

KAROL STAWSKI, ANNA GOC

*Zakład Genetyki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Lwowska 1, 87-100 Toruń
E-mail: stawski@umk.pl
goc@umk.pl*

ROŚLINNE CZYNNIKI SZOKU CIEPLNEGO

WPROWADZENIE

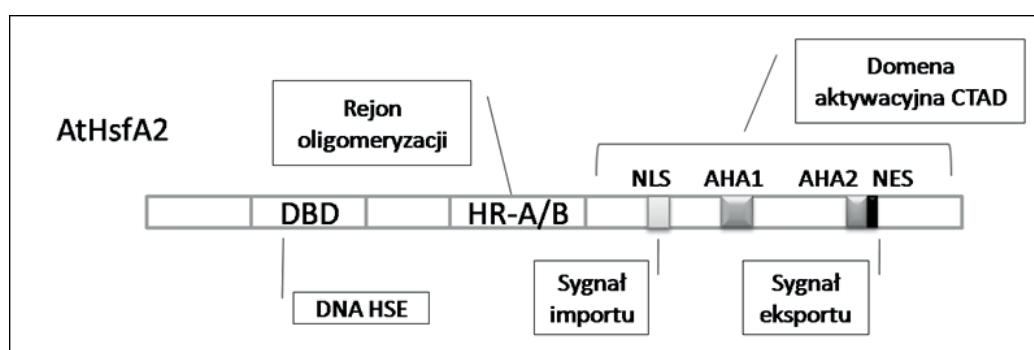
Odpowiedź na szok cieplny (ang. heat shock response, HSR) jest wysoce konserwowanym mechanizmem w całym świecie ożywionym, która umożliwia przeżycie organizmom w niekorzystnych warunkach środowiska. Indukcja genów w szoku jest zależna od obecności w ich promotorach regulatorowej sekwencji DNA określanej jako element Hse (ang. heat shock element), który jest ciągiem co najmniej trzech powtórzeń sekwencji 5'nGAAn3', występujących w przeciwnych orientacjach (PELHAM 1982, JEDLIĆKA i współaut. 1997). Pierwszych dowodów na to, że są to miejsca przyłączania czynników transkrypcyjnych szoku cieplnego Hsf (ang. heat shock factor) dostarczyły badania prowadzone na izolatach jąder komórkowych *Drosophila melanogaster* (PARKER i TOPOL 1984). U *Drosophila*, *Saccharomyces* i *Caenorhab-*

ditits elegans za utrzymanie homeostazy komórkowej odpowiadają pojedyncze Hsf (FUJIMOTO i NAKAI 2010). U muszki owocowej Hsf jest również niezbędny do prawidłowego rozwoju embrionalnego (JEDLIĆKA i współaut. 1997). Dla ssaków opisano cztery czynniki Hsf, z których tylko Hsf1 odgrywa kluczową rolę w kształtowaniu HSR (FUJIMOTO i NAKAI 2010), ale najbardziej liczna grupa Hsf występuje w świecie roślin. Do najlepiej scharakteryzowanych należą czynniki Hsf rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*), pomidora (*Lycopersicon esculentum*) oraz ryżu (*Oryza sativa*), reprezentowane odpowiednio przez 21, 25 i 18 białek (MORIMOTO 1998, NOVER i współaut. 2001, BANIWAŁ i współaut. 2004). Budowa poszczególnych białek Hsf decyduje o ich funkcji.

BUDOWA HSF

Wszystkie Hsf posiadają zachowawczą strukturę modułową (Ryc. 1). Blisko końca aminowego znajduje się domena DBD (ang. DNA binding domain) z motywem helisa-skłęt-helisa, który zapewnia precyzyjne pozycjonowanie DBD względem rozpoznawanej palindromowej sekwencji Hse (SCHULTHEISS i współaut. 1996, CICERO i współaut. 2001). Do niej przylega region oligomeryzacji odpowiadający za oddziaływania z innymi cząsteczkami Hsf. Składa się on dwóch części

HR-A i HR-B, w których występują motywy składające się z siedmiu reszt aminokwasowych, z pierwszą i czwartą resztą o charakterze hydrofobowym. Mogą one tworzyć połączenia zarówno wewnątrz-, jak i międzycząsteczkowe. Konwersja nieaktywnych monomerów Hsf do funkcjonalnych czynników transkrypcyjnych wymaga ich trimeryzacji (PETERANDERL i współaut. 1999). W centralnej części białka Hsf znajduje się sekwencja sygnałowa NLS (ang. nuclear localization si-



Ryc. 1. Budowa HsfA2 *Arabidopsis thaliana* (wg KOSKULL-DÖRING i współaut. 2007).

gnał) kierująca Hsf do jądra komórkowego, zaś koniec karboksylowy cząsteczki zajmuje domena aktywacyjna CTAD (ang. C-terminal activation domain) (NOVER i współaut. 2001, KOSKULL-DÖRING i współaut. 2007).

Roślinne Hsf są najbardziej zróżnicowane pod względem budowy rejonu HR-A/B, co stało się podstawą ich podziału na 3 klasy: A, B i C. W klasie A i C obszary HR-A i HR-B są na skutek insercji bardziej od siebie oddalone (odpowiednio 27 i 13 reszt aminokwasowych) niż w klasie B (6 reszt aminokwasowych), która zawiera Hsf podobne do zwierzęcych (NOVER i współaut. 2001).

U modelowej rośliny jaką jest rzodkiewnik, klasyfikacja Hsf obejmuje 14 różnych grup (A1-9, B1-4, C1). Liczba poszczególnych członków w grupie zmienia się pomiędzy gatunkami. U ryżu w grupie A1 zidentyfikowano tylko pojedynczy gen, podczas gdy dla rzodkiewnika są to odpowiednio: *A1a*, *A1b*, *A1d*, *A1e*, a dla pomidora *A1a*, *A1b*, *A1c*. Z kolei grupa A2 jest reprezentowana przez je-

den gen w genomie *Arabidopsis thaliana* i pięć genów w *Oryza sativa* (*A2a-e*) (NOVER i współaut. 2001; KOSKULL-DÖRING i współaut. 2007). Klasa A posiada kwaśną domenę CTAD z charakterystycznym, krótkim motywem motywem AHA, uczestniczącym w aktywacji transkrypcji (DÖRING i współaut. 2000; KOTAK i współaut. 2004). Z kolei funkcja klas B i C jest trudna do przewidywania.

Jądrowa dystrybucja roślinnych Hsf nie jest stała i może ulec zmianie dzięki sekwencji NES (ang. nuclear export signal) kierującej eksportem z jądra komórkowego do cytoplazmy, a zlokalizowanej na końcu karboksylowym ponad połowy roślinnych Hsf (NOVER i współaut. 2001). Lokalizacja Hsf wynika z równowagi pomiędzy jądrowym importem i eksportem. Przykładowo, mutacja wewnątrz sekwencji sygnałowej NES *HsfA2 L. esculentum* zakłóca dystrybucję białka tak, że przyjmuje ono wyłącznie lokalizację jądrową (HEERKLOTZ i współaut. 2001).

FUNKCJONALNE INTERAKCJE POMIĘDZY HSF

Wielopoziomowy proces aktywacji Hsf wymaga, jak już wspomniano, trimeryzacji monomerycznych białek. Duża różnorodność roślinnych Hsf, jak i wysokie podobieństwo pomiędzy rejonami oligomeryzacji, sprzyja powstawaniu heterooligomerów (MILLER i MITTLER 2006, CHAN-SCHAMINET i współaut. 2009).

U pomidora zidentyfikowano konstytutywnie ekspresowany *HsfA1*, który jest uważany za główny czynnik szoku cieplnego (MISHRA i współaut. 2002), u rzodkiewnika nie udało się wyznaczyć takiego pojedynczego czynnika. Nokaut nawet dwóch izogenów *HsfA1* (*HsfA1a* i *A1b*) ma tylko niewielki wpływ na termotolerancję rzodkiewnika

(LOHMANN i współaut. 2004). U pomidora *HsfA1* kontroluje transkrypcję *HsfA2* i *HsfB1* (MISHRA i współaut. 2002), których białka wspólnie z *HsfA1* biorą udział w utrzymaniu termotolerancji rośliny (SCHARF i współaut. 1998). Aktywacja genów pomidora, kodujących białka biorące udział w stresie cieplnym, zachodzi przy udziale superaktywatora, który jest formowany na skutek heterooligomeryzacji *HsfA1* i *HsfA2*. Zdolności aktywatorowe homooligomerów *HsfA1* bądź *HsfA2* są kilka razy mniejsze niż heterooligomerów. Różnice te są następstwem komplementacji dwóch różnych domen CTAD i motywów AHA o odmiennych zdolnościach do interakcji z czynnikami maszyneryi transkrypcyjnej.

W pierwszej kolejności w obrębie domeny oligomeryzacji HsfA dochodzi do szybkiej homotrimeryzacji pomiędzy regionami HR-A, a następnie do heterooligomeryzacji pomiędzy homotrimerami HsfA1 i HsfA2, co pociąga za sobą formowania heksamerycznych kompleksów. Proces ich powstawania jest uprzywilejowany w stosunku do homooligomerycznych heksamerów. O specyfice oddziaływań HsfA1/A2 decyduje rejon HR-B, a o stabilności pozostałe elementy rejonu oligomeryzacji. Dynamiczna równowaga, która się ustala pomiędzy kompleksami homo- lub heterooligomerów HsfA1/A2 jest kluczowa dla właściwej ekspresji genów indukowanych w szoku cieplnym (CHAN-SCHAMINET i współaut. 2009).

Tendencję do heterooligomeryzacji mają również członkowie Hsf klasy A rzodkiewnika. Heterooligomery powstają między innymi z HsfA1a i HsfA1b i funkcjonują one jako aktywatory transkrypcji (LI i współaut. 2010). Łączenie się HsfA5 i HsfA4 zmienia znacząco ich właściwości. Stosując zarówno technikę immunostrącania, jak i dwuhybrydowy system drożdżowy potwierdzono preferencyjne powstawanie kompleksów HsfA4/A5 w stosunku do homooligomerów A4 lub A5. Homotrimery HsfA4 funkcjonują jako

aktywatory transkrypcyjne, ale w wyniku oddziaływania z HsfA5 tracą swą aktywność. Sądzone, że fizyczna interakcja obu czynników transkrypcyjnych jest wynikiem wysokiego podobieństwa domen HR-A/B, jednakże porównując ich sekwencję do analogicznych obszarów HsfA1 lub HsfA2 nie stwierdzono istnienia znaczących różnic w ich budowie. Istota tych oddziaływań pozostaje ciągle nieznana, niemniej jednak HsfA1 po podstawieniu domeny HR-A/B na pochodzącą z HsfA4b łączy się z HsfA5 (BANIWAŁ i współaut. 2007).

Regulacja aktywności HsfA4 na drodze interakcji z oligomerami HsfA5 została potwierdzona zarówno dla pomidora, jak i rzodkiewnika. Ustalenie dynamicznej równowagi pomiędzy ich aktywnymi homooligomerami a nieaktywnymi heterooligomerami jest częścią złożonego mechanizmu regulacji genów w odpowiedzi na stres u roślin. Potwierdza to również fakt, że geny *Arabidopsis HsfA4a*, *HsfA4c* i *HsfA5* ulegają specyficznej tkankowo i rozwojowo ekspresji. Poziom ich mRNA zmienia się także w warunkach stresu, ale zazwyczaj w taki sposób, że równowaga pomiędzy nimi jest przesunięta na korzyść aktywatorowego homotrimeru *HsfA4* (BANIWAŁ i współaut. 2007).

SPOSOBY REGULACJI TRANSKRYPCJI GENÓW HSF

Analiza *in silico* potencjalnych sekwencji promotorowych położonych 1000 pz powyżej miejsca startu transkrypcji wykazała, że u *Oryza sativa* regulacja 12 spośród 26 genów *Hsf* mogłaby odbywać się na zasadzie pętli sprzężenia zwrotnego przez ich własne sekwencje regulatorowe Hse (MITTAL i współaut. 2009). Taką formę regulacji zaproponowano dla genów rzodkiewnika już wcześniej (NOVER i współaut. 2001). Jednak należy pamiętać, że jest to tylko jeden z wielu możliwych sposobów ich kontroli, gdyż brak Hse (np. w promotorze *OsHsfA2c*) nie wyklucza indukcji genu w warunkach szoku cieplnego, podobnie brak elementu LTR (ang. low temperature response) w promotorach *Hsf* klasy C ryżu ich aktywacji w warunkach chłodu (MITTAL i współaut. 2009).

Zjawisko tolerancji krzyżowej roślin na stres jest między innymi zasługą regulacji ekspresji genów *Hsf* przy udziale *loci* kodujących w genomie *A. thaliana* aktywatory transkrypcyjne takie jak: ABI3, ABI4, ABI5 (ang. abscisic acid-insensitive). Spośród nich ABI3 reguluje transkrypcję spe-

cyficznego rozwojowo genu *HsfA9* (KOTAK i współaut. 2007). Białko HsfA9 powstaje wyłącznie w późnych etapach rozwoju nasion i wpływa na indukcję kilku niskocząsteczkowych genów *Hsp* (ang. small heat shock proteins, *sHsp*) oraz *Hsp70* i *Hsp101*. Ma to ogromne znaczenie dla rozwoju nasion, gdyż brak *sHsp* uwrażliwia je na przesuszanie. Co ciekawe, homologiczne transkrypty *HsfA9* były wykrywane także w dojrzałych ziarnach kawy i nasionach pomidorów, ale nigdy w tkankach wegetatywnych i tylko ekotopowa ekspresja genu *ABI3* w obecności kwasu abscysynowego prowadzi do akumulacji *HsfA9*. Również mutanty *ABI3 A. thaliana* (*abi3-6* i *S138922*) nie wykazywały obecności transkryptów *HsfA9* ani jego białka. Specyficzna budowa promotora *HsfA9* i obecność w nim swoistych elementów RY/Sph, charakterystycznych dla genów eksprymowanych w nasionach, rodzi przypuszczenia, że mogą to być miejsca wiązania dla ABI3 lub innych specyficznych rozwojowo czynników transkrypcyjnych. Selektywna zdolność HsfA9

do indukcji wybranych *sHsp* (*Hsp17.4-CI*, *Hsp17.7-CII*) i *Hsp101*, podczas gdy inne *Hsp* (*Hsp17.6A-CI*, *Hsp 17.6-CII*) nie są ekspresjonowane w nasionach wskazuje, że ten rodzaj regulacji może zależeć od struktury chromatyny (KOTAK i współaut. 2007).

Inny czynnik transkrypcyjny, *Dreb2a* (ang. dehydration-responsive element binding protein), kontroluje ekspresję genu *HsfA3* rzodkiewnika. *Dreb2A* uczestniczy zarówno w stresie cieplnym, jak i w powstawaniu odpowiedzi na suszę (YOSHIDA i współaut. 2008). Oprócz *HsfA3* aktywuje on również wybrane *sHsp* (*Hsp18.1-CI*, *Hsp26.5-MII*) i *Hsp70* (SAKUMA i współaut. 2006). Nadekspresja *Dreb2a* zwiększa zakres termotolerancji uruchamiając całą kaskadę sygnałową genów powiązanych ze stresem abiotycznym. W warunkach szoku cieplnego szybka indukcja genu *Dreb2a* poprzedza późniejszą aktywację *HsfA3*, która narasta stopniowo do około 10 godzin działania podwyższonej temperatury. Nokaut genu *Dreb2a* prowadzi w trakcie szoku cieplnego do gwałtownego spadku *HsfA3* oraz zmniejszenia zakresu termotolerancji rzodkiewnika (YOSHIDA i współaut. 2008).

Istnieje jeszcze jeden poziom regulacji Hsf, który także wiąże się ze strukturą ich promotorów. Często geny regulowane poprzez Hsf posiadają co najmniej kilka sekwencji Hse rozdzielonych przez miejsca wiązania dla innych czynników transkrypcyjnych. BHARTI i współaut. (2004) zaobserwowali zależnie od budowy promotora efekt, który wykraczał poza możliwości działania samego czynnika HsfA1. Nowopoznanym, synergistycznym kooperatorem aktywności HsfA1 pomidora okazał się być HsfB1. Oba czynniki, po przyłączeniu się w osobnych miejscach w obrębie promotora, współdziałają w aktywacji transkrypcji. Ponieważ białko HsfB1 samo nie posiada motywu aktywacyjnego AHA, przypuszcza się, że rekrutuje ono inne czynniki transkrypcyjne (BHARTI i współaut. 2004). Funkcja HsfB1 pomidora wydaje się być uniwersalna, gdyż może wzmacniać transkrypcję również w obecności innych przedstawicieli klasy A zarówno pomidora, jak i rzodkiewnika, a nawet *Gal4* drożdży i wirusowego białka VP16. Jak się okazało, zdolność ta wiąże się z specyficzną budową domeny CTAD HsfB1, a dokładniej obecnością w niej sekwencji GRGKMMK,

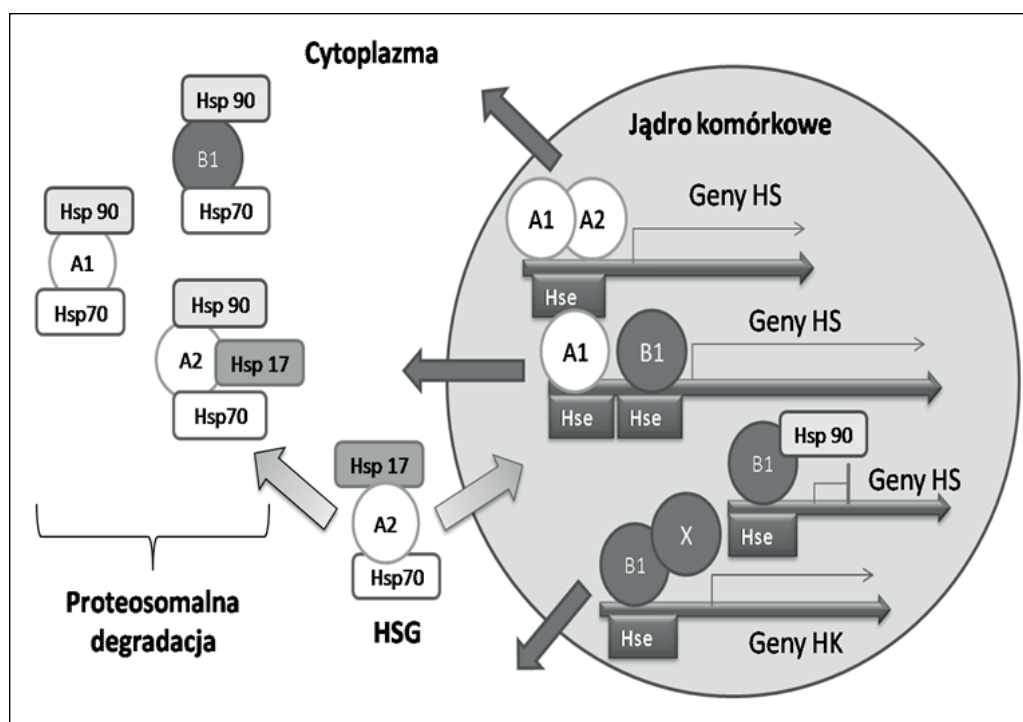
którą oprócz *Lycopersicum esculentum* posiadają również HsfB1 *Glycine max* i *Nicotiana tabacum*. Sekwencja ta pozwala na interakcję z białkiem CBP (ang. CREB binding protein) będącym ortologiem histonowej acetylotransferazy HAC1 (ang. histone acetyl transferase-like protein 1), która poprzez modyfikacje histonów wpływa na stopień kondensacji chromatyny. Zarówno ssaczce białka CBP/p300, jak i roślinne CBP (HAC1) wywierają silny stymulujący wpływ na transkrypcję genów. HAC1/CBP jest pierwszym opisanym czynnikiem wchodzącym w interakcje jednocześnie z dwoma typami Hsf. Prawdopodobnie białko to służy jako platforma do formowania kompleksu aktywacyjnego CBP/HsfA1/HsfB1 (BHARTI i współaut. 2004). HsfB1 rzodkiewnika ma na końcu karboksylowym sekwencję GRSRMTETK, w której zamiast centralnie zlokalizowanej reszty lizyny (K) występuje reszta metioninowa (M), przez co traci on powinowactwo do CBP (BHARTI i współaut. 2004) i jest represorem aktywności Hsf klasy A (CZARNECKA-VERNER i współaut. 2004). Domena HsfB1 rzodkiewnika odpowiedzialna za represję transkrypcji ma wysoce konserwowaną sekwencję (LFGV), która poprzedza sygnał lokalizacji jądrowej. Sekwencja ta została zidentyfikowana również w innych roślinnych czynnikach transkrypcyjnych (IKEDA i OHME-TAKAGI 2009).

Dla rzodkiewnika podwójna mutacja *hsfB1/B2b* nie ma wpływu na ekspresję genów szoku cieplnego takich jak *Hsp17.6*, *Hsp23.6*, *Hsp70*, *Hsp83.1* i *Hsp101* i prowadzi do silnej indukcji genu *Pdf1.2a/b* (KUMAR i współaut. 2009). Kodowane przez ten ostatni gen białko uczestniczy w wytworzeniu odporności roślin na stres biotyczny. Sposób w jaki dochodzi do aktywacji *Pdf1.2a/b* jest nieznany. Wiadomo jednak, że represja omawianego genu przez HsfB nie zachodzi poprzez wiązanie się z DNA w obrębie promotora *Pdf1.2a/b*. Dowodzi to, że klasa B Hsf rzodkiewnika musi działać pośrednio poprzez oddziaływanie z innymi białkami. Zatem może dochodzić do interakcji pomiędzy szlakami czynników Hsf w takich reakcjach jak stres cieplny i atak patogenów, czego dowodem jest na przykład, że w wysokiej temperaturze środowiska patogenny grzyb *Alternaria brassicicola* nie infekuje rzodkiewnika (KUMAR i współaut. 2009).

INTERAKCJA BIAŁEK TYPU HSF Z BIAŁKAMI SZOKU CIEPLNEGO

Interakcje jakie zachodzą pomiędzy Hsp i Hsf mogą być konserwowane dla większości systemów biologicznych. Pierwsze doniesienia o istnieniu tego typu oddziaływań opierały się głównie na badaniach Hsf1 kręgowców. Białka chaperonowe (czapeczkujące) Hsp70/90 wiążą zwierzęce Hsf tworząc z nimi kompleksy, uniemożliwiając indukcję genów im podległych (MORIMOTO 1998). Silne zróżnicowanie roślinnych Hsf ma swoje odzwierciedlenie w ich zdolności do wiązania się z określonymi białkami czaperonowymi (Hsp90, Hsp70, sHsp). Formowanie pomiędzy nimi zależnych układów biologicznych jest podstawą budowania odpowiedzi komórkowej w szoku cieplnym, jak również w późniejszym wyciszeniu uczestniczących genów. W takich układach zależności występują opisane białka pomidora: HsfA1 regu-

lowane przez Hsp70, HsfA2 przez Hsp17.4-CII i HsfB1 przez Hsp90 (HAHN i współaut. 2011). W trakcie procesu wyciszania HSR u *L. esculentum* zanika zdolność do tworzenia heterooligomerycznych kompleksów HsfA1/HsfA2. HsfA1 jest wycofywany z jądra komórkowego do cytoplazmy (SCHARF i współaut. 1998), zaś HsfA2 pozostaje na jego terenie związany przez niskocząsteczkowe sHsp klasy CI i CII. Białka tych dwóch klas wykazują przeciwstawne funkcje, podczas gdy Hsp17.4-CII działa jako specyficzny korepresor HsfA2, zatrzymując go w warunkach stresu cieplnego w białkowych agregatach cytoplazmatycznych, czynnik Hsp17-CI uczestniczy w ich rozbijaniu (PORT i współaut. 2004). Nieaktywne cząsteczki HsfA2 po uwolnieniu z kompleksów, w warunkach stresu cieplnego, mogą ponownie być rekrutowane przez



Ryc. 2 Interakcje HSP i HSF u *Lycopodium esculentum* (wg HAHN i współaut. 2011, zmodyfikowana).

W trakcie procesu wyciszania HSR dochodzi do związania HsfA1, A2, B1 (A1, A2, B1) przez Hsp70 i Hsp90, co prowadzi do ich degradacji w proteosomie. HsfB1 (B1) w kompleksie z Hsp90 może funkcjonować jako represor genów szoku cieplnego (Geny HS) lub po związaniu Hsp70 również podlegać degradacji. Równolegle HsfB1 jest wymagany do podtrzymania transkrypcji genów metabolizmu podstawowego (Geny HK) poprzez oddziaływanie z czynnikami transkrypcyjnymi (X). Po ustaniu warunków szoku cieplnego HsfA2 tworzą głównie cytoplazmatyczne granule HSG, które po powtórnym zadziałaniu stresu rozpadają się uwalniając HsfA2, który wraz z HsfA1 formuje kompleksy aktywatorowe (A1/A2). Indukcja poprzez HsfA1 i HsfB1 prowadzi do włączenia innych genów szoku cieplnego mających dla nich dwa niezależne miejsca wiązania Hse.

HsfA1 (SCHARF i współaut. 1998). Zarówno HsfA2, jak i HsfA1 oddziałują ponadto z Hsp70 i Hsp90. Do tego typu interakcji białko Hsp90 wykorzystuje swój koniec karboksylowy, lecz nie jest to motyw MEEVD, odpowiedzialny za interakcje z ko-chaperonami posiadającymi domenę konserwowanych 34-aminokwasowych powtórzeń TPR (ang. tetratricopeptide repeat) (TRAVERS i FARES 2007). Wykorzystując dwuhybrydowy system drożdżowy wykryto również rejony biorące udział w interakcji z Hsp70. Dla HsfA2 jest to koniec karboksylowy, a dla HsfA1 koniec aminowy białka (HAHN i współaut. 2011).

Interakcja HsfA1 z Hsp70 uniemożliwia jego wiązanie się z elementem Hse blokując przez to jego zdolności aktywatorowe. Hsp70 może uczestniczyć w modulowaniu aktywności HsfA1 zarówno w normalnych warunkach fizjologicznych, jak również w trakcie atenuacji HSR. Kluczowa wydaje się tylko dostępność płaszczyzny oddziaływań Hsf-Hsp. Jeśli HsfA1 tworzy heterooligomeryczne kompleksy superaktywatorowe HsfA1/A2, to czynnik wydaje się być niedostępny dla Hsp70 (CHAN-SCHAMINET i współaut. 2009).

HAHN i współaut. (2011) przedstawili model oddziaływania pomiędzy poziomem białek czaperonowych Hsp70/Hsp90 a Hsf, podczas HSR (Ryc. 2). Szczególną funkcję w modulowaniu tej odpowiedzi zajmuje HsfB1. Jego asocjacja z Hsp90 nie tylko ułatwia czynnikowi odnalezienie sekwencji Hse w

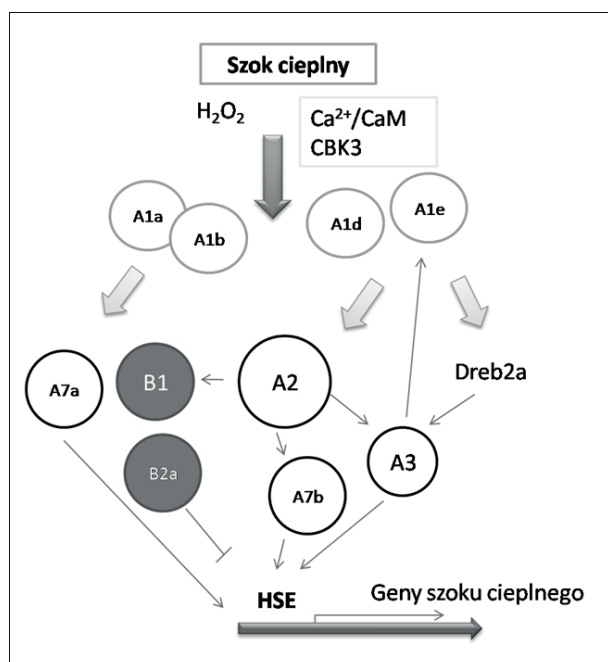
genach metabolizmu podstawowego pomidora, lecz również hamuje ekspresję genów *Hsp* aktywowanych wcześniej przez HsfA1 i HsfB1. Jak już wcześniej opisano, HsfB może oddziaływać również z czynnikami transkrypcyjnymi, po przyłączeniu HAC1 indukować geny *Hsp* (BHARTI i współaut. 2004) lub współdziałając z innymi białkami hamować ich ekspresję (KUMAR i współaut. 2009). Niezależnie od funkcji HsfB1 jego stabilność jest zależna nie tylko od interakcji z Hsp90, lecz również z Hsp70. Po uzupełnieniu kompleksu HsfB1/Hsp90 o Hsp 70, HsfB1 jest kierowany na drogę proteosomalnej degradacji. W wyniku podobnych interakcji w trakcie wyciszania HSR usuwany jest HsfA1. Ponadto w C-końcu HsfB1 odkryto rejon, który nie uczestniczy w wyżej wymienionych oddziaływaniach, lecz decyduje o szybkości degradacji HsfB1. Element ten zawiera dwie reszty lizynowe i kilka serynowych, co rodzi przypuszczenia, że może ulegać potranslacyjnym modyfikacjom lub rekrutuje nieznane dotąd czynniki (HAHN i współaut. 2011). Farmakologiczna inhibicja Hsp90 prowadzi do wydłużonej akumulacji i stabilizacji oprócz HsfB1 również HsfA2. Fizyczna asocjacja Hsf z chaperonami Hsp70 i Hsp90 wskazuje na współlistnienie różnych kompleksów lub bliską współpracę Hsp70 i Hsp90, tak jak ma to miejsce u kręgowców w przypadku modulowania aktywności receptorów glikokortykoidowych (PRATT i współaut. 2008).

UDZIAŁ ROŚLINNYCH HSF W STRESIE I ICH SPECYFIKA ROZWOJOWA

Dla rzodkiewnika HsfA2 należy do kluczowych białek indukowanych przez różne rodzaje stresu. Spośród czynników klasy A wykazuje on najwyższą ekspresję w stresie oksydacyjnym wywołanym zarówno przez silne światło, szok cieplny lub poprzez traktowanie roślin H_2O_2 lub O_3 (MILLER i MITTLER 2006, NISHIZAWA i współaut. 2006). Oprócz tego równie silnie jest indukowany w warunkach stresu solnego i osmotycznego, jak i anoksji (OGAWA i współaut. 2007, BANTI i współaut. 2010). Pod kontrolą HsfA2 pozostaje duża grupa ok. 720 genów rzodkiewnika, które są związane z kształtowaniem się odporności na stres, a wśród nich są geny niemal wszystkich *sHsp* i poszczególnych izoform *Hsp70* i *Hsp100*, jak również gen peroksydazy askorbinianowej *APX2* i syntazy galaktinolu *GalS* (SCHRAMM i współaut. 2006, NISHIZAWA-YOKOI i współaut. 2009).

Nadekspresja *HsfA2* u *A. thaliana* uodparnia roślinę na warunki stresu, zaś nokaut tego genu redukuje poziom tolerancji na ciepło, jak również reaktywne formy tlenu (RFT) (NISHIZAWA i współaut. 2006, OGAWA i współaut. 2007). Indukcja jego genu przebiega przy udziale HsfA1d i HsfA1e, lecz bez HsfA1a i HsfA1b (NISHIZAWA-YOKOI i współaut. 2011).

RFT są wspólnym czynnikiem dla heterogenicznych rodzajów stresu, takich jak: światło UV, zranienia, atak patogena czy hipoksja korzenia. Różne czynniki wywołujące stres mają swój charakterystyczny profil produkcji poszczególnych form RFT: O_2^- , 1O_2 i H_2O_2 . Generalnie większość genów powiązanych z odpowiedzią roślin na RFT zostaje aktywowana w odpowiedzi na podwyższony poziom tlenu singletowego (1O_2), a nadtlenuk wodoru (H_2O_2) i anionorodnik ponadtlenukowy



Ryc. 3. Drogi oddziaływania czynników Hsf u *Arabidopsis thaliana* (wg LIU i współaut. 2011, NISHIZAWA-YOKO i współaut. 2011, zmodyfikowana).

($O_2^{\cdot-}$) indukują tylko nieliczne z nich (GADJEV i współaut. 2006). Wybrane Hsf mogą pełnić funkcje sensorów RFT w komórce. Spośród wszystkich Hsf ryżu najlepiej predysponuje do tej funkcji OsHsfA2a. Koduje go gen wczesnej odpowiedzi na RFT, a inne Hsf (OsHsfA2f i OsHsfA7) mogą być także włączane później (MITTAL i współaut. 2009). U rzodkiewnika za sensory RFT są uważane AtHsfA4a i AtHsfA8 (DAVLETOVA i współaut. 2005). Ich ekspresja w warunkach stresu oksydacyjnego rośnie gwałtownie, podczas gdy innych Hsf zmienia się tylko nieznacznie. Podobną funkcję przypisuje się również *HsfA1b*. Jego nadekspresja podnosi poziom antyoksydacyjnego enzymu peroksydazy askorbinianowej 1 (Apx1), a w stresie cieplnym i świetlnym również Apx2 (PANCHUK i współaut. 2002). Warto również zauważyć, że niektóre z omawianych czynników transkrypcyjnych, tak jak wcześniej wspomniane OsHsfA2a i OsHsfA2f biorą udział w odpowiedzi na dwa rodzaje stresu (cieplny i oksydacyjny). Z kolei OsHsfA5, OsHsfC2a mają jeszcze szerszy zakres odpowiedzi, co potwierdza udział Hsf w kształtowaniu się tolerancji krzyżowej roślin (MITTAL i współaut. 2009).

LIU i współaut. (2011) zaproponowali model powstawania odpowiedzi HSR u rzodkiewnika. Kluczowe miejsce zajął w

nim HsfA2, które moduluje siłę odpowiedzi na stres. RFT i jony wapnia są głównymi cząsteczkami sygnałowymi w stresie. U rzodkiewnika prowadzą do indukcji genów z grupy *HsfA1* poprzez kaskadę sygnałów zależnych od Ca^{2+} , która może przebiegać od kalmoduliny (CaM) do białek wiążących CaM (CBK3) (LIU i współaut. 2011) (Ryc. 3). Aktywacja genów *HsfA1* rzodkiewnika prowadzi do wzrostu transkrypcji ponad 200 różnych genów. Pośród nich można wyróżnić *HsfA2*, *HsfA7a/7b* i *Dreb2a*. Wymienione czynniki transkrypcyjne działają jako wtórne aktywatory kolejnych genów zaangażowanych w szoku cieplnym, co zostało potwierdzone w przypadku *HsfA3*, który pozostaje pod kontrolą *Dreb2a* (SCHRAMM i współaut. 2006, YOSHIDA i współaut. 2008, NISHIZAWA-YOKOI i współaut. 2011). HsfA2 i HsfA3 mogą specyficznie regulować geny, które nie są pod bezpośrednią kontrolą HsfA1 (LIU i współaut. 2011). Ponadto pomiędzy HsfA1e, A2 i A3 istnieje dodatnie sprzężenie zwrotne. HsfA3 może indukować transkrypcję HsfA1e (YOSHIDA i współaut. 2008), który wpływa na ekspresję HsfA2, a ten na HsfA3 (OGAWA i współaut. 2007).

Niektóre spośród Hsf rzodkiewnika i ryżu wykazują wysoki stopień stresowej specjalizacji. U ryżu w szoku cieplnym nie uczestniczą geny: *OsHsfA5*, *OsHsfB4c*, *LOC_Os06g22610*, a poziom *OsHsfC1a* obniża się (MITTAL i współaut. 2009). Podobnie niewielki poziom ekspresji w warunkach szoku cieplnego, jak i w stresie solnym, osmotycznym, oksydacyjnym i UVB, wykazują niektóre Hsf rzodkiewnika (6 z klasy A i 1 z B) (SWINDELL i współaut. 2007). W reakcji na chłód u *O. sativa* dochodzi do spadku transkrypcji wszystkich członków klasy B za wyjątkiem *OsHsfB4a* i *OsHsfB4b*. Ostatni podlega indukcji po około 5 godzinach w warunkach 5°C, dużo później niż trzej członkowie klasy A: *OsHsfA3*, *OsHsfA4d*, *OsHsfA9* i pojedynczy przedstawiciel C - *OsHsfC1b* (MITTAL i współaut. 2009).

Wszystkie Hsf, oprócz wybiórczej wrażliwości w stresie, wykazują własną specyfikę tkankową. Do indukcji transkrypcji *HsfA9* rzodkiewnika dochodzi w nasionach w późnym stadium ich rozwoju (KOTAK i współaut. 2007). Jego ortolog u ryżu nie wykazuje już takiej zależności (MITTAL i współaut. 2009). Wysoki poziom *OsHsfB1* obserwowano w nasionach i korzeniach ryżu, *OsHsfA4d* w liściach, *OsHsfA2e* w kwiatostanie, *OsHsfA1a* w kwiatach, a *OsHsfB4b* w słupkach (MITTAL i współaut. 2009). Podobnie w przypadku rzod-

kiewnika transkrypty *HsfA5* wraz z *HsfA4c* są wykrywane w pyłku, natomiast w korzeniach

występują transkrypty *HsfB1* i *HsfC1* (SWINDELL i współaut. 2007).

PODSUMOWANIE

Roślinne Hsf jako czynniki transkrypcyjne stanowią przedmiot zainteresowań badaczy zajmujących się odpowiedzią roślin na szeroko rozumiany stres nie tylko abiotyczny. Udział wybranych Hsf w powstaniu odpowiedzi na kilka stresów jednocześnie stawia je na kluczowym miejscu w szlakach transdukcji sygnałów. Wysokie podobieństwo pomiędzy poszczególnymi członkami Hsf w obrębie klasy lub grupy nie ma jednak odzwierciedlenia w przewidywaniu funkcji poszczególnych jej członków. O ich aktywności nie decyduje wyłącznie budowa domenowa, lecz zdolność do oligomeryzacji lub/i heterooligomeryzacji. Dobrym przykładem jest HsfA1 pomidora lub HsfA4 rzodkiewnika (BANIWAŁ i współaut. 2007, Li i współaut. 2010). Mogą

również wchodzić w interakcje z białkami czaperonowymi sHsp, Hsp70 i Hsp90, które decydują głównie o ich stabilności (HAHN i współaut. 2011). Ponadto aktywność Hsf może być zależna do oddziaływania z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, w sposób bezpośredni lub pośredni budując kombinację Hsf i/lub czynników transkrypcyjnych przyłączonych w obrębie tego samego promotora. O ile dobrze poznana jest rola Hsf klasy A w kształtowaniu HSR, to dużo mniej wiadomo na temat funkcji pozostałych Hsf członków klasy B i C. Ogromna różnorodność Hsf pozwala przypuszczać, że są one również konieczne w procesach różnicowania się komórek roślinnych.

ROŚLINNE CZYNNIKI SZOKU CIEPLNEGO

Streszczenie

Transkrypcyjne czynniki szoku cieplnego (Hsf) są niezbędne dla wszystkich organizmów eukaryotycznych do przetrwania w warunkach silnego stresu. Są odpowiedzialne za transkrypcyjną regulację genów kodujących białka chaperonowe oraz inne białka powiązane ze stresem. W porównaniu do czterech Hsf kręgowców, roślinne Hsf są bardzo liczne i mogą mieć nawet 25 członków. Wykazują one wysoki stopień specjalizacji w stosunku do rodzaju stresu jak również różnych programów rozwojowych. Pomimo pewnych wysoce zachowywanych cech, różnice w strukturze roślinnych Hsf pozwoliły na wyróżnieniu trzech podstawowych klas (klasa A, B

i C). W przeciwieństwie do aktywatorowej klasy A, klasy C i B o porównywalnej liczbie członków nie posiadają oczywistej funkcji. U roślin transkrypcyjna regulacja genów zależnych od Hsf jest kontrolowana przez pośrednią lub bezpośrednią kooperację pomiędzy różnymi czynnikami Hsf, jak również w wyniku interakcji z białkami chaperonowymi. Wciąż jednak sieć wzajemnych zależności pomiędzy poszczególnymi Hsf jest mało zrozumiała. Z całą pewnością Hsf funkcjonują jako część składowa szlaków transdukcji sygnałów aktywowanych w stresie środowiskowym jak i w trakcie rozwoju.

PLANT HEAT STRESS FACTORS

Summary

Heat shock factors (Hsf) are essential for all eukaryotic organisms to survive under exposures to acute stress. They are transcriptional regulators of genes encoding molecular chaperones and other stress proteins. Compared with other eukaryotes, e.g. vertebrates with 4 members of the Hsf family, the plant Hsf family shows a large multiplicity, with more than 20 members. The plant Hsf family shows a strong diversification of expression pattern not only in response to stress, but also during various developmental programs. Despite many conserved features plant Hsf are allocated based on structural

characteristics into three major classes (class A, B and C). In contrast to class A, a considerable number of Hsf assigned to classes B and C have no evident function as transcription activators. Transcriptional regulation of Hsf dependent genes in plants is controlled by direct and indirect cooperation between distinct Hsf members and by interaction with chaperones. However our understanding of the function of plant Hsf network is far from complete. Certainly, they can functions as part of different signal transduction pathways operating in response to environmental stress and during development.

LITERATURA

- BANIWAL S. K., BHARTI K., CHAN K. Y., FAUTH M., GANGULI A., KOTAK S., MISHRA S. K., NOVER L., PORT M., SCHARF K. D., TRIPP J., WEBER C., ZIELINSKI D., VON KOSKULL-DÖRING P., 2004. *Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors*. J. Biosci. 4, 471–487.
- BANIWAL S. K., CHAN K. Y., SCHARF K.-D., NOVER L., 2007. *Role of heat stress transcription factor HsfA5 as specific repressor of HsfA4*. J. Biol. Chem. 282, 3605–3613.
- BANTI V., MAFESSONI F., LORETI E., ALPI A., PERATA P., 2010. *The heat-inducible transcription factor HsfA2 enhances anoxia tolerance in Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 152, 1471–1483.
- BHARTI K., VON KOSKULL-DÖRING P., BHARTI S., KUMAR P., TINTSCHL-KORBITZER A., TREUTER E., NOVER L., 2004. *Tomato heat stress transcription factor HsfB1 represents a novel type of general transcription coactivator with a histone-like motif interacting with the plant CREB binding protein ortholog HAC1*. Plant Cell 16, 1521–1535.
- CHAN-SCHAMINET K. Y., BANIWAL S. K., BUBLAK D., NOVER L., SCHARF K. D., 2009. *Specific interaction between tomato HsfA1 and HsfA2 creates hetero-oligomeric superactivator complexes for synergistic activation of heat stress gene expression*. J. Biol. Chem. 284, 20848–20857.
- CICERO M. P., HUBL S. T., HARRISON C. J., LITTLEFIELD O., HARDY J. A., NELSON H. C. M., 2001. *The wing in yeast heat shock transcription factor (HSF) DNA-binding domain is required for full activity*. Nucleic Acids Res. 29, 1715–1723.
- CZARNECKA-VERNER E., PAN S., SALEM T., GURLEY W. B., 2004. *Plant class B HSFs inhibit transcription and exhibit affinity for TFIIB and TBP*. Plant Mol. Biol. 56, 57–75.
- DAVLETOVA S., RIZHSKY L., LIANG H., SHENGQIANG Z., OLIVER D.J., COUTU J., SHULAEV V., SCHLAUCH K., MITTLER R., 2005. *Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis*. Plant Cell 17, 268–281.
- DÖRING P., TREUTER E., KISTNER C., LYCK R., CHEN A., NOVER L., 2000. *The role of AHA motifs in the activator function of tomato heat stress transcription factors HsfA1 and HsfA2*. Plant Cell 12, 265–278.
- FUJIMOTO M., NAKAI A., 2010. *The heat shock factor family and adaptation to proteotoxic stress*. FEBS J. 277, 4112–4125.
- GADJEV I., VANDERAUWERA S., GECHEV T. S., LALOI C., MINKOV I. N., SHULAEV V., APEL K., INZE D., MITTLER R., VAN BREUSEGEM F., 2006. *Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in Arabidopsis*. Plant Physiol. 141, 436–445.
- HAHN A., BUBLAK D., SCHLEIFF E., SCHARF K. D., 2011. *Crosstalk between Hsp90 and Hsp70 chaperones and heat stress transcription factors in tomato*. Plant Cell 23, 741–755.
- HEERKLOTZ D., DÖRING P., BONZELIUS F., WINKELHAUS S., NOVER L., 2001. *The balance of nuclear import and export determines the intracellular distribution of tomato heat stress transcription factor HsfA2*. Mol. Cell Biol. 21, 1759–1768.
- IKEDA M., OHME-TAKAGI M., 2009. *A novel group of transcriptional repressors in Arabidopsis*. Plant Cell Physiol. 50, 970–975.
- JEDLICKA P., MORTIN M. A., WU C., 1997. *Multiple functions of Drosophila heat shock transcription factor in vivo*. EMBO J. 16, 2452–2462.
- KOSKULL-DÖRING P., SCHARF K.-D., NOVER L., 2007. *The diversity of plant heat stress transcription factors*. Trends Plant Sci. 12, 452–457.
- KOTAK S., PORT M., GANGULI A., BICKER F., VON KOSKULL-DÖRING P., 2004. *Characterization of C-terminal domains of Arabidopsis heat stress transcription factors (Hsfs) and identification of a new signature combination of plant class A Hsfs with AHA and NES motifs essential for activator function and intracellular localization*. Plant J. 39, 98–112.
- KOTAK S., VIERLING E., BÄUMLEIN H., VON KOSKULL-DÖRING P., 2007. *A novel transcriptional cascade regulating expression of heat stress proteins during seed development of Arabidopsis*. Plant Cell 19, 182–195.
- KUMAR M., BUSCH W., BIRKE H., KEMMERLING B., NURNBERGER T., SCHÖFFL F., 2009. *Heat shock factors HsfB1 and HsfB2b are involved in the regulation of Pdf1.2 expression and pathogen resistance in Arabidopsis*. Mol. Plant 2, 152–165.
- LI M., DOLL J., WECKERMANN K., OECKING C., BERENDZEN K.-W., SCHÖFFL F., 2010. *Detection of in vivo interactions between Arabidopsis class A-HSFs, using a novel BiFC fragment, and identification of novel class B-HSF interacting proteins*. Eur. J. Cell Biol. 89, 126–132.
- LIU H. C., LIAO H. T., CHARNG Y. Y., 2011. *The role of class A1 heat shock factors (HsFA1s) in response to heat and other stresses in Arabidopsis*. Plant Cell Environ. 34, 738–751.
- LOHMANN C., EGGERS-SCHUMACHER G., WUNDERLICH M., SCHÖFFL F., 2004. *Two different heat shock transcription factors regulate immediate early expression of stress genes in Arabidopsis*. Mol. Genet. Genomics. 271, 11–21.
- MILLER G., MITTLER R., 2006. *Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants?* Ann. Bot. 98, 279–288.
- MISHRA S. K., TRIPP J., WINKELHAUS S., TSCHIRSCH B., THERES K., NOVER L., SCHARF K. D., 2002. *In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato*. Genes Dev. 16, 1555–1567.
- MITTAL D., CHAKRABARTI S., SARKAR A., SINGH A., GROVER A., 2009. *Heat shock factor gene family in rice: genomic organization and transcript expression profiling in response to high temperature, low temperature and oxidative stresses*. Plant Physiol. Biochem. 47, 785–795.
- MORIMOTO R. I., 1998. *Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators*. Genes Dev. 12, 3788–3796.
- NISHIZAWA A., YABUTA Y., YOSHIDA E., MARUTA T., YOSHIMURA K., SHIGEOKA S., 2006. *Arabidopsis heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress*. Plant J. 48, 535–547.
- NISHIZAWA-YOKOI A., YOSHIDA E., YABUTA Y., SHIGEOKA S., 2009. *Analysis of the regulation of target genes by an Arabidopsis heat shock transcription factor, HsfA2*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 73, 890–895.
- NISHIZAWA-YOKOI A., NOSAKA R., HAYASHI H., TAINAKA H., MARUTA T., TAMOI M., IKEDA M., OHME-TAKAGI M., YOSHIMURA K., YABUTA Y., SHIGEOKA S., 2011. *HsfA1d and HsfA1e involved in the transcriptional regulation of HsfA2 function as key regulators for the Hsf signaling network in response*

- to environmental stress. *Plant Cell Physiol.* 52, 933–945.
- NOVER L., BHARTI K., DÖRING P., MISHRA S. K., GANGULI A., SCHARF K. D., 2001 *Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need?* *Cell Stress Chaperon.* 6, 177–189.
- OGAWA D., YAMAGUCHI K., NISHIUCHI T., 2007. *High-level overexpression of the Arabidopsis HsfA2 gene confers not only increased thermotolerance but also salt/osmotic stress tolerance and enhanced callus growth.* *J. Exp. Bot.* 58, 3373–3383.
- PANCHUK I. I., VOLKOV R. A., SCHÖFFL F., 2002. *Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in Arabidopsis.* *Plant Physiol.* 129, 838–853.
- PARKER C. S., TOPOL J. A., 1984. *Drosophila RNA polymerase II transcription factor binds to the regulatory site of an hsp70 gene.* *Cell* 37, 273–283.
- PELHAM H. R., 1982. *A regulatory upstream promoter element in the Drosophila hsp70 heat-shock gene.* *Cell* 30, 517–528.
- PETERANDERL R., RABENSTEIN M., SHIN Y. K., LIU C. W., WEMMER D. E., KING D. S., NELSON H. C., 1999. *Biochemical and biophysical characterization of the trimerization domain from the heat shock transcription factor.* *Biochemistry* 38, 3559–3569.
- PORT M., TRIPP J., ZIELINSKI D., WEBER C., HEERKLOTZ D., WINKELHAUS S., BUBLAK D., SCHARF K. D., 2004. *Role of Hsp17.4-CII as coregulator and cytoplasmic retention factor of tomato heat stress transcription factor HsfA2.* *Plant Physiol.* 135, 1457–1470.
- PRATT W. B., MORISHIMA Y., OSAWA Y., 2008. *The Hsp90 chaperone machinery regulates signaling by modulating ligand binding clefts.* *J. Biol. Chem.* 283, 22885–22889.
- SAKUMA Y., MARUYAMA K., QIN F., OSAKABE Y., SHINOZAKI K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., 2006. *Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 18822–18827.
- SCHARF K. D., HEIDER H., HOHFELD I., LYCK R., SCHMIDT E., NOVER L., 1998. *The tomato Hsf system: HsfA2 needs interaction with HsfA1 for efficient nuclear import and may be localized in cytoplasmic heat stress granules.* *Mol. Cell. Biol.* 18, 2240–2251.
- SCHRAMM F., GANGULI A., KIEHLMANN E., ENGLISH G., WALCH D., VON KOSKULL-DÖRING P., 2006. *The heat stress transcription factor HsfA2 serves as a regulatory amplifier of a subset of genes in the heat stress response in Arabidopsis.* *Plant Mol. Biol.* 60, 759–772.
- SCHULTHEISS J., KUNERT O., GASE U., SCHARF K.-D., NOVER L., RÜTERJANS H., 1996. *Solution structure of the DNA-binding domain of the tomato heat stress transcription factor HSF24.* *Eur. J. Biochem.* 236, 911–921.
- SWINDELL W. R., HUEBNER M., WEBER A. P., 2007. *Transcriptional profiling of Arabidopsis heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways.* *BMC Genomics* 8, 125.
- TRAVERS S. A., FARES M. A., 2007. *Functional coevolutionary networks of the Hsp70-Hop-Hsp90 system revealed through computational analyses.* *Mol. Biol. Evol.* 24, 1032–1044.
- YOSHIDA T., SAKUMA Y., TODAKA D., MARUYAMA K., QIN F., MIZOI J., KIDOKORO S., FUJITA Y., SHINOZAKI K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., 2008. *Functional analysis of an Arabidopsis heat-shock transcription factor HsfA3 in the transcriptional cascade downstream of the DREB2A stress-regulatory system.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368, 515–521.