sekwencji sygnałowych w C-końcowej domenie receptorów błonowych.

Badania ostatnich dziesięciu lat doprowadziły do poznania tych sekwencji w kilkunastu białkach błonowych ulegających internalizacji. Okazało się, że sygnały te mają charakter degeneratywny, tzn. nie ma pełnej zgodności w sekwencji aminokwasów określonych sygnałów i że są odmienne dla różnych białek, niemniej jednak można wyróżnić dwie główne ich klasy (tab. 2). Pierwsza klasa sygnałów charakteryzuje się obecnością aminokwasu aromatycznego – tyrozyny w towarzystwie jednego lub kilku aminokwasów o charakterze hydrofobowym [5, 28, 33, 50]. Drugą klasę sygnałów cechuje występowanie dwóch reszt leucyny w C-końcowej domenie białka ulegającego endocytozie bądź sortowaniu [8, 28].

Najlepiej poznany jest sygnał  $YXX\emptyset$ , gdzie Y oznacza resztę tyrozyny, X – dowolny aminokwas, a  $\emptyset$  – aminokwas z rozbudowanym hydrofobowym łańcuchem bocznym [5, 28, 33, 48]. Sygnał ten pośredniczy głównie w internalizacji białek wbudowanych w błonę komórkową, ale także w kierowaniu cząsteczek do endosomów i lizosomów [28, 30]. Sekwencja sygnałowa YQRL w domenie cytosolowej białka TGN38 odpowiada schematowi  $YXX\emptyset$  i jest niezbędna dla prawidłowej internalizacji tego białka. Sekwencja ta wiąże się silnie z podjednostką  $\mu_2$  kompleksu AP-2 oraz w nieznacznym stopniu także z podjednostką  $\mu_1$  kompleksu AP-1. Substytucja resztami alaniny wykazała, że w sekwencji YQRL jedynie reszty Y i L są istotne dla wiązania podjednostki  $\mu_2$  i internalizacji [33]. Rozpoznawanie sygnału YQRL z udziałem podjednostki  $\mu_2$  kompleksu AP-2 wzrastało 8–40-krotnie w obecności PtdIns(3)P. Stymulujący efekt wywierało również kilka innych fosfatydyloinozytolofosforanów. Nieufosforylowany fosfatydyloinozytol nie wykazywał takiego efektu, a PtdIns(4)P i PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> działały hamująco. Stymulujący wpływ PtdIns(3)P na wiązanie  $\mu_2$  z sekwencją YQRL oprócz wymagania reszty fosforanowej w pozycji 3 w pierścieniu inozytolowym, uwarunkowany jest również obecnością kwasu tłuszczowego i reszty glicerolowej [37].

Domena cytosolowa receptora transferyny z sygnałem YTRF wiąże się wyłącznie z podjednostką  $\mu_2$  kompleksu AP-2 [33]. Tyrozyna w konserwatywnej sekwencji YKYSKV odgrywa też istotną rolę w wiązaniu podjednostki  $\mu_2$  kompleksu AP-2



TABELA 2. Sekwencje sygnałowe warunkujące endocytozę i transport wewnątrzkomórkowy (dane wg [5, 9, 19, 20, 24, 28, 30, 33, 41, 48, 50])

Sekwencja sygnałowa	Białko transbłonowe
YTRF	receptor transferyny
YQPL	receptor komórek T (CD3)
GYQTI	lgp A/lamp-1
GYEQF	lgp B/lamp-2
GYRHV	lizosomalna kwaśna fosfataza
YSAA	receptor polimerycznych Ig
YQRL	TGN38
YKYSKV	receptor MPR <sup>CI</sup>
FENTLY	receptor mannozy
YENPTY	prekursor $\beta$ -amyloidu
FDNPVY	receptor LDL
LL	receptor Fc
LL	receptor EGF
LLHV	receptor MPR <sup>CI</sup>
HLL	receptor MPR <sup>CD</sup>
LI	MHC II

i internalizacji receptora MPR<sup>CI</sup> z powierzchni komórki [22, 24]. W przypadku, gdy receptor znajduje się w błonie TGN, jego właściwe kierowanie jest niezależne od tyrozyny, a istotną rolę odgrywa sekwencja sygnałowa LLHV [16, 24]. Dla właściwego funkcjonowania receptora MPR<sup>CD</sup>, który uczestniczy głównie w sortowaniu białek lizosomalnych w TGN, niezbędna jest sekwencja HLL [16].

Obecność sygnału opartego na dwóch resztach leucyny (LL) stwierdzono też w domenie cytosolowej receptora EGF [19]. Obecność reszt LL w pozycjach 679 i 680 okazała się niezbędna dla efektywnego transportu kompleksu ligand-receptor z endosomów do lizosomów. Substytucja obu reszt alaniną nie upośledzała indukowanej ligandem internalizacji

receptora z powierzchni komórki, ale wpływała znacząco na zahamowanie lizosomalnej degradacji kompleksów ligand-receptor przez kierowanie ich z endosomów z powrotem do błony komórkowej.

Sygnał dileucynowy (LL) jest więc sygnałem niezbędnym dla prawidłowego sortowania białek do lizosomów. Dotychczas nie było wiadomo, jakie kompleksy adaptorowe zaangażowane są w wiązanie sygnału LL. Marks i wsp. [28] wykazali, że udział w wiązaniu sekwencji YXX $\emptyset$  i LL biorą odrębne kompleksy AP. Ohno i wsp. [33] nie stwierdzili asocjacji LL ani z podjednostką  $\mu_1$ , ani z  $\mu_2$ , co sugeruje udział innych podjednostek w rozpoznawaniu i interakcji z sygnałem dileucynowym. Ostatnie doniesienia wskazują na udział podjednostki  $\beta_1$  kompleksu AP-1 w rozpoznawaniu i wiązaniu sygnału dileucynowego [38].

## REGULACJA PROCESÓW TRANSPORTU Z UDZIAŁEM OPŁASZCZONYCH PĘCHERZYKÓW

Złożoność procesów wiązania białek adaptorowych do odpowiedniej błony, powstawania opłaszczonych pęcherzyków oraz właściwego ich kierowania sugeruje,

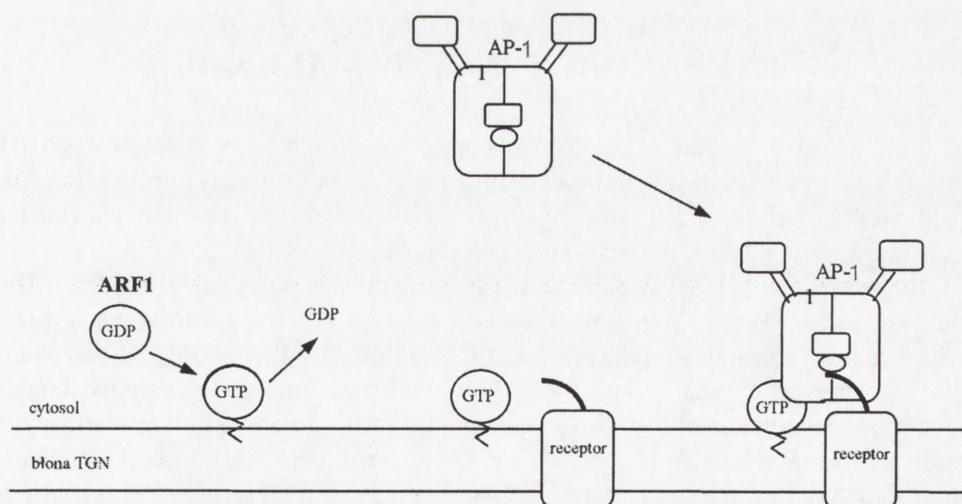


że konieczne są precyzyjne mechanizmy regulacji. Istotną rolę odgrywają czynniki ARF (*ADP-ribosylation factor*) – GTP-azy występujące w dwóch formach: aktywnej, związanej z GTP i zdolnej do wiązania z błoną plazmatyczną i błoną cystem aparatu Golgiego lub w formie nieaktywnej, cytosolowej, związanej z GDP.

Znanych jest co najmniej sześć białek ARF i kilka strukturalnie podobnych, wykazujących różną lokalizację w tkankach ssaków. ARF1 zlokalizowany jest w strukturach aparatu Golgiego, ARF6 występuje w błonie plazmatycznej i endosomach (jest przy tym niewrażliwy na brefeldynę A). Z odrębną lokalizacją czynników ARF w substrukturach komórkowych związana jest dystrybucja opłaszczonych pęcherzyków do różnych kompartmentów [8].

Przyłączenie aktywnej formy czynnika ARF1 do błony TGN jest niezbędnym warunkiem wiązania kompleksu AP-1 z błoną (rys. 4). Brefeldyna A (BFA), która hamuje wymianę nukleotydów przez ARF, a tym samym jego aktywację, uniemożliwia wiązanie kompleksu AP-1 z błoną TGN *in vitro*. Efektem dodania BFA do żywych komórek jest zwiększenie ilości wolnych cząsteczek AP-1 w cytosolu. Z kolei dodanie do komórki GTPγS (który *in vitro* stabilizuje czynnik ARF w formie aktywnej, zasocjowanej z GTP) stymuluje wiązanie AP-1 z błoną cystem TGN, a także chroni przed wpływem BFA [17].

Nie stwierdzono, aby BFA wpływała na wzrost stężeń wolnych kompleksów AP-2 w cytosolu komórek [42]. Natomiast GTPγS powoduje, że kompleks AP-2 nie wiąże się z błoną komórkową, ale z błoną przedziału endosomalnego [17, 42].



RYSUNEK 4. Udział białka ARF1 w wiązaniu kompleksu adaptorowego AP-1 z receptorem w błonie cystem regionu trans aparatu Golgiego (TGN)

Rekrutacja kompleksu AP-3 do właściwej błony jest stymulowana, podobnie jak w przypadku AP-1, przez GTPγS oraz blokowana przez brefeldynę A, co wskazuje na udział w tym procesie białek wymieniających GDP na GTP [45]. Również kompleks AP-4 jest wrażliwy na BFA [12] (tab. 1).

W transporcie zachodzącym z udziałem opłaszczonych pęcherzyków niezbędne są także małe białka Rab z aktywnością GTP-azową. Znanych jest około trzydziestu różnych białek Rab. Cztery z nich: Rab 4, Rab 5, Rab 7 i Rab 9 biorą udział w transporcie w drodze endocytozy i są niezbędne dla kierowania pęcherzyków do właściwych przedziałów, np. Rab 5 reguluje fuzję pęcherzyka endocytarnego z wczesnym endosomem [8, 13, 52].

Fuzja opłaszczonego pęcherzyka z właściwą błoną docelową możliwa jest dzięki dopasowaniu odpowiednich białek v-SNARE i t-SNARE, które są integralnymi białkami błony pęcherzyka i błony przedziału docelowego [13, 30, 40, 52].

Regulacja asocjacji kompleksów adaptorowych z błoną oraz ich zdolności do łączenia się z klatryną odbywa się również poprzez proces fosforylacji i defosforylacji. Fosforylacji ulegają podjednostki  $\alpha$ ,  $\beta_1/\beta_2$  oraz  $\mu_1/\mu_2$  kompleksów adaptorowych. Nie stwierdzono natomiast fosforylacji  $\gamma$ -adaptyny. Fosforylacja reszt seryny w odcinku łącznikowym podjednostki  $\beta$  uniemożliwia wiązanie klatryny i utworzenia prawidłowego opłaszczania [53].

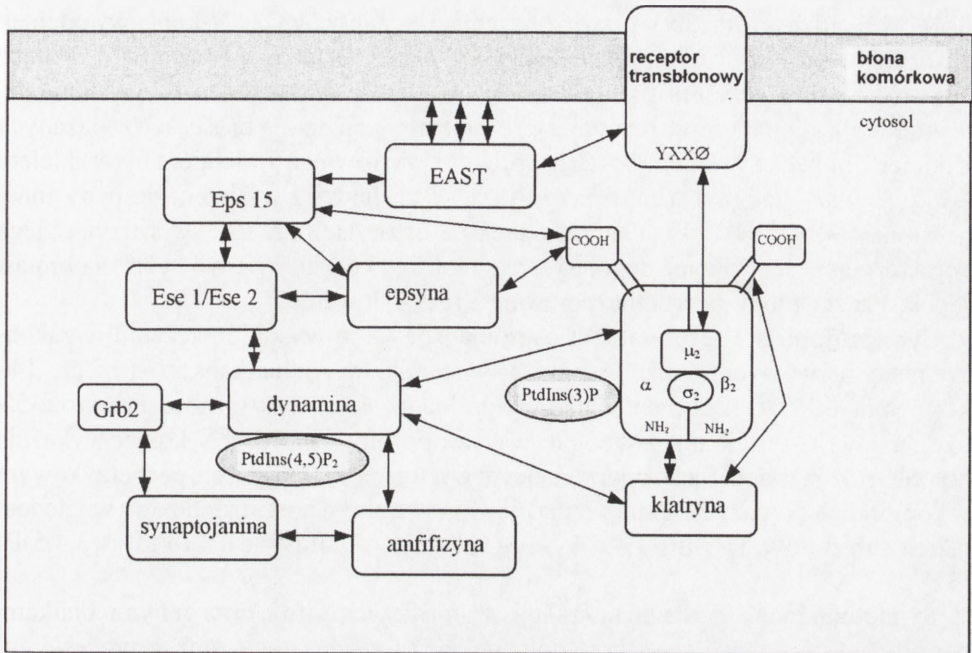
Fosforylacja podjednostek  $\mu_1$  i  $\mu_2$  zachodzi na resztach seryny i treoniny i może być sposobem regulacji wiązania tych podjednostek z sekwencjami sygnałowymi w domenie cytosolowej receptora [53].

## INTERAKCJE Z INNYMI BIAŁKAMI

Endocytoza z udziałem receptorów, klatryny i kompleksów adaptorowych AP jest złożonym wieloetapowym procesem, w który zaangażowanych jest szereg różnych białek. Odkrywa się coraz to nowe białka niezbędne na różnych etapach transportu przy udziale pęcherzyków opłaszczonych klatryną (rys. 5).

Stosunkowo niedawno wykazano udział dynaminy w powyższym procesie. **Dynamina** jest GTP-azą (100 kD). Białko to asocjuje z błoną komórkową w przebieganiach tworzącego się pęcherzyka, a jej GTP-azowa aktywność jest niezbędna dla odcięcia pęcherzyka z błony [30, 41]. C-końcowy fragment dynaminy, bogaty w prolinę i argininę (*proline rich domain* – PRD), łączy się z białkami zawierającymi domenę SH3 (*Src homology domain* – np. Grb2, amfifizyna, Ese), a także z białkami mikrotubularnymi. Domena centralna, homologiczna z plekstryną – PH (*pleckstrin homology*), wiąże fosfatydyloinozytole [10]. N-końcowa domena dynaminy jest miejscem wiązania GTP. Genetyczna modyfikacja w postaci delekcji N-końca dynaminy powoduje zahamowanie internalizacji transferyny oraz zmiany w wewnątrz-





RYSUNEK 5. Udział białek i fosfatydylinozytoli w endocytozie (zmodyfikowane dane wg [1, 2, 3, 7, 8, 10, 26, 31, 32, 43])

komórkowej dystrybucji ciężkiego łańcucha klatryny i  $\alpha$ -adaptyny kompleksu AP-2, podczas gdy rozmieszczenie  $\gamma$ -adaptyny kompleksu AP-1 pozostaje niezmienione [17]. Dane te wskazują na rolę dynaminy w odcinaniu pęcherzyków opłaszczonych powstających wyłącznie z błony komórkowej, a nie z błony cystem TGN.

Aktywność GTP-azowa dynaminy wzrasta pod wpływem fosfatydylinozytoli oraz na skutek interakcji z białkiem Grb2 [39]. Najsilniejszym aktywatorem jest PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, kolejnym PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. Aktywacja dynaminy przez Grb2 i PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> ma charakter synergistyczny, np. przy 0,05  $\mu$ M stężeniu dynaminy jej aktywność GTP-azowa wzrasta w obecności obu aktywatorów czterokrotnie w porównaniu z aktywnością ujawnianą wyłącznie w obecności PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Przyпуска się, że Grb2, podlegając interakcji z częsteczkami dynaminy, wywołuje znaczny wzrost stężenia fosfolipidów na powierzchni pęcherzyków [1]. Podobnie jak inne białka uczestniczące w procesach endocytozy i sortowania, dynamina ulega odwracalnej fosforylacji i defosforylacji, przy czym forma defosforylowana wykazuje obniżoną aktywność GTP-azową [2, 39].

**Amfizyna** jest cytosolowym białkiem pierwotnie zidentyfikowanym w tkance nerwowej, gdzie gromadzi się w zakończeniach synaptycznych. N-końcowy odcinek amfizyny zawiera strukturę *coiled-coil*, a C-koniec stanowi domena SH3, biorąca udział w interakcjach amfizyny z dynaminą i synaptojaniną. Amfizyna wchodzi w interakcję z dynaminą na poziomie jej oligomeryzacji, tzn. w procesach związanych z odcięciem pęcherzyka endocytarnego; wiąże się również z białkiem cytoszkieletu – aktyną [39]. Interakcja amfizyny z AP-2 zachodzi z udziałem domeny innej niż domena SH3 i zwiększa się na skutek defosforylacji [2, 10]. Amfizyna ulega defosforylacji wywołanej depolaryzacją błony zakończeń nerwowych, natomiast repolaryzacja błony powoduje ponowne ufosforylowanie.

**Synaptojanina 1** jest białkiem nagromadzonym w wysokim stężeniu w zakończeniach nerwowych, synaptojanina 2 występuje w wielu tkankach (m. cz. 140 kD). Spośród trzech domen białka, centralna wykazuje aktywność inozytolo-5'-fosfatazową, C-terminalna jest bogata w reszty proliny, natomiast N-koniec wykazuje homologię z białkiem Sac 1, odgrywającym ważną rolę w transporcie pęcherzykowym w komórkach drożdży. Synaptojanina ujawnia swą aktywność fosfatazową względem takich substratów, jak:  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ,  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ ,  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  i  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  [31].

Synaptojanina 1 podlega interakcji z amfizyną, Grb2 oraz innymi białkami posiadającymi w swej strukturze domenę SH3 i zaangażowanymi w procesie endocytozy i recykliczacji pęcherzyków synaptycznych. Synaptojanina 2 podlega jedynie interakcji z Grb2, co wydaje się wskazywać, że wielorakie opisane formy inozytolo-5-fosfataz uczestniczą w specyficznych interakcjach i procesach (m.in. w endocytozie) i pośredniczą w ich regulacji z udziałem fosfatydyloinozytoli [31, 32].

Synaptojanina 1, dynamina 1 i amfizyna 1 ulegają równoczesnej defosforylacji w trakcie depolaryzacji błony zakończeń nerwowych i fosforylacji uwarunkowanej repolaryzacją. Za defosforylację odpowiedzialna jest kalcyneuryna – fosfataza, której aktywność jest regulowana przez kalmodulinę i jony  $\text{Ca}^{2+}$  [39].

**Eps 15** jest kolejnym białkiem biorącym udział w procesie tworzenia i wewnątrzkomórkowego przemieszczania się pęcherzyków opłaszczonych klatryną. Białko to zidentyfikowano pierwotnie jako substrat kinazy receptora EGF. Zlokalizowanie Eps 15 na krańcach formujących się dołków opłaszczonych dowodzi jego roli w odcinaniu pęcherzyków [49]. Stwierdzono też całkowitą kolokalizację puli Eps 15 w komórce z klatryną i kompleksem adaptorowym AP-2. Białko Eps 15 wiąże się z domeną globularną (C-końcową)  $\alpha$ -adaptyny zarówno wolnego (cytosolowego), jak i związanego z błoną komórkową kompleksu AP-2 [3, 49]. W wiązaniu się z AP-2 uczestniczy sekwencja Asp-Pro-Phe (DPF) w C-końcowej domenie białka Eps 15. Cechą wyróżniającą Eps 15 jest obecność trzech 70-aminokwasowych konserwatywnych domen zwanych domenami EH (*Eps 15 homology domain*) zlokalizowanych na N-końcu polipeptydu [29]. Domeny te uczestniczą



w interakcjach Eps 15 z innymi białkami, ligandem dla domen EH jest trójpeptyd Asn-Pro-Phe (NPF). Komórki HeLa ze zmutowanym białkiem Eps 15 pozbawionym domen EH nie są zdolne do tworzenia prawidłowych pęcherzyków opłaszczonych [3, 4].

Wykazano też wiązanie Eps 15 z epsyną, kolejnym białkiem zaangażowanym w proces endocytozy z udziałem opłaszczonych pęcherzyków [7]. **Epsyna** ma w regionie C-końcowym trzy motywy Asn-Pro-Phe (NPF) dla związania trzech domen EH białka Eps 15 oraz trójpeptyd Asp-Pro-Trp (DPW), który może wiązać się z regionem globularnym  $\alpha$ -adaptyny, konkurując w tym wiązaniu z Eps 15.

Białkiem biorącym udział prawdopodobnie w najwcześniejszych etapach endocytozy jest **EAST** [25, 26]. Zastosowanie mikroskopii immunofluorescencyjnej pozwoliło na stwierdzenie kolokalizacji białka EAST z klatryną w obrębie pęcherzyków. Wykazano też zdolność wiązania EAST z Eps 15 [26]. Niezbędna w tym wiązaniu jest domena SH3, dla której ligandem są sekwencje bogate w prolinę, obecne w regionie centralnym białka Eps 15. Istotną rolę w strukturze białka EAST odgrywa także domena VHS złożona z około 140 reszt aminokwasowych N-końca. Sugeruje się udział tej domeny w zakotwiczeniu EAST w błonie komórkowej. Poza tym obecność domeny VHS odkryto w kilku innych białkach związanych z endocytozą lub transportem pęcherzykowym [25].

W 1999 roku Sengar i wsp. zidentyfikowali w komórkach ssaków nowe białka **Ese1** i **Ese2**, biorące udział w procesie endocytozy. Białka Ese tworzą *in vivo* kompleks z Eps 15, mogący reagować przynajmniej z czternastoma innymi białkami. Stwierdzono między innymi, że białka Ese wykazują zdolność wiązania z epsyną poprzez N-końcową domenę EH oraz z dynaminą za pośrednictwem C-końcowej domeny SH3. Przypuszcza się, że kompleks białek Ese-Eps 15 stanowi ogniwo łączące dynaminę i inne białkowe komponenty istotne dla endocytozy [43].

Sposób tworzenia pęcherzyków opłaszczonych uczestniczących w endocytozie zależnej od receptorów i wewnątrzkomórkowym transporcie oraz regulacja tych procesów zostały w ostatnich latach dobrze poznane i wzbogacone odkryciem nowych białek. W niniejszym artykule przedstawiono nowe dane dotyczące procesów endocytozy zależnej od receptorów i transportu makromolekuł z TGN, w szczególności z udziałem opłaszczonych klatryną pęcherzyków oraz kompleksów AP-1 i AP-2. Zasygnalizowano również rolę fosfatydyloinozytoli w pewnych etapach tych procesów.

## LITERATURA

- [1] BARYLKO B, BINNS D, LIN K-M, ATKINSON MAL, JAMESON DM, YIN HL, ALBANESI JP. Synergistic activation of dynamin GTP-ase by Grb2 and phosphoinositides. *J Biol Chem* 1998; **273**: 3791–3797.

- [2] BAUERFEIND R, TAKEI K, DeCAMILI P. Amphiphysin I is associated with coated endocytic intermediates and undergoes stimulation-dependent dephosphorylation in nerve terminals. *J Biol Chem* 1997; **272**: 30984–30992.
- [3] BENMERAH A, LAMAZE C, BEGUE B, SCHMID SL, DAUTRY-VARSAT A, CERF-BEN-SUSSAN N. AP-2/Eps 15 interaction is required for receptor-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 1998; **140**: 1055–1062.
- [4] BENMERAH A, BAYROU M, CERF-BENSUSSAN N, DAUTRY-VARSAT A. Inhibition of clathrin-coated pit assembly by an Eps 15 mutant. *J Cell Sci* 1999; **112**: 1303–1311.
- [5] BONIFACINO JS, DELLANGELICA EC. Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J Cell Biol* 1999; **145**: 923–926.
- [6] BROWN MS, GOLDSTEIN JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986; **232**: 34–47.
- [7] CHEN H, FRE S, SLEPNEV VI, CAPUA MR, TAKEI K, BUTLER MH, DiFIORE PP, DeCAMILI P. Epsin is an EH-domain-binding protein implicated in clathrin-mediated endocytosis. *Nature* 1998; **394**: 793–797.
- [8] CLAGUE MJ. Molecular aspects of the endocytic pathway. *Biochem J* 1998; **336**: 271–282.
- [9] CZARTORYSKA B. Wewnątrzkomórkowy transport enzymów lizosomalnych – rola receptorów mannozo-6-fosforanu. *Post Bioch* 1996; **42**: 350–357.
- [10] DeCAMILI P, EMR SD, McPHERSON PS, NOVICK P. Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. *Science* 1996; **271**: 1533–1539.
- [11] DELLANGELICA EC, OHNO H, OOI CE, RABINOVICH E, ROCHE KW, BONIFACINO JS. AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression. *EMBO J* 1997; **16**: 917–928.
- [12] DELLANGELICA EC, MULLINS C, BONIFACINO JS. AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *J Biol Chem* 1999; **274**: 7278–7285.
- [13] FEGER J, GIL-FALGON S, LAMAZE C. Cell receptors: definition, mechanisms, and regulation of receptor-mediated endocytosis. *Cell Mol Biol* 1994; **40**: 1039–1061.
- [14] FIELDING CJ, FIELDING PE. Intracellular cholesterol transport. *J Lipid Res* 1997; **38**: 1503–1521.
- [15] HEUSER J, EVANS L. Three-dimensional visualization of coated vesicle formation in fibroblasts. *J Cell Biol* 1980; **84**: 560–583.
- [16] HILLE-REHFELD A. Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes. *Bioch Biophys Acta* 1995; **1241**: 177–194.
- [17] HIRST J, ROBINSON MS. Clathrin and adaptors. *Bioch Biophys Acta* 1998; **1404**: 173–193.
- [18] KEEN JH. Clathrin assembly proteins: affinity purification and a model for coat assembly. *J Cell Biol* 1987; **105**: 1989–1998.
- [19] KIL SJ, HOBERT M, CARLIN C. A leucine-based determinant in the epidermal growth factor receptor juxtamembrane domain is required for the efficient transport of ligand-receptor complexes to lysosomes. *J Biol Chem* 1999; **274**: 3141–3150.
- [20] KIRCHHAUSEN T, BONIFACINO JS, RIEZMAN H. Linking cargo to vesicle formation: receptor tail interactions with coat proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1997; **9**: 488–495.
- [21] KNUTSON VP, DONNELLY PV, LOPEZ-REYES MM, BALBA YLO. Receptor-mediated endocytosis. [w] Schultz SG et al. [red.] *Molecular Biology of Membrane Transport Disorders*. New York: Plenum Press 1996: 303–319.
- [22] KORNFIELD S, MELLMAN I. The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol* 1989; **5**: 483–525.
- [23] LANGE Y, YE J, STECK TL. Circulation of cholesterol between lysosomes and the plasma membrane. *J Biol Chem* 1998; **273**: 18915–18922.
- [24] LeBORGNE R, HOFLACK B. Protein transport from the secretory to the endocytic pathway in mammalian cells. *Bioch Biophys Acta* 1998; **1404**: 195–209.



- [25] LOHI O, LEHTO VP. VHS domain marks a group of proteins involved in endocytosis and vesicular trafficking. *FEBS Lett* 1998; **440**: 255–257.
- [26] LOHI O, POUSSU A, MENLAINEN J, KELLOKUMPU S, WASENIUS VM, LEHTO VP. EAST, an epidermal growth factor receptor- and Eps 15-associated protein with Src homology 3 and tyrosine-based activation motif domains. *J Biol Chem* 1998; **273**: 21408–21415.
- [27] LOWE M, KREIS TE. Regulation of membrane traffic in animal cells by COP I. *Bioch Biophys Acta* 1998; **1404**: 53–66.
- [28] MARKS MS, WOODRUFF L, OHNO H, BONIFACINO JS. Protein targeting by tyrosine- and di-leucine-based signals: evidence for distinct saturable components. *J Cell Biol* 1996; **135**: 341–354.
- [29] MAYER BJ. Endocytosis: EH domains lend a hand. *Curr Biol* 1999; **9**: R70–R73.
- [30] MELLMAN I. Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996; **12**: 575–625.
- [31] MICHEVA KD, KAY BK, McPHERSON PS. Synaptojanin forms two separate complexes in the nerve terminal. *J Biol Chem* 1997; **272**: 27239–27245.
- [32] NEMOTO Y, ARRIBAS M, HAFFNER C, DeCAMILI P. Synaptojanin 2, a novel synaptojanin isoform with a distinct targeting domain and expression pattern. *J Biol Chem* 1997; **272**: 30817–30821.
- [33] OHNO H, STEWART J, FOURNIER MC, BOSSHART H, RHEE I, MIYATAKE S, SAITO T, GALLUSSER A, KIRCHHAUSEN T, BONIFACINO JS. Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* 1995; **269**: 1872–1875.
- [34] PAGE LJ, ROBINSON MS. Targeting signals and subunit interactions in coated vesicle adaptor complexes. *J Cell Biol* 1995; **131**: 619–630.
- [35] PFEFFER SR. Mannose 6-phosphate receptors and their role in targeting proteins to lysosomes. *J Membr Biol* 1988; **103**: 7–16.
- [36] PONNAMBALAM S, ROBINSON MS, JACKSON APS, PEIPERL L, PARHAM P. Conservation and diversity in families of coated vesicle adaptins. *J Biol Chem* 1990; **265**: 4814–4820.
- [37] RAPOPORT I, MIYAZAKI M, BOLL W, DUCKEWORTH B, CANTLEY LC, SHOELSON SE, KIRCHHAUSEN T. Regulatory interactions in the recognition of endocytic sorting signals by AP-2 complex. *EMBO J* 1997; **16**: 2240–2250.
- [38] RAPOPORT I, CHEN YC, CUPERS P, SHOELSON SE, KIRCHHAUSEN T. Dileucine-based sorting signals bind to the  $\beta$  chain of AP-1 at a site distinct and regulated differently from the tyrosine-based motif-binding site. *EMBO J* 1998; **17**: 2148–2155.
- [39] ROBINSON PJ, LIU J-P, POWELL KA, FYKSE EM, SUDHOF TC. Phosphorylation of dynamin I and synaptic vesicle recycling. *TINS* 1994; **17**: 348–353.
- [40] ROTHMAN JE. Mechanism of intracellular protein transport. *Nature* 1994; **372**: 55–63.
- [41] SCHMID SL. Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem* 1997; **66**: 511–548.
- [42] SCHMID SL, DAMKE H. Coated vesicles: a diversity of form and function. *FASEB J* 1995; **9**: 1445–1453.
- [43] SENGAR AS, WANG W, BISHAY J, COHEN S, EGAN SE. The EH and SH3 domain of Ese proteins regulate endocytosis by linking to dynamin and Eps 15. *EMBO J* 1999; **18**: 1159–1171.
- [44] SHIH W, GALLUSSER A, KIRCHHAUSEN T. A clathrin-binding site in the hinge of the  $\beta_2$  chain of mammalian AP-2 complexes. *J Biol Chem* 1995; **270**: 31083–31090.
- [45] SIMPSON F, BRIGHT NA, WEST MA, NEWMAN LS, DARNELL RB, ROBINSON MS. A novel adaptor-related protein complex. *J Cell Biol* 1996; **133**: 749–760.
- [46] SIMPSON F, PEDEN AA, CHRISTOPOULOU L, ROBINSON MS. Characterization of the adaptor-related protein complex, AP-3. *J Cell Biol* 1997; **137**: 835–845.
- [47] SMYTHE E, WARREN G. The mechanism of receptor-mediated endocytosis. *Eur J Biochem* 1991; **202**: 689–699.

- [48] STEPHENS DJ, BANTING G. Specificity of interaction between adaptor complex medium chains and the tyrosine-based sorting motifs of TGN38 and lgp120. *Biochem J* 1998; **335**: 567–572.
- [49] TEBAR F, SORKINA T, SORKIN A, ERICSSON M, KIRCHHAUSEN T. Eps 15 is a component of clathrin-coated pits and vesicles and is located at the rim of coated pits. *J Biol Chem* 1996; **271**: 28727–28730.
- [50] TROWBRIDGE IS, COLLAWN JF, HOPKINS CR. Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu Rev Cell Biol* 1993; **9**: 129–161.
- [51] UNGEWICKELL E, UNGEWICKELL H, HOLSTEIN SEH, LINDNER R, PRASAD K, BAROUCH W, MARTIN B, GREENE LE, EISENBERG E. Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature* 1995; **378**: 632–635.
- [52] WASIK A. Proces sekrecji i tworzenia lorik u orzęsków z podrzędu *Tintinnina*. *Kosmos* 1999; **48**: 19–27.
- [53] WILDE A, BRODSKY FM. *In vivo* phosphorylation of adaptors regulates their interaction with clathrin. *J Cell Biol* 1996; **135**: 635–645.

*Redaktor prowadzący – B. Kamińska*

*Otrzymano: 26.11.1999 r.*

*Przyjęto: 08.03. 2000 r.*

*Adres autora: ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń*



## CZYM JEST KOMÓRKA ROŚLINNA? MIEJSCE ŚCIAN KOMÓRKOWYCH\*

### WHAT IS A PLANT CELL? POSITION OF PLANT CELL WALLS

Przemysław WOJTASZEK

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań

**Streszczenie:** Ściany komórkowe roślin są integralnym składnikiem żywych komórek, podlegającym dynamicznym zmianom w odpowiedzi na bodźce wewnętrzne i docierające z zewnątrz. Renesans badań nad ścianami komórkowymi doprowadził do sytuacji wymagającej ponownego zdefiniowania pojęcia „komórka roślinna”. W pracy przedstawiono współczesny stan wiedzy o ścianach komórkowych, ukazując równocześnie zróżnicowane pojmowanie miejsca ścian w komórkach roślinnych. Wychodząc z analizy założeń i wniosków dwóch teorii organizacji systemów biologicznych: komórkowej i organizmalnej, zaproponowano organizmalny model interpretacyjny komórki roślinnej. Na tej podstawie wskazano na integralną obecność ścian komórkowych w architekturze roślin i komórek roślinnych. (*Postępy Biologii Komórki* 2000; 27: 315–324)

**Słowa kluczowe:** komórka roślinna (definicja); matriks pozakomórkowa (ECM); matriks zewnątrzkomórkowa (ECM); protoplast; ściany komórkowe; teoria komórkowa; teoria organizmalna

**Summary:** Plant cell walls are integral components of living cells, undergoing dynamic changes in response to internal as well as external stimuli. The revival of studies on plant walls has led to the situation where re-definition of a concept of „plant cell” is necessary. In this paper the current knowledge on plant walls is presented and differentiated understanding of the position of cell walls in plant cells is revealed. Starting from the analysis of basic tenets and corollaries of cell and organismal theories describing organisation of biological systems, an organismal model for interpretation of plant cell concept is proposed. On that basis an integral presence of cell walls in the architecture of plants and plant cells is indicated.

(*Advances of Cell Biology* 2000; 27: 315–324)

**Key words:** cellular theory; cell walls; exocellular matrix (ECM); extracellular matrix (ECM); organismal theory; plant cell (definition); protoplast

\*Autor dziękuje Komitetowi Badań Naukowych za wsparcie finansowe w ramach projektu badawczego 6 P04C 022 13.

*„The cell wall infrastructure of their tissues sets plants apart from all other organisms”.*

*Obecność w ich tkankach infrastruktury ścian komórkowych odróżnia rośliny od wszystkich innych organizmów.*

Niklas 1992

Próby poznania wielorakich przejawów biologii żywych organizmów doprowadziły do ukształtowania się różnych dyscyplin nauk przyrodniczych, rządzonych przez właściwe sobie podejścia metodologiczne i bardzo często oddzielonych wyraźną barierą wyspecjalizowanego języka. Jednym z efektów takiej historii stało się zamknięcie, mniej lub bardziej hermetyczne, dyscyplin biologii w obrębie danego poziomu hierarchicznej organizacji biologicznej. Dopiero w ostatnich latach zaobserwować można odwrócenie tego długotrwałego procesu, także w biologii roślin [6]. Prowadzi to jednak niekiedy do znacznego zamieszania pojęciowego, wynikającego po części z braku jednoczącego wszystkich badaczy podłoża teoretycznego.

Ściany komórkowe, i tylko one, były tą częścią komórki, którą ujrzał Robert Hooke obserwując korek pod mikroskopem, i których rysunki znalazły się w jego słynnej „Mikrografii” [13]. Do dziś też ściany komórkowe, obok plastydów i częściowo wakuol, pozostały najważniejszym elementem strukturalnym wyróżniającym komórki roślinne wśród innych komórek eukariotycznych. Paradoxem wobec tego wydawać się może fakt, że ściany wyznaczające granice komórek, jedna z inspiracji teorii komórkowej Schleidena i Schwanna, po odkryciu protoplastu na prawie trzy wieki odeszły w cień zapomnienia jako martwa, sztywna skrzynka otaczająca żywy protoplast. Paradoxem jest również to, że właśnie renesans badań nad ścianami komórkowymi, jaki obserwujemy w XX wieku, doprowadził do sytuacji wymagającej ponownego zdefiniowania pojęcia „komórka roślinna”.

## CZYM SĄ ŚCIANY KOMÓRKOWE?

*For the plant cell, the cell wall is a frontier zone, where the cell encounters the challenge of the outside world. For the plant biologist, the cell wall is a research frontier, at which the old concept of a dead, structureless box has given way to a new picture of a highly complex structure performing a great diversity of functions in the life of the plant.*

*Dla komórki roślinnej ściana komórkowa stanowi strefę graniczną, miejsce, w którym komórka styka się z wyzwaniem otaczającego świata. Dla biologa roślin ściana komórkowa jest granicą poznawczą, gdzie stara koncepcja martwej, pozbawionej struktury wewnętrznej, skorupy ustępuje miejsca nowemu obrazowi wysoce złożonego układu spełniającego wiele różnych funkcji w życiu rośliny.*

Brett & Waldron 1996



Wieki obserwacji mikroskopowych utrwaliły przekonanie, że ściany komórkowe są „raz dane” i że są one zawsze stałym elementem komórki. Badania współczesne, wykorzystujące zdobycze biologii komórki, biochemii i biologii molekularnej pokazują jednak, że ściany komórkowe są integralnym składnikiem żywych komórek, podlegającym dynamicznym zmianom w odpowiedzi na bodźce wewnętrzne i docierające z zewnątrz [2, 3, 42].

Ściany komórkowe są strukturą wysoce złożoną, o właściwościach, które zarówno jakościowo, jak i ilościowo odbiegają od właściwości budujących ją elementów składowych. Z chemicznego punktu widzenia, ściany komórkowe są skomplikowaną, lecz uporządkowaną mieszaniną polisacharydów, (gliko)protein i związków fenolowych, głównie w postaci lignin. Zaproponowane modele opisują ściany komórkowe jako kompleks co najmniej trzech przenikających się wzajemnie sieci: celulozowo-hemicelulozowej, pektynowej i białkowej oraz, w niektórych typach ścian, ligninowej [5]. Elementy ścian komórkowych powiązane są ze sobą wiązaniami kowalencyjnymi lub wodorowymi i stabilizowane oddziaływaniami jonowymi i/lub hydrofobowymi, których zasięg jest różny dla różnych typów ścian komórkowych. Istotne znaczenie odgrywa również zmienna zawartość wody oraz substancji mineralnych w ścianach, w zasadniczy sposób wpływając na własności fizykochemiczne polimerów ścian i zakres ich wzajemnych oddziaływań. Rozważając własności mechaniczne ścian przyjmuje się, że ściany są kompozytowym układem dwufazowym, złożonym ze sztywnych, odpornych na rozciąganie, krystalicznych mikrofibril celulozowych zanurzonych w amorficznej, odpornej na ściskanie matryks, tworzonej głównie przez pektyny, a stabilizowanej przez białka i związki fenolowe [41].

Formowanie ścian komórkowych podlega bardzo precyzyjnej kontroli, zarówno lokalnie, jak i na poziomie całego organizmu, zależnej od stanu fizjologicznego komórki i od wzajemnego oddziaływania sygnałów docierających do i wychodzących z komórki. Ściany komórkowe w różnych tkankach, ściany komórkowe poszczególnych komórek w obrębie tkanek, a nawet domeny ścian komórkowych pojedynczych komórek mogą być formowane w różny sposób, z różną prędkością i z wykorzystaniem zróżnicowanych elementów budulcowych [21, 32]. Właściwie wszystkie przedziały komórki uczestniczą w biosyntezie ścian komórkowych, dokonując tym samym „tłumaczenia” jednowymiarowych sekwencji genów na trójwymiarową architekturę komórek i tkanek [42].

Ściany komórkowe są najpowszechniej występującą na Ziemi strukturą biologiczną. Szacuje się, że rośliny wytwarzają rocznie ponad 100 mld ton celulozy i lignin [28]. Pomimo to do niedawna niewiele było wiadomo o roli, jaką ściany spełniają w życiu komórek i roślin. Wyjątkiem była funkcja szkieletowa, którą najlepiej charakteryzuje zdanie Hagemanna [10]: „*Włączenie ścian komórkowych do rozwijających się merystemów roślin wyższych było mechaniczną koniecznością i podstawą ich ewolucji na lądzie*”.

Obecnie wiemy już, że ściany komórkowe:

- 1) są czynnikiem kontrolującym wzrost i kształt komórek,
- 2) biorą udział w procesach transportowych,
- 3) dzięki obecności plazmodesm, których stan, wielkość i rozmieszczenie mogą być precyzyjnie regulowane, uczestniczą w procesach komunikacji międzykomórkowej,
- 4) stanowią źródło oligosacharyn – roślinnych cząsteczek sygnałnych,
- 5) są istotnym wyznacznikiem różnicowania się komórek oraz
- 6) determinantą procesów rozwoju i morfogenezy,
- 7) a z racji swego umiejscowienia na zewnątrz protoplastów stanowią naturalną strefę kontaktu z otaczającym środowiskiem, w tym także z mikroorganizmami symbiotycznymi i patogennymi [2, 3, 42].

## CZYM JEST KOMÓRKA ROŚLINNA?

Intensywny rozwój badań ścian komórkowych spowodował, że pojawiło się znaczne zamieszanie pojęciowe. Historycznie ugruntowane pojęcie „ściana komórkowa” zaczęto często zamieniać na „matriks pozakomórkowa” (ang. *extracellular matrix*; ECM), w przekonaniu, że to drugie lepiej oddaje dynamiczną zmienność ścian komórkowych i ich funkcjonalne podobieństwo do ECM zwierząt (np. [2, 32]). Wynika to po części ze specyfiki rozwoju badań, przede wszystkim biochemicznych i molekularnych, nad roślinami, które zwykle postępują w ślad za badaniami komórek zwierzęcych. W efekcie zjawiska zaobserwowane u roślin próbuje się „dopasowywać” do odkryć i modeli opracowanych dla zwierząt. Stąd też wykorzystanie pojęcia ECM, które w zamyśle wprowadzających je badaczy miało również sugerować jedność wszystkich przejawów życia świata roślin i zwierząt. Zamieszanie terminologiczne znalazło swój wyraz w dyskusji: „Czym jest komórka roślinna”? toczącej się w 1991 roku na łamach *Plant Cell* [33, 34, 38, 39]. Dyskusja ta zamykała się właściwie w pytaniu: „Czy ściany komórkowe są częścią komórki roślinnej, czy też nie”?

Klasyczna definicja komórki roślinnej, podana przez Esau, stwierdza, że „Komórka roślinna składa się z protoplastu i ściany komórkowej; w zmartwiałych tkankach, wyłącznie ze ściany komórkowej lub ze ściany komórkowej i 'nieożywionych' inkluzji”. [9]. W zasadzie bez zmian definicję tę powtarzają również najnowsze polskie opracowania encyklopedyczne [8, 37], powielając niestety przy tym pogląd, iż „Ściana komórkowa jest martwym wytworem protoplastu” [37]. Tego typu definicje odzwierciedlają jedno z możliwych podejść do pojmowania komórki. Jego podstawą jest zgoda na to, że wszystkie organizmy zbudowane są z komórek, ale poszczególne grupy organizmów mogą być wyróżnione dzięki swoistym elementom konstrukcyjnym ich komórek i np. dla roślin takim elementem będzie m.in. ściana komórkowa [39]. Na przeciwnym biegunie sytuuje się drugie stanowisko, zgodnie z którym



definicja komórki jako „najmniejszej jednostki życia” powinna obejmować jedynie te elementy, które są wspólne dla wszystkich organizmów żywych. Tutaj ulokować można próby bardzo uogólnionych definicji, np. termodynamiczną, traktującą komórkę jako układ otwarty (np. definicja w [30]), czy też model komórki jako „powierzchni zdarzeń”, zaproponowany przez Lintilhaca [23]. W bardziej tradycyjnym ujęciu tego podejścia „... istoty żywe zbudowane są z komórek – małych, otoczonych błoną jednostek, wypełnionych stężonym wodnym roztworem związków chemicznych i wyposażonych w niezwykłą zdolność tworzenia swych własnych kopii na drodze wzrostu i podziału na dwie jednostki potomne” [1]. Stąd bezpośrednim wnioskiem jest uznanie, że wszystko, co usytuowane jest poza obrębem błony komórkowej, nie jest częścią, lecz produktem aktywności komórki, a ściany komórkowe roślin, grzybów czy bakterii należy wyłączyć z obrębu komórki i zrównać z ECM komórek zwierzęcych [38]. Konsekwentne stosowanie tej definicji sprawia jednak trudności nawet jej orędownikom ze względu na istnienie pojęcia „protoplastu” swoistego dla świata roślin. Chociaż więc „*Naga komórka roślinna, sztucznie pozbawiona swojej ściany, jest delikatna i bardzo podatna na uszkodzenia*”, to „...zwiększenie objętości komórki, ograniczone przez opór ściany komórkowej, umożliwia pozostawanie *protoplastu w stanie jędrności*” [1] (wyróżnienia moje). Co więcej, takie podejście umniejsza również znaczenie zdolności komórek do samopowieliania [33]. Należy bowiem zauważyć, że formowanie przegrody pierwotnej i dalej ściany komórkowej jest nieodłączną cechą podziału komórkowego u roślin. Tymczasem jako protoplast, komórka roślinna jest niezdolna do podziału dopóty, dopóki nie zostanie odtworzona funkcjonalna, otaczająca ściana komórkowa [26, 40].

## DWA SPOJRZENIA NA ORGANIZACJĘ BIOLOGICZNĄ ORGANIZMÓW ŻYWYCH

Przedstawione problemy interpretacyjne wydają się możliwe do przezwyciężenia. Poniżej chciałbym zaproponować jedną z potencjalnych dróg wyjścia, opierającą się na zmodyfikowanej definicji komórki roślinnej. Wymaga to jednak wcześniejszego omówienia założeń organizmalnej teorii organizacji biologicznej i porównania ich z założeniami teorii komórkowej.

Teoria komórkowa, zaproponowana przez Schleidena [35] i Schwanna [36], tak bardzo wrosła w system badań i kształcenia biologów, że bardzo często zapomina się, iż nie jest ona jedynym sposobem interpretacji świata żywego. Już kilka lat po jej powstaniu, pojawiła się propozycja odmiennego opisu organizacji systemów biologicznych, zwana teorią organizmalną, której wyrazicielem był przede wszystkim Hofmeister [12], a której założenia najlepiej podsumowuje stwierdzenie du Bary’ego: „*Die Pflanze bildet Zellen, nicht die Zelle bildet Pflanzen*” (Roślina tworzy komórki, komórki nie tworzą roślin; cyt. za [28]). Zestawione w tabeli 1 porównanie pod-

TABELA 1. Porównanie podstawowych założeń dwóch teorii organizacji biologicznej (na podstawie [17, 18, 28])

Teoria komórkowa	Teoria organizmalna
<ul style="list-style-type: none"> <li>•Wszystkie istoty żywe zbudowane są z komórek</li> <li>•Każda komórka w organizmie jest odrębnym indywiduum o takiej samej randze morfologicznej</li> <li>•Komórka w tkance jest morfologicznie i fizjologicznie podstawową jednostką struktury i funkcji</li> <li>•Każdy organizm wielokomórkowy jest zbiorowiskiem („republika”) komórek</li> <li>•Cechy organizmu są sumą cech budujących go komórek</li> <li>•Ontogeneza jest efektem kooperatywnego współdziałania wielu komórek</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Ontogeneza jest własnością organizmu jako całości</li> <li>•Wzrost i różnicowanie są własnościami protoplazmatycznego indywiduum</li> <li>•Różnicowanie może, ale nie musi obejmować podziału protoplazmy</li> <li>•Jeżeli do podziału dochodzi, to komórki są podrzędnymi częściami całości</li> <li>•Ponieważ podziały rzadko są kompletne, wszystkie części pozostają połączone i całość nadal funkcjonalnie jest jednością</li> <li>•Ontogeneza jest rozdzieleniem całości na nowoutworzone części</li> </ul>

stawowych założeń obu teorii pokazuje, że są one na tyle ostro sformułowane, iż przyjęcie jednej teorii wyklucza możliwość nałożenia się wyprowadzanych wniosków z wnioskami sformułowanymi na podstawie drugiej z nich. Co więcej, akceptacja i zastosowanie jednej ścieżki interpretacyjnej właściwie wyznacza kierunek badań uniemożliwiając szersze spojrzenie na pojawiające się problemy. Za przykład niech posłużą implikacje filogenetyczne. Ponieważ według teorii komórkowej organizm wielokomórkowy jest zbiorowiskiem komórek, podstawowym wnioskiem, jaki się nasuwa, jest stwierdzenie, że organizmy jednokomórkowe są „prymitywniejsze”, a ewolucja form żywych postępowała drogą uformowania kolonii komórkowych i dalej funkcjonalnej specjalizacji komórek w obrębie kolonii, co doprowadziło do wykształcenia organizmów wielokomórkowych. Z drugiej strony interpretacja organizmalna oznacza uznanie, że organizmy wielo- i jednokomórkowe są formami życia wzajemnie homologicznymi, w których odpowiednio doszło lub nie do podziału protoplazmy. Natomiast utworzenie struktur rozpoznawanych jako komórki umożliwiło specjalizację poszczególnych fragmentów protoplazmatycznego indywiduum.

Przyjrzenie się założeniom teorii komórkowej pokazuje, że znakomicie oddaje ona sytuację obserwowaną u zwierząt, gdzie mamy do czynienia z podziałami komórkowymi prowadzącymi do pełnej separacji komórek potomnych. Jej efektem jest niezależność drogi rozwojowej, a także niezależna ruchliwość i możliwość przemieszczania się komórek potomnych. Wydaje się jednak, że do opisu świata roślin lepiej nadaje się teoria organizmalna. Zauważyć bowiem należy, że u roślin podziały komórkowe, będące efektem wprowadzenia przegrody pierwotnej pomiędzy



potomne protoplasty, nie są kompletne, a dzięki plazmodesmom zachowana zostaje ciągłość cytoplazmatyczna i systemu błon wewnętrznych oraz, prawdopodobnie, cytoszkieletu [22, 42]. Przerwanie owej ciągłości symplastycznej, charakterystyczne dla procesu formowania gamet, jest równocześnie oznaką powstawania nowego organizmu, nowego protoplazmatycznego indywiduum [25]. Poza tym, istnieje wiele innych przesłanek uzasadniających stosowanie teorii organizmalnej do opisu roślin. Szczególnie interesujących dostarczają badania morfogenezy roślin, wskazujące na nadrzędność cech organizmu w organogenezie i kształtowaniu się formy rośliny (np. [7], przegląd w [10, 11, 17, 18]). Te dane znalazły ostatnio również swoje potwierdzenie w analizach mutantów roślin o zaburzonych procesach rozwojowych [14, 42].

## DEFINICJA KOMÓRKI ROŚLINNEJ

Przyjęcie założeń teorii organizmalnej umożliwia znacząco odmienne spojrzenie na ściany komórkowe, na ich miejsce w roślinach i w komórkach roślinnych, a w konsekwencji pozwala rozwiązać problem definicji komórki roślinnej. Zgodnie z nimi, komórka jest podrzędną częścią organizmu – rośliny, wypadkową wtórnego podziału protoplazmy na mniejsze fragmenty (tab. 1). W takim układzie występowanie ścian komórkowych, w szczególności zewnętrznych ścian komórkowych, staje się przede wszystkim cechą organizmu, a nie komórki. Warstwa kutykuli, uformowana wokół ścian komórkowych zygoty *Citrus jambhiri*, jeszcze zanim dojdzie do pierwszego podziału komórkowego [4], czy też wymóg depozycji warstwy kutykularnej dla zainicjowania embriogenezy somatycznej u *Camellia japonica* [29], potwierdzają taką właśnie pozycję ścian komórkowych. Podobnie, w przypadku organizmów jednokomórkowych otaczająca je ściana również jest cechą organizmu. Natomiast, wewnętrzne ściany komórkowe, dzielące protoplazmatyczne indywiduum roślinne na komórki, tworzą strukturalne i funkcjonalne *continuum* we wnętrzu całej rośliny. Jak łatwo zauważyć, owo *continuum*, określane mianem „apoplastu”, już dawno zostało przez biologów roślin rozpoznane i przeciwstawione innemu *continuum* uformowanemu przez ciągły system cytoplazmatyczny zamknięty w obrębie systemu błon komórkowych – „symplastowi”.

Powyższa relacja między roślinami i systemem ich ścian komórkowych obserwowana jest również u zwierząt. *Continuum* matriks pozakomórkowej, w której zanurzone są komórki zwierzęce, jest topologicznie tożsame z *continuum* ścian komórkowych w roślinach. Podstawowa różnica ujawnia się wtedy, gdy rozpatruje się relacje na poziomie komórkowym. U zwierząt matriks powstaje dzięki kooperatywnemu działaniu wielu komórek w obrębie tkanek lub organów i nie jest możliwe przypisanie pochodzenia jej elementów składowych poszczególnym komórkom. W efekcie, zwierzęca ECM jest najczęściej definiowana przez użycie dodatkowych

pojęć, np. tkanki: „...tkanki składają się nie tylko z komórek (...), lecz także z substancji międzykomórkowej, którą komórki wydzielają dookoła siebie” [1].

Odmianą sytuację obserwuje się u roślin, u których dany element ściany komórkowej można zidentyfikować jako wytwór określonej komórki, najczęściej tylko jednej komórki. Wspomniana już wcześniej konieczność istnienia ścian komórkowych do tego, by nastąpił podział komórkowy protoplastu [26, 40] oraz owa ścisła zależność topologiczna, a przede wszystkim biosyntetyczna [42] pokazują, że chociaż ściany komórkowe usytuowane są na zewnątrz komórki, to stanowią one część tejże komórki. Wiadomo również, że cytoskielet komórki i jej błona komórkowa połączone są ze ścianami komórkowymi w jedno funkcjonalne i strukturalne *continuum* [27, 31, 43]. Umożliwia to nie tylko regulację funkcji mechanicznych, ale także koordynację wymiany informacji między- i wewnątrzkomórkowej, a przede wszystkim zapewnia stabilny szlak przekazywania sygnałów od zewnętrznych peryferii komórki bezpośrednio do jądra. Udział ścian komórkowych w ustalaniu położenia jądra komórek roślin [19], czy też, wykryta niedawno, obecność mechanicznych połączeń pomiędzy jądrami komórek ludzkich a ich powierzchnią [24], potwierdzają tego typu sugestie. Pamiętać również należy, że komórka nie jest „workiem z enzymami”, a jej metabolizm nie jest mieszaniną reakcji swobodnie przebiegających w roztworze. Znaczna część aktywności biochemicznej komórki to reakcje „w ciele stałym”, z udziałem białek, których prawidłowe funkcjonowanie zależne jest m.in. od dostępności wody czy też warunków biofizycznych (mechanicznych) w ich bezpośrednim otoczeniu [15]. Obecność ciągłego *continuum*, obejmującego wszystkie elementy strukturalne komórki, dostarcza trójwymiarowej konstrukcji architektonicznej, zapewniającej tak mechaniczne, jak i biochemiczne warunki do prawidłowego funkcjonowania komórki w roślinie [42]. W takim układzie, integracja ścian komórkowych, jako głównego stabilizatora „architektury życia” [16], w obręb komórki roślinnej wydaje się jedynym logicznym posunięciem.

Pewien krok na drodze do integralnego pojmowania komórek roślinnych uczyniony został w 1993 r., wraz z propozycją Wyatt i Carpity [43], by powszechnie stosowany termin „matriks pozakomórkowa” (ang. *extracellular matrix*, ECM) zmodyfikować na mniej ostre sformułowanie „matriks zewnątrzkomórkowa” (ang. *exocellular matrix*, ECM). Choć propozycja ta nie likwidowała źródła konfliktów terminologicznych, pozwalała na większą dowolność interpretacyjną usytuowania ścian komórkowych w relacji do protoplastu i całej komórki roślinnej [43]. Propozycja, którą przedstawiam tutaj, powraca do klasycznej definicji komórki roślinnej [9], ale zwraca uwagę na dwa, podstawowe w moim rozumieniu, aspekty:

- 1) usytuowanie komórki roślinnej w kontekście organizmu, a więc w relacji części do całości oraz

- 2) włączenie ścian komórkowych w obręb komórek roślinnych jako integralnej, zewnętrznej części tychże.



W tym sensie, ściana komórkowa staje się „powierzchnią zdarzeń” Lintilhaca [23] lub inaczej miejscem, w którym stykają się cechy komórkowe i organizmalne roślin [20].

## LITERATURA

- [1] ALBERTS B, BRAY D, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. Podstawy Biologii Komórki. Wprowadzenie do Biologii Molekularnej. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN 1999.
- [2] BOLWELL GP. Dynamic aspects of the plant extracellular matrix. *Int Rev Cytol* 1993; **146**: 261–324.
- [3] BRETT C, WALDRON K. Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls. 2<sup>nd</sup> Ed. London: Chapman & Hall 1996.
- [4] BRUCK DK, WALKER DB. Cell determination during embryogenesis in *Citrus jambhiri*. I. Ontogeny of the epidermis. *Bot Gaz* 1985; **146**: 188–195.
- [5] CARPITA NC, GIBEAUT DM. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* 1993; **3**: 1–30.
- [6] CHRISPEELS MJ. Plant physiology has become plant biology, a cross-disciplinary science. *Plant Physiol* 1996; **112**: 1–2.
- [7] COOKE TJ, LU B. The independence of cell shape and overall form in multicellular algae and land plants: cells do not act as building blocks for constructing plant organs. *Int J Plant Sci* 1992; **153**: S7–S27.
- [8] Encyklopedia Biologiczna. Tom V. Kraków: OPRES 1998
- [9] ESAU K. Anatomy of Seed Plants. 2<sup>nd</sup> Ed. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore: John Wiley & Sons 1997.
- [10] HAGEMANN W. The relationship of anatomy to morphology in plants: a new theoretical perspective. *Int J Plant Sci* 1992; **153**: S38–S48.
- [11] HAGEMANN W. Towards an organismic concept of land plants: the marginal blastozone and the development of the vegetation body of selected frondose gametophytes of liverworts and ferns. *Plant Syst Evol* 1999; **216**: 81–133.
- [12] HOFMEISTER W. Die Lehre von der Pflanzenzelle. [w] Hofmeister W [red.] Handbuch der physiologischen Botanik. Tom 1. Leipzig: Engelmann 1867.
- [13] HOOKE R. Micrographia: On Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses with Observations and Inquiries Thereupon. London: Royal Society of London 1665.
- [14] HOWELL SH. Molecular Genetics of Plant Development. Cambridge: Cambridge University Press 1998.
- [15] INGBER DE. The riddle of morphogenesis: a question of solution chemistry or molecular cell engineering? *Cell* 1993; **75**: 1249–1252.
- [16] INGBER DE. Architektura życia. *Świat Nauki* 1998; **3**: 48–57.
- [17] KAPLAN DR. The relationship of cells to organisms in plants: problem and implications of an organismal perspective. *Int J Plant Sci* 1992; **153**: S28–S37.
- [18] KAPLAN DR, HAGEMANN W. The relationship of cell and organism in vascular plants. *BioScience* 1991; **41**: 693–703.
- [19] KATSUTA J, SHIBAOKA H. The roles of the cytoskeleton and the cell wall in nuclear positioning in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol* 1988; **29**: 403–413.
- [20] KORN RW. Biological organization – A new look at an old problem. *BioScience* 1999; **49**: 51–57.

- [21] LACHAUD S, CATESSON A-M, BONNEMAIN J-L. Structure and functions of vascular cambium. *C R Acad Sci Paris, Sciences de la Vie/Life Sci* 1999; **322**: 633–650.
- [22] LINDSEY K, TOPPING J. On the relationship between the plant cell and the plant. *Semin Cell Develop Biol* 1998; **9**: 171–177.
- [23] LINTILHAC PM. Toward a theory of cellularity – Speculations on the nature of living cell. *BioScience* 1999; **49**: 59–68.
- [24] MANIOTIS AJ, CHEN CS, INGBER DE. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 849–854.
- [25] McLEAN BG, HEMPEL FD, ZAMBRYSKI PC. Plant intercellular communication via plasmodesmata. *Plant Cell* 1997; **9**: 1043–1054.
- [26] MEYER Y, ABEL WD. Importance of the cell wall for cell division and in the activity of the cytoplasm in cultured tobacco protoplasts. *Planta* 1975; **123**: 33–40.
- [27] MILLER DD, DE RUIJTER NCA, EMONS AMC. From signal to form: aspects of the cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in root hair tips. *J Exp Bot* 1997; **48**: 1881–1896.
- [28] NIKLAS KJ. *Plant Biomechanics. An Engineering Approach to Plant Form and Function*. Chicago, London: The University of Chicago Press 1992.
- [29] PEDROSO MC, PAIS MS. Factors controlling somatic embryogenesis – Cell wall changes as an *in vitro* marker of embryonic competence. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 1995; **43**: 147–154.
- [30] Podstawy Cytofizjologii. Kawiak J, Mirecka J, Olszewska M, Warchoł J [red.] Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN 1995.
- [31] REUZEAU C, PONT-LEZICA RF. Comparing plant and animal extracellular matrix-cytoskeleton connections – are they alike? *Protoplasma* 1995; **186**: 113–121.
- [32] ROBERTS K. The plant extracellular matrix: in a new expansive mood. *Curr Opin Cell Biol* 1994; **6**: 688–694.
- [33] ROBINSON DG. What is a plant cell? The last word. *Plant Cell* 1991; **3**: 1145–1146.
- [34] SACK F. What is a plant cell? Continued... . *Plant Cell* 1991; **3**: 844.
- [35] SCHLEIDEN MJ. Beiträge zur Phytogenesis. *Arch Anat Physiol* 1838; 1838: 137–177.
- [36] SCHWANN T. *Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstume der Tiere und Pflanzen*. Leipzig: Engelmann 1839.
- [37] Słownik Botaniczny. Szweykowska A, Szweykowski J [red.] Warszawa: Wiedza Powszechna 1993.
- [38] STAEHELIN LA. What is a plant cell? A response. *Plant Cell* 1991; **3**: 553.
- [39] STAFFORD HA. What is a plant cell? *Plant Cell* 1991; **3**: 331.
- [40] SUZUKI K, ITOH T, SASAMOTO H. Cell wall architecture prerequisite for the cell division in the protoplasts of white poplar, *Populus alba* L. *Plant Cell Physiol* 1998; **39**: 632–638.
- [41] VARNER JE, LIN L-S. Plant cell wall architecture. *Cell* 1989; **56**: 231–239.
- [42] WOJTASZEK P. Genes and plant cell walls: a difficult relationship. *Biol Rev (Cambridge)* 2000; w druku.
- [43] WYATT SE, CARPITA NC. The plant cytoskeleton-cell-wall continuum. *Trends Cell Biol* 1993; **3**: 413–417.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 23.02. 2000 r.

Przyjęto: 06.03.2000 r.

Adres autora: ul. Z. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań  
email. przemow@ibch.poznan.pl.



## CZY ZWIERZĘTA Z CELOWANĄ MODYFIKACJĄ GENOMU SĄ WIARYGODNYM MODELEM BADAWCZYM? LEKCJE Z NEUROBIOLOGII

DO ANIMALS WITH TARGETED GENOMIC MODIFICATION  
PROVIDE RELIABLE RESEARCH MODEL.  
LESSONS FROM THE NEUROBIOLOGY

Anna KOWALCZYK

Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Zwierzętarńia, Warszawa

*Streszczenie:* W pracy omawiane są wybrane modele mysie ze znokautowanymi genami, użyte w badaniach nad układem nerwowym. Niejednolite tło genetyczne zwierząt, udział genotypu myszy szczepu 129 – głównego źródła embrionalnych komórek macierzystych, defekty rozwojowe, pleiotropia i efekty kompensacyjne, to tylko niektóre z przyczyn utrudniających interpretację wyników uzyskanych na tym modelu. Stosowanie specyficznych czasowo i przestrzennie „nokautów drugiej generacji”, wprowadzenie transgenów odwracających efekt usunięcia genu, blokowanie genów antysensowym mRNA bądź przez mutacje punktowe pozwala na wyeliminowanie niektórych wątpliwości.  
(*Postępy Biologii Komórki* 2000; 27: 325–342)

*Słowa kluczowe:* modele mysie ze znokautowanymi genami

*Summary:* This article is focused on problems related to application of mice knock-outs used in neurobiology. Diverse genetical background, genotype of mouse strain 129 (the main source of embryonic stem cells), developmental defects, pleiotropy and compensation make the interpretation of results from knock-out models difficult. The use of time- and space-specific „knock-outs of second generation”, introduction of transgenes that reverse the effect of gen knock-outs, blocking of genes by antisense mRNA or point mutations may aid in eliminating some of these problems.  
(*Advances in Cell Biology* 2000; 27: 325–342)

*Key words:* knock-out mice

## WSTĘP

### Zwierzęta z celowaną modyfikacją genomu i ich znaczenie

Od kilkunastu lat dostępny jest model badawczy w postaci zwierząt transgenicznych. Jedną z ich odmian są zwierzęta o celowanej modyfikacji genomu, tzw. mutanty zerowe, znane także jako nokauty (ang. *gene knockout*) albo zwierzęta z ukierunkowaną delecją. Do ich powstania przyczyniły się zwłaszcza obserwacje zjawiska homologicznej rekombinacji w komórkach somatycznych zwierząt wyższych [6].

Mutanty zerowe charakteryzują się głównie tym, że są pozbawione funkcjonalnie czynnego, konkretnego genu. Technika wykorzystywana do stworzenia takich zwierząt polega na całkowitym bądź częściowym usunięciu genu i zastąpieniu go obcym zmodyfikowanym fragmentem DNA drogą homologicznej rekombinacji [22,44,49]. Postępowanie to uniemożliwia powstanie biologicznie czynnego produktu genu zmodyfikowanego i tym samym daje nam wgląd we wszystkie konsekwencje rozwojowe i czynnościowe, jakie ta zmiana ze sobą niesie.

Korzystanie ze zwierząt z celowaną mutacją pozwala na studiowanie mechanizmów regulacyjnych genu, modelowanie chorób dziedzicznych i nowotworowych, tworzenie nowych leków, a nawet kreowanie nowych genów nie występujących w przyrodzie.

Celowana mutacja zerowa u myszy jest świetnym narzędziem do stwierdzenia, które geny są niezbędne do życia, które odpowiadają za prawidłowe funkcjonowanie organizmu w różnych okresach rozwojowych, a które za procesy adaptacyjne. Co roku powstają nowe modele zwierzęce z mutacjami zerowymi, imitujące choroby ludzkie, wnoszące wkład w poznanie mechanizmów zaburzeń oraz wskazujące kierunki leczenia. Nie ma dziś prawie dyscypliny w naukach biomedycznych, która by nie skorzystała choć w niewielkim stopniu z techniki nokautu [7,10,12,14,23,30,31,37,40,47,55].

### Technika celowanej modyfikacji genu

Ukierunkowaną delecję (a dokładniej zamianę) genu u myszy wykonuje się od strony technicznej w sposób następujący:

a) *in vitro* tworzy się zmutowany fragment DNA zwany wstawką; zajmie on miejsce genu, który chcemy usunąć (rys. 1); wstawka zawiera także umożliwiające selekcję (patrz niżej) geny markerowe z odpowiedniego wektora (wektorem może być np. plazmid, wirus SV40, wirusy: brodawczaka, krowianki, bakulowirus, adenowirus lub retrowirus) [57] i odcinki homologiczne do odcinków otaczających gen usuwany;



b) z macicy ciężarnych myszy wyplukuje się 3-dniowe zarodki, których węzeł zarodkowy zawiera komórki macierzyste, ESC (ang. *embryonic stem cells*); są one komórkami niezróżnicowanymi, totipotentnymi i do nich wprowadza się metodą, np. elektroporacji, lipofekcji, balistyczną czy laserową [45,53,54], zmutowany fragment obcego DNA;

c) jeśli zostanie on prawidłowo zintegrowany z genomem ESC, zmienione komórki ESC nabeżdżą zdolności przeżycia na podłożu selekcyjnym, dzięki czemu będzie można je wyodrębnić spośród innych niezmodyfikowanych [50]; komórki te zostaną następnie wprowadzone do blastocyst, a blastocysty są implantowane do matek zastępczych, po czym urodzą się z nich chimery – zwierzęta mające w sobie materiał genetyczny z blastocysty i zmodyfikowanych komórek ESC; będzie je ponadto charakteryzował brak jednego allelu genu, który usuwaliśmy;

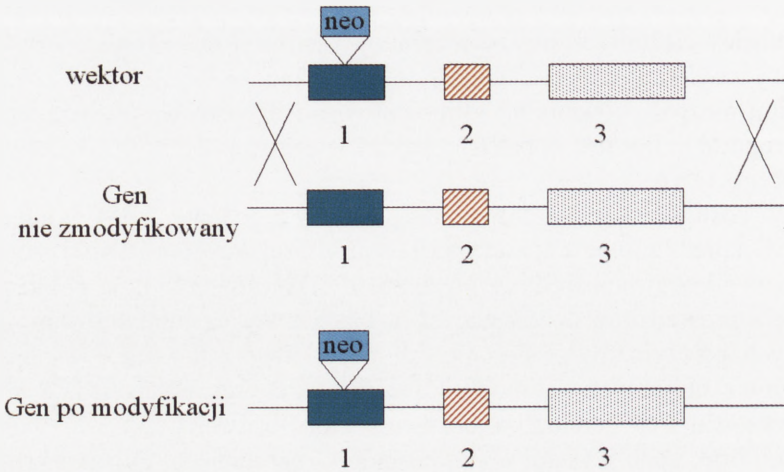
d) jeżeli brak genu wystąpi w linii komórek rozrodczych, to przez krzyżowanie takich chimer między sobą otrzymamy w kolejnym pokoleniu 1/4 potomstwa, które będzie pozbawione obu kopii interesującego nas genu.

### Problemy ze zwierzętami o zmodyfikowanym genomie

Po początkowym okresie entuzjazmu związanego z nową technologią zwrócono uwagę na liczne problemy, jakie niesie jej zastosowanie, oraz podważono wiarygodność szeregu uzyskanych przy jej pomocy wyników. Szczególnie dobitnie ujawniło się to w badaniach neurobiologicznych, zwłaszcza zaś tych, których celem było określenie udziału wybranych genów w zachowaniu się myszy. Warto zatem przyjrzeć się tym problemom i źródłom ich pochodzenia.

Już w technologii uzyskiwania zwierząt z ukierunkowaną delecją tkwią pierwsze pułapki poważnie utrudniające na późniejszym etapie interpretację wyników i podważające ich wiarygodność. Zarodkowe komórki macierzyste ESC uzyskuje się głównie ze szczepu myszy 129, który charakteryzuje się licznymi anomaliami anatomicznymi i neurologicznymi m.in. brakiem *corpus callosum* (spoidło wielkie łączące lewą i prawą półkulę mózgu). Nic więc dziwnego, że także wyniki testów behawioralnych, w których badano emocje i równowagę, uzyskane na myszach 129 są nietypowe w porównaniu z innymi szczepami [1,4,16,26]. Myszy szczepu 129 są bierne i źle wypadają w teście otwartego pola, służącym ocenie emocjonalności zwierzęcia (pomiar jego zdolności eksploracyjnych i pokonywania lęków po umieszczeniu w nowym otoczeniu) oraz w teście „rotorod” – trzymaniu równowagi na obrotowym pręcie [1,4,16,26,38]. Z tych to powodów szczep 129 nie może być bez zastrzeżeń zaakceptowany jako wzorcowy, a uzyskane na nim wyniki przenoszone na pozostałe szczepy czy też w inny sposób uogólniane.

Co więcej, kolejnym poważnym argumentem przemawiającym przeciwko szczepowi 129 jako dawcy ESC, czy szczepowi, który wybierzemy do dalszych krzyżowań, jest niejednorodność jego licznych podszczepów utrzymywanych w różnych ośrod-



RYSUNEK 1. Nokaut genu z wykorzystaniem rekombinacji homologicznej: 1, 2, 3 to eksony – regiony kodujące genu. Gen oporności na neomycynę rozbija ekson kodujący białko i jest zarazem markerem selekcyjnym dla komórek, które uległy modyfikacji

kach hodowlanych na świecie. Myszy te różnią się w kilkunastu loci i nie przyjmują od siebie nawzajem przeszczepów [41], a więc uzyskane od nich linie komórek ESC również się różnią. Trudno w takiej sytuacji mówić o zwierzętach powstałych na bazie tych polimorficznych ESC jako o jednorodnym szczepie 129.

Elementami krytycznymi w późniejszych etapach tworzenia myszy z celowaną mutacją zerową mogą się okazać: wybór szczepu do dalszych kojarzeń i sam sposób łączenia w pary. Idealem byłoby trzymanie się przy krzyżowaniach tego samego szczepu, z którego pochodziły komórki ESC. Szczep 129 jest jednak niezbyt odpowiedni do badań neurobiologicznych i sprawia kłopoty w hodowli. Dlatego popularne jest kojarzenie osobników heterozygotycznych pod względem genu zmodyfikowanego z osobnikami pochodzącymi ze szczepów C57BL, BALB/c, CD1, CBA, DBA lub ich krzyżówkami. Geny szczepu, na jaki się decydujemy, tworzą łącznie z genami szczepu komórek ESC tło genetyczne mutantu zerowego i osobników kontrolnych, a ponadto współdziałają z pozostałymi genami wstawki modyfikującej [2]. Dlatego też szczegółowa analiza genetyczna zwierząt ze znokautowanym genem nie powinna nigdy ograniczać się do locus zmutowanego.

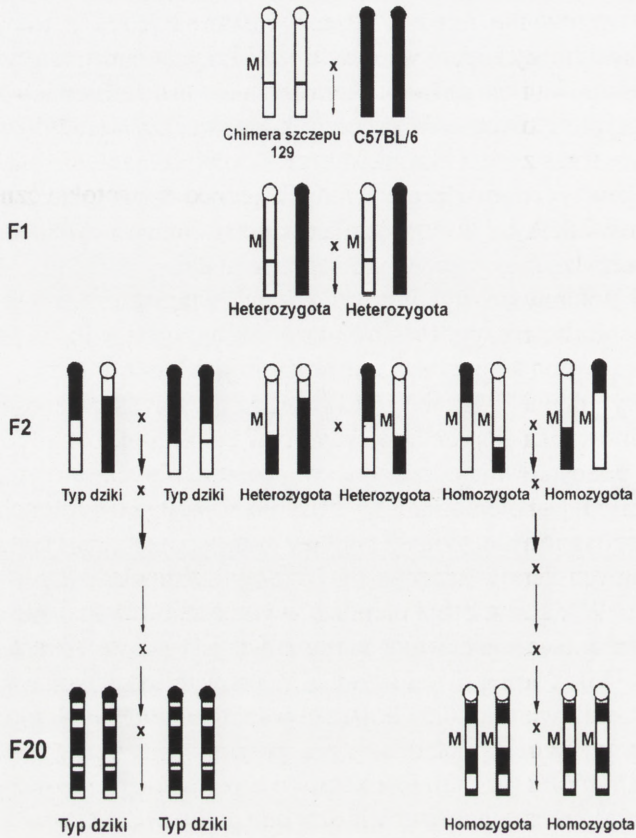
Podczas badań behawioralnych prowadzonych na mysich chimerach zaobserwowano, że odpowiedź, wynikająca rzekomo z funkcji badanego genu, może się różnić w zależności od tła genetycznego szczepu, na którym jest on umieszczony, a zatem może pochodzić spoza locus badanego. Mając zatem możliwość wyboru tła, na jakie będzie wprowadzona mutacja zerowa, powinniśmy korzystać z informacji o szczepach myszy [1,4,16,26,38].



W celu otrzymania zwierząt nokautowych stosuje się kilka rodzajów krzyżowań. Mogą to być krzyżowania między homozygotami, między heterozygotami bądź heterozygot z czystym szczepem wsobnym tzw. krzyżowanie wsteczne. To ostatnie jest zaledwie postępowaniem pośrednim, zmierzającym do eliminacji udziału jednego szczepu w genotypie i stworzenia zwierząt kongenicznych (różniących się jednym genem lub małym fragmentem chromosomu). Dopiero kojarzenie osobników o ujednoliconym tle genetycznym i pozbawionych jednej kopii genu modyfikowanego między sobą, prowadziłyby do uzyskania zwierząt nokautowych. Kontrolę do nich stanowiłby szczep wsobny zgodny ze szczepem tła.

Homozygoty nokautowe wykorzystywane w badaniach uzyskuje się przez kojarzenie między sobą heterozygot w stosunku do zmutowanego locus. Grupę kontrolną do nich stanowią osobniki pozbawione mutacji, urodzone z tych samych miotów, tzw. homozygoty „dzikie”. Trzeba zauważyć, że homozygotyczność ta dotyczy jedynie locus zajmowanego przez interesujący nas gen, podczas gdy dwuszczepowe tło genetyczne pozostaje niejednorodne w poszczególnych osobnikach i zmienia się wraz z kolejnymi pokoleniami. Krzyżowanie homozygot z mutacją między sobą, a osobników pozbawionych mutacji między sobą pozwala na skuteczne śledzenie losów segregujących genów szczepu tła i szczepu wstawki jedynie przez dwa pokolenia (rys. 2). W dalszych pokoleniach wymieszanie tych genów staje się tak znaczne (niezależna segregacja), że niemożliwe jest proste określenie źródeł ich pochodzenia [16,36]. Z tego powodu strategia stosowania kojarzeń wsobnych między homozygotami zmutowanymi oraz kojarzeń wsobnych między homozygotami „dzikimi” jako kontrolami jest błędna, i nie powinno się korzystać ze zwierząt z pokoleń dalszych niż F2 (rys. 2). Rodzeństwo typu dzikiego nie jest dobrą kontrolą dla homozygotycznych mutantów również z innego powodu. Często śledząc zmiany w zachowaniu zwierząt po pozbawieniu ich funkcji jakiegoś genu pochodzącego ze szczepu 129, a znajdującego się na tle genetycznym szczepu, np. C57BL, stwierdza się, że do złudzenia przypominają one zmiany obserwowane u szczepu 129. Dzieje się tak najprawdopodobniej, dlatego że zmiany te nie są wynikiem samej mutacji, ale raczej aktywności genów otaczających wstawkę, pochodzących z tego samego źródła co zmutowany locus, czyli szczepu 129. Jest to zgodne z zasadą, że geny blisko siebie leżące dziedziczą się razem. Sytuacja ta ukazuje również, że korzystamy z nieodpowiedniej kontroli, gdyż u osobników typu dzikiego fragment chromosomu odpowiadający wstawce u mutantu będzie pochodził ze szczepu C57BL, a nie 129, zatem będzie zawierał zupełnie inny zestaw alleli [16]. Przy kojarzeniach jedno-szczepowych tego rodzaju rozbieżności oczywiście nie istnieją.

Bardzo spektakularnym przykładem powyższego problemu, może być oporność na ekscytotoksyczne działanie kainianu (agonisty glutaminianu) w komórkach CA3 hipokampa, zaobserwowana u myszy z genotypem BALB/c i C57BL, pozbawionych w wyniku homologicznej rekombinacji czynnego genu, kodującego białko p53 (supresor nowotworów) [34]. Ekscytotoksyczność jest to zjawisko śmierci komórek



RYSUNEK 2. Typowy sposób krzyżowania w celu uzyskania mutantów homozygotycznych pod względem genu badanego i osobników kontrolnych. W pokoleniu F2 osobniki badane i kontrola do nich różnią się genami otaczającymi locus zmutowany, gdyż pochodzą one z odmiennych szczepów: M – gen zmutowany otoczony sekwencjami wstawki; kolory czarny i biały – geny pochodzące ze szczepów 129 i C57BL.

nerwowych wynikające z nadmiernej stymulacji receptorów dla glutaminianu, który w warunkach prawidłowych jest głównym neuroprzebieżnikiem pobudzającym w mózgu ssaków. Kainian podany dootrzewnowo imituje stan wzmożonej aktywacji komórek nerwowych wywołując u zwierząt początkowo drgawki, a następnie zmiany neurodegeneracyjne [43]. Ponieważ gen *p53* odgrywa rolę w naprawie uszkodzeń DNA i wykazuje zwiększoną ekspresję w uszkodzonych neuronach w modelach ischemii i epilepsji, sądzono, że odgrywa on również rolę w uszkodzeniach pokainianowych (kierując komórki na drogę apoptozy), a jego brak może działać



osłaniająco. Wydawało się zatem, że wynik uzyskany przy pomocy nokautu genu *p53* w pełni potwierdza przyjęte założenia. Okazało się jednak, że choć u wszystkich czterech szczepów myszy 129, FVB, BALB/c i C57BL zarejestrowano ataki drgawek, to u myszy 129 i FVB protekcyjnego efektu mutacji nie zaobserwowano. Co więcej, stwierdzono, że w hipokampach myszy szczepów C57BL i BALB/c kainian nie powoduje wystąpienia zmian neurotoksycznych. Można zatem sądzić, że sam brak genu *p53* nie jest wystarczający do ochrony przed neurotoksycznym działaniem kwasu kainowego (KA), [34,38] i że inne geny biorące udział w mechanizmie ochronnym pochodzący z tła genetycznego szczepów C57BL i BALB/c [11,38].

Innym przykładem wyników, które trudno wyjaśnić inaczej niż poprzez odmienność szczepów tła są różnice w charakterystyce myszy nokautowych bez genu *fosB* uzyskanych w laboratoriach Greenberga [5] i Bravo [20]. Pierwsze mutanty są na tle szczepów 129/Sv x BALB/c i wykazują brak opieki nad potomstwem, podczas gdy drugie, na tle szczepu C57BL, takiego defektu nie przejawiają.

Interesującym przykładem mogą tu być również badania nad zwierzętami ze znokautowanym genem  $\alpha$ CaMKII. Zasadniczo myszy pozbawione podjednostki  $\alpha$  kinazy białkowej zależnej od wapnia i kalmoduliny (ang.  $\alpha$ CaMKII) nie są zdolne do wytworzenia długotrwałego wzmocnienia synaptycznego LTP (ang. *long term potentiation*, elektrofizjologiczny model procesów uczenia się) w neuronach hipokampa. Stwierdzono jednak istnienie przypadków będących odstępstwem od tej reguły, a odpowiedzialnością za taki wynik obarcza się nieznaną przyczynę pochodzącą z fragmentu ESC otaczającego locus nokautowy (ESC typu E14, blastocysty z C57BL, narodzone samce skrzyżowane z BALB/c) [39].

Można przypuszczać, iż umieszczenie tej samej mutacji zerowej na różnych tłach genetycznych pozwala na wszechstronniejsze zbadanie funkcjonowania genu i wykrycie istnienia genów modyfikatorów pochodzących z odmiennego tła. Postępowanie takie nie daje jednoznacznej odpowiedzi, które zmiany są rzeczywiście wynikiem dokonanej mutacji, dowodzi jednak, że znajomość charakterystyki szczepów wyjściowych, biorących udział w wytworzeniu mutantu zerowego, jest bardzo pomocna w wykryciu istnienia takich zależności. Na bardziej precyzyjne rozgraniczenie źródeł zmian pozwoliłoby być może stworzenie mutacji nokautowych z genem markerowym. Gen taki znaczyłby specyficznie genotyp bądź jego część i utrzymywał się z pokolenia na pokolenie, bez szkody dla organizmu. Funkcje takiego markera mogłoby spełniać białko zielono fluoryzujące MmGFP (ang. *modified green fluorescent protein*), które wprowadzone z materiałem genetycznym do implantowanych blastocyst, daje się śledzić u osobników z nich urodzonych i wnioskować o dalszych losach tego materiału w nowopowstałym organizmie [58].

Mówiąc o lekcjach płynących z eksperymentów behawioralnych, trudno nie wspomnieć o labiryncie wodnym Morrisa. Badania nad uczeniem się i pamięcią u myszy i szczurów prowadzone są głównie w różnych wersjach tego labiryntu. Lipp i Wolfer [29] oraz Wolfer i wsp. [52] wskazują na interesującą prawidłowość zaobserwowaną

po przetestowaniu ponad 1500 myszy. Różne zwierzęta nokautowe poszukując platformy, obierają w przeważającej większości strategię pływania po obwodzie basenu, przy jego ścianie (tzw. *thigmotaxis*), a następnie zataczają coraz mniejsze koła, aż do osiągnięcia celu. Strategia ta charakterystyczna dla większości mutantów zerowych jest odmienna od standardowej obieranej przez różne szczepy myszy i szczurów oraz ich krzyżówki. Fakt ten jest tłumaczony pogorszeniem zdolności uczenia się. Z kolei wyniki analizy czynnikowej wskazują, iż zależność taka (*thigmotaxis versus* zdolność uczenia się) jest tylko częściowa, co koniecznie wymaga uwzględnienia w interpretacji wyników testu. Także samo założenie, że istnieje tylko jeden właściwy sposób rozwiązania zadania, tj. szukania platformy, wymaga chyba ponownej weryfikacji, jeśli ma odzwierciedlać pełnię różnic behawioralnych charakteryzujących nowe modele, jakimi są zwierzęta nokautowe czy transgeniczne.

W tym samym teście labiryntu wodnego Morrisa zwierzę wykonuje czasem prawidłowo zadanie dotarcia do oznakowanej platformy (niezaburzone uczenie), a ma problemy ze znalezieniem platformy ukrytej pod wodą, co jest postrzegane jako dowód na pogorszone uczenie. Ponieważ wyniki testów u myszy poddanych lezji hipokampa wskazują, iż uszkodzenia te pogarszają umiejętność poszukiwania platformy zarówno ukrytej, jak i widocznej, uważa się, że odnajdywanie platformy oznakowanej może być zadaniem o zbyt niskim stopniu trudności, by wykryć zmiany w uczeniu nieznacznego stopnia i tym sposobem zwierzęta lekko upośledzone zostaną niewłaściwie sklasyfikowane.

### Inne możliwe czynniki składające się na istotne wątpliwości interpretacyjne

Jak już zostało wspomniane, działanie mutacji zerowej nie jest jedyną składową tworzącą nowy fenotyp. Innymi istotnymi czynnikami współdziałającymi i utrudniającymi zarazem interpretację wyników, oprócz genów szczepu tła i genów otczających locus zmutowany, mogą być defekty rozwojowe i fizjologiczne, mechanizmy kompensacyjne, plejotropia, autoreperacja czy różnice spowodowane mitochondrialnym DNA matczynym.

### Plejotropia i kompensacja

Mutacja zerowa niektórych genów wywołuje wiele odrębnych efektów fenotypowych, sprawiających wrażenie, że nie mają ze sobą związku, choć są one wynikiem tylko jednej modyfikacji w genomie. Sumę takich zmian określa się mianem plejotropii. Przykładem plejotropowego efektu genu może być zróżnicowany fenotyp u myszy, po usunięciu wspomnianego już genu *p53* [14,34]. Brak genu *p53* powoduje wczesny rozwój nowotworów różnorodnych narządów, w tym mózgu.



Efekt ten wynika z faktu, że gen *p53* zwiększa śmierć komórek w przypadkach nieprawidłowej proliferacji. Liczne efekty plejotropowe można również zaobserwować u myszy pozbawionych genów kodujących białka połączeń szczelinowych (ang. *gap junction*) zwane koneksynami. Brak koneksyny 32 (Cx32) odpowiada za występowanie nowotworów wątroby, dysfunkcję tego narządu w odpowiedzi na stymulację nerwów współczulnych oraz zwolnione obwodowe przewodnictwo nerwowe [3,35,46], a brak koneksyny 43 (Cx43) jest przyczyną zaburzeń kardiologicznych, nieprawidłowości w budowie soczewek i zwolnionego niesynchronicznego przewodnictwa (zaburzenie fali wapniowej w astrocytach) [21].

Wydaje się, że najczęściej wieloraki efekt fenotypowy obserwuje się u takich mutantów zerowych, u których usuwany gen odpowiada za wystąpienie zmian rozwojowych. Przykładem mogą tu być myszy bez genu *wnt* (proto-onkogen) pozbawione śródmózgowia, tyłomózgowia bądź części mózdzku. Tak silnie neurotropowy fenotyp sprawia, że giną one wcześniej, już *in utero* lub w 24 godziny po narodzinach. Gen *wnt* jest odpowiedzialny prawdopodobnie za tworzenie wzorca przestrzennego, według którego przebiega formowanie struktur w mózgu, skoro sam wywołuje tak liczne defekty [30].

Czasami zmiany fenotypowe u mutantów zerowych nie są widoczne. Może to być oznaką działania jakiegoś mechanizmu kompensacyjnego, np. reakcji zwiększających aktywność genów powiązanych z badanym locus, które przejmują funkcje genu zmutowanego i zarazem maskują brak jego produktu [28]. Przykładowo Chen i wsp. [8] nie obserwowali zmian w długotrwałym osłabieniu synaptycznym – LTD (ang. *long term depression*) w mózdzku myszy – u mutantów zerowych genu kodującego PKC  $\gamma$ . Zachowanie prawidłowego LTD będącego formą plastyczności neuronalnej, u tych mutantów, jest o tyle interesujące, że powszechnie uważa się, iż do jego indukcji potrzebna jest aktywacja kinazy białkowej C. Otrzymany wynik pozwala przypuszczać, że istnieje alternatywna, nieznana droga indukcji tej formy plastyczności synaptycznej, będącej kompensacją braku właściwej kinazy bądź jest zbyt mała czułość testu mierzącego LTD, który mógł nie wykryć zmian, jeśli były nieznaczne.

Zjawisko kompensacji u zwierząt z celowaną modyfikacją genomu nie zawsze jest tylko prostym zastąpieniem produktu jednego genu innym o podobnym działaniu, jak przykładowo wzrost aktywności kinazy tyrozynowej Src po usunięciu genu dla kinazy tyrozynowej Fyn [27]. Istnieje też możliwość wystąpienia zwiększonej ekspresji genu innego niż badany, prowadzącej do zaburzeń fenotypowych, które nie trudno przypisać genowi badanemu, podczas gdy zależność od niego może być tylko pośrednia [17]. Przykładem takiej sytuacji może być nadmierna aktywność funkcjonalna różnych składowych układu dopaminergicznego po usunięciu transportera dopaminy, prowadząca do kaskady neuronalnych zmian plastycznych [25]. Brak transportera wydłużał wielokrotnie (ok. 300 razy) czas obecności dopaminy w przestrzeni pozakomórkowej. Celem przywrócenia względnej równowagi w sy-

stemie, organizm zmniejszał liczbę pęcherzyków synaptycznych i uwalnianie dopaminy. Wzrastała natomiast paradoksalnie synteza dopaminy, mimo spadku poziomu wytwarzającego ją enzymu – hydroksylazy tyrozynowej [25].

Wiadomo, że kompensacja utraty genu może wystąpić na każdym z poziomów biologicznej organizacji: molekularnym, biochemicznym, a nawet behawioralnym. Jako teoretyczny przykład behawioralnej kompensacji Gerlai [18] podaje genetyczne uszkodzenie węchu, które zmusza zwierzę do preferencji bodźców wzrokowych, wpływając na liczne zmiany w strukturach mózgu związanych z tego typu bodźcami. Istnieje ewentualność, że badacz wysnuje z tych zmian wniosek, iż uszkodzony gen jest istotny dla układu wzrokowego (gdy w rzeczywistości jest to odpowiedź z niezidentyfikowanych genów, sprzężonych z genem „węchowym”). Jednocześnie Gerlai [18] sugeruje, że z podobnymi zagadkami stykamy się próbując połączyć efekt LTP z procesem uczenia się.

### Defekty rozwojowe

Słabością klasycznej technologii nokautu w odniesieniu do mózgu jest brak specyficzności przestrzennej i czasowej [9]. Poszczególne regiony mózgu pełnią różne funkcje wyrażające się ekspresją odmiennych genów. Konwencjonalne usunięcie genu z mózgu oznacza usunięcie go z całego organizmu, stąd trudność w przypisaniu zmian w zachowaniu czy elektrofizjologii brakowi genu w konkretnej strukturze mózgu.

Dodatkowy problem bierze się również stąd, że geny działają nie tylko w pełni ukształtowanym, dojrzałym mózgu, ale i w trakcie jego rozwoju. Oznacza to, że obserwowane zmiany w zachowaniu, czy inne defekty u „klasycznych zwierząt nokautowych” wzrastających bez udziału jakiegoś genu, mogą mieć charakter pośredni i wynikać z niemożności zrealizowania przez zwierzę normalnego programu rozwojowego. Dzieje się tak przykładowo u mysich mutantów zerowych bez jądrowego receptora hormonalnego NURR1 o nieznanym ligandzie (ang. *orphan*), niezdolnych do wykształcenia neuronów dopaminergicznych w śródmózgowiu [55].

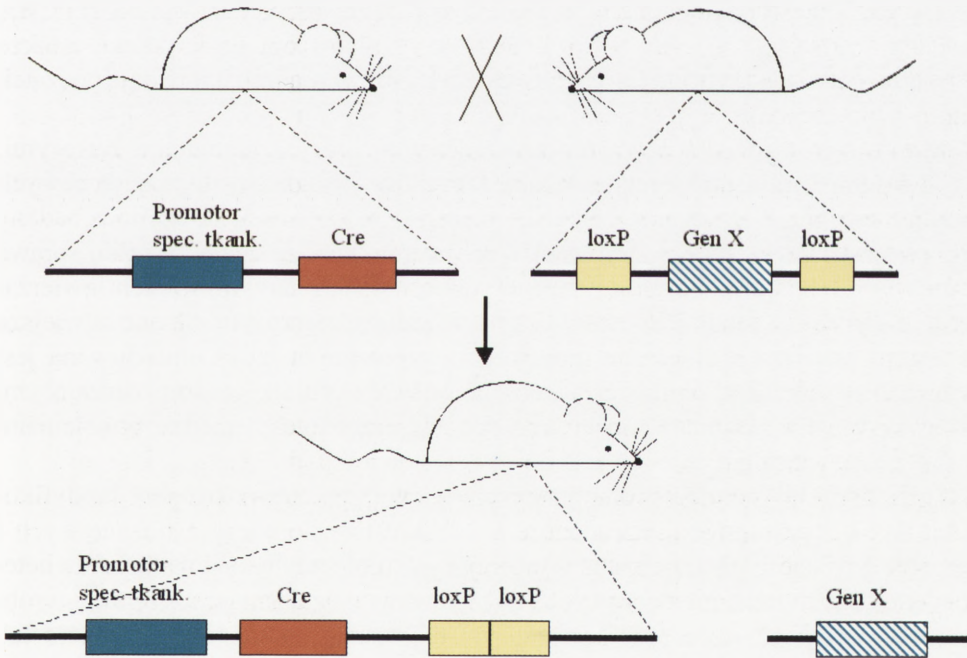
Drogę rozwiązania takich problemów wskazuje np. podejście doświadczalne zespołu Kandela. W celu przekonania się, czy przyczyną pogorszonego LTP w polu CA1 hipokampa i pogorszonego uczenia przestrzennego u myszy bez genu *fyn* jest rzeczywiście brak kinazy tyrozynowej Fyn, badacze ci wprowadzili transgen *fyn* do organizmu mutantów zerowych (*fyn*  $-/-$ ), przywracając zwierzętom wcześniej utracone funkcje. Powrót prawidłowego LTP i zdolności uczenia, potwierdziły zatem, iż zależą one od obecności *fyn*, a obserwowane zmiany są wynikiem nokautu, a nie nieznanymi defektami rozwojowymi [27].

Innym podejściem, mającym na celu wyeliminowanie opisywanych problemów jest wprowadzenie „zwierząt nokautowych drugiej generacji”, których ekspresja może być ograniczona do określonego typu komórek bądź wybranego czasu [56].



Efekt wywołania ekspresji zmodyfikowanego układu tylko w wybranym miejscu uzyskano przez dobór tkankowo-specyficznych promotorów bądź selektywne usunięcie określonego genu (tzw. „floksowanie genu”, od ang. *flanked by lox*). Jest to możliwe dzięki wykorzystaniu specyfiki działania rekombinazy Cre, enzymu rozpoznającego sekwencje sygnałowe *lox P* i wycinającego każdy zawarty między nimi fragment DNA [33](rys. 3). Ekspresja tego enzymu może być ograniczona do określonego obszaru mózgu dzięki zastosowaniu swoistego promotora.

Do uzyskiwania specyficzności czasowej u zwierząt z indukowanym nokautem genowym wykorzystano systemy transaktywatorowe oraz promotory genów późno uruchamianych w życiu zwierzęcia. W systemach transaktywatorowych używa się białek hybrydowych złożonych z domen: transaktywującej, wiążącej ligand np. tetracyklinę i warunkującej wiązanie z DNA. Transaktywatory rozpoznając specyficzne sekwencje umieszczone w sąsiedztwie miejsca startu transkrypcji badanego genu, włączają bądź wyłączają jego ekspresję w zależności od podania liganda [24]. Ponadto produkcja samych białek transaktywatorowych może być kontrolowana przez promotory genów późno uruchamianych w życiu zwierzęcia (np.



RYSUNEK 3. Zasada działania systemu *Cre-loxP*; system wymaga przygotowania dwóch szczepów wyjściowych zwierząt. Pierwszy zawiera specyficzny tkankowo promotor i gen rekombinazy Cre. Drugi zaopatrzony jest w sekwencje *lox P*, między którymi znajduje się odcinek DNA z genem, który planujemy usunąć. Skojarzenie w wybranym czasie zwierząt z obu szczepów oraz spotkanie sekwencji *lox P* z rekombinazą Cre, w tkance wyznaczonej przez promotor, spowoduje uruchomienie systemu i usunięcie genu X ze wskazanego miejsca

CaMKII). Przykładem zastosowania technik „floksovania” było uzyskanie przez zespół Tonegawy nokautów dla receptora NMDA (NMDAR1), którego brak u myszy ograniczony był wyłącznie do komórek CA1 hipokampa i pojawiał się po osiągnięciu przez zwierzęta wieku trzech tygodni [51].

### Rozwiązania

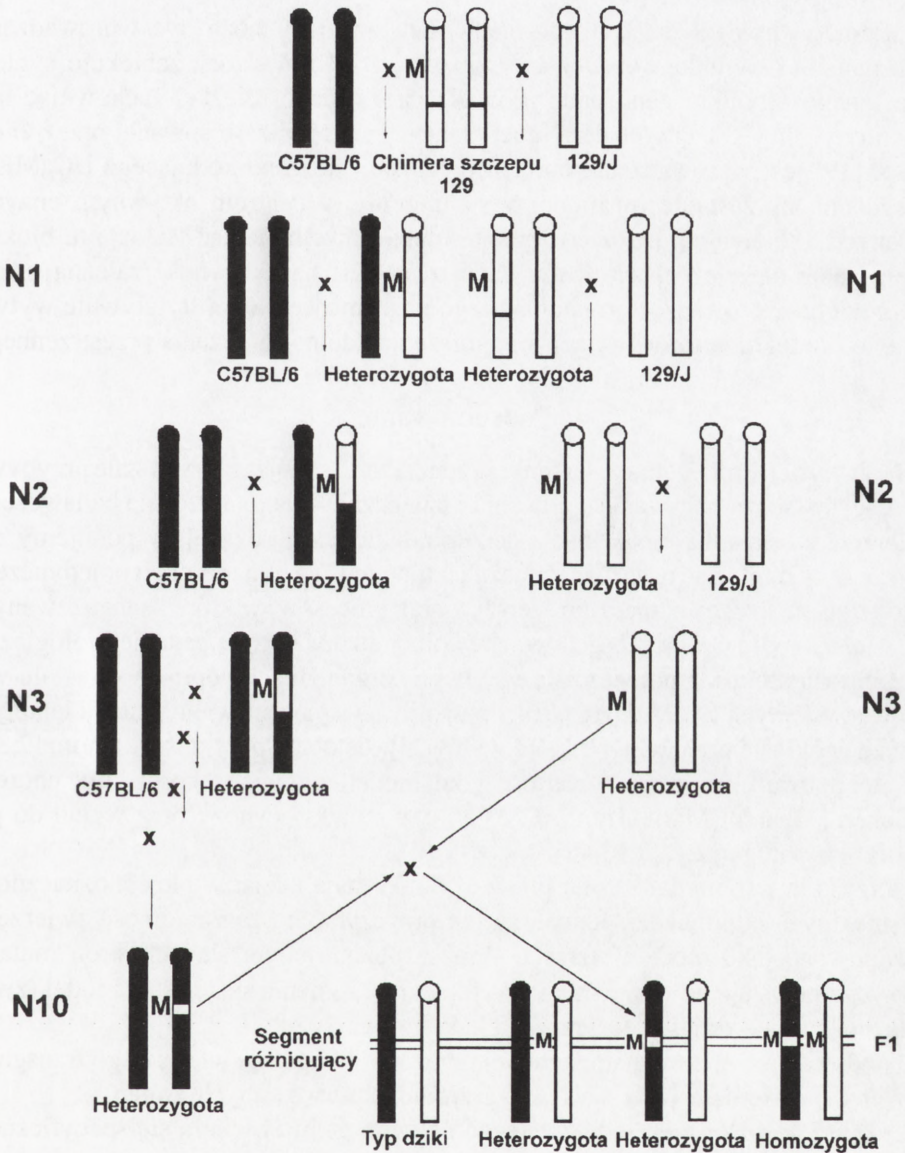
Nieuwzględnienie charakterystyki szczepów zmusza nas dzisiaj do ponownej oceny wyników badań nad uczeniem się. Dotyczy to zwłaszcza zwierząt z neuroanatomicznymi anomaliami lub o słabych wynikach w testach behawioralnych, które posłużyły do wytworzenia modeli z nokautem do tych badań [16].

Większość z nich powstała na bazie linii macierzystych komórek embrionalnych wywodzących się ze szczepu 129 (patrz str. 327–328). Do produkcji kolejnych zwierząt z mutacją zerową niezbędny jest więc szeroko zakrojony program poszukiwania nowych linii komórkowych, żywotnych i odpornych na warunki długotrwałej hodowli laboratoryjnej. Na uwagę zasługuje tu wyprowadzenie przez grupę Yagi i wsp. [53] nowej linii komórek ESC, tzw. linii TT2, wyprowadzonej z myszy pierwszego pokolenia krzyżówki między szczepami C57BL (samica) i CBA (samiec) [53]. Linię tę cechuje duża zdolność różnicowania się w tkanki, a także różnicowania się w komórki linii płciowej, czyli grupy komórek, które dają początek jajom i plemnikiem.

Mimo nagromadzenia pewnych doświadczeń w pracy z mutantami zerowymi, wciąż trudno o uniwersalne rekomendacje szczepów wsobnych do tworzenia nowych modeli. Niektórzy są zdania, iż każdy szczep o wrażliwości na czynnik badany jest tak samo dobry do eksperymentów pod warunkiem, że zdajemy sobie sprawę z jego specyfiki [15]. Firmy zajmujące się produkcją i utrzymywaniem zwierząt dążą do tworzenia modeli nokautowych na tle jednoszczepowym. Są one łatwiejsze w interpretacji niż analogiczne modele o tle mieszanym, gdyż eliminowana jest w nich dwuznaczność wynikająca ze współdziałania z genami otaczającymi wstawkę, pochodzącymi z innego szczepu oraz zmienność między pokoleniami z segregujących alleli.

Uczestnicy konferencji w Banbury poświęconej genomowi zwierząt modyfikowanych genetycznie [36] zaproponowali uzyskiwanie homozygot nokautowych i kontroli do nich drogą krzyżowań wypierających. Polegałyby one na łączeniu heterozygotycznych mutantów zerowych (+/-) z dwoma niezależnymi szczepami wsobnymi do uzyskania szczepów kongenicznych (różniących się jednym genem lub małym fragmentem chromosomu), a następnie kojarzeniu ich między sobą (rys. 4). Metoda ta zasługuje na uwagę, gdyż zmniejsza dryf genetyczny (przy malejącej zmienności genetycznej maleje też losowa fluktuacja w częstotliwości genów na skutek błędów) i redukuje wielkość różniących się fragmentów. Jest to jednak pro-





RYSUNEK 4. Proponowany sposób krzyżowań w celu uzyskiwania mutantów zerowych i kontroli o zminimalizowanych różnicach w obrębie genów wstawki z komórek ESC. Pierwszy etap polega na wyprowadzeniu dwóch szczepów kongenicznych, drugi zaś jest krzyżówką międzyszczepową dającą osobniki do badań. M – gen zmutowany otoczony sekwencjami wstawki, X – symbol kojarzenia, kolory czarny i biały – geny pochodzące ze szczepów C57BL i 129

cedura czasochłonna (ponad rok pracy hodowlanej przez minimum 6 pokoleń - ang. „*rapid congenic*”) [36].

Alternatywnym do uszkodzenia genu rozwiązaniem może być wprowadzenie do organizmu techniką nokautu antysensowego mRNA, który zablokuje syntezę określonego produktu genu bądź prowadzącą do niego ścieżkę, zachowując niezmienny gen [23]. Przykładem innej ciekawej strategii zastosowanej przez Giese i wsp. [19] jest wprowadzenie mutacji punktowej do genu kodującego  $\alpha$ CaMKII. Polega ona na zastąpieniu aminokwasu treoniny w centrum aktywnym enzymu w pozycji 286 alaniną, przez co zmianie ulega funkcja białka. Mutacja ta blokuje przełączanie niezależnej autofosforylacji  $\alpha$ CaMKII na aktywność zależną od Ca i kalmoduliny, prowadząc do nadmiernego nagromadzenia konstytutywnie wytwarzanego produktu autofosforylacji i pogorszenia zdolności uczenia przestrzennego.

### Podsumowanie

Setki mysich linii z wyłączoną funkcją genu, które istnieją i których stale przybywa, najlepiej świadczą o ich zaakceptowaniu i użyteczności jako narzędzia badawczego. Zwierzęta z celowaną modyfikacją genomu, takie jakimi dzisiaj dysponujemy, nie zawsze są w stanie dać nam jednoznaczną odpowiedź na temat funkcji pojedynczego genu. Dają za to często znacznie szerszy obraz procesów, w które zaangażowanych jest wiele współpracujących genów. Zrewolucjonizowały one badanie biologicznej roli białek u ssaków i potwierdziły w żywych organizmach poprawność wielu wyników uzyskanych wcześniej *in vitro*. Pozwoliły na wykrycie wielu mutacji letalnych jeszcze w okresie prenatalnym, które wymykały się do tej pory obserwacjom [7,37]. Nie do podważenia jest ich wartość jako modeli ludzkich chorób, np. choroby Gauchera, Charcot-Marie-Tooth (CMTX) czy mukowiscydozy oraz wkład do poznania ich patogenezы [3,13,48].

Wszystkie wspomniane w tej pracy czynniki mają udział w niejednoznaczności uzyskiwanych odpowiedzi. Jednak za ich przyczyną, nasza znajomość zwierzęcia nokautowego jako modelu wzrasta. Wraz z poznawaniem słabych stron mutantów zerowego powstają nowe techniki weryfikacyjne. Zmienia się też sam model (zwierzęta nokautowe drugiej generacji). I tak:

- 1) odwracając efekt mutacji zerowej przez wprowadzenie właściwego transgenu, możemy potwierdzić bądź wykluczyć źródło obserwowanych zmian,

- 2) przez zastosowanie indukowanego nokautu genu zwiększa się specyficzność działania badanego czynnika,

- 3) wprowadzając postulowaną standaryzację genetyczną produkowanych zwierząt można porównywać wyniki uzyskane w różnych laboratoriach na świecie.

Dzięki technice floksowania genu zwierzę może się prawidłowo rozwijać i dorastać z udziałem wszystkich genów. Eliminuje to część wątpliwości interpretacyjnych



istniejących w pracy ze zwierzętami, będącymi mutantami zerowymi od wieku embrionalnego.

Technika nokautu genowego z pewnością nie powinna być stosowana jako jedyna. Równoległe korzystanie choćby ze zwierząt transgenicznych, zwłaszcza o ekspresji indukowanej, wzbogaciłoby obraz działania genu o efekt nadmiernej ekspresji [42] i pozwoliło dodatkowo na odwracanie efektu, czego nie oferuje niestety model ze znokautowanym genem. Także wytworzenie mutacji zerowych o jednorodnym tle genetycznym zwiększyłyby czytelność interpretacji wyników i w tym kierunku powinny zmierzać starania przy konstruowaniu kolejnych modeli.

Tymczasem jednak, wnioski z badań nad mutantami zerowymi powinny być formułowane z dużą ostrożnością, zwłaszcza w neurobiologii, gdzie każda czynność zależy od wielu genów i niezwykle łatwo o błędną interpretację.

## LITERATURA

- [1] AIBA A, KANO M, CHEN C, STANTON ME, FOX GD, HERRUP K, ZWINGMANN TA, TONEGAWA S. Deficient cerebellar long-term depression and impaired motor learning in mGluR1 mutant mice. *Cell* 1994; **79**: 377–388.
- [2] ALLEN ND, NORRIS ML, AZIM SURANI M. Epigenetic control of transgene expression and imprinting by genotype-specific modifiers. *Cell* 1990; **61**: 853–861.
- [3] ANZINI P, NEUBERG D H, SCHACHNER M., NELLES E, WILLECKE K, ZIELASEK J, TOYKA K V, SUTER U, MARTINI R. Structural abnormalities and deficient maintenance of peripheral nerve myelin in mice lacking the gap junction protein connexin 32. *J Neurosci* 1997; **17**: 4545–4551.
- [4] BALK JH, PICETTI R, SALARDI A, THIRLER G, DIERICH A, DEPAULIS A, LE MEUR M, BORRELLI E. Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature* 1995; **377**: 424–428.
- [5] BROWN JR, YE H, BRONSON RT, DIKES P, GREENBERG ME. A Defect in nurturing in mice lacking the immediate early gene fos B. *Cell* 1996; **86**: 297–309.
- [6] CAPECCHI MR. Gen naszym celem. *Świat Nauki* 1994; **5**: 36–43.
- [7] CHAWENSAKSOPHAK K, JAMES R, HAMMOND VE, KOENTGEN F, BECK F. Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice. *Nature* 1997; **386**: 84–87.
- [8] CHEN C, KANO M, ABELIOVICH A, CHEN L, BAO S, KIM JJ, HASHIMOTO K, THOMPSON RF. Impaired motor coordination correlates with persistent multiple climbing fiber innervation in PKC  $\gamma$  mutant mice. *Cell* 1995; **83**: 1233–1242.
- [9] CHEN CH, TONEGAWA S. Molecular genetic analysis of synaptic plasticity, activity-dependent neural development, learning and memory in the mammalian brain. *Annu Rev Neurosci* 1997; **20**: 157–184.
- [10] CHISAKA O, CAPECCHI MR. Regionally restricted developmental defects resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene *hox-1.5*. *Nature* 1991; **350**: 473–479.
- [11] CHOI DW. Background genes: out of sight, but not out of brain. *Trends Neurosci* 1997; **20**: (11).
- [12] CLARKE AR, MAANDRAG EM, VAN ROON M, VAN DER LUGT NMT, VAN DER VALK M, HOOPER ML, BERNS A, TE RIELE H. Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature* 1992; **359**: 328–330.

- [13] CRUSIO WIME. Gene-targeting studies: new methods, old problems. *Trends Neurosci* 1996; **19**(5): 186–187.
- [14] DONEHOWER LA, HARVEY M, SLAGLE BL, MC ARTHUR MJ, MONTGOMERY JR CHA, BUTEL J, BRADLEY A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 1992; **356**: 215–221.
- [15] FRANKEL WN. Mouse strain backgrounds: more than black and white. *Neuron* 1998; **20**: 183.
- [16] GERLAI R. Gen targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype? *Trends Neurosci* 1996; **19**: 177–181.
- [17] GERLAI R. Gene targeting in neuroscience: the systemic approach. *Trends Neurosci* 1996; **19**: 188–189.
- [18] GERLAI R. A casual relationship between LTP and learning? Has the question been answered by genetic approaches? *Behav Brain Sci* 1997; **20**: 617–618.
- [19] GIESE KP, FEDOROV NB, FILIPKOWSKI RK, SILVA AJ. Autophosphorylation at Thr286 of the calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science* 1998; **279**: 870–873.
- [20] GRUDA MC, VAN AMSTERDAM J, RIZZO CH.A, DURHAM SK, LIRA S, BRAVO R. Expression of Fos B during mouse development: normal development of Fos B knock-out mice. *Oncogene* 1996; **12**: 2177–2185.
- [21] GUERRERO PA, SCHUESSLER RB, DAVIS LM, BEYER EC, JOHNSON CM, YAMADA KA, SAFFITZ JE. Slow ventricular conduction in mice heterozygous for a connexin 43 null mutation. *J Clin Invest* 1997; **15**: 1991–1998.
- [22] HETMAN M. Celowane modyfikowanie genomu ssaków. *Post Biol Kom* 1993; **20**: 217–238.
- [23] HOELSCHER C. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 1997; **20**: 298–303.
- [24] JAWORSKI J. Kontrolowana ekspresja egzogennych genów w komórkach ssaków. *Postepy Biochemii* 1998; **44**: 40–48.
- [25] JONES SR, GAINETDINOV RR, JABER M, GIROS B, WIGHTMAN R, CARON MG. Profound neuronal plasticity in response to inactivation of the dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci* 1998; **95**: 4029–4034.
- [26] KASHIWABUCHI N, IKEDA K, ARAKI K, HIRANO T, SHIBUKI K, TAKAYAMA C, INOUE Y, KUTSUWADA T, YAGI T, KANG Y, AIZAWA S, MISHINA M. Impairment of motor coordination, Purkinje cell synapse formation, and cerebellar long-term depression in GluR delta2 mutant mice. *Cell* 1995; **81**: 245–252.
- [27] KOJIMA N, WANG J, MANSUY IM, GRANT SETH GN, MAYFORD M. Rescuing impairment of long potentiation in fyn-deficient mice by introducing Fyn transgene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 4761–4765.
- [28] LATHE R. Mice gene targeting and behaviour: more than just genetic background. *Trends Neurosci* 1996; **19**: 183–186.
- [29] LIPP HP, WOLFER DP. Genetically modified mice and cognition. *Curr Opinion Neurobiol* 1998; **8**: 272–280.
- [30] LIU X, WU H, BYRNE M, KRANE S, JAENISCH R. Type III collagen for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 1852–1856.
- [31] LUO G, DUCY P, MCKEE MD, PINERO GJ, LOYER E, BEHRINGER R, KARSENTY G. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997; **386**: 78–81.
- [32] MC MAHON AP, BRADLEY A. The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* 1990; **62**: 1073–1085.
- [33] MORRIS RG, MORRIS RJ. Memory floxed. *Nature* 1997; **385**: 680–681.



- [34] MORRISON RS, WENZEL HJ, KINOSHITA Y, ROBBINS CA, DONEHOVER LA, SCHWARTZKROIN PA. Loss of the p53 Tumor suppressor gene protects neurons from kainate induced cell death. *J Neurosci* 1996; **16**: 1337–1345.
- [35] NELLES E, BUTZLER C, JUNG D, TEMME A, GABRIEL HD, DAHL U, TRAUB O, STUMPFL F, JUNGERMANN K, ZIELASEK J, TOYKA KV, DERMETZEL R, WILLECKE K. Defective propagation of signals generated by sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin 32-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 9565–9570.
- [36] NOTA WYDAWCY Mutant mice and neuroscience: recommendations concerning genetic background. Banbury conference on genetic background in mice. *Neuron* 1997; **19**: 755–759.
- [37] OFFERMANN S, MANCINO V, REVEL J, SIMON MI. Vascular system defect and impaired cell chemokinesis as a result of G  $\alpha$  13 deficiency. *Science* 1997; **275**: 533–536.
- [38] SCHAUWECKER PE, STEWARD O. Genetic determinants of susceptibility to excitotoxic cell death: Implication for gene targeting approaches. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 4103–4108.
- [39] SILVA AJ, PAYLOR R, WEHNER JM, TONEGAWA S. Impaired spatial learning in  $\alpha$ -calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 1992; **257**: 206–211.
- [40] SIMON AM, GOODENOUGH DA, LI E, PAUL DL. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature* 1997; **385**: 525–529.
- [41] SIMPSON EM, LINDER CC, SARGENT EE, DAVISSON MT, MOBRAATEN LE, SHARP JJ. Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice. *Nat Genet* 1997; **16**: 19–27.
- [42] SNOUWAERT JN, BRIGMAN KK, LATOUR AM., MALOUF NN, BOUCHER RC, SMITHIES O, KOLLER BH. An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. *Science* 1992; **257**: 1083–1088.
- [43] SPERK G, LASSMANN H, BARAN H, KISH S.J, SEITELBERGER F, HORNYKIEWICZ O. Kainic acid induced seizures: neurochemical and histopathological changes. *Neuroscience* 1983; **10**: 1301–1315.
- [44] SZOSTAK JW, ORR-WEAVER TL ROTHSTEIN RJ. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 1983; **33**: 25–35.
- [45] TAO W, WILKINSON J, STANDBRIDGE EJ, BERNS MW. Direct gene transfer into human cultured cells facilitated by laser micropuncture of the cell membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 4180–4184.
- [46] TEMME A, BUCHMANN A, GABRIEL HD, NELLES E, SCHWARZ M., WILLECKE K. High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin 32. *Curr Biol* 1997; **7**: 713–716.
- [47] TONDRAVI MM, McKERCHER SR, ANDERSON K, ERDMANN JM, QUIROZ M, MAKI R, TEITELBAUM SL. Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1. *Nature* 1997; **386**: 81–84.
- [48] TYBULEWICZ VLJ, TREMBLAY ML, LAMARKA TE, WILLEMSEN R et al. Animal model of Gaucher's disease from targeted disruption of the mouse glucocerebrosidase gene. *Nature* 1992; **357**: 407–410.
- [49] VALANCIUS V, SMITHIES O. Double-strand gap repair in a mammalian gene targeting reaction. *Molecular and Cellular Biology* 1991; **11**: 4389–4397.
- [50] WATSON JD, GILMAN M, WITKOWSKI J, ZOLLER M. Recombinant DNA. WH, Freeman and Company, Scientific American Books, New York 1992: 213–272.
- [51] WILSON MA, TONEGAWA S. Synaptic plasticity, place cells and spatial memory: study with second generation knockouts. *Trends Neurosci* 1997; **20**: 102–106.
- [52] WOLFER D, STAGLIAR-BOZICEVIC M, LIPP H-P. Spatial memory and learning in transgenic mice: fact or artefact? *News Physiol Sci* 1998; **13**: 118–123.

- [53] YAGI T, TOKUNAGA T, FURUTA Y, NADA S, YOSHIDA M, TSUKADA T, SAGA Y, TAKEDAN, IKAWA Y, AIZAWA S. A novel cell line, TT2, with high germline-differentiating potency. *Analytical Biochem* 1993; **214**: 70–76.
- [54] YANG NS, BURKHOLDER J, ROBERTS B, MARTINELL B, Mc CABE D. *In vivo* and *in vitro* gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 9568–9572.
- [55] ZETTERSTROM RH. Parkinson mouse. *Trends Genet* 1997; **13**(7): 263.
- [56] ZHANG Y, RIESTERER CH, AYRALL A, SABLITZKY F, LITTLEWOOD TD, RETH M. Inducible site-directed recombination in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 1996; **24**: 543–548; **10**: 1301–1315.
- [57] ZWIERZCHOWSKI L, JASZCZAK K, MODLIŃSKI JA. [red.] *Biotechnologia zwierząt*. PWN 1997: 27–44.
- [58] ŻERNICKA-GOETZ M, PINES J, McLEAN HUNTER S, DIXON JP, SIEMERING KR, HASELOFF J, EVANS MJ. Following cell fate in the living mouse embryo. *Development* 1997; **124**: 1133–1137.

*Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska*

*Otrzymano: 03.12.1999 r.*

*Przyjęto: 31.03. 2000 r.*

*Adres autora: 02-106 Warszawa, ul. Pawińskiego 5*



## UDZIAŁ KOMÓREK TUCZNYCH W ANGIOGENEZIE

### THE ROLE OF MAST CELLS IN ANGIOGENESIS

Marzena JUCZEWSKA\*, Elżbieta CHYCZEWSKA\*\*,  
Wojciech NAUMNIK\*\*, Wiesława NIKLIŃSKA\*\*\*

\*Białostocki Ośrodek Onkologiczny im. M. Skłodowskiej-Curie,  
Oddział Radioterapii II; \*\*Klinika Chorób Płuc i Gruzlicy,

\*\*\*Zakład Histologii i Embriologii Akademii Medycznej w Białymstoku

*Streszczenie:* Funkcja komórek tucznych w angiogenezie nie jest dokładnie poznana. Ich rola w procesach stymulacji, hamowania i regulacji angiogenezy wiąże się z wydzielanymi przez mastocyty mediatorami angiogenezy, takimi jak: heparyna, histamina, bFGF, VEGF, chymaza, tryptaza i hydrolazy. Oddziaływania enzymatyczne komórek tucznych na substancję międzykomórkową, głównie za pośrednictwem proteaz, powodujące przebudowę jej struktury, ułatwiają tworzenie przestrzennej sieci naczyń. W pracy przedyskutowano dane literaturowe przemawiające za bezpośrednim i pośrednim udziałem mastocytów w procesach neowaskularyzacji w guzie nowotworowym. Omówiono interakcje komórek znajdujących się w podścielisku guza, przede wszystkim śródbłonnów, mastocytów i fibroblastów oraz hipotetyczny udział mastocytów w metabolicznej regulacji angiogenezy. Przedstawiono metodykę badań komórek tucznych i angiogenezy.

(*Postępy Biologii Komórki* 2000; 27: 343–358)

*Słowa kluczowe:* komórka tuczna, angiogeneza, substancja międzykomórkowa.

*Summary:* The function of mast cells in angiogenesis is not completely known. Their role in the processes of the stimulation, inhibition and regulation of the angiogenesis is connected with mediators of angiogenesis produced by mast cells, e.g. heparin, histamin, bFGF, VEGF, chymase, tryptase and hydrolases. The enzymatical actions of mast cells on extracellular matrix, mostly by proteases, change its structure and facilitate creation of three-dimensional vascular system. In this paper the literature data was discussed, proving direct and indirect role of mastocytes in neovascularization processes in malignant tumor. The interactions of the cells of extracellular matrix, mostly endothelial cells, mastocytes and fibroblasts, and role of mastocytes in metabolic regulation of angiogenesis were described. The methods of studies on mast cells and angiogenesis were presented.

(*Advances in Cell Biology* 2000; 27: 343–358)

*Key words:* mast cell, angiogenesis, extracellular matrix.

Proces angiogenezy, czyli tworzenia nowych naczyń krwionośnych z istniejących naczyń gospodarza, dokonuje się w warunkach zarówno fizjologicznych, jak i patologicznych. W fizjologii mamy do czynienia z „waskulogenezą”, czyli tworzeniem kapilarów z angioblastów w procesie embriogenezy [57], a następnie z powstawaniem nowych naczyń w związku z owulacją, formowaniem ciała żółtego i ciąży u kobiet oraz w cyklicznych zjawiskach fizjologicznych, takich jak wzrost włosów.

W patologii w trakcie gojenia się ran oraz naprawy lokalnych uszkodzeń organizmu wywołanych urazem lub niedokrwieniem spotykamy proces „reendotelializacji”. Neowaskularyzację towarzyszącą stanom patologicznym obserwuje się w chirurgii (gojenie się ran), okulistyce (retinopatia cukrzycowa i inne choroby oczu), stomatologii (choroby dziąseł), dermatologii (łuszczyca, eczema, sclerodermia), w niektórych – a być może nawet we wszystkich – schorzeniach z autoimmunoagresji, a także podczas tworzenia się krążenia obocznego po zawale mięśnia sercowego [3, 44].

Umownie w procesie angiogenezy wyróżniamy sekwencję zjawisk, które w warunkach patologii nierzadko ulegają zakłóceniu. Podstawowe etapy angiogenezy to:

1. degradacja błony podstawnej naczynia gospodarza,
2. migracja komórek śródbłonka,
3. proliferacja komórek śródbłonka,
4. formowanie światła nowych naczyń,
5. rozwój przestrzennej sieci kapilarów,
6. tworzenie się nowej błony podstawnej,
7. rekrutacja pericytów [20, 63].

Burzliwy rozwój badań naukowych dotyczących uwarunkowań i regulacji neowaskularyzacji datuje się od lat siedemdziesiątych obecnego wieku, kiedy to Folkman sformułował tezę o zależności rozwoju guza nowotworowego od angiogenezy [19]. Rozpoczęcie procesu neowaskularyzacji wiąże się z uzyskaniem przez guz nowotworowy fenotypu angiogenicznego, co następuje, gdy guz liczy ok.  $10^6$  komórek. Angiogeneza zachodzi w warunkach dynamicznej równowagi pomiędzy stymulatorami a inhibitorami neowaskularyzacji, modulowanej przez mediatory biochemiczne obserwowanych reakcji [37, 38]. Najwcześniej poznane stymulatory i inhibitory angiogenezy przedstawiono w tabelach 1 i 2. Regulacja angiogenezy dokonuje się na poziomie metabolicznym i genetycznym [14].

W proces angiogenezy zaangażowane są komórki gospodarza i komórki guza, a w szczególności komórki śródbłonka, makrofagi i komórki tuczne.

Komórki tuczne (mastocyty) spotykamy w organizmie wszędzie tam, gdzie występuje tkanka łączna właściwa. Powstające w szpiku, prawdopodobnie z komórek pnia, prekursorzy mastocytów przechodzą do krwi, a następnie do tkanek, gdzie



TABELA 1. Endogenne czynniki stymulujące angiogenezę

Nazwa polska	Używany skrót	Nazwa angielska
kwaśny czynnik wzrostu fibroblastów <i>zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów</i>	aFGF <i>bFGF</i>	acidic fibroblast growth factor <i>basic fibroblast growth factor</i>
angiogenina <i>heparinaza</i>		angiogenin <i>heparinase</i>
czynnik wzrostu hepatocytów <i>interleukina-8</i>	HGF <i>IL-8</i>	hepatocyte growth factor <i>interleukin-8</i>
czynnik wzrostu łożyska	PGF	placenta growth factor
płytkowy czynnik wzrostu śródbłonna	PD-ECGF	platelet-derived endothelial cell growth factor
pleotropina		pleotropin
<i>prostaglandyna E<sub>1</sub></i>	<i>PGE<sub>1</sub></i>	<i>prostaglandin E<sub>1</sub></i>
<i>prostaglandyna E<sub>2</sub></i>	<i>PGE<sub>2</sub></i>	<i>prostaglandin E<sub>2</sub></i>
transformujący czynnik wzrostu $\alpha$	TGF $\alpha$	transforming growth factor $\alpha$
<i>transformujący czynnik wzrostu <math>\beta</math></i>	<i>TGF <math>\beta</math></i>	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
<i>czynnik martwicy nowotworu <math>\alpha</math></i>	<i>TNF<math>\alpha</math></i>	<i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
naczyniowy czynnik wzrostu śródbłonna / /czynnik przepuszczalności naczyń	<i>VEGF/ VPF</i>	<i>vascular endothelial growth factor/ vascular permeability factor</i>
proliferyna		proliferin
czynnik wzrostu kolonii granulocytów	G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor

\* grubą czcionką zaznaczono czynniki produkowane przez komórki tuczne

dojrzewają i różnicują się. Występują szczególnie w pobliżu takich struktur, jak naczynia i nerwy. Ich cechy fenotypowe zależą od otoczenia [43]. Za proces proliferacji, dojrzewania i migracji komórek tucznych odpowiada przede wszystkim cytokina zwana czynnikiem pobudzającym komórki pnia (*stem cell factor* – SCF) lub czynnikiem wzrostu komórek tucznych (*mast cell growth factor* – MCGF) oraz interleukina 3 (IL-3) [39]. Mastocyty są dużymi komórkami o kształcie okrągłym lub owalnym, zawierającymi w cytoplazmie zasadochłonne ziarna. Ich pofałdowana błona komórkowa zawiera receptory dla fragmentów Fc przeciwciał IgE (*reagin*), receptory dla IgG oraz składnika C3b dopełniacza. Wyróżniamy dwie subpopulacje komórek tucznych, przy czym mogą one przechodzić jedna w drugą zależnie od czynników wytwarzanych przez komórki środowiska:

1) komórki tuczne błon śluzowych (MMC – *mucosal mast cells*), zwane także komórkami T, ponieważ charakterystycznym enzymem proteolitycznym dla tych komórek jest tryptaza,

2) komórki tuczne tkanki łącznej (CTMC – *connective tissue mast cells*), zwane także komórkami TC, ponieważ obok tryptazy komórki te zawierają chymazę.

Rola mastocytów w organizmie wiąże się przede wszystkim ze zjawiskiem degranulacji pobudzonych mastocytów, w wyniku czego uwalniane są z ziaren me-

TABELA 2. Endogenne czynniki hamujące angiogenezę

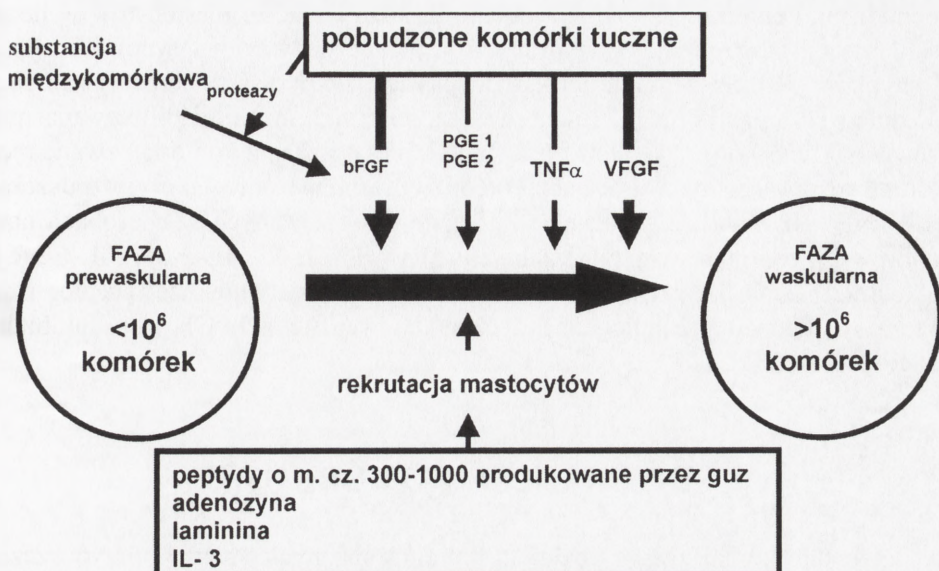
Nazwa polska	Używany skrót	Nazwa angielska
angiostatyna		angiostatin
chrząstkowy inhibitor	CDI	cartilage-derived inhibitor
<i>heparynaza</i>		<i>heparinase</i>
interferon $\alpha$	IFN $\alpha$	interferon $\alpha$
interferon $\beta$	IFN $\beta$	interferon $\beta$
<i>interferon <math>\gamma</math></i>	<b>IFN <math>\gamma</math></b>	<i>interferon <math>\gamma</math></i>
czynnik płytkowy 4	PF4	platelet factor 4
prolaktyna (fragment 16kD)		prolactin (16kD fragment)
protamina		protamine
trombospondyna-1	TSP-1	thrombospondin-1
tkankowe inhibitory metaloproteinaz	TIMP-1	tissue inhibitors of metalloproteinases
	TIMP-2	
	TIMP-3	

\* grubą czcionką zaznaczono czynniki produkowane przez komórki tuczne

diatory zachodzących w organizmie reakcji. Ponadto pod wpływem pobudzenia komórki tuczne zdolne są także do syntezy *de novo* i wydzielania do środowiska niektórych mediatorów. Aktywacja komórek tucznych zachodzi pod wpływem pobudzenia receptorów błonowych za pośrednictwem różnych mechanizmów – immunologicznych i nieimmunologicznych, w tym działania enzymów, hormonów i określonych substancji chemicznych [34]. Ciekawym spostrzeżeniem jest, że tryptaza, którą wydzielają komórki tuczne, sama ma również zdolność aktywacji mastocytów [30]. Po aktywacji w komórkach tucznych może nastąpić synteza chemokin i cytokin [43]. Mastocyty zaangażowane są w reakcje alergiczne, immunologiczne i zapalne. Niewątpliwie pełnią kluczową rolę w chorobach alergicznych [7, 52]. Badano ich udział w przebiegu wielu schorzeń, takich jak np. astma atopowa, sarkoidoza, łuszczyca, osteoporoza, choroba wrzodowa, miażdżyca, niedokrwienie mięśnia sercowego, stany chorobowe prowadzące do włóknienia płuc, odrzucanie przeszczepu, wstrząs [12, 15, 23].

Mało zbadana jest rola komórek tucznych w angiogenezie zachodzącej w nowotworach. Pierwsze opisy komórek tucznych obserwowanych u chorych obciążonych guzem dotyczą raczej cech ilościowych zjawiska gromadzenia się mastocytów w przypadku guza pierwotnego bez obecności przerzutów nowotworowych i w sytuacji guza przerzutuującego [59]. Mastocyty gromadzą się w miejscach inicjacji angiogenezy tuż przed rozpoczęciem procesu neowaskularyzacji [20]. Wzrost ich liczby stwierdzono w podścielisku raka żołądka, odbytnicy i innych nowotworów. Zjawisko to stanowi jeden z możliwych mechanizmów osiągnięcia przez guz fenotypu angiogenicznego, czyli przejścia z przewaskularnej w waskularną fazę wzrostu (rys. 1). W guzach litych mastocyty obserwowano głównie na obrzeżu guza oraz w otaczającej tkance łącznej. Ponieważ obszar akumulacji mastocytów pokrywa się





RYSUNEK 1. Hipotetyczny wpływ mastocytów na konwersję guza do fenotypu angiogenicznego

z regionem występowania „gorących pól” angiogenezy, problem wydaje się być skomplikowany. Wiadomo bowiem ponad wszelką wątpliwość, że intensywna angiogeneza sprzyja procesowi rozwoju guza nowotworowego i jego przerzutowania. Zbadanie korelacji liczby komórek tucznych ze stopniem intensywności angiogenezy w raku może stanowić kluczową informację dla zrozumienia procesów angiogenezy w nowotworach. Wiąże się z tym możliwość ingerencji w procesy angiogenezy za pośrednictwem wpływu na komórki tuczne [42]. Pamiętać jednak należy, że stwierdzenie obecności zwiększonej liczby komórek tucznych – według niektórych autorów – nie jest dowodem na ich udział w obserwowanych procesach patofizjologicznych [39].

W świetle dotychczasowych badań prowadzonych na zwierzętach – myszach i szczurach, obserwacji patomorfologicznych oraz wyników eksperymentów *in vitro* wydaje się, że udział mastocytów w angiogenezie wiąże się przede wszystkim z faktem, iż są one źródłem kilkudziesięciu substancji biologicznie czynnych. Wskutek degranulacji z ziaren uwalniane są mediatory pośredniczące w procesach regulacji przepływu krwi, przepuszczalności śródbłonnków i nabłonek, wydzielania błony śluzowej. W warunkach doświadczalnych sama degranulacja mastocytów indukowała neowaskularyzację [42, 55]. Z punktu widzenia procesów angiogenezy istotną rolę pełnią zwłaszcza mediatory preformowane pochodzące z ziaren mastocytów (np. heparyna i histamina), mediatory wytwarzane wtórnie z fosfolipidów błonowych po aktywacji komórki tucznej oraz cytokiny syntetyzowane i wydzielane przez

pobudzoną komórkę [7, 49]. Kluczową rolę dla obecności mastocytów w neowaskularyzacji mogą pełnić także proteiny, przede wszystkim serynowe – tryptazy i chymazy [30]. Szczególnie intrygująca wydaje się być sfera oddziaływań za pośrednictwem cytokin [24]. Funkcja większości z nich może być blokowana przez zewnątrzkomórkowe fragmenty receptorów, niezwiązane z komórką, zwane receptorami rozpuszczalnymi. Podczas proteolizy uwalniane są receptory rozpuszczalne dla  $TNF\alpha$ , IL-1 i IL-2. Znaczenie kliniczne obserwowanych w chorobach nowotworowych receptorów rozpuszczalnych (SR) –  $TNF\alpha$ -SR, IL-2-SR i IL-6-SR jest aktualnie badane [56]. Do chwili obecnej wykazano jedynie, że receptor rozpuszczalny znanego proangiogenego czynnika wzrostu – bFGF jest inhibitorem angiogenezy [33].

## INTERAKCJE KOMÓRKOWE

Interakcje komórkowe z udziałem komórek tucznych obrazują przypuszczalny bezpośredni udział mastocytów w angiogenezie. Guz nowotworowy jest infiltrowany przez różne komórki, w tym komórki tuczne. Infiltrację guza przez mastocyty obserwuje się czasem nawet w fazie przedinwazyjnej [13]. Oddziaływania te mają charakter komórkowy lub zachodzą z udziałem substancji biologicznie czynnych. Badane są wzajemne relacje mastocytów z fibroblastami i komórkami śródbłonna. Tryptaza, której źródłem są także mastocyty, jest mitogenem dla fibroblastów oraz nasila proliferacyjne działanie na fibroblasty innych czynników wzrostu, np. FGF [38]. Z kolei fibroblasty wspomagają angiogenezę przez wydzielanie proangiogenych czynników wzrostu.

Mastocyty są źródłem czynników stymulujących lub hamujących angiogenezę lub też stymulują produkcję mediatorów wpływających na czynniki regulujące zjawiska neowaskularyzacji. Okazało się, że w nowotworze mastocyty – obok makrofagów, eozynofili i limfocytów – nie występują jedynie w roli komórek zapalnych [13, 42]. Prostaglandyny, postrzegane jako mediatory prozapalne, okazały się być również związkami stymulującymi angiogenezę. Ich synteza *de novo* jako metabolitów kwasu arachidonowego zachodzi w pobudzonej komórce z udziałem cyklooksygenazy [9, 17]. Akumulacja komórek tucznych pochodzących z tkanki łącznej w miejscu, gdzie rozpocznie się angiogeneza, zachodzi zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych [28, 42]. Wykazano, że chociaż obecność mastocytów nie jest konieczna do zaistnienia procesu angiogenezy, tym niemniej angiogeneza zachodząca z udziałem mastocytów jest bardziej nasiloną i trwa dłużej niż neowaskularyzacja stymulowana przez czynniki wzrostu związane z heparyną (bFGF, VEGF<sub>165</sub>), ale nie pochodzące z komórek tucznych [42, 46, 55]. Migracja komórek tucznych poprzedzająca angiogenezę wywołana jest przez chemotaktyczne



działanie czynników o dużym potencjale angiogenicznym, takich jak: płytkowy czynnik wzrostu-AB (PDGF-AB), naczyniowy czynnik wzrostu śródbłonka (VEGF), zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF), adenozyzna będąca metabolitem niedotlenionych tkanek i laminina. Stwierdzono także, że sam guz nowotworowy produkuje czynniki chemotaktyczne dla mastocytów. Są to peptydy o masie cząsteczkowej 300–1000 [42]. Badano również stymulację chemotaksji mastocytów przez interleukinę 3, przy czym należy zaznaczyć, że komórki tuczne również mogą wydzielać IL-3 [41]. Nie wiadomo, czy mamy tu do czynienia z oddziaływaniami autokrynnymi. Należy zwrócić uwagę, że przedmiotem tych oddziaływań są także komórki śródbłonka, których rola w angiogenezie jest pierwszoplanowa. Wspomnieć należy, że również komórki śródbłonka wydzielają czynniki stymulujące angiogenezę: bFGF, PDF, IGF-1, IL-1, IL-6, GM-CSF [20].

Udział mastocytów w poszczególnych etapach angiogenezy jest zagadnieniem aktualnie badanym i w wielu wypadkach wpływ na angiogenezę mastocytów i ich mediatorów można określić jedynie jako hipotetyczny.

Początkiem neowaskularyzacji jest przerwanie ciągłości naczynia, spowodowane działaniem enzymów proteolitycznych, uwolnionych przez komórki guza i komórki prawidłowe, takie jak: fibroblasty, makrofagi i monocyty. Uszkodzenie komórek nasila proteolizę przez zwiększony wyrzut proteaz [3]. Mastocyty produkują hydrolazy degradujące błonę podstawną i komponenty tkanki łącznej [42]. Zidentyfikowane dotychczas główne składniki „kaskady proteolitycznej” to:

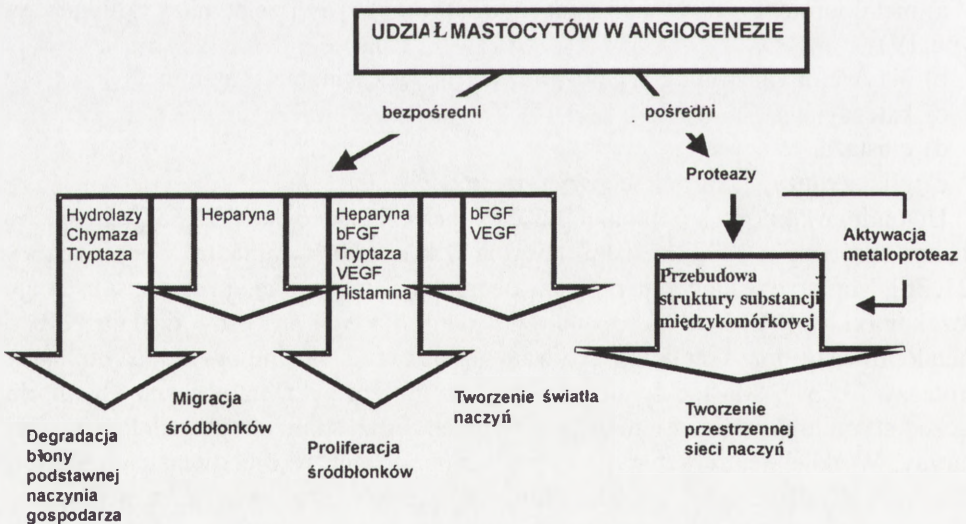
- a) metaloproteazy, takie jak: kolagenazy, stromelizyny i żelatynazy (kolagenazy typu IV),
- b) aktywator plazminogenu prowadzący do uczynienia plazminy,
- c) katepsyna B,
- d) elastaza,
- e) glikozydazy, takie jak heparynaza [62].

Uwolnione komórki śródbłonka (EC), których cykl życiowy w czasie angiogenezy zostaje skrócony z 1000 do 5 dni, migrują w kierunku stymulatorów angiogenezy [21, 36]. Migrację tę ułatwiają proteazy degradujące w tym samym czasie substancję pozakomórkową (EM). Kluczowymi enzymami dla tych procesów wydają się być metaloproteazy oraz tkankowy aktywator urokinazy i plazminogenu uczynniający proteazy [3, 31]. Mastocyty uczynniają latentne formy metaloproteaz. Komórki tuczne stymulują migrację śródbłonek przede wszystkim za pośrednictwem heparyny. Wydaje się, że heparyna w angiogenezie pełni rolę ułatwiającą bądź stabilizującą działanie innych mediatorów angiogenezy, natomiast bezpośrednio nie wywiera wpływu stymulującego ani hamującego neowaskularyzację [42]. Z drugiej strony wiadomo, że heparyna w obecności kortykosterydów działa hamująco na angiogenezę, przede wszystkim przez hamowanie produkcji i wydzielania proteaz, w tym kolagenaz, oraz hamowanie produkcji fibronektyny przez śródbłoneki [4, 42, 50]. Poruszanie się komórek śródbłonka ułatwia też kolagen typu VIII, który

jest produkowany przez mastocyty, ale także przez śródbłonki, keratynocyty i komórki niektórych guzów [58].

Mastocyty wpływają też na proliferację komórek śródbłonka; udowodniono, że tryptaza pochodząca z komórek tłuszczowych jest mitogenem dla komórek śródbłonka [11] (rys. 2). Heparyna pochodząca z komórek tłuszczowych wzmacnia również mitogeny efekt aFGF, a histamina wzmacnia proliferację komórek śródbłonka. Antagoniści receptora  $H_1$  blokują promitogenne działania histaminy na endothelium [42]. Wykazano także, że VEGF – będący również mediatorem pochodzącym z mastocytów – wywiera efekt mitogeny na komórki śródbłonka. Ponieważ właściwe komórkom śródbłonka jest występowanie nie w formie pojedynczych komórek, ale w formie zorganizowanej z wytworzeniem błony wewnętrznej naczynia, w punkcie rozpoczęcia migracji obserwuje się „wspomagającą” proliferację endothelium służącą zabezpieczeniu ciągłości naczynia macierzystego [3].

Wspomnieć należy, że oprócz wpływu na angiogenezę mastocyty mogą oddziaływać z guzem nowotworowym przez reakcje cytotoksyczne i wpływ na apoptozę. Prawdopodobnie w tych reakcjach uczestniczy  $TNF\alpha$ , którego efekt cytotoksyczny potencjalizuje tlenek azotu. W trakcie badań *in vitro* stwierdzono, że interleukina 4 produkowana przez mastocyty hamuje wzrost komórek raka sutka i indukuje apoptozę [26].



RYSUNEK 2. Udział komórki tłuszczowej w angiogenezie



## **MASTOCYTY A SUBSTANCJA MIĘDZYKOMÓRKOWA**

Oddziaływania mastocytów z substancją międzykomórkową mają przede wszystkim charakter enzymatyczny. Reakcje te wpływają pośrednio na proces neowaskularyzacji. Tryptaza i chymotryptaza – serynowe proteazy o aktywności trypsynowej i chymotrypsynopodobnej, występujące w komórkach tucznych obok karboksypeptydaz i katepsyny G, po aktywacji mastocytów zostają wydzielone do podścieliska [38]. Tam biorą bezpośredni udział w degradacji substancji międzykomórkowej: tryptaza degraduje glikoproteiny, a chymaza – składniki błon podstawnych i struktur otaczających: kolagen typu IV i V, lamininę, fibronektynę i elastynę. Jednocześnie enzymy te po dostaniu się do podścieliska aktywują latentne formy metaloproteaz macierzy międzykomórkowej [30, 42]. Procesy powyższe, w wyniku których następuje rozluźnienie struktury substancji międzykomórkowej, ułatwiają penetrację komórek śródbłonna, co przyspiesza neowaskularyzację w jej pierwszych etapach. Jednocześnie zmieniona w wyniku reakcji enzymatycznych, rozluźniona struktura podścieliska stanowi czynnik sprzyjający tworzeniu się przestrzennej sieci naczyń. Warto wspomnieć, że tryptaza równocześnie wpływa także na aktywację komórek tucznych [30].

## **KOMÓRKI TUCZNE W PROCESACH REGULACJI ANGIOGENEZY**

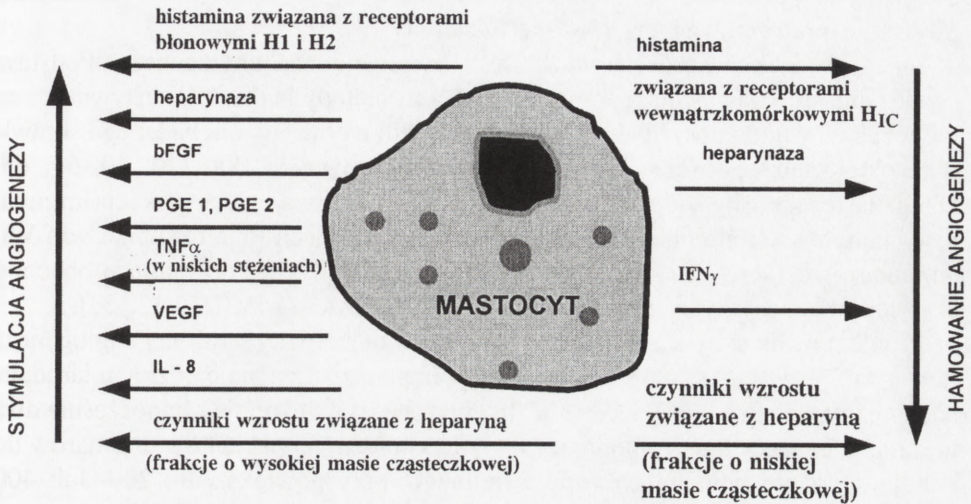
Regulacja metaboliczna angiogenezy dokonuje się w sposób podobny jak w tkankach nienowotworowych, gdzie pierwszą przyczyną zachodzących zjawisk są potrzeby metaboliczne tkanki. Wzrost obciążenia metabolitami powoduje hipoksję tkanek. Ma to miejsce w przypadku wzrastającej masy tkanki, również masy guza nowotworowego. Przyczyną hipoksji może być też niedostateczny przepływ krwi spowodowany procesami zamykającymi naczynia, czego przykładem może być retinopatia proliferatywna, niedokrwienna choroba serca lub urazowe uszkodzenie tkanek. Czynnikiem przepuszczalności naczyń (VEGF) jako mediator parakryny stymuluje w tej sytuacji angiogenezę metaboliczną [14]. Jak wykazały badania prowadzone zwłaszcza w ciągu ostatnich 3 lat, VEGF jest głównym regulatorem angiogenezy i waskulogenezy [45]. Dalsza regulacja neowaskularyzacji odbywa się w sposób bezpośredni – przez stymulatory i inhibitory oraz pośrednio – przez blokowanie funkcji stymulatorów i inhibitorów. Zachowanie swoistej „homeostazy” angiogenicznej możliwe jest także dzięki działalności mediatorów, a więc związków lub struktur wywierających wpływ na wcześniej wymienione czynniki [37, 38, 54].

Wykazano, że udział mastocytów w procesach angiogenezy nie jest jednoznaczny. Komórki tuczne wydzielają czynniki stymulujące angiogenezę, takie jak histamina wiążąca się z receptorami  $H_1$  i  $H_2$  błony komórkowej, heparynaza,  $TNF\alpha$  w niskich stężeniach,  $IL-8$ ,  $PGE_1$ ,  $PGE_2$  oraz wysokocząsteczkowe frakcje czynników wzrostu związanych z heparyną. Mastocyty są jednocześnie źródłem czynników hamujących angiogenezę, takich jak: histamina wiążąca się z receptorem  $H_{1C}$  – *intracellular receptor*, heparynaza, interferon  $\gamma$  i niskocząsteczkowe frakcje czynników wzrostu związanych z heparyną. Reakcje te modulują obecność innych wydzielanych przez mastocyty mediatorów, cytokin, enzymów i czynników chemotaktycznych oraz udział mechanizmów parakrynnych wpływających na procesy metaboliczne i mitogenne [46] (rys. 3).

W ziarnach mastocytów drogą badań immunohistochemicznych wykazano obecność dwóch głównych czynników proangiogennych: bFGF i VEGF [29, 51]. VEGF wpływa głównie na wzrost przepuszczalności naczyń i proliferację śródbłonek [6]. Specyficzna jest rola bFGF – ważnego stymulatora neowaskularyzacji – w relacji do udziału komórki tucznej w procesach angiogenezy. Stwierdzono, że mastocyty są głównym źródłem bFGF w przewlekłych stanach zapalnych i w naczyniakach skóry [52]. Obecność FGF wykazano także w tkankach nowotworowych chrząstniakomięsa, wątrobiaka, czerniaka i raka sutka [25]. Z drugiej strony heparyna pochodząca z degranulacji mastocytów mobilizuje bFGF z macierzy pozakomórkowej. W macierzy pozakomórkowej bFGF jest związany z proteoglikanem siarczanu heparyny; jego przekształcenie w formę biologicznie aktywną następuje wskutek działania heparyny, heparynaz i kolagenaz oraz proteaz uczynnianych przez aktywator plazminogenu. Wszystkie te czynniki produkowane są bezpośrednio przez komórki wcześniej rekrutowane (np. mastocyty i makrofagi) lub przez komórki nowotworowe. Jednocześnie kompleks bFGF-heparyna, powstający ze względu na duże powinowactwo obu związków, spełnia dla podścieliska funkcję stabilizującą i ochronną przed działaniem proteaz. Ponadto heparyna i siarczan heparyny wpływają na łączenie bFGF z jego receptorem, co w konsekwencji indukuje komórkową odpowiedź na obecność bFGF. Funkcję heparyny blokuje heparynaza oraz protamina [1, 4, 5, 16, 20, 22, 34, 42] (rys. 3). W badaniach prowadzonych na mastocytach mysich wykazano, że ekspresja bFGF-2 może być selektywnie regulowana przez *stem cell factor* – SCF,  $TNF\alpha$  i  $TGF\beta$  [51].

Zagadnienie, w jaki sposób inne cytokiny pochodzące z komórek tucznych wpływają na angiogenezę, pozostaje w sferze badań. Kachektyna  $TNF\alpha$  – pierwsza cytokina, której bioaktywność wykazano w normalnych komórkach tucznych, była początkowo postrzegana jako cytokina wyłącznie prozapalna [17]. Obecnie wykazano, że pobudza ona mastocyty do sekrecji histaminy i tryptazy, a jej obecność w niskich stężeniach stymuluje angiogenezę [7, 46]. W badaniach *in vitro* wykazano też obecność w mastocytach  $IL-4$ ,  $IL-5$ ,  $IL-6$ ,  $IL-8$ , z których  $IL-8$  jest od dawna znaną cytokiną proangiogenną. Stwierdzono także, że komórki tuczne wytwarzają





RYSUNEK 3. Rola mastocytów w regulacji angiogenezy

mRNA dla IL-3, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, GM-CSF oraz SCF [7]. Ponieważ regulacja wytwarzania i hamowanie produkcji cytokin może odbywać się na poziomie transkrypcji DNA, translacji RNA i stabilizacji mRNA, a także wydzielania zsyntetyzowanej cytokiny, problem udziału tych procesów w regulacji angiogenezy na poziomie genetycznym czeka na opracowanie [7, 56].

## METODYKA BADAŃ KOMÓREK TUCZNYCH I ANGIOGENEZY

Metodyka badań morfologicznych komórek tucznych wiązała się przez wiele lat ze zjawiskiem metachromazji ziaren mastocytów podczas barwienia barwnikami tiazynowymi, takimi jak tionina i błękit toluidyny. W latach osiemdziesiątych opisano możliwość barwienia heparyny w komórkach tucznych metodą fluorescencyjną z użyciem siarczanu berberyny [16]. Znaczny postęp w zakresie wiedzy dotyczącej biologii komórek tucznych był możliwy dzięki użyciu w badaniach technik mikroskopii elektronowej. Obecnie bada się komórki tuczne przede wszystkim przy użyciu metod immunohistochemicznych [17].

W badaniach *in vitro* badano aktywację mastocytów określając stopień ich pobudzenia na podstawie pomiaru ilości uwolnionych do środowiska mediatorów, zwłaszcza preformowanych, głównie histaminy [9].

Innego rodzaju metodyka wiąże się z badaniami nad angiogenezą. Podstawą oznaczania stopnia nasilenia angiogenezy są metody badania intensywności angiogenezy mierzonej liczbą naczyń na jednostkę powierzchni badanego skrawka oraz określenie gęstości angiogenezy według umownych skal [20, 40, 64, 65]. Działania te muszą być poprzedzone wybarwieniem EC wraz z identyfikacją immunohistochemiczną śródbłonna, najczęściej związaną z obecnością czynnika von Willebranda – markera EC [60]. Opisano również metody wykorzystujące obecność cząsteczek adhezyjnych, na przykład CD31 (PECAM-1) i CD34 [2, 33].

Problem techniczny stanowi wybór obszaru o najbardziej nasilonej angiogenezie (tzw. *hot spot*). Autorzy japońscy proponują uznać za najbardziej miarodajne badanie obrzeża guza [66]. Oceny liczby mikronaczyń dokonują równocześnie dwaj niezależni badacze, nie dysponujący danymi klinicznymi pacjentów. Pomiarów dokonuje się z użyciem mikroskopu świetlnego, przy powiększeniu 200- lub 400-krotnym [65, 66]. Istnieje możliwość użycia przystawki komputerowej, umożliwiającej zautomatyzowanie metod morfometrycznych badań angiogenezy [20, 27, 35, 65].

Inną sferą badań nad angiogenezą są metody jakościowego i ilościowego oznaczania *in vivo* markerów angiogenezy [10, 18, 53]. Wartość markera posiadają m.in. czynniki wzrostowe o działaniu angiogennym. Ich poziom określa się w płynach ustrojowych, a źródłem ich są m.in. mastocyty:

- bFGF – w moczu, szczególnie u chorych z inwazyjnym procesem nowotworowym [47, 48]
- VEGF – w wysiękach płucnych [53].

W badaniach surowicy chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC) stwierdzono obecność bFGF i VEGF. Wyższy poziom bFGF w surowicy tych chorych stanowił dobry czynnik prognostyczny [8]. Wynik ten jest niezgodny z wynikami podobnych badań prowadzonych dla innych nowotworów. Nie wykazano jak dotąd żadnej wartości prognostycznej poziomu czynnika VEGF w surowicy chorych na NSCLC [8]. Wiadomo również, że poziom tych czynników może rosnąć wskutek sekrecji przez aktywowane mastocyty [6, 51, 61]. Dalszych badań wymaga zagadnienie, czy i w jaki sposób pobudzenie komórki tucznej wpływa na angiogenezę guza w NSCLC.

Obecne badania nad udziałem komórki tucznej w angiogenezie wiążą się przede wszystkim z obecnością w mastocytach dwóch proteaz serynowych – tryptazy i chymazy. Oznaczanie poziomu tryptazy stanowić może wykładnik aktywacji mastocytów [11]. Metody immunohistochemiczne umożliwiają dalsze badania nad biologią komórki tucznej, a także ocenę ilościową obecności mastocytów w miejscach nasilonej angiogenezy [42]. Jedną z nowszych metod są badania immunotopoche-



miczne przy użyciu mikroskopu elektronowego. Umożliwiły one m.in. wykrycie w ciałkach tłuszczowych mastocytów cyklooksygenazy prostaglandyn, dzięki czemu wyjaśniono proces wytwarzania prostaglandyn przez mastocyty [17]. Znalazienie zależności ilościowych i jakościowych między akumulującymi się mastocytami a procesami angiogenezy stanowi współczesne wyzwanie badawcze.

## LITERATURA

- [1] AGIS H, FÜREDER W, BANKL HC, KUNDI M, SPERR WR, WILLHEIM M, BOLTZ-NITULESCU G, BUTTERFIELD JH, KISHI K, LECHNER K, VALENT P. Comparative immunophenotypic analysis of human mast cells, blood basophils and monocytes. *Immunology* 1996; **87**: 535–543.
- [2] ALBELDA SM, MULLER WA, BUCK CA, WEWMAN PT. Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD 31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 1991; **14**: 1059–1068.
- [3] AUERBACH W, AUERBACH R. Angiogenesis inhibition: a review. *Pharmac Ther* 1994; **63**: 265–311.
- [4] AZIZKHAN RG, AZIZKHAN JC, ZETTER BR, FOLKMAN J. Mast cell heparin stimulates migration of capillary endothelial cells *in vitro*. *J Exp Med* 1980; **152**: 931–944.
- [5] BISSONNETTE E Y, HOGABOAM CM, WALLACE JL, BEFUS AD. Potentiation of tumor necrosis factor- $\alpha$  mediated cytotoxicity of mast cells by their production of nitric oxide. *J Immunol* 1991; **147**: 3060–3065.
- [6] BOESIGER J, TSAI M, MAURER M, YAMAGUCHI M, BROWN LF, CLAFFEY KP, DVORAK HF, GALLI SJ. Mast cells can secrete vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor and exhibit enhanced release after immunoglobulin E-dependent upregulation of Fc epsilon receptor I expression. *J Exp Med* 1998; **188**: 1135–1145.
- [7] BRADDING P. Human mast cell cytokines. *Clin Exp Allergy* 1996; **26**: 13–19.
- [8] BRATTSTRÖM D, BERQVIST M, LARSSON A, HOLMERTZ J, HESSELIUS P, ROSENBERG L, BRODIN O, WAGENIUS G. Basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in sera from non-small cell lung cancer patients. *Anticancer Res* 1998; **18,2A**: 1123–1127.
- [9] BRZEZIŃSKA-BŁASZCZYK E. Mastocyty człowieka i ich rola w organizmie. *Ann Acad Med Lodz* 1993; **34**: 7–16.
- [10] BUSAM KJ, BERWICK M, BLESSING K, FANDREY K, KANG S, KARAOLI T, FINE J, COCHRAN AJ, WHITE WJ, RIVERS J, ELDER DE, PO WEN DR, HEYMAN BH, RAYMOND LB. Tumor vascularity is not a prognostic factor for malignant melanoma of the skin. *Am J Path* 1995; **147**: 1049–1056.
- [11] CAIRNS JA, WALLS AF. Mast cell tryptase is a mitogen for epithelial cells. *J Immunol* 1996; **156**: 275–283.
- [12] CHYCZEWSKI L, DĘBEK W, CHYCZEWSKA E, DĘBEK K, BAŃKOWSKI E. Morphology of lung mast cells in rats treated with Bleomycin. *Exp Toxic Pathol* 1995; **48**: 515–517.
- [13] COUSSENS LM, RAYMOND WW, BERGERS G, LAIG-WEBSTER M, BEHRENDTSEN O, WERB Z, CAUGHEY GH, HANAHAN D. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev* 1999; **13**: 1382–1397.
- [14] D'AMORE PA, SHIMA DT. Tumor angiogenesis: A physiological process or genetically determined? *Cancer Metast Rev* 1996; **15**: 205–212.

- [15] DĘBEK W, CHYCZEWSKI L, OLDHAFFER KJ. BN52021 inhibits activation of peritoneal mast cells caused by hemorrhage and blood volume restoration. *Pol J Pathol* 1999; **50**: 259–267.
- [16] DIMLICH RVW, MEINEKE HA, REILLY FD, MCCUSKEY RS. The fluorescent staining of heparin in mast cells using berberine sulfate: compatibility with paraformaldehyde or o-phthalaldehyde induced fluorescence and metachromasia. *Stain Technol* 1980; **55**: 217–223.
- [17] DVORAK AM. New aspects of mast cell biology. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; **114**: 1–9.
- [18] FIDLER IJ, ELLIS LM. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* 1994; **79**: 185–188.
- [19] FOLKMAN J. Tumor angiogenesis: a possible control point in tumor growth. *Ann Int Med* 1975; **82**: 96–100.
- [20] FOLKMAN J. Tumor angiogenesis. [w] Holland JF, Frei EF III, Bast RC, Kufe D W, Morton DL, Weichselbaum RR [red.] *Cancer Medicine*, 3 rd edn. Philadelphia: Lea & Febiger 1993: 153–170.
- [21] FOLKMAN J. The influence of angiogenesis research on management of patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1995; **36**: 109–118.
- [22] FRIEND DS, GHILDYAL N, AUSTEN KF, GURISH MF, MATSUMOTO R, STEVENS RL. Mast cells that reside at different locations in the jejunum of mice infected with *Trichinella spiralis* exhibit sequential changes in their granule ultrastructure and chymase phenotype. *J Cell Biol* 1996; **135**: 279–290.
- [23] GALLI SJ. New concepts about the mast cells. *N Engl J Med* 1993; **328**: 257–265.
- [24] GALLI SJ, GORDON JR, WERSIL BK. Cytokine production by mast cells and basophils. *Curr Opin Immunol* 1991; **3**: 865–872.
- [25] GIL M, ROSZKOWSKI K. Angiogeneza w procesie nowotworowym. *Pneumonologia i Alergologia Polska* 1993; **61**: 5–10.
- [26] GOOCH IL, LEE AV, YEE D. Interleukin 4 inhibite growth and induce apoptosis in human beast cancer cells. *Cancer Res* 1998; **58**: 4199–4205.
- [27] GOULDING H, NIK ABDUL RASHID NF, ROBERTSON JF, BELL JA, ELSTON CW, BLAMEY RW, ELLIS IO. Assessment of angiogenesis in breast carcinoma: an important factor in prognosis? *Hum Pathol* 1995; **26**: 1196–1200.
- [28] GRUBER BL, MARCHESE MJ, KEW R. Angiogenic factors stimulate mast-cell migration. *Blood* 1995; **86**: 2488–2493.
- [29] GRUTZKAU A, KRUGER-KRASAGES S, BAUMEISTER H, SCHWARZ C, KOGEL H, WELKER P, LIPPERT U, HENZ BM, MOLLER A. Synthesis, storage and release of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) by human mast cells: implications for the biological significance of VEGF<sub>206</sub>. *Mol Biol Cell* 1998; **9**: 875–884.
- [30] HE S, WALLS AF. Human mast cell tryptase: a stimulus of microvascular leakage and mast cell activation. *Eur J Pharmacol* 1997; **328**: 89–97.
- [31] HILDENBRAND R, DILGER I, HORLIN A, STUTTE HJ. Urokinase plasminogen activator induces angiogenesis and tumor vessel invasion in breast cancer. *Path Res Pract* 1995; **191**: 403–409.
- [32] HORAK ER, LEEK R, KLENK N, LE JEUNE S, SMITH K, STURART N. Angiogenesis assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 1992; **340**: 1120–1124.
- [33] JAIN RK, KOENIG GC, DELLIAN M, FUKUMURA D, MUNN LL, MELDER RJ. Leukocyte-endothelial adhesion and angiogenesis in tumors. *Cancer Metast Rev* 1996; **15**: 195–204.
- [34] JAKUBICZ D, MAŚLIŃSKI S. Komórka tuczna w stawie. Część I. Morfologia, fizjologia i lokalizacja komórki tucznej w tkankach. *Reumatologia* 1996; **34**: 31–38.
- [35] JUCZEWSKA M, CHYCZEWSKI L, TELEGO M, CHYCZEWSKA E, NIKLIŃSKI J, TAŃSKA M, LAUDAŃSKI J. Studies on angiogenesis intensity in lung cancer in aspect of its



- correlation with histological type of tumor and clinical stage. *Rocz Akad Med Białyst* 1997; **42 suppl 1**: 254–270.
- [36] KALEBIC T, GARBISA S, GLASER B, LIOTTA L. Basement membrane collagen degradation by migrating endothelial cells. *Science* 1983; **221**: 281.
- [37] KLAGSBURN M, D'AMORE P. Regulators of angiogenesis. *Ann Rev Physiol* 1991; **53**: 217–239.
- [38] KLAGSBURN M. Regulators of angiogenesis: stimulators, inhibitors and extracellular matrix. *J Cell Biochem* 1991; **47**: 199–200.
- [39] KUPRYŚ I, KUNA P. Komórki tuczne i cytokiny – nowe spojrzenie na udział mastocytów w reakcji zapalnej. *Post Hig Med Dośw* 1996; **50**: 43–63.
- [40] MACCHIARINI P, FONTANINI G, HARDIN MJ, SQUARTINI F, ANGELETTI CA. Relation of neovascularization to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet* 1992; **340**: 145–146.
- [41] MATSUURA N, ZETTER BR. Stimulation of mast cell chemotaxis by interleukin 3. *J Exp Med* 1989; **170**: 1421–1426.
- [42] MEININGER CJ, ZETTER BR. Mast cell and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 1992; **3**: 73–79.
- [43] METCALFE DD, BARAM D, MEKORI YA. Mast cells. *Physiol Rev* 1997; **77**: 1033–1079.
- [44] NAGASHIMA M, YOSHINO S, ISHIWATA T, ASANO G. Role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1995; **22**: 1624–1630.
- [45] NEUFELD G, COHEN T, GEGRINOVITCH S, POLTORAK Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; **13**: 9–22.
- [46] NORRBY K. Mast cells and angiogenesis. [w] International Symposium „Mast Cells and Cellular Interactions” Berlin, September 15–16, 1995. *J Invest Dermatol* 1995; **105**: 715.
- [47] NGUYEN M, WATANABE H, BUDSON AE. Elevated levels of an angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in the urine of patients with a wide spectrum of cancers. *J Natl Cancer Inst* 1994; **86**: 356.
- [48] NGUYEN M, WATANABE H, BUDSON AE, RICHIE JP, FOLKMAN J. Elevated levels of an angiogenic peptide basic fibroblast growth factor in urine of bladder cancer patients. *J Natl Cancer Inst*. 1993; **85**: 241–242.
- [49] OLEJNIK AK, BRZEZIŃSKA-BŁASZCZYK E. Proteiny mastocytów. *Post Hig Med Dośw* 1998; **52**: 381–399.
- [50] PAŁGAN K, DREWA G. Aktualne poglądy na angiogenezę nowotworową. *Post Hig Med Dośw* 1993; **47**: 193–207.
- [51] QU Z, KAYTON RJ, AHMADI P, LIEBLER JM, POWERS MR, PLANCK SR, ROSENBAUM JT. Ultrastructural immunolocalization of basic fibroblast growth factor in mast cell secretory granules. Morphological evidence for bFGF release through degranulation. *J Histochem Cytochem* 1998; **46**: 1119–1128.
- [52] QU Z, LIEBLER JM, POWERS MR, GALEY T, AHMADI P, HUANG X-N, ANSEL JC, BUTTERFIELD JH, PLANCK SR, ROSENBAUM JT. Mast cells are a major source of basic fibroblast growth factor in chronic inflammation and cutaneous hemangioma. *Am J Pathol* 1995; **147**: 564–573.
- [53] RADZIKOWSKI CZ. Przerzuty nowotworowe – problem biologiczny, dylemat prognostyczny i terapeutyczny. *Nowotwory* 1995; **45**: 184–201.
- [54] RISAU W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; **386**: 671–674.
- [54] RIZZO V, DEFOUW DO. Mast cell activation accelerates the normal rate of angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. *Microvascular Res* 1996; **52**: 245–257.
- [55] ROBAK T. Cytokiny i ich rola we współczesnej onkologii. [w] Madej G [red.] Chemioterapia onkologiczna dorosłych i dzieci. Warszawa, PZWL 1999: 49–67.
- [56] SCHWEIGERER L. Antiangiogenesis as a novel therapeutic concept in pediatric oncology. *J Mol Med* 1995; **73**: 497–508.

- [57] SHUTTLEWORTH CA. Type VIII collagen. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; **29**: 1145–1148.
- [58] SIMU G, CSABA G. Mast cells in tumor-bearing patients. *Acta Morphol Hung* 1972; **20**: 327–338.
- [59] STEPHENSON TJ, GRIFFITHS DWR, MILLS PM. Comparison of Ulex europaeus I lectin binding and factor VIII-related antigen as markers of vascular endothelium in follicular carcinoma of the thyroid. *Histopathology* 1986; **10**: 251–260.
- [60] TAKANAMI I, TANAKA F, HASHIZUME T, KODAIRA S. Tumor angiogenesis in pulmonary adenocarcinomas: Relationship with basic fibroblast growth factor, its receptor and survival. *Neoplasma* 1997; **44**: 295–298.
- [61] TEICHER BA. A system approach to cancer therapy. *Cancer Metast Rev* 1996; **15**: 247–272.
- [62] VERNON RB, SAGE E. Between molecules and morphology. Extracellular matrix and creation of vascular form. *Am J Pathol* 1995; **147**: 873–883.
- [63] WEIDNER N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat* 1995; **36**: 169–180.
- [64] WEIDNER N, SEMPLE JP, WELCH WR, FOLKMAN J. Tumor angiogenesis and metastasis - correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; **324**: 1–8.
- [65] YAMAZAKI K, ABE S, TAKEKAWA H, SUKOH N, WATANABE N, OGURA S, NAKAJIMA I, ISOBE H, INOUE K, KAWAKAMI Y. Tumor angiogenesis in human lung adenocarcinoma. *Cancer* 1994; **74**: 2245–2250.
- [66] YUAN A, YANG PCH, YU CH-J, LEE Y-CH, YAO Y-T, CHEN CH-L, LEE L-N, KUO S-H, LUH K-T. Tumor angiogenesis correlates with histologic type and metastasis in non-small-cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; **152**: 2157–2162.

*Redaktor prowadzący – Maciej Zabel*

*Otrzymano: 24.02.2000 r.*

*Przyjęto: 17.04.2000 r.*

*Adres autorki: ul. Stołeczna 17/2 m. 1, 15-879 Białystok*



## DISOMIA JEDNORODZICIELSKA (UPD) U CZŁOWIEKA MECHANIZM POWSTAWANIA I SKUTKI KLINICZNE

### UNIPARENTAL DISOMY (UPD) IN MAN THE ORIGIN AND CLINICAL CONSEQUENCES

Ewa BOCIAN

Zakład Genetyki Medycznej Instytut Matki i Dziecka

**Streszczenie:** Określenie disomii jednorodzielskiej (UPD) oznacza obecność w diploidalnych komórkach organizmu pary chromosomów homologicznych, które pochodzą tylko od jednego zamiast od obojga rodziców. Jest ona zazwyczaj wynikiem naprawy stanu aneuploidalnego powstającego wskutek nieprawidłowej segregacji chromosomów w mejozie lub rzadziej w czasie podziałów mitotycznych komórek somatycznych. Została dotychczas udokumentowana dla większości chromosomów z niemal trzykrotnie większą częstością disomii matczynej niż ojcowskiej. To zróżnicowanie częstości UPD znajduje uzasadnienie w tym, że aneuploidia powstaje częściej podczas gametogenezy żeńskiej. Odkrycie i ponad dwudziestoletni już okres badań tego zjawiska zaowocowały wyjaśnieniem niezrozumiałych wcześniej mechanizmów powstawania i ekspresji klinicznej wielu chorób genetycznych. Obecnie wiemy, że u podłoża patomechanizmu wielu z nich leży związana z disomią jednorodzielską utrata heterozygotyczności skutkująca ujawnieniem się recesywnych chorób monogenowych i zaburzeniem ekspresji genów podlegających piętnowaniu rodzicielskiemu oraz mozaikowość chromosomowa. W pracy omówiono mechanizmy powstawania UPD, przedstawiono obecny stan wiedzy na temat częstości i ryzyka oraz skutków klinicznych tego zjawiska.

(*Postępy Biologii Komórki* 2000; 27: 359–376)

**Słowa kluczowe:** disomia jednorodzielska, aneuploidia, czynniki ryzyka, skutki kliniczne.

**Summary:** Uniparental disomy (UPD) is the presence in a diploid individual of a chromosome pair that derives from only one parent. In general the mechanism of formation of UPD is based on the correction of aneuploidy derived from meiotic or mitotic errors. UPD almost all chromosomes have been documented but preponderance of maternal versus paternal disomy (3:1) have been observed. This difference can be explained with the frequency of aneuploidy in the female gametogenesis. After over 20 years of studies since the concept of UPD was introduced unusual and unexplained observations on the clinical expression some of genetic disorders are now clear. The phenotype in such disorders is determined by genomic imprinting disturbances and nonmendelian inheritance of monogenic recessive traits due to the loss of heterozygosity in UPD cases. Undetected mosaicism may also reflect an abnormal phenotype. The

mechanisms of UPD formation, present knowledge on the frequency, risk factors and clinical consequences of uniparental disomy are presented.

(*Advances in Cell Biology* 2000; 27: 359–376)

*Key words:* uniparental disomy, aneuploidy, risk factors, clinical consequences.

## WPROWADZENIE

W ostatnim 10-leciu opisano wiele zjawisk genetycznych, których nie można wyjaśnić zasadami klasycznej genetyki mendelowskiej. Przejawiają się one najczęściej, inną niż wynikałoby to z reguł genetyki klasycznej, ekspresją genów. Skutkuje ona zazwyczaj nietypową ekspresją kliniczną choroby albo też niezgodnym z regułami Mendla tokiem dziedziczenia choroby. Wśród zjawisk tych wymienić można: mozaikowość komórkową, zjawisko antycypacji polegające na coraz cięższym przebiegu choroby w kolejnych pokoleniach (związane z tzw. mutacjami dynamicznymi), piętno genomowe, czyli zróżnicowaną ekspresję genów w zależności od ich rodzicielskiego pochodzenia i wreszcie disomię jednorodzielską, która jest przedmiotem tego opracowania.

Disomia jednorodzielska (UPD od ang. *uniparental disomy*) oznacza, że oba chromosomy homologiczne danej pary pochodzą tylko od jednego zamiast od obojga rodziców. Może występować w formie heterodisomii, czyli obecności obu chromosomów homologicznych danej pary lub izodisomii (ID), gdy w komórce występują dwie identyczne kopie jednego z chromosomów homologicznych pochodzące od jednego z rodziców. Koncepcja występowania tego zjawiska zaproponowana została w 1980 roku przez Engela [24]. Jej podstawę stanowiły obserwacje dotyczące częstego występowania aneuploidii niektórych chromosomów (trisomii 16, 15, 21 i 22 oraz monosomii X) w poronieniach samoistnych. Z tego faktu Engel wysnuł wniosek, że częstość powstawania nieprawidłowych, disomicznych i nullisomicznych dla tych chromosomów gamet musi być jeszcze większa. Zwrócił uwagę na możliwość naprawy pierwotnego stanu aneuploidalnego w zygotach powstałych z połączenia tych gamet. Skutkiem takiej naprawy może być właśnie disomia jednorodzielska.

Pierwszy przypadek, dokumentujący nie tylko zjawisko UPD (matczynej izodisomii chromosomu 7), ale także jej skutki kliniczne, został opisany u dziewczynki z mukowiscydozą i niedoborem wzrostu w 1988 roku przez Spence'a i wsp. [70]. W rok później opisano drugi przypadek matczynej UPD 7 oraz matczyną disomię chromosomu 15 u dziecka z klasycznym fenotypem zespołu Pradera-Williego [50, 77]. Odkrycia te uświadomiły fakt, że disomia jednorodzielska nie jest zjawiskiem wyjątkowym i może grać istotną rolę w patologii u człowieka. Od tej pory opisano disomię jednorodzielską większości chromosomów, a w wielu przypadkach kli-



nicznych wyjaśniono także mechanizmy odpowiedzialne za stwierdzaną patologię. Wiele jednak zagadnień dotyczących UPD pozostaje jeszcze do wyjaśnienia, o czym świadczy przegląd piśmiennictwa w publikacjach Engela [28] i Kotzota [41]. W pracy przedstawiono podstawowe informacje dotyczące mechanizmów powstawania, częstości i czynników ryzyka oraz skutków klinicznych disomii jednorodzielskiej u człowieka.

## MECHANIZMY POWSTAWANIA DISOMII JEDNORODZICIELSKIEJ

Zaproponowane przez Engela i opisane mechanizmy powstawania disomii jednorodzielskiej polegają na naprawie stanu aneuploidalnego, który powstał w wyniku błędów mejotycznych, w czasie gametogenezy lub błędów mitotycznych po zapłodnieniu [3, 24, 25, 26, 70]. Bezpośrednich dowodów występowania disomii jednorodzielskiej dostarczają badania z wykorzystaniem metod biologii molekularnej. W badaniach tych analiza polimorficznych markerów DNA określonej pary chromosomów w rodzinie umożliwia stwierdzenie rodzicielskiego pochodzenia tych chromosomów u badanego dziecka. W pierwszym udowodnionym przypadku UPD wykazano w ten właśnie sposób, że dziecko z mukowiscydozą i niedoborem wzrostu jest homozygotą w odniesieniu do 19 identycznych z matczynymi markerów DNA chromosomu 7 dokumentując w ten sposób izodisomię matczyną chromosomu 7 [70]. Większość pośrednich dowodów występowania UPD dostarczyły natomiast badania cytogenetyczne [25]. Jednym z nich jest klasyczny już przypadek rodziny, w której matka nosicielka translokacji Robertsonowskiej  $t(22q22q)$  po licznych poronieniach urodziła zdrowe dziecko z identyczną translokacją. Wynikiem normalnego dziedziczenia powinna być trisomia lub monosomia chromosomu 22, które są letalne.

Mechanizmy powstawania disomii jednorodzielskiej związane z nieprawidłową segregacją chromosomów w mejozie określane są jako: komplementacja gamet, naprawa stanu trisomicznego i duplikacja mitotyczna (rys. 1, tab. 1). Większość z nich została potwierdzona i udokumentowana.

### Komplementacja gamet

Mechanizm ten prowadzi do powstania zygoty z prawidłową, euploidalną liczbą chromosomów w wyniku połączenia się dwóch nieprawidłowych (disomicznej i nullisomicznej w odniesieniu do tego samego chromosomu) gamet. Określony jako tzw. komplementacja gamet stanowił podstawę zaproponowanej po raz pierwszy przez Engela [24] koncepcji disomii jednorodzielskiej. W powstałej w wyniku nieprawidłowego I podziału mejotycznego komórce disomicznej zależnie od tego, czy miał miejsce *crossing-over* oraz zależnie od rodzaju segregacji chromatyd tej

TABELA 1. Mechanizmy powstawania disomii jednorodzielskiej

Nazwa określająca mechanizm	Mechanizm	Efekt końcowy w komórkach somatycznych
Komplementacja gamet	Połączenie dwóch nieprawidłowych, disomicznej i nullisomicznej w odniesieniu do tego samego chromosomu, gamet	Heterodisomia/izodisomia we wszystkich komórkach
Naprawa stanu trisomicznego	Połączenie prawidłowej gamety monosomicznej z nieprawidłową, disomiczną a następnie utrata z trisomicznej zygoty jednej kopii chromosomu	Heterodisomia/izodisomia Możliwość mozaikowości – UPD/trisomia
Duplikacja mitotyczna (od monosomii do izodisomii)	Połączenie prawidłowej gamety monosomicznej z nieprawidłową nullisomiczną, a następnie duplikacja chromosomu w czasie podziału mitotycznego zygoty	Izodisomia Możliwość mozaikowości – ID/monosomia
Błędy mitotyczne	Nondysjunkcja mitotyczna, a następnie duplikacja chromosomu w komórce z monosomią lub utrata chromosomu z komórki z trisomią. Rekombinacja mitotyczna	Izodisomia, heterodisomia mozaikowość Częściowa izodisomia

UPD – disomia jednorodzielska, ID – izodisomia

pary chromosomów w drugim podziale, powstaje gameta z całkowitą heterodisomią lub z izodisomią częściową. Skutkiem błędu w II podziale mejotycznym jest zawsze przynajmniej częściowa izodisomia.

Komplementacja gamet zdarza się rzadko. Jak dotychczas, opisano zaledwie cztery przekonujące przypadki UPD powstałej w ten sposób. Trzy z nich, opisane ostatnio, dotyczą ojcowskiej UPD 14 i 15 oraz matczynej UPD 22 [15, 17, 53]. Skąpa dokumentacja tego mechanizmu powstawania disomii jednorodzielskiej może wynikać z trudności odróżnienia komplementacji gamet od naprawy stanu trisomicznego. Mechanizmy te można rozróżnić jedynie w przypadku stwierdzenia obecności trisomii w mozaice z komórkami euploidalnymi.

### Naprawa stanu trisomicznego

Obecnie przyjmuje się, że naprawa stanu trisomicznego, czyli postzygotyczna utrata dodatkowej kopii chromosomu jest najczęstszym mechanizmem powstawania disomii jednorodzielskiej. Jeśli, jak się przypuszcza, euploidyzacja jest losowa, to ryzyko powstania w ten sposób UPD wynosi w przybliżeniu 30%. To teoretyczne ryzyko disomii jednorodzielskiej zostało dotychczas udowodnione dla chromosomów 16 i 22 [39, 85].

Najliczniejsze przykłady udokumentowanego mechanizmu naprawy stanu trisomicznego pochodzą z badań prenatalnych. Dotyczą one niektórych spośród opisanych dotychczas przypadków matczynej disomii chromosomów 7, 9, 10, 15 i 16 [7, 38, 39, 42, 46, 58, 65, 83]. W badaniach tych stwierdzano mozaikową





trisomię, obecną zazwyczaj tylko w łożysku, natomiast euploidalne komórki płodu lub dziecka po urodzeniu wykazywały UPD tych chromosomów. W podobnych badaniach Robinson i wsp. [63] wykazali obecność matczynej UPD w 17/94 stwierdzone przypadki tkankowo-specyficznej mozaikowości. Opisano także przypadki uogólnionej mozaikowości, w których komórki euploidalne wykazywały disomię jednorodzielską [12, 18, 60]. Przedstawiony w pracy Los i wsp. [46] model naprawy stanu trisomicznego uwzględniający przebieg embriogenezy wyjaśnia, jak powstają różne postaci, stwierdzanej w badaniach prenatalnych, mozaikowości.

Fakt, że około 23% wszystkich (z wyjątkiem UPD 15) przypadków disomii jednorodzielskiej stanowi UPD chromosomu 16 wskazuje pośrednio, że mechanizm naprawy trisomii ma istotne znaczenie w powstawaniu disomii jednorodzielskiej. Trisomia chromosomu 16 należy do najczęściej stwierdzanych aberracji w porównaniach samoistnych [41]. Niemal wszystkie rozpoznane dotychczas przypadki UPD 16 łączą się z obecnością mozaikowej postaci trisomii tego chromosomu w łożysku [79]. Również znaczna przewaga matczynej UPD nad ojcowską (w przybliżeniu 3:1) w kontekście tego, że w przeważającej części przypadków trisomia pochodzi z matczyńskich błędów mejotycznych, wskazuje na istotne znaczenie omawianego mechanizmu powstawania disomii jednorodzielskiej.

### Duplikacja mitotyczna

Duplikacja chromosomu w monosomicznej zygocie powstałej z połączenia prawidłowej z nieprawidłową, nullisomiczną gametą prowadzi do powstania całkowitej izodisomii tego chromosomu. Wprawdzie trudno jest udowodnić bezpośrednio ten mechanizm powstawania UPD, wydaje się jednak, że oba przypadki matczynej izodisomii chromosomu 7 stwierdzone u dzieci z mukowiscydozą i niedoborem wzrostu oraz opisana ostatnio ojcowska izodisomia tego chromosomu mogły powstać w ten właśnie sposób [52, 70, 77]. Przyjmuje się także, że mitotyczna duplikacja chromosomu 15 odpowiedzialna jest za ojcowską disomię tego chromosomu stwierdzaną w ok. 2% przypadków zespołu Angelmana [49, 84]. Niemal we wszystkich przypadkach tej UPD wykazano izodisomię całego chromosomu 15. Najprostszym wyjaśnieniem mechanizmu powstania całkowitej izodisomii jest nondysjunkcja chromatyd w czasie jednego z pierwszych podziałów mitotycznych monosomicznej zygoty. W niektórych przypadkach (opisanych dla chromosomów 1, 2, 7, 14 i 15) jest ona skutkiem utworzenia w takiej zygocie izochromosomu [5, 11, 21, 66, 71, 78].

### Błędy mitotyczne

Disomia jednorodzielska powstała w wyniku błędów mitotycznych występuje zazwyczaj w mozaice z komórkami prawidłowymi, w których wszystkie chromosomy homologiczne mają oburodzielskie pochodzenie. Najlepiej poznanym i udoku-



mentowanym przykładem tego mechanizmu powstawania UPD jest ojcowska, częściowa izodisomia regionu krótkiego ramienia chromosomu 11 stwierdzana w ok. 17–28% przypadków zespołu Beckwitha-Wiedemanna [10, 20, 68]. Występowanie częściowej, niemal punktowej izodisomii 11p15.5 w formie mozaikowej sugeruje mitotyczny *crossing-over* jako czynnik sprawczy tej disomii. Tylko w jednym przypadku wykazano, że obejmuje ona cały chromosom 11, mogłaby więc powstać jako rezultat mitotycznej nondysjunkcji, a następnie duplikacji tego chromosomu [20].

## CZĘSTOŚĆ WYSTĘPOWANIA I ROZKŁAD CHROMOSOMOWY UPD

Ponad 10 lat temu Warburton [80] określiła fenomen UPD jako rzadko występujący skutek wysokiej częstości aneuploidii w gametach człowieka. Prawdopodobieństwo powstania UPD w wyniku komplementacji gamet określiła na 1/30,000 zarodków. Rozważania nad częstością izodisomii zakończyła autorka stwierdzeniem, iż nie wydaje się prawdopodobne, aby to zjawisko stało się kiedykolwiek czymś więcej niż tylko interesującą osobliwością. Trzy lata później Engel uznał za uzasadnione stwierdzenie, że diploidalna liczba chromosomów może być rezultatem losowego połączenia się dwóch aneuploidalnych gamet w 1 na 3000 zarodków. Szacunki oparte na założeniu, że ok. 50% ciąży ulega poronieniu z powodu aberracji chromosomowych, z których połowę stanowią trisomie i odpowiadające im monosomie (najczęściej 16, 21, 15, 22 i X) uwzględniające także częstość aberracji stwierdzanych w gametach, wykazały, że UPD wymienionych chromosomów może występować w 1,65/1000 zarodków [25].

W najnowszych rozważaniach nad populacyjną częstością disomii jednorodzielskiej Engel [28] podaje szacunki, których podstawę stanowi częstość przypadków określonego zespołu klinicznego uwarunkowanych disomią jednorodzielską oraz częstość występowania tego zespołu w populacji. Dla przykładu, jeśli częstość zespołu Pradera-Williego i Angelmana wynosi dla każdego z nich 1/20,000, a odsetek przypadków UPD w tych zespołach odpowiednio, 25 i 2%, to częstość matczynej UPD chromosomu 15 wynosi w przybliżeniu 1/80,000, a ojcowskiej  $\sim 1/10^6$  żywych urodzeń [62]. Z podobnych kalkulacji wynika, że populacyjna częstość ojcowskiej UPD 11p związanej z etiologią zespołu Beckwitha-Wiedemanna jest 1/75,000, a ojcowska UPD 6 odpowiedzialna za 40% przypadków przejściowej nietolerancji glukozy u noworodków występuje z częstością 1/1,250,000 urodzeń.

Z przeglądu informacji dotyczących rodzicielskiego pochodzenia i częstości występowania UPD poszczególnych chromosomów wynika, że matczyzna disomia stwierdzana jest niemal trzykrotnie częściej niż disomia ojcowska oraz, że jej rozkład

chromosomowy nie jest równy [41]. Dominację UPD matczynej tłumaczy fakt, że aneuploidia chromosomowa powstaje w przeważającej części przypadków z błędów mejotycznych gametogenezy żeńskiej. Aż 67% przypadków matczynej UPD (poza UPD 15) to heterodisomia. Najczęściej dotyczy ona chromosomów 7, 14 i 16 (68/108 opisanych przypadków). Nie opisano jeszcze matczynej UPD chromosomów 5, 11, 12 oraz 19. Disomii ojcowskiej nie wykazano natomiast w chromosomach 2, 3, 4, 9, 12, jak również 17–19. Nie stwierdzono zatem w ogóle disomii jednorodzielskiej chromosomów 12, 18 i 19 [14, 28, 31, 41]. Szczególnie zadziwiający jest fakt braku UPD chromosomu 18, którego trisomia należy do najczęstszych aneuploidii u człowieka. Można w związku z tym przypuszczać, że jego disomia jednorodzielska jest letalna. Częstość i rozkład chromosomowy UPD w poronieniach samoistnych nie są jednak jeszcze poznane. W pierwszych badaniach dotyczących tego problemu nie wykryto żadnego przypadku UPD wśród 53 analizowanych poronień [67, 69].

Przyczyn obserwowanego zróżnicowania częstości UPD poszczególnych chromosomów, jak się wydaje, można upatrywać między innymi w jej różnorodnych skutkach klinicznych. Dzięki nim disomia jest zazwyczaj rozpoznawana. Większość udokumentowanych przypadków UPD pochodzi z badań, w których stwierdzono pre- lub postnatalnie mozaikowość, strukturalne aberracje chromosomowe lub z analizy sprzężeń i mutacji w rodzinach z rozpoznawaną chorobą genetyczną. Jeżeli UPD pozostaje bez wpływu na cechy fenotypowe lub jej skutki są letalne, wykrycie tej nieprawidłowości jest sprawą przypadku. Zgodnie z tym rozumowaniem można więc przypuszczać, że brak skutków klinicznych UPD 21mat jest właśnie przyczyną tak rzadkiego jej rozpoznawania, mimo że trisomia 21 należy do najczęstszych trisomii stwierdzanych w poronieniach samoistnych i u żywo urodzonych [67].

## CZYNNIKI RYZYKA DISOMII JEDNORODZIELSKIEJ

Poznanie czynników ryzyka disomii jednorodzielskiej ma istotne znaczenie dla określenia wskazań do wykonywania badań diagnostycznych tej nieprawidłowości. Na podstawie udokumentowanych już przypadków UPD można stwierdzić, że sama aneuploidia, jak i czynniki do niej predysponujące są równocześnie czynnikami ryzyka UPD. Wśród nich wymienić należy przede wszystkim zaawansowany wiek ciężarnej (ze względu na zwiększone ryzyko nondysjunkcji chromosomów). Czynnikiem ryzyka UPD, jak się przypuszcza, są także aberracje chromosomowe, które mogą zaburzać segregację chromosomów w czasie podziału komórkowego [25, 27, 43]. Spektakularnym przykładem tego, że zaawansowany wiek sprzyja powstawaniu UPD, jest fakt, że matczyzna disomia 15 jest częstszą niż delecja 15q11q13 przyczyną zespołu Pradera-Williego u dzieci starszych matek [9]. Robinson



i wsp. [62] wykazali ostatnio, że ryzyko UPD 15mat, podobnie jak ryzyko trisomii 21, stanowi wykładniczą funkcję wieku.

Poza niemałą już liczbą opisanych przypadków UPD dokumentujących jej związek przyczynowy z obecnością aneuploidii, zwłaszcza trisomii oraz niektórych aberracji strukturalnych chromosomów [17, 19, 53, 61, 74] informacje o czynnikach ryzyka UPD pochodzą z trzech grup badań. Dwie z nich dotyczą analizy częstości UPD w rodzinach nosicieli translokacji wzajemnych i robertsonowskich oraz chromosomów markerowych [35, 36]. Wyniki uzyskane w tych badaniach nie są jednoznaczne. Wśród 65 rodzin, w których występowały translokacje chromosomowe, disomię jednorodzielską wykryto tylko w jednym przypadku. Z drugiej strony jednak znaczna część przedstawianych w piśmiennictwie przypadków UPD została rozpoznana właśnie u dzieci nosicieli translokacji robertsonowskich [4, 71, 74].

W badaniach przeprowadzonych w 22 rodzinach nosicieli chromosomów markerowych pochodzących z różnych chromosomów oraz u 10 nosicieli mar(15) otrzymano wyniki podobne do tych, które uzyskane zostały u nosicieli translokacji [16, 36]. Zidentyfikowano tylko jeden przypadek UPD, w którym ojcowska izodisomia chromosomu 6 współistniała z chromosomem markerowym pochodzącym z tego chromosomu. Analiza czynników ryzyka UPD 15 wykazała również, że zarówno chromosomy mar(15), jak i translokacje robertsonowskie chromosomu 15 tylko nieznacznie zwiększają to ryzyko [62].

Trzecia grupa badań dotyczy oceny częstości występowania UPD różnych chromosomów w przypadkach rozpoznanej prenatalnie mozaikowej trisomii występującej tylko w łożysku lub zarówno w łożysku, jak i u płodu. Analiza 192 takich przypadków wykazała, że w przeciwieństwie do innych chromosomów trisomia chromosomu 15 i 16 stwierdzana w łożysku nigdy nie występuje u płodu. Wynika to prawdopodobnie z działania mechanizmu naprawczego. Wydaje się więc, że ryzyko wystąpienia disomii jednorodzielskiej u płodu dotyczy głównie tych chromosomów [33]. Przypuszczenie to znajduje potwierdzenie w wynikach wielu badań [12, 29, 39, 48, 63]. Wprawdzie mozaikowa trisomia występująca tylko w łożysku była stwierdzana także w odniesieniu do wielu innych chromosomów (najczęściej do chromosomu 2, 3, 7, 10 i 12), jednak zazwyczaj mitotyczne pochodzenie tych trisomii decyduje o małym ryzyku powstania disomii jednorodzielskiej [33, 63, 85].

Istnienie związku między mejotycznym pochodzeniem trisomii a ryzykiem wystąpienia UPD zostało wykazane w pracy Robinsona i wsp. [63] i potwierdzone pośrednio także w innych badaniach [76]. Autorzy stwierdzili disomię jednorodzielską w 17 spośród 94 analizowanych przypadków mozaikowości występującej tylko w łożysku. We wszystkich przypadkach trisomia pochodziła z błędów mejotycznych. Wykazano również, że ryzyko powstania UPD dotyczy przede wszystkim tych przypadków mozaikowości, w których odsetek trisomicznych komórek jest wysoki.

## SKUTKI KLINICZNE UPD

Disomia jednorodzielska może być przyczyną patologii, u podłoża której leżą: utrata heterozygotyczności skutkująca ujawnieniem się chorób monogenowych o recesywnym toku dziedziczenia, rodzicielskie piętno genomowe i inna niż w sytuacji oburodzicielskiego dziedziczenia ekspresja napiętnowanych genów oraz mozaikowość chromosomowa. Każdy z tych czynników osobno lub w kombinacji z pozostałymi może decydować o ekspresji klinicznej choroby.

### Recesywne choroby monogenowe

Disomia jednorodzielska (izodisomia), w wyniku której mutacje genów recesywnych uzyskują stan homozygotyczności, może być przyczyną ujawnienia się chorób wywoływanych przez te mutacje. W takich przypadkach izodisomia skutkuje ekspresją kliniczną choroby monogenowej o recesywnym toku dziedziczenia nawet wtedy, gdy tylko jedno z rodziców jest nosicielem zmutowanego genu. Taki mechanizm ujawniania się chorób recesywnych udokumentowany został co najmniej dla 18 chorób [28]. Kilka z nich to: wymieniana już wcześniej mukowiscydoza (UPD 7mat) [70, 77], rdzeniowy zanik mięśni typu III (UPD 5pat) [6], zespół Blooma (UPD 15mat) [87], całkowita ślepotą na barwy (UPD 14mat) [54] czy pyknodysostosa (UPD 1pat) [30]. Opisany też został przypadek dystrofii mięśniowej Duchenne'a, której nietypowa dla choroby recesywnej sprzężonej z chromosomem X ekspresja była skutkiem disomii matczynej tego chromosomu [59]. W innym przypadku izodisomia Xq była przyczyną ujawnienia się u pacjenta z zespołem Klinefeltera (47,XXY), sprzężonego z chromosomem X zespołu niewrażliwości na androgeny [75].

### Piętno genomowe

Określenie rodzicielskie piętno genomowe odnosi się do zjawiska epigenetycznego, stanowiącego mechanizm modyfikacji ekspresji genów [2]. Polega ono na zróżnicowanej ekspresji genów zależnej od ich pochodzenia rodzicielskiego. Geny napiętnowane są nieaktywne, co funkcjonalnie równoznaczne jest z hemizygotycznością w loci tych genów. W tym kontekście zrozumiałym jest mechanizm odpowiedzialny za ekspresję kliniczną choroby w sytuacji, gdy UPD dotyczy chromosomów, których geny mają rodzicielskie piętno genomowe. Disomia jednorodzielska jest w tych przypadkach przyczyną innej niż w sytuacji dziedziczenia oburodzicielskiego, nieprawidłowej ekspresji genów.

Klasycznym już przykładem skutków klinicznych UPD wynikających z obecności piętna genomowego są zespoły Pradera-Williego (PWS) i Angelmana (AS) występujące u osób z matczyną i ojcowską disomią chromosomu 15. W obu zespołach,



które cechuje charakterystyczny i całkowicie odmienny obraz kliniczny, defekt molekularny dotyczy tego samego regionu q11q13 chromosomu 15. Polega on zazwyczaj na jego delecji w chromosomie ojcowskim (PWS) lub matczynym (AS). Matczyne piętno genomowe sprawia, że matczyzna disomia chromosomu 15 równoznaczna jest funkcjonalnie z ojcowską delecją krytycznego regionu chromosomu odpowiedzialną za PWS. I odwrotnie, wynikiem napiętnowania genów ojcowskich i disomii ojcowskiej (odpowiadającej funkcjonalnie delecji matczynej) chromosomu 15 jest zespół Angelmana [51]. Matczyzna heterodisomia chromosomu 15 odpowiedzialna jest za ok. 25% przypadków PWS, izodisomia ojcowska zaś za niespełna 5% przypadków AS [8, 49, 72, 84].

Obecnie stosunkowo dobrze poznanych jest pięć zespołów klinicznych, u podłoża których leży nieprawidłowa ekspresja genów związana z disomią jednorodzicielską chromosomów 6, 7, 11 i 15 zawierających napiętnowane geny (tab. 2). Obserwacje kliniczne wskazują również, że geny chromosomu 14 podlegają piętnowaniu rodzicielskiemu, co skutkuje zróżnicowanym zespołem cech klinicznych stwierdzanych w przypadkach matczynej i ojcowskiej disomii tego chromosomu [32]. Słabiej poznane i nie w pełni jeszcze udokumentowane są skutki kliniczne UPD 2mat i 16mat, które jak się przypuszcza, łączą się także z piętnem rodzicielskim genów w tych chromosomach [1, 5, 34, 65, 66, 79].

Utrata heterozygotyczności i nieprawidłowa ekspresja napiętnowanych genów (protoonkogenów oraz genów supresorowych nowotworów) spowodowane disomią jednorodzicielską mogą być także przyczyną transformacji nowotworowej [57]. Dobrym przykładem jest tu zespół Beckwitha–Wiedemanna, w którym około 20% chorych wykazuje ojcowską izodisomię chromosomu 11p15 [10, 23, 44]. Zwiększona w wyniku disomii ekspresja odpowiedzialnego za chorobę genu IGF2 (promotora wzrostu) i/lub brak ekspresji genu inhibitora wzrostu H19 oraz p57<sup>KIP2</sup> z chromosomu matczynego predysponuje do rozwoju procesu nowotworowego – guza Wilmsa. Zarówno główne cechy kliniczne zespołu Beckwitha–Wiedemanna – przerost języka, nadmierny rozwój fizyczny z asymetrią w budowie ciała oraz wady powłok brzusznych, jak i zwiększone ryzyko nowotworów embrionalnych są wynikiem nadekspresji genu promotora wzrostu [10, 44, 45].

### Mozaikowość

Istotną rolę w patologii stwierdzanej w przypadkach disomii jednorodzicielskiej należy przypisać mozaikowości chromosomowej, która może towarzyszyć disomii. Wydaje się, że nie są to wcale rzadkie przypadki, jeśli wziąć pod uwagę fakt, że disomia jednorodzicielska powstaje najczęściej w wyniku postzygotycznej utraty dodatkowej kopii chromosomu z komórek trisomicznych. Mozaikowość może być wykluczona tylko w tych przypadkach UPD, które powstały w wyniku komplementacji gamet. Możliwość istnienia nierozpoznanej tkankowo-specyficznej i/lub

TABELA 2. Skutki kliniczne UPD warunkowane piętnem genomowym

Zespół/Cechy kliniczne	UPD	Piśmiennictwo
Pradera i Williego (PWS)	15mat	[8, 51, 64]
Angelmana (AS)	15pat	[64, 72, 84]
Beckwitha i Wiedemanna	11pat	[10, 23, 44, 68]
Silvera i Russela	7mat	[22, 40, 56]
Prześciowa nietolerancja glukozy	6pat	[13, 73, 82]
Niedobór wzrostu, przedwczesne dojrzewanie	14mat	[4, 47, 78]
Dysplazja szkieletowa, zwężenie aorty, karłowatość	14pat	[15]

niewielkiego stopnia mozaikowości, towarzyszącej disomii jednorodzielskiej jest też jedną z przyczyn problemów z jednoznacznym wykazaniem związku przyczynowo-skutkowego między UPD a stwierdzanymi u pacjenta objawami klinicznymi. Odnosi się to szczególnie do tych przypadków UPD, w których stwierdzone jest opóźnienie rozwoju wewnątrzmacicznego, niska masa urodzeniowa, czasami również inne nieprawidłowości, a w badaniu prenatalnym wykazano obecność, ograniczonej do łożyska, mozaikowej trisomii chromosomowej. Dotyczy ona zazwyczaj trisomii chromosomu 16, ale także i innych chromosomów [14, 39, 48, 63, 86].

Jak dotychczas wszystkie opisane przypadki UPD 16mat związane były z obecnością mozaikowej trisomii tego chromosomu w łożysku i niemal we wszystkich stwierdzano opóźnienie rozwoju wewnątrzmacicznego płodu [39, 48, 65, 79, 81, 86]. W większości z nich rozwój dzieci po urodzeniu był prawidłowy. Przyjmuje się w związku z tym, że za opóźnienie rozwoju wewnątrzmacicznego odpowiedzialna jest raczej trisomia 16 występująca w łożysku niż disomia jednorodzielska tego chromosomu. Jednak w tych przypadkach UPD 16mat, w których stwierdzone są także inne nieprawidłowości fenotypowe, sugerowany jest efekt rodzicielskiego piętna genomowego [1, 48, 63, 65, 79, 86].

## PROBLEMY INTERPRETACJI KLINICZNEJ UPD

Jednoznaczna interpretacja kliniczna UPD uwzględniająca zarówno związek przyczynowo-skutkowy pomiędzy stwierdzanym fenotypem a obecnością disomii, jak też określenie typowych dla różnych chromosomów skutków klinicznych jest w wielu przypadkach bardzo trudna, czasami nie jest możliwa. W dużym stopniu wiąże się to z problemem identyfikacji oraz oceny skutków fenotypowych tkankowo-specyficznej mozaikowości chromosomowej [37]. Otwarte pozostaje więc pytanie: ile i jakie tkanki powinny być badane w celu wykluczenia mozaikowości, aby możliwe było stwierdzenie, że obserwowane cechy kliniczne pacjenta powstały w wyniku disomii jednorodzielskiej. Analiza patomechanizmu UPD w określonych



przypadkach klinicznych powinna uwzględniać również i to, że stwierdzenie w badaniu molekularnym kilku markerów polimorficznych heterodisomii nie wyklucza homozygotyczności recesywnych mutacji genowych w innych niż badane loci i odwrotnie. Dlatego też najnowsze badania zmierzające do wyjaśnienia przyczyny patologii w określonych przypadkach UPD koncentrują się na analizie molekularnej jak największej liczby loci chromosomowych [1, 47, 55].

Na zakończenie wspomnieć również trzeba, że disomia jednorodzielska określonego chromosomu i związana z nią utrata heterozygotyczności może skutkować niezwykle trudnym do interpretacji, obrazem klinicznym pacjenta wynikającym z ujawnienia się dwóch różnych chorób. Mogą to być dwie recesywne choroby monogenowe, których loci genowe objęte zostały izodisomią [52] lub zespół kliniczny związany z zaburzeniem ekspresji piętna genomowego w połączeniu z chorobą o recesywnym toku dziedziczenia [54, 70, 77, 87].

## PODSUMOWANIE

Odkrycie disomii jednorodzielskiej oraz wyniki badań nad mechanizmami i ryzykiem jej powstawania wraz z oceną jej skutków klinicznych wyjaśniły już wiele znaków zapytania dotyczących patomechanizmu niektórych chorób genetycznych. Udowodniono także, że wbrew założeniom genetyki mendlowskiej nie ma pełnej ekwiwalentności pomiędzy chromosomami pochodzącymi od matki i od ojca. Jednak wiele zagadnień dotyczących UPD, a szczególnie częstość jej występowania w normalnej populacji, czynniki ryzyka jej powstawania oraz ryzyko i rodzaj patologii w przypadkach disomii określonych chromosomów pozostają jeszcze do ustalenia.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ABU-AMERO SN, ALI Z, ABU-AMERO KK, STANIER P, MOORE GE. An analysis of common isodisomic region in five mUPD 16 probands. *J Med Genet* 1999; **36**: 204–207.
- [2] BARTOLOMEI MS, TILGHMAN SM. Genomic imprinting in mammals. *Ann Rev Genet* 1997; **31**: 493–525.
- [3] BARTSCH O, HUBNER H, MORDALSKA A. Powstawanie i znaczenie uniparentalnej disomii. *Post Biol Kom* 1992; **19**: 311–322.
- [4] BERENDS MJW, HALLEY DJJ, SORGEDRAGER N. Two cases of maternal uniparental disomy 14 with a phenotype overlapping with the Prader-Willi phenotype. *Am J Med Genet* 1999; **84**: 76–79.
- [5] BERNASCONI F, KARAGUZEL A, CELEPF, KESER I, LULECIG, DUTLY F, SCHINZEL A. Normal phenotype with maternal isodisomy in a female with two isochromosomes: i(2p) and i(2q). *Am J Hum Genet* 1996; **59**: 1114–1118.

- [6] BRZUSTOWICZ LM, ALLITTO BA, MATSEOANE D, THEVE R, MICHAUD L, i wsp. Paternal isodisomy for chromosome 5 in a child with spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 1994; **45**: 46–51.
- [7] CASSIDY SB, LAI L-W, ERICKSON RP, MAGNUSON L, THOMAS E, GENDRON R, HERRMANN J. Trisomy 15 with loss of the paternal 15 as a cause of Prader-Willi syndrome due to maternal disomy. *Am J Hum Genet* 1992; **51**: 701–708.
- [8] CASSIDY SB. Prader-Willi syndrome. *J Med Genet* 1997; **34**: 917–923.
- [9] CASSIDY SB, FORSYTHE M, HEEGER S, NICHOLLS RD, SCHORK N, BENN P, SCHWARTZ S. Comparison of phenotype between patients with Prader-Willi syndrome due to deletion 15q and uniparental disomy 15. *Am J Med Genet* 1997; **68**: 433–440.
- [10] CATCHPOOLE D, LAM WWK, VALLER D, TEMPLE IK, JOYCE JA, REIK W, SCHOFIELD PN, MAHER ER. Epigenetic modification and uniparental inheritance of H19 in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet* 1997; **34**: 353–359.
- [11] CHEN H, YOUNG R, MU X, NANDI X, MIAO S, PROUTY L, URSIN S, GONZALEZ J, YANAMANDRA K. Uniparental isodisomy resulting from 46,XX,i(1p),i(1q) in a woman with short stature. *Am J Hum Genet* 1999; **82**: 215–218.
- [12] CHRISTIAN SL, SMITH ACM, BLACK S, ELDER FFB, JOHNSON JMP, RESTA RG, ROCKLIN ML, et al. Prenatal diagnosis of uniparental disomy 15 following trisomy 15 mosaicism. *Prenat Diagn* 1996; **16**: 323–332.
- [13] CHRISTIAN SL, RICH BH, LOEBL C, ISRAEL J, VASA R, KITTIKAMRON K, SPIRO R, ROSENFELD R, LEDBETTER D. Significance of genetic testing for paternal uniparental disomy of chromosome 6 in neonatal diabetes mellitus. *J Pediatr* 1999; **134**: 42–46.
- [14] CHUDOBA I, FRANKE Y, SENGER G, SAUERBERI G, DEMUTH S, BEENSEN V, NEUMANN A, HANSMANN I, CLAUSSEN U. Maternal UPD 20 in a hyperactive child with severe growth retardation. *Eur J Hum Genet* 1999; **7**: 533–540.
- [15] COTTER PhD, KAFFE S, CURDY LD, JHAVERI M, WILLNER JP, HIRSCHHORN K. Paternal uniparental disomy for chromosome 14: a case report and review. *Am J Med Genet* 1997; **70**: 74–79.
- [16] CROLLA JA, HARVEY JF, SITH FL, DENNIS NR. Supernumerary marker 15 chromosomes: A clinical, molecular and FISH approach to diagnosis and prognosis. *Hum Genet* 1995; **95**: 161–170.
- [17] DAWSON AJ, MEARS AJ, CHUDLEY AE, BECH-HANSEN T, McDERMID H. Der(22)t(11;22) resulting from paternal de novo translocation, adjacent 1 segregation, and maternal heterodisomy of chromosome 22. *J Med Genet* 1996; **33**: 952–956.
- [18] DE PATER JM, SCHURING-BLOM GH, VAN DEN BOGAARD R, VAN DER SIJS-BOS CJM, CHRISTIAENS GCML, STOUTENBEEK PH, LESCHOT NJ. Maternal uniparental disomy for chromosome 22 in a child with generalized mosaicism for trisomy 22. *Prenat Diagn* 1997; **17**: 81–86.
- [19] DEVRIENDT K, PETIT P, MATTHIJS G, VERMEESCH JR, HOLVOET M, DeMUELE-NAERE A, MARYNEN P, CASSIMAN J-J, FRYNS J-P. Trisomy 15 rescue with jumping translocation of distal 15q in Prader-Willi syndrome. *J Med Genet* 1997; **34**: 395–399.
- [20] DUTLY F, BAUMER A, KAYSERILI H, YUKSEL-APAK M, ZEROVA T, SCHNIZEL A. Seven cases of Wiedemann-Beckwith syndrome, including the first reported case of mosaic paternal isodisomy along the whole chromosome 11. *Am J Med Genet* 1998; **79**: 347.
- [21] EGGERING FA, SCHONBERG SA, CHEHAB FF, NORTON ME COX VA, EPSTEIN CJ. Uniparental isodisomy for paternal 7p and maternal 7q in a child with growth retardation. *Am J Hum Genet* 1994; **55**: 253–265.
- [22] EGGERMANN T, WOLLMANN HA, KUNER R, EGGERMANN K, ENDERS H, KAISER P, RANKE MB. Molecular studies in 37 Silver-Russell syndrome patients: frequency and etiology of uniparental disomy. *Hum Genet* 1997; **100**: 415–519.
- [23] ELLIOTT M, MAHER ER. Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet* 1994; **31**: 560–564.



- [24] ENGEL E. A new genetic concept uniparental disomy and its potential effect, isodisomy. *Am J Med Genet* 1980; **6**: 137–143.
- [25] ENGEL E, and DELOZIER-BLANCHET CD. Uniparental disomy, isodisomy, and imprinting: Probable effects in man and strategies for their detection. *Am J Med Genet* 1991; **40**: 432–439.
- [26] ENGEL E. Uniparental disomy revisited: The first twelve years. *Am J Med Genet* 1993; **46**: 670–674.
- [27] ENGEL E. Uniparental disomy (UPD). Genomic imprinting and a case for new genetics (Prenatal and clinical implications: the Likon concept). *Ann Genet* 1997; **40**: 24–34.
- [28] ENGEL E. Uniparental disomies in unselected populations. *Am J Hum Genet* 1998; **63**: 962–966.
- [29] EUROPEAN COLLABORATIVE RESEARCH ON MOSAICISM IN CVS EUCROMIC. Trisomy 15 CPM: Probable origins, pregnancy outcome and risk of fetal UPD. *Prenat Diagn* 1999; **19**: 29–35.
- [30] GELB BD, WILLNER JP, DUNN TM, KARDON NB, VERLOES A, PONCIN J, DESNICK RJ. Paternal uniparental disomy for chromosome 1 revealed by molecular analysis of a patient with pycnodysostosis. *Am J Hum Genet* 1998; **62**: 848–854.
- [31] GENUARDI M, TOZZIC, POMPONI MG, STAGNI ML, DELLA MONICA M, SCARANO G, CALVIERI F, TORRISI L, NERI G. Mosaic trisomy 17 in amniocytes: phenotypic outcome, tissue distribution, and uniparental disomy studies. *Eur J Hum Genet* 1999; **7**: 421–426.
- [32] GEORGIADES P, CHIERAKUL C, FERGUSON-SMITH AC. Parental origin effects in human trisomy for chromosome 14q: implications for genomic imprinting. *J Med Genet* 1998; **35**: 821–824.
- [33] HAHNEMANN JM, and VEJERSLEV LO. European collaborative research on mosaicism in CVS (EUCROMIC)-fetal and extrafetal cell lineages in 192 gestations with CVS mosaicism involving single autosomal trisomy. *Am J Med Genet* 1997; **70**: 179–187.
- [34] HARRISON K, EISENGER K, ANYANE-YEBOA K, BROWN S. Maternal uniparental disomy of chromosome 2 in a baby with trisomy 2 mosaicism in amniotic fluid culture. *Am J Med Genet* 1995; **58**: 147–151.
- [35] JAMES RS, TEMPLE IK, PATCH C, THOMPSON EM, HASSOLD T, JACOBS PA. A systematic search for uniparental disomy in carriers of chromosome translocations. *Eur J Hum Genet* 1994; **2**: 83–95.
- [36] JAMES RS, TEMPLE IK, DENNIS NR, CROLLA JA. A search for uniparental disomy in carriers of supernumerary marker chromosomes. *Eur J Hum Genet* 1995; **3**: 21–26.
- [37] JOHNSON A, WAPNER RJ. Mosaicism: implications for postnatal outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1997; **10**: 126–135.
- [38] JONES C, BOOTH C, RITA D, JAZMINES L, SPIRO R, McCULLOCH B, McCASKILL C, SHAFFER LG. Identification of a case of maternal uniparental disomy of chromosome 10 associated with confined placental mosaicism. *Prenat Diagn* 1995; **15**: 843–848.
- [39] KALOUSEK DK, LANGLOIS S, BARRETT I, YAMI, WILSON DR, HOWARD-PEEBLES PN, JOHNSON MP, GIORGIUTTI E. Uniparental disomy for chromosome 16 in humans. *Am J Hum Genet* 1993; **52**: 8–16.
- [40] KOTZOT D, SCHMITT S, BERNASCONI F, ROBINSON WP, LURIE IW, ILYINA H, MEHES K, HAMEL BCJ, OTTEN BJ, HERGERSBERG M, WERDER E, SCHONLE E, SCHINZEL A. Uniparental disomy 7 in Silver-Russell syndrome and primordial growth retardation. *Hum Mol Genet* 1995; **4**: 583–587.
- [41] KOTZOT D. Abnormal phenotypes in uniparental disomy (UPD): Fundamental aspects and a critical review with bibliography of UPD other than 15. *Am J Med Genet* 1999; **82**: 265–274.
- [42] LANGLOIS S, YONG SL, WILSON RD, KWONG LC, KALOUSEK DK. Prenatal and postnatal failure associated with maternal heterodisomy for chromosome 7. *J Med Genet* 1995; **32**: 871–875.

- [43] LEDBETTER DH, ENGEL E. Uniparental disomy in humans: development of an imprinting map and its implications for prenatal diagnosis. *Hum Mol Genet* 1995; **4**: 1757–1764.
- [44] LI M, SQUIRE JA, WEKSBERG R. Molecular genetics of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Curr Opin Pediatr* 1997; **9**: 623–629.
- [45] LI M, SQUIRE JA, WEKSBERG R. Overgrowth syndromes and genomic imprinting: from mouse to man. *Clin Genet* 1998; **53**: 165–170
- [46] LOS FJ, VAN OPSTAL D, VAN DEN BERG C, BRAAT APG, VERHOEFS, WESBY-VAN SWAAY E, VAN DEN OUVELAND AMW, HALLEY DJJ. Uniparental disomy with and without confined placental mosaicism: a model for trisomic zygote rescue. *Prenat Diagn* 1998; **18**: 659–668.
- [47] MARTIN RA, SABOL DW, ROGAN PK. Maternal uniparental disomy of chromosome 14 confined to an interstitial segment (14q23-14q24.2). *J Med Genet* 1999; **36**: 633–636.
- [48] MOORE GE, ALI Z, KHAN RU, BLUNT S, BENNETT PR, VAUGHAN JI. The incidence of uniparental disomy associated with intrauterine growth retardation in a cohort of thirty-five severely affected babies. *Am J Obstet Gynecol* 1997; **176**: 294–299.
- [49] MUTIRANGURA A, GREENBERG F, BUTLER MG, MALCOLM S, NICHOLLS RD, CHAKRAWARTI A, LEDBETTER DH. Multiplex PCR of three dinucleotide repeats in the Prader-Willi/Angelman critical region (15q11-q13):Molecular diagnosis and mechanism of uniparental disomy. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 143–151.
- [50] NICHOLLS RD, KNOLL JHM, BUTLER MG, KARAM S, LALANDE M. Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in non-deletion Prader-Willi syndrome. *Nature* 1989; **342**: 281–285.
- [51] NICHOLLS RD. Genomic imprinting and uniparental disomy in Angelman and Prader-Willi syndromes: A review. *Am J Med Genet* 1993; **46**: 16–25.
- [52] PAN Y, Mc CASKILL CD, THOMPSON KH, HICKS J, CASEY B, SCHAFFER LG, CRAIGEN WJ. Paternal isodisomy of chromosome 7 associated with complete situs inversus and immotile cilia. *Am J Hum Genet* 1998; **62**: 1551–1555.
- [53] PARK JP, MOESCHLER JB, HANI VH, HAWK AB, BELLONI DR, NOLL WW, MOHANDAS TK. Maternal disomy and Prader-Willi syndrome consistent with gamete complementation in a case of familial translocation (3;15)(p25;q11.2). *Am J Med Genet* 1998; **78**: 134–139.
- [54] PENTAO L, LEWIS RA, LEDBETTER DH, PATEL PI, LUPSKI JR. Maternal uniparental isodisomy of chromosome 14: association with autosomal recessive rod monochromacy. *Am J Hum Genet* 1992; **50**: 690–699.
- [55] PREECE MA, ABU-AMERO SN, ALI Z, ABU-AMERO KK, WAKELING EL, STANIER P, MOORE GE. An analysis of the distribution of hetero- and isodisomic regions of chromosome 7 in five mUPD7 Silver-Russell syndrome probands. *J Med Genet* 1999; **36**: 457–460.
- [56] PREECE MA, PRICE SM, DAVIES V, CLOUGH L, STANIER P, TREMBATH RC, MOORE GE. Maternal uniparental disomy 7 in Silver-Russell syndrome. *J Med Genet* 1997; **34**: 6–9.
- [57] PULFORD DJ, FALLS JG, KILLIAN JK, JIRTLE RL. Polymorphisms, genomic imprinting and cancer susceptibility. *Mutat Res* 1999; **436**: 59–67.
- [58] PURVIS-SMITH SG, SAVILLE T, MANASS S, YIP M-Y, LAM-PO-TANG PRL, DUFFY B, JOHNSTON H, LEIGH D, McDONALD B. Uniparental disomy 15 resulting from correction of an initial trisomy 15 {Letter}. *Am J Hum Genet* 1992; **50**: 1348–1350.
- [59] QUAN F, JANAS J, TOH-FEJEL SE, JOHNSON DB, WOLFORD JK, POPOVICH BW. Uniparental disomy of the entire X chromosome in a female with Duchenne muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 1997; **60**: 160–165.
- [60] RALPH A, SCOTT F, TIERNAN C, CAUBERE M, KOLLEGGER S, JUNIO J, ROBERTS C, EWEN K, SLATER HR. Maternal uniparental isodisomy for chromosome 14 detected prenatally. *Prenat Diagn* 1999; **19**: 681–684.



- [61] ROBINSON WP, WAGSTAFF J, BERNASCONI F, BACCICHETTI C, ARTIFONI L, FRANZONI E, SUSLAK L, SHIH LY, AVIV H, SCHINZEL A. Uniparental disomy explains the occurrence of the ANGELMAN or Prader-Willi syndrome in patients with an additional small invdup(15) chromosome. *J Med Genet* 1993; **30**: 756–760.
- [62] ROBINSON WP, LANGLOIS S, SCHUFFENHAUER S, HORSTHEMKE B, MICHAELIS RC, CHRISTIAN S, LEDBETTER DM, SCHINZEL A. Cytogenetic and age-dependent risk factors associated with uniparental disomy 15. *Prenat Diagn* 1996; **16**: 837–844.
- [63] ROBINSON WP, BARRETT U, BERNARD L, TELENUS A, BERNASCONI F, WILSON RD, BEST RG, HOWARD-PEEBLES PN, LANGLOIS S, KALOUSEK DK. Meiotic origin of trisomy in confined placental mosaicism correlated with presence of fetal uniparental disomy, high levels of trisomy in trophoblast, and increased risk of fetal intrauterine growth restriction. *Am J Hum Genet* 1997; **60**: 917–927.
- [64] SAITOH S, BUITING K, CASSIDY SB, CONROY JM, DRISCOLL DJ, GABRIEL JM et al. Clinical spectrum and molecular diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome patients with an imprinting mutation. *Am J Med Genet* 1997; **68**: 195–206.
- [65] SCHNEIDER AS, BISCHOFF FZ, McCASKILL C, COADY ML, STOPFER JE, SHAFFER LG. Comprehensive 4-year follow up on a case of maternal heterodisomy for chromosome 16. *Am J Med Genet* 1996; **66**: 204–208.
- [66] SHAFFER LG, McCASKILL Ch, EGLI CA, BAKER JC, JOHNSTON KM. Is there an abnormal phenotype associated with maternal isodisomy for chromosome 2 in the presence of two isochromosomes? *Am J Hum Genet* 1997; **61**: 462–463.
- [67] SHAFFER LG, McCASKILL Ch, ADKINS K, HASSOLD TJ. Systematic search for uniparental disomy in early fetal loss: The results and review of the literature. *Am J Med Genet* 1998; **79**: 366–372.
- [68] SLATTER RE, ELLIOTT M, WELHAM K, CARRERA M, SCHOFIELD PN, BARTON DE, MAHER ER. Mosaic uniparental disomy in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet* 1994; **31**: 749–753.
- [69] SMITH MJ, CREASY MR, CLARKE A, UPADHYAYA M. Sex ratio and absence of uniparental disomy in spontaneous abortions with a normal karyotype. *Clin Genet* 1998; **53**: 258–261.
- [70] SPENCE JE, PERCIACCANTE RG, GREIG GM, HUNTINGTON FW, LEDBETTER DH, HEJTMANCIK JF, POLLACK MS, OBRIEN WE, BEAUDET AL. Uniparental disomy as a mechanism for human genetic disease. *Am J Hum Genet* 1988; **42**: 217–226.
- [71] SPLITT MP, GOODSHIP JA. Another case of maternal uniparental disomy chromosome 14 syndrome. *Am J Med Genet* 1997; **72**: 239–240.
- [72] STALKER HJ, WILLIAMS CA. Genetic Counseling in Angelman syndrome. The challenges of multiple causes. *Am J Med Genet* 1998; **77**: 54–59.
- [73] TEMPLE IK, GARDNER RJ, ROBINSON DO, KIBIRIGE MS, FERGUSON AW, BAUM DJ, BARBER JCK, et al. Further evidence for an imprinted gene for neonatal diabetes localised to chromosome 6q22–q23. *Hum Mol Genet* 1996; **5**: 1117–1121.
- [74] TOTH-FEJEL SE, OLSON S, GUNTER K, QUAN F, WOLFORD J, POPOVICH BW, MAGENIS RE. The impact of imprinting: Prader-Willi syndrome resulting from chromosome translocation, recombination, and nondisjunction. *Am J Hum Genet* 1996; **58**: 1008–1016.
- [75] UEHARA S, TAMURA M, NATA M, KANETAKE J, HASHIYADA M, TERADA Y, YAEGASHIN, FUNATO T, YAJIMA A. Complete androgen insensitivity in a 47,XXY patient with uniparental disomy for the X chromosome. *Am J Med Genet* 1999; **86**: 107–111.
- [76] VAN OPSTAL D, VAN DEN BERG C, DEELEN WH, BRANDENBURG H, COHEN OVERBEEK TE, HALLEY DJJ, VAN DEN OUVELAND AMW, INTVELD PA, LOS FJ. Prospective prenatal investigations on potential uniparental disomy in cases of confined placental trisomy. *Prenat Diagn* 1998; **18**: 35–44.

- [77] VOSS R, BEN-SIMON E, AVITAL A, GODREY S, ZLOTOGORA J, DAGAN J, TIKO-CHINSKI Y, HILLEL J. Isodisomy for chromosome 7 in a patient with cystic fibrosis: could uniparental disomy be common in humans? *Am J Hum Genet* 1989; **45**: 373–380.
- [78] WALTER CA, SHAFFER LG, KAYE CI, HUFF RW, GHIDONI PD, McCASKILL C, McFARLAND MB, MOORE CM. Short-limb dwarfism and hypertrophic cardiomyopathy in a patient with paternal isodisomy 14: 45,XY,idic(14)(p11). *Am J Med Genet* 1996; **65**: 259–265.
- [79] WANG JCC, MAMUNES P, KOU SY, SCHMIDT J, MAO R, and HSU WT. Centromeric DNA break in a 10;16 reciprocal translocation associated with trisomy 16 confined placental mosaicism and maternal uniparental disomy for chromosome 16. *Am J Med Genet* 1998; **80**: 418–422.
- [80] WARBURTON D. Editorial: Uniparental disomy: A rare consequence of the high rate of aneuploidy in human gametes. *Am J Hum Genet* 1988; **42**: 215–216.
- [81] WHITEFORD ML, COUTTS J, AL.-ROOMI L, MATHER A, LOWTHER G, COOKE A, VAUGHAN JI, MOORE GE, TOLME JL. Uniparental isodisomy for chromosome 16 in a growth-retarded infant with. *Prenat Diagn* 1995; **15**: 579–584.
- [82] WHITEFORD ML, NARENDRA A, WHITE MP, COOKE A, WILKINSON AG, ROBERTSON KJ, TOLMIE JL. Paternal uniparental disomy for chromosome 6 causes transient neonatal diabetes. *J Med Genet* 1997; **34**: 167–168.
- [83] WILKINSON TA, JAMES RS, CROLLA JA, COCKWELL AE, CAMPBELL PL, TEMPLE IK. A case of maternal uniparental disomy of chromosome 9 in association with confined placental mosaicism for trisomy 9. *Prenat Diagn* 1996; **16**: 371–374.
- [84] WILLIAMS CA, ANGELMAN H, CLAYTON-SMITH J, DRISCOLL DJ, HENDRICKSON JE, KNOLL KHM, MAGENIS RE, SCHINZEL A, WAGSTAFF J, WHIDDEN E, ZORI RT. Angelman syndrome: consensus for diagnostic criteria. *Am J Med Genet* 1995; **56**: 237–238.
- [85] WOLSTENHOLME J. Confined placental mosaicism for trisomies 2, 3, 7, 8, 9, 16 i 22: Their incidence, likely origins, and mechanism for cell lineage compartmentalization. *Prenat Diagn* 1996; **16**: 511–524.
- [86] WOO V, BRIDGE PJ, BAMFORTH JS. Maternal uniparental heterodisomy for chromosome 16: case report. *Am J Med Genet* 1997; **70**: 387–390.
- [87] WOODAGET, PRASAD M, DIXON JW., SELBY RE, ROMAINDR, COLUMBANO-GREEN LM, GRAHAM D, ROGAN PK, SEIP JR, SMITH A, TRENT RJ. Bloom syndrome and maternal uniparental disomy for chromosome 15. *Am J Hum Genet* 1994; **55**: 74–80.

*Redaktor prowadzący – Maciej Zabel*

*Otrzymano: 08.01.2 000 r.*

*Przyjęto: 17.04. 2 000 r.*

*Adres autora: Ul. Kasprzaka 17A, 01-211 Warszawa*



## NIEBIAŁKOWE INHIBITORY KINAZ ZALEŻNYCH OD CYKLIN\*

### NON-PROTEINACEOUS INHIBITORS OF THE CYCLIN-DEPENDENT KINASES

Cezary WÓJCIK, Monika WÓJCIK

Zakład Histologii i Embriologii, Centrum Biostruktury, Akademia Medyczna  
w Warszawie

**Streszczenie:** W regulacji cyklu komórkowego biorą udział kinazy zależne od cyklin (CDK) w połączeniu z cyklinami, którym przeciwstawiają się naturalne, białkowe inhibitory CDK. Ponieważ zaburzenia w regulacji cyklu komórkowego często występują w różnych stanach chorobowych, przede wszystkim w chorobie nowotworowej, trwają poszukiwania drobnocząsteczkowych inhibitorów CDK, które mogłyby znaleźć zastosowanie jako leki hamujące proliferację komórek. Wyizolowano i zsyntetyzowano już wiele takich inhibitorów (m.in. olomucynę, roscovitynę, flawopirydol oraz indyrybinę), których cechą wspólną jest współzawodniczenie z ATP o miejsce wiązania z CDK. W licznych modelach *in vitro* oraz *in vivo* na zwierzętach doświadczalnych wykazują one działanie przeciwnowotworowe, a flawopirydol jest już w II fazie badań klinicznych.

(*Postępy Biologii Komórki* 2000; 27: 377–396)

**Słowa kluczowe:** cykl komórkowy, inhibitory CDK, nowotwory, proliferacja komórek

**Summary:** The cell cycle is regulated by the activity of cyclin dependent kinases (CDKs) associated with cyclins. Their activity is opposed by various CDK inhibitory proteins. Dysregulation of the cell cycle occurs in various pathological conditions – the most important of them being cancer. Therefore, there is a continuous effort to search for chemical CDK inhibitors, which may be used as antiproliferative drugs. Various compounds have been already isolated and synthesized (e.g. olomoucine, roscovitine, flavopiridol and indirubin). All known CDK inhibitors compete with ATP in the binding with CDKs. Chemical CDK inhibitors show antitumor activity in various *in vitro* assays and on experimental animals. Flavopiridol is already being tested in phase II clinical trials.

(*Advances in Cell Biology* 2000; 27: 377–396)

**Key words:** cell cycle, CDK inhibitors, cancer, cell proliferation

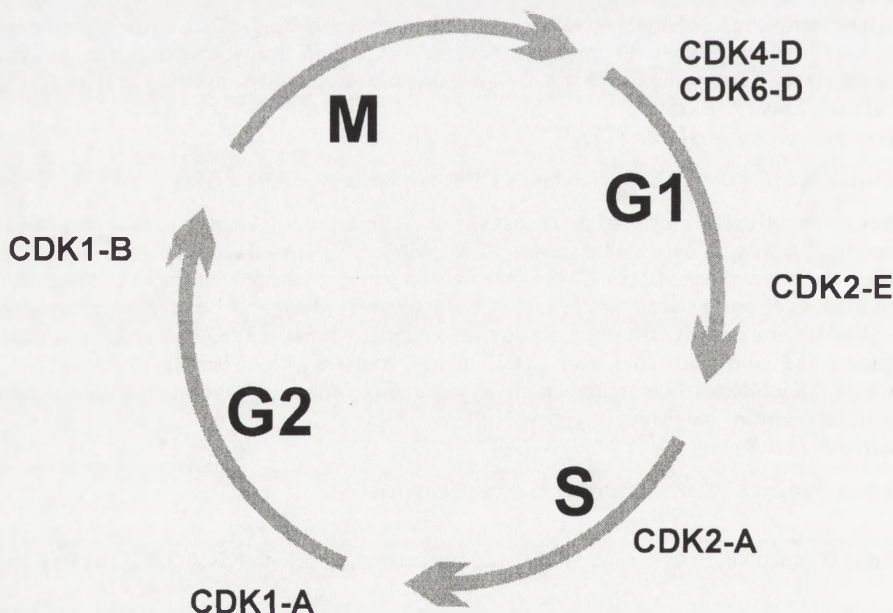
\*Badania w pracowni dr Cezarego Wójcika są finansowane z grantu KBN nr 4 P05A 084 16

## 1. WPROWADZENIE

Proliferacja komórek jest ściśle regulowana poprzez aktywację i dezaktywację serii białek, które tworzą rodzaj „napędu” cyklu komórkowego. „Napęd” ten jest złożony głównie z trzech rodzajów białek: **kinaz zależnych od cyklin (CDK)**, **cyklin** i **inhibitorów kinaz zależnych od cyklin (CKI)**. Dokładny opis regulacji cyklu komórkowego jest dostępny w wielu pracach przeglądowych, zarówno w języku polskim [94, 95] jak i angielskim [22, 63, 69, 73, 74].

Kinazy zależne od cyklin działają na kluczowych etapach cyklu komórkowego regulując progresję poszczególnych jego faz i przejścia między fazami (rys. 1) [94]. Zablockowanie tylko jednej z kinaz wywołuje blok w określonym punkcie cyklu komórkowego, np. zablockowanie aktywności CDK1 w kompleksie z cykliną B wywoła blok w późnej fazie G2, podczas gdy zablockowanie aktywności CDK4 i CDK6 w kompleksie z cyklinami D wywoła blok w fazie G1. Funkcje poszczególnych kinaz CDK mogą być niekiedy komplementarne względem siebie, co jest ważne zwłaszcza w komórkach nowotworowych. CDK7 uczestniczy w aktywacji pozostałych CDK [19], zaś CDK5 nie reguluje cyklu komórkowego, lecz odgrywa rolę w metabolizmie neuronów [45].

Od czasu odkrycia kluczowej roli CDK w regulacji cyklu komórkowego zdano sobie sprawę, iż zablockowanie ich aktywności powinno powodować całkowite za-



RYSUNEK 1. Schemat przedstawiający udział poszczególnych CDK w powiązaniu z odpowiednimi cyklinami w regulacji cyklu komórkowego

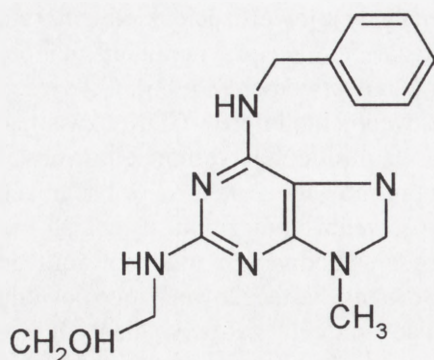


hamowanie proliferacji komórek. Nadzieje te znalazły potwierdzenie, kiedy odkryto naturalne, białkowe inhibitory CDK [95]. Okazało się, że przynajmniej niektóre z nich, takie jak p27<sup>Kip1</sup>, są często zmutowane w nowotworach [84, 86]. Co więcej, rozpoczęto próby terapii genowej za pomocą sekwencji inhibitorów CDK, uzyskując zachęcające wyniki polegające na zahamowaniu proliferacji komórek nowotworowych [14, 30, 89]. Niestety, terapia genowa pomimo wielu sukcesów w badaniach doświadczalnych wciąż nie spełnia się w zastosowaniu klinicznym, ustępując tradycyjnym formom leczenia. O wiele prostsze i wygodniejsze w stosowaniu od białkowych inhibitorów CDK byłyby inhibitory drobnocząsteczkowe. Z tego powodu firmy farmaceutyczne rozpoczęły wyścig mający na celu zarówno identyfikację odpowiednich naturalnych produktów, jak i syntezę sztucznych drobnocząsteczkowych związków chemicznych, mających właściwości inhibitorów CDK.

Teoretycznie jest możliwe wyróżnienie różnych mechanizmów działania inhibitorów, np. współzawodnictwa o wiązanie substratów – zarówno ATP jak i białek ulegających fosforylacji, współzawodnictwa przyłączania cyklin, naśladowanie działania białkowych inhibitorów CDK lub zaburzenie regulacji degradacji proteolitycznej poszczególnych cyklin. W praktyce zaprojektowanie odpowiednich związków chemicznych jest o wiele trudniejsze. Wszystkie znane niebiałkowe inhibitory CDK wykazują tylko jeden mechanizm działania – współzawodniczenie z ATP o wiązanie w miejscu katalitycznym. Mają one z reguły płaski pierścień heterocykliczny, który zajmuje kieszonkę wiążącą purynę wytwarzając 2–3 wiązania wodorowe z Glu w pozycji 81 i Leu w pozycji 83 łańcucha polipeptydowego CDK. Poza tą wspólną cechą, inhibitory CDK znacznie się różnią budową chemiczną i należą do różnych grup związków, np. do analogów purynowych, flawonoidów, pochodnych indygo, analogów staurosporyny itp. Większość z tych związków ma wiele wad, gdyż albo są one niewystarczająco selektywne, albo mają niską stałą wiązania z CDK. Reprezentują one potencjalny punkt wyjścia do odkrycia potężnych, specyficznych inhibitorów kinaz zależnych od cyklin [20, 26, 52, 53].

## 2. ANALOGI PURYNOWE

Niedługo po tym jak odkryto, iż CDK odpowiadają za kontrolę cyklu komórkowego, Rialet i Meijer zaproponowali, by do poszukiwań nowych leków antynowotworowych używać testu polegającego na zdolności testowanej substancji do blokowania fosforylacji histonu H1, jednego z najwcześniej poznanych substratów CDK. Doprowadziło to do zidentyfikowania, iż analogi purynowe, takie jak: N6-(D2-izopentyl)adenina (izopentenyloadenina) i 6-dimetyloaminopuryna (DMAP), blokują aktywność CDK [72]. Substancje te wyróżniają się niską selektywnością i małą siłą działania. Meijer i współpracownicy zbadali więcej niż 80 analogów



RYSUNEK 2. Olomucyna

purynowych [90], co pozwoliło na wyizolowanie **olomucyny**, czyli 2-(2-hydroksyetyloamino)-6-benzoksyloamino-9-metylopuryny (rys. 2).

Olomucyna inhibuje CDK1, CDK2 i CDK5, lecz jest także w niewielkim stopniu inhibitorem innych kinaz oraz białek wiążących ATP (np. ERK1 i ERK2). Olomucyna praktycznie nie oddziałuje na CDK4. Wartości IC<sub>50</sub> olomucyny oraz innych omawianych inhibitorów CDK są podane w tabeli 1. Olomucyna konkuruje o miejsce wiązania z ATP, natomiast nie jest konkurencyjna w stosunku do ulegających fos-

forylacji substratów CDK. Olomucyna hamuje rozwój i dojrzewanie owocytów żełców, żabich i mysich, jednokomórkowych glonów, komórek roślin wyższych [1, 24, 90] oraz normalnych i nowotworowych linii komórkowych w hodowli tkankowej [9, 18, 35, 36]. Jej efekty hamujące proliferację i wywołujące apoptozę nie zależą od obecności aktywnego białka p53, co stwierdzono na dwóch liniach komórkowych chłoniaka Burkitta, różniących się mutacją p53 [18]. Potwierdzono to niezależnie na czterech liniach ludzkich nowotworów – BxPC-3, PANC-1, Capan-2, i CAV. Ponadto, nie stwierdzono zależności działania olomucyny i pokrewnej jej roskowityny od ekspresji p16 i K-Ras [36]. Badania na niedrobnokomórkowym raku płuca MR65 i neuroblastomie CHP212 ujawniły, iż olomucyna i roskowityna wywołują blok w cyklu komórkowym na przejściach G1/S, G2/M i M/G1 oraz w czasie trwania fazy S. Pełnemu blokowi cyklu komórkowego towarzyszyło pojawienie się komórek apoptotycznych [82]. Efekty działania olomucyny są często

TABELA 1. Wartości stężenia wybranych inhibitorów CDK (wyrażone w  $\mu\text{M}$ ), wywołujące zahamowanie 50% aktywności enzymatycznej podanych kompleksów CDK z cyklinami (IC<sub>50</sub>)

Inhibitor	CDK1-B	CDK2-A	CDK4-D	CDK5
Olomucyna	7	7	>1000	3
Roskowityna	0,65	0,70	>100	?
Flawopirydol	0,40	0,40	0,40	0,40
1-butyrolakton	0,68	1,50	>1000	?
Staurosporyna	0,005	0,007	>1000	?
Indyrubina	10	2,2	12	?
5-kwas sufonowy	0,4	0,18	0,055	?
Indyrubiny				
Kenpaullon	0,40	0,65	>100	?
9-hydroksyelliptycyna	1	?	?	?
Suramina	4	?	?	?

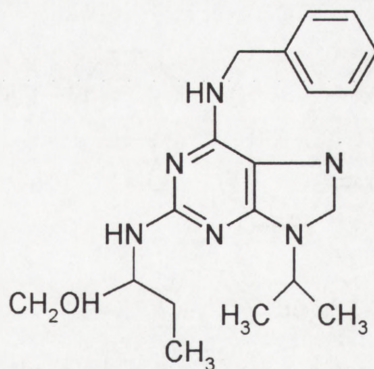


odwracalne, czyli po jej usunięciu następuje kontynuacja cyklu komórkowego. Interesujące jest, iż olomucyna nie wykazuje działania w przypadku zarodków muszki owocowej i drożdży, a tylko słabą aktywność w zarodkach nicieni [1]. Co ciekawe, choć olomucyna wywołuje generalnie apoptozę komórek w hodowli, to zapobiega apoptozie wywołanej np. arabinozydem cytozyny [65]. Ponadto, olomucyna zapobiega transportowi pęcherzyków wzdłuż aksonów do zakończeń nerwowych [71]. Co więcej, wykazano, iż może ona wpływać na zmiany aktywności neuronów zachodzące w przebiegu rytmu okołodobowego [76].

Opisano pojedynczy przypadek wyleczenia spontanicznego czerniaka u psa po dożylnym podaniu olomucyny w dawce 8 mg/kg i 24 h powtarzanej przez kolejnych siedem dni. Biopsje węzłów chłonnych wykazały, iż począwszy od trzeciego dnia leczenia pojawiła się masowa apoptoza przerzutów czerniaka. Standardowe badania laboratoryjne nie ujawniły żadnych działań niepożądanych olomucyny [29].

Opisano krystaliczną strukturę olomucyny związanej z CDK2 [81]. Badania te potwierdzają, iż olomucyna wiąże się z kieszonką wiążącą ATP. Należałoby odnotować, iż znajomość oddziaływań olomucyny z CDK2 nie dostarcza wyjaśnienia, dlaczego CDK4 i CDK6 są niewrażliwe na olomucynę. Zbadanie na poziomie atomowym miejsca przyłączenia się olomucyny do CDK2 umożliwiło przeprowadzenie dalszych modyfikacji chemicznych olomucyny, celem otrzymania inhibitora o większej specyficzności i powinowactwie. Wysiłek ten został opłacony syntezą ulepszanego analogu olomucyny, mianowicie **roskowityny** (rys. 3) [54].

Roskowityna w porównaniu z olomucyną wykazuje się zwiększonym co najmniej dziesięciokrotnie powinowactwem w stosunku do CDK1 i CDK2. Podobnie jak olomucyna, również roskowityna jest nieaktywna w stosunku do CDK4 i hamuje także kilka innych kinaz (ERK1 i ERK2 oraz kinazę związaną z receptorem dla insuliny). Roskowityna ma pojedyncze centrum chiralne, tak więc występują jej enancjomery. Stereoizomer R ma około dwa razy większe powinowactwo do CDK niż stereoizomer S. Zwiększone powinowactwo względem CDK nie idzie w parze ze zwiększonym powinowactwem do innych kinaz, co powoduje większą selektywność tego inhibitora w porównaniu z olomucyną [54]. Stwierdzono, iż roskowityna wywołuje apoptozę szeregu linii komórkowych *in vitro*, np. pozbawionego receptora estrogeny raka gruczołu mlekowego linii MDA-MB-231 [56]. Roskowityna odwracalnie hamuje mejozę oocytów żeńców i mitozę ich zarodków w późnej profazie oraz syntezę DNA w ekstraktach z jaj żaby *Xenopus laevis*. Ponadto, blokuje ona zależne od progesteronu dojrzewanie



RYSUNEK 3. Roskowityna

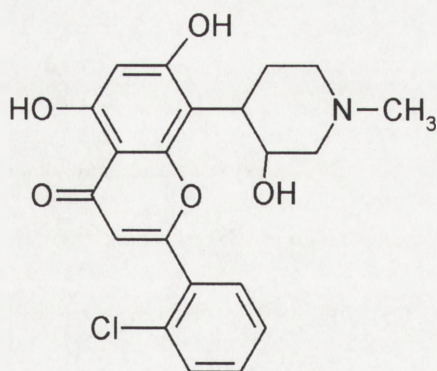
oocytów *Xenopus laevis*. Roskowityna hamuje proliferację komórek białaczki L1210 wywołując blok w fazach G1 i G2 [60]. Potrafi ona także skutecznie hamować replikację ludzkiego cytomegalowirusa oraz wirusa opryszczki w hodowli tkankowej [7, 77]. Roskowityna podawana dootrzewnowo szczurom z doświadczalnym mezangialnym proliferacyjnym kłębuszkowym zapaleniem nerek (model Thy1) powodowała redukcję proliferacji komórek mezangium oraz ekspresję kolagenu typu IV, fibronektyny i lamininy, co wiązało się z poprawą funkcji nerek [70].

Najnowsze pochodne puryn o zwiększonym powinowactwie do CDK to alkiłowane C2 pochodne o IC50 względem CDK rzędu 0,20  $\mu\text{M}$  [46] oraz **purwalanole** A i B. Purwalanol A posiada IC50 względem kompleksu CDK2 z cykliną A rzędu 0,070  $\mu\text{M}$  [27].

### 3. FLAWONOIDY

Flawonoidy od dawna znane były jako inhibitory kinaz. Wiele z nich wykazuje działanie modulujące cykl komórkowy oraz hamujące wzrost [61].

**Flawopirydol** [(-) cis-5,7-dihydroksy-2-(2-chlorofenyl)-8-[4-(3-hydroksy-1-metyl-0-piperidynyl)-4H-benzopiran-4-on]] (rys. 4) jest pochodną alkaloidu rohitukiny wyizolowanego z indyjskiej rośliny *Dysoxylum binectariferum*. Flawopirydol i pochodny związek o nazwie **L86-8276** (bez atomu chloru) są inhibitorami CDK o dużym powinowactwie i specyficzności [50]. Badania wskazują, iż flawopirydol, w przeciwieństwie do olomucyny i butyrolaktonu, nie jest zdolny rozróżnić poszczególnych kinaz z rodziny CDK [10, 50]. Flawopirydol wykazuje również pewne właściwości inhibicyjne w stosunku do niektórych innych kinaz, w tym kinazy białkowej A, G i kinazy związanej z receptorem dla EGF. Podobnie jak olomucyna i roskowityna, flawopirydol jest inhibitorem konkurencyjnym w stosunku do ATP [50]. Ustalono strukturę krystaliczną kompleksu CDK2 z L86-8276. Pierścień benzopiranowy L86-8276 zajmuje podobny obszar jak pierścień purynowy ATP, a pierścień pirydynowy L86-8276 – obszar, w którym znajduje się normalnie reszta  $\alpha$ -fosforanowa ATP. Podobnie, jak w przypadku olomucyny, grupa fenyłowa L86-8276 wystaje z kieszonki wiążącej ATP [16].



RYSUNEK 4. Flawopirydol

Wstępne badania potwierdziły cytostaticzne działanie flawopirydolu na różne linie komórkowe [39, 50, 93]. Flawopirydol może być również cytotoksyczny dla niektórych linii komórkowych, poprzez indukcję apoptozy [2, 4, 5, 67], która jest



niezależna od aktywnego białka p53 [12, 85], pRb czy p16 [12]. Badania różnych linii raka przełyku wykazały jednak zwiększoną wrażliwość tych linii, które były pozbawione aktywnego pRb [79]. Flawopirydol wywołuje także różnicowanie się komórek słabo zróżnicowanych linii komórkowych, takich jak linie niedrobnokomórkowego raka płuca NCI-H358 [44]. Efekt ten jest z jednej strony korzystny z punktu widzenia terapii, gdyż hamuje proliferację nowotworów, z drugiej jednak strony komórki zróżnicowane są bardziej odporne na chemioterapeutyki i mogą stanowić źródło wznowy. Nie do końca jest jasne, czy efekty działania flawopirydolu zależą jedynie od blokowania CDK, czy też od jego wpływu na inne kinazy. Cytotoksyczny wpływ flawopirydolu na nieproliferujące komórki raka płuca linii A-549 [4] lub komórki ludzkiego śródbłonna żył pępowinowych [8] nie dają się wyjaśnić blokowaniem CDK, które są nieaktywne w komórkach nieproliferujących. Obserwacja ta poddaje w wątpliwość absolutną specyficzność tej substancji. Dalsze badania będą konieczne w celu określenia stopnia, do którego cytostatyczne i cytotoksyczne efekty działania flawopirydolu są skojarzone z inhibicją CDK, a w jakim stopniu można je przypisać innym właściwościom tego związku.

Inhibicja CDK występujących w komórkach nerwowych może także zapobiegać ich uszkodzeniom i apoptozie, tak jak to zaobserwowano w komórkach PC12, neuronach współczulnych i ziarnistych neuronach mózdzku, umieszczonych w pożywce pozbawionej fizjologicznego stężenia KCl. Zarówno flawopirydol, jak i olomucyna zapobiegły w tych warunkach apoptozie neuronów. Nie wiadomo, czy podobne właściwości ochronne mogłyby on posiadać *in vivo* [64, 66]. Flawopirydol zapobiegł także apoptozie wywołanej przez toksyczne działanie arabinozydu cytozyny, podczas gdy olomucyna i roskowityna nie wykazały takiego działania. Można to wytłumaczyć faktem, iż w apoptozie neuronów uczestniczy CDK4, który nie jest hamowany przez te analogi puryn. Zapobieganie apoptozie neuronów wywołanej przez arabinozyd cytozyny ma istotne znaczenie, gdyż neurotoksyczność niektórych chemioterapeutyków znacznie utrudnia ich stosowanie [13]. Niezależnie od działania na CDK5, flawopirydol zapobiega także toksycznym efektem  $\beta$ -amyloidu wywieranym na neurony w hodowli tkankowej [23].

Proliferacja miocytów gładkich błony wewnętrznej naczyń jest czynnikiem etiopatogenetycznym w szeregu schorzeń, włączając to powstawanie zmian miażdżycowych i restenozę. Blokowanie ich proliferacji w modelach zwierzęcych zapobiega lub pomniejsza rozwój tych uszkodzeń naczyń krwionośnych. Proliferacja miocytów błony wewnętrznej uzależniona jest z reguły oddziaływaniem licznych czynników wzrostu, takich jak: płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF) czy zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF). Flawopirydol w stężeniu 75 nmol/L zapobiega proliferacji miocytów *in vitro* w odpowiedzi na te czynniki. Podawany doustnie szczurom z uszkodzoną cewnikiem tętnicą szyjną wspólną w dawce 5 mg/kg redukuje on powierzchnię odnowy błony wewnętrznej o 35% po 7 dniach, a o 39% po 14 dniach. Wyniki te zachęcają do przeprowadzenia prób klinicznych u ludzi, np.

celem zapobieżenia restenozie w tętnicach wieńcowych po angioplastyce i/lub wszczępieniu stentów [75].

Flawopirydol znajduje się obecnie w II fazie badań klinicznych jako lek przeciwnowotworowy. Przed przystąpieniem do prób klinicznych poważnym problemem był niski iloczyn rozpuszczalności flawopirydolu w wodzie wynoszący 0,024 mg/mL podczas gdy pożądane stężenie tego leku w osoczu powinno wynosić 10 mg/mL. Flawopirydol w pożądanym stężeniu udało się rozpuścić w 30% roztworze hydroksypopyl beta-cyklodekstryny w 0,1 M buforze cytrynianowym (pH 4,52). Taki roztwór nie wytrąca się po wprowadzeniu do buforów o pH fizjologicznych, a więc zapewnia bezpieczeństwo podawania parenteralnego [15, 48, 49]. Innym problemem, warunkującym skuteczność podawanego flawopirydolu, jest obecność innych białek poza CDK, które mają do niego wysokie powinowactwo. Wykazano, iż cytozolowa dehydrogenaza aldehydowa 1 wiąże flawopirydol, choć nie wpływa to na jej czynność enzymatyczną. Jednakże ekspresja zwiększonej ilości tego enzymu w badanych liniach komórkowych korelowała z ich mniejszą wrażliwością na niskie stężenia flawopirydolu. Można przypuszczać, iż w czasie chemioterapii flawopirydołem może dojść do selekcji komórek guza o wysokiej zawartości tego enzymu, co w konsekwencji może powodować powstanie klonu opornych komórek nowotworowych [78].

Częstym problemem przy klasycznych formach chemioterapii, np. z użyciem doksorubicyny, jest rozwój oporności wielolekowej związanej ze zwiększoną ekspresją glikoproteiny błonowej MRP1. Wykazano, iż flawopirydol oddziałuje z MRP1, zwiększając jego aktywność ATP-azową i zaburzając usuwanie doksorubicyny z komórek. Linie komórkowe ze zwiększoną ekspresją MRP1 są jednakże odporne na cytotoksyczne działanie flawopirydolu [33, 34].

Celem zapobieżenia rozwinięciu się oporności wielolekowej często stosuje się w chemioterapii skojarzone podawanie leków o różnych mechanizmach działania, zwiększając tym samym jej efektywność. Ponieważ stosowane leki często działają na różne etapy cyklu komórkowego, niezmiernie ważna jest kolejność ich podawania. Na linii A549 niedrobnokomórkowego raka płuc wykazano, iż synergiczne działanie flawopirydolu i taksolu, arabinozydu cytozyny, topotekanu oraz etopozydu występuje tylko przy podaniu wcześniejszym niż flawopirydolu. Jednakże podanie arabinozydu cytozyny lub 5-fluorouracylu w 24 h po podaniu flawopirydolu także było bardzo skuteczne. Jedynie efekt synergistyczny działania cisplatyny z flawopirydołem nie zależał od kolejności podania [5]. Również w przypadku szeregu linii raka żołądka i gruczołu mlekowego wykazano, iż wzmocnienie efektu przeciwnowotworowego flawopirydolu poprzez jego skojarzenie z taksolem występowało jedynie wtedy, gdy flawopirydol podano po taksole, a nie przed lub równocześnie [58].

Dodatkowe korzyści wynikające ze stosowania flawopirydolu mogą wynikać z tego, iż poza bezpośrednim efektem przeciwnowotworowym wynikającym z blokowania CDK może on także blokować angiogenezę nowotworów. Zaobserwowano,



iz flawopirydol obniża zależną od niedotlenienia ekspresję czynnika wzrostu komórek śródbłonna (VEGF), produkowanego normalnie przez ludzkie monocyty. Mechanizm działania flawopirydolu wydaje się zależeć od dramatycznej destabilizacji mRNA dla VEGF-u [55].

W fazie badań przedklinicznych określono ogólną toksyczność flawopirydolu, a następnie przetestowano jego działanie na przeszczepialne nowotwory u zwierząt doświadczalnych. Podawanie flawopirydolu myszom wywoływało apoptozę tymocytów, splenocytów i komórek węzłów chłonnych, co pociągało za sobą atrofię śledziony, grasicy i węzłów chłonnych. Poza tym obserwowano także apoptozę enterocytów w kryptach jelitowych. Nie stwierdzono uszkodzenia szpiku kostnego, nerek, wątroby, płuc, mięśni szkieletowych i sercowego [2]. Większość flawopirydolu ulega zmetabolizowaniu w wątrobie, a wytworzone mono- i di-glukuroniany są wydalane z żółcią [37]. Flawopirydol podawany dootrzewnowo w dawce 5 mg/kg na 24 h okazał się skuteczny w ograniczaniu wzrostu jednej z linii ludzkiego raka płaskonabłonkowego szyi i głowy (HNSCC) na myszach nagich. Zaobserwowano redukcję masy guza o 60–70%, której towarzyszyła rozległa apoptoza komórek nowotworowych [68]. Flawopirydol podawany dożylnie w dawce 7,5 mg/kg na 24 h wywoływał apoptozę guzów u myszy nagich, co spowodowane zostało przez ludzkie linie białaczkowe HL-60, SUDHL-4 i Nalm/6. Co więcej uzyskano kompletne wyleczenie 11 z 12 przypadków zaawansowanych guzów wywołanych przez linię HL-60. Pięciodniowe leczenie chłoniaków wywołanych przez linię SUDHL-4 spowodowało całkowite wyleczenie w połowie przypadków i długotrwałą regresję w dalszych 25% przypadków. Późne stadia chłoniaka AS283 związanego z zespołem upośledzenia odporności były odporne na działanie flawopirydolu, jednak gdy lek ten zastosowano we wczesnych stadiach powodował on całkowite wyleczenie. W przypadku ludzkiej ostrej limfoblastycznej białaczki uzyskano 15-dniowe przedłużenie życia w stosunku do kontroli. Uzyskane wyniki wskazują na to, iż flawopirydol i podobne mu inhibitory kinaz zależnych od cyklin stanowią dobre leki przeciwnowotworowe [2].

Przeprowadzono badania kliniczne I fazy działania flawopirydolu, mające na celu określenie maksymalnej tolerowanej dawki, profilu toksyczności oraz jego farmakokinetyki po podaniu dożylnym we wlewie ciągłym przez 72 h powtarzanym trzykrotnie co dwa tygodnie. Do badań tych zakwalifikowano 66 pacjentów w zaawansowanej chorobie nowotworowej odpornej na konwencjonalne leczenie. Badania 49 pacjentów pozwoliły określić maksymalną tolerowaną dawkę flawopirydolu na 50 mg/m<sup>2</sup> powierzchni ciała/24 h. Głównym objawem niepożądanym warunkującym ten poziom dawki była biegunka wydzielnicza. Z tego powodu zastosowano standardową profilaktykę przeciwbiegunkową, co pozwoliło osiągnąć maksymalną tolerowaną dawkę w wysokości 78 mg/m<sup>2</sup> powierzchni ciała/24 h. Głównym objawem niepożądanym było w tym przypadku niedociśnienie występujące przy dawce 98 mg/m<sup>2</sup> powierzchni ciała/24 h. Wśród innych działań niepożądanych zaobser-

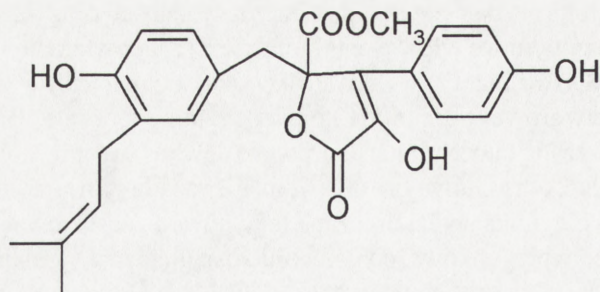
wowano reakcje zapalne z towarzyszącym wzrostem białek ostrej fazy, które w przypadku niektórych pacjentów uniemożliwiły kontynuację leczenia. U niektórych pacjentów nie zadziałała także profilaktyka przeciwbiegunkowa, co zmuszało do obniżenia dawki flawopirydolu. Około 70% pacjentów wykazywało normalną farmakokinetykę flawopirydolu, jednak u 30% pojawiły się niespodziewane zwyżki stężenia tego leku w osoczu. Udało się osiągnąć stężenie flawopirydolu w osoczu wahające się od 71 nM (w przypadku dawki 50 mg/m<sup>2</sup>/ 24 h) do 344 nM (w przypadku dawki 78 mg/m<sup>2</sup>/24 h). Zaobserwowano średniego stopnia efekt przeciwnowotworowy w przypadku jednego pacjenta z rakiem nerki i niewielki efekt w przypadku trzech pacjentów z chłoniakiem nieziarniczym, rakiem nerki i rakiem jelita grubego. U pozostałych pacjentów nie zaobserwowano znaczącej poprawy. Wnioski z badania I fazy są zachęcające, gdyż osiągnięto stężenie terapeutyczne w osoczu (tj. takie, w których wykazano efekt przeciwnowotworowy w modelach zwierzęcych) przy stosunkowo niewielkich skutkach ubocznych. Obecnie prowadzone są badania kliniczne II fazy flawopirydolu [83].

#### 4. 1-BUTYROLAKTON

1-Butyrolakton { $\alpha$ -okso- $\beta$ -(*p*-hydroksyfenyl)- $\gamma$ -(*p*-hydroksy-*m*-3,3-dimetylalilbenzyl)- $\gamma$ -metoksykarbonyl- $\gamma$ -butyrolakton} (rys. 5) został wyizolowany ze szczepu F-25799 *Aspergillus* sp. w czasie poszukiwań substancji blokujących aktywność CDK [41]. **1-Butyrolakton** jest kompetetywny do ATP, hamuje CDK1 i CDK2. Inne kinazy są o rząd wielkości mniej wrażliwe na działanie tego związku chemicznego [41, 52]. Nie przeprowadzono jeszcze badań krystalograficznych dotyczących strukturalnych oddziaływań z CDK2. Pomimo tego jest on bardzo ciekawym związkiem, który zapewne będzie stanowił punkt wyjścia do syntezy dalszych substancji, przede wszystkim dlatego, iż jest przedstawicielem klasy związków,

które wcześniej nie były brane pod uwagę w badaniach nad kinazami [26].

Butyrolakton wywołuje blok w fazie G2 zsynchronizowanych ekstraktów z jaj żab *Xenopus* [87]. Hamuje on wzrost szeregu linii niedrobnokomórkowego i drobnokomórkowego raka płuc wywołując blok w fazie G2/M. Sko-



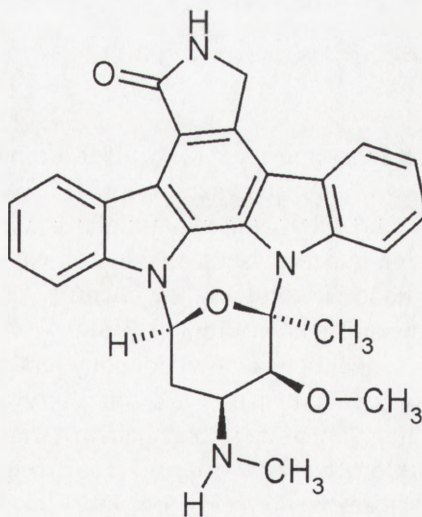
RYSUNEK 5. 1-butyrolakton



jarzenie butyrolaktonu z cisplatyną powoduje zmniejszenie efektu cytotoksycznego tej ostatniej, podczas gdy skojarzenie butyrolaktonu z taksolem, windezyną i etopozydem nie wywołuje żadnych efektów. Za pomocą chromatografii cienkowarstwowej zaobserwowano, iż butyrolakton wiąże się z cisplatyną, co może tłumaczyć osłabienie jej działania [59]. Butyrolakton hamuje proliferację i wywołuje apoptozę dwóch różnych linii raka trzustki ze zmutowanym genem p53 - PANC-1 i AsPC-1. Apoptozie towarzyszy wzrost ekspresji białka Bax, przy spadku ekspresji Bcl-2 [91]. Butyrolakton wywołuje u trzech różnych linii raka prostaty (DU145, PC-3, LNCaP) blok w fazie G2/M. W przypadku linii DU 145 i PC-3 komórki podejmują kolejną rundę replikacji DNA bez przeprowadzenia mitozy, co prowadzi do ich tetraploidyzacji. Tetraploidalne komórki mają albo jedno anormalne jądro, albo dwa oddzielne jądra. Efekt ten był mniejszy, lecz wciąż obserwowalny w przypadku linii LNCaP [88]. Butyrolakton hamuje także cykl komórkowy komórek ludzkiego raka wątroby HuH-7 głównie w fazie G2/M, czemu towarzyszy spadek produkcji albuminy i alfafroteiny przez redukcję ekspresji czynnika transkrypcyjnego HNF-1 [31].

## 5. STAUROSPORYNA I JEJ ANALOGI

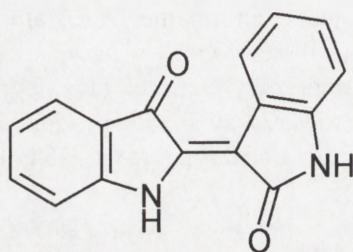
**Staurosporyna** (rys. 6) jest to alkaloid wyizolowany po raz pierwszy z hodowli *Streptomyces* sp. [52, 53]. Jest ona uznana jako potencjalny inhibitor szerokiego wachlarza kinaz, włączając w to zarówno kinazy serynowo-treoninowe, jak i kinazy tyrozynowe, przede wszystkim zaś białkowa kinaza C [21]. Staurosporyna blokuje CDK1 i CDK2, lecz nie działa na CDK4 [53, 72]. Ostatnio wykazano, iż analog staurosporyny – **7-hydroksylostaurosporyna** (UCN-01) ma także aktywność inhibitora CDK [40]. Mimo iż UCN-01 odznacza się mniejszą siłą inhibicji CDK niż staurosporyna, wykazuje w niewielkim stopniu polepszoną selektywność, a poza tym hamuje także CDK4, jak i CDK6 [40]. Brak specyficzności staurosporyny i UCN-01 zawęża ich zastosowanie jako narzędzi do zrozumienia regulacji CDK [52, 53]. Pochodne staurosporyny UCN-01 i CGP41251 znajdują się już w trakcie I fazy badań klinicznych jako potencjalne leki przeciwnowotworowe, jednak wprowadzono je do prób na ludziach głównie ze względu na ich własności blokowania kinazy białkowej C [21].



RYSUNEK 6. Staurosporyna

## 6. INDIRUBINA

Od wielu stuleci tradycyjna chińska medycyna używała w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej zestaw 11 ziół zwany pod nazwą Danggui Longhui Wang. Aktywność antynowotworową przypisano wchodzącemu w skład tej mieszanki indygo naturalnemu [17]. Indygo naturalne jest to niebieski proszek otrzymywany z liści kilku różnych roślin, głównie *Indigofera tinctoria*. W jego skład poza niebieskim izomerem indygo używanym także jako naturalny barwnik, wchodzi **indyrubina** (rys. 7), czyli czerwień indygowa.



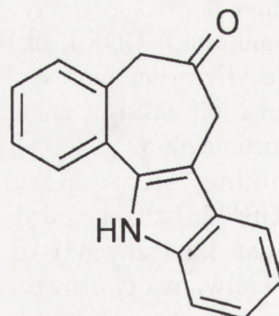
RYSUNEK 7. Indyrubina

Indyrubina w zapobiega syntezie DNA w komórkach nowotworowych [96, 99], co tłumaczono początkowo jej zdolnością do stosunkowo słabego wiązania się z DNA [97]. Pomimo tego indyrubina nie wywołuje supresji szpiku ani innych skutków ubocznych charakterystycznych dla chemioterapeutyków [38]. Stosunkowo niedawno wykazano, iż indyrubina jest selektywnym inhibitorem CDK. Wywołuje ona blok cyklu komórkowego w późnej fazie G1 na przejściu w fazę S i w późnej fazie G2 na przejściu w mitozę. Niektóre analogi indyrubiny, takie jak: 5-chloroindyrubina, 3-monoksym indyrubiny i 5-kwas sulfonowy indyrubiny, wykazują jeszcze większe powinowactwo do CDK. Badania krystalograficzne wykazały, że indyrubina wiąże się z kieszonką wiążącą ATP, podobnie jak inne znane inhibitory CDK [32].

## 7. PAULLONY

Kenpaullon (rys. 8), czyli 9-bromo-7,12-dihydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on jest inhibitorem CDK1 i CDK2, natomiast nie działa na CDK4. Jest on inhibitorem współzawodniczącym o wiązanie z ATP. W hodowli komórek nowotworowych powoduje zahamowanie ich proliferacji [98].

Kenpaullon stanowi dogodny punkt wyjścia dla syntezy pochodnych o zwiększonej aktywności inhibitorów CDK. Najbardziej obiecującym związkiem jest **alsterpaullon**, czyli 9-nitro-7,12-dihydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on, który ma dziesięciokrotnie zwiększone powinowactwo do CDK1 w kompleksie z



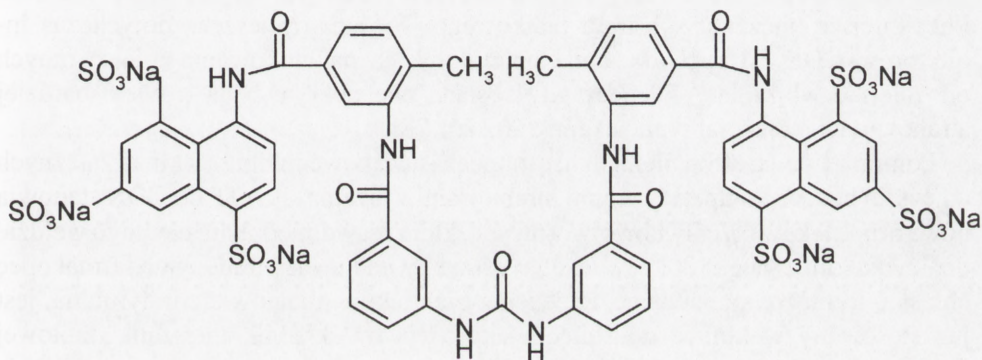
RYSUNEK 8. Kenpaullon



ykliną B (IC<sub>50</sub> 0,035 μM), co ulega odzwierciedleniu w silniejszym zahamowaniu wzrostu komórek nowotworowych *in vitro* [80].

## 8. INNE INHIBITORY

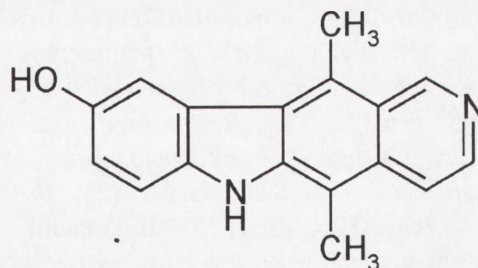
Istnieje duża liczba innych inhibitorów CDK. Zwykle są one nieselektywne i reprezentują związki chemiczne, w których nie zaobserwowano relacji pomiędzy strukturą a aktywnością. W związku z tym nie przedstawiają one większej wartości jako narzędzia badawcze lub specyficzne inhibitory CDK, lecz mogą stanowić wyjście do możliwych, aczkolwiek trudnych dalszych modyfikacji chemicznych w celu syntezy bardziej selektywnych analogów. Związki te to między innymi suramina i 9-hydroksy-elliptycyna [62]. **Suramina** (rys. 9) jest lekiem stosowanym w leczeniu chorób pasożytniczych zarówno robaczyc, jak i zakażeń pierwotniakami. Stosowana bywa także jako czynnik przeciwnowotworowy, gdyż jest inhibitorem topoizomerazy



RYSUNEK 9. Suramina

DNA II [42]. Suramina hamuje CDK1 przy stężeniu niższym, niż to jest potrzebne do uzyskania innych efektów biologicznych tego związku chemicznego [6]. Biorąc pod uwagę fakt, iż struktura tego związku jest dość skomplikowana, jest mało prawdopodobne, że będzie on poddany dalszym badaniom celem rozwoju nowych inhibitorów CDK.

Elliptycyny są znane od dawna jako czynniki przeciwnowotworowe działające jako związki interkalujące DNA [43] oraz inhibitory topoizomerazy II [11]. **9-hydroksyelliptycyna** (rys. 10) wykazuje aktywność inhibitora CDK1.



RYSUNEK 10. 9-elliptycyna

Nie znana jest jej specyficzność względem innych CDK [53]. Ze względu na ich działanie interkalujące DNA jest mało prawdopodobne, iż stanowiąc będą odpowiedni wzór dla inhibitorów CDK.

## 9. PODSUMOWANIE

Wszystkie przedstawione w niniejszej pracy inhibitory CDK są małymi organicznymi cząsteczkami, które są generalnie kompetytywne w odniesieniu do ATP, jeżeli chodzi o wiązanie się w centrum aktywnym CDK, gdzie zajmują kieszonkę ATP. Ponieważ ATP jest kofaktorem i substratem wielu różnych enzymów, stąd wynika duża trudność w osiągnięciu wystarczająco selektywnych i specyficznych inhibitorów CDK działających poprzez blokowanie wiązania ATP, które nie zaburzałyby innych procesów komórkowych. Tymczasem, aktywność CDK jest regulowana na szereg różnych sposobów, a poza kieszonką wiążącą ATP atrakcyjnym miejscem do zaprojektowania specyficznych inhibitorów jest miejsce wiązania cyklin i/lub miejsce wiązania substratu białkowego. Nie znamy jeszcze dotychczas inhibitorów CDK, których działanie opierałoby się na blokowaniu miejsc innych niż miejsce wiązania ATP, lecz gdy zostaną one odkryte będą o wiele bardziej atrakcyjnymi potencjalnymi lekami [20, 26, 28].

Pomimo swoich stron ujemnych, drobnocząsteczkowe inhibitory kinaz zależnych od cyklin będące kompetytywnymi inhibitorami wiązania się ATP do CDK stanowią nową grupę leków przeciwnowotworowych, która prawdopodobnie niedługo wejdzie do użytku klinicznego [20, 28]. Jeżeli weźmiemy pod uwagę tradycyjną farmakopeę chińską, to można powiedzieć, że jeden z tych leków, mianowicie indyrybina, jest już stosowany w klinice od stuleci, jako aktywny składnik mieszanki ziołowej Danggui Longhui Wan [17, 32]. Różne firmy farmaceutyczne intensywnie pracują nad omówionymi tu inhibitorami i ich pochodnymi w nadziei na krociowe zyski związane z ich przyszłą sprzedażą. Najbardziej zaawansowane są prace nad wdrożeniem do praktyki klinicznej w leczeniu nowotworów flawopirydolu przez firmę Hoechst Marrion Roussel.

Poza zastosowaniem jako leki przeciwnowotworowe, flawopirydol i inne inhibitory CDK mogą znaleźć zastosowanie we wszystkich stanach chorobowych zachodzących z udziałem nadmiernej proliferacji komórek, takich jak: restenoza naczyń wieńcowych po zabiegach angioplastyki i wszczepianiu stentów [47], łuszczyca [26, 51], kłębuszkowe zapalenie nerek [70], infekcje pasożytnicze (blokowanie cyklu komórkowego pasożytów, takich jak: zarodziec zimnicy, świdrowiec afrykański czy toksoplazma) [25, 57, 92], infekcje wirusowe (cytomegalia, opryszczka, AIDS) [3, 7, 77] itp. Ponadto mogą one znaleźć zastosowanie w pewnych schorzeniach neurologicznych z chorobą Alzheimerera włącznie, gdyż zachodzić w nich może nadmierna aktywność CDK5. CDK5 choć należy do rodziny CDK i



jest blokowana przez flawopirydol, nie wiąże się z regulacją cyklu komórkowego [26].

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ABRAHAM RT, ACQUARONE M, ANDERSEN A, ASENSI A, BELLE R, BERGER F, BERGOUNIOUX C, BRUNN G, BUQUET-FAGOT C, FAGOT D AND ET AL. Cellular effects of olomoucine, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Biol Cell* 1995; **2-3**: 105-120.
- [2] ARGUELLO F, ALEXANDER M, STERRY JA, TUDOR G, SMITH EM, KALAVAR NT, GREENE JF, JR., KOSS W, MORGAN CD, STINSON SF, SIFORD TJ, ALVORD WG, KLABANSKY RL AND SAUSVILLE EA. Flavopiridol induces apoptosis of normal lymphoid cells, causes immunosuppression, and has potent antitumor activity In vivo against human leukemia and lymphoma xenografts. *Blood* 1998; **7**: 2482-2490.
- [3] BARTZ SR, ROGEL ME AND EMERMAN M. Human immunodeficiency virus type 1 cell cycle control: Vpr is cytostatic and mediates G2 accumulation by a mechanism which differs from DNA damage checkpoint control. *J Virol* 1996; **4**: 2324-2331.
- [4] BIBLE KC AND KAUFMANN SH. Flavopiridol: a cytotoxic flavone that induces cell death in noncycling A549 human lung carcinoma cells. *Cancer Res* 1996; **21**: 4856-4861.
- [5] BIBLE KC AND KAUFMANN SH. Cytotoxic synergy between flavopiridol (NSC 649890, L86-8275) and various antineoplastic agents: the importance of sequence of administration. *Cancer Res* 1997; **16**: 3375-3380.
- [6] BOJANOWSKI K, NISHIO K, FUKUDA M, LARSEN AK AND SAIJO N. Effect of suramin on p34cdc2 kinase *in vitro* and in extracts from human H69 cells: evidence for a double mechanism of action. *Biochem Biophys Res Comm* 1994; **3**: 1574-1580.
- [7] BRESNAHAN WA, BOLDOGH I, CHI P, THOMPSON EA, ALBRECHT T. Inhibition of cellular Cdk2 activity blocks human cytomegalovirus replication. *Virology* 1997; **2**: 239-2347.
- [8] BRUSSELBACH S, NETTELBECK DM, SEDLACEK HH, MULLER R. Cell cycle-independent induction of apoptosis by the anti-tumor drug Flavopiridol in endothelial cells. *Int J Cancer* 1998; **1**: 146-152.
- [9] BUQUET-FAGOT C, LALLEMAND F, MONTAGNE MN, MESTER J. Effects of olomoucine, a selective inhibitor of cyclin-dependent kinases, on cell cycle progression in human cancer cell lines. *Anti-Cancer Drugs* 1997; **6**: 623-631.
- [10] CARLSON BA, DUBAY MM, SAUSVILLE EA, BRIZUELA L, WORLAND PJ. Flavopiridol induces G1 arrest with inhibition of cyclin-dependent kinase (CDK) 2 and CDK4 in human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 1996; **13**: 2973-2978.
- [11] CHARCOSSET JY, BENDIRDJIAN JP, LANTIERI MF, JACQUEMIN-SABLON A. Effects of 9-OH-ellipticine on cell survival, macromolecular syntheses, and cell cycle progression in sensitive and resistant Chinese hamster lung cells. *Cancer Res* 1985; **9**: 4229-4236
- [12] CHIEN M, ASTUMIAN M, LIEBOWITZ D, RINKER-SCHAEFFER C, STADLER WM. *In vitro* evaluation of flavopiridol, a novel cell cycle inhibitor, in bladder cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; **1**: 81-87.
- [13] COURTNEY MJ AND COFFEY ET. The mechanism of Ara-C-induced apoptosis of differentiating cerebellar granule neurons. *Eur J Neurosci* 1999; **3**: 1073-1084.
- [14] CRAIG C, WERSTOR, KIMM, OHRI E, LIZ, KATAYOSE D, LEE SJ, TREPPEL J, COWAN K, SETH P. A recombinant adenovirus expressing p27Kip1 induces cell cycle arrest and loss of cyclin-Cdk activity in human breast cancer cells. *Oncogene* 1997; **19**: 2283-2289.

- [15]DANNENFELSER RM, SURAKITBANHARN Y, TABIBI SE, YALKOWSKY SH. Parenteral formulation of Flavopiridol (NSC-649890). *PDA J Pharm Sci Technol* 1996; **6**: 356–359.
- [16]DE AZEVEDO WF, JR., MUELLER-DIECKMANN HJ, SCHULZE-GAHMEN U, WORLAND PJ, SAUSVILLE E, KIM SH. Structural basis for specificity and potency of a flavonoid inhibitor of human CDK2, a cell cycle kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **7**: 2735–4270.
- [17]DING GS. Important Chinese herbal remedies. *Clin Ther* 1987; **4**: 345–357.
- [18]FAN S, DUBA DE, PM OC. Cellular Effects of Olomoucine in Human Lymphoma Cells Differing in p53 Function. *Chemotherapy* 1999; **6**: 437–445.
- [19]FISHER RP, MORGAN DO. A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* 1994; **4**: 713–724.
- [20]GARRETT MD, FATTAEY A. CDK inhibition and cancer therapy. *Curr Op Gen Dev* 1999; **1**: 104–111.
- [21]GESCHER A. Analogs of staurosporine: potential anticancer drugs? *Gen Pharmacol* 1998; **5**: 721–728.
- [22]GILLETT CE, BARNES DM. Demystified ... cell cycle. *Mol Pathol* 1998; **6**: 310–316.
- [23]GIOVANNI A, WIRTZ-BRUGGER F, KERAMARIS E, SLACK R, PARK DS. Involvement of cell cycle elements, cyclin-dependent kinases, pRb, and E2F x DP, in B-amyloid-induced neuronal death. *J Biol Chem* 1999; **27**: 19011–19016.
- [24]GLAB N, LABIDI B, QIN LX, TREHIN C, BERGOUNIOUX C, MEIJER L. Olomoucine, an inhibitor of the cdc2/cdk2 kinases activity, blocks plant cells at the G1 to S and G2 to M cell cycle transitions. *FEBS Lett* 1994; **2**: 207–211.
- [25]GRAESER R, WERNLI B, FRANKLIN RM, KAPPES B. Plasmodium falciparum protein kinase 5 and the malarial nuclear division cycles. *Mol Biochem Parasitol* 1996; **1**: 37–49.
- [26]GRAY N, DETIVAUD L, DOERIG C, MEIJER L. ATP-site directed inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Curr Med Chem* 1999; **9**: 859–875.
- [27]GRAY NS, WODICKA L, THUNNISSEN AM, NORMAN TC, KWON S, ESPINOZA FH, MORGANDO, BARNES G, LECLERC S, MEIJER L, KIM SH, LOCKHART DJ, SCHULTZ PG. Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors. *Science* 1998; **5376**: 533–538.
- [28]HAJDUCH M, HAVLIEEK L, VESELY J, NOVOTNY R, MIHAL V, STRNAD M. Synthetic cyclin dependent kinase inhibitors. New generation of potent anti-cancer drugs. *Adv Exp Med Biol* 1999: 341–353.
- [29]HAJDUCH M, KOLAR Z, NOVOTNY R, HANUS J, MIHAL V, HLOBILKOVA A, NOSKOVA V, STRNAD M. Induction of apoptosis and regression of spontaneous dog melanoma following *in vivo* application of synthetic cyclin-dependent kinase inhibitor olomoucine. *Anti-Cancer Drugs* 1997; **10**: 1007–1013.
- [30]HALL MC, LI Y, PONG RC, ELY B, SAGALOWSKY AI, HSIEH JT. The growth inhibitory effect of p21 adenovirus on human bladder cancer cells. *J Urol* 2000; **3**: 1033–1038.
- [31]HIDA D, NAKATA K, SHIMA Y, MIGITA K, NAKAO K, KATO Y, ISHII N, EGUCHI K. Suppression of albumin and alpha-fetoprotein gene expression by butyrolactone I, a selective inhibitor of the cdk family, in HuH-7 human hepatoma cells. *Anticancer Res* 1998; **6A**: 4317–4322
- [32]HOESSEL R, LECLERC S, ENDICOTT JA, NOBEL ME, LAWRIE A, TUNNAH P, LEOST M, DAMIENS E, MARIE D, MARKO D, NIEDERBERGER E, TANG W, EISENBRAND G, MEIJER L. Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nat Cell Biol* 1999; **1**: 60–67.
- [33]HOOLJBERG JH, BROXTERMAN HJ, HEIJN M, FLES DL, LANKELMA J, PINEDO HM. Modulation by (iso)flavonoids of the ATPase activity of the multidrug resistance protein. *FEBS Lett* 1997; **2**: 344–348.



- [34]HOOIJBERG JH, BROXTERMAN HJ, SCHEFFER GL, VRASDONK C, HEIJN M, DE JONG MC, SCHEPER RJ, LANKELMA J, PINEDO HM Potent interaction of flavopiridol with MRP1. *Br J Cancer* 1999; **2**: 269–276.
- [35]ISEKI H, KO TC, XUE XY, SEAPAN A, HELLMICH MR, TOWNSEND CM, JR. Cyclin-dependent kinase inhibitors block proliferation of human gastric cancer cells. *Surgery* 1997; **2**: 187–194; discussion 194–195.
- [36]ISEKI H, KO TC, XUE XY, SEAPAN A, TOWNSEND CM, JR. A novel strategy for inhibiting growth of human pancreatic cancer cells by blocking cyclin-dependent kinase activity. *J Gastrointest Surg* 1998; **1**: 36–43.
- [37]JAGER W, ZEMBSCH B, WOLSCHANN P, PITTENAUER E, SENDEROWICZ AM, SAUSVILLE EA, SEDLACEK HH, GRAF J, THALHAMMER T. Metabolism of the anticancer drug flavopiridol, a new inhibitor of cyclin dependent kinases, in rat liver. *Life Sci* 1998; **20**: 1861–1873.
- [38]JI XJ, ZHANG FR, LEI JL, XU YT [Studies on the antineoplastic action and toxicity of synthetic indirubin (author's transl.)]. Yao Hsueh Hsueh Pao 1981; **2**: 146–148.
- [39]KAUR G, STETLER-STEVENSON M, SEBERS S, WORLAND P, SEDLACEK H, MYERS C, CZECH J, NAIK R, SAUSVILLE E. Growth inhibition with reversible cell cycle arrest of carcinoma cells by flavone L86-8275. *J Natl Cancer Inst* 1992; **22**: 1736–1740.
- [40]KAWAKAMI K, FUTAMI H, TAKAHARA J, YAMAGUCHI K. UCN-01, 7-hydroxyl-stauroporine, inhibits kinase activity of cyclin-dependent kinases and reduces the phosphorylation of the retinoblastoma susceptibility gene product in A549 human lung cancer cell line. *Biochem Biophys Res Comm* 1996; **3**: 778–783.
- [41]KITAGAWA M, OKABE T, OGINO H, MATSUMOTO H, SUZUKI-TAKAHASHI I, KOKUBO T, HIGASHI H, SAITOH S, TAYA Y, YASUDA H, ET AL. Butyrolactone I, a selective inhibitor of cdk2 and cdc2 kinase. *Oncogene* 1993; **9**: 2425–2432.
- [42]LARSEN AK Suramin: an anticancer drug with unique biological effects. *Canc Chemother Pharmacol* 1993; **2**: 96–98.
- [43]LE PECQ JB, NGUYEN DAT X, GOSSE C, PAOLETTI C. A new antitumoral agent: 9-hydroxyellipticine. Possibility of a rational design of anticancerous drugs in the series of DNA intercalating drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; **12**: 5078–5082.
- [44]LEE HR, CHANG TH, TEBALT MJ, 3RD, SENDEROWICZ AM, SZABO E. Induction of differentiation accompanies inhibition of Cdk2 in a non-small cell lung cancer cell line. *Int J Oncol* 1999; **1**: 161–166.
- [45]LEE KY, QI Z, YU YP, WANG JH. Neuronal Cdc2-like kinases: neuron-specific forms of Cdk5. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; **7**: 951–958.
- [46]LEGRAVEREND M, LUDWIG O, BISAGNI E, LECLERC S, MEIJER L. Synthesis of C2 alkynylated purines, a new family of potent inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Bioorg Med Chem Lett* 1998; **7**: 793–198.
- [47]LI JM, BROOKS G. Cell cycle regulatory molecules (cyclins, cyclin-dependent kinases and cyclin-dependent kinase inhibitors) and the cardiovascular system; potential targets for therapy? *Eur Heart J* 1999; **6**: 406–420.
- [48]LI P, TABIBI SE, YALKOWSKY SH. Solubilization of flavopiridol by pH control combined with cosolvents, surfactants, or complexants. *J Pharm Sci* 1999; **9**: 945–947.
- [49]LI P, TABIBI SE, YALKOWSKY SH. Solubilization of ionized and un-ionized flavopiridol by ethanol and polysorbate 20. *J Pharm Sci* 1999; **5**: 507–509.
- [50]LOSIEWICZ MD, CARLSON BA, KAUR G, SAUSVILLE EA, WORLAND PJ. Potent inhibition of CDC2 kinase activity by the flavonoid L86-8275. *Biochem Biophys Res Comm* 1994; **2**: 589–595.
- [51]MATE JL, ARIZA A, ROCA X, LOPEZ D, FERRANDIZ C, PEREZ-PITEIRA J, NAVAS-PALACIOS JJ. Expression patterns of cyclins D1 and E in condyloma acuminatum in comparison with psoriatic proliferative lesions. *J Pathol* 1998; **1**: 83–88.

- [52]MEIJER L .Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Prog Cell Cycle Res* 1995; 351–363.
- [53]MEIJER L. Chemical inhibitors of the cyclin-dependent kinases. *Trends Cell Biol* 1996; 393–397.
- [54]MEIJER L, BORGNE A, MULNER O, CHONG JP, BLOW JJ, INAGAKI N, INAGAKI M, DELCROS JG, MOULINOX JP. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem* 1997; 1-2: 527–536.
- [55]MELILLO G, SAUSVILLE EA, CLOUD K, LAHUSEN T, VARESIO L, SENDEROWICZ AM. Flavopiridol, a protein kinase inhibitor, down-regulates hypoxic induction of vascular endothelial growth factor expression in human monocytes. *Cancer Res* 1999; 21: 5433–5437.
- [56]MGBONYEBI OP, RUSSO J, RUSSO IH. Roscovitine induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Res* 1999; 8: 1903–1910.
- [57]MOTTRAM JC, SMITH G. A family of trypanosome cdc2-related protein kinases. *Gene* 1995; 1: 147–152.
- [58]MOTWANI M, DELOHERY TM, SCHWARTZ GK. Sequential dependent enhancement of caspase activation and apoptosis by flavopiridol on paclitaxel-treated human gastric and breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 1999; 7: 1876–1883.
- [59]NISHIO K, ISHIDA T, ARIOKA H, KUROKAWA H, FUKUOKA K, NOMOTO T, FUKU-MOTO H, YOKOTE H, SAIJO N. Antitumor effects of butyrolactone I, a selective cdc2 kinase inhibitor, on human lung cancer cell lines. *Anticancer Res* 1996; 6B: 3387–3395.
- [60]NISHIO K, ISHIDA T, ARIOKA H, KUROKAWA H, FUKUOKA K, NOMOTO T, FUKU-MOTO H, YOKOTE H, SAIJO N. Antitumor effects of butyrolactone I, a selective cdc2 kinase inhibitor, on human lung cancer cell lines. *Eur J Biochem* 1997; 1-2: 527–536.
- [61]OGAWARA H, AKIYAMA T, WATANABE S, ITO N, KOBORI M, SEODA Y. Inhibition of tyrosine protein kinase activity by synthetic isoflavones and flavones. *J Antibiot* 1989; 2: 340–343.
- [62]OHASHI M, SUGIKAWA E, NAKANISHI N. Inhibition of p53 protein phosphorylation by 9-hydroxyellipticine: a possible anticancer mechanism. *Jpn J Cancer Res* 1995; 9: 819–827.
- [63]JOHI R, GOULD KL. Regulating the onset of mitosis. *Curr Op Cell Biol* 1999; 2: 267–273.
- [64]PADMANABHAN J, PARK DS, GREENE LA, SHELANSKI ML. Role of cell cycle regulatory proteins in cerebellar granule neuron apoptosis. *J Neurosci* 1999; 20: 8747–8756.
- [65]PAPAZISIS KT, GEROMICHALOS GD, KOURETAS D, DIMITRIADIS KA, KORTSARIS AH. CDK-inhibitor olomoucine inhibits cell death after exposure of cell lines to cytosine-arabinoside. *Cancer Lett* 1999; 1-2: 221–226.
- [66]PARK DS, FARINELLI SE, GREENE LA. Inhibitors of cyclin-dependent kinases promote survival of post-mitotic neuronally differentiated PC12 cells and sympathetic neurons. *J Biol Chem* 1996; 14: 8161–8169.
- [67]PARKER BW, KAUR G, NIEVES-NEIRA W, TAIMI M, KOHLHAGEN G, SHIMIZU T, LOSIEWICZ MD, POMMIER Y, SAUSVILLE EA, SENDEROWICZ AM. Early induction of apoptosis in hematopoietic cell lines after exposure to flavopiridol. *Blood* 1998; 2: 458–465.
- [68]PATEL V, SENDEROWICZ AM, PINTO D, JR., IGISHI T, RAFFELD M, QUINTANILLA-MARTINEZ L, ENSLEY JF, SAUSVILLE EA, GUTKIND JS. Flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, suppresses the growth of head and neck squamous cell carcinomas by inducing apoptosis. *J Clin Invest* 1998; 9: 1674–1681.
- [69]PAVLETICH NP. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* 1999; 5: 821–828.
- [70]PIPPIN JW, QU Q, MEIJER L, SHANKLAND SJ. Direct in vivo inhibition of the nuclear cell cycle cascade in experimental mesangial proliferative glomerulonephritis with Roscovitine, a novel cyclin-dependent kinase antagonist. *J Clin Invest* 1997; 10: 2512–2520.



- [71] RATNER N, BLOOM GS, BRADY ST. A role for cyclin-dependent kinase(s) in the modulation of fast anterograde axonal transport: effects defined by olomoucine and the APC tumor suppressor protein. *J Neurosci* 1998; **19**: 7717–7726.
- [72] RIALET V, MEIJER L. A new screening test for antimitotic compounds using the universal M phase-specific protein kinase, p34cdc2/cyclin Bcdc13, affinity-immobilized on p13suc1-coated microtitration plates. *Anticancer Res* 1991; **4**: 1581–1590.
- [73] ROBERTS JM. Evolving ideas about cyclins. *Cell* 1999; **2**: 129–132.
- [74] ROUSSEL MF. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* 1999; **38**: 5311–5317.
- [75] RUEF J, MESHEL AS, HU Z, HORAIST C, BALLINGER CA, THOMPSON LJ, SUBBARAO VD, DUMONT JA, PATTERSON C. Flavopiridol inhibits smooth muscle cell proliferation in vitro and neointimal formation *In vivo* after carotid injury in the rat. *Circulation* 1999; **6**: 659–665.
- [76] SANKRITHI N, ESKIN A. Effects of cyclin-dependent kinase inhibitors on transcription and ocular circadian rhythm of *Aplysia*. *J Neurochem* 1999; **2**: 605–613.
- [77] SCHANG LM, PHILLIPS J, SCHAFFER PA. Requirement for cellular cyclin-dependent kinases in herpes simplex virus replication and transcription. *J Virol* 1998; **7**: 5626–5637.
- [78] SCHNIER JB, KAUR G, KAISER A, STINSON SF, SAUSVILLE EA, GARDNER J, NISHIKI K, BRADBURY EM, SENDEROWICZ AM. Identification of cytosolic aldehyde dehydrogenase 1 from non-small cell lung carcinomas as a flavopiridol-binding protein. *FEBS Lett* 1999; **1-2**: 100–104.
- [79] SCHRUMP DS, MATTHEWS W, CHEN GA, MIXON A, ALTORKI NK. Flavopiridol mediates cell cycle arrest and apoptosis in esophageal cancer cells. *Clin Cancer Res* 1998; **11**: 2885–2890.
- [80] SCHULTZ C, LINK A, LEOST M, ZAHAREVITZ DW, GUSSIO R, SAUSVILLE EA, MEIJER L, KUNICK C. Paullones, a series of cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis, evaluation of CDK1/cyclin B inhibition, and in vitro antitumor activity. *J Med Chem* 1999; **15**: 2909–2919.
- [81] SCHULZE-GAHMEN U, BRANDSEN J, JONES HD, MORGAN DO, MEIJER L, VESELY J, KIM SH. Multiple modes of ligand recognition: crystal structures of cyclin-dependent protein kinase 2 in complex with ATP and two inhibitors, olomoucine and isopentenyladenine. *Proteins* 1995; **4**: 378–391.
- [82] SCHUTTE B, NIELAND L, VAN ENGELAND M, HENFLING ME, MEIJER L, RAMAEKERS FC. The effect of the cyclin-dependent kinase inhibitor olomoucine on cell cycle kinetics. *Exp Cell Res* 1997; **1**: 4–15.
- [83] SENDEROWICZ AM, HEADLEE D, STINSON SF, LUSH RM, KALIL N, VILLALBA L, HILL K, STEINBERG SM, FIGG WD, TOMPKINS A, ARBUCK SG, SAUSVILLE EA. Phase I trial of continuous infusion flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with refractory neoplasms. *J Clin Oncol* 1998; **9**: 2986–2999.
- [84] SGAMBATO A, CITTADINI A, FARAGLIA B, WEINSTEIN IB. Multiple functions of p27(Kip1) and its alterations in tumor cells: a review. *J Cell Physiol* 2000; **1**: 18–27.
- [85] SHAPIRO GI, KOESTNER DA, MATRANGA CB, ROLLINS BJ. Flavopiridol induces cell cycle arrest and p53-independent apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 1999; **10**: 2925–2938.
- [86] SLINGERLAND J, PAGANO M. Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol* 2000; **1**: 10–17.
- [87] SOMEYA A, TANAKA N, OKUYAMA A. Inhibition of cell cycle oscillation of DNA replication by a selective inhibitor of the cdc2 kinase family, butyrolactone I, in *Xenopus* egg extracts. *Biochem Biophys Res Comm* 1994; **2**: 536–545.

- [88]SUZUKI M, HOSAKA Y, MATSUSHIMA H, GOTO T, KITAMURA T, KAWABE K Butyrolactone I induces cyclin B1 and causes G2/M arrest and skipping of mitosis in human prostate cell lines. *Cancer Lett* 1999; **1-2**: 121–130.
- [89] TSAO YP, HUANG SJ, CHANG JL, HSIEH JT, PONG RC, CHEN SL. Adenovirus-mediated p21((WAF1/SDII/CIP1)) gene transfer induces apoptosis of human cervical cancer cell lines. *J Virol* 1999; **6**: 4983–4990.
- [90] VESELY J, HAVLICEK L, STRNAD M, BLOW JJ, DONELLA-DEANA A, PINNA L, LETHAM DS, KATO J, DETIVAUD L, LECLERC S, ET AL. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur J Biochem* 1994; **2**: 771–786.
- [91] WADA M, HOSOTANI R, LEE JU, DOI R, KOSHIBA T, FUJIMOTO K, MIYAMOTO Y, TSUJI S, NAKAJIMA S, OKUYAMA A, IMAMURA M. An exogenous cdk inhibitor, butyrolactone-I, induces apoptosis with increased Bax/Bcl-2 ratio in p53-mutated pancreatic cancer cells. *Anticancer Res* 1998; **4A**: 2559–2566.
- [92] WASTLING JM, KINNAIRD JH. Isolation and characterisation of a genomic clone encoding a cdc2-related kinase of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 1998; **1**: 143–148.
- [93] WORLAND PJ, KAUR G, STETLER-STEVENSON M, SEBERS S, SARTOR O, SAUSVILLE EA Alteration of the phosphorylation state of p34cdc2 kinase by the flavone L86-8275 in breast carcinoma cells. Correlation with decreased H1 kinase activity. *Biochem Pharmacol* 1993; **10**: 1831–1840.
- [94] WÓJCIK C Mechanizmy regulacji cyklu komórkowego. *Post Biol Kom* 1993; 331–352.
- [95] WÓJCIK C Inhibitory kinaz zależnych od cyklin – nowe geny przeciwnowotworowe. *Post Biol Kom* 1994; 243–248.
- [96] WU GY, FANG FD. Studies on the mechanism of indirubin action in the treatment of chronic granulocytic leukemia. II. Effects of indirubin on nucleic acid and protein synthesis in animal transplantable tumor cells and normal proliferating cells *in vitro*. *Chung Kuo I Hsueh Ko Hsueh Yuan Hsueh Pao* 1980; **2**: 83–87.
- [97] WU GY, LIU JZ, FANG FD, ZUO J. Studies on the mechanism of indirubin action in the treatment of chronic granulocytic leukemia. V. Binding between indirubin and DNA and identification of the type of binding. *Sci Sin [B]* 1982; **10**: 1071–1079.
- [98] ZAHAREVITZ DW, GUSSIO R, LEOST M, SENDEROWICZ AM, LAHUSEN T, KUNICK C, MEIJER L, SAUSVILLE EA. Discovery and initial characterization of the paullones, a novel class of small-molecule inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Cancer Res* 1999; **11**: 2566–2569.
- [99] ZHANG L, WU GY, QIU CC, GAO BH. Effect of indirubin on DNA synthesis *in vitro*. *Chung Kuo I Hsueh Ko Hsueh Yuan Hsueh Pao* 1985; **2**: 112–116.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 29.03. 2000 r.

Przyjęto: 20.04. 2000 r.

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

email: cwojcik@ib.amwaw.edu.pl



**GIBERELINY – PERCEPCJA I TRANSDUKCJA SYGNAŁU\*****GIBBERELLINS – SIGNAL PERCEPTION AND TRANSDUCTION**

Stanisław KOWALCZYK, Anna JAKUBOWSKA

Zakład Biochemii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

**Streszczenie:** Komórki aleuronowe izolowane z nasion zbóż oraz uzyskiwane z nich protoplasty są szczególnie użytecznym układem doświadczalnym w badaniach percepcji i transdukcji sygnału giberelinowego. Mimo że dotychczas nie udało się jeszcze zidentyfikować białka receptorowego, to jego lokalizacja na zewnętrznej powierzchni plazmolemy komórek aleuronowych była wielokrotnie potwierdzana. Szlaki transdukcji sygnału giberelinowego funkcjonujące w komórkach aleuronowych obejmują białko G, 1,4,5-trisfosforan inozytolu,  $Ca^{2+}$ , kalmodulinę, cGMP, cytozolowe pH, fosforylację białek oraz białka aktywujące i hamujące transkrypcję genów  $\alpha$ -amylazy. Poznano i zsekwencjonowano fragmenty promotorów genów  $\alpha$ -amylazy oraz zidentyfikowano najważniejsze motywy odpowiedzialne za hormonalną regulację genów. W komórkach aleuronowych jęczmienia udało się zidentyfikować cztery białka regulujące transkrypcję genów  $\alpha$ -amylazy (Myb, HRT, ABF1, ABF2) pełniące funkcję czynników *trans*. Spośród wielu wyselekcjonowanych dotychczas mutantów giberelinowych *Arabidopsis thaliana* cztery (*gai*, *grs/rga*, *spy*, *shi*) zostały już przebadane na poziomie molekularnym. Białka GAI, GRS/RGA i SHI pełnią funkcję negatywnych regulatorów w indukowanym przez giberelinę wzroście wydłużeniowym. Produktem genu *SPY* jest przypuszczalnie transferaza przenosząca resztę *N*-acetyloglukozoaminy na resztę seryny lub treoniny białka ulegającego modyfikacji. (*Postępy Biologii Komórki* 2000; 27: 397–423)

**Słowa kluczowe:** gibereliny, białka wiążące gibereliny, łańcuch transdukcji sygnału giberelinowego, mutanty giberelinowe *Arabidopsis thaliana*

**Summary:** Isolated aleurone cells and protoplasts of cereal grains are particularly useful model system for studying of gibberellin signaling. Up to now, the identity of the receptor protein is unknown, but its activity in cereal aleurone has been localized to the plasma membrane. The gibberellin-signaling pathways identified in aleurone cells involve heterotrimeric G proteins, 1,4,5-inositol triphosphate,  $Ca^{2+}$ , calmodulin, cGMP, cytosolic pH, protein phosphorylation, and transcription factors. The promoters of

\*Praca finansowana w ramach grantu KBN nr 6P04C 056 16 i grantu wewnętrznego Uniwersytetu Mikołaja Kopernika nr 407-B

gibberellin-inducible  $\alpha$ -amylase genes have been sequenced and motifs essential for hormone-stimulated transcription have been determined. Barley transcription regulators (Myb, HRT, ABF) that are important *trans* acting elements of gibberellin-inducible  $\alpha$ -amylase genes were identified. In *Arabidopsis thaliana* four gibberellin-signaling mutants (*gai*, *grs/rga*, *spy*, *shi*) have been selected. The GAI, GRS/RGA and SHI proteins function as negative regulators of gibberellin-induced growth responses. Supposedly, the product of *SPY* gene is *O*-GlcNAc transferase that modifies proteins by glycosylation. (*Advances in Cell Biology* 2000; 27: 397–423)

**Key words:** gibberellin, gibberellin binding proteins, gibberellin signal transduction pathway, gibberellin mutants of *Arabidopsis thaliana*

## WSTĘP

Rodzina związków nazywanych ogólnie giberelinami (GA), licząca obecnie ponad 110 substancji, obejmuje dużą grupę metabolitów pośrednich szlaku biosyntezy bądź degradacji GA oraz zaledwie kilka ( $GA_1$ ,  $GA_3$ ,  $GA_4$ ,  $GA_5$ ,  $GA_7$ ,  $GA_{32}$ ) biologicznie aktywnych fitohormonów [<http://www.plant-hormones.bbsrc.ac.uk/ga-inplants/gibberellin-nomenclature.htm>]. Spośród pięciu klasycznych roślinnych hormonów gibereliny zajmują kluczową pozycję w regulacji wzrostu i rozwoju roślin. W cyklu życiowym rośliny cały ciąg procesów poczynając od kiełkowania nasion i wzrostu wydłużeniowego hipokotyli, poprzez indukcję kwitnienia, rozrost liści, wzrost wydłużeniowy międzywęźli, a kończąc na rozwoju kwiatów i dojrzewaniu owoców regulowany jest przez GA. Od wielu lat główny nurt badań związanych z giberelinami kierowano na identyfikowanie kolejnych związków oraz poznawanie szlaków biosyntezy i mechanizmów regulujących poziom GA w roślinie. W ostatnich latach w piśmiennictwie światowym opublikowano kilka prac przeglądowych podsumowujących osiągnięcia na tym polu [31,32,48,56]. Drugi, niemniej żmudny kierunek poszukiwań koncentruje uwagę na problematyce związanej z percepcją i transdukcją sygnału giberelinowego. Mimo upływu ponad 25 lat od czasu, gdy w ogóle zaczęto się interesować receptorami giberelin i podjęto pierwsze próby izolacji białek wiążących GA, postęp wiedzy w zakresie percepcji i transdukcji sygnału giberelinowego jest dalece niezadowalający. Przez wiele lat większość badań biochemicznych, a z czasem również badań wykorzystujących metody biologii molekularnej ogniskowała uwagę na komórkach warstwy aleuronowej ziarniaków, które stały się niemal modelowym układem w poszukiwaniach białek receptorowych oraz badaniach wewnątrzkomórkowych mechanizmów przekazywania sygnału giberelinowego. Wyniki niektórych z tych badań były już częściowo prezentowane w polskich wydawnictwach i czasopismach monograficznych [57,58], a także czasopismach o zasięgu ogólnoswiatowym [7,39,78]. W ostatnim pięcioleciu zauważalny jest wyraźny wzrost zainteresowania pierwotnymi mechanizmami działania GA. Wydaje się, że wieloletni zastój będzie obecnie szybko przełamywany dzięki coraz śmiel-



szemu sięganiu po techniki genetyki molekularnej oraz zwróceniu uwagi na mutanty, szczególnie mutanty rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) charakteryzujące się zmienionymi odpowiedziami na GA. O wadze i nowatorstwie podejmowanych badań oraz znaczeniu uzyskiwanych wyników może świadczyć liczba prac przeglądowych na ten temat opublikowana w literaturze światowej w ostatnich trzech latach [6,30,42,-63,65,70,82,96,99].

Niniejsza praca jest próbą podsumowania aktualnego stanu wiedzy na temat percepcji i transdukcji sygnału giberelinowego, obejmuje bowiem przegląd wyników badań prowadzonych na komórkach aleuronowych oraz prezentuje najważniejsze osiągnięcia w badaniach mutantów giberelinowych rzodkiewnika. Problematyka związana z przekazywaniem sygnałów w komórkach roślinnych była tematem prac opublikowanych w polskich czasopismach monograficznych [3,58]. Uwagom Czytelników zainteresowanych roślinnymi hormonami polecamy również prace opublikowane w ostatnim czasie w *Postęпах Biologii Komórki* poświęcone zagadnieniom związanym z percepcją i transdukcją sygnału auksynowego, etylenowego, cytokininowego i brasinosteroidowego [52,105].

## BIAŁKA WIĄŻĄCE GIBERELINY A MIEJSCE PERCEPCJI SYGNAŁU

Gibereliny są słabymi kwasami o właściwościach hydrofobowych, których wartość pK mieści się w granicach 4,0–4,2. W formie niezdisocjowanej gibereliny mogą więc penetrować do wnętrza komórki, bowiem plazmolema nie stanowi dla nich poważniejszej bariery ograniczającej dyfuzję. Jednak w środowisku o pH wyższym od wartości pK przenikanie GA przez błonę jest już mocno ograniczone. Wyniki doświadczeń, w których analizowano odpowiedzi giberelinowe w warunkach utrudnionej dyfuzji hormonu przez błonę (wyższe pH środowiska zewnątrzkomórkowego), nie dają jednoznacznych rozstrzygnięć [29,90,92]. Ponadto w tego typu doświadczeniach powinna być uwzględniana możliwość niemal natychmiastowego metabolizmu wnikażącej do komórki GA, w tym także syntezy koniugatów z innymi związkami, co jak wiadomo wiąże się z inaktywacją fitohormonu. Wyniki nielicznych doświadczeń, w których autorzy analizowali kinetykę wnikania GA do komórek, sugerują możliwość transportu GA z udziałem nośników. Obok dyfuzji pozbawionych ładunku cząsteczek GA, przenikanie gibereliny przez błonę jest w pewnym stopniu zależne od gradientu protonowego, a zależność szybkości transportu od stężenia hormonu ma charakter wysyceniowy. Obserwacje te mogłyby wskazywać na obecność w błonie nośników transportujących GA do komórki [68].

Miejsce wiązania gibereliny wydaje się już być ustalone w przypadku komórek warstwy aleuronowej ziarniaków zbóż. W badaniach percepcji i transdukcji sygnału

giberelinowego komórki aleuronowe stały się niemal modelowym układem badawczym. W kielkujących nasionach  $GA_1$  jest syntetyzowana przez zarodek, skąd dyfunduje lub jest transportowana do bielma. Warstwa komórek aleuronowych otaczająca bielmo, nie zawierająca wykrywalnych ilości GA, reaguje na fitohormon wydzielaniem na zewnątrz szeregu enzymów hydrolitycznych koniecznych do uruchomienia zmagazynowanych w bielmie związków zapasowych. Indukcja ekspresji genów kilku hydrolaz (proteinaza cysteinowa, 1-3,1-4- $\beta$  glukanaza, RNaza), a szczególnie genów  $\alpha$ -amylazy w komórkach aleuronowych jęczmienia, pszenicy, owsa i ryżu jest od wielu lat powszechnie badaną odpowiedzią giberelinową [7,39,42,81].

W badaniach lokalizacji białka (białek) receptorowego używano zmodyfikowanego hormonu, w którym do pierścienia D w cząsteczce GA podstawiono w pozycji  $C_{17}$  krótki łańcuch węglowodorowy zakończony grupą hydrosulfidową. Wcześniej już było wiadomo, że znaczenie pierścienia D w wiązaniu hormonu przez receptor jest zdecydowanie mniejsze niż pozostałych trzech pierścieni oraz że zmodyfikowana w ten sposób  $GA_4$  nadal indukuje syntezę  $\alpha$ -amylazy [37]. Zmienioną giberelinę wiązano za pośrednictwem krótkiego łańcucha węglowodorowego do mikrogranulek sefarozy, które uniemożliwiają penetrację hormonu do wnętrza komórki. W protoplastach komórek aleuronowych owsa traktowanych takim koniugatem  $GA_4$  obserwowano wyraźną indukcję ekspresji genu i syntezę  $\alpha$ -amylazy. Zewnątrzkomórkową lokalizację miejsc percepcji GA potwierdzają również wyniki doświadczeń polegających na mikroiniekcji  $GA_3$  do cytozolu protoplastów komórek aleuronowych jęczmienia [23]. Giberelina wstrzyknięta do wnętrza protoplastu nie wywołuje żadnych zmian w syntezie i sekrecji  $\alpha$ -amylazy, które pojawiają się dopiero po podaniu hormonu do środowiska zewnątrzprotoplastowego. O zewnątrzkomórkowej lokalizacji białka receptorowego świadczą również wyniki badań, w których używano przeciwciał antyidiotypowych. W tym celu króliki immunizowano przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciw fragmentowi struktury  $GA_4$ , który gra istotną rolę w indukowaniu odpowiedzi hormonalnej [36]. Otrzymane przeciwciała poliklonalne działają antagonistycznie w stosunku do giberelin rozpoznając białko wiążące fitohormon. Immunoglobuliny jako stosunkowo duże i obdarzone ładunkiem cząsteczki nie wnikają do wnętrza komórki, a zatem miejsce wiązania przeciwciał i GA powinno się znajdować na zewnętrznej powierzchni plazmolemy. Zewnątrzkomórkową lokalizację receptorów mogą również potwierdzać obserwacje wskazujące na brak korelacji między stopniem hydrofobowości giberelin i łatwością przenikania przez błonę a efektami biochemicznymi w postaci wzmożonej syntezy  $\alpha$ -amylazy.  $GA_1$ ,  $GA_4$  i 2,2-dimetylo- $GA_4$  różnią się zdecydowanie hydrofobowością, a mimo to indukują ekspresję  $\alpha$ -amylazy niemal w takim samym stopniu [7,36]. Błonową lokalizację białka receptorowego potwierdzono w próbach wiązania znakowanej gibereliny do białek ekstrahowanych z błony plazmatycznej komórek warstwy aleuronowej nasion owsa [38,60]. Mimo że gibereliny są wiązane przez szereg polipeptydów, to tylko polipeptydy o masie czą-



steczkowej 60–68 kDa i 18 kDa wydają się wiązać hormon specyficznie. Swoistość wiązania wyraża się między innymi w tym, że tylko aktywna giberelina konkuruje o miejsce wiązania z giberelinami GA<sub>4</sub> i GA<sub>1</sub> wyznakowanymi jodem I<sup>125</sup> i zawierającymi grupę azydową. Nie stwierdzono tego rodzaju współzawodnictwa między nieaktywnymi giberelinami GA<sub>8</sub> i GA<sub>34</sub> a wyznakowaną GA<sub>4</sub>. Polipeptydy wiążące GA o podobnej masie cząsteczkowej zidentyfikowano również w błonie plazmatycznej grochu i rzodkiewnika [60].

Już wcześniej, bo od połowy lat siedemdziesiątych podejmowano próby identyfikowania białek wiążących znakowane gibereliny w tkankach tych części roślin, które charakteryzują się szybkim wzrostem elongacyjnym. W kilku laboratoriach prowadzono próby identyfikowania i oczyszczania takich białek z epikotyła grochu i azukii (*Azukia angularis*) [50,67], hipokotyła sałaty [94], ogórka [104], fasoli [66] oraz liści kukurydzy [49]. Wyniki tych badań są na ogół zgodne pod jednym względem, a mianowicie tym że lokalizują białka wiążące GA w cytoplazmie. Tylko sporadycznie obserwowano wiązanie hormonu przez ziarna aleuronowe oraz frakcję wzbogaconą w materiał ścian komórkowych [94]. Mimo że w wielu przypadkach białka wiążące GA charakteryzują się wysokim powinowactwem i specyficznością tylko w stosunku do aktywnych giberelin, to jednak żaden z opublikowanych wyników nie dowodzi receptorowego charakteru badanych białek. Z drugiej jednak strony, wyniki tych poszukiwań kierują uwagę na cytoplazmatyczne białka wiążące GA jako ewentualne białka receptorowe, potwierdzając tym samym sugestie niektórych autorów wskazujących na podobieństwo giberelin do zwierzęcych hormonów sterydowych.

Podsumowując wyniki dotychczasowych poszukiwań należy stwierdzić, iż z wyjątkiem komórek warstwy aleuronowej, wiedza na temat białek receptorowych GA nadal pozostaje niemal całkowicie w sferze przypuszczeń. Co więcej, wiązanie nadziei na poznanie białka receptorowego z ewentualnym wyselekcjonowaniem odpowiednich mutantów wydaje się również nieuzasadnione. Dzisiaj już wiadomo, że gibereliny pełnią kluczową funkcję regulacyjną w rozwoju nasion, a zatem mutacja w białku receptorowym może być letalna już na etapie rozwoju embrionalnego.

## POZNAWANIE SZLAKU TRANSDUKCJI SYGNAŁU GIBERELINOWEGO

Brak znaczących sukcesów w poszukiwaniach receptorów giberelin kieruje uwagę badaczy na potencjalne ogniwa łańcucha transdukcji sygnału. W przypadku komórek aleuronowych, w których białka uczestniczące w percepcji GA położone są na zewnętrznej powierzchni plazmolemy, szczególne zainteresowanie budzi sposób przekazywania sygnału giberelinowego do cytoplazmy. Wyniki uzyskane w ostatnim

czasie pozwalają już z dużym prawdopodobieństwem wiązać ten mechanizm z funkcjonowaniem heterotrimerycznych białek G. W badaniach poświęconych temu problemowi używano czternastoaminokwasowego syntetycznego peptydu Mas7 (analog mastoparanu), który stymuluje wymianę GDP/GTP na podjednostce  $\alpha$  białka G. Efekt działania Mas7 jest podobny do reakcji, która towarzyszy wiązaniu ligandu (hormonu) przez receptory współdziałające z białkiem G. W protoplastach komórek aleuronowych inkubowanych z różnymi stężeniami Mas7 gen  $\alpha$ -amylazy ulega specyficznej ekspresji oraz rośnie sekrecja enzymu do środowiska zewnątrzkomórkowego [47]. Analog GDP (GDP- $\beta$ -S) hamujący wymianę GDP/GTP na podjednostce  $\alpha$  całkowicie zapobiega indukowanej przez GA ekspresji genu  $\alpha$ -amylazy. Analog GTP- $\gamma$ -S aktywujący podjednostkę  $\alpha$  wpływa stymulująco na ekspresję genu. Toksyne krztusca nie hamuje indukowanej przez Mas7 ekspresji genu  $\alpha$ -amylazy, podobnie jak nie jest hamowana indukcja ekspresji genu przez GA<sub>1</sub>. Wyniki tych doświadczeń stoją jednak w konflikcie z wynikami uzyskanymi wcześniej w badaniach nad wpływem mastoparanu na sekrecję  $\alpha$ -amylazy przez komórki warstwy aleuronowej pszenicy [54]. Rozbieżności te można jednak tłumaczyć stosowaniem zbyt wysokiego stężenia mastoparanu (10  $\mu$ M), bowiem podobne stężenie Mas7 również nie stymuluje sekrecji amylazy [47]. W ostatnim czasie sklonowano gen *Dwarf 1* (*D1*) u znanego wcześniej mutantu *dl* ryżu niewrażliwego na gibereliny. Mutant *dl* jest karłowaty, ma szerokie i ciemnozielone liście, zredukowane kwiatostany i krótkie okrągłe nasiona. Okazało się, że gen *D1* koduje podjednostkę  $\alpha$  białka G [2]. Mutacja *dl* polegająca na delecji stosunkowo dużego fragmentu genu (833 par zasad) położonego między intronem a pierwszym egzonom uniemożliwia transkrypcję genu. Wprowadzenie niezmutowanego genu *D1* do mutantu *dl* przywraca u rośliny transgenicznej fenotyp rośliny dzikiej. Fujisawa i wsp. [20] uzyskali transgeniczny ryż zawierający cDNA podjednostki  $\alpha$  w pozycji antysensownej. Rośliny transgeniczne charakteryzujące się śladowymi ilościami bądź całkowitym brakiem mRNA podjednostki  $\alpha$  wykazują fenotyp zbliżony do karłowatego mutantu *dl*. Tak więc efekt plejotropowości związany z genem *D1*, obserwowany w przypadku roślin zmutowanych czy roślin transgenicznych z wyeliminowaną syntezą podjednostki  $\alpha$ , wydaje się jednoznacznie potwierdzać rolę białka G w szlaku transdukcji sygnału giberelinowego związanego z regulacją wzrostu i rozwoju rośliny.

Od ponad dziesięciu lat, w centrum zainteresowania wielu badaczy zajmujących się przekaźnictwem sygnału giberelinowego w komórkach aleuronowych znajdują się jony wapnia. To szczególne zainteresowanie wzbudziły obserwacje dotyczące znaczącego wzrostu stężenia Ca<sup>2+</sup> w cytozolu komórek aleuronowych i protoplastów traktowanych GA. Zmiana stężenia Ca<sup>2+</sup> w cytoplazmie jest reakcją stosunkowo szybką, rozpoczynającą się już po kilku minutach od wprowadzenia GA<sub>3</sub> i osiągającą maksimum po kilkudziesięciu minutach. Podobnych zmian nie obserwuje się w przypadku nieaktywnej gibereliny GA<sub>8</sub>, a także w przypadku mutantu niewrażliwego



na gibereliny [10,22]. Wzrost stężenia jonów wapnia, obserwowany głównie w peryferyjnej warstwie cytoplazmy, jest ściśle zależny od poziomu  $\text{Ca}^{2+}$  w otaczającym środowisku i wydaje się być następstwem otwierania kanałów wapniowych w plazmolemie i wnikania jonów z apoplastu. W ostatnim czasie opublikowano doniesienie, w którym autorzy wskazują także na możliwość lokalnego wzrostu poziomu  $\text{Ca}^{2+}$  w cytoplazmie jako rezultatu wypływu jonów z wewnątrzkomórkowych magazynów (siateczka śródplazmatyczna, wakuola) [14]. Otwieranie kanałów wapniowych w tym przypadku jest indukowane przez 1,4,5-trisfosforan inozytoli, a blokowane przez czerwień rutenową. Aktualne hipotezy sugerują, że gibereliny stymulują zarówno otwieranie kanałów i wnikanie  $\text{Ca}^{2+}$  do wnętrza komórki, jak też aktywację pomp i transport wapnia z cytoplazmy, aczkolwiek wypadkowa tych zmian prowadzi do wzrostu stężenia jonów wapnia w cytoplazmie [11]. Indukowana przez GA ekspresja genów  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaz [14] może potwierdzać powyższą sugestię, chociaż ogólnie problem zmian stężenia jonów wapnia w komórce w następstwie działania GA pozostaje nadal otwarty.

Wzrost poziomu jonów wapnia w cytoplazmie wywołany stresem osmotycznym czy deficytem tlenowym (hipoksja) nie pociąga żadnych zmian w syntezie  $\alpha$ -amylazy [10]. Podobne obserwacje dotyczące zmian poziomu mRNA  $\alpha$ -amylazy pod wpływem GA i  $\text{Ca}^{2+}$  prowadzą do wniosku, że jony wapnia nie wpływają na ekspresję genów  $\alpha$ -amylazy. Oczywiście wzrost stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  może wpływać na syntezę amylaz będących metaloproteinami zawierającymi wapń, a także może mieć wpływ na sekrecję enzymu [17]. Wyniki uzyskane ostatnio przez Gilroya [24] potwierdzają te sugestie, wskazując na rolę  $\text{Ca}^{2+}$  w egzocytocie jako czynnika warunkującego fuzję pęcherzyków sekrecyjnych transportujących  $\alpha$ -amylazę z komórki.

Udział jonów wapnia w przekazywaniu sygnału giberelinowego potwierdzają jednak wyniki badań związanych z kalmoduliną. Poziom mRNA kodującego kalmodulinę w komórkach warstwy aleuronowej jęczmienia jest kontrolowany przez GA i ABA.  $\text{GA}_3$  podawana łącznie z jonami wapnia stymuluje, natomiast ABA hamuje syntezę kalmoduliny [21,86]. Związki działające antagonistycznie w stosunku do kalmoduliny (W7, W5), dodawane do zawiesiny protoplastów, hamują indukowaną przez GA sekrecję  $\alpha$ -amylazy. Z drugiej jednak strony, mikroiniekcyjne wprowadzanie kalmoduliny do komórek aleuronowych jęczmienia, bez i z różnymi ilościami jonów wapnia, nie wywołuje typowych odpowiedzi giberelinowych [24]. Zmiany konformacyjne kalmoduliny towarzyszące wiązaniu  $\text{Ca}^{2+}$  prowadzą do wzrostu jej powinowactwa do enzymów efektorowych. W ten sposób zmiany stężenia jonów wapnia mogą wpływać na aktywność enzymów bądź białek nośnikowych. W komórkach aleuronowych obserwowano modulujący wpływ  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmoduliny na aktywność kanałów jonowych w wakuolach magazynujących białka [5]. Ponadto wydaje się, że enzymem efektorowym może być również  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaza zlokalizowana w błonach siateczki śródplazmatycznej [14,35] i tonoplaście komórek aleuronowych owsa [9], a także nowo poznany transporter jonów z plazmolemy [87].

W ostatnich latach zwrócono też uwagę na kinazy białkowe aktywowane przez jony wapnia jako potencjalne ogniwa łańcucha transdukcji sygnału giberelinowego. Sugestie odnośnie funkcjonowania kinaz białkowych w przekazywaniu sygnału GA opierają się na wynikach doświadczeń polegających na wprowadzaniu do protoplastów jęczmienia metodą mikroiniekcji syntetycznego peptydu (syntide-2) fosforylowanego przez kinazę białkową zależną od  $\text{Ca}^{+2}$  i kalmoduliny [77]. Syntetyczny substrat nie wpływa na zmiany stężenia jonów wapnia w cytoplazmie, natomiast hamuje inne typowe odpowiedzi giberelinowe, w tym ekspresję genu  $\alpha$ -amylazy i sekrecję enzymu. Obserwowane zmiany autorzy interpretują jako efekt współzawodnictwa syntetycznego substratu z niezidentyfikowanym jeszcze naturalnym substratem, którego fosforylacja wiąże się z przekazywaniem sygnału do jądra. Syntetyczny substrat jest fosforylowany *in vitro* przez kinazę białkową zależną od jonów wapnia zawartą w ekstrakcie komórek aleuronowych. Kalmodulina nie ma wpływu na fosforylację, natomiast hamuje ją związek W7 działający antagoniście w stosunku do kalmoduliny. Ostatecznie udało się zidentyfikować enzym mający przypuszczalnie domenę kalmodulinopodobną, który może być odpowiedzialny za fosforylowanie syntetycznego substratu. Kilka lat wcześniej w nasionach ryżu zidentyfikowano kinazę białkową zależną od jonów wapnia, której synteza jest silnie aktywowana przez GA [1]. Również aktywność tej kinazy nie zmienia się pod wpływem kalmoduliny, natomiast jest hamowana przez związki działające antagonistycznie w stosunku do kalmoduliny. Udział kinaz białkowych w przekazywaniu sygnału GA mogą również potwierdzać wyniki doświadczeń, w których analizowano ekspresję genu *Amy3* w komórkach ryżu hodowanych *in vitro* traktowanych kwasem okadejowym (inhibitor fosfataz białkowych klasy PP1 i PP2A) [61]. Autorzy stwierdzili, że kwas okadejowy (OA) w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  indukuje ekspresję genu *Amy3* bez udziału GA. Wyniki tych doświadczeń są jednak sprzeczne z obserwacjami uzyskanymi w badaniach dotyczących wpływu OA i innych inhibitorów fosfataz białkowych na pojawianie się typowych reakcji indukowanych przez GA. Okazało się, że kwas okadejowy całkowicie zapobiega wzrostowi stężenia jonów wapnia w cytoplazmie komórek aleuronowych owsa, akumulacji mRNA  $\alpha$ -amylazy oraz syntezie enzymu [54]. Podobne efekty obserwowano również w przypadku innych inhibitorów fosfataz białkowych w badaniach prowadzonych na nasionach ryżu [13]. Obserwowana wcześniej indukcja ekspresji genu *Amy3* przez OA może wynikać z różnic między komórkami aleuronowymi a komórkami pochodzącymi przypuszczalnie z organów wegetatywnych (autorzy nie podają) [61], w których gibereliny nie indukują syntezy amylazy. Zakładając, że fosfatazy białkowe hamowane przez kwas okadejowy hydrolizują wiązanie fosfoserynowe i fosfotreoninowe, należałoby przyjąć, że aktywacja serynowo/treoninowej kinazy białkowej funkcjonującej w szlaku przekazywania sygnału powinna prowadzić do represji genów  $\alpha$ -amylazy. Derepresja (aktywacja) genów wiązała by się zatem z defosforylacją któregoś z elementów szlaku przekazywania sygnału.



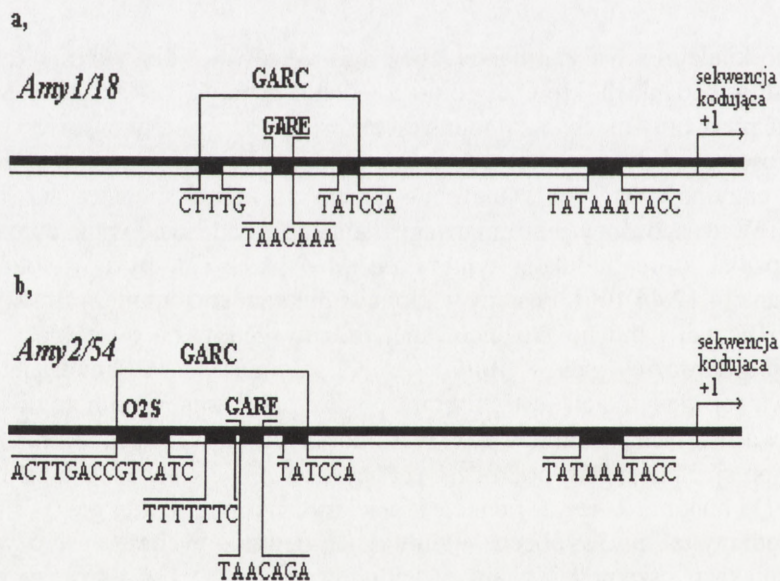
W kontekście prowadzonych obecnie poszukiwań warto również odnotować wyniki wskazujące na związek przekazywania sygnału giberelinowego ze zmianami pH wewnątrz komórki bądź zmianami poziomu cyklicznych nukleotydów. W przeprowadzonych doświadczeniach zaobserwowano, iż w protoplastach traktowanych GA środowisko wewnątrzkomórkowe i wewnątrz wakuoli ulega wyraźnemu zakwaszeniu [34,97]. GA powoduje także około trzykrotny wzrost poziomu cGMP w komórkach aleuronowych jęczmienia i protoplastach uzyskiwanych z tych komórek. Inhibitor cyklazy guanylanowej (LY 83583) zapobiega zmianom stężenia cGMP oraz hamuje indukowaną przez GA syntezę i sekrecję  $\alpha$ -amylazy. Dibutyrylo-cGMP (penetrujący błonę analog cGMP) przywraca sekrecję amylazy w warunkach gdy jest hamowana aktywność cyklazy guanylanowej, chociaż samodzielnie (bez gibereliny) nie indukuje syntezę  $\alpha$ -amylazy [75].

## SEKWENCJE PROMOTOROWE I BIAŁKA REGULUJĄCE EKSPRESJĘ GENÓW INDUKOWANYCH PRZEZ GIBERELINY

Komórki aleuronowe ziarniaków zbóż stały się również dogodnym układem modelowym w badaniach, które za pomocą technik genetyki molekularnej starają się wyjaśnić pierwotny mechanizm regulacji ekspresji genów indukowanych przez GA. Możliwościami podejmowania tego rodzaju badań sprzyja stosunkowo dobra znajomość enzymów, których synteza i sekrecja do bielma indukowana jest przez hormon. W ten sposób w centrum uwagi znalazła się badana od wielu lat  $\alpha$ -amylaza, w przypadku której indukcja syntezy *de novo* przez GA była wielokrotnie potwierdzana [4,12,44,106]. Postępy w klonowaniu genów  $\alpha$ -amylazy umożliwiły podział tej licznej i mocno zróżnicowanej rodziny genów na dwie klasy. Klasa A obejmuje podrodziny genów *Amy1* i *Amy2*, natomiast klasa B podrodzinę *Amy3*. Podstawą tej klasyfikacji jest struktura genów oraz stopień homologii sekwencji aminokwasowej ich produktów [40]. W komórkach aleuronowych jęczmienia i pszenicy ekspresji ulegają geny podrodzin  $\alpha$ -*Amy1* i  $\alpha$ -*Amy2* kodujące białka o wysokim ( $\alpha$ -*Amy1*) i niskim ( $\alpha$ -*Amy2*) punkcie izoelektrycznym. Produkty genów należących do podrodziny  $\alpha$ -*Amy3* są obecne w komórkach aleuronowych ryżu i w rozwijających się ziarniakach pszenicy. Zmiany w indukowanej przez GA ekspresji genów  $\alpha$ -amylazy są łatwe w analizie, bowiem poziom mRNA enzymu w komórkach jęczmienia i owsa traktowanych hormonem rośnie prawie 50-krotnie [12,44]. Ekspresja  $\alpha$ -*Amy* nie jest natychmiastowa i rośnie dopiero po kilku godzinach. Pojawianie się mRNA kodującego enzym hamowane jest przez cykloheksimid i aminoetylo-L-cysteinę (analog aminokwasu), co sugeruje, że indukcja transkrypcji genów  $\alpha$ -amylazy zależy od syntezy pewnych białek. Sugestię powyższą potwierdza również

brak hamowania transkrypcji w warunkach, gdy cykloheksimid jest wprowadzany po 2–4 godzinach od podania gibereliny.

Analiza sekwencji promotorowych genów indukowanych przez GA w komórkach jęczmienia [25,59,91], pszenicy [41,83,100] i ryżu [43,98] wykazała obecność trzech specyficznych motywów tworzących kompleks odpowiedzi giberelinowej GARC (*GA-responsive complex*) [25] (rys. 1). Fragment GARC obejmujący kasetę pirymidynową (CTTTTG), kasetę TAACAAA i kasetę TATCCA jest wystarczający do hormonalnej regulacji transkrypcji genów  $\alpha$ -Amy1 wyrażającej się silną indukcją ekspresji przez GA i represją przez ABA [43]. Fragment obejmujący 21 zasad, w obrębie którego położona jest sekwencja TAACAAA określaną jest jako GARE (*GA-responsive element*) [91] (rys. 1). W przypadku genów  $\alpha$ -Amy2, kodujących  $\alpha$ -amylazę o niskich wartościach pI, pojedyncza kopia GARE warunkuje transkrypcję genów tylko w obecności innego krótkiego fragmentu nazywanego O2S (*opaque-2 similar*) (rys. 1) [55,80]. Kasetka O2S jest jednym z dwóch lub kilku fragmentów tworzących tzw. elementy sprzęgające CE (*coupling element*), które grają istotną rolę w modyfikowaniu ekspresji genów indukowanych przez GA [59,80].

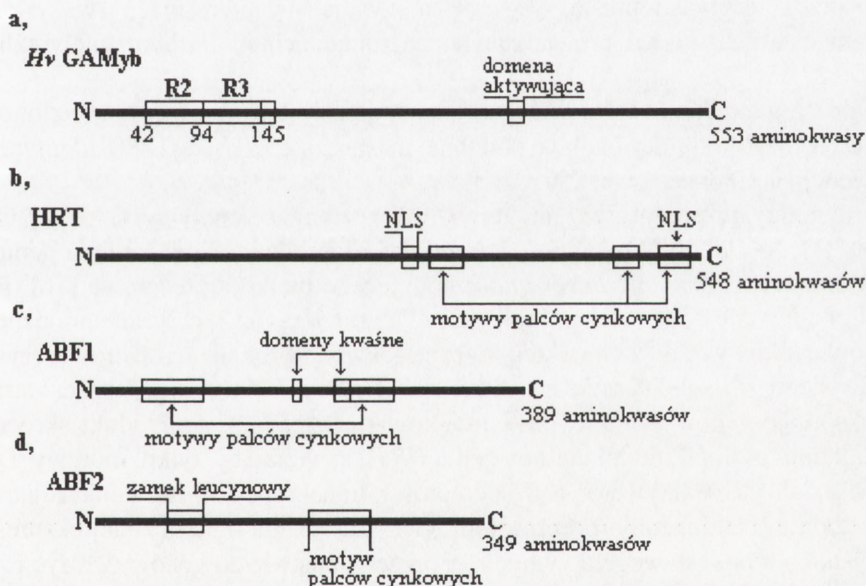


RYSUNEK 1. Sekwencje regulatorowe w promotorach genów *Amy1/18* i *Amy2/54* kodujących  $\alpha$ -amylazę w komórkach aleuronowych pszenicy: a – kompleks odpowiedzi giberelinowej (GARC) genu *Amy1/18* obejmuje trzy charakterystyczne motywy z kasetami: pirymidynową, kasetą GARE (element odpowiedzi giberelinowej) i kasetą TATCCA; b – kompleks odpowiedzi giberelinowej genu *Amy2/54* zawiera podobne motywy z trzema charakterystycznymi kasetami oraz dodatkowy motyw O2S pełniący funkcję elementu sprzęgającego; na schematach zaznaczono również położenie kasety TATAAAT wiążącej TBP (na podstawie danych [25,41,55,59,80,100])



Poznanie sekwencji promotorowych genów  $\alpha$ -amylazy ułatwiło poszukiwanie białek regulatorowych wiążących się z kompleksem odpowiedzi giberelinowej (GARC). Już w pierwszych doświadczeniach udało się wyizolować z ekstraktu jądrowego komórek aleuronowych dwa niezidentyfikowane białka wiążące się specyficznym z fragmentami zawierającymi sekwencje odpowiadające kasetom GARE i TATCCAT [95]. W późniejszych badaniach zwrócono jednak uwagę na podobieństwo sekwencji GARE z sekwencją wiążącą czynniki transkrypcyjne z rodziny Myb. U *A. thaliana* poznano dotychczas około stu sekwencji genów *MYB*, których produkty pełnią funkcje regulacyjne w transkrypcji dużej grupy genów ważnych z punktu widzenia procesów wzrostowych. Niektóre roślinne białka Myb uczestniczą w kontrolowaniu wtórnego metabolizmu, inne w procesach morfogenezy komórki, a jeszcze inne w reakcjach obronnych indukowanych przez czynniki patogenne i stres [62,64].

Mając na uwadze wspomniane już wyżej podobieństwo sekwencji GARE z sekwencją wiążącą czynniki transkrypcyjne z rodziny Myb podjęto próby sklonowania



RYSUNEK 2. Białka regulujące transkrypcję genów  $\alpha$ -amylazy: a – schemat białka *Hv*GAMyb z komórek aleuronowych jęczmienia z zaznaczonym położeniem charakterystycznych fragmentów R2 i R3 tworzących domenę wiążącą DNA, na schemacie pokazano także położenie domeny aktywującej transkrypcję; b – schemat białka HRT z komórek aleuronowych jęczmienia z zaznaczonymi trzema motywami palców cynkowych oraz dwoma motywami zawierającymi sekwencję lokalizacji jądrowej (NLS); c – schemat białka ABF1 z nasion owsa z zaznaczonym położeniem dwóch motywów palców cynkowych i dwóch motywów zawierających aminokwasu kwaśne; d – schemat białka ABF2 z nasion owsa zawiera pojedynczy motyw palców cynkowych oraz motyw zamka leucynowego (na podstawie danych [26,76,84,102])

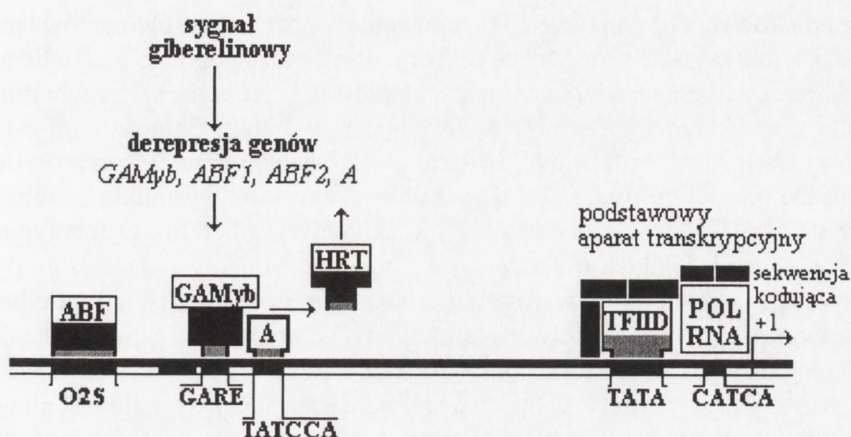
genów kodujących podobne białka w komórkach aleuronowych. Do przeszukiwania biblioteki cDNA z komórek aleuronowych jęczmienia używano konserwowanego fragmentu genu *C1 myb* kukurydzy [26]. Zidentyfikowany i sklonowany gen *HvGA-Myb* koduje białko o masie cząsteczkowej 60 kDa zawierające wszystkie charakterystyczne elementy czynników aktywujących transkrypcję z rodziny Myb. Wspólną cechą wszystkich białek Myb jest obecność charakterystycznej domeny wiążącej DNA (DBD) wykazującej specyficzność względem określonej sekwencji zasad. W roślinnych białkach Myb domenę wiążącą DNA tworzą dwa fragmenty (R2 i R3), z których każdy utworzony jest z około 50 reszt aminokwasowych (rys. 2a). W obrębie każdego fragmentu zawarte są 3 motywy tworzące helisy, z których po dwie z każdego fragmentu uczestniczą w rozpoznawaniu sekwencji nukleotydowej DNA [62]. Produkt genu *HvGAMyb* wiąże się do kasety GARE, a w warunkach jego nadekspresji aktywuje promotor genu  $\alpha$ -*Amy1* bez udziału GA [26]. Mutacja w obrębie kasety GARE utrudnia bądź w ogóle uniemożliwia wiązanie *GAMyb*. Indukowanej przez GA ekspresji genu *HvGAMyb* nie hamuje cykloheksimid, co sugeruje, że sygnał giberelinowy indukuje ekspresję genu *HvGA-Myb* przez jego derepresję. Sugestia ta wydaje się interesująca zważywszy na wyniki ostatnich badań prowadzonych na mutantach *A. thaliana* niewrażliwych na GA.

Oprócz genu *HvGAMyb*, w komórkach warstwy aleuronowej ryżu sklonowano gen *OsGAMyb* kodujący białko o podobnej masie cząsteczkowej i 88% identyczności sekwencji aminokwasowej [27].

Fragmenty promotorów genu *Amy1/6-4* zawierające motywy GARE i GARC posłużyły do zidentyfikowania w komórkach aleuronowych jęczmienia genu *HRT* (*Hordeum repressor of transcription*) kodującego białko represorowe [76]. Białko *HRT* zbudowane z 548 reszt aminokwasowych zawiera trzy nieco zmienione motywy palców cynkowych oraz charakterystyczną sekwencję lokalizacji jądrowej (rys. 2b). *HRT* wiąże się selektywnie z sekwencją GARE i GARC wpływając hamująco na ekspresję genów *Amy1* i *Amy2* indukowanych przez GA. Produkt skróconego technikami biologii molekularnej genu *HRT*, zawierający tylko motywy DBD i NLS, działa jako aktywator bądź derepresor transkrypcji *Amy1* konkurując przypuszczalnie z endogennym represorem. Gen *HRT* ulega ograniczonej ekspresji we wszystkich tkankach roślinnych, w przeciwieństwie do genów *GAMyb* i *Amy1*, których mRNA nie jest wykrywane w tych tkankach. Obserwacje powyższe prowadzą do wniosku, że *HRT* może być represorem dla większej liczby genów, których sekwencje promotorowe zawierają motyw zbliżony do GARE.

Przed kilku laty sklonowano geny *ABF1* i *ABF2* kodujące białka, które zawierają pojedynczy lub podwójny motyw palców cynkowych, i tworzące nową rodzinę białek wiążących DNA (rys. 2c i 2d) [84]. Białka *ABF1* i *ABF2* komórek aleuronowych owsa wiążą się do motywu O2S (sekwencja sprzęgająca) obecnego w promotorze genów *Amy2*. *ABF1* i *ABF2* należą do rodziny białek WRKY poznanych





RYSUNEK 3. Proponowany mechanizm aktywacji genu  $\alpha$ -Amy2 indukowanej przez giberelinę. Sygnał giberelinowy prowadzi do derepresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne GAMyB, ABF1 i ABF2 oraz niezidentyfikowane białko A; białka aktywujące transkrypcję wiążą się z kasetami GARE, O2S i kasetą TATCCA; GAMyB konkuruje z białkiem represorowym HRT o sekwencję położoną w obrębie motywu zawierającego kasetę GARE; na schemacie zaznaczono położenie kasyety TATA oraz sekwencję CATCA w motywie inicjującym transkrypcję (na podstawie danych [26,76,84,102])

wcześniej w badaniach związanych z regulacją ekspresji genów indukowanych przez czynniki patogene.

Ostatnie badania potwierdzają funkcjonowanie co najmniej trzech różnych białek regulujących ekspresję genów  $\alpha$ -Amy2 owsa [102]. Niezidentyfikowane jeszcze białko (białko A na rys. 3) wiąże się z motywem zawierającym sekwencję TATCCA, GAMyB z kasetą GARE, a homo- lub heterodimer białek ABF z sekwencją motywu O2S (rys. 3). Uwzględniając dotychczasowe wyniki można założyć, że sygnał giberelinowy powoduje derepresję genów kodujących białka aktywujące transkrypcję (GAMyB, ABF, A), które wypierając białko represorowe HRT z GARE aktywują transkrypcję genów  $\alpha$ -amylazy.

## MUTANTY GIBERELINOWE RZODKIEWNIKA W BADANIACH TRANSDUKCJI SYGNAŁU

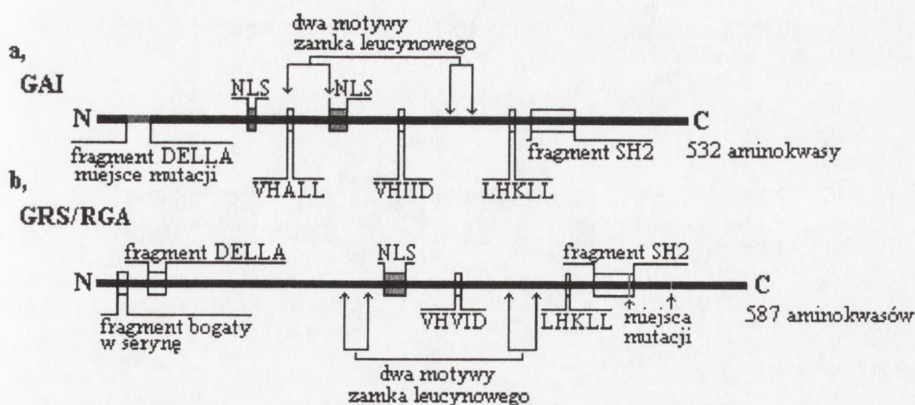
Próby wyselekcjonowania mutantów giberelinowych, które miałyby zmienione białko receptorowe bądź któryś z elementów szlaku transdukcji sygnału są w większości przypadków skazane na niepowodzenie. Przyczyna tych niepowodzeń leży głównie w sposobie identyfikowania mutantów, który jest zwykle oparty na analizie łatwo zauważalnych zmian morfologicznych, a więc zmian regulowanych przez zespół różnorodnych sygnałów. Mimo tych ograniczeń, niektóre z wyselekcjonowa-

nych mutantów *A. thaliana* okazały się przydatne w poznawaniu elementów łańcucha przekazywania sygnału GA. Mutanty giberelinowe można ogólnie podzielić na trzy grupy. Pierwszą grupę tworzą mutanty „karłowate” fenotypowo przypominające mutanty z defektami w biosyntezie GA, chociaż w odróżnieniu od tych ostatnich mutanty „karłowate” traktowane gibereliną nie osiągają nigdy rozmiarów rośliny dzikiej. Do drugiej grupy należą mutanty określane jako „wysmukłe”, które mimo że nie zawierają podwyższonego poziomu aktywnych giberelin, to fenotypowo są podobne do roślin dzikich traktowanych gibereliną. Mutanty z trzeciej grupy charakteryzują się zmienionym wzrostem i zmienionymi odpowiedziami na giberelinę podawaną zewnętrznie, aczkolwiek fenotypowo odbiegają od roślin wykazujących obniżony lub podwyższony poziom GA. Mimo że ta grupa mutantów jest najliczniejsza, to ich przydatność w badaniach szlaku transdukcji sygnału jest niewielka. Szczegółowy przegląd mutantów giberelinowych zainteresowany Czytelnik znajdzie w pracach przeglądowych [82,96].

Spośród wyselekcjonowanych dotychczas mutantów odpowiedzi giberelinowych, cztery mutanty *A. thaliana* zostały scharakteryzowane na poziomie molekularnym. Są to mutanty: *gai* (*gibberellin insensitive*), *rga* (*repressor of gai-3*) określane również jako *grs* (*gai related sequence*), *spy* (*spindly*) i *sly* (*sleepy*).

Mutant *gai* wyselekcjonowany w połowie lat osiemdziesiątych charakteryzuje się karłowatością i zredukowaną dominacją wierzchołkową, a ponadto ma ciemnozielone liście i znacznie gorzej kiełkujące nasiona. Podobne anomalie występują również u mutantów z defektem w biosyntezie GA, aczkolwiek zmiany te są zwykle korygowane przez zewnętrznie podawaną giberelinę [51]. W 1997 r. sklonowano zmutowany gen *gai* i ustalono rodzaj i miejsce mutacji [71]. Okazało się, że *GAI* koduje białko zbudowane z 532 reszt aminokwasowych, a zmutowany gen z delecją 51 par zasad koduje białko skrócone w części N-końcowej o fragment utworzony z 17 reszt aminokwasowych (rys. 4a). Skróceniu polipeptydu o fragment DELLA (nazwa pochodzi od pierwszych pięciu aminokwasów tego fragmentu) towarzyszą charakterystyczne zmiany fenotypowe wskazujące na brak wrażliwości mutantna na GA. Sekwencja aminokwasowa *GAI* w jego części C-końcowej jest homologiczna z produktami genów *SCR* (*SCARECROW*) *A. thaliana* i *Ls* (*Lateral suppressor*) pomidora tworzących nową rodzinę czynników transkrypcyjnych [18,85]. Szczególnie wyraźna homologia występuje w domenie *VHIID*, której funkcja jak na razie nie została jeszcze poznana. Białko *GAI* zawiera ponadto dwa charakterystyczne motywy *LHKLL* i *VHALL* nawiązujące do motywu *LXXLL* występującego pojedynczo lub w powtórzeniach w zwierzęcych koaktywatorach transkrypcji. Ostatnie badania jednoznacznie potwierdzają udział motywu *LXXLL* w tworzeniu funkcjonalnych kompleksów między białkowymi koaktywatorami transkrypcji a jądrowymi białkami receptorowymi wiążącymi różnego typu ligandy, w tym również hormony sterydowe [33]. *GAI* zawiera ponadto dwie sekwencje lokalizacji jądrowej (*NLS*), kilka motywów leucynowych, a w części C-końcowej fragment nawiązujący

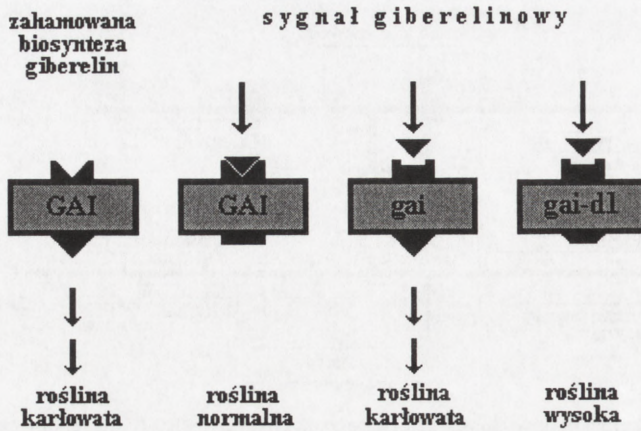




RYSUNEK 4. Schemat budowy białek represorowych GAI i GRS/RGA: a – schemat pokazuje położenie w białku GAI dwóch motywów zawierających lokalizację jądrową (NLS) oraz dwóch motywów z sekwencją zamka leucynowego; na schemacie zaznaczono również położenie charakterystycznej sekwencji VHIID, dwóch sekwencji (LHKLL i VHALL) nawiązujących do motywów charakterystycznych dla zwierzęcych koaktywatorów transkrypcji, fragmentu homologicznego z domeną SH2 oraz fragmentu DELLA; b – charakterystyczne dla białka GAI motywy sekwencji aminokwasowej występują również w białku GRS/RGA; na schemacie zaznaczono ponadto charakterystyczny fragment bogaty w serynę oraz miejsca mutacji położone w części C-końcowej białka (na podstawie danych [71,88])

do motywu SH2. Motyw SH2 (*Src homology*) poznany po raz pierwszy w cytoplazmatycznej kinazie tyrozynowej *Src* utworzony jest zwykle z około 100 reszt aminokwasowych. Występuje on między innymi w cytoplazmatycznych białkach STAT (*signal transducer and activator of transcription*), które po ufosforylowaniu reszty tyrozynowej ulegają dimeryzacji i przemieszczają się do jądra. Za pośrednictwem motywu SH2 polipeptyd wiąże się w sposób sekwencyjnie swoisty do fosfotyrozyny położonej w innym polipeptydzie [15]. Białko GAI jest przypuszczalnie jedynym poznanym dotychczas białkiem roślinnym zawierającym motyw SH2 i dlatego funkcja tego motywu jest jak na razie trudna do przewidzenia.

W wyniku mutagenезы promieniami  $\gamma$  mutantów *gai* uzyskano kilka podwójnych mutantów supresorowych (*gai-d1*, *gai-d2*, *gai-d5*, *gai-d7*) fenotypowo przypominających rośliny dzikie [72]. Okazało się, że podwójne mutanty obok istniejącej mutacji *gai* (brak 51 par zasad) zawierają dodatkową mutację substytucyjną lub delecyjną w innym regionie polipeptydu (zwykle w części C-końcowej) prowadzącą w większości przypadków do skrócenia polipeptydu. Zanik fenotypu charakterystycznego dla *gai* i powrót do fenotypu przypominającego roślinę dziką wiąże się z utratą funkcji podwójnie zmutowanego produktu. Na szczególną uwagę zasługuje podwójna mutacja *gai-t6*, która prowadzi do braku syntezy jakiegokolwiek produktu, a w efekcie do zaniku karłowatości. Wyniki powyższe dowodzą, że GAI funkcjonuje jako represor sygnalizacji giberelinowej (rys. 5). Mutacja w części N-końcowej polipeptydu (delecja fragmentu DELLA) prowadzi do defektu w „od-



RYSUNEK 5. Proponowany model funkcjonowania białka represorowego GAI. Fragment DELLA białka GAI funkcjonuje w odbiorze sygnału giberelinowego; w innym miejscu (przypuszczalnie w części C-końcowej peptydu) położona jest domena represorowa. W warunkach gdy zahamowana jest biosynteza GA, białko GAI domeną represorową hamuje (bezpośrednio lub pośrednio) ekspresję genu *GAMyb*, a także genów ważnych dla procesów wzrostu i rozwoju rośliny. Odbiór sygnału giberelinowego zmienia konformację białka GAI w ten sposób, że część represorowa traci zdolność blokowania transkrypcji umożliwiając ekspresję genów regulowanych przez GA. W przypadku zmutowanego białka *gai* zmieniona została część odbierająca sygnał i dlatego część represorowa blokuje ekspresję genów niezależnie od obecności lub braku GA. Podwójnie zmutowane białko *gai-d1* ma zmienioną zarówno część odbierającą, jak też część represorową, co w efekcie prowadzi do konstytutywnej ekspresji genów regulowanych przez to białko (na podstawie danych [30,71,72, 74,103])

biorze” sygnału giberelinowego lub braku wiązania samej GA. Mutant *gai* jest karłowaty i przypomina mutanty z defektem w biosyntezie GA, a zatem białko GAI funkcjonuje jako represor szlaku regulującego ekspresję genów związanych ze wzrostem elongacyjnym. Derepresja szlaku związana z „odbiosem” sygnału giberelinowego jest przypuszczalnie następstwem zmian konformacyjnych w części represorowej GAI. Brak represji w przypadku podwójnych mutantów *gai-d* wiąże się z mutacją w części represorowej białka (rys. 5). Ponieważ białko GAI nie ma typowej domeny bZIP wiążącej DNA (brak regionu bogatego w aminokwasy zasadowe), jego funkcja represorowa może się wiązać z możliwością tworzenia funkcjonalnych kompleksów z białkami wiążącymi się z DNA.

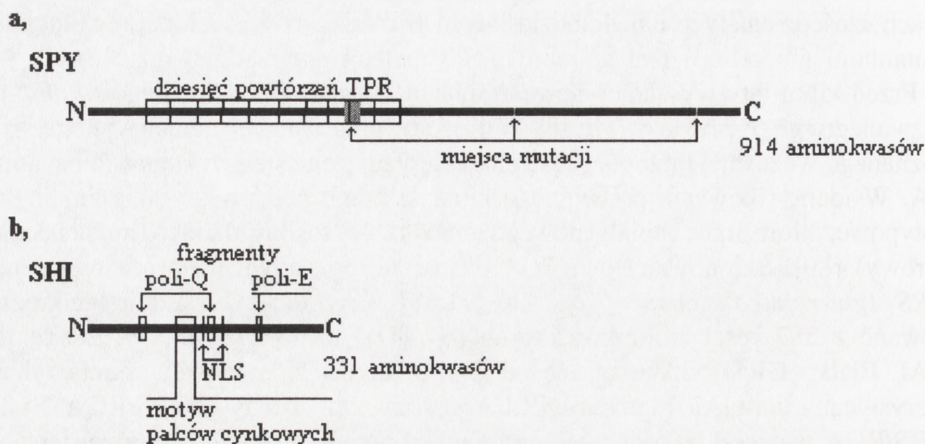
Mutantami fenotypowo podobnymi do *gai* są mutanty *d8* kukurydzy i *rht3* pszenicy [39]. W badaniach prowadzonych na niskopiennych odmianach pszenicy *Rht-B1* i *RhtD1* (*reduced height*) i kukurydzy *d8* wykazano, że karłowatość tych odmian jest związana z mutacją w genie homologicznym z *GAI A. thaliana* (62% identyczność sekwencji aminokwasowej). Wszystkie wymienione mutacje dotyczą regionu konserwowanego w N-końcowej części białka [73]. Tak więc po wielu latach okazało się, że odmiany niskopiennych zbóż wprowadzone do uprawy w



latach sześćdziesiątych i siedemdziesiątych w okresie tzw. „zielonej rewolucji” są mutantami giberelinowymi podobnymi do mutacji *gai* rzodkiewnika.

Przed kilku laty wyselekcjonowano innego mutantu giberelinowego *A. thaliana* nazwanego *rga* (*repressor of gai-3*). W poszukiwaniach nowej mutacji wykorzystano poznanego wcześniej mutantu *gai-3* charakteryzującego się defektem w biosyntezie GA. W identyfikowaniu podwójnego mutantu brano pod uwagę takie zmiany fenotypowe, które upodobniały nowego mutantu do rośliny dzikiej (mutant supresorowy) [89]. Sklonowany gen *RGA* okazał się poznany już wcześniej genem *GRS* (*gai related sequence*) (rys. 4b) [71,88]. Gen *GRS/RGA* koduje białko zbudowane z 587 reszt aminokwasowych (64 kDa) identyczne w 83% z białkiem *GAI*. Białko *GRS/RGA* różni się od *GAI* w części N-końcowej, chociaż charakterystyczny dla *GAI* fragment *DELLA* jest również obecny w *GRS/RGA*. Białko *GRS/RGA* w części N-końcowej ma fragment homopoliserynowy nie występujący w *GAI*. Obydwa białka zawierają krótsze konserwowane fragmenty poliserynowe lub politreoninowe położone w innych miejscach. Miejsca mutacji w białku *RGA* znajdują się w części C-końcowej (rys. 4b). Obecnie przypuszcza się, że białko *GRS/RGA*, podobnie jak *GAI*, jest represorem blokującym transkrypcję genów związanych z regulowanymi przez GA reakcjami wzrostu i rozwoju. Z odmienną sugestią wystąpił ostatnio Truong [101] proponując, że białka *GRS/RGA* oraz *GAI* mogą być aktywatorami transkrypcji regulującymi ekspresję genu (genów) kodującego białko represorowe.

Mutantem *A. thaliana* z grupy „wysmukłych” (*slender*) jest mutant *spy* (*spindly*) wyselekcjonowany na podstawie braku wrażliwości na paklobutrazol. Paklobutrazol jest inhibitorem syntezy giberelin hamującym aktywność monoooksygenazy katalizującej przemianę *ent*-kaurenu do kwasu *ent*-kaurenowego. Nasiona traktowane czynnikiem mutagennym selekcjonowano na podstawie braku hamowania, a więc normalnego kiełkowania nasion na podłożu zawierającym paklobutrazol. Rośliny reagujące odmiennie na inhibitor selekcjonowano następnie pod kątem oporności skiełkowanych siewek na karłowacenie wywoływane roztworem paklobutrazolu podawanym do liści. W ten sposób zidentyfikowano kilka linii mutantów *spy*, które pod względem wielkości i cech morfologicznych przypominają rośliny dzikie mimo zahamowanej syntezy GA [46]. Sklonowany gen *SPY* koduje białko zbudowane z 914 reszt aminokwasowych mające 10 charakterystycznych powtórzeń TPR (*tetratricopeptide repeat*) [45] (rys. 6a). Podobną budowę aminokwasową ma również produkt genu *HvSPY* sklonowanego ostatnio z jęczmienia [79]. Charakterystyczną cechą obu białek jest obecność wspomnianej już domeny TPR. Pojedynczy fragment TPR zawierający zwykle 34 reszty aminokwasowe tworzy parę  $\alpha$ -helis biegnących przeciwnie do siebie. Szereg doniesień potwierdza funkcjonowanie TPR w interakcji białko-białko i to zarówno w przypadku pary białek zawierających TPR, jak też w oddziaływaniach z białkami, które nie mają TPR [8,16]. Mutanty *spy1* i *spy2* kodują białko skrócone o 23 aminokwasowy fragment położony częściowo w ósmym,



RYSUNEK 6. Schemat budowy białek represorowych SPY i SHI: a – białko SPY jest przypuszczalnie transferazą katalizującą przeniesienie reszty *N*-acetylglukozaaminowej z UDP-*N*-acetylglukozaminy na resztę seryny lub treoniny w białku substratowym (ulegającym glikozylacji); potencjalnymi substratami mogącymi ulegać modyfikacji w drodze glikozylacji i deglikozylacji są białka GAI i GRS/RGA; białko SPY ma w części N-końcowej dziesięciokrotnie powtórzony charakterystyczny fragment określany jako TPR; b – w części środkowej białka SHI położony jest fragment zawierający motyw palców cynkowych oraz fragment, w obrębie którego położona jest sekwencja lokalizacji jądrowej (NLS), białko SHI zawiera też dwa fragmenty bogate w glutaminę i jeden fragment bogaty w reszty kwasu glutaminowego (na podstawie danych [19,45,79])

a częściowo w dziewiątym powtórzeniu TPR. Zmiany związane z delecją fragmentu położonego w tym miejscu podkreślają znaczenie TPR w funkcjonowaniu białka. W ostatnim czasie stwierdzono, że białko SPY jest homologiczne z podjednostką p110 transferazy katalizującej przeniesienie reszty *N*-acetylglukozaaminowej z UDP-*N*-acetylglukozaminy na resztę seryny lub treoniny w białku substratowym. Enzym OGT (*O*-GlcNAc transferase) z cytoplazmy wątroby szczura jest przypuszczalnie heterotrimerem zbudowanym z dwóch podjednostek katalitycznych (110 kDa) i jednej nieco mniejszej podjednostki [53]. Białko SPY różni się od zwierzęcej transferazy brakiem sekwencji lokalizacji jądrowej.

Potranslacyjna modyfikacja białek polegająca na utworzeniu wiązania *O*-glikozydowego z *N*-acetylglukozaaminą jest więc jeszcze jednym ze sposobów swoistego wyznaczenia białek. W tym miejscu warto zwrócić uwagę na fakt, że glikozylowaniu ulegają reszty seryny bądź treoniny, a więc reszty tych samych aminokwasów, które są fosforylowane przez kinazy białkowe. Wydaje się więc, że to samo białko może być fosforylowane bądź glikozylowane, co w efekcie będzie się wiązać z pewnymi zmianami jego właściwości. Wyniki dotychczasowych prac sugerują, że tego rodzaju glikozylacja białek gra ważną rolę w tworzeniu i rozpadzie aktywnych kompleksów białkowych funkcjonujących w transkrypcji, transporcie jądrowym i organizacji cytoszkieletu [28].



W przewidywaniach dotyczących roli białka SPY w transdukcji sygnału giberelinowego ważne są obserwacje zmian fenotypowych u podwójnych mutantów *gai gar2* i *gai spy*, u których fenotyp *gai* ulega supresji [74,103]. Gen *gar2* nie został jeszcze sklonowany i dlatego właściwa interpretacja wyników jest jeszcze praktycznie niemożliwa. W przypadku mutantu *gai spy* można zakładać, że mutacja w OGT (białko SPY) i związana z tym utrata aktywności transferazowej oraz brak glikozylacji białka *gai* prowadzi do utraty jego właściwości represyjnych. Białko SPY będąc enzymem glikozylującym GAI, a być może także GRS/RGA, modyfikuje bądź reguluje ich właściwości represorowe. Dzisiaj jeszcze nie wiadomo, czy indukowana przez giberelinę derepresja szlaku wiąże się z hydrolitycznym usunięciem z GAI reszty *N*-acetylglukozaaminowej, czy może ze zmianami konformacyjnymi GAI uniemożliwiającymi jego glikozylację.

W ostatnim czasie sklonowano gen *SHI* (*short internodes*) u karłowatego mutantu *A. thaliana* [19]. Mutant *shi* fenotypowo podobny jest do mutantów z defektem w biosyntezie GA, chociaż egzogennie podawana GA nie przywraca cech rośliny dzikiej. Analiza sekwencji aminokwasowej białka SHI, zbudowanego z 331 reszt aminokwasowych, wskazuje na obecność motywu mogącego tworzyć palce cynkowe (rys. 6b). Białko SHI zawiera ponadto fragment bogaty w glutaminę oraz fragment utworzony przez aminokwasy kwaśne, a więc motywy charakterystyczne dla białek funkcjonujących jako regulatory transkrypcji. Funkcję regulacyjną SHI może również potwierdzać obecność dwóch motywów stanowiących sygnały lokalizacji jądrowej (NLS). Analiza sekwencji nukleotydowej zmutowanego genu *shi* wykazała brak jakichkolwiek zmian w sekwencji kodującej. Miejsce mutacji położone jest w części promotorowej, co w konsekwencji prowadzi do znacznej nadekspresji genu *SHI*. O ile fenotyp mutantu *shi* jest następstwem nadekspresji niezmienionego genu *SHI*, to można przypuszczać, że białko SHI funkcjonuje również jako represor transkrypcji.

Oprócz mutantów odpowiedzi giberelinowych, których zmutowane geny zostały zidentyfikowane i sklonowane, są znane dwa inne mutanty *A. thaliana*, które nie zostały jeszcze poznane na poziomie molekularnym. Mutant odpowiedzi giberelinowej *styl* (*sleepy1*) został przypadkowo zidentyfikowany w badaniach mutantu *abil-1* (*abscisic acid insensitive*) [93]. Homozygotyczny mutant *abil-1* był powtórnie mutagenizowany w celu wyselekcjonowania mutantu supresorowego. Okazało się, że niektóre mutanty supresorowe przypominają osobniki z defektem w biosyntezie GA wykazując typowe cechy karłowatości, które nie ustępują po dołściowym podaniu hormonu.

Wszystkie sklonowane dotychczas geny mutantów odpowiedzi giberelinowych kodują negatywne regulatory szlaku sygnalizacji giberelinowej. Wydaje się, że pozytywnym regulatorem może być produkt genu *PKL* (*PICKLE*). Mutanta *pk1* zidentyfikowano na podstawie zmian rozwojowych korzeni pierwotnych *A. thaliana*. Recesywna mutacja *pk1* prowadzi do fenotypu, który częściowo przypomina mutanty

z deficytem GA [69]. Podwójny mutant *pkl gai* wykazuje fenotypowy synergizm, co może sugerować, że produkty obu genów funkcjonują w oddzielnych szlakach transdukcji sygnału.

## PODSUMOWANIE

Fitohormony regulując ekspresję genów wpływają bezpośrednio na to, że komórki mające te same genotypy zaczynają się w odpowiednim czasie różnicować w wysoce wyspecjalizowane tkanki i organy lub wykazują zmianę swojej funkcji. Poznawanie pierwotnych mechanizmów działania poszczególnych fitohormonów ma zatem doprowadzić do poznania mechanizmów regulujących wzrost i różnicowanie się komórek i tkanek. Badanie mechanizmów działania poszczególnych substancji wzrostowych komplikuje jednak w istotny sposób znane powszechnie zjawisko wzajemnego współdziałania oraz wielokierunkowość oddziaływań poszczególnych hormonów. Jest to zresztą jedna z głównych przyczyn niezbyt imponującego postępu wiedzy na temat mechanizmów działania roślinnych hormonów.

Chemiczne właściwości giberelin pozwalają przypuszczać, że miejsce ich percepcji może być zlokalizowane na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej bądź znajduje się na wewnętrznych strukturach komórki. Tylko w przypadku komórek aleuronowych lokalizacja białka receptorowego na zewnętrznej powierzchni plazmolemy została dostatecznie udokumentowana. Nie budzi również wątpliwości udział heterotrimerycznego białka G w transdukcji sygnału giberelinowego, co także pośrednio potwierdza zewnątrzkomórkową lokalizację receptora GA. Wydaje się, że „karłowatość” jednego z mutantów ryżu będąca efektem mutacji bądź braku podjednostki  $\alpha$  białka G [2,20] wskazuje na udział białka G w ogólnym, odnoszącym się do wszystkich tkanek mechanizmie przenoszenia sygnału giberelinowego do cytoplazmy. Z drugiej jednak strony, wielu autorów nadal sądzi, że receptorem (receptorami) giberelin jest niezidentyfikowane jeszcze rozpuszczalne białko cytoplazmatyczne. Sugestie nawiązujące do zwierzęcych receptorów hormonów steroidowych są wciąż aktualne, a potwierdza je również poznana sekwencja aminokwasowa białka GAI [71]. Obecny w GAI charakterystyczny motyw z sekwencją LHKLL mają niektóre zwierzęce koaktywatory transkrypcji. Dzisiaj już wiadomo, że sekwencja LHKLL uczestniczy w asocjacji białek koaktywatorowych z białkami receptorowymi wiążącymi niektóre lipofilowe ligandy [33]. Obecność wspomnianej sekwencji w GAI może zatem sugerować, że białko to łączy się z białkiem receptorowym wiążącym giberelinę. Sugestia ta wydaje się bardziej prawdopodobna niż propozycja autorów wiążąca funkcjonowanie motywu DELLA w białku GAI z bezpośrednim wiązaniem gibereliny [71]. Podsumowując, można



ogólnie stwierdzić, że na obecnym etapie badań nie można jeszcze wykluczyć funkcjonowania cytoplazmatycznych receptorów giberelin.

Podobnie spekulatywny charakter ma również większość dotychczasowych propozycji dotyczących łańcucha transdukcji sygnału giberelinowego. W komórkach aleuronowych jedną z najszybszych odpowiedzi na GA jest niewątpliwie wzrost stężenia jonów wapnia w cytoplazmie. Wydaje się, że zasadniczym źródłem rosnącego stężenia tych jonów w cytoplazmie jest apoplast. Duże zmiany stężenia  $Ca^{2+}$  w pobliżu wewnętrznej powierzchni plazmolemy wiążą się w jakiś sposób z mechanizmem sekrecji  $\alpha$ -amylazy. Pojedyncze doniesienie mówiące o uruchamianiu wewnątrzkomórkowych magazynów wapnia za pośrednictwem produktów hydrolizy fosfolipidów inozytolowych [14] jak na razie nie zostało potwierdzone przez innych autorów. Mimo że nie potwierdzono udziału  $Ca^{2+}$  w szlaku sygnałowym prowadzącym do ekspresji genów  $\alpha$ -amylazy, to stwierdzana powszechnie obecność kalmoduliny w komórkach aleuronowych oraz indukowana przez GA synteza tego białka może świadczyć o zaangażowaniu kalmoduliny w przekazywanie sygnału giberelinowego. Białkami efektorowymi mogą być zlokalizowane w plazmolemie kanały jonowe regulowane przez kalmodulinę i cykliczne nukleotydy [87],  $Ca^{2+}$ -ATPaza tonoplastu i błon siateczki śródplazmatycznej [9,14,35], a także kinazy i fosfatazy białkowe. Analiza dotychczasowych wyników jednoznacznie potwierdza znaczenie odwracalnej fosforylacji niezidentyfikowanych jeszcze białek jako reakcji, która uczestniczy w przekazywaniu informacji prowadzącej do zmian w ekspresji genów  $\alpha$ -amylazy.

Poznanie sekwencji promotorowych genów  $\alpha$ -amylazy umożliwiło znalezienie kilku motywów, które tworzą tzw. kompleks odpowiedzi giberelinowej (GARC). Zidentyfikowano i sklonowano dotychczas cztery geny, których produkty regulują transkrypcję genów  $\alpha$ -amylazy. Czynniki aktywującymi są GAMyB, białka ABF1 i ABF2 oraz niezidentyfikowane jeszcze białko wiążące się do kasyety TATCCA. Białko HRT pełni przypuszczalnie funkcję represorową konkurując z GAMyB o specyficzną sekwencję w DNA. Synteza białka aktywatorowego *HvGAMyB* jest indukowana przez giberelinę. W związku z tym, że transkrypcja genu *HvGAMyB* nie jest hamowana przez cykloheksimid, można założyć, że indukcja ekspresji genu przez GA polega właściwie na jego derepresji. Obecnie szereg wyników wskazuje na białka GAI i GRS/RGA jako potencjalne białka regulatorowe, które mogą uczestniczyć bezpośrednio lub pośrednio w represji *HvGAMyB*. Właściwości represorowe tych białek są przypuszczalnie regulowane drogą specyficznego glikozylacji katalizowanej przez białko SPY. Produkt genu *SPY* transformowanego za pośrednictwem układu bakulowirusa do komórek owadzych wykazuje aktywność transferazy przenoszącej resztę *N*-acetyloglukozoaminy na resztę seryny lub treoniny [cyt. za 99]. Na razie nie wiemy jeszcze, czy białka GAI i GRS/RGA są rzeczywiście naturalnymi substratami, których właściwości są modyfikowane poprzez przyłączenie lub hydrolytyczne odszczepienie reszty *N*-acetyloglukozoaminowej. Regulatorową funkcję

takiej modyfikacji sugerują wyniki badań, w których komórki aleuronowe jęczmienia transformowano genem *HvSPY*. W transformowanych komórkach obserwowano zablokowanie ekspresji genu  $\alpha$ -amylazy indukowanego przez GA i brak zauważalnych zmian w ekspresji innych genów [79]. Wcześniejsze badania wskazywały także, że w komórkach aleuronowych mutanta jęczmienia z rodzaju „wysmukłych” (*sln1*) dochodzi do konstytutywnej ekspresji genu  $\alpha$ -amylazy, a także genów innych hydrolaz [82]. Są to więc argumenty przemawiające za tym, że co najmniej niektóre elementy szlaku transdukcji sygnału giberelinowego są takie same w komórkach aleuronowych i komórkach tkanek wegetatywnych, w tym również tkanek charakteryzujących się szybkim wzrostem. Potwierdzenie tych sugestii, a także dalsze poznawanie poszczególnych ogniw i ustalenie ich uszeregowania w łańcuchach przekazywania sygnału giberelinowego będzie jednak wymagało jeszcze wielu żmudnych badań.

## LITERATURA

- [1] ABO-EL-SAAD M, WU R. A rice membrane calcium-dependent protein kinase is induced by gibberellin. *Plant Physiol* 1995; **108**: 787–793.
- [2] ASHIKARI M, WU J, YANO M, SASAKI T, YOSHIMURA A. Rice gibberellin-insensitive dwarf mutant gene *Dwarf 1* encodes the  $\alpha$ -subunit of GTP-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 10284–10289.
- [3] BARAŃSKA J. Przekazywanie sygnałów w komórce roślinnej; receptory błony komórkowej. *Post Biochem* 1998; **44**: 201–207.
- [4] BAULCOMBE DC, BUFFARD D. Gibberellic-acid-regulated expression of  $\alpha$ -amylase and six other genes in wheat aleurone layers. *Planta* 1983; **157**: 493–501.
- [5] BETHKE PC, JONES RL.  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin modulates ion channel activity in storage protein vacuoles of barley aleurone cells. *Plant Cell* 1994; **6**: 277–285.
- [6] BETHKE PC, JONES RL. Gibberellin signaling. *Curr Opin Plant Biol* 1998; **1**: 440–446.
- [7] BETHKE PC, SCHUURINK R, JONES RL. Hormonal signalling in cereal aleurone. *J Exp Bot* 1997; **48**: 133–1356.
- [8] BLATCH GL, LÄSSLE M. The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interaction. *BioEssays* 1999; **21**: 932–939.
- [9] BUSH DS, WANG T. Diversity of calcium-efflux transporters in wheat aleurone cells. *Planta* 1995; **197**: 19–30.
- [10] BUSH DS. Effects of gibberellic acid and environmental factors on cytosolic calcium in wheat aleurone cells. *Planta* 1996; **199**: 89–99.
- [11] BUSH DS., BISWAS AK, JONES RL. Hormonal regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  transport in the endomembrane system of the barley aleurone. *Planta* 1993; **189**: 507–515.
- [12] CHANDLER PM, ZWAR JA, JACOBSEN JV, HIGGINS TJV, INGLIS AS. The effects of gibberellic acid and abscisic acid on  $\alpha$ -amylase mRNA levels in barley aleurone layers studies using an  $\alpha$ -amylase cDNA clone. *Plant Mol Biol* 1984; **3**: 407–418.
- [13] CHANG M, WANG B, CHEN X, WU R. Molecular characterization of catalytic-subunit cDNA sequences encoding protein phosphatases 1 and 2A and study of their roles in the gibberellin-dependent *Osamy-c* expression in rice. *Plant Mol Biol* 1999; **39**: 105–115.



- [14] CHEN X, CHANG M, WANG B, WU R. Cloning of a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase gene and the role of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  in the gibberellin-dependent signaling pathway in aleurone cells. *Plant J* 1997; **11**: 363–371.
- [15] CHEN X, VINKEMEIER U, ZHAO Y, JERUZALMID, DARNELL JE, KURIYAN J. Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell* 1998; **93**: 827–839.
- [16] DAS AK, COHEN PTW, BARFORD D. The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implication for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J* 1998; **17**: 1192–1199.
- [17] DEIKMAN J, JONES RL. Control of  $\alpha$ -amylase mRNA accumulation by gibberellic acid and calcium in barley aleurone layers. *Plant Physiol* 1985; **78**: 192–198.
- [18] DI LAURENZIO L, WYsocka-DILLER J, MALAMY JE, PYSH L, HELARIUTTA Y, FRESHOUR G, HAHN MG, FELDMANN KA, BENFEY PN. The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root. *Cell* 1996; **86**: 423–433.
- [19] FRIDBORG I, KUUSK S, MORITZ T, SUNDBERG E. The *Arabidopsis* dwarf mutant *shi* exhibits reduced gibberellin responses conferred by overexpression of a new putative zinc finger protein. *Plant Cell* 1999; **11**: 1019–1031.
- [20] FUJISAWA Y, KATO T, OHKI S, ISHIKAWA A, KITANO H, SASAKI T, ASAHI T, IWASAKI Y. Suppression of the heterotrimeric G protein causes abnormal morphology, including dwarfism, in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 7575–7580.
- [21] GILROY S, JONES RL. Calmodulin stimulation of unidirectional calcium uptake by the endoplasmic reticulum of barley aleurone. *Planta* 1993; **190**: 289–296.
- [22] GILROY S, JONES RL. Gibberellic acid and abscisic acid coordinately regulate cytoplasmic calcium and secretory activity in barley aleurone protoplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 3591–3595.
- [23] GILROY S, JONES RL. Perception of gibberellin and abscisic acid at the external face of the plasma membrane of barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone protoplasts. *Plant Physiol* 1994; **104**: 1185–1192.
- [24] GILROY S. Signal transduction in barley aleurone protoplasts is calcium dependent and independent. *Plant Cell* 1996; **8**: 2193–2209.
- [25] GUBLER F, JACOBSEN JV. Gibberellin-responsive elements in the promoter of a barley high-pI  $\alpha$ -amylase gene. *Plant Cell* 1992; **4**: 1435–1441.
- [26] GUBLER F, KALLA R, ROBERTS JK, JACOBSEN JV. Gibberellin-regulated expression of *myb* gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pI  $\alpha$ -amylase gene promoter. *Plant Cell* 1995; **7**: 1879–1891.
- [27] GUBLER F, WATTS RJ, KALLA R, MATTHEWS P, KEYS M, JACOBSEN JV. Cloning of a rice cDNA encoding a transcription factor homologous to barley GAMyb. *Plant Cell Physiol* 1997; **38**: 362–365.
- [28] HALTIWANGER RS, BUSBY S, GROVE K, LI S, MASON D, MEDINA L, MOLONEY D, PHILIPSBERG G, SCARTOZZI R. O-glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins: regulation analogous to phosphorylation? *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **231**: 237–242.
- [29] HAMABATA A, RODRIGUEZ E, GARCIA-MAYA M, BERNAL-LUGO I. Effect of pH on the  $\text{GA}_3$  induced  $\alpha$ -amylase synthesis. *J Plant Physiol* 1994; **143**: 349–352.
- [30] HARBERD NP, KING KE, CAROL P, COWLING RJ, PENG J, RICHARDS DE. Gibberellin: inhibitor of an inhibitor of...? *BioEssays* 1998; **20**: 1001–1008.
- [31] HEDDEN P, KAMIYA Y. Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1997; **48**: 431–460.
- [32] HEDDEN P, PROEBSTING WM. Genetic analysis of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiol* 1999; **119**: 365–370.
- [33] HEERY DM, KALKHOVEN E, HOARE S, PARKER MG. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 1997; **387**: 733–736.

- [34] HEIMOVAARA-DIJKSTRA S, HEISTEK JC, WANG M. Counteractive effects of ABA and GA<sub>3</sub> on extracellular and intracellular pH and malate in barley aleurone. *Plant Physiol* 1994; **106**: 359–365.
- [35] HONG B, ICHIDA A, WANG Y, GENS JS, PICKARD BG, HARPER JF. Identification of a calmodulin-regulated Ca<sup>2+</sup>-ATPase in the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol* 1999; **119**: 1165–1175.
- [36] HOOLEY R, BEALE MH, SMITH SJ, WALKER RP, RUSHTON PJ, WHITFORD PN, LAZARUS CM. Gibberellin perception and the *Avena fatua* aleurone: do our molecular keys fit the correct locks? *Biochem Soc Trans* 1992; **20**: 85–89.
- [37] HOOLEY R, BEALE MH, SMITH SJ. Gibberellin perception at the plasma membrane of *Avena fatua* aleurone protoplasts. *Planta* 1991; **183**: 274–280.
- [38] HOOLEY R, SMITH SJ, BEALE MH, WALKER RP. *In vivo* photoaffinity labelling of gibberellin-binding proteins in *Avena fatua* aleurone. *Aust J Plant Physiol* 1993; **20**: 573–584.
- [39] HOOLEY R. Gibberellins: perception, transduction and responses. *Plant Mol Biol* 1994; **26**: 1529–1555.
- [40] HUANG N, STEBBINS GL, RODRIGUEZ RL. Classification and evolution of  $\alpha$ -amylase genes in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 7526–7530.
- [41] HUTTLY AK, PHILLIPS AL, TREGGAR JW. Localisation of *cis* elements in the promoter of a wheat  $\alpha$ -Amy2 gene. *Plant Mol Biol* 1992; **19**: 903–911.
- [42] HUTTLY AK, PHILLIPS AL. Gibberellin-regulated plant genes. *Physiol Plant* 1995; **95**: 310–317.
- [43] ITOH K, YAMAGUCHI J, HUANG N, RODRIGUEZ RL, AKAZAWA T, SHIMAMOTO K. Developmental and hormonal regulation of rice  $\alpha$ -amylase (*RAmy1A*)-*gusA* fusion genes in transgenic rice seeds. *Plant Physiol* 1995; **107**: 25–31.
- [44] JACOBSEN JV, BEACH LR. Control of transcription of  $\alpha$ -amylase and rRNA genes in barley aleurone protoplasts by gibberellin and abscisic acid. *Nature* 1985; **316**: 275–277.
- [45] 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.
- [46] JACOBSEN SE, OLSZEWSKI NE. Mutations at the *SPINDLY* locus of *Arabidopsis* alter gibberellin signal transduction. *Plant Cell* 1993; **5**: 887–896.
- [47] JONES HD, SMITH SJ, DESIKAN R, PLAKIDOU-DYMOCK S, LOVEGROVE A, HOOLEY R. Heterotrimeric G proteins are implicated in gibberellin induction of  $\alpha$ -amylase gene expression in wild oat aleurone. *Plant Cell* 1998; **10**: 245–253.
- [48] KAMIYA Y, GARCIA-MARTINEZ JL. Regulation of gibberellin biosynthesis by light. *Curr Opin Plant Biol* 1999; **2**: 398–403.
- [49] KEITH B, RAPPAPORT L. *In vitro* gibberellin A<sub>1</sub> binding in *Zea mays* L. *Plant Physiol* 1987; **85**: 934–941.
- [50] KEITH B, SRIVASTAVA LM. *In vivo* binding of gibberellin A<sub>1</sub> in dwarf pea epicotyls. *Plant Physiol* 1980; **66**: 962–967.
- [51] KOORNNEEF M, ELGERSMA A, HANHART CJ, VAN LOENEN-MARTINET EP, VAN RIJN L, ZEEVAART JAD. A gibberellin insensitive mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 1985; **65**: 33–39.
- [52] KOWALCZYK S, JAKUBOWSKA A. Receptory etylenu, cytokinin i brasinosteroidów – transmembranowymi kinazami białkowymi? *Post Biol Kom* 1999; **26**: 3–32.
- [53] KREPPPEL LK, BLOMBERG MA, HART GW. Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem* 1997; **272**: 9308–9315.
- [54] KUO A, CAPPELLUTI S, CERVANTES-CERVANTES M, RODRIGUEZ M, BUSH DS. Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, blocks calcium changes, gene expression, and cell death induced by gibberellin in wheat aleurone cells. *Plant Cell* 1996; **8**: 259–269.



- [55] LANAHAN MB, HO T-HD, ROGERS SW, ROGERS JC. A gibberellin response complex in cereal  $\alpha$ -amylase gene promoters. *Plant Cell* 1992; **4**: 203–211.
- [56] LANGE T. Molecular biology of gibberellin synthesis. *Planta* 1998; **204**: 409–419.
- [57] LEGOCKA J. Sposób działania ważniejszych regulatorów roślinnych.[w] Jankiewicz LS [red.] Regulatory wzrostu i rozwoju roślin. Właściwości i działanie. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN 1997: 199–225.
- [58] LEWAK S. Hormony roślinne – kierunki badań ostatniego dziesięciolecia. *Kosmos* 1995; **44**: 601–622.
- [59] LIN W, GOPALAKRISHNAN B, MUTHUKRISHNAN S. Transcription efficiency and hormone-responsiveness of  $\alpha$ -amylase gene promoters in an improved transient expression system from barley aleurone protoplasts. *Protoplasma* 1996; **192**: 93–108.
- [60] LOVEGROVE A, BARRATT DHP, BEALE MH, HOOLEY R. Gibberellin-photoaffinity labelling of two polypeptides in plant plasma membranes. *Plant J* 1998; **15**: 311–320.
- [61] LUE M-Y, LEE HT. Protein phosphatase inhibitors enhance the expression of an  $\alpha$ -amylase gene,  $\alpha$ Amy3, in cultured rice cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **205**: 807–816.
- [62] MARTIN C, PAZ-ARES J. MYB transcription factors in plants. *Trends Genet* 1997; **13**: 67–73.
- [63] MCCOURT P. Genetic analysis of hormone signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1999; **50**: 219–243.
- [64] MEISSNER RC, JIN H, COMINELLI E, DENEKAMP M, FUERTES A, GRECOR, KRANZ HD, PENFIELD S, PETRONI K, URZAINQUI A, MARTIN C, PAZ-ARES J, SMEEKENS S, TONELLI C, WEISSHAAR B, BAUMANN E, KLIMYUK V, MARILLONNET S, PATEL K, SPEULMAN E, TISSIER AF, BOUCHEZ D, JONES JJ, PEREIRA A, WISMAN E, BEVAN M. Function search in a large transcription factor gene family in *Arabidopsis*: Assessing the potential of reverse genetics to identify insertional mutations in R2R3 MYB genes. *Plant Cell* 1999; **11**: 1827–1840.
- [65] MOLLER SG, CHUA N-H. Interactions and intersections of plant signaling pathways. *J Mol Biol* 1999; **293**: 219–234.
- [66] NAKAJIMA M, SAKAI S, KANAZAWA K, KIZAWA S, YAMAGUCHI I, TAKAHASHI N, MUROFUSHI N. Partial purification of a soluble gibberellin-binding protein from mung bean hypocotyls. *Plant Cell Physiol* 1993; **34**: 289–296.
- [67] NAKAJIMA M., TAKITA K, WADA H, MIHARA K, HASEGAWA M, YAMAGUCHI I, MUROFUSHI N. Partial purification and characterization of a gibberellin-binding protein from seedlings of *Azuki* *angularis*. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **241**: 782–786.
- [68] NOUR JM, RUBERY PH. The uptake of gibberellin A<sub>1</sub> by suspension-cultured *Spinacia oleracea* cells has a carrier-mediated component. *Planta* 1984; **160**: 436–443.
- [69] OGAS J, CHENG J-C, SUNG ZR, SOMERVILLE C. Cellular differentiation regulated by gibberellin in the *Arabidopsis thaliana* pickle mutant. *Science* 1997; **277**: 91–94.
- [70] OGAS J. Plant hormones: Dissecting the gibberellin response pathway. *Curr Biol* 1998; **8**: R165–R167.
- [71] PENG J, CAROL P, RICHARDS DE, KING KE, COWLING RJ, MURPHY GP, HARBERD NP. The *Arabidopsis* *GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev* 1997; **11**: 3194–3205.
- [72] PENG J, HARBERD NP. Derivative alleles of the *Arabidopsis* gibberellin-insensitive (*gai*) mutation confer a wild-type phenotype. *Plant Cell* 1993; **5**: 351–360.
- [73] PENG J, RICHARDS DE, HARTLEY NM, MURPHY GP, DEVOS KM, FLINTHAM JE, BEALES J, FISH LJ, WORLAND AJ, PELICA F, SUDHAKAR D, CHRISTOU P, SNAPE JW, GALE MD, HARBERD NP. „Green revolution” genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* 1999; **400**: 256–261.
- [74] PENG J, RICHARDS DE, MORITZ T, CANO-DELGADO A, HARBERD NP. Extragenic suppressors of the *Arabidopsis* *gai* mutation alter the dose-response relationship of diverse gibberellin responses. *Plant Physiol* 1999; **119**: 1199–1207.

- [75] PENSON SP, SCHUURINK RC, FATH A, GUBLER F, JACOBSEN JV, JONES RL. cGMP is required for gibberellic acid-induced gene expression in barley aleurone. *Plant Cell* 1996; **8**: 2325–2333.
- [76] RAVENTOS D, SKRIVER K, SCHLEIN M, KARNAHL K, ROGERS SW, ROGERS JC, MUNDY J. HRT, a novel zinc finger, transcriptional repressor from barley. *J Biol Chem* 1998; **273**: 23313–23320.
- [77] RITCHIE S, GILROY S. Calcium-dependent protein phosphorylation may mediate the gibberellic acid response in barley aleurone. *Plant Physiol* 1998; **116**: 765–776.
- [78] RITCHIE S, GILROY S. Gibberellins: regulating genes and germination. *New Phytol* 1998; **140**: 363–383.
- [79] ROBERTSON M, SWAIN SM, CHANDLER PM, OLSZEWSKI NE. Identification of a negative regulator of gibberellin action, HvSPY, in barley. *Plant Cell* 1998; **10**: 995–1007.
- [80] ROGERS JC, ROGERS SW. Definition and functional implications of gibberellin and abscisic acid *cis*-acting hormone response complexes. *Plant Cell* 1992; **4**: 1443–1451.
- [81] ROGERS SW, ROGERS JC. Cloning and characterization of a gibberellin-induced RNase expressed in barley aleurone cells. *Plant Physiol* 1999; **119**: 1457–1464.
- [82] ROSS JJ, MURFET IC, REID JB. Gibberellin mutants. *Physiol Plant* 1997; **100**: 550–560.
- [83] RUSHTON PJ, HOOLEY R, LAZARUS CM. Aleurone nuclear proteins bind to similar elements in the promoter regions of two gibberellin-regulated  $\alpha$ -amylase genes. *Plant Mol Biol* 1992; **19**: 891–901.
- [84] RUSHTON PJ, MACDONALD H, HUTTLY AK, LAZARUS CM, HOOLEY R. Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conserved *cis*-element in the promoters of  $\alpha$ -Amy2 genes. *Plant Mol Biol* 1995; **29**: 691–702.
- [85] SCHUMACHER K, SCHMITT T, ROSSBERG M, SCHMITZ G, THERES K. The *Lateral suppressor (Ls)* gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 290–295.
- [86] SCHUURINK RC, CHAN PV, JONES RL. Modulation of calmodulin mRNA and protein levels in barley aleurone. *Plant Physiol* 1996; **111**: 371–380.
- [87] SCHUURINK RC, SHARTZTER SF, FATH A, JONES RL. Characterization of a calmodulin-binding transporter from the plasma membrane of barley aleurone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 1944–1949.
- [88] SILVERSTONE AL, CIAMPAGLIO CN, SUN T-P. The Arabidopsis *RGA* gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* 1998; **10**: 155–169.
- [89] SILVERSTONE AL, MAK PYA, MARTINEZ EC, SUN T-P. The new *RGA* locus encodes a negative regulator of gibberellin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 1997; **146**: 1087–1099.
- [90] SINJORGO KMC, DE VRIES MA, HEISTEK JC, VAN ZEIJL MJ, VAN DER VEEN SW, DOUMA AC. The effect of external pH on the gibberellic acid response of barley aleurone. *J Plant Physiol* 1993; **142**: 506–509.
- [91] SKRIVER K, OLSEN FL, ROGERS JC, MUNDY J. Cis-acting DNA elements responsive to gibberellin and its antagonist abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 7266–7270.
- [92] SMITH SJ, WALKER RP, BEALE MH, HOOLEY R. Biological activity of some gibberellins and gibberellin derivatives in aleurone cells and protoplasts of *Avena fatua*. *Phytochemistry* 1993; **33**: 17–20.
- [93] STEBER CM, COONEY SE, MCCOURT P. Isolation of the GA-response mutant *sly1* as a suppressor of *AB11-1* in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 1998; **149**: 509–521.
- [94] STODDART JL, WILLIAMS PD. Interaction of [ $^3$ H] Gibberellin A<sub>1</sub> with a sub-cellular fraction from lettuce (*Lactuca sativa* L.) hypocotyls. *Planta* 1980; **148**: 485–490.



- [95] SUTLIFF TD, LANAHAN MB, HO T-HD. Gibberellin treatment stimulates nuclear factor binding to the gibberellin response complex in a barley  $\alpha$ -amylase promoter. *Plant Cell* 1993; **5**: 1681–1692.
- [96] SWAIN SM, OLSZEWSKI NE. Genetic analysis of gibberellin signal transduction. *Plant Physiol* 1996; **112**: 11–17.
- [97] SWANSON SJ, JONES RL. Gibberellic acid induces vacuolar acidification in barley aleurone. *Plant Cell* 1996; **8**: 2211–2221.
- [98] TANIDA I, KIM J-K, WU R. Functional dissection of a rice high-pI  $\alpha$ -amylase gene promoter. *Mol Gen Genet* 1994; **244**: 127–134.
- [99] THORNTON TM, SWAIN SM, OLSZEWSKI NE. Gibberellin signal transduction presents ... the SPY who O-GLcNAc'd me. *Trends Plant Sci* 1999; **4**: 424–428.
- [100] TREGEAR JW, PRIMAVESI LF, HUTTLY AK. Functional analysis of linker insertions and point mutations in the  $\alpha$ -Amy2/54 GA-regulated promoter. *Plant Mol Biol* 1995; **29**: 749–758.
- [101] TRUONG H-N, CABOCHE M, DANIEL-VEDELE F. Sequence and characterization of two *Arabidopsis thaliana* cDNAs isolated by functional complementation of a yeast *gln3 gdh1* mutant. *FEBS Lett* 1997; **410**: 213–218.
- [102] WILLMOTT RL, RUSHTON PJ, HOOLEY R, LAZARUS CM. DNaseI footprints suggest the involvement of a least three types of transcription factors in the regulation of  $\alpha$ -Amy2/A by gibberellin. *Plant Mol Biol* 1998; **38**: 817–825.
- [103] WILSON RN, SOMERVILLE CR. Phenotypic suppression of the gibberellin-insensitive mutant (*gai*) of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 1995; **108**: 495–502.
- [104] YALPANI N, SUTTLE JC, HULTSTRAND JF, RODAWAY SJ. Competition for *in vitro* [<sup>3</sup>H] gibberellin A<sub>4</sub> binding in cucumber by substituted phthalimides. *Plant Physiol* 1989; **91**: 823–828.
- [105] ZIELIŃSKA E, KOWALCZYK S. Percepcja i transdukcja sygnału auksynowego. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 155–183.
- [106] ZWAR JA, HOOLEY R. Hormonal regulation of  $\alpha$ -amylase gene transcription in wild oat (*Avena fatua* L.) aleurone protoplasts. *Plant Physiol* 1986; **80**: 459–463.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 07.03. 2000 r.

Przyjęto: 19.04. 2000 r.

Adres autora: ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń





## MECHANIZM REAKCJI FOTOFOBOWEJ U POKREWNYCH ORZĘSKÓW *STENTOR COERULEUS* I *BLEPHARISMA JAPONICUM*

### MECHANISM OF PHOTOPHOBIC RESPONSE IN CILIATE *STENTOR COERULEUS* AND RELATED *BLEPHARISMA JAPONICUM*

Hanna FABCZAK, Stanisław FABCZAK

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego,  
Polska Akademia Nauk, Warszawa

**Streszczenie:** Orzęski *Blepharisma* i *Stentor* mają systemy fotoreceptorowe, które czynią je wrażliwymi na działanie światła. Przejawem tego zjawiska jest między innymi reakcja fotofobowa, którą obserwuje się w momencie wzrostu intensywności oświetlenia. Taki bodziec powoduje zatrzymanie poruszającego się orzęska, następnie rewersję ruchu rzęskowego i ponowny ruch komórki do przodu. Rewersja ruchu rzęskowego jest konsekwencją wystąpienia w komórce błonowego potencjału czynnościowego indukowanego przez potencjał fotoreceptorowy. Powstanie tego potencjału jest uwarunkowane absorpcją światła przez komórkowy pigment prowadzącą, w przypadku *Stentor*, do aktywacji głównie procesów enzymatycznych z udziałem cGMP i zmian poziomu tego cyklicznego nukleotydu w komórce, które mogą powodować aktywację kanałów jonowych, zależnych od cGMP. U *Blepharisma* najprawdopodobniej zasadniczą rolę w systemie przekazywania sygnału spełnia InsP<sub>3</sub>. Potwierdzeniem tego przypuszczenia jest wykazanie przejściowego wzrostu stężenia InsP<sub>3</sub> w komórkach poddanych działaniu światła oraz obecności w korteksie tego orzęska białka homologicznego do białka receptorowego dla InsP<sub>3</sub>. (*Postępy Biologii Komórki* 2000; 27: 425–439)

**Słowa kluczowe:** system fotoreceptorowy, białko G, cGMP, InsP<sub>3</sub>, cGMP-zależne kanały jonowe, elektryczne potencjały błonowe, reakcja fotofobowa, orzęski, *Stentor coeruleus*, *Blepharisma japonicum*, przekazywanie sygnału świetlnego.

**Summary:** *Stentor* and *Blepharisma* possess photoreceptor systems that render the cells capable of avoiding light. The observed photobehaviour is largely the result of a step-up photophobic response displayed by both ciliates. The photophobic response caused by a sudden increase in light intensity starts

\*Praca finansowana w ramach projektu badawczego KBN 6 PO4C-057-18 i działalności statutowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcego Nenckiego w Warszawie.

with a cessation of ciliary beating, then a period of ciliary reversal followed by renewed forward movement. Ciliary reversal correlates with the generation of an action potential, which is elicited by a photoreceptor potential as a result of light absorption by cellular pigments. The photochemical processes within the pigments lead in the case of *Stentor* to internal cyclic GMP level changes that possibly result in changes of ionic conductance of cation channels gated by this cyclic nucleotide. In related *Blepharisma* cells, however,  $\text{InsP}_3$  seems to be responsible for the alterations in membrane potentials and induction of light avoiding response. This supposition is proved by a measured increase in the  $\text{InsP}_3$  levels in cells exposed to light and an identification of  $\text{InsP}_3$  receptor-like protein exclusively localized within the *Blepharisma* cell cortex.

(*Advances in Cell Biology* 2000; 27: 425–439)

**Key words:** photoreceptor system, G-protein, cGMP,  $\text{InsP}_3$ , cGMP-dependent ion channels, electrical membrane potentials, photophobic response, ciliates, *Blepharisma japonicum*, *Stentor coeruleus*, phototransduction.

**Wykaz stosowanych skrótów:** cGMP – cykliczny monofosforan guanozyny,  $\text{InsP}_3$  – 1,4,5-trisfosfoinozytol, DG – diacyloglicerol, białka G – białka wiążące trifosforan guanozyny, GTPazy – enzymy hydrolizujące trifosforan guanozyny, 8-Br-cGMP – 8-bromo-cykliczny monofosforan guanozyny, cAMP – cykliczny monofosforan adenozyne,  $\text{PtdInsP}_2$  – fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan, PLC – fosfolipaza C, PDE – fosfodiesteraza, IBMX – 3'-isobutylo-1-metylo-ksantyna.

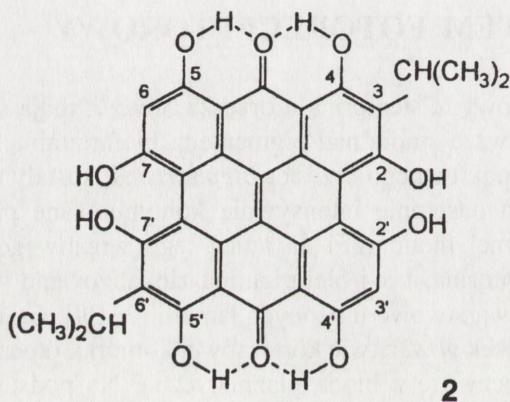
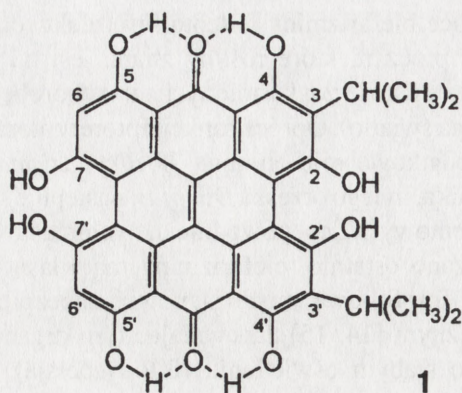
Unikanie jasno oświetlonych rejonów i gromadzenie się w miejscach zacienionych przez dwa spokrewnione orzęski, niebiesko-zielonego *Stentor coeruleus* i jasno-różową *Blepharisma japonicum*, opisano po raz pierwszy już na początku tego wieku. Zjawisko to, nazywane fotodyspersją, jest efektem zdolności postrzegania przez komórki zmian w poziomie oświetlenia w środowisku i reagowania na nie zmianami sposobu poruszania się. Wśród tych reakcji ruchowych występuje reakcja fototaktyczna, opisana jak do tej pory tylko u *Stentor*, którą obserwuje się, gdy poruszający się orzęsek znajdzie się w skupionej wiązce światła. W takiej sytuacji komórka kontynuuje ruch tylko w kierunku od źródła światła, wzdłuż linii jego rozchodzenia się [3–5]. Inną formą zmiany ruchu, która występuje u obu orzęsków i prowadzi do fotodyspersji, jest zwiększona szybkość ruchu komórek w środowisku intensywniej oświetlonym [3–5, 22]. Najlepiej poznaną odpowiedzią ruchową i najistotniejszą w wywoływaniu efektu fotodyspersyjnego jest reakcja fotofobowa. Fotoreakcja ta, przebiegająca w podobny sposób u *Blepharisma* i *Stentor*, polega na przejściowej zmianie kierunku poruszania się orzęska w wyniku rewersji ruchu rzęskowego, gdy komórka wpływa z rejonu zacienionego do obszaru jaśniejszego oświetlonego [3–5, 27]. Unikalne wśród orzęsków reakcje ruchowe na zmiany w poziomie oświetlenia u *Blepharisma* i *Stentor* są spowodowane, jak się uważa, obecnością licznych granул pigmentowych. Zawierają one barwniki (pochodne hiperycyny), które mogą pełnić funkcje fotoreceptorów i są nazywane blefarizminą u *Blepharisma* i stentoriną u *Stentor*. Znaczne zaburzenia w występowaniu reakcji fotofobowej obserwuje się u obu orzęsków poddanych działaniu światła w zakresie widzialnym, o wysokim natężeniu. Przedłużone działanie intensywnego światła może powodować nawet śmierć komórek. Przyczyną tych zjawisk są, podobnie jak w przypadku



hiperycyny, właściwości fotouczulające blefarizminy i stentoriny (efekt fotodynamiczny). Hiperycyna syntetyzowana przez niektóre rośliny znana jest od dawna jako naturalny fotouczulacz, wywołujący u zwierząt karmionych nimi chorobę zwaną hiperycyzmem (silne uczulenie skóry na światło). Oprócz funkcji fotoreceptora barwnikowi u orzęsków przypisuje się dodatkowo rolę obronną. U *Blepharisma* zaobserwowano, że podczas ataku drapieżnika, innego orzęska *Dileptus*, następuje szybkie wyrzucanie zawartości granul pigmentowych, co powoduje natychmiastowe odstraszenie agresora, gdyż, jak wykazano ostatnio, blefarizmina ma własności toksyczne [16]. U orzęsków reakcja fotofobowa może stanowić zabezpieczenie komórek przed efektem fotodynamicznym [14, 15] zapewniając tym organizmom przebywanie głównie w miejscach o słabym oświetleniu (fotodispersja), a tym samym stwarza optymalne warunki do przetrwania dla tych orzęsków.

## KOMÓRKOWY SYSTEM FOTORECEPTOROWY

Badania nad pigmentem komórkowym, stentoriną u orzęska *Stentor*, mają swój początek w końcu XIX wieku. Pierwsze studia nad pigmentem, blefarizminą, początkowo nazwanym zoopuryną, u pokrewnego orzęska *Blepharisma*, zostały rozpoczęte na początku XX wieku, a następnie intensywnie kontynuowane przez Giesego, który jest autorem obszernej monografii na temat tego wrażliwego na światło orzęska [15]. Zarówno, stentorina, jak i blefarizmina zlokalizowane są w granulach pigmentowych w postaci warstwowo ułożonych lamelli [27,29]. Granule te, gęsto ułożone między rzędami rzęsek w warstwie korteksowej komórki, otoczone są błoną, która w sposób ciągły łączy się z błoną plazmatyczną. Na podstawie badań spektroskopowych barwników stwierdzono, że stentorina i blefarizmina stanowią nową klasę fotoreceptorów, znacznie różniącą się od dobrze znanych już grup fotoreceptorów, takich jak rodopsyna, bakteriorodopsyna, fitochrom, chlorofil i flawiny. Oba barwniki zawierają hiperycynę, która należy do związków mesonaftodiantronamów [14,15,27,29] (rys. 1). Wprawdzie jeszcze nie w pełni poznane są procesy fotochemiczne zachodzące w cząsteczkach pigmentu orzęsków po absorpcji światła, ale na podstawie wstępnych badań zakłada się, że w analogii do znacznie lepiej poznanych fotoreceptorów organizmów wyższych, w fotoreceptorach orzęsków ma miejsce transfer elektronów i/lub protonów [1,14,19,27,33]. Cząsteczka stentoriny, to chromofor wbudowany w polipeptyd, będący heterodimerem o masach cząsteczkowych 44 kD i 52 kD [26,28]. Blefarizmina zaś połączona jest z białkiem o masie cząsteczkowej 38–50 kD. Wyniki te nie znalazły jednak potwierdzenia w późniejszych badaniach, gdyż fotoreceptor u *Blepharisma*, został zidentyfikowany jako kompleks z białkiem o znacznie wyższej masie cząsteczkowej wynoszącej 200 kD [21,25]. Najnowsze badania z użyciem metod biologii molekularnej do-



RYSUNEK 1. Przymuszczalna struktura stentoriny [6]

starczyły nowych danych na temat możliwej budowy fotoreceptorów, które mogą uczestniczyć w procesie absorpcji światła u orzęsków. Wynika z nich, że u *Blepharisma* oraz u *Fabrea salina*, orzęska u którego do tej pory stwierdzano istnienie wyłącznie fotoreceptora zawierającego hipercycyno-podobny chromofor [20], są obecne geny kodujące białko, wchodzące w skład rodopsyny, fotoreceptora typowego dla komórek organizmów wyższych. Występowanie białka homologicznego do rodopsyny wykazano również u jeszcze innego orzęska *Paramecium bursaria* [23], który wykazuje wrażliwość na działanie światła. Na obecnym etapie wiedzy trudno jest jednoznacznie przesądzić jakiego typu fotoreceptor jest zaangażowany w systemie przetwarzania sygnału świetlnego w komórkach *Blepharisma* i *Stentor*.

## RZĘSKOWA REAKCJA RUCHOWA

Ruchowa reakcja fotofobowa u obu orzęsków, *Stentor* i *Blepharisma*, na skokowy wzrost natężenia światła przebiega w zbliżony sposób. W reakcji tej można wyróżnić kilka charakterystycznych etapów:

(a) płynący do przodu orzęsek zatrzymuje się z pewnym opóźnieniem w stosunku do momentu zadziaływania bodźca,

(b) kolejno następuje przejściowy okres ruchu komórki do tyłu w wyniku rewersji ruchu rzęskowego, po którym



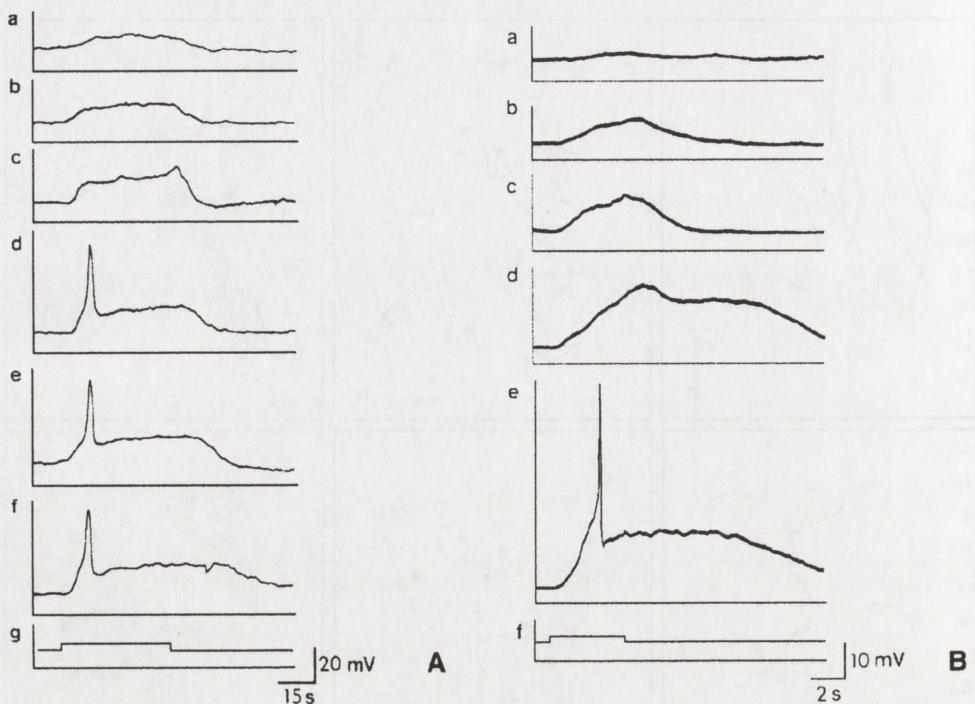


RYSUNEK 2. Reakcja fotofobowa u orzęsków *Stentor* (a,b,c) i (d,e,f) *Blepharisma*: (a,d) makrofotografia ruchu komórek adaptowanych do światła o niskiej intensywności, (b,e) makrofotografia ruchu komórek podczas reakcji fotofobowej, (c,f) schematyczne przedstawienie reakcji fotofobowej zarejestrowanej na taśmie magnetowidu [4]

(c) komórka ponownie zatrzymuje się, aby w końcu

(d) rozpocząć ruch do przodu w zmienionym zwykle kierunku (rys. 2).

Zarówno opóźnienie reakcji ruchowej, jak i czas trwania rewersji ruchu rzęskowego zależą od intensywności bodźca, tj. różnicy we wzroście natężenia światła. U obu orzęsków opóźnienie reakcji maleje, a czas poruszania się do tyłu wydłuża, wraz ze wzrostem wielkości bodźca. Opóźnienie reakcji fotofobowej oraz okres rewersji ruchu rzęskowego różnią się u obu orzęsków. *Stentor* reaguje znacznie szybciej na stymulację świetlną; opóźnienie reakcji wynosi 0,1 do 0,3 s w standardowych warunkach w zależności od natężenia światła [30], natomiast u *Blepharisma* opóźnienie to może osiągnąć wartość około 1 s. Należy zwrócić uwagę na fakt,



RYSUNEK 3. Błonowe zmiany elektryczne u (A) *Blepharisma* (a,b,c – potencjał fotoreceptorowy, d,e,f – potencjały fotoreceptorowy i czynnościowy) oraz (B) *Stentor* (a,b,c,d – potencjał fotoreceptorowy oraz e – potencjał czynnościowy) w odpowiedzi na narastające natężenie bodźca świetlnego (g,f) [4]

że oba orzęski reagują na światło z opóźnieniem znacznie większym niż przy stymulacji tych orzęsków bodźcami mechanicznymi [3–5]. Znaczne opóźnienie, z jakim występuje reakcja fotofobowa, w porównaniu z odpowiedzią tych orzęsków na inne bodźce sugeruje, że jest to czas niezbędny, aby w komórce uruchomione zostały określone procesy biochemiczne przetwarzające bodźce świetlne na końcową reakcję motoryczną [28].

## BŁONOWE ZJAWISKA ELEKTRYCZNE

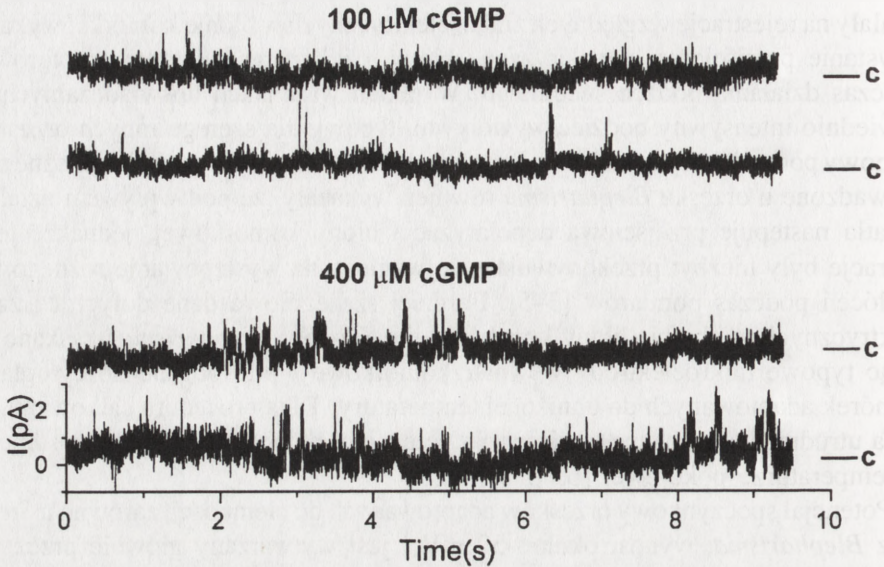
### Potencjały fotoreceptorowy i czynnościowy

Wstępne próby badania elektrycznej reakcji błony komórkowej na światło w komórkach *Stentor* podjęte były przy wykorzystaniu wewnątrzkomórkowych mikroelektrod szklanych, wprowadzonych do wakuoli tętniącej. Doświadczenia te po-



zwały na rejestrację względnych zmian elektrycznych w błonie komórki i wykazały powstanie przejściowej depolaryzacji błony, czyli potencjału fotoreceptorowego podczas działania bodźca świetlnego. W takich warunkach doświadczalnych odpowiednio intensywny bodziec wywoływał, typowy dla szeregu innych orzęsków, błonowy potencjał czynnościowy. Podobne doświadczenia elektrofizjologiczne przeprowadzone u orzęska *Blepharisma* również wykazały, że pod wpływem działania światła następuje przejściowa depolaryzacja błony komórkowej, jednakże te rejestracje były niezbyt przekonujące ze względu na występowanie różnego typu zakłóceń podczas pomiarów [3–5]. Bardziej szczegółowe dane dotyczące zmian elektrycznych w obrębie błony komórkowej u *Stentor* i *Blepharisma* uzyskano stosując typowe mikroelektrody wewnątrzkomórkowe wprowadzane do cytoplazmy komórek adaptowanych do obniżonej temperatury. Taka procedura całkowicie usuwała utrudnienia związane z rejestracją potencjału błonowego zwykle występujące w temperaturze pokojowej [6,7].

Potencjał spoczynkowy orzęsków adaptowanych do ciemności, zarówno u *Stentor* oraz *Blepharisma*, wynosi około  $-50$  mV i jest wytwarzany głównie przez jony potasu [4]. Komórki, poddane stymulacji światłem o niskiej intensywności, wytwarzają u orzęsków adaptowanych do ciemności potencjał fotoreceptorowy, którego amplituda rośnie wraz ze wzrostem natężenia bodźca, aż do osiągnięcia wartości maksymalnej w zakresie od 15 do 25 mV dla poszczególnych komórek [4,6,7]. Podobny potencjał receptorowy może być wywołany u orzęsków wstępnie adaptowanych do oświetlenia o niskiej intensywności. Potencjał receptorowy jest generowany z określonym opóźnieniem w stosunku do zapoczątkowania działania bodźca. Bodziec o odpowiednio wysokim natężeniu może powodować u obu orzęsków generację potencjału receptorowego, o amplitudzie przekraczającej wartość progową dla elektrycznego pobudzenia błony komórkowej i w konsekwencji wytworzenie potencjału czynnościowego (rys. 3). Opóźnienie w generacji potencjału czynnościowego, podobnie jak opóźnienie reakcji fotofobowej, różni się znacznie u obu badanych orzęsków. Dla komórek *Stentor* wynosi ono średnio 0,5 s ( $10^{\circ}\text{C}$ ), a u *Blepharisma* trwa znacznie dłużej i wynosi 2–5 s ( $12^{\circ}\text{C}$ ). W przypadku krótkotrwałych, intensywnych impulsów światła u obu komórek repolaryzacja potencjału czynnościowego jest natychmiastowa, natomiast intensywne bodźce o wydłużonym czasie działania wywołują dodatkowo opóźnioną depolaryzację błony. Ta opóźniona depolaryzacja reprezentuje utrzymujący się nadal potencjał fotoreceptorowy. Zmiany elektryczne w błonie komórkowej przy ciągłym naświetlaniu komórek mają podobny przebieg jak w przypadku długotrwałego bodźca z tą różnicą, że amplituda opóźnionej depolaryzacji (potencjału receptorowego) ulega zmniejszeniu w czasie, mimo trwania stymulacji [4,6,7]. Taki proces znany jest jako zjawisko adaptacji komórki do światła. W orzęskach adaptowanych do wysokiego poziomu oświetlenia nie obserwuje się błonowej odpowiedzi elektrycznej, nie występuje również reakcja fotofobowa. Komórki takie generują potencjał fotoreceptorowy o niskiej amplitudzie



RYSUNEK 4. Aktywność jonowych kanałów kationowych regulowanych przez cGMP w natywnych błonach orzęsków *Stentor* [18]

bez możliwości wytworzenia potencjału czynnościowego. Podobne procesy fotoadaptacyjne zostały opisane w komórkach receptorowych oka kręgowców i bezkręgowców. Umożliwiają one organizmowi posiadającemu układ wzrokowy optymalne widzenie w szerokim zakresie zmian intensywności oświetlenia w ich środowisku [2]. Na podstawie czasowej analizy przebiegów reakcji fotofobowej i odpowiedzi elektrycznych w komórkach *Stentor* i *Blepharisma* można przypuszczać, że moment generacji potencjału czynnościowego odpowiada początkowi rewersji ruchu rzęskowego, a koniec opóźnionej depolaryzacji jest jej zakończeniem [4]. W obu badanych orzęskach ma więc miejsce sprzężenie między zmianą elektryczną w błonie komórkowej i ruchową reakcją rzęskową. Podobne zjawisko obserwuje się u innych orzęsków podczas odpowiedzi tych komórek na działanie różnych innych bodźców [4,6,7].

### Analiza aktywności kanałów jonowych

Na podstawie zgromadzonych dotychczas danych trudno jest określić dokładny mechanizm jonowy, który byłby odpowiedzialny za generację potencjału fotoreceptorowego. Wstępne doświadczenia z zastosowaniem metody *patch-clamp* wykazują, że potencjał fotoreceptorowy u *Stentor* może być tworzony w wyniku modyfikacji aktywności jonowych kanałów błonowych aktywowanych przez cGMP (rys. 4). Występowanie takich kanałów stwierdzono w pęcherzykach zbudowanych z natywnej błony komórkowej orzęsków *Stentor* otrzymanych według opracowanej



przez nas metody [18]. Wstępną charakterystykę tych kanałów przeprowadzono w liposomach, do których wbudowano izolowane składniki korteksu z komórek *Stentor*. Jak wynika z tych doświadczeń, prawdopodobieństwo otwarcia badanego kanału wzrasta przy wzroście stężenia cGMP w mikromolarnym zakresie. Przewodność jonowa kanału w stanie otwarcia została określona na około 30 pS. Działanie cyklicznego GMP jest w pełni odwracalne, gdyż całkowite usunięcie tego nukleotydu ze środowiska powoduje powrót aktywności kanału do stanu początkowego (zamknięcie kanału). Aktywność jonowa kanałów aktywowanych wstępnie przez cGMP może być całkowicie zredukowana przez stosowanie niskich stężeń *l-cis* diltiazemu, bloкера kanałów, których aktywność jest kontrolowana przez cGMP [31,32]. Istnienie specyficznych kanałów jonowych, których funkcjonowanie jest regulowane przez cGMP, zostało potwierdzone także przez ich lokalizację metodą immunochemiczną. W korteksie komórek *Stentor* stwierdzono obecność białka o masie cząsteczkowej 63 kD, specyficznie wiążącego cGMP, homologicznego do  $\alpha$ -podjednostki białka kanału aktywowanego przez cGMP w pręcikach oka wołu [31,32].

## UKŁADY PRZETWARZANIA SYGNAŁU

### Białka wiążące GTP

Obserwowane charakterystyczne, znaczne opóźnienia, z jakimi w komórkach *Blepharisma* i *Stentor* następuje generacja potencjału czynnościowego, a w związku z tym i rewersja ruchu rzęskowego sugerują, że po fotoaktywacji układu receptorowego może następować uruchomienie określonych szlaków sygnałowych. Podobne zjawisko przetwarzania sygnału występuje w komórkach fotoreceptorowych u bezkręgowców i kręgowców. W tych komórkach fotoreceptorowych, jak i w przypadku komórek pierwotniaczych następuje przetworzenie bodźca świetlnego na błonowe zmiany elektryczne w celu wywołania odpowiedniej reakcji fizjologicznej [28]. Od wielu już lat wiadomo, że białka wiążące GTP (białka G) stanowią istotne ogniwo w procesie przetwarzania sygnału w receptorowych komórkach eukariotycznych, a poprzez stosowanie modulatorów aktywności tych białek można w znaczący sposób wpływać na efektywność przekazywania sygnału. Doświadczenia behawioralne, w których do badań reakcji fotofobowej orzęsków użyto fluorku aluminium ( $\text{AlF}_4^-$ ), toksyn cholery i krztuśca oraz mastoparanu, czyli substancji w istotny sposób modulujących aktywność białek G, wydają się potwierdzać powyższe sugestie. Fluorek aluminium wiążąc się z białkami G aktywuje je naśladując działanie GTP. Natomiast toksyny cholery i krztuśca powodują ADP-rybozylację białek G, w przypadku transducyny, białka G uczestniczącego w procesie przekazywania impulsu świetlnego w komórkach receptorowych kręgowców, powodują zahamowanie aktywności GTP-azy, a więc utrzymują białko G w stanie aktywnym.

Mastoparan zaś jest czynnikiem, który bezpośrednio może aktywować białka G zastępując w ten sposób działanie bodźca. W przypadku doświadczeń z komórkami *Stentor* zarówno  $\text{AlF}_4^-$ , jak i obie toksyny powodują istotny wzrost wrażliwości komórek na światło [8]. Orzęski poddane działaniu tych substancji zarówno szybciej reagowały na bodziec świetlny (mniejsze opóźnienie reakcji fotofobowej), jak i w większej liczbie komórek obserwowano wystąpienie fotoreakcji w odpowiedzi na działanie standardowego bodźca w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Podobny efekt, czyli podwyższenie czułości na światło obserwowano również u *Blepharisma*, po wstępnej inkubacji orzęsków w medium zawierającym jeden z modulatorów białek G:  $\text{AlF}_4^-$ , obie toksyny lub mastoparan [9,13].

Dalsze badania z wykorzystaniem metod typu *Western blot* i PCR, dostarczyły nowych dowodów na możliwość istnienia w orzęskach systemu przetwarzania fotoreceptorowego. U *Stentor* wykazano obecność białka G, homologicznego do transducyny z pręcików oka wołu. Zarówno w lizacie komórkowym, jak i w korteksie tego orzęska, stwierdzono specyficzną pozytywną reakcję białka o masie cząsteczkowej 39 kD z przeciwciałami wytworzonymi przeciw  $\alpha$ -podjednostce transducyny. Ponadto wykazano 35-procentową homologię tego białka z  $\alpha$ -podjednostką różnych heterotrimerycznych białek G występujących w innych organizmach eukariotycznych [8,27]. U pokrewnego orzęska *Blepharisma* zaś białko o masie cząsteczkowej 55 kD, występujące w lizacie komórkowym i korteksie, pozytywnie i specyficznie wiąże się z przeciwciałami wytworzonymi przeciwko  $\alpha$ -podjednostce transducyny oraz z przeciwciałami przeciw wspólnemu fragmentowi  $\alpha$ -podjednostki białek G [13]. Wśród innych badanych orzęsków istnienie heterotrimerycznych białek G wykazano w komórkach, które charakteryzują się zdolnością percepcji sygnału świetlnego. U wspomnianego wcześniej orzęska *Paramecium bursaria*, który również jest zdolny do ruchowej reakcji rzęskowej na bodziec świetlny, u którego stwierdzono obecność rodopsyny, zlokalizowano białko o masie cząsteczkowej 57 kD, wykazujące aktywność GTP-azy i homologicznego do  $\alpha$ -podjednostki białek G [24,26].

### Cykliczny GMP oraz trisfosfoinozytol jako wtórne przekaźniki

Pierwsze sugestie na temat udziału wtórnych przekaźników w procesie przetwarzania bodźców świetlnych u orzęsków pochodzą z badań nad zjawiskiem wydłużania się komórek *Blepharisma* podczas ich długotrwałej ekspozycji na działanie intensywnego światła. Z badań tych wynika, że proces ten może być znacznie zredukowany po wprowadzeniu do cytoplazmy egzogenego cGMP.

Ostatnio u *Blepharisma* i *Stentor*, cGMP wydaje się być także w istotny sposób zaangażowany w procesy kontrolujące reakcję fotofobową [8,9]. Okazuje się, że inkubacja komórek w środowisku zawierającym analogi cGMP, 8-bromo-cykliczny GMP (8-Br-cGMP) lub dwumaślan cyklicznego GMP, swobodnie przenikających

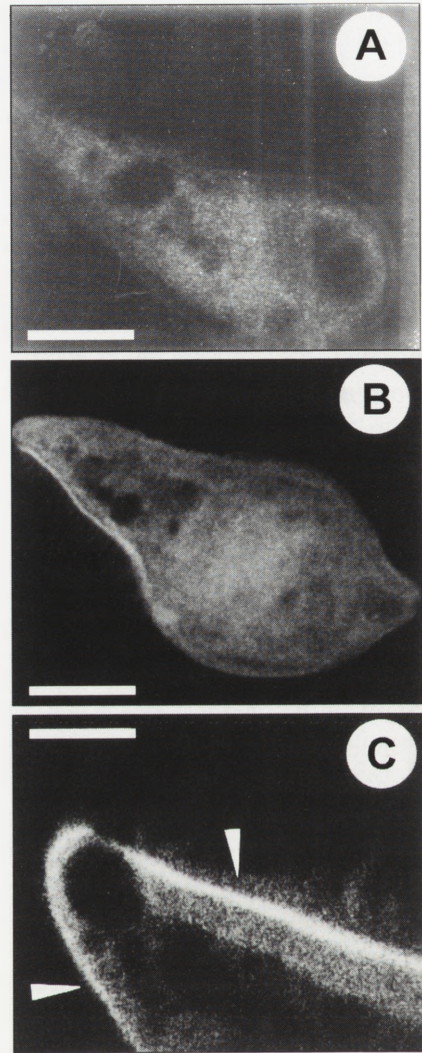


przez błonę komórkową, powoduje znaczne opóźnienie w wystąpieniu reakcji fotofobowej oraz zredukowanie liczby komórek reagujących na światło w porównaniu z populacją komórek kontrolnych. Proces ten jest całkowicie odwracalny i zależny od czasu inkubacji jak i stężenia stosowanego nukleotydu. Nie stwierdzono natomiast żadnego wpływu przenikających przez błonę form cAMP na reakcję fotofobową u badanych orzęsków [8,9,30]. Udział cGMP w reakcji fotofobowej u obu orzęsków potwierdzony został w dalszych doświadczeniach, w których użyto powszechnie stosowanych inhibitorów fosfodiesterazy (PDE) cyklicznych nukleotydów, IBMX i teofiliny. Powodują one podwyższenie poziomu cGMP u tych orzęsków i w istotny sposób hamują występowanie ruchowej reakcji fotofobowej [8,9,30]. Odwrotną sytuację, tzn. wzrost reaktywności orzęsków na działanie światła, obserwowano po inkubacji komórek z czynnikiem LY 83583 [8,9,30], który specyficznie obniża poziom cGMP w komórkach przez hamowanie aktywności cykazy guanylanowej.

Stosując bardzo precyzyjną metodę radioimmunologiczną do określania wewnątrzkomórkowego poziomu cGMP, uzyskano kolejne dane świadczące o istotnych zmianach stężenia tego nukleotydu u orzęsków *Stentor* podczas naświetlania [30]. W komórkach adaptowanych do ciemności i poddanych następnie stymulacji światłem następuje stosunkowo szybki przejściowy spadek poziomu cytoplazmatycznego cGMP, po czym wartość stężenia nukleotydu wraca w nieco wolniejszym tempie do poziomu początkowego. Wielkość zmian wewnątrzkomórkowego cGMP jest wprost proporcjonalna do natężenia stosowanego światła, a proces renormalizacji poziomu jest znacznie wydłużony w komórkach traktowanych bodźcami o wydłużonym czasie działania. Obserwowane zmiany poziomu cGMP w komórkach poddanych działaniu światła są znacznie zredukowane w przypadku komórek traktowanych wstępnie czynnikami wpływającymi na aktywność fosfodiesterazy cyklicznych nukleotydów, IBMX i teofiliny. Identyczne pomiary poziomu cyklicznego cAMP w cytoplazmie, w różnych warunkach oświetleniowych nie wykazały zauważalnych zmian w jego poziomie (dane nie publikowane). Wstępne doświadczenia związane z oznaczaniem w identyczny sposób poziomu komórkowego cGMP w orzęskach *Blepharisma* nie dostarczyły przekonujących danych, które pozwoliłyby na jednoznaczne stwierdzenie charakteru zależności pomiędzy zmianami poziomu cGMP w komórce podczas działania światła i wymagają dalszych badań (dane nie publikowane).

Wcześniejsze badania behawioralne z użyciem mastoparanu, jako aktywatora białek G, sugerowały istnienie u *Blepharisma* także innego szlaku przekazywania sygnału świetlnego z udziałem ufosforylowanych pochodnych inozytoli. Kolejne badania behawioralne u tego orzęska, w których stwierdzono silny wpływ czynników zaburzających cykl inozytolowy w komórce na reakcję fotofobową, potwierdziły powyższe przypuszczenia. Zaobserwowano, że neomycyna, znany inhibitor hydrolizy fosfatydyloinozytoli-4,5-bisfosforanu (PtdInsP<sub>2</sub>) do trisfosfoinozytoli (InsP<sub>3</sub>) i diacylogliceroli (DG), powoduje znaczące zmniejszenie liczby reagujących komórek

oraz wydłużenie czasu, z jakim komórki reagują na światło [10,13]. Podobne, choć może nie tak duże, zmiany w zachowaniu się komórek zachodzą również pod wpływem heparyny, blokera receptora  $\text{InsP}_3$  oraz jonów litu, które hamują aktywności fosfatazy monofosfoinozytolu i w związku z tym powodują zmniejszenie puli inozytolu, podstawowego substratu do powstawania  $\text{PtdInsP}_2$  [10,13]. Analiza poziomu  $\text{InsP}_3$ , przy zastosowaniu specyficznej metody radioimmunologicznej pokazała, że światło niewątpliwie wywołuje przejściowy wzrost poziomu  $\text{InsP}_3$  w komórkach *Blepharisma*. Poziom cytoplazmatycznego  $\text{InsP}_3$  w orzęsku zwiększa się wraz z podwyższaniem intensywności bodźca i jest znacznie hamowany u orzęsków preinkubowanych z  $\text{Li}^+$  lub neomycyną. Stopień hamowania hydrolizy fosfatydyloinozytolu do  $\text{InsP}_3$  i DG przez jony litu i neomycynę był zależny od ich stężenia [12]. Przeprowadzona w ostatnim czasie analiza lizatu komórkowego oraz frakcji korteksowej komórek *Blepharisma*, z wykorzystaniem metody *Western blot*, jednoznacznie wykazała występowanie w tych preparatach białka, o masie cząsteczkowej większej niż 200 kD, homologicznego do białka receptorowego  $\text{InsP}_3$ , występującego w układach przetwarzania receptorowego organizmów wyższych. Obecność tego białka w warstwie korteksowej orzęska [11] potwierdzona została dodatkowo wynikami doświadczeń immunocytochemicznych z użyciem przeciwciał znakowanych fluoresceiną (rys. 5). W świetle przytoczonych powyżej wyników doświadczalnych wydaje się, że orzęski *Blepharisma* mogą być zaopatrzone w dwa niezależne szlaki przetwarzania sygnału świetlnego, analogicznie jak niektóre komórki fotoreceptorowe bezkręgowców [2]. Nie można też wykluczyć możliwości,



RYSUNEK 5. Zdjęcia komórek *Blepharisma* ze znakowanym w warstwie korteksowej białkiem receptorowym dla  $\text{InsP}_3$ : (a) – kontrola, tj. komórki inkubowane bez pierwotnych przeciwciał, (b,c) – komórki inkubowane z pierwotnymi przeciwciałami przeciwko receptorowi  $\text{InsP}_3$  oraz przeciwciałami wtórnymi sprzężonymi z fluoresceiną [11]

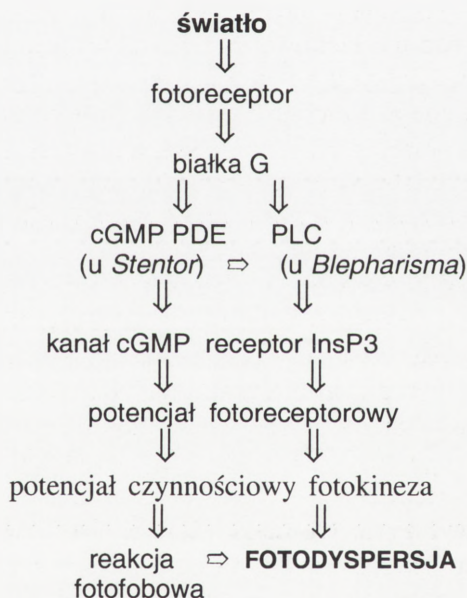


że oba szlaki współdziałają ze sobą i cGMP może być wykorzystywany przez komórkę, np. w późniejszej fazie przekazywania sygnału do regulacji aktywności receptora  $\text{InsP}_3$  przez jego fosforylację z udziałem kinazy zależnej od cGMP [17].

## PODSUMOWANIE

Wyniki badań omówionych w tym artykule ilustruje poniższy schemat (rys. 6), który w uproszczony sposób przedstawia przypuszczalny mechanizm przekazywania sygnału świetlnego u dwóch pokrewnych orześków *Blepharisma* i *Stentor*. Niektóre etapy tego mechanizmu nie są jeszcze znane i wymagają dalszych szczegółowych badań. Dotychczas nie udało się uzyskać danych dotyczących funkcjonalnej aktywności komórkowych fotoreceptorów *in vitro*. Ze wstępnych badań wynika, że barwnik nieodwracalnie traci swoją aktywność podczas izolacji od pozostałych struktur białkowych, tworzących przypuszczalny szlak przetwarzania sygnału [28]. W przypadku komórek fotoreceptorowych organizmów wyższych zbadanie cyklu fotochemicznego zachodzącego w fotoreceptorze (rodopsynie) i oddziaływań rodopsyny z białkiem G (transducyną) *in vitro* nie nastręczało większych trudności. Z powyższego względu wiedza o funkcjonowaniu układów receptorowych przetwarzania sygnału w tych komórkach jest znacznie bardziej zaawansowana. Dalszych badań wymagają też procesy leżące u podstaw generacji potencjału fotoreceptorowego u obu orześków, będącego ostatnim etapem w procesie przetwarzania sygnału. Przypuszcza się, jak wspomniano wyżej, że za generację potencjału fotoreceptorowego u obu orześków mogą być odpowiedzialne zmiany przewodnictwa błony dla kationów w wyniku aktywacji szlaku przetwarzającego bodziec i zmiany w poziomie wtórnego przekaźnika, chociaż istnieją w literaturze i inne hipotezy na powyższy temat [34]. Szczególnie

interesujący wydaje się fakt, że pomimo pokrewieństwa tych orześków, w niektórych etapach procesu przekazywania sygnału świetlnego włączone są odmienne szlaki enzymatyczne i związane z tym różne wtórne przekaźniki, choć końcowym efektem



RYSUNEK 6. Schemat prawdopodobnego mechanizmu przetwarzania bodźca świetlnego w komórkach *Blepharisma* i *Stentor*

u obu orzęsków są podobne elektryczne zjawiska błonowe, wywołujące reakcji fotofobową i prowadzące do fotodyspersji.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ANGELINI N, QUARANTA A, CHECCUCCI G, SONG P-S, LENCI F. Electron transfer fluorescence quenching of *Blepharisma japonicum* photoreceptor pigments. *Photochem Photobiol* 1998; **68**: 864–868.
- [2] DORLÖCHTER M, STIEVE H. The *Limulus* ventral photoreceptor: light response and the role of calcium in a classic preparation. *Progress Neurobiol* 1997; **53**: 451–515.
- [3] FABCZAK S, FABCZAK H. Fotoreakcje u orzęsków *Blepharisma* i *Stentor*. *Post Biol Kom* 1993; **20** (Suppl. 2): 155–162.
- [4] FABCZAK S, FABCZAK H. Phototransduction in *Blepharisma* and *Stentor*. *Acta Protozool* 1995; **34**: 1–11.
- [5] FABCZAK H, FABCZAK S. Reakcja fotofobowa u orzęska *Blepharisma japonicum*. *Kosmos* 1997; **46**: 173–179.
- [6] FABCZAK S, FABCZAK H, TAO N, SONG P-S. Photosensory transduction in ciliates. I. An analysis of light-induced electrical and motile responses in *Stentor coeruleus*. *Photochem Photobiol* 1993; **57**: 696–701.
- [7] FABCZAK S, FABCZAK H, SONG P-S. Photosensory transduction in ciliates. III. The temporal relation between membrane potentials and photomotile responses in *Blepharisma japonicum*. *Photochem Photobiol* 1993; **57**: 872–876.
- [8] FABCZAK H, PARK P-B, FABCZAK S, SONG P-S. Photosensory transduction in ciliates. II. Possible role of G-protein and cGMP in *Stentor coeruleus*. *Photochem Photobiol* 1993; **57**: 702–706.
- [9] FABCZAK H., TAO N, FABCZAK S, SONG P-S. Photosensory transduction in ciliates. IV. Modulation of photomovement response of *Blepharisma japonicum* by cGMP. *Photochem Photobiol* 1993; **57**: 872–876.
- [10] FABCZAK H, WALERCZYK M, GROSZYNSKA B, FABCZAK S. InsP<sub>3</sub>-modulated photophobic responses in *Blepharisma*. *Acta Protozool*. 1996; **35**: 251–255.
- [11] FABCZAK H, WALERCZYK M, FABCZAK S. Identification of protein homologous to inositol trisphosphate receptor in ciliate *Blepharisma*. *Acta Protozool* 1998; **37**: 209–213.
- [12] FABCZAK H, WALERCZYK M, GROSZYNSKA B, FABCZAK S. Light induces inositol trisphosphate elevation in *Blepharisma japonicum*. *Photobiol Photochem* 1999; **69**: 254–258.
- [13] FABCZAK H, WALERCZYK M, FABCZAK S. Contribution of the phosphoinositide-dependent signal pathway to photomotility in *Blepharisma*. *J Photochem Photobiol B* 2000; (in press).
- [14] FALK H. From the photosensitizer hypericin to the photoreceptor stentorin—the chemistry of phenanthroperylenequinones. *Angew Chem Int Ed* 1999; **38**: 3116–3136
- [15] GIESE AC. The photobiology of *Blepharisma*. in *Photochemical and Photobiological Reviews* (KC Smith, ed) 1981, Plenum Press, New York.
- [16] HARUMOTO T, MIYAKE A, ISHIKAWA N, SUGIBAYASHI R, ZENFUKU K, IIO H. Chemical defense by means of pigmented extrusomes in the ciliate *Blepharisma japonicum*. *Europ J Protistol* 1998; **34**: 458–470.
- [17] KOMALAVILAS P, LINCOLN TM. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic GMP- protein dependent kinase. *J Biol Chem* 1994; **269**: 8701–8704.
- [18] KÓPROWSKI P, WALERCZYK M, GROSZYNSKA B, FABCZAK H, KUBALSKI A. Modified patch-clamp method for studying ion channels in *Stentor coeruleus*. *Acta Protozool* 1997; **36**: 121–124.



- [19] LOSI A, VELCI A, VAPPIANI CC. Photoinduced structural volume changes in aqueous solution of blepharism. *Photochem Photobiol* 1999; **69**: 435–442.
- [20] MARANGONI R, PUNTONI S, COLOMBETTI G. A model system for photosensory perception in Protozoa: the marine ciliate *Fabrea salina*. in *Biophysics of Photoperception Molecular and Phototransductive Events* (C. Taddei-Ferretti, ed.) 1997, 83–91, World Scientific, Singapore, New Jersey, London, Hong Kong.
- [21] MATSUOKA T, SATO M, MAEDA M, NAOKI H, TANAKA T, KOTSUKI H. Localization of blepharism in photosensors and identification of photoreceptor complex mediating the step-up photophobic response of the unicellular organism, *Blepharisma*. *Photochem Photobiol* 1997; **65**: 915–921.
- [22] MATSUOKA T, SATO M, MATSUOKA S. Photoreceptor pigment mediating swimming acceleration of *Blepharisma*, an unicellular organism. *Microbios* 1999; **99**: 89–94.
- [23] NAKAOKA Y, TOKIOKA R, SHINOZAWA T, USUKURA J. Photoreception of *Paramecium* cilia: localization of photosensitivity and binding with anti-frog-rhodopsin IgG. *J Cell Sci* 1991; **99**: 67–72.
- [24] NEW DC, WONG JTY. The evidence for G-protein-coupled receptors and heterotrimeric G proteins in protozoa and ancestral metazoa. *Biol Signals Recept* 1998; **7**: 98–108.
- [25] PODESTA A, GIOFFRE D, GROSSI T, MONTAGNOLI G. Immunological and biochemical evidence that blepharism is not a prosthetic group. *Photochem Photobiol* 2000; **71**: 669–673.
- [26] SHINOZAWA T, HASHIMOTO H, FUJITA J, NAKAOKA Y. Participation of GTP-binding protein in the photo-transduction of *Paramecium bursaria*. *Cell Struct Funct* 1996; **21**: 469–474.
- [27] SONG P-S. Light signal transduction in ciliate *Stentor* and *Blepharisma*. 1. Structure and function of the photoreceptors. in *Biophysics of Photoperception Molecular and Phototransductive Events* (C. Taddei-Ferretti, ed.) 1997a, 48–66, World Scientific, Singapore, New Jersey, London, Hong Kong.
- [28] SONG P.-S. Light signal transduction in ciliate *Stentor* and *Blepharisma*. 2. Transduction mechanism. in *Biophysics of Photoperception Molecular and Phototransductive Events* (C. Taddei-Ferretti, ed.) 1997b, 67–82, World Scientific, Singapore, New Jersey, London, Hong Kong.
- [29] TAO N, DEFORCE L, ROMANOWSKI M, MEZA-KEUTHEN MS, SONG P-S, FURUYA M. *Stentor* and *Blepharisma* photoreceptors: structure and function. *Acta Protozool* 1994; **33**: 199–211.
- [30] WALERCZYK M, FABCZAK S. Cyclic GMP as second messenger in phototransduction in *Stentor coeruleus*. *J Photochem Photobiol* 2000 (in press).
- [31] WALERCZYK M, FABCZAK S. Cyclic GMP activated channels in *Stentor coeruleus*. *Photochem Photobiol* 2000 (in press).
- [32] WALERCZYK M, FABCZAK H, FABCZAK S. Reakcja fotofobowa u *Stentor coeruleus*- badania elektrofizjologiczne. *Post Hig Med. Dośw.* 2000; **54**: 329–339.
- [33] WELLS TA, LOSI A, DAI R, SCOTT P, ANDERSON M, REDEPENDING J, PARK S-M, GOLDBECK J, SONG P-S. Electron transfer quenching and photoinduced EPR of hypericin and the ciliate photoreceptor stentorin. *J Phys Chem* 1997; **101**: 366–372.
- [34] WOOD DC. Electrophysiology and photomovement of *Stentor*. in *Biophysics of Photoreceptors and Photomovements in Microorganisms* (F Lenci, ed), 1991: 281–291, Plenum Press, New York.

Redaktor prowadzący – B. Kamińska

Otrzymano: 17.02.2000r.

Przyjęto: 26.04.2000 r.

Adres autora: 03-741 Warszawa, ul. Białostocka 9 m. 46





## O-GLIKOZYLACJA BIAŁEK JĄDROWYCH

### O-GLYCOSYLATION OF NUCLEAR PROTEINS

Anna KRZEŚLAK, Anna LIPIŃSKA

Katedra Cytobiochemii, Uniwersytet Łódzki

**Streszczenie:** Glikozylacja polegająca na przyłączeniu pojedynczych reszt *N*-acetyloglukozaminy do seryny lub treoniny polipeptydu wiązaniem *O*-glikozydowym jest powszechną modyfikacją białek jądrowych. Białkami modyfikowanymi w ten niezwykły sposób są liczne białka chromatyny i jądrowego kompleksu porowego, a także polimeraza RNA klasy II i niektóre czynniki transkrypcyjne. Sugeruje się, że *O*-glikozylacja białek jądrowych odgrywa ważną rolę w transporcie jądrowo-cytoplazmatycznym, regulacji procesu transkrypcji oraz regulacji poziomu fosforylacji białek. W niniejszym artykule przedstawiono dane dotyczące enzymów zaangażowanych w *O*-glikozylację i deglikozylację białek, miejsc przyłączenia reszt *N*-acetyloglukozaminy do polipeptydu oraz omówiono znane glikoproteiny jądrowe. (*Postępy Biologii Komórki* 2000; 27: 441–460)

**Słowa kluczowe:** *O*-GlcNAcylation, *O*-GlcNAc transferaza,  $\beta$ -*N*-acetylo-D-glukozaminidaza, nukleoporyny, transport jądrowo-cytoplazmatyczny, polimeraza RNA klasy II, czynniki transkrypcyjne.

**Summary:** Glycosylation, consisting in incorporation of single *N*-acetylglucosamine residues attached by *O*-linkage to serine or threonine residues, is a common modification of nuclear proteins. Numerous chromatin and nuclear pore complex proteins as well as RNA polymerase II and some transcription factors are glycosylated in this unusual way. *O*-glycosylation of nuclear proteins has been postulated to play a role in nucleus-cytoplasmic transport, transcriptional regulation and regulation of protein phosphorylation level. In this paper data concerning enzymes engaged in *O*-glycosylation and deglycosylation of proteins, attachment sites of *N*-acetylglucosamine residues and known nuclear glycoproteins have been described.

(*Advances in Cell Biology* 2000; 27: 441–460)

**Key words:** *O*-GlcNAcylation, *O*-GlcNAc transferase, *N*-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase, nucleoporins, nucleus-cytoplasmic transport, RNA polymerase II, transcription factors.

**Wykaz skrótów:** **A** (Ala) – alanina; **BHK** (ang. *baby hamster kidney cells*) – komórki nerek nowo narodzonych chomików syryjskich; **cDNA** (ang. *complementary lub copy DNA*) – DNA komplementarny do mRNA; **D** (Asp) – asparaginian; **E** (Glu) – glutaminian; **EB1** – linia komórek wywodzących się z limfocytów B człowieka, zmienionych nowotworowo pod wpływem zakażenia wirusem Epsteina-Barr; **F** (Phe) – fenyloalanina; **G** (Gly) – glicyna; **GalNAc** – *N*-acetylglalaktozamina; **GlcNAc** – *N*-acetyloglu-

kozamina; **HeLa** – linia ludzkich komórek nabłonkowych pochodzących z raka szyjki macicy pacjentki Helen Lane lub Lange lub Larsen; **I** (Ile) – izoleucyna; **L** (Leu) – leucyna; **M** (Met) – metionina; **N** (Asn) – asparagina; **NPC** (ang. *nuclear pore complex*) – jądrowy kompleks porowy; **Nup** (ang. *nucleoporin*) – nukleoporyna; **O-GlcNAc** – *N*-acetyloglukozamina przyłączona do polipeptydu wiązaniem *O*-glikozydowym; **P** (Pro) – prolina; **PNGaza F** (ang. *peptide: N-glycosidase z Flavobacterium meningosepticum*) – peptydowa *N*-glikozydaza F; **POM** (ang. *pore membrane protein*) – integralne białko błonowe NPC; **R** (Arg) – arginina; **RanBP** (ang. *Ran-binding protein*) – białko wiążące Ran; **RanGAP** (ang. *Ran GTPase activating protein*) – białko aktywujące GTPazę Ran; **S** (Ser) – seryna; **Sp1** (ang. *specific protein 1*) – specyficzny czynnik transkrypcyjny; **SRF** (ang. *serum response factor*) – czynnik wrażliwości na surowicę krwi (czynnik transkrypcyjny); **T** (Thr) – treonina; **V** (Val) – walina; **WGA** (ang. *wheat germ agglutinin*) – lektyna z kielków pszenicy; **X** – nieznaną aminokwas.

## WSTĘP

Obecnie nie ulega wątpliwości fakt, że glikoproteiny stanowią integralny komponent jąder komórkowych zwierząt. Uważa się, że białka jądrowe mogą być *N*- i *O*-glikozylowane.

Pierwsze w piśmiennictwie polskim dane o *N*- i *O*-glikozylacji białek jądrowych przedstawiono w poprzednim opracowaniu przeglądowym [51].

W specyficznej *O*-glikozylacji białek jądrowych wiązanie *O*-glikozydowe tworzone jest między pojedynczą resztą *N*-acetyloglukozaminy (GlcNAc) a grupą hydroksylową seryny lub treoniny polipeptydu (*O*-GlcNAcyllacja) [29, 41, 70, 78]. Tę formę glikozylacji odkryto w 1984 roku w laboratorium Harta (USA) podczas badania terminalnych reszt GlcNAc glikanów powierzchni limfocytów myszy [78]. Wkrótce okazało się, że ta nowa forma glikozylacji dotyczy przede wszystkim białek wewnątrzkomórkowych [29, 33, 41]. Białka *O*-glikozylowane są zlokalizowane głównie w jądrach i w cytoplazmie oraz w pozostałych organellach komórkowych z wyjątkiem mitochondriów. Zawierające *O*-GlcNAc białka wykryto u wszystkich badanych *Eukaryota* od drożdży do człowieka oraz u wirusów. Nie stwierdzono natomiast tej modyfikacji u *Prokaryota* [41].

Właściwości *O*-GlcNAcyllacji bardziej przypominają fosforylację niż typowe *O*- i *N*-glikozylacje [34, 37, 38]. Przede wszystkim charakteryzuje się ona niezwykłą dynamicznością. Okres połowicznego zaniku reszt cukrowych jest bardzo krótki w porównaniu z tym samym czasem dla polipeptydu [45, 71]. Aktywacja limfocytów T myszy przez mitogen powoduje szybką i przejściową zmianę poziomu *O*-GlcNAcyllacji zarówno białek jądrowych, jak i cytoplazmatycznych [45]. Wprowadzenie i usuwanie reszt *O*-GlcNAc w przypadku wielu białek, między innymi cytokeratyn i białek jądrowych kompleksów porowych (ang. *nuclear pore complex* – NPC), zależy od fazy cyklu komórkowego [33, 35]. *O*-glikozylacja dotyczy często domen charakteryzujących się dużą zawartością sekwencji PEST wyznaczających wewnątrzkomórkowe białka do szybkiej degradacji proteolitycznej. Przyłączenie



reszt *O*-GlcNAc do tych miejsc może wpływać na obrót metaboliczny niektórych ważnych regulatorowych białek [33].

Pomimo tego że białka mające reszty *O*-GlcNAc spełniają różne funkcje, wykazują one pewne cechy wspólne [33, 36]. Przede wszystkim są one także fosforylowane. W niektórych przypadkach reszty GlcNAc i fosforanowe zajmują zamiennie te same miejsca [9, 33, 36, 37, 38]. Wszystkie *O*-glikozylowane białka mają zdolność do odwracalnego i specyficznego łączenia się z innymi białkami w multimeryczne struktury kompleksowe [33, 36].

Do tej pory zidentyfikowano około 50 białek komórkowych, zawierających reszty *O*-GlcNAc [30, 74].

## MIEJSCA PRZYŁĄCZENIA RESZT *O*-GLCNAc DO BIAŁKA

Miejsca *O*-GlcNAcytacji nie są jednoznacznie określone jak w przypadku *N*-glikozylacji, w której przyłączenie reszt cukrowych dotyczy zawsze sekwencji Asn – X – Ser/Thr [5, 15]. Wyróżnia się jednak dla nich pewne cechy wspólne. Większość znanych obecnie sekwencji, do których przyłączane są reszty *O*-GlcNAc, można podzielić na dwie klasy. Pierwsza klasa obejmuje sekwencje typu P – X<sub>1</sub> – X<sub>2</sub> – X<sub>3</sub>, w których peptyd X<sub>1</sub> – X<sub>3</sub> zawiera przynajmniej jedną resztę seryny lub treoniny oraz alifatyczny aminokwas (częstotliwość występowania Val > Ala > Gly) lub inną resztę proliny. Aromatyczne i wysoce hydrofobowe aminokwasy nie występują w peptydzie X<sub>1</sub> – X<sub>3</sub> [30, 50]. W niektórych przypadkach glikozylowana seryna lub treonina znajduje się dalej, tj. w odległości 4–5 aminokwasów od C-terminalnej strony proliny, rzadziej występuje po jej *N*-terminalnej stronie. Druga

TABELA 1. Miejsca przyłączenia reszt *O*-GlcNAc do białek jądrowych

Białko	Sekwencja	Pozycja piśmiennictwa
Klasa I (P-X <sub>1</sub> -X <sub>2</sub> -X <sub>3</sub> )		
c-MYC	FELLTPPLSPSR	[8, 9]
Białko NPC p62	MAAGPADTSDPL	[35]
Polimeraza RNA klasy II	(S/T)P(S/T)SP	[46]
	TPTSPN	[46]
	SPTSPT	[46]
	LAPVSASV	[69]
Czynnik SRF	NLPGTTSTIQT	[69]
	SPSAVSSAD	[69]
	Klasa II	
Czynnik SRF	DLTQTSSSGTVTL	[69]

klasa, znacznie mniej liczna, obejmuje te sekwencje, w których nie ma proliny (tab. 1). Należy jednak podkreślić, że wszystkie miejsca klasy drugiej występują w białkach zawierających także sekwencje klasy pierwszej. Może to sugerować, że enzymy zaangażowane w *O*-GlcNAcyłację inicjalnie rozpoznają miejsca zawierające prolinę, a dopiero potem modyfikują inne reszty Ser/Thr, które są dostępne w trójwymiarowej strukturze białka [30].

## ENZYMY PRZYŁĄCZAJĄCE I USUWAJĄCE RESZTY *O*-GlcNAc

### *N*-acetylglukozaminyłotransferaza UDP-*N*-acetylglukozamina : białko

W latach dziewięćdziesiątych w laboratorium Harta wyizolowano, oczyszczono i scharakteryzowano *N*-acetylglukozaminyłotransferazę UDP-*N*-acetylglukozamina: białko (*O*-GlcNAc transferaza) (EC. 2.4.1) z cytosolu wątroby szczura [27, 28]. Enzym ten wykorzystuje UDP-GlcNAc jako donor *N*-acetylglukozaminy przyłączając ją zarówno do syntetycznych peptydów (których sekwencja została oparta na znanych miejscach glikozylacji), jak i natywnych białek [27, 28]. Masa cząsteczkowa *O*-GlcNAc transferazy szczura wyznaczona techniką filtracji żelowej wynosi 340 kDa. Analiza oczyszczonego ponad 30 000 razy enzymu wykazała, że jest on heterotrimerem zbudowanym z dwóch podjednostek  $\alpha$  (m. cz. 110 kDa) oraz jednej podjednostki  $\beta$  (m. cz. 78 kDa). Bardzo silnymi inhibitorami *O*-GlcNAc transferazy są UDP, UTP i UDP-GlcNAc. Optymalne pH dla działania tego enzymu wynosi około 6,0. Aktywność *O*-GlcNAc transferazy utrzymuje się na dość wysokim poziomie przy wzroście pH do 7,5, lecz gwałtownie spada poniżej pH 6,0 [28]. Wersenian sodu tylko w niewielkim stopniu redukuje aktywność enzymu (ok. 30%), co sugeruje, że odmiennie niż inne transferazy nie wymaga on do swojego funkcjonowania obecności dwuwartościowych kationów [28].

Ostatnio sklonowano i scharakteryzowano gen kodujący katalityczną podjednostkę  $\alpha$  *O*-GlcNAc transferazy [49]. Gen ten jest wysoce konserwatywny i wykazuje prawie 80% identyczności u wszystkich badanych *Eukaryota* (szczur, pies, królik, człowiek), a więc istnieje możliwość, że kodowany przez niego enzym spełnia istotne funkcje w komórce. Stwierdzono, że *O*-GlcNAc transferaza w przeciwieństwie do wszystkich opisywanych wcześniej glikozyłotransferaz występuje w cytosolu i w jądrach komórkowych, co pozostaje w zgodzie z lokalizacją większości *O*-glikozylowanych białek.

Badania potranslacyjnych modyfikacji *O*-GlcNAc transferazy wykazały *O*-glikozylację enzymu, a także jego fosforylację na tyrozynie. Kinazy tyrozynowe mogą więc odgrywać rolę w regulowaniu aktywności *O*-GlcNAc transferazy i łączyć



*O*-GlcNAcyłację z kaskadą przekazywania sygnału. *O*-GlcNAc transferaza zawiera w N-terminalnej części wiele tandemowo ułożonych powtórzeń motywów TPR (ang. *tetratricopeptide repeats*; motywy sekwencyjne zawierające układ czterech, a następnie trzech konserwatywnych aminokwasów). Obecność motywów TPR, które pośredniczą w interakcjach białko-białko, sugeruje, że specyficzność lub aktywność *O*-GlcNAc transferazy może być regulowana niezależnie od centrum katalitycznego enzymu przez interakcje z czynnikami wiążącymi TPR [49].

### $\beta$ -*N*-acetylo-*D*-glukozaminidaza

W 1994 r. zidentyfikowano i scharakteryzowano  $\beta$ -*N*-acetylo-*D*-glukozaminidazę z cytosolu śledziona szczura [13]. Oczyszczony ponad 22 000 razy enzym ma masę cząsteczkową około 106 kDa i jest heterodimerem, który składa się z podjednostki  $\alpha$  (m.c. 54 kDa) oraz  $\beta$  (m.c. 51 kDa). Miejsce aktywne enzymu znajduje się w podjednostce  $\alpha$ . Subkomórkowe frakcjonowanie wykazało lokalizację tego enzymu głównie w jądrach komórkowych i cytosolu oraz jego powszechną obecność we wszystkich tkankach szczura. Badania te sugerują, że  $\beta$ -*N*-acetylo-*D*-glukozaminidaza jest włączona w usuwanie reszt *O*-GlcNAc z glikoprotein obecnych zarówno w przedziale cytoplazmatycznym, jak i nukleoplazmatycznym komórek.

Optymalne pH dla działania enzymu wynosi 6,4. W pH poniżej 5,0 zaczyna on tracić aktywność, a w pH 6,0 i wyższym ją zachowuje. Aktywność enzymu jest efektywnie hamowana przez różne analogi GlcNAc, takie jak: 1-amino-GlcNAc, 1-azydo-GlcNAc, LOGNAC [lakton 1,5-(2-acetamido-2-deoksy-*D*-glukonohydroksymowy)] i PUGNAC [O-(2-acetamido-2-deoksy-*D*-glukopiranozylideno)amino-*N*-fenylokarbaminian] [13, 31].  $\beta$ -*N*-acetylo-*D*-glukozaminidaza wykazuje o wiele większą aktywność względem syntetycznych glikopeptydów mających *O*-GlcNAc niż inne heksozaminidazy. W przeciwieństwie do kwasowych lizosomowych heksozaminidaz aktywność tego enzymu nie jest hamowana przez GalNAc lub jej analogi i nie reaguje z przeciwciałami przeciwko kwasowemu heksozaminidazom. Na aktywność enzymu nie wpływa obecność wersenianu sodu [13].

## **O-GLIKOZYLOWANE BIAŁKA JĄDROWE**

### Glikoproteiny związane z transportem jądrowo-cytoplazmatycznym

Otoczka jądrowa jest substrukturą jądra komórkowego mającą największy odsetek glikoprotein zawierających reszty *O*-GlcNAc. Glikoproteiny te (nukleoporyny) są składnikami jądrowych kompleksów porowych, w których stanowią od 2 do 3% wszystkich białek. Białka mające reszty *O*-GlcNAc są rozpoznawane przez lektynę z kielków pszenicy (ang. *wheat germ agglutinin* – WGA) oraz przeciwciała skier-

rowane przeciwko białkom NPC, dla których *O*-glikozydowo przyłączone reszty *N*-acetyloglukozaminy stanowią ważną część determinanty antygenowej [65, 74]

Z kolejności kodonów cDNA wydedukowano sekwencje aminokwasowe pięciu *O*-glikozylowanych nukleoporyn. Cechą charakterystyczną ich struktury pierwszorzędowej jest występowanie pentapeptydowego motywu XFXFG [65].

Głównym i najlepiej poznany glikozylowany białkiem jądrowych kompleksów porowych jest glikoproteina p62. Sekwencję aminokwasową podano dla p62 żaby *Xenopus laevis*, szczura, myszy i człowieka [7, 11, 75]. W cząsteczce p62 można wyróżnić region C-terminalny z  $\alpha$ -heliksowymi domenami zawierającymi charakterystyczne powtórzenia hydrofobowych reszt w heptadach oraz część N-terminalną charakteryzującą się występowaniem serii zdegenerowanych pentapeptydowych powtórzeń XFXFG [6, 65]. Cordes i wsp. [11] z cDNA wydedukowali 526- i 547-aminokwasową sekwencję białka p62 NPC odpowiednio myszy i żaby *Xenopus laevis*. Analiza sekwencji tych dwóch białek wykazała wysoką konserwatywność regionu C-terminalnego, dla którego stwierdzono aż 87% identyczności składu aminokwasowego. Modyfikacja p62 myszy i żaby *Xenopus* przez reszty *O*-GlcNAc dotyczy głównie regionu N-terminalnego. W p62 myszy większość miejsc glikozylacji jest zlokalizowana pomiędzy 222. a 339. aminokwasem i obejmuje 18–22 reszt, a u *Xenopus* – pomiędzy 153. a 352. aminokwasem i dotyczy 15–18 potencjalnych miejsc glikozylacji.

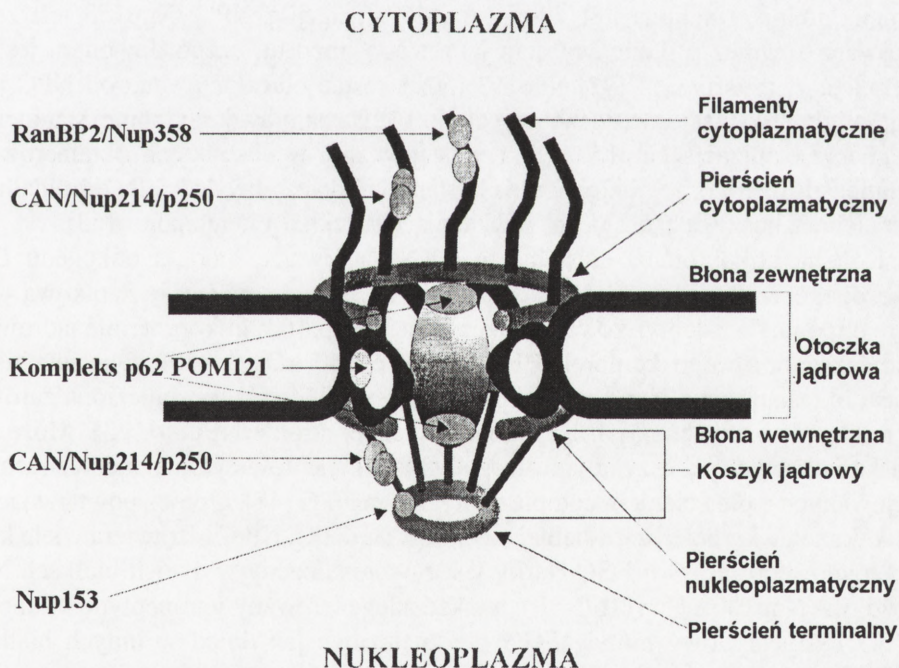
Cząsteczka p62 szczura (525 aminokwasów) zawiera 10–12 reszt *N*-acetyloglukozaminy [53]. W C-końcowym regionie znajduje się jedno znane miejsce glikozylacji na Ser 471. Większość miejsc glikozylacji (60%) w p62 szczura występuje w obrębie sześciu zgrupowanych reszt seryny w centralnym regionie bogatym w Ser/Thr znajdującym się pomiędzy Ser 270. a Thr 294. Uważa się, że domena ta funkcjonuje jako region łącznikowy pomiędzy częścią aminoterminalną o strukturze  $\beta$  i karboksyterminalną o strukturze  $\alpha$ -heliksu. *O*-glikozylacja i fosforylacja tego łącznikowego regionu może prowadzić do dynamicznych zmian konformacji p62 w czasie montażu i demontażu jądrowych kompleksów porowych [53].

Emig i wsp. [19] stwierdzili, że wiele białek otoczki jądrowej komórek neuroblastomy jest sjalowanych, o czym świadczy wiązanie lektyny z dzikiego bzu czarnego (*Sambucus nigra agglutinin* – SNA), która rozpoznaje reszty kwasu sjalowego przyłączone wiązaniem  $\alpha$ -2,6 do galaktozy lub *N*-acetylogalaktozaminy (GalNAc). Glikoproteina najsilniej reagująca ze SNA wydaje się być homologiem p62 szczura. Autorzy sugerują, że reszty kwasu sjalowego są przyłączone do pojedynczych reszt *O*-GlcNAc, co oznaczałoby, że SNA wykazuje także inną niż początkowo sądzono specyficzność. Mechanizm i miejsce takiej glikozylacji nie są jednak znane. Reszty kwasu sjalowego prawdopodobnie odgrywają funkcjonalną rolę w transporcie jądrowo-cytoplazmatycznym, ponieważ wiązanie SNA blokuje jądrowy transport białek [19].



Białka NPC mogą ze sobą wchodzić w interakcje i tworzyć kompleksy. Kompleksy nukleoporyn wątroby szczura, w których uczestniczy p62, zostały wyizolowane i scharakteryzowane przez wielu badaczy [6, 21, 25, 47]. Ustalono, że p62 szczura występuje w połączeniu z trzema innymi białkami o masach cząsteczkowych około 58 kDa (p58), 54 kDa (p54) i 45 kDa (p45) [25]. Kompleks ten ma masę około 220 kDa i zawiera po jednej kopii każdego z 4 białek. Poliptyd p45 był zasocjowany z kompleksem tylko wtedy, gdy zastosowano wyjątkowe warunki zapobiegające degradacji proteolitycznej podczas jego izolowania. Kompleks wykazuje tendencję do łączenia się w struktury oligomeryczne, stąd obserwowane wcześniej różnice jego masy cząsteczkowej [6, 21, 25, 47].

Lokalizację p62 w architekturze jądrowego kompleksu porowego zbadano przy wykorzystaniu monoklonalnych przeciwciał RL31, które reagują specyficznie z p62 szczura [25]. Okazało się, że p62 występuje zarówno po cytoplazmatycznej, jak i nukleoplazmatycznej stronie NPC w pobliżu centralnego kompleksu kanałowego (rys. 1). Ta lokalizacja jest zgodna z przypuszczeniami, że kompleks p62 jest włączony w import białek do jądra i eksport RNA oraz może sugerować bezpośrednio



RYSUNEK 1. Schemat przedstawiający lokalizację epitopów głównych O-glikozylowanych białek jądrowego kompleksu porowego (wg [65] zmodyfikowany)

wiązanie się p62 z ligandem, który jest aktywnie transportowany przez NPC [21, 65].

Na początku lat dziewięćdziesiątych sklonowano i zsekwencjonowano cDNA dla nukleoporyny o masie cząsteczkowej 153 kDa (Nup153) [54, 77]. W cząsteczce Nup153 można wyróżnić 3 domeny: liczące po około 600 aminokwasów domeny amino- i karboksyterminalną oraz 240-aminokwasową domenę centralną. W C-terminalnej części Nup153 znajduje się powyżej 37 kopii zdegenerowanego penta-peptydowego motywu XFXFG. Ta część Nup153 komórek HeLa jest bogata w serynę i jest regionem przyłączonych *O*-glikozydowo reszt *N*-acetyloglukozaminy [54]. W Nup153 wątroby szczura aminokwasy te są rozproszone w całej cząsteczce [77]. W domenie centralnej Nup153 zawiera 4 motywy palców cynkowych, z których każdy ma dwie pary reszt cysteiny (Cys<sub>2</sub> – Cys<sub>2</sub>). Fragment Nup153 zawierający te motywy wiąże DNA w sposób zależny od cynku [77]. Sugeruje się, że Nup153 odgrywa rolę w przyłączaniu transkrybowanych genów do NPC i ułatwia eksport zsyntetyzowanych RNA [77]. Za słusznością tej hipotezy przemawia lokalizacja Nup153 w pobliżu terminalnego pierścienia „koszyka jądrowego” [63]. Bastos i wsp. [3] sugerują, że karboksyterminalna domena Nup153 reprezentuje miejsce dokowania dla cząsteczek mRNA wychodzących z jądra komórkowego, natomiast domena aminoterminalna jest wymagana do asocjacji z NPC. Nup153 jest zaangażowana również w końcowy etap jądrowego importu, czego dowodem jest jej interakcja z importyną β [72]. Nup153 może zostać oddysocjowana od NPC jako homooligomer o masie cząsteczkowej około 1 MDa najprawdopodobniej stanowiący oktamer. Lokalizacja Nup153 i fakt występowania w ekstraktach oktamerowego kompleksu sugeruje, że nukleoporyna ta stanowi podstawowy szkielet terminalnego pierścienia „koszyka jądrowego” wykazującego układ oktagonalny [63].

Kolejną glikoproteiną jest białko CAN stanowiące produkt onkogenu *CAN* włączonego w reorganizację chromosomów związaną z białeczką szpikową [48], które odpowiada zidentyfikowanej przez Panté i wsp. [64] glikoproteinie jądrowego kompleksu porowego komórek BHK o masie 250 kDa (p250). Obecnie białko to jest określane jako Nup214. Nukleoporyna Nup214 została znaleziona zarówno po nukleoplazmatycznej, jak i cytoplazmatycznej stronie NPC [4, 23]. Może być ona komponentem „koszyka jądrowego” oraz filamentów cytoplazmatycznych zasocjowanych z pierścieniem cytoplazmatycznym NPC [48]. Oprócz powtarzających się w domenie karboksyterminalnej motywów XFXFG, Nup214 zawiera wiele kopii tripeptydowego motywu FGQ (który jest również obecny w dwóch białkach NPC drożdży – Nup100 i Nup116/NSP), a także zdegenerowany tetrapeptydowy motyw SVFG i tripeptydowy motyw FGG nie znalezione jak dotąd w innych białkach NPC. Ponadto w tej domenie znajduje się znaczna liczba reszt seryny i treoniny – potencjalnych miejsc wiązania GlcNAc. W domenie centralnej Nup214 zawiera motyw zamka leucynowego, który może odgrywać rolę w interakcjach białko – białko [65].



Innym ważnym składnikiem jądrowego kompleksu porowego jest nukleoporyna RanBP2/Nup358 (3224 aminokwasy) zawierająca 26 kopii pentapeptydowego motywu XFXFG [79, 80]. RanBP2/Nup358 wiąże się z przeciwciałami monoklonalnymi RL1, które rozpoznają specyficznie białka NPC posiadające reszty *O*-GlcNAc, ale w przeciwieństwie do pozostałych białek tej rodziny nie wiąże WGA, co wskazuje, że liczba reszt *O*-GlcNAc w tym białku jest raczej mała [65]. Oprócz powtórzeń pentapeptydowych sekwencji XFXFG, w pierwszorzędowej strukturze białka można wyróżnić osiem motywów palców cynkowych podobnych do tych występujących w Nup153 oraz N-terminalną bogatą w leucynę domenę zawierającą motyw zamka leucynowego [79]. Lokalizacja RanBP2/Nup358 w obrębie filamentów cytoplazmatycznych NPC może sugerować, że stanowi ona najprawdopodobniej miejsce inicjalnego wiązania transportowanego substratu [79]. Ponadto RanBP2/Nup358 wiąże małą GTPazę Ran/TC4 będącą głównym czynnikiem komórek ssaków i oocytów *Xenopus laevis* zaangażowanym bezpośrednio w import białek i eksport RNA przez NPC na etapie zależnej od energii translokacji oraz przyłącza białka stymulujące aktywność GTPazową Ran – RanGAP1 i RanBP1. W sekwencji aminokwasowej RanBP2/Nup358 znajdują się 4 domeny wiążące Ran/TC4-GTP homologiczne do występujących w białku RanBP1 również wiążącym Ran/TC4-GTP [10, 56, 57, 60, 61, 80].

W 1995 r. zidentyfikowano i scharakteryzowano *O*-glikozylowane białko ekstraktów jaj *Xenopus laevis* o masie cząsteczkowej 97 kDa, które jest pierwszą nukleoporyną kręgowców zawierającą powtórzenia tetrapeptydowego motywu GLFG charakterystycznego dla nukleoporyn drożdży [66]. Radu i wsp. [68] z kolejności kodonów w cDNA określili sekwencję nukleoporyny szczura o masie cząsteczkowej 98 kDa (937 aminokwasów) – homologu 97 kDa nukleoporyny *Xenopus laevis*. Powers i wsp. [66] przy zastosowaniu mikroskopii immunofluorescencyjnej stwierdzili, że występuje ono przy otoczce jądrowej oraz wewnątrz jądra. Nup98/p97 podobnie jak nukleoporyny drożdży w karboksyterminalnej domenie zawiera motyw wiążący RNA [66]. Jak wykazano ostatnio, Nup98 nie jest zaangażowana w import białek do jądra, ale stanowi istotny element mechanizmu eksportu RNA [67].

*O*-glikozylowanymi są również integralne białka błonowe zakotwiczone w „błonie porowej” otoczki jądrowej powstającej w miejscu zetknięcia się jej zewnętrznej i wewnętrznej błony od strony jądrowego kompleksu porowego. Integralne białko błonowe jądrowego kompleksu porowego POM121 wiąże WGA, a więc posiada reszty *O*-GlcNAc. W POM121 można wyróżnić 44-aminokwasowy segment transmembranowy, krótką 28-aminokwasową domenę N-terminalną ulokowaną w przestrzeni międzybłonowej otoczki jądrowej oraz długą, stanowiącą ponad 90% masy całego białka domenę C-terminalną (1127 aminokwasów), w której zlokalizowane są miejsca glikozylacji oraz charakterystyczne dla rodziny nukleoporyn powtórzenia motywu sekwencyjnego XFXFG (23 kopie). Uważa się, że POM121 podobnie jak inna integralna glikoproteina błonowa gp210 uczestniczy w przyłączaniu NPC do

„błony porowej” otoczki jądrowej [26]. Segment transmembranowy zakotwiczący POM121 w „błonie porowej” otoczki jądrowej oddziałuje z analogicznymi odcinkami innych białek, o ile mają strukturę  $\alpha$ -heliksu (np. gp210) tworząc dimer.

Jak dotąd nie rozstrzygnięto kwestii roli *O*-glikozylacji w transporcie jądrowo-cytoplazmatycznym. WGA i przeciwciała monoklonalne przeciwko glikoproteinom jądrowego kompleksu porowego blokują transport RNA i białek posiadających sekwencje lokalizacji jądrowej (ang. *nuclear localization sequence lub signal* – NLS) [1, 12, 22, 24, 59]. Okazało się, że chociaż pozbawienie cytosolowego ekstraktu jaj *Xenopus laevis* glikoprotein zawierających *O*-GlcNAc pozwala na odtworzenie niezmiennych morfologicznie jądrowych kompleksów porowych, to jednak są one niezdolne do wiązania i translokacji transportowanych substratów [38, 58]. Glikoproteiny jądrowych kompleksów porowych unieruchomione na złożu Sepharose-WGA lub monoklonalne przeciwciała pozbawiają reticulocyty rozpuszczalnych cytosolowych czynników odpowiedzialnych za pośredniczenie w transporcie białek jądrowych [76]. Sugeruje to bezpośrednie interakcje białek mających reszty *O*-GlcNAc z rozpuszczalnymi czynnikami uczestniczącymi w transporcie jądrowo-cytoplazmatycznym.

Niezależnie od ogromnego znaczenia glikoprotein NPC w transporcie jądrowo-cytoplazmatycznym rola ich reszt cukrowych jest nieznana [39]. Aby rozstrzygnąć tę kwestię, odtworzono jądrowe kompleksy porowe *Xenopus laevis* z białkami zawierającymi reszty *O*-GlcNAc zmodyfikowane przez enzymatyczne przyłączenie galaktozy [58]. Nie stwierdzono żadnego wpływu tej modyfikacji ani na strukturę NPC, ani na transport jądrowy, a więc wydaje się, że same reszty *O*-GlcNAc nie są krytyczne dla funkcjonowania kompleksów porowych.

U drożdży obecnie zidentyfikowano ponad trzydzieści nukleoporyn [2, 7, 14, 20, 62]. Niektóre z nich, np. Nsp1 i Nup1, reagują z przeciwciałami wytworzonymi przeciwko nukleoporynom szczura i jak stwierdzono zawierają regiony z powtarzającymi się sekwencjami FXFG. Nie zaobserwowano jednak występowania reszt *O*-GlcNAc w żadnym z białek NPC drożdży, ani też WGA nie wiąże się z NPC drożdży [20, 40]. Duverger i wsp. [16, 17, 18] zaproponowali interesującą hipotezę udziału reszt cukrowych w transporcie jądrowo-cytoplazmatycznym jako niepeptydowych sygnałów lokalizacji jądrowej. Przeprowadzili oni wnikliwe badania importu syntetycznych glikoprotein (neoglikoprotein) w komórkach HeLa permeabilizowanych digitoniną. Neoglikoproteinę stanowiła albumina surowicy wołu z przyłączonymi resztami cukrowymi. Stwierdzono, że import neoglikoprotein jest uzależniony od rodzaju przyłączonych reszt cukrowych. Neoglikoproteiny zawierające *N*-acetylogalaktozaminę oraz mannozo-6-fosforan lub galaktozo-6-fosforan nie były transportowane do jądra komórkowego w przeciwieństwie do tych posiadających nieufosforylowaną mannozę, glukozę, fukozę czy di-*N*-acetylochitobiozę. Okazało się także, że import neoglikoprotein podobnie jak import białek jest procesem wymagającym energii. Jeśli badane komórki były inkubowane w

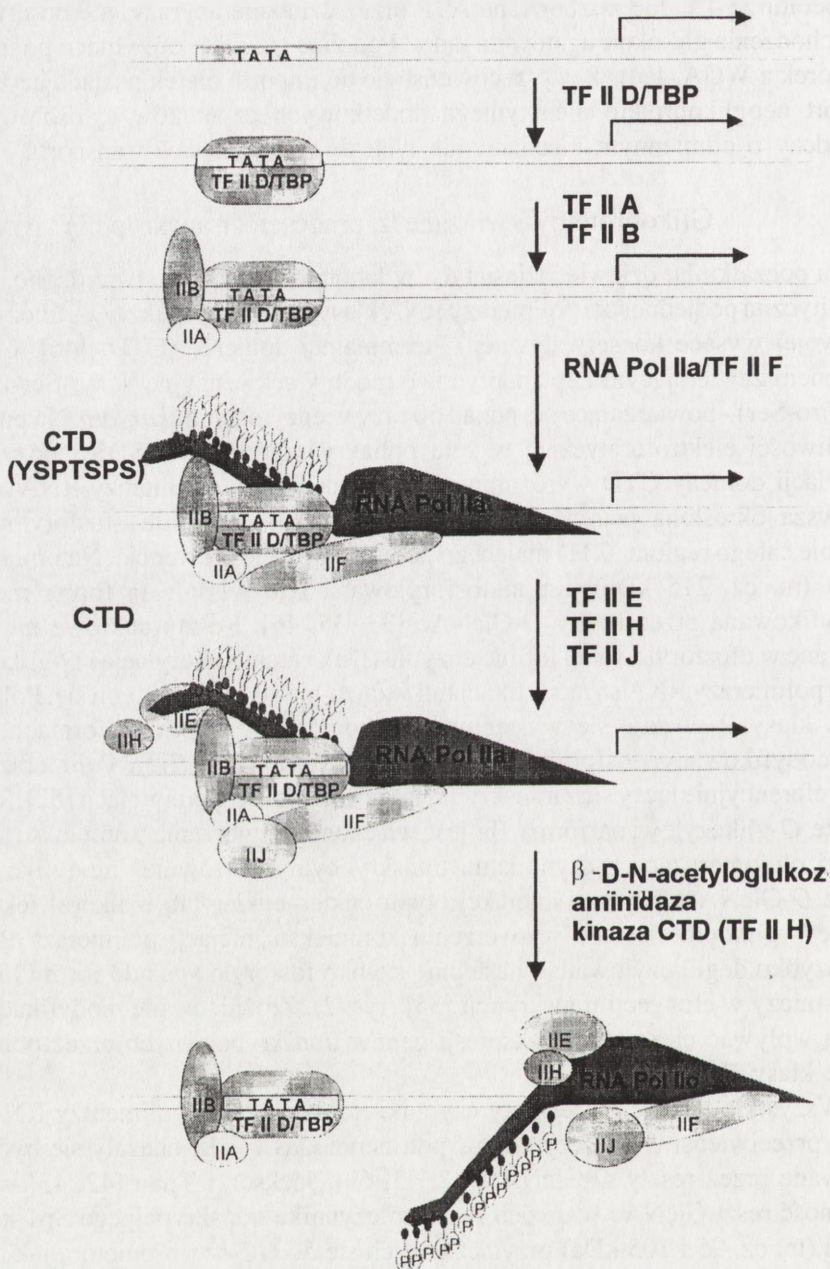


temperaturze 4°C lub pozbawione ATP przez działanie apyrazy, nie obserwowano przechodzenia glikokoniugatów do jądra. Podobne rezultaty otrzymano po inkubacji komórek z WGA. Jednak w przeciwieństwie do importu białek posiadających NLS, import neoglikoprotein nie wymaga dodatkowych czynników cytosolowych, co świadczy o odmiennym mechanizmie tych dwóch procesów transportu.

### Glikoproteiny związane z procesem transkrypcji

Na początku lat dziewięćdziesiątych w laboratorium Harta stwierdzono, że duża katalityczna podjednostka polimerazy RNA klasy II może być także *O*-glikozylowana w swojej wysoce konserwatywnej C-terminalnej domenie (CTD) [46]. CTD jest regionem zawierającym heptapeptydowe moduły sekwencyjne –(Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser)– powtarzające się ponad 50 razy w enzymach *Eukaryota*. Na podstawie ruchliwości elektroforetycznej w żelu poliakrylamidowym z SDS i poziomu fosforylacji domeny CTD wyróżniono dwie różne formy polimerazy RNA klasy II. Pierwsza określona jako Ilo (m. cz. 240 kDa) jest znacznie ufosforylowana w obrębie całego regionu CTD mającego powtarzające się sekwencje. Natomiast druga – Ila (m. cz. 215 kDa) jest niefosforylowana i to właśnie ta forma może być modyfikowana przez reszty *O*-GlcNAc [33, 35, 46]. Reszty cukrowe nie są wykrywane w ufosforylowanej formie enzymu (Ilo), zatem fosforylacja i *O*-glikozylacja CTD polimerazy RNA są modyfikacjami wzajemnie wykluczającymi się. Polimeraza RNA klasy II wydaje się występować w komórce w trzech izoformach: enzym niezmodyfikowany, fosforylowany (Ilo) i glikozylowany (Ila). Polimeraza RNA Ila preferencyjnie łączy się z transkrypcyjnym kompleksem preinicjacji [52]. Sugeruje się, że *O*-glikozylowana forma Ila jest włączona w tworzenie kompleksu inicjacji dzięki oligomeryzacji z czynnikami transkrypcyjnymi (również modyfikowanymi przez *O*-GlcNAc) poprzez interakcje typu cukier–cukier lub białko(a) lektynopodobne – glikoproteina. Po wytworzeniu kompleksu inicjacji polimeraza RNA Ila jest szybko deglikozylowana i następnie szybko fosforylowana do formy Ilo, która uczestniczy w elongacji transkrypcji [35] (rys. 2). Zróżnicowane modyfikacje CTD mogą wpływać na regulację ekspresji genów transkrybowanych przez polimerazę RNA klasy II.

Wszystkie badane do tej pory czynniki transkrypcyjne polimerazy RNA klasy II, w przeciwieństwie do czynników polimeraz klas I i III, okazały się być modyfikowane przez reszty *O*-GlcNAc [42, 43, 69]. Jackson i Tjian [42, 43] wykazali obecność reszt GlcNAc w dwóch formach czynnika transkrypcyjnego Sp1 komórek HeLa (m. cz. 95 i 105 kDa) przyłączających się do *GC-box* promotora jak również w dwóch czynnikach z grupy CTF (ang. *CCAAT-binding transcription factor*) (m. cz. 62 i 64 kDa) przyłączających się do sekwencji CCAAT. Glikozylowana forma Sp1 wydaje się być bardziej efektywna w aktywacji transkrypcji od nieglikozylowanej. Stwierdzono, że WGA silnie wiąże się z czynnikiem Sp1 poprzez reszty



RYSUNEK 2. Model przedstawiający udział *O*-GlcNAcyacji karboksyterminalnej domeny (CTD) polimerazy RNA klasy II oraz jej czynników transkrypcyjnych w inicjacji transkrypcji (wg [35] zmodyfikowany): TBP (ang. *TATA box-binding protein*) – białko wiążące się z motywem TATA; TF (ang. *transcription factor*) – czynnik transkrypcyjny; Pol II RNA – polimeraza RNA klasy II



O-GlcNAc i hamuje aktywację transkrypcji, ale nie wpływa na przyłączanie Sp1 do DNA.

Ostatnio stwierdzono interakcję pomiędzy czynnikiem transkrypcyjnym Sp1 a białkiem jądrowych kompleksów porowych p62 *in vitro* i *in vivo* [32]. Regionem p62 niezbędnym do związania Sp1 jest odcinek C-końcowy, w którym nie występują reszty *N*-acetyloglukozaminy, co sugeruje, że główny sposób interakcji pomiędzy Sp1 i p62 nie zależy od glikozylacji p62. Autorzy nie odrzucają jednak całkowicie możliwości udziału w tych interakcjach reszt O-GlcNAc czynnika Sp1 lub *N*-terminalnej części p62. Obserwowana zdolność interakcji Sp1 z p62 może tłumaczyć ułatwienie translokacji czynników podobnych do Sp1 na peryferie jądra komórkowego, gdzie zachodzi transkrypcja. Stwierdzona interakcja Sp1 z p62 pozostaje w zgodzie z koncepcją, że jądrowy kompleks porowy łącznie z innymi elementami struktury matryks jądrowej odgrywa rolę w przestrzennej organizacji procesu transkrypcji.

Czynnik wrażliwości na surowicę krwi SRF (ang. *serum response factor*) jest powszechnym 508-aminokwasowym czynnikiem transkrypcyjnym, który wiąże się ze SRE (ang. *serum response element*) – regulatorowym elementem zlokalizowanym w promotorach wielu genów, które są szybko transkrybowane w następstwie stymulacji komórek przez czynniki wzrostu [69]. Reason i wsp. [69] wykazali obecność oraz określili lokalizację reszt O-GlcNAc na czynniku transkrypcyjnym p67<sup>SRF</sup> ulegającym ekspresji w linii komórek owadów. Cztery miejsca O-GlcNAcytacji w rekombinantach p67<sup>SRF</sup> zidentyfikowano w C-terminalnym regionie białka. Trzy spośród tych miejsc zawierają reszty seryny w krótkich tandemowych powtórzeniach. Największy poziom glikozylacji stwierdzono na resztach seryny (Ser)<sub>3</sub> w peptydzie rozciągającym się między 374. a 391. aminokwasem, który jest usytuowany w domenie transaktywacji. Pozostałe miejsca glikozylacji p67<sup>SRF</sup> są zlokalizowane w regionie białka pomiędzy domeną wiążącą DNA i transaktywacji. Żadne z czterech miejsc glikozylacji nie znajdowało się w pobliżu miejsc fosforylacji katalizowanej przez kinazę kazeinową II. Fakt, że jedno miejsce glikozylacji w p67<sup>SRF</sup> jest zlokalizowane w domenie transaktywacji, a trzy inne w regionie pomiędzy domeną wiążącą DNA i aktywacji, sugeruje, że glikozylacja może odgrywać rolę w kontrolowaniu transkrypcji. Możliwe, że *in vivo* reszty O-GlcNAc na czynnikach transkrypcyjnych, takich jak SRF, odgrywają rolę w regulowaniu ich obrotu metabolicznego, lokalizacji jądrowej, kontrolowaniu fosforylacji lub pośredniczeniu w odwracalnej asocjacji z innymi czynnikami transkrypcyjnymi i/lub polimerazą RNA klasy II.

Glikozylowany jest także receptor estrogenów (ER) [44]. Receptor estrogenów jest aktywowany przez ligand czynnikiem transkrypcyjnym, który moduluje specyficzną ekspresję genu poprzez wiązanie się ze specyficznymi sekwencjami regulatorowymi DNA określanymi jako sekwencje warunkujące odpowiedź na estrogen (ang. *estrogen response elements* – ERE). Prawie wszystkie receptory hormonów

sterydowych są fosfoproteinami. ER myszy i człowieka jest hiperfosforylowany na resztach seryny w obecności estradiolu. Stwierdzono również fosforylację tyrozyny. Jiang i Hart [44] wykazali, że znaczna populacja (10% lub więcej) receptorów estrogenów myszy, wołu i człowieka jest także modyfikowana przez *O*-GlcNAc, a główne miejsce przyłączenia reszty cukrowej stanowi Thr 575. występująca w sekwencji PEST w karboksyterminalnej domenie F. Autorzy nie wykluczają możliwości *O*-GlcNAcytacji również Ser 576.. Sugeruje się, że dynamiczna *O*-glikozylacja ER może odgrywać kluczową rolę w regulacji transkrypcji przez modulowanie aktywności tego czynnika. Z drugiej strony glikozylacja w regionie PEST może zabezpieczać białko przed proteolizą.

W laboratorium Harta udowodniono, że *c*-MYC produkt protoonkogenu *c*-MYC (439-aminokwasowe białko jądrowe) będący fosfoproteiną ma również reszty *O*-GlcNAc [8, 9]. Modyfikację *c*-MYC przez reszty GlcNAc wykazano między innymi stosując chromatografię powinowactwa na złożu Sepharose-WGA oraz kowalencyjne przyłączanie galaktozy ze znakowanej UDP[<sup>3</sup>H]-galaktozy przy udziale  $\beta$ -D-galaktozylotransferazy UDPgalaktoza: *N*-acetyloglukozamina mleka krowy. Zastosowanie PNGazy F (odłączającej reszty cukrowe połączone *N*-glikozydowo) nie usunęło znakowania, co wykazało, że reszty *N*-acetyloglukozaminy w *c*-MYC są przyłączone *O*-glikozydowo. Główne miejsce *O*-GlcNAcytacji zlokalizowano w *N*-terminalnie położonej domenie aktywacji transkrypcji i jest nim treonina w pozycji 58., która stanowi także główne miejsce fosforylacji *in vivo* [9]. Mutacja Thr58. określanej mianem „gorącego miejsca” *c*-MYC często stwierdzana w białkach *v*-Myc retrowirusów, w chłoniaku Burkitta i białaczkach związanych z AIDS powoduje zwiększenie zdolności do transformacji nowotworowej komórek w kulturach oraz wzrost indukcji nowotworowej u zwierząt. Wymienna glikozylacja i fosforylacja tej mającej duże znaczenie biologiczne reszty aminokwasowej może odgrywać ważną rolę regulacyjną w funkcjonowaniu *c*-MYC [8, 9].

Białko p53 będące supresorem nowotworów i czynnikiem transkrypcyjnym, zmutowane w około połowie wszystkich ludzkich nowotworów, jest *O*-glikozylowane w swojej C-terminalnej domenie. p53 z ludzkich komórek linii EB-1 ma wysoką transkrypcyjną aktywność i wysokie powinowactwo do wiązania DNA. Biologiczna aktywność i powinowactwo do DNA p53 z EB-1 są zależne od obecności reszt *O*-GlcNAc, które maskują zasadowy region C-terminalnej części p53 normalnie hamujący wiązanie DNA. Dynamiczna *O*-GlcNAcyłacja tego regionu może odgrywać rolę w modulowaniu powinowactwa białka do DNA [73].

*O*-glikozylowany jest także duży antygen T wirusa SV40 (m. cz. 90 kDa), który odgrywa podstawową rolę w wirusowej infekcji komórek gospodarza. Wykazuje on wiele biologicznych właściwości, takich jak: wiązanie DNA, hydroliza ATP, wiązanie i inaktywacja białek supresorowych p53 i produktu genu siatkówczaka *RB* (retinoblastoma) (p110<sup>Rb</sup>) [55]. Medina i wsp. [55] wykazali obecność reszt *O*-GlcNAc w *N*-terminalnym regionie antygeny T. Główne miejsce *O*-glikozylacji



znajduje się na resztach seryny w pozycji 111. i 112., gdyż podstawienie tych reszt alaniną powoduje znaczące obniżenie ilości przyłączanej do antygeny T [<sup>3</sup>H]-glukozaminy. Reszty seryny 111. i 112. mogą odgrywać ważną rolę w funkcjonowaniu antygeny T. Przede wszystkim reszty te znajdują się w regionie odpowiedzialnym za wiązanie produktu genu *RB* retinoblastomy (aminokwasy od 105. do 115.), a więc niewykluczone, że ich modyfikacja przez *O*-GlcNAc wpływa na interakcje z białkiem p110<sup>Rb</sup>. Ponadto podstawienie tych reszt seryny alaniną powoduje znaczne obniżenie wydajności replikacji wirusa SV40. Seryny 111. i 112. są znanymi miejscami fosforylacji, a seryna 112. jest fosforylowana *in vitro* przez kinazę kazeinową II. Istnieje możliwość, że *in vivo* reszty *O*-GlcNAc współzawodniczą z resztami fosforanowymi o te miejsca, co służy regulacji poziomu fosforylacji białka [55].

## PODSUMOWANIE

Pomimo tego że *O*-glikozylację białek jądrowych odkryto już kilkanaście lat temu, modyfikacja ta nadal nie jest w wystarczającym stopniu poznana. Obecnie wiadomo, że *O*-GlcNAcylation jest modyfikacją bardzo powszechną i dynamiczną. Nie rozstrzygnięto jednak kwestii jej funkcjonalnego znaczenia w komórce, choć istnieją na ten temat pewne sugestie. Szczególnie interesująca wydaje się koncepcja roli *O*-glikozylacji jako antagonisty fosforylacji. Współzawodnictwo pomiędzy resztami *O*-GlcNAc i fosforanowymi o miejsca wiązania może przyczyniać się do bardziej złożonej, niż początkowo sądzono, regulacji szeregu procesów komórkowych, np. transkrypcji. Dalsza identyfikacja miejsc przyłączania reszt *O*-GlcNAc do białek jest więc istotna dla zrozumienia funkcjonalnej roli tej modyfikacji w komórce. Wydaje się, że obserwowany ostatnio rozwój metod chemicznych i immunologicznych wykorzystywanych do badania glikoprotein oraz dostępność inhibitorów enzymów włączonych w glikozylację i deglikozylację pozwolą w niedalekiej przyszłości uzyskać odpowiedź na najbardziej nurtujące pytania dotyczące znaczenia *O*-glikozylacji białek jądrowych.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ADAM EJH, ADAM SA. Identification of cytosolic factors required for nuclear location sequence-mediated binding to the nuclear envelope. *J Cell Biol* 1994; **125**: 547–555.
- [2] AITCHISON JD, ROUT MP, MARELLI M, BLOBEL G, WOZNIAK RW. Two novel related yeast nucleoporins Nup170p and Nup157p: complementation with the vertebrate homologue Nup155p and functional interactions with the yeast nuclear pore-membrane protein Pom152p. *J Cell Biol* 1995; **131**: 1133–1148.

- [3] BASTOS R, LIN A, ENARSON M, BURKE B. Targeting and function in mRNA export of nuclear pore complex protein Nup153. *J Cell Biol* 1996; **134**: 1141–1156.
- [4] BOER JM, VAN DEURSEN JMA, CROES HJ, FRANSEN JAM, GROSVELD GC. The nucleoporin CAN/Nup214 binds to the both the cytoplasmic and the nucleoplasmic sides of the nuclear pore complex in overexpressing cells. *Exp Cell Res* 1997; **232**: 182–185.
- [5] BURDA P, AEBI M. The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1426**: 239–257.
- [6] BUSS F, STEWART M. Macromolecular interactions in the nucleoporin p62 complex of rat nuclear pores: binding of nucleoporin p54 to the rod domain of p62. *J Cell Biol* 1995; **128**: 251–261.
- [7] CARMO-FONSECA M, KERN H, HURT EC. Human nucleoporin p62 and the essential yeast nuclear pore protein NSP1 show sequence homology and a similar domain organization. *Eur J Cell Biol* 1991; **55**: 17–30.
- [8] CHOU T-Y, DANG CV, HART GW. Glycosylation of the c-Myc transactivation domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 4417–4421.
- [9] CHOU T-Y, HART GW, DANG CV. c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *J Biol Chem* 1995; **270**: 18961–18965.
- [10] COLE CN, HAMMELL CM. Nucleocytoplasmic transport: driving and directing transport. *Curr Biol* 1998; **8**: 368–372.
- [11] CORDES V, WAIZENEGGER I, KROHNE G. Nuclear pore complex glycoprotein p62 of *Xenopus laevis* and mouse: cDNA cloning and identification of its glycosylated region. *Eur J Cell Biol* 1991; **55**: 31–47.
- [12] DAVIS LI. The nuclear pore complex. *Annu Rev Biochem* 1995; **64**: 865–896.
- [13] DONG DL-Y, HART GW. Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. *J Biol Chem* 1994; **269**: 19321–19330.
- [14] DOYE V, HURT EC. Genetic approaches to nuclear pore structure and function. *Trends Genet* 1995; **11**: 235–241.
- [15] DRICKAMER K, TAYLOR ME. Evolving views of protein glycosylation. *TIBS* 1998; **23**: 321–324.
- [16] DUVERGER E, CARPENTIER V, ROCHE A-C, MONSIGNY M. Sugar-dependent nuclear import of glycoconjugates from the cytosol. *Exp Cell Res* 1993; **207**: 197–201.
- [17] DUVERGER E, PELLERIN-MENDES C, MAYER R, ROCHE A-C, MONSIGNY M. Nuclear import of glycoconjugates is distinct from the classical NLS pathway. *J Cell Sci* 1995; **108**: 1325–1332.
- [18] DUVERGER E, ROCHE A-C, MONSIGNY M. N-acetylglucosamine-dependent nuclear import of neoglycoproteins. *Glycobiology* 1996; **6**: 381–386.
- [19] EMIG S, SCHMALZ D, SHAKIBAEI M, BUCHNER K. The nuclear pore complex protein p62 is one of several sialic acid-containing proteins of the nuclear envelope. *J Biol Chem* 1995; **270**: 13787–13793.
- [20] FABRE E, HURT E. Yeast genetics to dissect the nuclear pore complex and nucleocytoplasmic trafficking. *Annu Rev Genet* 1997; **31**: 277–313.
- [21] FINLAY DR, MEIER E, BRADLEY P, HORECKA J, FORBES DJ. A complex of nuclear pore proteins required for pore function. *J Cell Biol* 1991; **114**: 169–183.
- [22] FORBES DJ. Structure and function of the nuclear pore complex. *Annu Rev Cell Biol* 1992; **8**: 495–527.
- [23] FORNEROD M, VAN DEURSEN J, VAN BAAL S, REYNOLDS A, DAVIS D, MURTI KG, FRANSEN J, GROSVELD G. The human homologue of yeast CRM1 is in a dynamic subcomplex with CAN/ Nup214 and a novel nuclear pore component Nup88. *EMBO J* 1997; **4**: 807–816.



- [24] GREBER UF, GERACE L. Nuclear protein import is inhibited by an antibody to a luminal epitope of a nuclear pore complex glycoprotein. *J Cell Biol* 1992; **116**: 15–30.
- [25] GUAN T, MULLER S, KLEIR G, PANTÉ N, BLEVITT JM, HANER M, PASCHAL B, AEBI U, GERACE L. Structural analysis of the p62 complex, an assembly of O-linked glycoproteins that localizes near the central gated channel of the nuclear pore complex. *Mol Biol Cell* 1995; **6**: 1591–1603.
- [26] HALLBERG E, WOZNIAK RW, BLOBEL G. An integral membrane protein of the pore membrane domain of the nuclear envelope contains a nucleoporin-like region. *J Cell Biol* 1993; **122**: 513–521.
- [27] HALTIWANGER RS, HOLT GD, HART GW. Enzymatic addition of O-GlcNAc to nuclear and cytoplasmic proteins. Identification of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine: peptide  $\beta$ -N-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem* 1990; **265**: 2563–2568.
- [28] HALTIWANGER RS., BLOMBERG MA., HART GW. Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. Purification and characterization of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine: polypeptide  $\beta$ -N-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem* 1992; **267**: 9005–9013.
- [29] HALTIWANGER RS, KELLY WG, ROQUEMORE EP, BLOMBERG MA, DONG L-YD, KREPPPEL L, CHOU T-Y, HART GW. Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins is ubiquitous and dynamic. *Biochem Soc Trans* 1992; **20**: 264–269.
- [30] HALTIWANGER RS, BUSBY S, GROVE K, LI S, MASON D, MEDINA L, MOLONEY D, PHILIPSBERG G, SCARTOZZI R. O-glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins: regulation analogous to phosphorylation? *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **231**: 237–242.
- [31] HALTIWANGER RS, GROVE K, PHILIPSBERG GA. Modulation of O-linked N-acetylglucosamine levels on nuclear and cytoplasmic proteins *in vivo* using the peptide O-GlcNAc- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase inhibitor O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino-N-phenylcarbamate. *J Biol Chem* 1998; **273**: 3611–3617.
- [32] HAN I, ROOS MD, KUDLOW JE. Interaction of the transcription factor Sp1 with the nuclear pore protein p62 requires the C-terminal domain of p62. *J Cell Biochem* 1998; **68**: 50–61.
- [33] HART GW, KELLY WG, BLOMBERG MA, ROQUEMORE EP, DONG L-YD, KREPPPEL L, CHOU T-Y, SNOW D, GREIS K. Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins is as abundant and as dynamic as phosphorylation. [w] *Glyco- and Cellbiology*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1994: 91–103.
- [34] HART GW, KELLY WG, BLOMBERG MA, ROQUEMORE EP, DONG L-YD, KREPPPEL L, CHOU T-Y, SNOW D, GREIS K. Nuclear and cytoplasmic glycosylation is ubiquitous and has the hallmarks of a regulatory modification. [w] Bock K, Clausen H [red.] *Complex carbohydrates in drug research*. Munksgaard Copenhagen: Alfred Benzon Symposium 1994; **36**: 280–290.
- [35] HART GW, GREIS KD, DONG L-YD., BLOMBERG MA, CHOU T-Y, JIANG M-S, ROQUEMORE EP, SNOW DM, KREPPPEL LK, COLE RC, HAYES BK. Ubiquitous and temporal glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. *Pure & Appl Chem* 1995; **67**: 1637–1645.
- [36] HART GW, GREIS KD, DONG L-YD, BLOMBERG MA, CHOU T-Y, JIANG M-S, ROQUEMORE EP, SNOW DM, KREPPPEL LK, COLE RN, COMER FI, ARNOLD CS, HAYES BK. O-linked N-acetylglucosamine: the „yin-yang” of Ser/Thr phosphorylation? Nuclear and cytoplasmic glycosylation. [w] Alavi A, Axford JS [red.] *Glycoimmunology*. New York: Plenum Press 1995: 115–123.
- [37] HART GW, KREPPPEL LK, COMER FI, ARNOLD CS, SNOW DM, YE Z, CHENG X, DELLAMANNA B, CAINE DS, EARLES BJ, AKIMOTO Y, COLE RN, HAYES BK. O-GlcNAcylation of key nuclear and cytoskeletal proteins: reciprocity with O-phosphorylation and putative roles in protein multimerization. *Glycobiology* 1996; **6**: 711–716.
- [38] HART GW. Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu Rev Biochem* 1997; **66**: 315–335.

- [39] HEESE-PECK A, RAIKHEL NV. The nuclear pore complex. *Plant Mol Biol* 1998; **38**: 145–162.
- [40] HICKS GR, RAIKHEL NV. Protein import into the nucleus: an integrated review. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; **11**: 155–188.
- [41] HOLT GD, HART GW. The subcellular distribution of terminal *N*-acetylglucosamine moieties. Localization of a novel protein saccharide linkage, *O*-linked GlcNAc. *J Biol Chem* 1986; **261**: 8049–8057.
- [42] JACKSON SP, TJIAN R. *O*-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell* 1988; **55**: 125–133.
- [43] JACKSON SP, TJIAN R. Purification and analysis of RNA polymerase II transcription factors by using wheat germ agglutinin affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 1781–1785.
- [44] JIANG M-S, HART GW. A subpopulation of estrogen receptors are modified by *O*-linked *N*-acetylglucosamine. *J Biol Chem* 1997; **272**: 2421–2428.
- [45] KEARSE KP, HART GW. Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 1701–1705.
- [46] KELLY WG, DAHMUS ME, HART GW. RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by *O*-GlcNAc. *J Biol Chem* 1993; **268**: 10416–10424.
- [47] KITA K, OMATA S, HORIGOME T. Purification and characterization of nuclear pore glycoprotein complex containing p62. *J Biochem* 1993; **113**: 377–382.
- [48] KRAEMER D, WOZNIAK RW, BLOBEL G, RADU A. The human CAN protein, a putative oncogene product associated with myeloid leukemogenesis, is a nuclear pore complex protein that faces the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 1519–1523.
- [49] KREPPPEL LK, BLOMBERG MA, HART GW. Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique *O*-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem* 1997; **272**: 9308–9315.
- [50] KU N-O, OMARY MB. Identification and mutational analysis of the glycosylation sites of human keratin 18. *J Biol Chem* 1995; **270**: 11820–11827.
- [51] LIPIŃSKA A. Glikoproteiny jądrowe: lokalizacja, charakterystyka, funkcja. [w] Kiliańska Z, Krajewska WM, Lipińska A [red.] *Białka komórek prawidłowych i patologicznych*. Łódzkie Towarzystwo Naukowe 1994; 47–60.
- [52] LU H, FLORES O, WEINMANN R, REINBERG D. The nonphosphorylated form of RNA polymerase II preferentially associates with the preinitiation complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 10004–10008.
- [53] LUBAS WA., SMITH M, STARR CM, HANOVER JA. Analysis of nuclear pore protein p62 glycosylation. *Biochemistry* 1995; **34**: 1686–1694.
- [54] McMORROW I, BASTOS R, HORTON H, BURKE B. Sequence analysis of cDNA encoding a human nuclear pore complex protein, hnup153. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1217**: 219–223.
- [55] MEDINA L, GROVE K, HALTIWANGER RS. SV40 large T antigen is modified with *O*-linked *N*-acetylglucosamine but not with other forms of glycosylation. *Glycobiology* 1998; **8**: 383–391.
- [56] MELCHIOR F, PASCHAL B, EVANS J, GERACE L. Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolyzable analogues of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor. *J Cell Biol* 1993; **123**: 1649–1659.
- [57] MELCHIOR F, GERACE L. Two-way trafficking with Ran. *Trends Cell Biol* 1998; **8**: 175–179.
- [58] MILLER MW, HANOVER JA. Functional nuclear pores reconstituted with  $\beta$ 1-4 galactose-modified *O*-linked *N*-acetylglucosamine glycoproteins. *J Biol Chem* 1994; **269**: 9289–9297.
- [59] MOORE M, BLOBEL G. The two steps of nuclear import, targeting to the nuclear envelope and translocation through the nuclear pore, require different cytosolic factors. *Cell* 1992; **69**: 938–950.



- [60] MOORE MS, BLOBEL G. The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature* 1993; **365**: 661–663.
- [61] MOROIANU J, BLOBEL G. Protein export from the nucleus requires the GTPase Ran and GTP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 4318–4322.
- [62] NEHRBASS U, ROUT MP, MAGUIRE S, BLOBEL G, WOZNIAK RW. The yeast nucleoporin Nup188p interacts genetically and physically with the core structures of the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 1996; **133**: 1153–1162.
- [63] PANTÉ N, AEBI U. Toward the molecular details of the nuclear pore complex. *J Struct Biol* 1994; **113**: 179–189.
- [64] PANTÉ N, BASTOS R, McMORROW I, BURKE B, AEBI U. Interactions and three-dimensional localization of a group of nuclear pore complex proteins. *J Cell Biol* 1994; **126**: 603–617.
- [65] PANTÉ N, AEBI U. Molecular dissection of the nuclear pore complex. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1996; **31**: 153–199.
- [66] POWERS MA, MACAULAY C, MASIARZ FR, FORBES DJ. Reconstituted nuclei depleted of a vertebrate GLFG nuclear pore protein, p97, import but are defective in nuclear growth and replication. *J Cell Biol* 1995; **128**: 721–736.
- [67] POWERS MA, FORBES DJ, DAHLBERG JE, LUND E. The vertebrate GLFG nucleoporin, Nup98, is an essential component of multiple RNA export pathways. *J Cell Biol* 1997; **136**: 241–250.
- [68] RADU A, MOORE MS, BLOBEL G. The peptide repeat domain of nucleoporin Nup98 functions as a docking site in transport across the nuclear pore complex. *Cell* 1995; **81**: 215–222.
- [69] REASON AJ., MORRIS HR., PANICO M, MARAIS R, TREISMAN RH, HALTIWANGER RS, HART GW, KELLY WG, DELL A. Localization of O-GlcNAc modification on the serum response transcription factor. *J Biol Chem* 1992; **267**: 16911–16921.
- [70] ROQUEMORE EP, CHOU T-Y, HART GW. Detection of O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) on cytoplasmic and nuclear proteins. [w] Lennarz WJ, Hart GW [red.] *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York 1994; **230**: 443–460.
- [71] ROQUEMORE EP, CHEVRIER MR, COTTER RJ, HART GW. Dynamic O-GlcNAcylation of the small heat shock protein  $\alpha$ B-crystallin. *Biochemistry* 1996; **35**: 3578–3586.
- [72] SHAH S, TUGENDREICH S, FORBES D. Major binding sites for the nuclear import receptor are the internal nucleoporin Nup153 and the adjacent nuclear filament protein Tpr. *J Cell Biol* 1998; **141**: 31–49.
- [73] SHAW P, FREEMAN J, BOVEY R, IGGO R. Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus. *Oncogene* 1996; **12**: 921–930.
- [74] SNOW DM, HART GW. Nuclear and cytoplasmic glycosylation. *Int Rev Cytol* 1998; **181**: 43–74.
- [75] STARR CM, DONOFRIO M, PARK MK, HANOVER JA. Primary sequence and heterologous expression of nuclear pore glycoprotein p62. *J Cell Biol* 1990; **110**: 1861–1871.
- [76] STERNE-MARR R, BLEVITT JM, GERACE L. O-linked glycoproteins of the nuclear pore complex interact with a cytosolic factor required for nuclear protein import. *J Cell Biol* 1992; **116**: 271–280.
- [77] SUKEGAWA J, BLOBEL G. A nuclear pore complex protein that contains zinc finger motifs, binds DNA, and faces the nucleoplasm. *Cell* 1993; **72**: 29–38.
- [78] TORRES C-R, HART GW. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J Biol Chem* 1984; **259**: 3308–3317.
- [79] WU J, MATUNIS MJ, KRAEMER D, BLOBEL G, COUTAVAS E. Nup358, a cytoplasmically exposed nucleoporin with peptide repeats, Ran-GTP binding sites, zinc fingers, a cyclophilin A homologous domain, and a leucine-rich region. *J Biol Chem* 1995; **270**: 14209–14213.

- [80] YOKOYAMA N, HAYASHI N, SEKI T, PANTÉ N, OHBA T, NISHII K, KUMA K, HAYASHIDA T, MIYATA T, AEBI U, FUKUI M, NISHIMOTO T. A giant nucleopore protein that binds Ran/TC4. *Nature* 1995; **376**: 184–188.

*Redaktor prowadzący – Maria Olszewska*

*Otrzymano: 12.04. 2000 r.*

*Przyjęto: 10.05. 2000 r.*

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

*e-mail: annal@biol.uni.lodz.pl*



## Wskazówki przygotowania rysunków i streszczeń do publikacji w PBK

Dostarczane na dyskietkach teksty powinny być napisane w Word, wersja 6,0. Jeśli w tekst zostały wstawione rysunki, powinny one zostać umieszczone osobno na dyskietce. Powinny to być albo mapy bitowe (.TIF, .PCX), albo pliki z Corela, wersja aktualna lub wcześniejsza. Każda wersja Worda lub Corela pozwala na zachowanie pracy w formacie wersji wcześniejszej.

Streszczenie ma mieć następującą strukturę:

<b>j. polski</b>		<b>j. angielski</b>
Podstawy zagadnienia:	jedno zdanie	Background:
Podtytuły:	do każdego podtytułu 3–5 zdań	Subtitles:
Wnioski:	2 zdania	Conclusions:
Słowa kluczowe:	do 8 słów	Key words:

Takie streszczenia standardowe mogą być ważne, gdyż obecnie czyta się je komputerowo. Treść streszczenia zachęca bądź nie zachęca do przeczytania całego artykułu.

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

Cennik odbitek prac dla Autorów w 2000 r.

Liczba odbitek	50	100	200	400
Cena zł	40,00	60,00	80,00	100,00

Zamówienie na odbitki musi być złożone wraz z przesłaną korektą pracy.

## Warunki prenumeraty kwartalnika PBK

### *Prenumerata na rok 2001*

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 2001 pod adresem:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99,  
01-813 Warszawa; tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl

na konto: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,  
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa;

Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 12401053-40006576-2700-401112-001.

Cena prenumeraty rocznika na rok 2001:

dla instytucji (bibliotek) wynosi 68 zł,  
a dla odbiorców indywidualnych 25 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2001 should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland,  
tel. 8340 344, fax. 8340 470, e-mail: jkawiak@cmkp.edu.pl

On account: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,  
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa;

Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa, No 12401053-40006576-2700-401112-001.

Price per year 20 dollars USA.

Wieloletni program rozwoju i inwestycji  
 w latach 2014-2020

Dotyczy to wydatków na realizację zadań z zakresu...

Opis zadania	Wzrost	Wydatki	Dotacje
1. Zadania...	...	...	...
2. Zadania...	...	...	...
3. Zadania...	...	...	...
4. Zadania...	...	...	...
5. Zadania...	...	...	...
6. Zadania...	...	...	...
7. Zadania...	...	...	...
8. Zadania...	...	...	...
9. Zadania...	...	...	...
10. Zadania...	...	...	...
11. Zadania...	...	...	...
12. Zadania...	...	...	...
13. Zadania...	...	...	...
14. Zadania...	...	...	...
15. Zadania...	...	...	...
16. Zadania...	...	...	...
17. Zadania...	...	...	...
18. Zadania...	...	...	...
19. Zadania...	...	...	...
20. Zadania...	...	...	...
21. Zadania...	...	...	...
22. Zadania...	...	...	...
23. Zadania...	...	...	...
24. Zadania...	...	...	...
25. Zadania...	...	...	...
26. Zadania...	...	...	...
27. Zadania...	...	...	...
28. Zadania...	...	...	...
29. Zadania...	...	...	...
30. Zadania...	...	...	...
31. Zadania...	...	...	...
32. Zadania...	...	...	...
33. Zadania...	...	...	...
34. Zadania...	...	...	...
35. Zadania...	...	...	...
36. Zadania...	...	...	...
37. Zadania...	...	...	...
38. Zadania...	...	...	...
39. Zadania...	...	...	...
40. Zadania...	...	...	...
41. Zadania...	...	...	...
42. Zadania...	...	...	...
43. Zadania...	...	...	...
44. Zadania...	...	...	...
45. Zadania...	...	...	...
46. Zadania...	...	...	...
47. Zadania...	...	...	...
48. Zadania...	...	...	...
49. Zadania...	...	...	...
50. Zadania...	...	...	...
51. Zadania...	...	...	...
52. Zadania...	...	...	...
53. Zadania...	...	...	...
54. Zadania...	...	...	...
55. Zadania...	...	...	...
56. Zadania...	...	...	...
57. Zadania...	...	...	...
58. Zadania...	...	...	...
59. Zadania...	...	...	...
60. Zadania...	...	...	...
61. Zadania...	...	...	...
62. Zadania...	...	...	...
63. Zadania...	...	...	...
64. Zadania...	...	...	...
65. Zadania...	...	...	...
66. Zadania...	...	...	...
67. Zadania...	...	...	...
68. Zadania...	...	...	...
69. Zadania...	...	...	...
70. Zadania...	...	...	...
71. Zadania...	...	...	...
72. Zadania...	...	...	...
73. Zadania...	...	...	...
74. Zadania...	...	...	...
75. Zadania...	...	...	...
76. Zadania...	...	...	...
77. Zadania...	...	...	...
78. Zadania...	...	...	...
79. Zadania...	...	...	...
80. Zadania...	...	...	...
81. Zadania...	...	...	...
82. Zadania...	...	...	...
83. Zadania...	...	...	...
84. Zadania...	...	...	...
85. Zadania...	...	...	...
86. Zadania...	...	...	...
87. Zadania...	...	...	...
88. Zadania...	...	...	...
89. Zadania...	...	...	...
90. Zadania...	...	...	...
91. Zadania...	...	...	...
92. Zadania...	...	...	...
93. Zadania...	...	...	...
94. Zadania...	...	...	...
95. Zadania...	...	...	...
96. Zadania...	...	...	...
97. Zadania...	...	...	...
98. Zadania...	...	...	...
99. Zadania...	...	...	...
100. Zadania...	...	...	...

Wykaz zadań realizowanych w ramach...

Opis zadania	Wzrost	Wydatki	Dotacje
1. Zadania...	...	...	...
2. Zadania...	...	...	...
3. Zadania...	...	...	...
4. Zadania...	...	...	...
5. Zadania...	...	...	...
6. Zadania...	...	...	...
7. Zadania...	...	...	...
8. Zadania...	...	...	...
9. Zadania...	...	...	...
10. Zadania...	...	...	...
11. Zadania...	...	...	...
12. Zadania...	...	...	...
13. Zadania...	...	...	...
14. Zadania...	...	...	...
15. Zadania...	...	...	...
16. Zadania...	...	...	...
17. Zadania...	...	...	...
18. Zadania...	...	...	...
19. Zadania...	...	...	...
20. Zadania...	...	...	...
21. Zadania...	...	...	...
22. Zadania...	...	...	...
23. Zadania...	...	...	...
24. Zadania...	...	...	...
25. Zadania...	...	...	...
26. Zadania...	...	...	...
27. Zadania...	...	...	...
28. Zadania...	...	...	...
29. Zadania...	...	...	...
30. Zadania...	...	...	...
31. Zadania...	...	...	...
32. Zadania...	...	...	...
33. Zadania...	...	...	...
34. Zadania...	...	...	...
35. Zadania...	...	...	...
36. Zadania...	...	...	...
37. Zadania...	...	...	...
38. Zadania...	...	...	...
39. Zadania...	...	...	...
40. Zadania...	...	...	...
41. Zadania...	...	...	...
42. Zadania...	...	...	...
43. Zadania...	...	...	...
44. Zadania...	...	...	...
45. Zadania...	...	...	...
46. Zadania...	...	...	...
47. Zadania...	...	...	...
48. Zadania...	...	...	...
49. Zadania...	...	...	...
50. Zadania...	...	...	...
51. Zadania...	...	...	...
52. Zadania...	...	...	...
53. Zadania...	...	...	...
54. Zadania...	...	...	...
55. Zadania...	...	...	...
56. Zadania...	...	...	...
57. Zadania...	...	...	...
58. Zadania...	...	...	...
59. Zadania...	...	...	...
60. Zadania...	...	...	...
61. Zadania...	...	...	...
62. Zadania...	...	...	...
63. Zadania...	...	...	...
64. Zadania...	...	...	...
65. Zadania...	...	...	...
66. Zadania...	...	...	...
67. Zadania...	...	...	...
68. Zadania...	...	...	...
69. Zadania...	...	...	...
70. Zadania...	...	...	...
71. Zadania...	...	...	...
72. Zadania...	...	...	...
73. Zadania...	...	...	...
74. Zadania...	...	...	...
75. Zadania...	...	...	...
76. Zadania...	...	...	...
77. Zadania...	...	...	...
78. Zadania...	...	...	...
79. Zadania...	...	...	...
80. Zadania...	...	...	...
81. Zadania...	...	...	...
82. Zadania...	...	...	...
83. Zadania...	...	...	...
84. Zadania...	...	...	...
85. Zadania...	...	...	...
86. Zadania...	...	...	...
87. Zadania...	...	...	...
88. Zadania...	...	...	...
89. Zadania...	...	...	...
90. Zadania...	...	...	...
91. Zadania...	...	...	...
92. Zadania...	...	...	...
93. Zadania...	...	...	...
94. Zadania...	...	...	...
95. Zadania...	...	...	...
96. Zadania...	...	...	...
97. Zadania...	...	...	...
98. Zadania...	...	...	...
99. Zadania...	...	...	...
100. Zadania...	...	...	...



# Journals supported by the Polish Society of Cell Biology

## **ACTA PROTOZOLOGICA**

International Quarterly Journal publishes original papers presenting the results of experimental or theoretical research in all fields of protistology with the exception of faunistic notices of a local character and purely clinical reports.

Editor in Chief: J. Sikora  
Co-Editors: H. Fabczak,  
and A. Wasik

Managing Editor:

M. Woronowicz-Rymaszewska

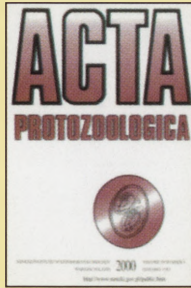
Nencki Institute of Experimental Biology, Pasteura 3

02-093 Warszawa, Poland

Fax: (+48) 22 8225342

E-mail: [jurek@nencki.gov.pl](mailto:jurek@nencki.gov.pl)

<http://www.nencki.gov.pl/actapro.htm>



Indexed in: Chemical Abstracts, Current Contents, LIBREX-AGEN, Protozoological Abstracts, Polish Scientific Journals Contents.

## **CELLULAR & MOLECULAR BIOLOGY LETTERS**

International Quarterly Journal, Official Publication of the Polish Society for Cell Biology. CMBL provides an international forum for original articles (also short communications) and mini-reviews on broad aspects of cell and molecular biology.

Editors: J. Szopa, A. Kozubek and A.F. Sikorski

Address:

Prof. Jan Szopa

Department of Genetic Biochemistry,

University of Wrocław

Przybyszewskiego 63/77

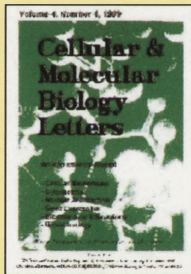
51-148 Wrocław, Poland

Tel/Fax (48) +71 325 29 30

E-mail: [cmb1@angband.microb.uni.wroc.pl](mailto:cmb1@angband.microb.uni.wroc.pl)

<http://www.microb.uni.wroc.pl/biochem/cmb1.htm>

Free access to full text of articles since year 2000



Indexed in: ISI Master Journal List, AGRO-AGEN, Biological Abstracts, BIOSIS, Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica, WinSPIRS, Biochemistry & Biophysics Citation Index, Science Citation Index Expanded, Biosciences Citation Index, Web of Science, Bioscience Web.

## **FOLIA BIOLOGICA**

International Quarterly Journal of Biological Research. The journal publishes papers in the broad field of experimental zoology, nuclear and chromosome research, and also ultrastructural studies.

Editor in Chief: Halina Kościuszko  
Co-Editor:

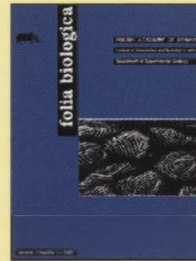
A. Maryńska-Nadachowska  
Polish Academy of Sciences,

Institute of Systematics and Evolution of Animals, Dept Exp. Zoology  
Sławkowska 17, 31-016 Kraków, Poland

E-mail: [folia@isez.pan.krakow.pl](mailto:folia@isez.pan.krakow.pl)

<http://www.isez.pan.krakow.pl>

Indexed in: ISI Master Journal List, Current Contents, Polish Scientific Journals Contents.



## **FOLIA HISTOCHEMICA ET CYTOBIOLOGICA**

Official Quarterly Journal of the Polish Histochemical and Cytochemical Society Publishes papers from the fields of histochemistry, cell and tissue biology.

Editors: J. A. Litwin (Dept Histology, Jagiellonian University, School of Medicine, Kraków),

B. Bilińska (Inst Zoology, Jagiellonian University, Kraków).

Editorial Office:

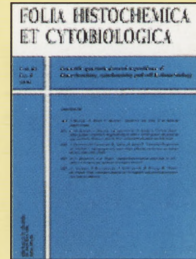
P.O.B. 843, PL-30-960 Kraków, Poland

Tel/Fax: (+ 48) 12 4227027

e-mail: [mmlitwin@cyf-kr.edu.pl](mailto:mmlitwin@cyf-kr.edu.pl)

<http://ampat.amu.edu.pl/czasopis/fhec.htm>

Indexed in: ISI Master Journal List, Current Contents, Index Medicus/MEDLINE, Excerpta Medica/EMBASE, Biological Abstracts, SciSearch, Research Alert, Science Citation Index Expanded.



## **POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI**

Quarterly Journal of the Polish Anatomical Society, the Polish Society of Cell Biology, the Polish UNESCO Net and the Foundation for Cell Biology and Molecular Biology. Publishes review articles, short reviews and letters to the editors. Abstracts are published in English.

Editors:

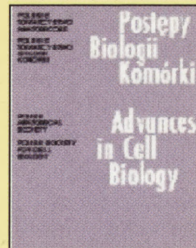
S. Biliński, J. Kawiak, W. Kilariski,  
M. Olszewska, B. Płytycz, M. Zabel,  
J. Żeromski

Address:

Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego,  
Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, Poland

Tel: (+22) 8340344, Fax: (+22) 8340470

E-mail: [jkawiak@cmkp.edu.pl](mailto:jkawiak@cmkp.edu.pl)







# INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach. 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 maszynopisu 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 maszynopisu z kilkoma pozycjami bibliograficznymi 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. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki s. 461) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nie numerowana 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 rysunków. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, 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 rysunków, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym ( np. [5]). Spis literatury należy zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

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

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

Tabele, opisy schematów i rysunków 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. Wymiary poszczególnych rysunków, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmienionej formie. Wszystkie załączniki muszą być opatrzone na odwrocie nazwiskiem pierwszego autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji. Stosowane jednostki miar muszą być zgodne z układem SI. Prosimy o dołączenie wykazu skrótów.

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. Redakcja prosi o propozycję do 5 osób (nazwisko, imię, adres, fax), które byłyby odpowiednimi recenzentami maszynopisu, nie powinny jednak być pracownikami instytucji, w której pracuje autor, ani jego współpracownikami. Poprawioną po recenzji wersję pracy należy zwrócić do redakcji koniecznie w ciągu 30 dni. Redakcja rezygnuje z publikacji maszynopisu, którego autorzy do 30 dni nie odpowiedzą na list redaktora.

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

Dołączono 2 kopie maszynopisu,

Treść pracy nie była uprzednio publikowana nie została

tabel i rycin.

tak

nie

wysłana do innej redakcji

tak

nie

Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę.

tak

nie

Dołączono kopię pracy wraz z rysunkami na dyskietce

tak

nie

Jest zgoda osób, których informacje niepubli-

tak

nie

z podaniem nazwy plików i użytych programów edycyjnych

tak

nie

kwowane są zamieszczone w tekście artykułu

tak

nie

z komputera IBM

Odpowiadam za całość pracy opisaną w zał. maszyn.

tak

nie

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 Fundacji.

podpisy wszystkich autorów

## TREŚĆ – CONTENTS

W tym Zeszyście	293
ROSZEK K., GNIOT-SZULŻYCKA J.: Wielorakie formy pęcherzyków opłaszczonych klatryną w zależnym od receptorów transporcie i segregacji makromolekuł Diverse forms of clathrin coated vesicles in receptor mediated transport and segregation of macromolecules	295
WOJTASZEK P.: Czym jest komórka roślinna? Miejsce ścian komórkowych What is a plant cell? Position of plant cell walls	315
KOWALCZYK A.: Czy zwierzęta z celowaną modyfikacją genomu są wiarygodnym modelem badawczym? Lekcje z neurobiologii Do animals with targeted genomic modification provide reliable research model. Lessons from the neurobiology	325
JUCZEWSKA M., CHYCZEWSKA E., NAUMIK W., NIKLIŃSKA W.: Udział komórek tucznych w angiogenezie The role of mast cells in angiogenesis	343
BOCIAN E.: Disomia jednorodzielska (UPD) u człowieka. Mechanizm powstawania i skutki kliniczne Uniparental disomy (UPD) in man. The origin and clinical consequences	359
WÓJCIK C., WÓJCIK M.: Niebiałkowe inhibitory kinaz zależnych od cyklin Non-proteinaceous inhibitors of the cyclin-dependent kinases	377
KOWALCZYK S., JAKUBOWSKA A.: Gibereliny – Percepcja i transdukcja sygnału Gibberellins – Signal perception and transduction	397
FABCZAK H., FABCZAK S.: Mechanizm reakcji fotofobowej u pokrewnych orzęsków <i>Stentor coeruleus</i> i <i>Blepharisma japonicum</i> Mechanism of photophobic response in ciliate <i>Stentor coeruleus</i> and related <i>Blepharisma japonicum</i>	425
KRZEŚLAK A., LIPIŃSKA A.: O-Glikozylacja białek jądrowych O-Glycosylation of nuclear proteins	441
Wskazówki przygotowania rysunków i streszczeń do publikacji w PBK	461
Warunki prenumeraty kwartalnika PBK	461