

ANNA GOC

Instytut Biologii, Pracownia Genetyki, Uniwersytet M. Kopernika,
Toruń

MOLEKULARNE MECHANIZMY PLASTYCZNOŚCI KOMÓREK CHROMOCHŁONNYCH

PLASTYCZNOŚĆ KOMÓREK CHROMOCHŁONNYCH

Układ nerwowy charakteryzuje plastyczność polegająca na adaptacyjnej zdolności całych obszarów mózgu, a także pojedynczych komórek, synaps i receptorów do modyfikowania swej specyficznej struktury i funkcji. Najlepiej zbadane przykłady zmian plastycznych dotyczą ontogenezy mózgu, przebudowania połączeń neuronalnych po urazach i w procesie zapamiętywania.

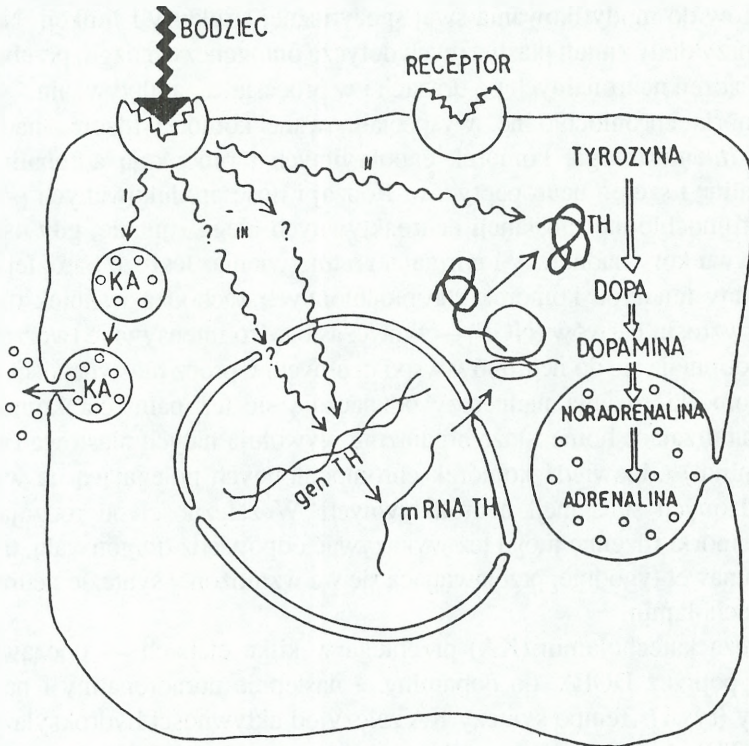
Komórki chromochłonne, wyspecjalizowane komórki rdzenia nadnerczy, mają *in situ* morfologię komórek endokrynych i produkują adrenalinę bądź noradrenalinę i szereg neuropeptydów. Rodzaj i ilość produkowanych przez komórki chromochłonne substancji neuroaktywnych ulega zmianie, gdy usunąć je spod wpływu kory nadnerczy i normalnego unerwienia. Jeszcze bardziej drastyczne zmiany fenotypu komórek chromochłonnych zachodzą wskutek działania czynnika wzrostu nerwów (NGF) — wówczas bardzo intensywnie tworzą wypustki i upodobniają się do neuronów współczulnych. Oprócz plastyczności fenotypowej, komórki rdzenia nadnerczy odznaczają się też pamięcią komórkową. Bodźce zaburzające homeostazę organizmu wywołują natychmiastową (w ciągu sekund–minut) odpowiedź komórek chromochłonnych polegającą na wyrzucie nagromadzonych substancji neuroaktywnych. W zależności od rodzaju i siły bodźca komórki rdzenne mogą też wykazywać odpowiedź długotrwałą, trwającą godziny a nawet tygodnie, przejawiającą się we wzmożonej syntezie neuropeptydów i katecholamin.

Synteza katecholamin (KA) przebiega w kilku etapach — począwszy od tyrozyny, poprzez DOPA, do dopaminy, a następnie noradrenaliny i na końcu adrenaliny (rys.1). Tempo syntezy KA zależy od aktywności hydroksylazy tyrozynowej (TH), enzymu przeprowadzającego tyrozinę w DOPA.

Natychmiastowej odpowiedzi komórek chromochłonnych (wyrzutowi nagromadzonych KA i przechowywanych wraz z nimi neuropeptydów) towarzyszy również zwiększona *de novo* synteza KA (rys. 1). Odbywa się ona dzięki uprzednio istniejącym cząsteczkom TH, których aktywność w komórce niestymulowanej jest

hamowana przez końcowy produkt syntezy KA. Stymulacja powoduje fosforylację TH. Ufosforylowane cząsteczki TH tracą powinowactwo do blokujących je KA, odzyskują zdolność wiązania kofaktora (czterohydroksybiopteryny) i aktywność enzymatyczną (Z i g m o n d i in. 1989).

Długoterminowa odpowiedź komórek rdzenia nadnerczy wyraża się pierwotnie wzmożoną transkrypcją genu kodującego TH (rys. 1). W warunkach stymulacji synteza mRNA dla TH przebiega na kilkukrotnie podwyższonym poziomie, czasami przez wiele godzin. W następstwie translacji mRNA wzrasta w komórkach chromochłonnych ilość białka TH, a jego enzymatyczna aktywność prowadzi do znacznego zwiększenia syntezy KA. Zatem plastyczność komórek rdzenia nadnerczy wymaga istnienia, po pierwsze, systemu przekaźników przenoszących informację o bodźcu z receptora błonowego do jądra komórkowego oraz, po drugie, odbierających tę informację elementów regulatorowych w obrębie genu TH.



Rys. 1. Schemat odpowiedzi komórki chromochłonnej na bodźce naruszające równowagę organizmu. Odpowiedź natychmiastowa i krótkotrwała polega (I) na wyrzuceniu nagromadzonych KA i (II) na syntezie KA dzięki aktywacji istniejącego w komórce enzymu TH. W odpowiedzi długotrwałej (III) przekazanie sygnału z receptora błonowego do jądra prowadzi do wzmożonej transkrypcji genu TH, a w konsekwencji do intensywnej syntezy KA przez długi czas po zadziałaniu bodźca.

TRANSSYNAPTYCZNE I HORMONALNE DROGI AKTYWACJI GENU TH

Podwyższenie poziomu mRNA TH w komórkach rdzenia nadnerczy obserwowano *in vivo* u szczurów poddanych stresowi zimna (S t a c h o w i a k i in. 1985), iniekcjom nikotyny (S t a c h o w i a k i in. 1988) czy rezerpiny (T a n k i in. 1985, F a u c o n B i g u e t i in. 1986). Przecięcie nerwu trzewnego unerwiającego gruczoł nadnerczowy uniemożliwia podwyższenie poziomu mRNA TH pod wpływem zimna (S t a c h o w i a k i in. 1986) i rezerpiny (F r a n k l i n i in. 1991). Transsynaptyczna stymulacja genu TH zachodzi z udziałem cholinergicznym receptorów nikotynowych (S t a c h o w i a k i G o c 1992), jednakże doświadczenia z blokerami receptorów nikotynowych sugerują istnienie także innych cholinergicznym i niecholinergicznym receptorów (F o s s o m i in. 1991). Izolowane komórki chromochłonne oraz wywodzące się z komórek chromochłonnych nowotworowe linie komórkowe zachowują większość właściwości komórek rdzenia nadnerczy. Badania *in vitro* wykazały, że gen TH jest aktywowany nie tylko za pośrednictwem receptorów nikotynowych (S t a c h o w i a k i in. 1990b), ale także receptorów glukokortykoidów (S t a c h o w i a k i in. 1990b), NGF (G i z a n g - G i n s b e r g i Z i f f 1990), epidermalnego czynnika wzrostowego EGF (L e w i s i C h i k a r a i s h i 1987), angiotensyny (S t a c h o w i a k i in. 1990c) i innych neuromodulatorów.

Doświadczenia za pomocą techniki zwanej *run on*, przeprowadzane na izolowanych jądrach komórkowych w warunkach umożliwiających dokończenie uprzednio zapoczątkowanej syntezy mRNA bez możliwości *de novo* inicjacji transkrypcji, dowodzą, że wzrost poziomu mRNA TH w komórkach rdzenia nadnerczy stymulowanych nikotyną (F o s s o m i in. 1991, S t a c h o w i a k i in. 1990a), NGF (G i z a n g - G i n s b e r g i Z i f f 1990) i angiotensyną (S t a c h o w i a k i in. 1990a) jest rzeczywiście wynikiem transkrypcyjnej aktywacji genu TH.

UDZIAŁ WTÓRNYCH PRZEKAŹNIKÓW W AKTYWACJI GENU TH

Ca²⁺ jak i cAMP oraz aktywowane przez nie kinazy białkowe są zaangażowane w odpowiedź komórek chromochłonnych na różnorodne bodźce. Trudno jednakże rozróżnić jaki jest ich udział w krótko- i długoterminowej regulacji syntezy KA.

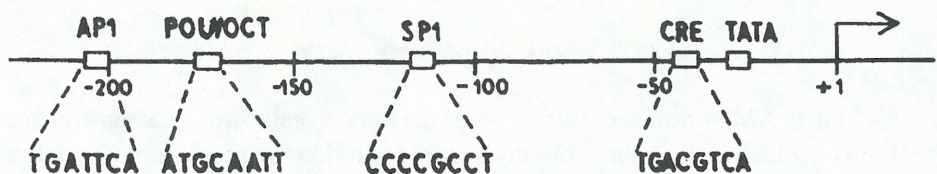
W stymulacji genu TH przez angiotensynę pośredniczą jony wapnia, zarówno wpływające do komórki, jak i uwalniane z wewnątrzkomórkowych zapasów, uruchamiające następnie drogi zależne od kalmoduliny oraz białkowej kinazy C (PKC) (S t a c h o w i a k i in. 1990c). Z kolei farmakologiczna depolaryzacja komórek chromochłonnych za pomocą weratrydyny powoduje wzrost ilości mRNA TH niezależnie od zahamowania dróg wapniowych (S t a c h o w i a k

i in. 1993). Świadczy to, że transmisja sygnałów stymulujących gen TH zachodzić może na wiele różnych sposobów.

Istnieją dowody, że bezpośrednia stymulacja Ca^{2+} -zależnej PKC (Carroll i in. 1991, Stachowiak i in. 1990c, Vyas i in. 1990) oraz zwiększenie komórkowego stężenia cAMP (Carroll i in. 1991, Fader i Lewis 1990, Lewis i in. 1983, Stachowiak i in. 1990b) wystarczają do podwyższenia poziomu mRNA TH. Dlatego też w badaniach *in vitro* bardzo powszechnie używa się estrów forbolowych (stymulujących PKC) oraz forskoliny (aktywatora cykazy adenylowej) lub 8Br-cAMP czy Bt_2cAMP (pochodnych cAMP) do imitowania bardziej złożonych stymulacji genu TH.

POTENCJALNE ELEMENTY REGULATOROWE GENU TH

Dotychczas wyizolowano i zsekwencjonowano szczurzy (Lewis i in. 1983, 1987), myszy (Iwata i in. 1992), wołowy (D'Mello i in. 1989) i ludzki (Kobayashi i in. 1988, O'Malley i in. 1987) gen TH. Porównanie promotorów, czyli sekwencji poprzedzających rejon kodujący, wykazało, że istnieje 74%–94% homologia na odcinku 260 par zasad przed miejscem startu transkrypcji genów TH z różnych gatunków ssaków (Cambi i in. 1989, D'Mello i in. 1989, Iwata i in. 1992). Wśród sekwencji dobrze zachowanych w toku ewolucji w genie TH znajdują się ciągi 7–8 nukleotydów znane z tego, że w innych genach eukariotycznych pełnią rolę elementów regulatorowych. Sekwencje regulatorowe są miejscami wiązania czynników transkrypcyjnych — białkowych czynników zwiększających lub zmniejszających wydajność transkrypcji. Obecność takich sekwencji w genie TH, a zwłaszcza ich dobre zachowanie w toku ewolucji, pozwala przypuszczać, że odgrywają one rolę w regulacji aktywności transkrypcyjnej tego genu. Rysunek 2 ilustruje rozmieszczenie potencjalnych miejsc regulatorowych występujących w promotorach wszystkich zbadanych genów TH.



Rys. 2. Schemat rozmieszczenia potencjalnych elementów regulatorowych genu TH. +1 — miejsce startu transkrypcji. Sekwencje położone na lewo od miejsca startu transkrypcji są numerowane kolejno ze znakiem minus. TATA — bogata w pary A-T sekwencja biorąca udział w inicjacji transkrypcji genów eukariotycznych. AP1, POU/OCT, SP1, CRE — miejsca prawdopodobnego wiązania znanych czynników transkrypcyjnych (poniżej podano sekwencję nukleotydową tych miejsc). Schemat sporządzono na podstawie sekwencji mysiego (Iwata i in. 1992), szczurzego (Lewis i in. 1987), wołowego (D'Mello i in. 1989) i ludzkiego (Kobayashi i in. 1988) genu TH.

Określenie roli poszczególnych sekwencji w rzeczywistej regulacji genu jest możliwe dzięki metodom biologii molekularnej. Po pierwsze, kompleksy białko-DNA wędrują w czasie elektroforezy z mniejszą prędkością niż to samo „nagie” DNA. Właściwość tą wykorzystuje się w metodzie *gel shift* do badania zdolności znakowanego radioaktywnie fragmentu DNA zawierającego badaną sekwencję do wiązania białek jądrowych lub znanych czynników transkrypcyjnych. Po drugie, badaną sekwencję łączy się z tak zwanym genem reporterowym (np. bakteryjnym genem CAT — acetylotransferazy chloramfenikolu lub genem lucyferazy z robaczka świętojańskiego) kodującym łatwy do ilościowego oznaczenia produkt. Aktywność produktu genu reporterowego w ekstraktach komórek, do których wprowadzono taki konstrukt, jest miarą aktywności transkrypcyjnej badanej sekwencji DNA. Po trzecie, można *in vitro* mutować badaną sekwencję i badać jej znaczenie w doświadczeniach opisanych w punkcie 1 i 2.

PODSTAWOWA AKTYWNOŚĆ GENU TH

W tkankach, w których zachodzi synteza KA, gen TH stale ulega transkrypcji na niewysokim poziomie. Mutacje punktowe pozwoliły ustalić, które z sekwencji promotora są istotne dla podstawowej aktywności szurczego genu TH (Y o o n i C h i k a r a i s h i 1992). Mutacje sekwencji regulatorowych znanych jako elementy: TATA, CRE, AP1 (rys. 1) i częściowo zachodzącej na AP1 symetrycznej sekwencji nazwanej DSE zmniejszają ilość produktu reporterowego genu CAT. Najprawdopodobniej AP1 i DSE współdziałają ze sobą w utrzymywaniu transkrypcji na poziomie podstawowym, jako że oligonukleotyd zawierający sekwencję obydwu tych elementów tworzy z białkami jądrowymi inny kompleks niż każda z tych sekwencji oddzielnie. Oprócz elementów o funkcji aktywatora w szurczym genie TH stwierdzono też obecność elementu represorowego, czyli hamującego transkrypcję. Jest nim 7-nukleotydowa sekwencja znajdująca się pomiędzy sekwencjami POU/OCT i SP1 (rys. 1), której mutacja podwyższa niestymulowaną aktywność CAT. Mutacje pozostałych elementów nie wpływają na poziom transkrypcji genu reporterowego w komórkach szurczego guza chromochłonnego PC12.

Badania promotora wołowego genu TH w nienowotworowych wołowych komórkach chromochłonnych potwierdzają istnienie zarówno sekwencji aktywatorowych jak i represorowych istotnych dla podstawowej ekspresji tego genu (G o c i S t a c h o w i a k, 1993).

AKTYWACJA GENU TH POPRZEZ ELEMENT CRE

Badanie skróconych sekwencji promotora szurczego genu TH przyłączonych do reporterowego genu CAT wykazało, że zarówno forskolina (F a d e r i L e w i s 1990) jak i weratrydyna (K i l b o u r n e i in. 1992) zwiększają aktywność CAT w komórkach guza chromochłonnego PC12 dopóki zachowanych jest 60 par

zasad (pz) poprzedzających miejsce startu transkrypcji. Natomiast transkrypcja takich genów, w których pozostawiono tylko 41 pz powyżej miejsca +1 nie jest regulowana ani podwyższonym stężeniem cAMP ani depolaryzacją (F a d e r i Lewis 1990, K i l b o u r n e i in. 1992). W usuniętym fragmencie -60/-42 znajduje się sekwencja CRE (rys.1) występująca w wielu innych genach i odpowiedzialna za regulację tych genów przez cAMP. 60 pz szczurzego promotora genu TH aktywuje też transkrypcję CAT pod wpływem jonoforu wapniowego (K i l b o u r n e i in. 1992). Element CRE wydaje się więc elementem koniecznym dla regulacji szczurzego genu TH przez cAMP i depolaryzację, a także elementem wystarczającym do odpowiedzi na zwiększony poziom Ca^{2+} . Ponieważ jednak jednoczesna stymulacja 8Br-cAMP i weratrydyną powoduje efekt większy niż suma efektów pojedynczych bodźców, wydaje się, że muszą one oddziaływać na sekwencję CRE różnymi drogami (K i l b o u r n e i in. 1992). Udział poszczególnych elementów promotora w regulacji genu TH pod wpływem depolaryzacji był też badany w wołowych komórkach chromochłonnych. W przeciwieństwie do promotora szczurzego genu TH, element CRE wołowego genu nie wystarcza do aktywacji ekspresji genu reporterowego w odpowiedzi na stymulację weratrydyną (S t a c h o w i a k i in. 1993 w druku). Obserwowane różnice mogą wynikać zarówno z międzygatunkowych różnic sekwencji sąsiadujących z zachowanymi w toku ewolucji elementami regulatorowymi, jak i ze zmienionego w nowotworowych komórkach PC12 systemu przekazywania sygnałów.

UDZIAŁ ELEMENTU AP1 W REGULACJI GENU TH

Badanie ilości mRNA genu reporterowego w komórkach PC12, do których wprowadzono sztucznie otrzymane geny zawierające promotor szczurzego genu TH wykazało, że dla stymulacji przez NGF wymagana jest obecność sekwencji -205/-193, to jest elementu AP1. Białka jądrowe komórek PC12 wiążą się z 28 pz fragmentem zawierającym ten rejon. Poziom białka wiążącego 28-nukleotydowy odcinek DNA zwiększa się, jeśli komórki traktować NGF przez godzinę, to znaczy okres wyzwalający maksymalną indukcję promotora genu TH (Gizang-Ginsberg i Z i f f 1990). Wyniki te wskazują na udział sekwencji AP1 w regulacji aktywności genu TH przez czynnik wzrostu nerwów. Bardzo prawdopodobne, że element AP1 jest też zaangażowany w odpowiedź genu TH na stymulację innych receptorów, lecz jak dotąd brak na to dowodów bezpośrednich. Dowody pośrednie zostaną omówione w następnym paragrafie.

CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE BIORĄCE UDZIAŁ W DŁUGOTERMINOWEJ ODPOWIEDZI KOMÓREK CHROMOCHŁONNYCH

Geny *c-fos* i *c-jun* kodujące białka c-Fos i c-Jun są tak zwanymi genami wczesnej odpowiedzi, których ekspresja jest stymulowana w przeciągu minut po

zadziałaniu bodźca i których produkty (zarówno mRNA jak i kodowane białko) są krótkotrwałe. Białka c-Fos i c-Jun mogą wiązać się w pary (dimery) tworząc czynnik transkrypcyjny AP1, za którego pośrednictwem zachodzi transmisja sygnałów stymulujących PKC. Przeciwciała skierowane przeciwko białkom c-Fos i c-Jun wykrywają także szereg pokrewnych białek, które mogą tworzyć dimery z c-Fos lub c-Jun i między sobą oraz wiązać się z DNA. Dimery różnych białek z rodziny Fos lub Jun mogą oddziaływać na tę samą sekwencję AP1, potęgując bądź osłabiając transkrypcję kontrolowanego genu.

Komórki chromochłonne również odpowiadają na wiele bodźców zwiększoną ekspresją genów rodzin *fos* i *jun*. Nikotyna i angiotensyna, pobudzające główne neuronalne i hormonalne receptory komórek rdzenia nadnerczy, oraz estry forbolowe, stymulujące bezpośrednio PKC, powodują wzrost ilości mRNA *c-fos* i *c-jun* (G o c i in. 1992, S t a c h o w i a k i in. 1990a), przy czym aktywacja genu *c-fos* wyprzedza w czasie aktywację genu TH (G o c i in. 1992). Stymulacja komórek chromochłonnych NGF, nikotyną i angiotensyną w warunkach zablokowanej syntezy białek nie prowadzi do zwiększenia ilości mRNA TH, co sugeruje, że do zaktywowania genu TH niezbędna jest obecność czynników białkowych o szybkim tempie syntezy i degradacji (G i z a n g - G i n s b e r g i Z i f f 1990, G o c i in. 1992).

Ilości białek rodziny Fos i Jun zmieniają się w komórkach rdzenia nadnerczy i komórkach PC12 pod wpływem angiotensyny i nikotyny (S t a c h o w i a k i in. 1990a), NGF (G i z a n g - G i n s b e r g i Z i f f 1990), estrów forbolowych (G o c i in. 1992). Wzorzec zmian jest różny dla różnych bodźców. Ilość niektórych spośród białek Fos i Jun wzrasta bardzo szybko po zadziałaniu bodźca, innych z opóźnieniem, ilość jeszcze innych pozostaje bez zmian. Podwyższony poziom poszczególnych białek utrzymuje się przez różny okres. Można więc przypuszczać, że skład czynnika AP1 zmienia się podczas i po stymulacji receptorów błonowych.

Ekspresja reporterowego genu znajdującego się pod kontrolą 245 pz promotora genu TH wzrasta znacząco w komórkach PC12, do których jednocześnie wprowadzono sekwencje kodujące c-Fos i c-Jun przyłączone do stale aktywnego silnego promotora (G o c i in. 1992). Białka c-Fos i c-Jun w podwyższonej ilości wystarczają więc do aktywacji genu TH, co z kolei sugeruje rzeczywisty udział czynnika AP1 w regulacji genu TH.

Zdolność białek jądrowych komórek PC12 do tworzenia kompleksów z 28 pz fragmentem promotora genu TH zawierającym element AP1 jest hamowana przez przeciwciała anti-c-Fos (G i z a n g - G i n s b e r g i Z i f f 1990). c-Fos lub białka rodziny Fos uczestniczą też w tworzeniu kompleksów z dłuższym fragmentem (-274/+10) promotora genu TH (G o c i in. 1992, G o c i S t a c h o w i a k, 1993). Kompleks białkowy, którego powstawanie, czy to z krótszym czy dłuższym fragmentem promotora, zakłóca przeciwciała anti-c-Fos, tworzą białka komórek kontrolnych i stymulowanych NGF lub angiotensyną (G i z a n g - G i n s b e r g

i Ziff 1990, Goc i Stachowiak, 1993 w druku). Można więc sądzić, że białkowy czynnik AP1 wiążąc się do sekwencji promotora bierze udział zarówno w regulacji podstawowego jak i indukowanego poziomu ekspresji genu TH. Ilość kompleksu białkowego, w skład którego wchodzi czynnik AP1 wzrasta na skutek stymulacji NGF (Gizang-Ginsberg i Ziff 1990), nie zmienia się natomiast pod wpływem pobudzenia receptorów angiotensynowych (Goc i Stachowiak, 1993 w druku). Tak więc mimo, że obydwa bodźce oddziałują na ekspresję genów kodujących AP1 i że AP1 jest zaangażowany w regulację genu TH, sposób ich działania na TH pozostaje specyficzny. Możliwe, że decyduje skład czynnika AP1.

Rola, jaką w regulacji genu TH odgrywa sekwencja CRE, pozwala przypuszczać, że białka wiążące element odpowiadający na zwiększone stężenie cAMP, to znaczy białka CREB, biorą udział w tej regulacji. Czynnik transkrypcyjny CREB działając na tę samą sekwencję może w zależności od stanu ufosforylowania pełnić rolę aktywatora lub represora (Lampkin 1990). CREB jest substratem nie tylko dla aktywowanej przez cAMP białkowej kinazy A lecz także dla kinazy zależnej od Ca^{2+} /kalmoduliny (Dash i in. 1991, Sheng i in. 1991). Funkcją białka CREB może więc być integrowanie sygnałów cAMP i Ca^{2+} , co w pełni zgadza się z rolą jaką sekwencja CRE pełni w przypadku genu TH. Sytuację dodatkowo komplikuje fakt, że istnieją formy CREB fosforylowane wyłącznie przez PKC (Andrison i Dixon 1990) oraz że homodimer Jun oraz heterodimer Fos/Jun mogą wiązać i transaktywować sekwencję CRE (Sassone-Corsi i in. 1990). Zwiększa to liczbę potencjalnych dróg, poprzez które czynniki AP1 i CREB regulują aktywność transkrypcyjną genu TH i nie wyklucza udziału innych czynników.

PODSUMOWANIE

Zdolność komórek chromochłonnych do odpowiedzi, dłuższej niż czas działania bodźca ma swoje molekularne podstawy w mechanizmach uczestniczących w regulacji genu TH. Dotychczas poznane mechanizmy wykorzystują systemy transdukcji sygnałów, które doprowadzają do specyficznej dla bodźca aktywacji czynników transkrypcyjnych. Kompleksy białkowe, w skład których wchodzić mogą różne kombinacje czynników transkrypcyjnych, wiążą się do miejsc regulatorowych genu TH aktywując jego transkrypcję. Wzmożona synteza KA jest wynikiem zwiększenia liczby cząsteczek TH na skutek długotrwałej aktywności tego genu. Konwergencja dróg sygnałowych, wielość potencjalnych elementów regulatorowych w promotorze genu TH i ich współdziałanie, a także liczba kombinacji jakie tworzyć mogą białkowe czynniki transkrypcyjne sprawiają, że nie potrafimy jak dotąd odpowiedzieć na wszystkie znaki zapytania z rysunku 1.

MOLECULAR MECHANISMS OF PLASTICITY OF CHROMAFFIN CELLS

Summary

Chromaffin cells are specialized cells of the adrenal medulla producing catecholamines and other neuromodulators. When stimulated (a) they release the stored neuroactive substances in seconds, and (b) they enhanced catecholamine synthesis for hours to weeks. The plasticity of chromaffin cells, i.e. the ability to sustain a response outlasting the duration of the stimulation, involves activation of the catecholamine biosynthetic genes. Transcription of the gene coding tyrosine hydroxylase (TH), the first and rate limiting enzyme in catecholamine synthesis, is elevated both *in vivo* and *in vitro* by many stressors and stimulation of neuronal and hormonal receptors. cAMP- and Ca^{2+} -dependent pathways of signal transduction participate, and sometimes converge, in enhanced synthesis of TH mRNA by activation of transcriptional factors. Several putative sites for their action were found in the promoters of all isolated TH genes. Deletion and point mutation analysis indicated that activatory and repressory elements interact in basal activity of rat and bovine genes. The AP1 site plays a role not only in basal but also in stimulated TH gene transcription. Increased levels of Fos, Jun and related proteins as well as their mRNAs were observed in stimulated chromaffin cells. Activation of *fos* and *jun* genes preceded the elevation of TH mRNA. *Gel shift* experiments revealed that the Fos/Jun (AP1) factor is involved in protein complexes bound to TH promoter fragments. CREB is another candidate for the transcriptional factor playing a role in TH gene regulation. The CRE site present in the TH promoter is responsive not only to [cAMP] but also to [Ca^{2+}] and, in the case of the rat gene, also to depolarization. AP1, CREB and other transcriptional factors may interact in mediating the TH gene regulation in chromaffin cells.

LITERATURA

- Andrisani O., Dixon J. E., 1990. *Identification and purification of a novel 120-kDa protein that recognizes the cAMP-responsive element*. J. Biol. Chem., 265, 3212–3218.
- Cambi F., Fung B., Chikaraishi D. M., 1989. *5' Flanking DNA sequences direct cell-specific expression of rat tyrosine hydroxylase*. J. Neurochem., 53, 1656–1659.
- Carroll J. M., Kim K. S., Kim K. T., Goodman H. M., Joh T. H., 1991. *Effects of second messenger system activation on functional expression of tyrosine hydroxylase fusion gene constructs in neuronal and nonneuronal cells*. J. Mol. Neurosci., 3, 65–74.
- Dash P. K., Karl K. A., Colicos M. A., Prywes R., Kandel E. R., 1991. *cAMP response element-binding protein is activated by Ca^{2+} /calmodulin- as well as cAMP-dependent protein kinase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 5061–5065.
- D' Mello S. R., Turzai L. M., Gioio A. E., Kaplan B. B., 1989. *Isolation and structural characterization of the bovine tyrosine hydroxylase gene*. J. Neurosci. Res., 23, 31–40.
- Fader D., Lewis E. J., 1990. *Interaction of cyclic AMP and cell-cell contact in the control of tyrosine hydroxylase RNA*. Mol. Brain Res., 8, 25–29.
- Faucon Biguet N., Buda M., Lamouroux A., Samolyk D., Mallet J., 1986. *Time course of the changes of TH mRNA in rat brain and adrenal medulla after a single injection of reserpine*. EMBO J., 5, 287–291.
- Fossom L. H., Carlson C. D., Tank A. W., 1991. *Stimulation of tyrosine hydroxylase gene transcription rate by nicotine in rat adrenal medulla*. Mol. Pharmacol., 40, 193–202.

- Franklin S.O., Zhu Y.-S., Yoburn B.C., Inturrisi C.E., 1991. *Transsynaptic activity regulates proenkephalin and tyrosine hydroxylase gene expression and the response to reserpine in the hamster adrenal*. Mol. Pharmacol., 40, 515–522.
- Gizang-Ginsberg E., Ziff E.B., 1990. *Nerve growth factor regulates tyrosine hydroxylase gene transcription through a nucleoprotein complex that contains c-Fos*. Genes Develop., 4, 477–491.
- Goc A., Norman S.A., Puchacz E., Stachowiak E.K., Lukas R.J., Stachowiak M.K., 1992. *A 5'-flanking region of the bovine tyrosine hydroxylase gene is involved in cell-specific expression, activation of gene transcription by phorbol ester, and transactivation by c-Fos and c-Jun*. Mol. Cell. Neurosci., 3, 383–394.
- Goc A., Stachowiak M.K., 1993. *Bovine tyrosine hydroxylase gene-promoter regions involved in basal and angiotensin II-stimulated expression in nontransformed adrenal medullary cells*. J. Neurochem., w druku.
- Iwata N., Kobayashi K., Sasaoka T., Hidaka H., Nagatsu T., 1992. *Structure of the mouse tyrosine hydroxylase gene*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 182, 348–354.
- Kilbourne E.J., Nankova B.B., Lewis E.J., McMahon A., Osaka H., Sabban D.B., Sabban E.L., 1992. *Regulated expression of the tyrosine hydroxylase gene by membrane depolarization*. J. Biol. Chem., 267, 7563–7569.
- Kobayashi K., Kaneda N., Ichinose H., Kishi F., Nakazawa A., Kurosawa Y., Fujita K., Nagatsu T., 1988. *Structure of the human tyrosine hydroxylase gene: alternative splicing from a single gene accounts for generation of four mRNA types*. J. Biochem. (Tokyo), 103, 907–912.
- Lamph W.W., Dwarki V.J., Ofir R., Montminy M., Verma I.M., 1990. *Negative and positive regulation by transcriptional factor cAMP response element-binding protein is modulated by phosphorylation*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 4320–4324.
- Lewis E.J., Chikaraishi D.M. 1987. *Regulated expression of the tyrosine hydroxylase gene by epidermal growth factor*. Mol. Cell. Biol., 7, 3332–3336.
- Lewis E.J., Harrington C.A., Chikaraishi D.M., 1987. *Transcriptional regulation of the tyrosine hydroxylase gene by glucocorticoid and cyclic AMP*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 3550–3554.
- Lewis E.J., Tank A.W., Weiner N., Chikaraishi D.M., 1983. *Regulation of tyrosine hydroxylase mRNA by glucocorticoid and cyclic AMP in a rat pheochromocytoma cell line*. J. Biol. Chem., 258, 14632–14637.
- O'Malley K.L., Anhalt M.J., Martin B.M., Kelseo J.R., Winfield S.L., Ginn E.I., 1987. *Isolation and characterization of the human tyrosine hydroxylase gene: identification of 5' alternative splice sites responsible for multiple mRNAs*. Biochemistry, 26, 6910–6914.
- Sassone-Corsi P., Ransone L.J., Verma I.M. 1990. *Cross-talk in signal transduction: TPA-inducible factor jun/AP1 activates cAMP-responsive enhancer elements*. Oncogene, 5, 427–431.
- Sheng M., Thompson M.A., Greenberg M.E., 1991. *CREB: a Ca²⁺-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases*. Science, 252, 1427–1430.
- Stachowiak M.K., Fluharty S.J., Stricker E.M., Zigmond M.J., Kaplan B.B. 1986. *Molecular adaptations in the catecholamine biosynthesis induced by cold stress and sympathectomy*. J. Neurosci. Res., 16, 13–24.
- Stachowiak M.K., Goc A., 1992. *Regulation of gene expression in catecholamine and opioid synthesis in sympathoadrenal system — nuclear mechanisms and second messenger systems*. [W:] G. E. Hollie, J. D. Wood (red.), Advances in the innervation of the gastrointestinal tract. Elsevier, Amsterdam, 251–263.
- Stachowiak M.K., Goc A., Hong J.S., Kaplan B.B., Stachowiak E.K., 1990a. *Neural and hormonal regulation of the tyrosine hydroxylase gene in adrenal medullary cells: participation of c-fos and AP1 factors*. Mol. Cell. Neurosci., 1, 202–213.

- Stachowiak M. K., Goc A., Hong J.-S., Poisner A., Jiang H.-K., Stachowiak E. K., 1993. *Regulation of tyrosine hydroxylase gene expression in depolarized nontransformed bovine adrenal medullary cells: Second messenger systems and promoter mechanisms*. *Molec. Brain Res.*, w druku.
- Stachowiak M. K., Hong J. S., Viveros O. H., 1990b. *Coordinate and differential regulation of phenylethanolamine N-methyltransferase, tyrosine hydroxylase and proenkephalin mRNAs by neural and hormonal mechanisms in cultured bovine adrenal medullary cells*. *Brain Res.*, 510, 277–288.
- Stachowiak M. K., Jiang H. K., Poisner A. M., Tuominen R. K., Hong J.-S., 1990c. *Short and long term regulation of catecholamine biosynthetic enzymes by angiotensin in cultured adrenal medullary cells*. *J. Biol. Chem.*, 265, 4694–4702.
- Stachowiak M. K., Sebbane R., Stricker E. M., Zigmond M. J., Kaplan B. B., 1985. *Effect of chronic cold exposure on tyrosine hydroxylase mRNA in rat adrenal gland*. *Brain Res.*, 359, 356–359.
- Stachowiak M. K., Stricker E. M., Zigmond M. J., Kaplan B. B., 1988. *A cholinergic antagonist blocks cold stress-induced alterations in rat adrenal tyrosine hydroxylase mRNA*. *Mol. Brain Res.*, 3, 193–195.
- Tank A. W., Lewis E. J., Chikaraishi D. M., Weiner N., 1985. *Elevation of RNA coding for tyrosine hydroxylase in rat adrenal gland by reserpine treatment and exposure to cold*. *J. Neurochem.*, 45, 1030–1033.
- Vyas S., Faucon Biguet N., Mallet J., 1990. *Transcriptional and posttranscriptional regulation of tyrosine hydroxylase gene by protein kinase C*. *EMBO J.*, 9, 3707–3712.
- Yoon S. O., Chikaraishi D. M., 1992. *Tissue-specific transcription of the rat tyrosine hydroxylase gene requires synergy between an AP1 motif and an overlapping E box-containing dyad*. *Neuron*, 9, 55–67.
- Zigmond R. E., Schwarzschild M. A., Rittenhouse A. R., 1989. *Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation*. *Ann. Rev. Neurosci.*, 12, 415–461.