

DARIUSZ JAN SMOLIŃSKI¹, BOGDAN WRÓBEL¹, KSZYSZTOF ZIENKIEWICZ²,
JANUSZ NIEDOJADŁO¹

¹*Zakład Biologii Komórki*

²*Pracownia Biologii Rozwoju*

Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej

Uniwersytet Mikołaja Kopernika,

Gagarina 9, 87-100 Toruń

e-mail: darsmol@cc.uni.torun.pl

wrobel@biol.uni.torun.pl

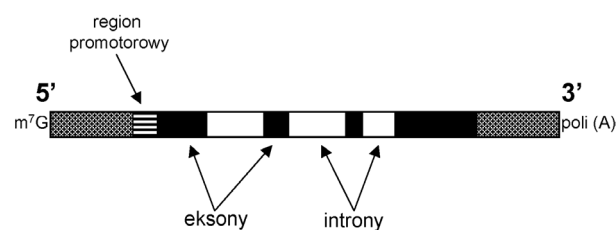
ORGANIZACJA SYSTEMU SPLICINGOWEGO W KOMÓRKACH LINII GENERATYWNEJ

WSTĘP

Nowe tysiąclecie powitaliśmy poznaniem sekwencji genetycznej m.in. roślin wyższych – *Arabidopsis thaliana* (rzodkiewnik, roślina o jednym z najmniejszych genomów), czy tak bliskiego nam gatunku jakim jest *Homo sapiens*.

Pierwotnie obowiązywał dogmat, że jeden gen koduje tylko jedno białko, dlatego też zaskoczeniem dla wszystkich było wykazanie, że ilość białek wielokrotnie przewyższa liczbę genów. Kluczem w wyjaśnieniu tego paradoksu okazało się ujawnienie, że geny kodujące białka zawierają dwa rodzaje sekwencji: eksony i introny, które w procesie transkrypcji ulegają przepisaniu na sekwencje pre-mRNA (Ryc. 1). Sekwencje intronowe zostają usunięte z pre-mRNA w procesie określanym terminem składanie (ang. splicing). Wyróżniane są dwa rodzaje splicingu: splicing konstytutywny, w wyniku którego zostają wycięte z pre-mRNA określone genu wszystkie introny, bądź splicing alternatywny, gdy usuwane są tylko niektóre introny. W przypadku splicingu alternatywnego z pre-mRNA transkrybowanego na matrycy jednego genu, formowane może być kilka rodzajów dojrzałych mRNA, zdolnych do udziału w

translacji różnych białek. Ujawnienie możliwości zachodzenia splicingu alternatywnego w jednoznaczny sposób pozwoliło wyjaśnić zjawisko kodowania przez jeden gen kilku rodzajów białek.



Ryc. 1 Schemat mozaikowego transkryptu pre-mRNA.

Wejście na szlak linii generatywnej wymaga specyficzną strategię komórki związaną z redukcją materiału genetycznego oraz funkcjonowaniem haploidalnego genomu. Wyraża się ona uruchomieniem nowych szlaków metabolicznych oraz zablokowaniem innych, funkcjonujących tylko w komórkach somatycznych, jak również uderzającymi zmianami strukturalnymi. Tak zaaranżowana sceneria stwarza niezwykle szanse dla ujawnienia wielu tajemnic funkcjonowania systemu

splicingowego, niemożliwych do zarejestrowania w komórkach somatycznych.

Prezentowana przez nas praca nie pretenduje do systematycznego przeglądu literatury tematu, lecz stanowi próbę zaprezen-

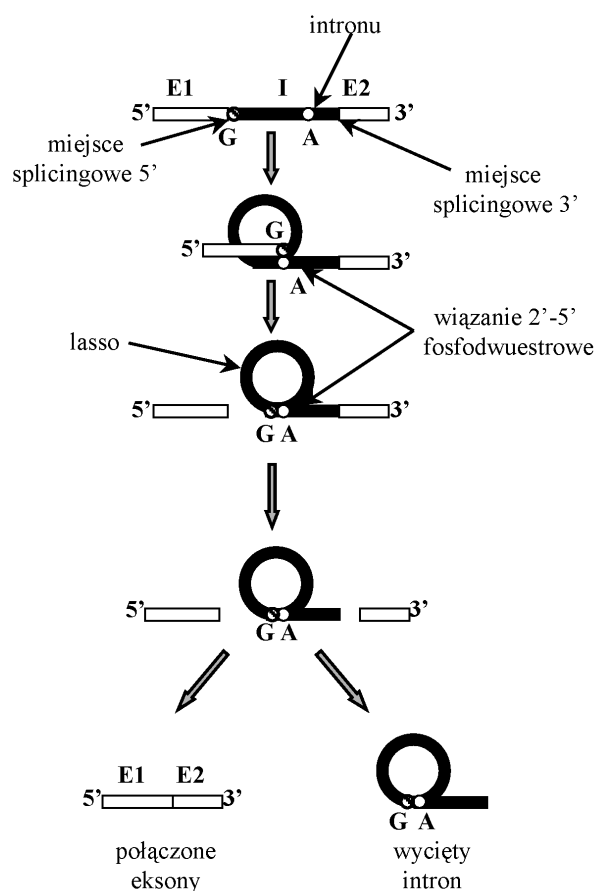
wania możliwości jakie stwarzają badania komórek linii generatywnej dla zbudowania spójnego modelu funkcjonowania systemu splicingowego u Eukariota.

PROCES SKŁADANIA TRANSKRYPÓW – SPLICING

Ogólny mechanizm wycinania intronów jest wspólny dla wszystkich Eukariota. Zachodzą w nim dwie reakcje cięcia na granicy intron-ekson, są to reakcje typu transestryfikacji. Podczas pierwszej, eliminacja intronu rozpoczyna się od cięcia (hydrolizy) w miejscu splicingowym 5'. Hydrolizę w miejscu 5' wykonuje wewnętrzny element intronu – grupa 2'-hydroksylowa adenozy, która znajduje się w tzw. punkcie rozgałęzienia intronu (ang. branch point). Wolny koniec 5' intronu (guanina) zostaje przyłączony do tej adenozy z punktu rozgałęzienia intronu (2'-5' wiązanie fosfodwuestrowe). W wyniku tego cięcia powstaje wolny ekson 5' i struktura przypominająca lasso (ang. lariat intermediate) zbudowana z intronu i eksonu 3'. W drugiej reakcji następuje cięcie w miejscu splicingowym 3' (na końcu 3' intronu). Następuje wtedy oderwanie intronu w postaci lassa (który ulega ostatecznie degradacji) i połączenie dwóch eksonów (Ryc. 2).

Podstawowym elementem maszynierii splicingowej jest formowana wieloetapowo struktura określana powszechnie terminem spliceosom. Jest on zbudowany z niskocząsteczkowych jądrowych RNA (snRNA) oraz ok. 70 białek. Rzeczą niezwykle istotną przy usuwaniu intronów jest precyzja tego procesu. Przesunięcie miejsca cięcia nawet o jeden nukleotyd może spowodować, że z mRNA w ogóle nie wytworzy się białko, albo będzie ono wadliwe. Za precyzję tego procesu odpowiadają głównie snRNA. Posiadają one w swojej budowie sekwencje komplementarne do intronu. W procesie hybrydyzacji między U1, U2 i U5 snRNA a intronem następuje precyzyjne przyczepienie spliceosomu do intronu (na zasadzie zamek-klucz), z dokładnością co do jednego nukleotydu. Również za przegrupowanie się intronu, w związku z tworzeniem struktury lassa, czy też zbliżanie dwóch końców eksonowych odpowiedzialne są snRNA. Oddziaływania tego typu powstają wtedy dzięki hybrydyzacji pomiędzy poszczególnymi snRNA. W skład

spliceosomu wchodzi pięć snRNA, a mianowicie U1, U2, U4, U5, U6. Zawierają one od 100 do 250 nukleotydów, występują od 200 tysięcy do miliona kopii na komórkę. Należą one do grupy niskocząsteczkowych RNA charakteryzujących się wysoką zawartością grup urydylowych, stąd pochodzi ich określenie UsnRNA. Są one metabolicznie stabilne. W obrębie tej grupy wyróżnia się takie, u których brak jest modyfikacji na końcu 5' oraz takie, które wykazują specyficzną modyfikację na końcu 5' – znaną pod nazwą „czapeczki”. Poznano jak dotąd dwa typy takiej struktury: czapeczka 2,2,7 trimetyloguanozy-



Ryc. 2 Schemat reakcji splicingowej.

Oznaczenia: E1 – ekson 1, E2 – ekson 2, A – adenina w miejscu rozgałęzienia intronu, G – guanina w miejscu splicingowym 5'.

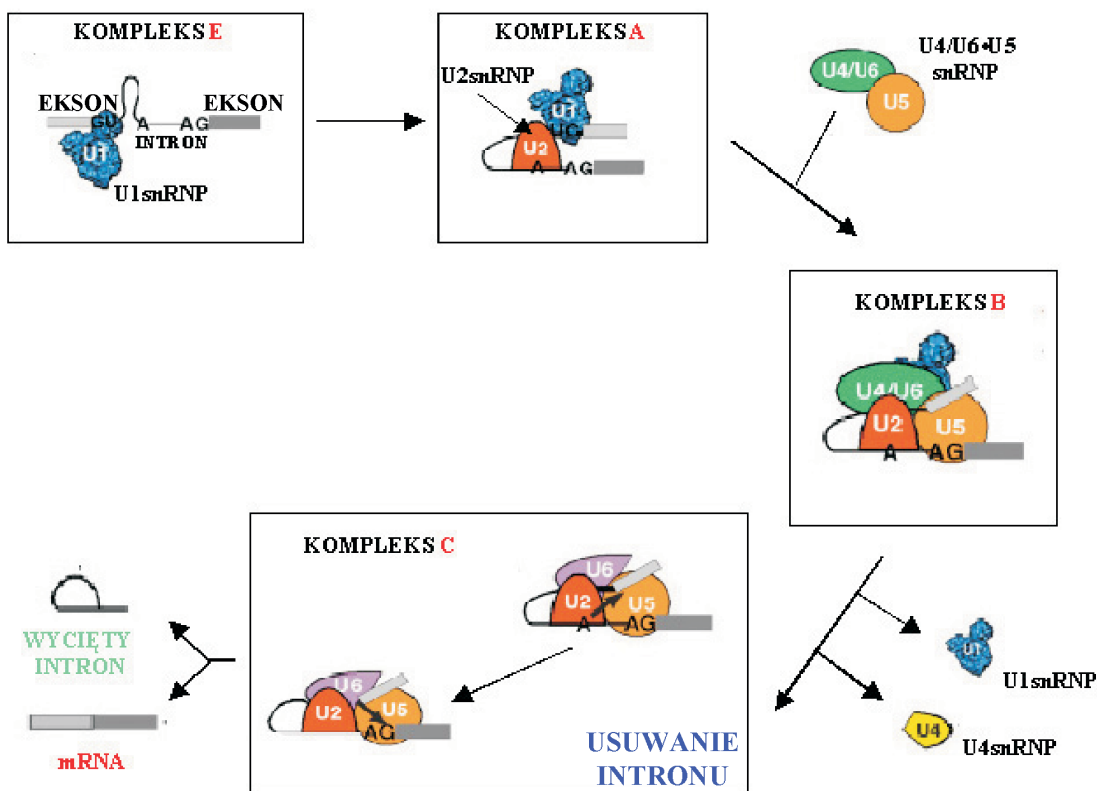
nowa (TMG) (charakteryzuje U1-U5 snRNA) oraz γ -monometyloguanozynowa (obecna w U6 snRNA) (BOCHNIG i współaut. 1987).

W pierwszym etapie formowania się spliceosomu do pre-mRNA na miejscu 5' intronu wiąże się U1snRNP. Towarzyszy temu przyłączenie kompleksu białkowego SF1/MBP. Równolegle do traktu pirymidynowego przyłącza się białkowy czynnik U2AF (ang. U2-snRNA auxiliary factor), dzięki czemu powstaje tzw. kompleks E przygotowujący pre-mRNA do wejścia na szlak splicingu (Ryc. 3). Kompleks E ulega przekształceniu w kompleks A, gdy U2 snRNP zwiąże się z punk-

ceosom, określane terminem kompleksu C, jest katalitycznie aktywny (GRAVELEY 2000).

BIAŁKA Sm

Niskocząsteczkowe jądrowe RNA tworzące spliceosom nie występują w komórce w postaci nagich łańcuchów rybonukleinowych, lecz są zasocjowane z białkami. Jądrowe U1, U2, U4 i U5 snRNP zbudowane są z białek rdzeniowych Sm (wspólnych) oraz takich białek jak np. U1-70kDa i U2AF³⁵, które są białkami unikatowymi dla poszczególnych



Ryc. 3 Formowanie kompleksów spliceosomalnych podczas tworzenia aktywnego katalitycznie spliceosomu. Objasnienia w tekście (wg JURICA I MOORE 2003, zmieniona).

tem rozgałęzienia. W dalszym etapie do U2 snRNP przyłącza się wcześniej uformowany kompleks U4/U6-U5 snRNP tworząc kompleks B. Proces ten wymaga udziału dwóch białkowych czynników pomocniczych SF1 i SF2 (ang. splicing factor). Ostatecznie następuje przegrupowanie całego kompleksu, w wyniku którego U6 przesuwa U1 z miejsca 5', natomiast U6 i U2 wchodzi w interakcję, U5 łączy miejsca splicingu wiążąc się z końcami eksonu w 3' i 5' miejscach splicingowych. U1 i U4 ulegają destabilizacji. Uformowany ostatecznie spli-

częstek snRNA. Białkowy rdzeń wspólny dla U snRNA, będących produktami polimerazy II RNA, złożony jest z siedmiu białek (B/B', D1, D2, D3, E, F, G), które w bardzo specyficzny sposób wiążą się w miejscu określanym mianem Sm-site U1, U2, U4 oraz U5 snRNA (HERMANN i współaut. 1995).

Na podstawie badań *in vitro* stwierdzono, że białka spliceosomalne Sm tworzą trzy stabilne wolne od RNA, heteromeryczne kompleksy EFG, D1D2, B/B'D3 (RAKER i współaut. 1996). Proces montowania tych kompleksów

do snRNA jest dwuetapowy. W pierwszym etapie kompleksy EFG i D1D2 tworzą z RNA cząstkę subrdzeniową, do której w drugim etapie przyłączy się kompleks B/B'D3 dając w efekcie kompletną domenę rdzeniową Sm. Proces ten w warunkach *in vitro* nie wymaga dodatkowych czynników białkowych (RAKER i współaut. 1999) w przeciwieństwie do składania białek Sm *in vivo*, gdzie niezbędne jest białko SMN (ang. survival motor neurons) oraz białko SIP1 (ang. SMN – interaction protein 1) (FISCHER i współaut. 1997, LIU i współaut. 1997).

BIAŁKA SR

Jedną z kluczowych funkcji w aktywacji splicesosomu pełnią białka należące do grupy SR. Są to białka pomocnicze, które są niezbędne do zajścia splicingu, ale nie są bezpośrednio i trwale związane z snRNA. Białkowe czynniki splicingowe SR odgrywają bardzo ważną rolę zarówno w procesie formowania kompleksu pre-spliceosomowego, spliceosomowego, jak i w późniejszych etapach dwóch reakcji transestryfikacyjnego procesu wycinania intronów i łączenia eksonów. Przykładem białka z rodziny SR jest jedna z protein uczestnicząca w zbliżaniu miejsc splicingowych 3' i 5'-białkowy splicingowy czynnik SC35, co zostało potwierdzone przez doświadczenia wykazujące możliwość równoczesnych interakcji pomiędzy SC35, a U1-70kDa i U2AF³⁵ (GRAVELEY 2000).

Białka z rodziny SR są strukturalnie i funkcjonalnie powiązane i pełnią dwojaką rolę w czasie składania pre-mRNA. Stanowią one podstawowe czynniki niezbędne do zajścia splicingu konstytutywnego, lecz zarazem uczestniczą w procesie alternatywnego splicingu, który prowadzi w konsekwencji do powstania zmienionego matrycowego RNA i co za tym idzie alternatywnego produktu końcowego tego samego genu.

Białka SR posiadają strukturę zawierającą jedną lub dwie domeny rozpoznające RNA-RRM (ang. RNA recognize motif), zwane także RBD (ang. RNA binding domain) i jedną C-terminalną domenę RS bogatą w dimerowe powtórzenia argininowo-serynowe. Domeny te i białka je posiadające stanowią jedne z najbardziej rozpowszechnionych molekuł u Eukariota. W świecie roślin, jak i zwierząt, zachowawczość białek SR jest rzędu 90%

(ZAHLER i współaut. 1993). Sugeruje to ich bardzo wysoką, ewolucyjną konserwowalność i ważne, funkcjonalne znaczenie dla wszystkich żywych organizmów.

KOMPARTMENTY JĄDROWE ZWIĄZANE Z PROCESEM SPLICINGU

Przełomem w badaniach nad organizacją komórkowego systemu splicingowego był niebywale intensywny rozwój technik immunocytochemicznych oraz hybrydyzacji *in situ* w latach 90. ubiegłego wieku. Dzięki temu stało się możliwe ujawnienie przestrzennych zależności pomiędzy poszczególnymi elementami maszynierii splicingowej. Nagromadzone dotychczas informacje jednoznacznie wskazują, że snRNA oraz białka obsługujące proces splicingu zlokalizowane są w jądrze w sposób nieprzypadkowy i zajmują ściśle wydzielone przestrzenie, dla określenia których stosuje się najczęściej terminy: „kompartamenty jądrowe” lub „domeny jądrowe”. Wśród domen jądrowych, zaangażowanych w proces splicingu, wyróżnia się: włókienka perichromatynowe, ziarnistości interchromatynowe oraz kilka kategorii ciał jądrowych (LAMOND i SPECTOR 2003).

Włókienka perichromatynowe (ang. perichromatin fibrills, PF) uważane są za morfologiczny wyraz pozajądrowej aktywności transkrypcyjnej. Nazwę swoją zawdzięczają położeniu na peryferiach skondensowanej chromatyny. W strukturach tych, oprócz polimerazy II RNA i czynników transkrypcyjnych, zlokalizowano pięć klas snRNA oraz białka niezbędne podczas reakcji splicingowej. Dlatego też włókienka perichromatynowe rozpatrywane są zarówno jako miejsce transkrypcji, jak i splicingu pre-mRNA.

Ziarnistości interchromatynowe (ang. interchromatin granules, IG) złożone są z ziaren o wymiarach 20–25 nm, które łączą cienkie włókienka o grubości 10 nm. Ziarnistości interchromatynowe nie są związane ze startem transkrypcji, o czym świadczy brak DNA oraz śladów pulsowo podanej H³ urydyny i jej analogów.

Badania ultrastrukturalne ujawniły, że IG są odpowiednikiem obserwowanych na poziomie mikroskopu świetlnego skupisk czynników splicingowych określanych mianem „speckles”.

Wśród ciał jądrowych związanych ze splicingiem najszerzej badane i najlepiej

poznane wydają się być ciała Cajal'a (ang. Cajal bodies). Pierwszy opisał je, ponad 100 lat temu, hiszpański cytolog Santiago Ramon'y Cajal, w komórkach nerwowych szczura. Od nazwiska odkrywcy pochodzi także obecna nazwa tych struktur. W literaturze anglojęzycznej ciała te, ze względu na swoją ultrastrukturę, określane są także terminem coiled bodies (CB), co oznacza ciała kłębuszkowate. Wieloletnie badania wykazały, że CB są strukturą niezwykle bogatą w elementy systemu splicingowego. Zastosowanie technik immunocytochemicznych pozwoliło ustalić, że markerowym białkiem ciał Cajala jest koilina występująca specyficznie i w wysokim stężeniu właśnie na obszarze tych struktur. Obecność wszystkich splicingowych UsnRNP w CB wskazuje na ich związek z procesem splicingu, jednakże brak wspomnianego powyżej białka SC35 wyklucza

te struktury jako miejsce zachodzenia reakcji splicingowej. Ponadto wykazywano częsty związek przestrzenny ciał Cajala z genami kodującymi snRNA, snoRNA (małe jąderkowe RNA) oraz białka histonowe, co w połączeniu z obecnością polimerazy II RNA i licznych czynników transkrypcyjnych pozwala przypuszczać, że struktury te biorą udział w biogenezie i/lub obróbce wymienionych makromolekuł. Wyniki badań z ostatnich lat wskazują, że w organizacji systemu splicingowego mogą brać udział inne ciała jądrowe, takie jak ciała znane pod angielskim terminem „gems” (ang. gemini of coiled bodies), często obserwowane jako przestrzennie zasocjowane z ciałami Cajala, zawierające białka związane z recyklingiem cząsteczek snRNP.

ORGANIZACJA SYSTEMU SPLICINGOWEGO W GAMETOGENEZIE U ZWIERZĄT

Wyjaśnienie mechanizmu ekspresji genów Eukariota od dawna inspirowało badaczy do poszukiwania dogodnych modeli badawczych umożliwiających powiązanie zdarzeń zachodzących na poziomie molekularnym z przestrzenną organizacją komórki.

Jednym z najbardziej spektakularnych modeli pozwalających na spełnienie tych oczekiwań okazały jądra oocytów płazów. Ich niezaprzeczalną zaletą są z reguły olbrzymie jądra komórkowe (ang. germinal vesicles, GV), których średnica sięga ok. 400 μm . Ta właściwość umożliwiła prowadzenie eksperymentów polegających na iniekcji przeciwciał oraz sond molekularnych do wnętrza jądra komórkowego, dzięki czemu stało się możliwe jednoznaczne zbadanie molekularnego składu poszczególnych kompartmentów jądrowych.

Zawrotną karierę wiodącego materiału badawczego zrobiły oocyty żaby *Xenopus laevis*, dzięki rozwijającym się niezwykle dynamicznie badaniom podjętym przez Galla i grupę jego współpracowników (GALL i współaut. 1999, GALL 2000). Jądra tych komórek zawierają dobrze, odróżnialne od siebie, kompartmenty oraz stale aktywne chromosomy, które swoim wyglądem przypominają szczoteczki do butelek. Pierwsze obserwacje na poziomie mikroskopu świetlnego zaintrygowały badaczy obecnością w ściśle określonych miejscach chromosomów szczoteczkowych kulistych struktur tzw. sfer (ang. sphere organelles) oraz

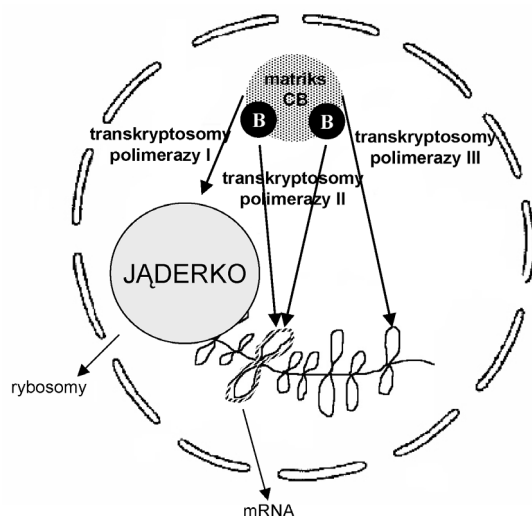
sfer niekontaktujących się z chromosomami i mniejszych od nich ziarnistości. Przełomowym momentem w wyjaśnieniu tajemnicy sfer występujących w jądrach oocytów *X. laevis* było ujawnienie na ich terenie białka koiliny, co sygnalizowało związek tych struktur z ciałami jądrowymi komórek somatycznych określanym terminem coiled bodies (CB). Wcześniejsze, gromadzone od wielu lat informacje jasno dowodziły, że CB są elementami ściśle związanymi z transkrypcją i maszyną splicingową. Niezwykle szybki postęp badań dostarczył licznych, przekonujących dowodów, że ciała sferyczne występujące w oocytach *X. laevis* i somatyczne coiled bodies są strukturami homologicznymi.

Jądra oocytów *X. laevis* zawierają od 50–100 CB, których średnica waha się w granicach od 1–10 μm . Badania w mikroskopie elektronowym ujawniły, że matriks CB zbudowana jest z silnie kontrastujących się ziaren o średnicy 20–30 nm, wymieszanych z ziarnami o znacznie słabszym kontraście. Jakkolwiek CB w oocytach *X. laevis* zawierają elementy systemu transkrypcyjnego polimerazy RNA I, II, III (Ryc. 4), to możliwość zachodzenia transkrypcji w tych strukturach należy wykluczyć, ponieważ jak dotąd nie stwierdzono na ich terenie obecności DNA ani też prekursorów RNA. Kluczowym dla poznania funkcji CB były pojawiające się w ostatnich latach liczne doniesienia wskazujące,

że CB wyposażone są w elementy systemu dojrzewania pierwotnych transkryptów polimerazy RNA I, II, III (Ryc. 4, Tabela 1).

Zazwyczaj na powierzchni CB odnotowuje się jedno lub kilka kulistych elementów o średnicy 1–4 μm , które mogą także występować w postaci niezwiązanej w nukleoplazmie, w ilości od kilkuset do kilku tysięcy. Okazało się, że struktury te zawierają znaczne ilości niskocząsteczkowych rybonukleoprotein (snRNP), dlatego też dla ich określenia przyjęto stosować termin snurposomy (od angielskiej wymowy akronimu snRNP). Snurposomy w oocytach *X. laevis* charakteryzujące się obecnością U1, U2, U4/U6 i U5 snRNA, podobnie jak u innych płazów, zaliczane są do grupy B-snurposomów, natomiast snurposomy traszki mające tylko U1 zaklasyfikowano do klasy C-snurposomów.

Wyniki badań ostatnich lat wskazują, że termin B-snurposomy wydaje się być nieprecyzyjny ponieważ te ciała zawierają także inne białka kluczowe dla maszyneryi transkrypcji i dojrzewania RNA (Ryc. 4, Tabela 1).



Ryc. 4. Model udziału ciał Cajala oraz snurposomów B w segregacji i montażu kompleksów transkrypcyjnych i splicingowych w oocytach płazów.

Strzałki przedstawiają przemieszczanie transkryptosomów w okolicie transkrybowanych przez polimerazę I, II oraz III RNA (objaśnienia w tekście); B, snurposomy B (wg GALL i współaut. 2000, zmieniona).

Zastosowanie techniki mikroskopii elektronowej ujawniło występowanie na terenie B-snurposomu wielu tysięcy cząstek o średnicy 20–30 nm określanych terminem trans-

kryptosomy. Wysoce atrakcyjną wydaje się hipoteza, że każdy transkryptosom reprezentuje kompleks polimerazy II i podstawowych czynników transkrypcyjnych oraz elementy maszyneryi splicingowej, dojrzewania 5' końca (ang. cleavage) i poliadenyacji (koniec 3'). Ziarnistości podobne do obserwowanych w B-snurposomach transkryptosomów polimerazy II RNA odnotowano także w matriksie ciał Cajala, która zawiera także większe ziarniste elementy (40–50 nm) reprezentujące być może transkryptosomy pol I.

Znacząca ilość informacji o strukturze i chemicznych składnikach ciał jądrowych w oocytach *X. laevis*, która pojawiła się w ostatnich 10. latach skłoniła Galla i współpracowników do podjęcia próby zaprezentowania funkcjonalnego modelu ciał jądrowych (Ryc. 4). Podstawowym założeniem tego modelu jest przekonanie, że ciała Cajala oraz snurposomy (A i B) są zespołem kompartmentów jądrowych, na terenie których gromadzone są transkryptosomy polimeraz RNA I, II, III. Autorzy sugerują, że kompleksy te transportowane są do różnych rejonów jądra: (1) transkryptosomy polimerazy RNA I – przemieszczane są do strefy włóknikowej jądra, (2) transkryptosomy polimerazy RNA II – zmagazynowane w B-snurposomach, uważanych za odpowiednik skupień ziarnistości interchromatynowych (ang. speckles) w komórkach somatycznych, wędrują w rejon pętli chromosomów szczoteczkowych, na których odbywa się transkrypcja mRNA; (3) transkryptosomy polimerazy RNA III – kierowane są do stosunkowo nielicznych i specyficznych miejsc na chromosomie w okolicie genów kodujących 5S rRNA i tRNA.

Cenne informacje dotyczące funkcjonowania systemu splicingowego wniosły pracownice wykorzystujące jako materiał badawczy oocyty owadów (BOGOLYUBOV i współaut. 2001). W jądrach oocytów owada mącznika młynarka (*Tenebrio molitor*) chromosomy zgrupowane są w charakterystyczne struktury określane terminem kariosphere. Poszczególne etapy rozwoju kariosphere są dobrze morfologicznie zdefiniowane i stanowią bardzo dogodny punkt odniesienia do śledzenia transformacji elementów systemu splicingowego. W początkowym okresie rozwoju kariosphere (stadium siateczkowate i zwarte), kondensujące chromosomy, otoczone są perichromatynowymi włóknikami często wymieszanymi

z ziarnistą materią. Elementy te znakują się przeciwciałami przeciwko ufosforylowanej i nieufosforylowanej pol II, snRNPs i SC35 (BOGOLYUBOV i PARFENOV 2001). Wysoce prawdopodobne wydaje się, że z tego materiału mogą być formowane ciała jądrowe pojawiające się licznie, gdy kariosphere zostaną w pełni uformowane osiągając postać pierścieniową, charakteryzującą się najwyższym

serwowane jest zjawisko odpączkowania błony jądrowej oocytów i formowania organelli określanych terminem jąder dodatkowych (ang. accessory nuclei, AN). W jądrach dodatkowych występują specyficzne ciała tzw. pseudojąderka, które od dawna budziły zainteresowanie wielu badaczy, tj. od momentu kiedy okazało się, że struktury te biorą aktywny udział w procesie ekspresji genu. Badania w

Tabela 1. Poznane składniki CB z oocytów *Xenopus laevis*.

	Matrix CB	B-snurposomy
Koilina	+	-
Polimeraza RNA I	+	-
SnoRNA	+	-
Nop 140	+	-
Fibrylaryna	+	-
B23	+	-
Polimeraza RNA II	+	+
Splicingowe snRNA	+	+
Białka Sm	+	+
Białka SR	+/-	+
TFIIF(RAP74)	+	+
CPSF100	+	+
CstF77	+	+
U7 snRNA	+	-
SLBP1	+	-
Polimeraza RNA III	+	-
TFIIIA	+	-

stopniem kondensacji chromatyny. Ciała jądrowe *Tenebrio molitor* wydają się być strukturami homologicznymi do B-snurposomów obserwowanych w oocytach płazów lub interchromatynowych granul (IGCs) występujących w oocytach ssaków. Wyniki tej pracy demonstrują wyraźną dynamikę rozmieszczenia czynników splicingowych korespondującą z kondensacją chromatyny. Podczas intensywnej kondensacji chromatyny i redukcji transkrypcji prawie wszystkie czynniki splicingowe karioplazmy, są gromadzone w ciałach jądrowych. Akumulacja czynników splicingowych i transkrypcyjnych w wyodrębnionych kompartmentach jąder oocytów *Tenebrio molitor* jest zgodna z często odnotowywaną tendencją towarzyszącą zmniejszeniu aktywności metabolicznej jądra.

Uderzająco różniące się od ciał jądrowych oocytów *Tenebrio molitor* struktury związane z systemem splicingowym obserwowano u innych gatunków owadów (ADAMSKA i BILIŃSKI 1997). U niektórych gatunków owadów ob-

tym zakresie, z wykorzystaniem jako modelu oocytów owadów od dawna prowadzone są w zespole kierowanym przez prof. Bilińskiego z Instytutu Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. W jądrach dodatkowych oocytów osy (*Vespa germanica*) występują 1–2 gęste inkluzje (BILIŃSKI i KLOC 2002). Każda inkluzja zbudowana jest ze sferycznego ciała i półsferycznej struktury zawierającej liczne 20–30 nm ziarnistości. Badania immunocytochemiczne i *in situ* hybrydyzacja wykazały, że inkluzje zawierają białka AgNOR, p80 koilinę, białka Sm i snRNA. Zgodnie z terminologią zaproponowaną przez Galla, sferyczne ciała są odpowiednikiem CB natomiast półsferyczne struktury odpowiadałyby B-snurposom. Ziarna na terenie półsferycznych struktur reprezentują transkryptosomy opisywane przez Galla. Pseudojąderka występujące w jądrach dodatkowych wydają się być strukturami homologicznymi z dużymi sferycznymi organellami, tzw. Bönnenkörper lub endobodies, występującymi w pęcherzykach zarodkowych ni-

ektórych grup owadów. Endobodies są z reguły mało zróżnicowane morfologicznie oraz wyposażone w fibrylarynę, koilinę, snRNP, nie zawierają natomiast czynników splicingowych z grupy SR, np. białka SC35.

Zdumiewającą organizacją charakteryzują się ciała jądrowe obserwowane w nieaktywnym genetycznie stadium rozwojowym oocytów żaby trawnej (*Rana temporaria*). W ciałach tych, nazwanych ciałami złożonymi (ang. multicomponent bodies CB, MCB), wyodrębnić można pięć stref o różniących się upakowaniem elementów włókienkowatych i

wyposażeniem chemicznym: I – fibrylaryna, B23; II – B23; III – snRNP, B23; IV – fibrylaryna; B23, koilina, snRNP; V – koilina, snRNP, fibrylaryna, B23 (PARFENOV i współaut. 1996). Obecność w ciałach MCB białka B23 wskazuje na ich związek z jądrem, natomiast odróżnia je od ciał Cajala, o których wiadomo że nie są wyposażone w białko B23. Wysoce prawdopodobne wydaje się, że MCB reprezentują struktury magazynujące materiał, który może być wykorzystany we wczesnych stadiach embriogenezy.

ORGANIZACJA SYSTEMU SPLICINGOWEGO W GAMETOGENEZIE U ROŚLIN

Funkcjonowanie systemu splicingowego w komórkach linii generatywnej roślin jest poznane w znacznie mniejszym zakresie niż u zwierząt. Domeny jądrowe wyposażone w molekuly związane z procesem składania pre-mRNA opisano jak dotąd w mikrosporocytach oliwki (*Olea europea*) (OLMEDILLA i współaut. 1997), modrzewia (*Larix decidua* Mill.) (SMOLIŃSKI i GÓRSKA-BRYLASS 1996a), mikrosporach i ziarnach pyłkowych rzepaku (*Brassica napus* L) (STRAATMAN i SCHEL 2000), oraz papryki rocznej (*Capsicum annuum* L) (TESTILLANO i współaut. 1995).

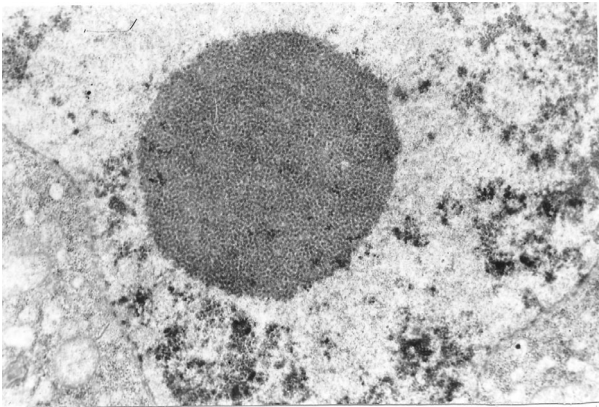
Mikrosporocyty oliwki charakteryzują się obecnością struktur jądrowych, odpowiadających ultrastrukturą i wyposażeniem molekularnym ciałom Cajala (OLMEDILLA i współaut. 1997). Podczas profazy mejozy obserwowano po kilka takich ciał w jądrze. W okresie leptotenu były małymi strukturami znajdującymi się w przestrzeniach interchromatynowych, w zygotenie i pachytenie wykazywały bliski kontakt z jądrem, czasami tworząc „czapeczkę na jądrze”. W okresie diplotenu posiadały największe rozmiary i obserwowano je ponownie w przestrzeniach interchromatynowych. Odnotowano w nich obecność niskocząsteczkowego jądrowego RNA (U3 snoRNA), co wskazuje na funkcjonalny związek z jądrem. Na tej podstawie założono, że CB nie są zaangażowane jedynie w wydarzenia związane z obróbką pre-mRNA, ale również rRNA.

Duży udział we wzbogaceniu wiedzy na temat organizacji systemu splicingowego w linii komórek generatywnych roślin wniosły badania mikrosporocytów modrzewia, zapo-

czątkowane w latach 70. przez zespół pod kierownictwem prof. A. Górskiej-Brylasy w Zakładzie Biologii Komórki Uniwersytetu M. Kopernika w Toruniu (GÓRSKA-BRYLASS i WRÓBEL 1978). W profazowych mikrosporocytach modrzewia obserwuje się liczne, rybonukleoproteinowe ciała jądrowe, które ze względu na ich charakterystykę molekularną zaliczyć można do odpowiedników ciał Cajala występujących w somatycznych komórkach ssaków czy oocytach płazów. Kuliste ciała o zróżnicowanych wymiarach (od 0,6 do 4 mm średnicy), rozmieszczone są w przestrzeniach interchromatynowych (GÓRSKA-BRYLASS i współaut. 1988). Występują one podczas profazy mejozy w okresie od leptotenu do diakinezy. Ich średnia liczba w komórce waha się od 3–20. W leptotenu/pachytenie są strukturami o wymiarach od 0,6–1 mm wykazującymi nieregularny kształt. Wielkością przypominają ciała Cajala somatycznych komórek ssaków. W miarę postępu profazy stają się większe i przyjmują bardziej regularny, kulisty kształt, osiągając większe rozmiary w diplotenie (Ryc. 5). Uwagę zwraca fakt, że wszystkie te ciała bez względu na fazę rozwoju mikrosporocytów, wykazują podobną substrukturę. Substruktura tych ciał jest podobna do zwiniętego kłębaka puszystych nici o średnicy 25–35 nm, utworzonych z bardzo cienkich 5 nm włókienek. Włókienka te tworzą nieregularną strukturę II rzędu (nić 25–30 nm), w której wyróżnić można powtarzające się odcinki luźniej i silniej skondensowane (Ryc. 5). Tego typu budowa morfologiczna charakteryzuje również ciała CB ssaków i mejozytne ciała

CB *Xenopus laevis*. Na terenie CB modrzewia metodą immunolokalizacji wykryto obecność niskocząsteczkowych, jądrowych snRNA (Ryc. 6). Stosując metodę *in situ* hybrydyzacji wykazano, że badane ciała zawierają sekwencje U1 i U2 snRNA, które są zaangażowane w pierwszy etap splicingu mRNA (SMOLIŃSKI i GÓRSKA-BRYLASS 1996a).

Badania lokalizacji białka SC 35 niezbędne- go w procesie splicingu (jedno z głównych białek typu SR), nie wykazały jego obecności w CB modrzewia (SMOLIŃSKI 1997). Jak się okazało białko to było przede wszystkim

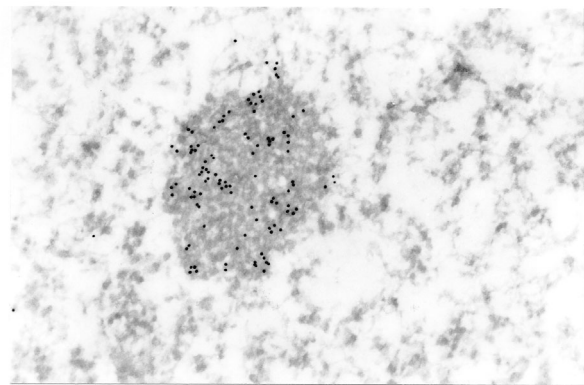


Ryc. 5. Ultrastruktura diplotenowego ciała typu CB z mejocytów modrzewia (transmisyjna mikroskopia elektronowa).

Ciało zlokalizowane jest w pobliżu błony jądrowej. Nie wykazuje z nią fizycznego kontaktu. Otoczone jest materiałem o niskiej gęstości elektronowej. Cytoplazma wypełniona rybosomami. Pow. 15000 X (zdjęcie udostępnione przez prof. A. Górską-Brylass).

obecne w przestrzeniach interchromatynowych. Nieobecność tego czynnika splicingowego na terenie mejotycznych ciał, dyskwalifikuje je jako miejsce w którym zachodzi splicing pre-RNA. Metodami immunocytochemicznymi w ciałach wykryto ponadto obecność koiliny, białka p80 będącego markerem dla zwierzęcych coiled bodies. Białku temu towarzyszy fibrylaryna – białko jąderkowe o masie 34 kDa. Obecność białka w badanych CB (podobnie jak CB mejocytów oliwki) sugeruje ich związek z dojrzewaniem rRNA. Jednakże brak rybosomalnego RNA, zarówno w CB oliwki (OLMEDILLA i współaut. 1997), jak i modrzewia (SMOLIŃSKI i GÓRSKA-BRYLASS 1996b), dyskwalifikuje je jako bezpośrednie miejsce zachodzenia tego procesu. Badania immunofluorescencyjne wykazały obecność korowych elementów spliceosomu – białek Sm w mejotyczny-

ch ciałach jądrowych modrzewia (Ryc. 7). Immunolokalizacja DNA z wykorzystaniem przeciwciał do jedno- i dwuniciowego DNA, a także zastosowanie metody z użyciem terminalnej deoksynukleotydtransferazy (TdT) wykazały jednoznacznie brak w nich DNA (SMOLIŃSKI i GÓRSKA-BRYLASS 1996b). Na podstawie uzyskanych wyników ciała CB mikrosporocytów modrzewia wydają się być strukturami związanymi ze szczególną strategią rozwojową tych komórek. Wiąże się ona ze znaczną intensyfikacją procesów metabolicznych. W okresie profazy mejotycznej u modrzewia zaobserwo-



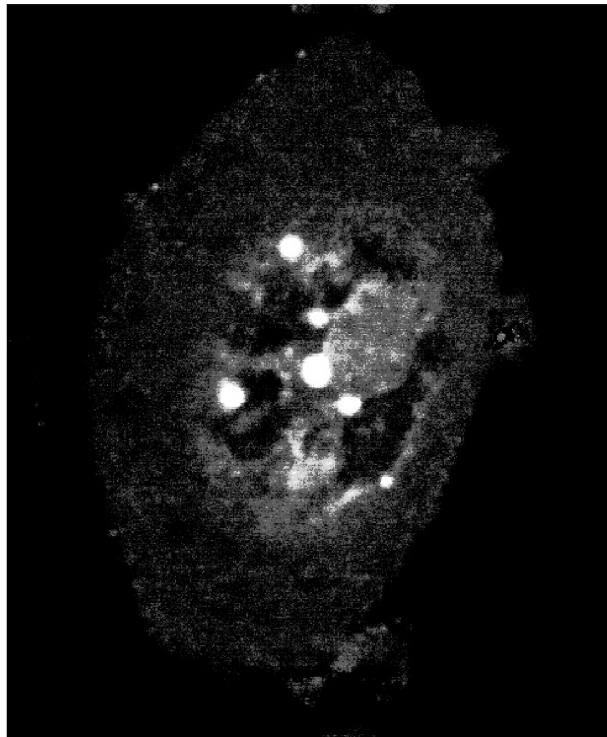
Ryc. 6. Lokalizacja snRNA na poziomie mikroskopu elektronowego w zygotenowym jądrze mikrosporocytu modrzewia (metoda immunozłotowa).

Miejsce lokalizacji snRNA wskazują czarne owalne punkty 10 nm koloidalnego złota. Nagromadzenie cząsteczek złota w owalnym ciele coiled bodies. Pow. 40000 X (zdjęcie wykonane przez dr D. J Smolińskiego).

wano intensywną transkrypcję i biosyntezę białek, a także wzrost aktywności szeregu enzymów, któremu towarzyszy szybki wzrost objętości tych komórek (CHWIROT i GÓRSKA-BRYLASS 1981; GÓRSKA-BRYLASS i współaut. 1981; CHWIROT i GÓRSKA-BRYLASS 1987, WRÓBEL i GÓRSKA-BRYLASS 1988, NOBLE 2001). Mejotyczne ciała Cajala u modrzewia, będące nośnikami elementów splicingowych, wydają się być związane z procesem dojrzewania mRNA, poprzedzającym zintensyfikowaną biosyntezę białka. Charakterystyka molekularna CB w mikrosporocytach modrzewia i oliwki, pozwala na stwierdzenie, że struktury te odpowiadają właściwości ciał Cajala w mejocytach zwierząt. Obecność takich struktur w komórkach roślin, wskazuje na ich konserwowany charakter, a zatem także

na ich uniwersalne znaczenie w funkcjonowaniu jądra.

W komórkach męskiej linii generatywnej modrzewia występowanie ciał jądrowych, zawierających molekuły związane z procesem splicingu nie ograniczało się jedynie do okresu mejozy. W czasie interfazy postmeiotycznej na terenie jądra komórkowego mikrospory



Ryc. 7. Immunofluorescencyjna lokalizacja białek Sm w mejocytach modrzewia.

Spliceosomalne białka Sm rozproszone są na terenie jądra komórkowego, jednakże głównym miejscem ich nagromadzenia są kuliste ciała Cajala. Zdjęcie wykonane przy użyciu konfokalnego skaningowego mikroskopu fluorescencyjnego. Pow. 1700 X (zdjęcie udostępnione przez E. Wiśniewską).

obserwowano specyficzną kategorię ciał jądrowych – tzw. ciała dwustrefowe (ang. bizonal bodies) (NIEDOJADIO i GÓRSKA-BRYLASS 2003). Jedna strefa tych struktur swoją

ultrastrukturą i wyposażeniem molekularnym (snRNP, białka srebro-chłonne oraz fibrylaryna) odpowiada CB, a druga zawiera białka srebrochłonne oraz Sm. Taka segregacja elementów systemu splicingowego w obrębie jednej struktury, jak i podobny, do zwierzęcych oocytów (zwłaszcza płazich) wzorzec aktywności metabolicznej skłania do rozpatrywania tych struktur jako roślinnego odpowiednika zwierzęcych snurposomów.

Również badania systemu splicingowego w mikrosporach rzepaku wykazały obecność ciał Cajala. Ciała te okazały się być najbogatszą jądrową strukturą pod względem ilości czynników splicingowych tych haploidalnych komórek (STRAATMAN i SCHEL 2000). Mikrospora będąca komórką macierzystą ziarna pyłkowego była także przedmiotem badań polegających na lokalizacji antygenów związanych ze splicingiem u papryki rocznej (*Capsicum annuum*) (TESTILANO i współaut. 1995). Ustalono, iż cząsteczki snRNP nie występują na obszarze całego jądra komórkowego mikrospory, ale ograniczone są jedynie do tzw. międzychromatynowych obszarów o strukturze włóknistej (ang. IR, interchromatin regions). Sugeruje się, że mogą to być odpowiedniki włókienek perichromatynowych (ang. perichromatin fibrils, PF) stanowiących morfologiczny wyraz procesu transkrypcji i obróbki pre-mRNA. Nie stwierdzono natomiast w opisywanych komórkach obecności ciał jądrowych zawierających czynniki splicingowe.

W czasie dalszego różnicowania się ziaren pyłkowych u rzepaku opisywane ciała były nadal obserwowane na terenie zarówno jądra komórkowego komórki wegetatywnej, jak i jądra generatywnego (STRAATMAN i SCHEL 2000). Jedynie ostatnie stadia tj. tuż przed antezą charakteryzowały się brakiem CB. Na tej podstawie wykazano, że liczba i rozmiar CB jest pozytywnie skorelowana z aktywnością metaboliczną komórki.

PODSUMOWANIE

W świetle zaprezentowanych przez nas informacji uzyskanych w wielu światowych pracowniach jasno wynika, że molekularny mechanizm splicingu jest procesem w wysokim stopniu konserwowanym w komórkach roślin i zwierząt. Jednakże uderzające okazało się, że komórkach linii genera-

tywnej, w porównaniu z komórkami somatycznymi, system kompartmentów jądrowych związanych ze splicingiem cechuje się znacznym zróżnicowaniem. Dotyczy ono zarówno struktury poszczególnych elementów, jak i ich wyposażenia chemicznego. Zaproponowany przez Galla integrujący

model funkcjonowania systemu splicingowego jest cenną próbą uporządkowania dotychczasowej wiedzy, jednakże wymaga dalszych badań do jego zaakceptowania lub weryfikacji.

W poszukiwaniu odpowiedzi na pytanie, w jakim stopniu kompartmenty jądrowe

Eukariota związane ze splicingiem tworzą spójny i uniwersalny system, konieczne jest nagromadzenie znacznie większej niż obecnie ilości danych pochodzących z badań na modelach roślinnych.

ORGANIZATION OF SPLICING SYSTEM IN GENERATIVE CELLS

S u m m a r y

The article brings forward basic issues related to splicing in plant and animal cells. The results taken up from experiments conducted on generative cells line of animals (oocytes) and plants (meiocytes, microspores and pollen grains) reveal many universal as-

pects of splicing system organization. Excepting close similarities of biochemical nature, a common feature of both plant and animal generative cells is occurrence of nuclear structures rich in elements of splicing system (e.g. UsnRNP) termed Cajal bodies.

LITERATURA

- ADAMSKA M., BILINSKI S. M., 1997. *Domeny jądrowe zawierające snRNP – struktura i aktualne poglądy na funkcje*. Post. Biol. Kom. 24, 93–102.
- BILIŃSKI S. M., KLOC M., 2002. *Accessory nuclei revisited: the translocation of snRNP from the germinal vesicle to the periphery of the future embryo*. Chromosoma 111, 62–68.
- BOGOLYUBOV D., ALEXANDROWA O., TSVETKOV A., PARFENOV V. 2000. *An immunoelectron study of karyosphere and nuclear bodies in oocytes of mealworm beetle, Tenebrio molitor (Coleoptera: Polyphaga)*. Chromosoma 109, 415–425.
- BOCHNIG P., REUTER R., BRINGMANN P., LÜHRMANN R., 1987. A monoclonal antibody against 2,2,7-trimethylguanosine that reacts with intact, class U, small nuclear ribonucleoproteins as well as with 7-methylguanosine-capped RNAs. Eur. J. Biochem. 168, 461–467.
- BOGOLYUBOV D., PARFENOV V., 2001. *Immunogold localization of RNA polymerase II and pre-mRNA splicing factors in Tenebrio molitor oocyte nuclei with special emphasis on karyosphere development*. Tissue Cell 33, 549–561.
- CHWIROT W. B., GÓRSKA-BRYLASS A., 1981. *Variations of total protein content and protein synthesis during microsporogenesis in Larix europaea DC*. Acta Soc. Bot. Pol. 50, 33–38.
- CHWIROT W. B., GÓRSKA-BRYLASS A., 1987. *Activity of Mg^{2+} ATPase and cytochrome c-oxidase in microsporocytes and anther wall during microsporogenesis in Larix Europaea DC*. Biol. Plantarum 29, 167–174.
- FISHER U., LIU Q., DREYFUSS G., 1997. *The SMN-SIP1 complex has a essential role in spliceosomal snRNP biogenesis*. Cell 90, 1023–1029.
- GALL J. G., 2000. *Cajal bodies: the first 100 years*. Annu. Rev. Cell Dev. 16, 273–300.
- GALL J. G., BELLINI M., ZHENG'AN W., MURPHY C., 1999. *Assembly of the nuclear transcription and processing machinery: Cajal bodies (coiled bodies) and transcriptosomes*. Mol. Biol. Cell 10, 4385–4402.
- GÓRSKA-BRYLASS A., WRÓBEL B., 1978. *An electron microscope study of extranucleolar ribonucleoprotein bodies in the microspore of Larix europaea L*. Soc. bot. Fr., Actualites botaniques 1–2, 23–25.
- GÓRSKA-BRYLASS A., CHWIROT W. B., MICHALSKI L., 1981. *IAA-peroxidase relation in the microsporocytes and anther wall during microsporogenesis in Larix europaea DC*. Acta Soc. Bot. Pol. 50, 67–73.
- GÓRSKA-BRYLASS A., WRÓBEL B., NARBUT A., 1988. *Extranuclear extrusions of nucleolar material during diplotene in microsporocytes Larix decidua Mill.* [W:] CRESTI M., GORI E., PACINI E. (red.) *Sexual Reproduction in Higher Plants*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 141–151.
- GRAVELEY B. R., 2000. *Sorting out the complexity of SR protein functions*. RNA 6, 1197–1211.
- HERMANN H., FABRIZIO P., RAKER V. A., FOULAKI K., HORNIG H., BRAHMS H., LUHRMANN R., 1995. *SnRNP Sm proteins share two evolutionarily conserved sequence motifs with are involved in Sm protein-protein interactions*. EMBO J. 14, 2076–2088.
- JURICA M. S., MOORE M. J., 2003. *Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins*. Mol. Cell 12, 5–14.
- LAMOND A. I., SPECTOR D. L., 2003. *Nuclear species: a model for nuclear organelles*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4, 605–612.
- LIU Q., FISCHER U., WANG F., DREYFUSS G., 1997. *The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in atrophy disease with spliceosomal snRNP proteins*. Cell. 90, 1013–1021.
- NIEDOJADŁO J., GÓRSKA-BRYLASS A., 2003. *New type of snRNP containing nuclear bodies in plant cells*. Biol. Cell 5, 303–310.
- NOBLE A., 2001. *Natura i funkcja cytoplazmatycznych "nukleoloidów" w mikrosporocytach modrzewia. (Larix decidua Mill.)* Rozprawa doktorska, Uniwersytet M. Kopernika, Toruń.
- OLMEDILLA A., DE DIOS ALCHE J., RODRIGUEZ-GARCIA M. I., 1997. *Nucleolar evolution and coiled bodies dur-*

- ing meiotic prophase in Olea europea: differential localization of nucleic acids.* Europ. J. Cell Biol. 74, 181–189.
- PARFENOV V. N., DAVIS D. S., POCHUKALINA G. N., SAMPLE C. E., MURTI K. G., 1996. *Nuclear bodies of stage 6 oocytes of Rana temporaria contain nucleolar and coiled body proteins.* Exp. Cell Res. 228, 229–236.
- RAKER V. A., PLESSEL G., LUHRMANN R., 1996. *The snRNP core assembly pathway: identification of stable core protein heteromeric complexes and an snRNP subcore particle in vitro.* EMBO J. 15, 2256–2269.
- RAKER V. A., HARTMUTH K., KASTNER B., LÜHRMANN R., 1999. *Spliceosomal U snRNP core assembly: Sm proteins assemble onto an Sm site RNA nonanucleotide in a specific and thermodynamically stable manner.* Mol. Cell. Biol. 19, 6554–6565.
- SMOLIŃSKI D. J., 1997. *Ciała jądrowe w profazowych mikrosporocytach modrzewia Larix decidua Mill.* Praca Doktorska, Uniwersytet M. Kopernika, Toruń.
- SMOLIŃSKI D. J., GÓRSKA-BRYLASS A., 1996a. *Ribosomal RNP bodies and snRNP bodies during meiotic prophase in larch.* Electron Microscopy 1996, 345–346.
- SMOLIŃSKI D. J., GÓRSKA-BRYLASS A., 1996b. *Plant “coiled bodies” after in situ hybridization and immunocytochemical investigations.* Folia Histochem. Cytobiol. 34 (Suppl. 2), 90.
- STRAATMAN K. R., SCHEL J. H. N., 2000. *Distribution of splicing proteins and putative coiled bodies during pollen development and androgenesis in Brassica napus L.* Protoplasma 216, 191–200.
- TESTILLANO P. S., GONZALES-MELENDI P., AHMADIAN P., FADON B., RISUENO M. C., 1995. *The immunolocalization of nuclear antigens during the pollen developmental program and induction of pollen embryogenesis.* Exp. Cell Res. 221, 41–51.
- WRÓBEL B., GÓRSKA-BRYLASS A., 1988. *Changes in intracellular localization of peroxidase during microsporogenesis in Gymnosperms.* Biologia Plantarum 30, 333–337.
- ZAHLER A. M., NEUGEBAUER K. M., LANE W. S., ROTH M. B., 1993. *Distinct functions of SR proteins in alternative pre-mRNA splicing.* Science 260, 219–22.