

CZY ISTNIEJE ROŚLINNY HOMOLOG ZWIERZĘCEGO PEPTYDU NATRIURETYCZNEGO?

DOES ANY HOMOLOG OF THE ANIMAL ANP EXIST IN THE PLANTS?

¹Sylvia WROTEK, ²Grażyna DĄBROWSKA, ³Andrzej TRETYN

¹Zakład Immunologii, ²Pracownia Genetyki i ³Zakład Biotechnologii Roślin
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Streszczenie: W latach dziewięćdziesiątych XX wieku opublikowano szereg prac sugerujących istnienie u roślin białek homologicznych do zwierzęcych peptydów natriuretycznych (NP). Przeprowadzono wiele doświadczeń wykazując m.in. różnorodny wpływ egzogennie podawanego przedsionkowego peptydu natriuretycznego (ANP) na metabolizm oraz wzrost i rozwój roślin. Badano także aktywność roślinnego immunohomologu ANP. Mimo to do tej pory nie opisano roślinnej sekwencji białkowej ani nukleotydowej, która w istotnym stopniu byłaby podobna do zwierzęcych NP. Z tego powodu na obecnym poziomie wiedzy nie można potwierdzić istnienia roślinnych homologów zwierzęcych peptydów natriuretycznych oraz kodujących je genów.

Słowa kluczowe: zwierzęce peptydy natriuretyczne (NP), receptory peptydów natriuretycznych, roślinne homologi peptydów natriuretycznych, ekspansyny.

Summary: In 1990s papers have been published suggesting the existence of an animal atrial natriuretic peptide (ANP) homologues in plant organisms. Multiple influence of exogenous atrial natriuretic peptide into plant metabolism, growth and development has been showed. Plant ANP immunohomologues has been studied as well. However, the plant nucleotide or aminoacid sequence similar to the animal NP have not yet been published. The existence of plant NP homologues to the animal natriuretic peptides and genes encoding them was not established.

Key words: animal natriuretic peptides, receptors of natriuretic peptides, plant homologues of natriuretic peptides, expansins.

WSTĘP

Przez wiele lat uważano, iż rozwojem roślin, regulacją wzrostu oraz ich fizjologiczną odpowiedzią na zmiany zachodzące w środowisku kierują tylko hormony roślinne [40]. Pogląd ten zweryfikowano w latach dziewięćdziesiątych, kiedy poznano funkcje i

właściwości takich cząsteczek, jak: glukoza, kwas jasmonowy i salicylowy oraz brasinosteroidy, nodulina, systemina, fitosulfokiny [30, 53]. Wyniki badań przeprowadzonych w latach dziewięćdziesiątych sugerują, iż peptydy natriuretyczne zaangażowane u zwierząt w regulację bilansu wodnego i sodowo-potasowego mogą również odgrywać podobną rolę u roślin. Pierwszych argumentów popierających tę hipotezę dostarczyły prace Vesely’ a i Giordano, na liściach i pędzie *Dracena godseffiana* przy użyciu przeciwciał skierowanych do szczyrkowego przedsionkowego peptydu natriuretycznego [56]. Zidentyfikowanie ANP u roślin otworzyłoby nieograniczone możliwości farmakologicznego wykorzystania jego jako leku obniżającego ciśnienie krwi.

RODZINA ZWIERZĘCYCH PEPTYDÓW NATRIURETYCZNYCH

Ponad 20 lat temu de Bold odkrył peptyd natriuretyczny produkowany w sercu szczura [11]. Początkowo zidentyfikowano i badano ANP – przedsionkowy peptyd natriuretyczny i BNP – mózgowy peptyd natriuretyczny [34]. Następnie wyizolowano z mózgu peptyd natriuretyczny typu C – CNP [47], z aorty węgorka i pstrąga – VNP tzw. komorowy peptyd natriuretyczny [51] oraz DNP z jadu zielonej mamby [44]. Ponadto białka reagujące z przeciwciałami do ANP wykryto u ślimaka [41], kraba [55], ostrygi [59], pantofelka [57].

Do rodziny białek o właściwościach natriuretycznych należą także: urodylatyna produkowana w komórkach okołocewkowych [10], uroguanina produkowana w śluzówce jelit [16] oraz limfoguanina produkowana w nerkach, mięśniu sercowym i układzie immunologicznym [12].

ANP NAJLEPIEJ POZNANYM PRZEDSTAWICIELEM RODZINY PEPTYDÓW NATRIURETYCZNYCH

Gen kodujący ludzkie ANP znajduje się na I chromosomie w położeniu 36,21 cM. Gen ten składa się z trzech egzonów i dwóch intronów, a jego długość wynosi 1786 nukleotydów. Fizjologicznie aktywne ANP jest produktem trzeciego egzonu (1.061–1.141) [NCBI, gi 178635].

Prepro-ANP jest 152-aminokwasowym białkiem magazynowanym w przedsionku serca. Przy udziale proteazy sygnałowej odcinana jest 24-aminokwasowa sekwencja sygnałowa z N-końca, a następnie usunięte zostają 2 argininy z C-końca probiałka (ryc. 1). Przed sekrecją peptyd ten ulega ograniczonej proteolizie na 2 cząsteczki: fragment N-końcowy (1–99aa) (aa – reszty aminokwasowe) i C-końcowy (99-126aa) [52]. Aktywną biologicznie częścią C-końca jest 17-aminokwasowy fragment zawarty pomiędzy dwiema cysteinami (7 i 23 aa) połączonymi mostkami dwusiarczkowymi. W obrębie tej pierścieniowej struktury znajdują się trzy konserwatywne sekwencje aminokwasowe: CFG-DRI-SGLGC [52]. Zniszczenie trójwymiarowej konformacji przez zerwanie mostków dwusiarczkowych powoduje zanik aktywności omawianego peptydu [32]. Dalsza proteoliza fragmentu N-końcowego pozwala

uzyskać kilka mniejszych fragmentów, z których część może również pełnić funkcje biologiczne (ryc. 1). Sugeruje się, że:

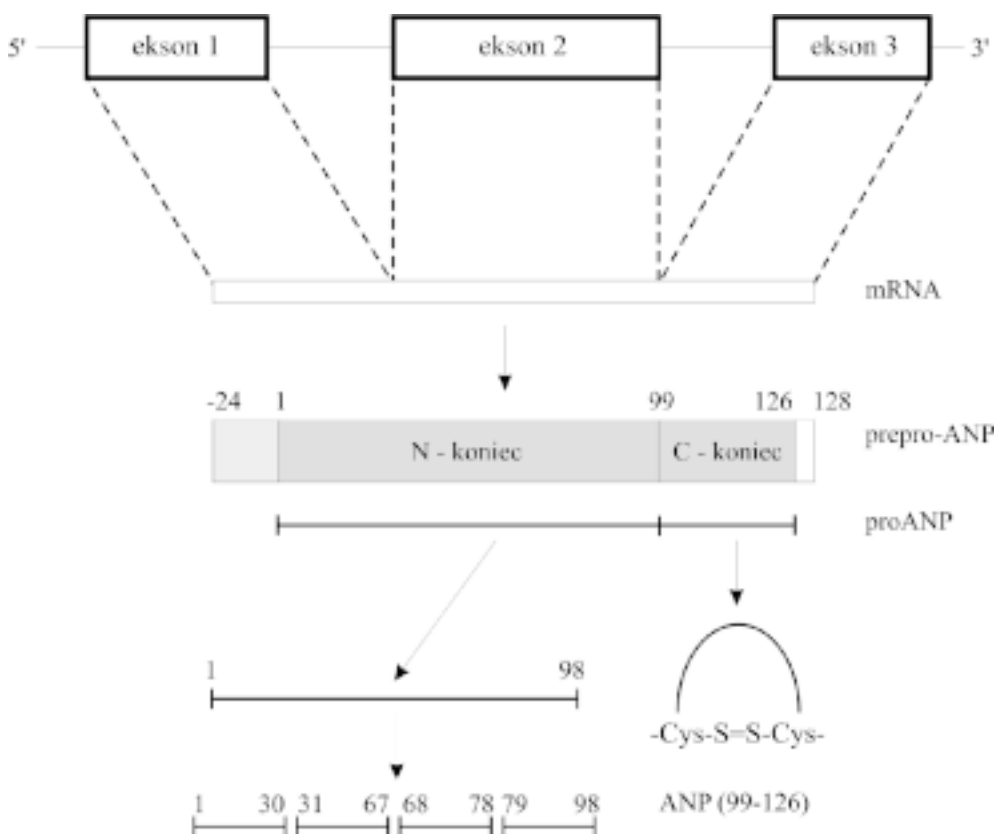
- ♦ ANP (1-30aa) bierze udział w długotrwałej stymulacji wydzielania sodu z organizmu,

- ♦ ANP (31-67aa) wpływa na rozszerzanie naczyń krwionośnych (tzw. wazodylator),

- ♦ ANP (79-98aa) jako tzw. białko kaliuretyczne reguluje gospodarkę potasową [60].

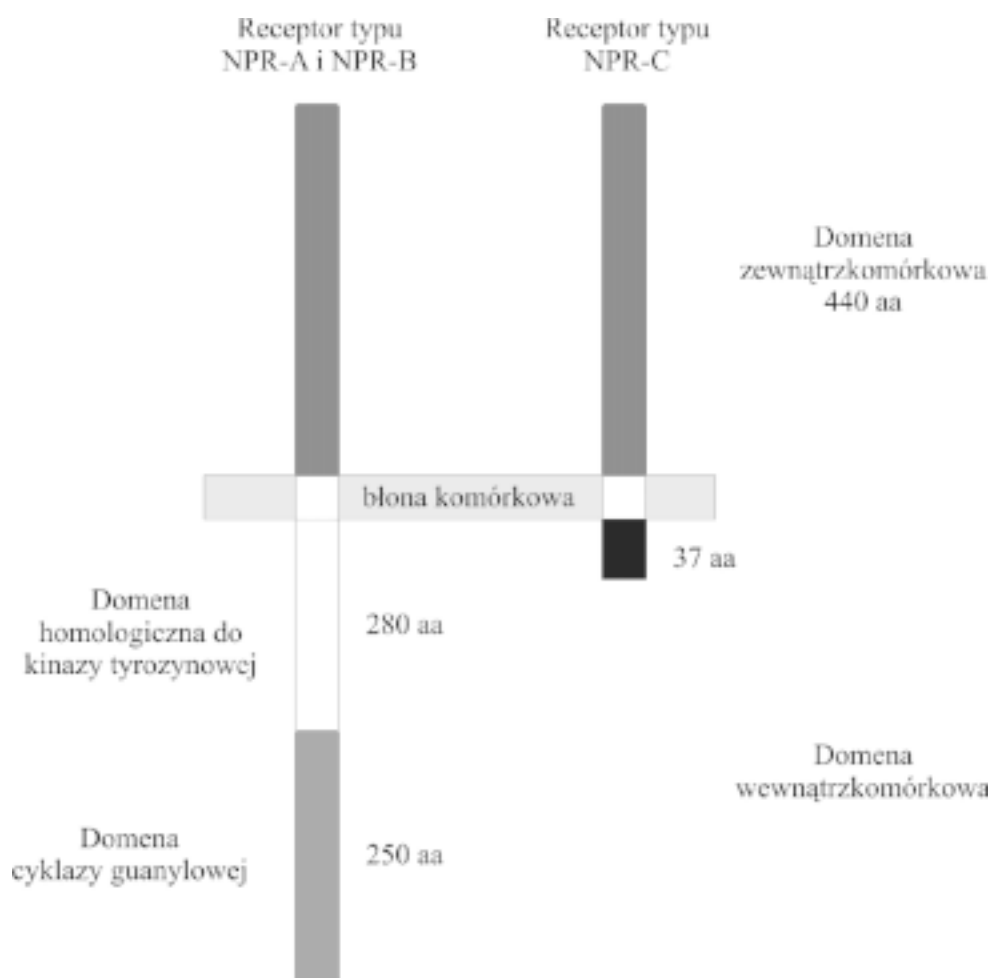
ANP jest konserwatywny wśród wszystkich gatunków ssaków. Natomiast homologia pomiędzy różnymi grupami kręgowców jest raczej niska i wynosi około 50%. Podobieństwo N-końca, tj. ANP 1-98aa człowieka i ANP 1-94aa łososia wynosi tylko 20%. Z kolei C-koniec (ANP 99-126aa) jest bardziej konserwatywny – u człowieka i łososia ich podobieństwo wynosi 63%. BNP jest wysoce zmiennym peptydem nawet wśród gatunków ssaków. Natomiast za peptyd, który w najmniejszym stopniu podlegał zmianom podczas ewolucji, przyjmuje się CNP [52].

BUDOWA RECEPTORÓW PEPTYDÓW NATRIURETYCZNYCH



RYCINA 1. Synteza przedsionkowego peptydu natriuretycznego (ANP), dokładny opis w tekście

Wszystkie receptory peptydów natriuretycznych zbudowane są z pojedynczego polipeptydu zawierającego domeny: zewnątrzkomórkową (N-końcową) o długości 440 aminokwasów, transbłonową i cytoplazmatyczną (C-końcową) (ryc. 2) Receptory peptydów natriuretycznych można podzielić na 2 typy: o domenie cytoplazmatycznej mającej długość 530 aminokwasów oraz o domenie cytoplazmatycznej długości 37 aminokwasów. W domenie cytoplazmatycznej receptorów pierwszego typu można wyróżnić sekwencje homologiczne do kinazy tyrozynowej (o długości 280 aminokwasów) i cyklazy guanylowej (o długości 250 aminokwasów). Taką budowę mają receptory: NPR-A (ang. *natriuretic peptide receptor type A*) wykazujący duże powinowactwo do ANP, BNP i VNP oraz NPR-B wykazujący powinowactwo do CNP i VNP [1,



RYCINA 2. Budowa receptorów peptydów natriuretycznych

22]. Przyłączenie powyższych ligandów do receptorów prowadzi do konwersji GTP w cGMP [27]. Natomiast receptory NPR-C [25] i niedawno odkryty NPR-D, których domena cytozolowa ma 37 aminokwasów (brak tu domeny cykazy guanylowej i kinazy tyrozynowej) prawdopodobnie oddziałują z cyklazą adenylanową [52, 54]. NPR-C wykazuje powinowactwo do wszystkich peptydów natriuretycznych i uważa się, że jest jednym z czynników zmniejszających stężenie ANP we krwi [27]. NPR-D znaleziony został jedynie u węgorza (*Anquilla japonica*) [52].

Receptory związane z cyklazą guanylową w warunkach nieredukujących występują jako tetrametry. NPR-C niemający domeny cykazy guanylowej jest w tych warunkach dimerem, zaś NPR-D również bez domeny cykazy guanylowej jest teramerem – podobnie jak NPR-A i NPR-B [9, 52].

FUNKCJE ANP U ZWIERZĄT

U zwierząt kręgowych w sercu zlokalizowane są baroreceptory (presoreceptory) wrażliwe na rozciąganie ścian naczyń krwionośnych. Początkowo sądzono, że regulacja ciśnienia krwi zachodzi jedynie dzięki przekazywaniu nerwami bodźców z baroreceptorów do ośrodkowego układu nerwowego. Obecnie wiadomo, że prawy przedsionek serca na skutek rozciągania wydziela hormon ANP. Jego natriuretyczne i diuretyczne działanie możliwe jest dzięki współpracy serca, mózgu i nerek. Wydzielanie ANP do krwiobiegu powoduje inhibicję wchłaniania wody i sodu przez jelito oraz stymulację wydalania ich nadmiaru przez nerki. Jednocześnie ANP wpływa na wydzielanie wazopresyny i aldosteronu [42]. Hormony te pobudzając lub hamując aktywność nerek, regulują zależnie od potrzeby organizmu bilans wody i jonów. Wynikiem tego jest obniżenie ciśnienia krwi w układzie krwionośnym i powrót organizmu do homeostazy [52].

ANP powoduje również hamowanie aktywności kanałów sodowych w rdzeniu nerek ssaków [63], a także dezaktywację Na^+/K^+ -ATPazy [4]. Hormon ten działa [36] w różnych typach komórek oraz wspomaga wydalanie potasu [23]. Inną funkcją ANP jest aktywacja kanałów potasowych zależnych od wapnia przez zwiększenie wydzielania cGMP [46]. Wyniki badań zespołu Patila wykazują również bezpośrednią stymulację akwaporyn (kanałów wodnych) [35].

Wzrost stężenia ANP w osoczu wpływa na: wydzielanie aldosteronu, resorpcję sodu w kanalikach nerkowych oraz wzrost komórek naczyńiowych [2, 17, 18, 19]. Badania na myszach dowiodły, że nadekspresja genu ANP powoduje obniżenie ciśnienia krwi [45]. Natomiast mutant myszy typu *knockout* (pozbawiony genu ANP) charakteryzował się wyższym ciśnieniem niż mysz typu dzikiego [20]. U ryb ANP pełni głównie funkcje hormonu odpowiedzialnego za wydzielanie sodu. Redukuje pragnienie i zmniejsza absorpcję sodu przez jelito węgorza żyjącego w wodzie słodkiej [52].

Stosując techniki autoradiograficzne i hybrydyzację *in situ* wykazano, że peptydy natriuretyczne i ich receptory występują licznie w mózgu, a szczególnie w regionie podwzgórza [6, 21]. Lokalizacja ta świadczy o udziale peptydów natriuretycznych w kontroli homeostazy płynów regulowanej przez ośrodkowy układ nerwowy. W badaniach

na szczurach wykazano, że peptydy natriuretyczne hamują działanie wazopresyny argininowej uwalnianej w podwzgórzu [43] i redukują pragnienie stymulowane angiotensyną II [3].

ROŚLINNE PEPTYDY NATRIURETYCZNE

Pierwsze sugestie o możliwości występowania peptydów natriuretycznych u roślin pochodzą z pracy Vesely i Giordano (1991). Stosując przeciwciała skierowane przeciwko poszczególnym fragmentom ludzkiego ANP (1-30, 31-67, 79-98aa) odkryto obecność immunohomologów w łodygach i liściach draceny (*Dracaena godseffiana*) [56].

Zastosowanie chromatografii immunopowinowactwa, doprowadziło do wyizolowania trzech fragmentów prohormonu ANP homologicznych do: N-końca proANP (1-98aa); fragmentu środkowego proANP (31-67aa) oraz C-końcowego proANP (99-126aa). Porównywano stężenie poszczególnych fragmentów w wyizolowanych białkach z liści i łodyg draceny (*Dracaena godseffiana*) z białkami uzyskanymi z przedsionka serca i żył szczura wędrownego (*Rattus norvegicus*). Najwyższą zawartość ANP (190–240 ng/g) stwierdzono w szczurzym przedsionku serca. Najniższe stężenie hormonu ANP zaobserwowano w ekstrakcie otrzymanym z żył 4,0–5,8 ng/g. Natomiast w liściach draceny stężenie wynosiło 120–150 ng/g, a w pędzie 96–140 ng/g. Na podstawie tych wyników Vesely i współpracownicy stwierdzili, iż u roślin zachodzi synteza peptydów homologicznych do zwierzęcego ANP. Badacze ci zasugerowali, że obecność peptydów natriuretycznych w liściach i pędzie może świadczyć o ich udziale w długodystansowym transporcie soli mineralnych [56].

Vesely i wsp. (1993) opublikowali listę gatunków, u których wykryto poszczególne immunohomologi ANP. Wśród tych organizmów znalazły się m.in.: euglena (*Euglena* sp.), bodziszek (*Geranium*), róża (*Rosa*) i sosna (*Pinus silvestris*). Ponadto autorzy ci stosując wysokosprawną chromatografię żelową (HPGPC) wykazali, że propeptydy i peptydy natriuretyczne z draceny (*Dracena godseffiana*) mają podobne masy cząsteczkowe do peptydów natriuretycznych z kręgowców. Ci sami autorzy stwierdzili również, że egzogennie podane fragmenty z ludzkiego ANP wpływają na poziom transpiracji u roślin [58].

Gehring i wsp. [13] odkryli, że syntetyczny szczurzy ANP indukuje otwieranie aparatów szparkowych u trzykrotki (*Tradescantia* sp.). Ponadto w błonie komórkowej liści i pędów zlokalizowano specyficzne miejsca wiązania znakowanego, szczurzego ANP [13, 49].

W 1998 Pharmawati i współpracownicy wykazali, że szczurzy rANP (ang. *Rat ANP*) działa na aparaty szparkowe tylko wtedy, gdy ma budowę pierścieniową. Przeprowadzenie S-karboksymetylacji powoduje powstanie liniowej cząsteczki peptydu i zahamowanie jego aktywności [37, 38]. Stwierdzono też, że działanie rANP jest hamowane w obecności inhibitorów cykazy guanylowej, takich jak: LY 83583 (6-anilino-5,8-quinolinequinone) i błękitu metylenowego. Natomiast analog cGMP (8-Br-cGMP) naśladuje wpływ rANP [37, 38].

W 1997 roku Bilington i współpracownicy wyizolowali i oczyścili roślinny immunohomolog ANP. Od tego czasu rozpoczęły się badania mające na celu poznanie funkcji roślinnego peptydu. Ustalono, że oczyszczony immunohomolog z bluszczu (*Hedera helix*) indukuje otwieranie aparatów szparkowych [5].

Pharmawati i współpracownicy wykazali, że immunoreaktywny, roślinny peptyd natriuretyczny powoduje wzrost cGMP w rdzeniu korzenia kukurydzy (*Zea mays*). Ustalili także, że LY83583 (inhibitor rozpuszczalnej cykazy guanylowej) nie zawsze hamował powstawanie cGMP. Na tej podstawie stwierdzili, że u roślin podobnie jak u zwierząt w działaniu peptydów natriuretycznych musi pośredniczyć związana cykaza guanylowa. Sugeruje to obecność w tkankach roślin receptorów peptydów natriuretycznych, zawierających domeny cykazy guanylowej [37, 39]. Stwierdzono także, że S-karboksymetylacja jest reakcją odpowiadającą za dezaktywację peptydu. Liniowa postać cząsteczki nie wykazuje zdolności do otwierania aparatów szparkowych [37].

Suwestica i Ghering (1998) stosując technikę magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) zbadali wpływ roślinnego immunohomologu ANP na transport wody z ksylenu do kory pierwotnej korzenia trzykrotki (*Tradescantia* sp.). Zaobserwowali istotny wzrost transportu radialnego pod wpływem tego peptydu. Natomiast w badaniach *in vitro* wykazali, że badany peptyd wiąże się do błon komórkowych w liściach trzykrotki [48].

Yang i wsp. (1996) stosując metodę radioimmunologiczną oraz wysokosprawnej chromatografii żelowej (HPGPC) wykryli w liściach i łodygach *Metasequoia* immunohomolog prohormonu ANP. W analizowanym eluacie zaobserwowali prohormon o większej masie cząsteczkowej oraz fragmenty powstałe w wyniku jego proteolizy. Autorzy przypuszczali, że ten peptyd ułatwia transport wody i soli mineralnych w kierunku wierzchołka rośliny, umożliwiając *Metasequoia* osiągnięcie znacznych wysokości [62].

W 2000 roku Maryani i współpracownicy wyizolowali roślinny homolog ANP z ziemniaka i wykazali jego wpływ na potencjał błonowy komórek liści tej rośliny [28]. Autorzy ci stwierdzili także, że ANP powoduje indukowane osmotycznie pęcznienie protoplastów otrzymywanych z komórek miękiszowych ziemniaka (*Solanum tuberosum*). Następnie ustalili, że oddziaływanie ANP na komórki przyszparkowe zachodzi przy udziale cGMP i jest naśladowane przez analog cGMP (8-Br-cGMP). Otwieranie aparatów szparkowych indukowane przez roślinny homolog ANP było hamowane, gdy frakcję białkową preinkubowano z przeciwciałami króliczymi skierowanymi na ludzkie ANP. Surowica z nieimmunizowanego królika nie wpływała na ruch szparek. Ustalili także, że dodanie 8-Br-cGMP nie powoduje zmian objętości protoplastów. Na tej podstawie stwierdzili, że w tym przypadku efekt zmian objętościowych nie jest powodowany przez cGMP i zasugerowali możliwość istnienia innych dróg przekazywania sygnału, niezależnych od cGMP [29].

Zaobserwowano także, że egzogenne podawane zwierzęce ANP wywierają różnicowany wpływ na rośliny [5, 28, 48]. Na tej podstawie zasugerowano istnienie u roślin receptora, dla którego ANP może być ligandem. Ustalono, że przypuszczalne receptory (podobnie jak receptory peptydów natriuretycznych) znajdują się w błonie komórkowej [13].

W 2002 roku opublikowano pracę o zidentyfikowaniu w genomie rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) sekwencji *AtPNP*, która koduje białko wiążące się

z przeciwciałami do ludzkiego ANP. Stwierdzono, że sekwencja nukleotydowa genu oznaczonego jako *AtPNP* jest także podobna do transkryptu z *Citrus jambhiri* zwanego CjBAP12 o nieznannej funkcji i do genów z rodziny ekspansyn [26]. Dane te są zgodne z wynikami uzyskanymi przez Ceccardi, który jako pierwszy wskazał na podobieństwo CjBAP12 do ekspansyn [8] (ryc. 3).

W wyniku kontynuacji badań dotyczących immunoreaktywnego peptydu wyizolowano dwa homologi (irPNP): AtPNP-A i AtPNP-B (26). Porównanie sekwencji aminokwasowych obu białek wyizolowanych z *Arabidopsis thaliana* wykazuje konserwatywny wzór kolejności aminokwasowej. Natomiast porównując sekwencje aminokwasowe białek AtPNP-A i CjBAP12, stwierdzono homologię fragmentów α -helikalnych i struktury- β w konformacji cząsteczek [26].

Porównano także ekspansyny z irPNP (ang. *immuno reactant natriuretic peptide*). Ekspansyny to białka, które mają wspólne miejsce katalityczne z glukonazami. Oddziałują one z mikrofibryllami celulozy i powodują rozluźnienie lub osłabienie wiązań między składnikami ściany. Najważniejszą cechą białek irPNP jest brak C-końca, który jest charakterystyczny dla ekspansyn. Wynika z tego zasadnicza różnica w ich funkcji, ponieważ C-terminalna domena odpowiada za wiązanie ekspansyn z celulozową ścianą komórki roślinnej. Jest więc bardzo prawdopodobne, iż białka irPNP utraciły tę domenę, a więc i funkcję wiązania się ze ścianą komórki. Utrata funkcji, spowodowała zwiększenie mobilności białka CjBAP12, które jest obecne w liście, choć tam nie jest syntezowane. Zaproponowano więc model molekularnej ewolucji białek irPNP. Wspólny przodek prawdopodobnie miał właściwości hydrolityczne i wiązał się ze ścianą komórkową. Z tego probiałka w toku dalszej ewolucji powstały ekspansyny, zdolne do wiązania się ze ścianą, aczkolwiek utraciły mobilność oraz białka irPNP, których ruchliwość wzrosła w zamian za utratę możliwości wiązania się ze ścianą komórkową. Te wnioski oparte są nie tylko na strukturze białek, ale na ich funkcji w utrzymywaniu homeostazy wody i soli w roślinie [5, 14, 26]. Wskazano również na funkcję białek irPNP w transporcie przez membrany komórkowe, stymulację osmotyczno-zależnego transportu wody do protoplastów. Sugeruje się także pomimo dużej różnicy w funkcji ekspansyn i białek irPNP, ich współdziałanie w odpowiedzi komórki na stres [26].

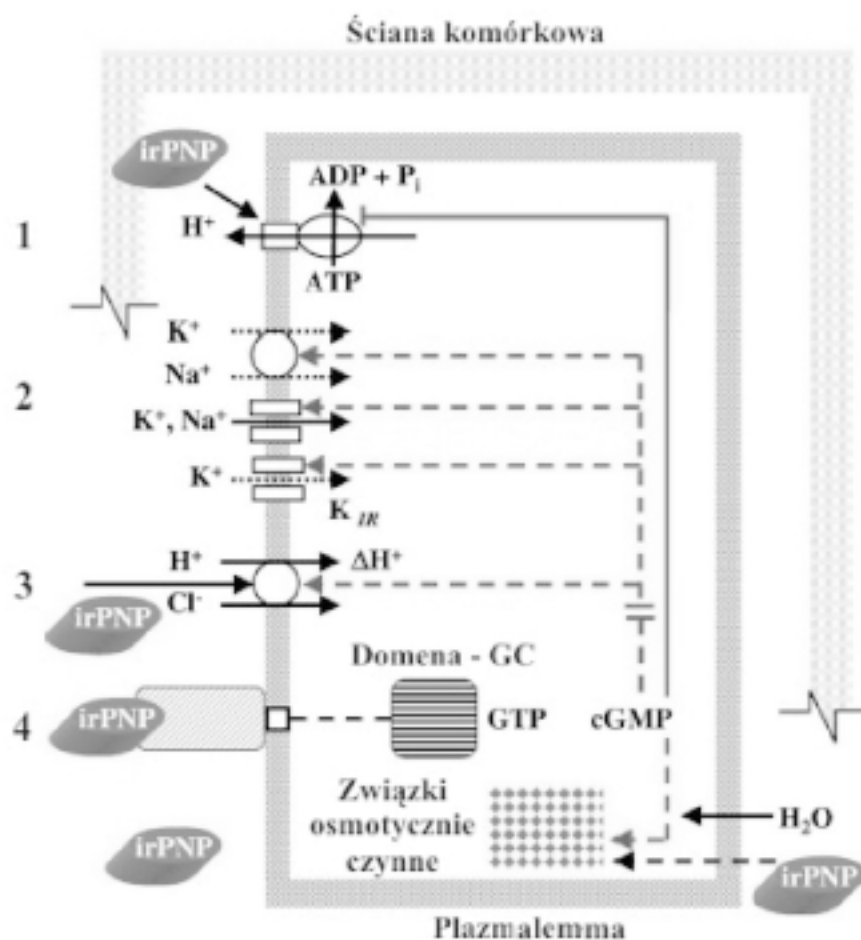
Porównując wszystkie omawiane powyżej białka, wykazano wspólne cechy w budowie wynikające z rozmieszczenia pojedynczych aminokwasów, a także motywów 5–7-aminokwasowych, które wydają się być wysoce konserwatywne [26].

W 2003 roku Gehring i Irving opublikowali schemat stanowiący podsumowanie wiedzy dotyczącej funkcjonowania immunohomologu ANP u roślin (ryc. 4) [15].

Natomiast w następnym roku Kende i inni [24] usystematyzowali nomenklaturę białek należących do superrodziny ekspansyn. Uwzględniono również tzw. roślinne peptydy natriuretyczne, które mają domenę podobną do domeny I ekspansyn [24].

Q9ZV52 EXR3_ARATH	Expansin-related protein 3 precursor (AtEXPR3) (Ath- ExpGamma-1.2) [EXLB3] [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cross)]	130 AA align
Score = 261 bits (668), Expect = 1e-69 Identities = 125/126 (99%), Positives = 126/126 (99%)		
Query: 1	MAVKFVVMIVFAQILAPIAEAAQGKAVYYDPPYTRSACYGTQRETLVVGVKNNLWQNGR	60
	MAVKFVVMIVFAQILAPIAEAAQGKAVYYDPPYTRSACYGTQRETLVVGVKNNLWQNGR	
Sbjct: 4	MAVKFVVMIVFAQILAPIAEAAQGKAVYYDPPYTRSACYGTQRETLVVGVKNNLWQNGR	63
Query: 61	ACGRRYRVRICIGATYNFDRACTGRTVDVKVVDVDFCREPCNGDNLNLSRDAFRVAVANTDAGNI	120
	ACGRRYRVRICIGATYNFDRACTGRTVDVKVVDVDFCREPCNGDNLNLSRDAFRV+ANTDAGNI	
Sbjct: 64	ACGRRYRVRICIGATYNFDRACTGRTVDVKVVDVDFCREPCNGDNLNLSRDAFRVAVANTDAGNI	123
Query: 121	RVVYTP 126	
	RVVYTP	
Sbjct: 124	RVVYTP 129	

RYCINA 3. Porównanie sekwencji roślinnego immunohomologu ANP pochodzącego z *Arabidopsis thaliana* z ekspansyną gamma wykonane w programie BLAST-



RYCINA 4. Wpływ roślinnego homologu ANP na zawartość jonów w komórce: 1 – pompa protonowa, 2 – różne typy kanałów jonowych, 3 – symport Cl⁻ i H⁺, 4 – receptor roślinnego homologu ANP (irPNP) (wg [15] zmodyfikowany)

PODSUMOWANIE

Pomimo wielu badań przeprowadzonych na roślinach zarówno występowanie ANP, jak i ich rola budzą wiele kontrowersji. Głównym argumentem przemawiającym za istnieniem roślinnych homologów ANP było wykrycie roślinnych peptydów dzięki przeciwciałom specyficznym dla fragmentu ludzkiego ANP. Ustalono, że zidentyfikowane immunoreaktywne peptydy:

- ◆ występują powszechnie u wielu gatunków roślin [58],
- ◆ są syntetyzowane w postaci probiałka, które podlega proteolitycznej obróbce prowadzącej do powstania fragmentów homologicznych do tych, jakie powstają z preprobiałka ANP [58],

- ♦ masy molekularne zidentyfikowanych roślinnych peptydów są zbliżone do mas zwierzęcych peptydów natriuretycznych [58],

- ♦ posiadają one w swojej sekwencji cysteiny połączone mostkiem dwusiarczkowym, który warunkuje aktywność biologiczną, natomiast S-karboksymetylacja białka powoduje utracenie jego aktywności [37],

- ♦ powodują wzrost stężenia cGMP w traktowanych nimi tkankach roślinnych [37].

Opublikowanie sekwencji immunohomologu ANP przez zespół Gehringa [29] skłania do przypuszczeń, że w tym przypadku oddziaływanie stosowanych zwierzęcych przeciwciał z ekstraktami roślinnymi jest niespecyficzne. W świetle powyższych wyników można stwierdzić, że stosowanie przeciwciał poliklonalnych do wykrywania antygenów u organizmów pochodzących z różnych królestw może prowadzić do wykrywania niepożądanych peptydów. Mimo braku homologii ANP do sekwencji roślinnego peptydu immunoreaktywnego niezmiennie stosowano nazwę „immunohomolog”. Stało się to przyczyną pojawiających się (zwłaszcza w pracach przeglądowych) błędów rzeczowych. W publikacji z 2003 roku można nawet przeczytać, że odkryto obecność genu kodującego ANP u roślin [31]. Tymczasem wykazano jedynie, że cDNA genu *ANP* z owcy hybrydyzuje z DNA i RNA bluszczu (*Hedera helix*) [61].

W 2003 roku w NCBI zdeponowano sekwencję genu określanego jako „*Immunoreactant natriuretic peptide-like protein*” (AC Q8RWA0 i Q84V62). Po wykonaniu analizy za pomocą programu BLASTP można stwierdzić, że są to peptydy najbardziej podobne do ekspansyn.

W 2004 roku zespół Gehringa opublikował pracę, w której pierwszy raz przyznano, że sekwencje tzw. immunohomologów różnią się znacząco od sekwencji ANP [33].

Zakładając, że dojrzałe peptydy natriuretyczne charakteryzują się:

- ♦ obecnością dwóch cystein, pomiędzy którymi tworzy się wiązanie dwusiarczkowe, nadające charakterystyczną strukturę pierścienia,

- ♦ obecnością 17-aminokwasowego, konserwatywnego fragmentu, w którym 11 aminokwasów jest zawsze takich samych.

Można stwierdzić, że do tej pory nie zidentyfikowano roślinnego genu kodującego peptyd, spełniający powyższe wymagania.

LITERATURA

- [1] ALLER G, LOMBARDO I, BHANOT S, FORREST JR JN. Cloning, characterization and functional expression of a CNP receptor regulating CFTR in the shark rectal gland. *Am J Physiol* 1999; **276**: 442–449.
- [2] ANDERSON JV, STRUTHERS AD, PAYNE NN, SLATER JD, BLOOM SR. Atrial natriuretic peptide inhibits the aldosterone response to angiotensin II in man. *Clin Sci (Colch)* 1986; **70**: 507–512.
- [3] ANTUNES-RODRIGUES J, MCCANN SM, ROGERS LC, SAMSON WK. Atrial natriuretic factor inhibits dehydration- and angiotensin II-induced water intake in the conscious, unrestrained rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 8720–8723.
- [4] APERIA A, HOLTBACK U, SYREN LM, SVENSSON LB, FRYCKSTEDT J, GREENGARD P. Activation / deactivation of renal Na, K-ATPase: a final common pathway for regulation of natriuresis. *FASEB J* 1994; **8**: 436–439.
- [5] BILLINGTON T, PHARMAWATI M, GEHRING CA. Isolation and immunoaffinity purification of biologically active plant natriuretic peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **235**: 722–725.

- [6] BROWN J, ZUO Z. C-type natriuretic peptide and atrial natriuretic peptide receptors of rat brain. *Am J Physiol* 1993; **264**: 513–523.
- [7] CARMELO C, LOPEZ-FARRE A, RIESCO A, OLIVERA A, OKADA K, CRAGOE E J, TSAI P, BRINGER VA, SCHRIER RW. Atrial natriuretic peptide and cGMP inhibit Na^+ / H^+ antiporter in vascular smooth muscle cell culture. *Kidney International* 1994; **45**: 66–75.
- [8] CECCARDI TL, BARTHE GA, DERRICK KS. A novel protein associated with citrus blight has sequence similarities to expansin. *Plant Mol Biol* 1998; **38**: 775–783.
- [9] CHINKERS M, GARBERS DL, CHANG MS i inni. A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor. *Nature* 1989; **338**: 78–83.
- [10] CURIE MG, FOK KF, KATO J, MOORE RJ, HAMRA FK, DUFFIN KL, SMITH CE. Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 947–951.
- [11] de BOLD A J, BORENSTEIN B H, VERESS AT, SONNENBERG H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* 1981; **28**: 89–94.
- [12] FORTE LR, EBER SL, FAN X, LONDON RM, WANG Y, ROWLAND LM, CHIN DT, FREEMAN RH, KRAUZE WJ. Lymphoguanilin: cloning and characterization of a unique member of guanylin peptide family. *Endocrinology* 1999; **140**: 1800–1806.
- [13] GEHRING CA, MD KHALID K, TOOP T, DONALD JA. Rat natriuretic peptide binds specifically to plant membranes and induces stomatal opening. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **228**: 739–744.
- [14] GEHRING CA. Natriuretic peptides – a new class of plant hormone? *Ann Bot* 1999; **83**: 329–334.
- [15] GEHRING CA, IRVING HR. Natriuretic peptides – a class of heterologous molecules in plants. *Inter J Biochem Cell Biol* 2003; **35**: 1318–1322.
- [16] HAMRA FK, FORTE LR, EBER SL, PIDHORODECKY J NV, KRAUSE WJ, FREEMAN RH, CHIN DT, TOMPKINS JA, FOK FK, SMITH CE, DUFFIN L, SIEGEL NR, CURRIE MG. Uroguanylin structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase. *Proc Nat Acad Sci USA* 1993; **90**: 10464–10468.
- [17] HARRIS PJ, THOMAS D, MORGAN TO. Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin-stimulated proximal tubular sodium and water reabsorption. *Nature* 1987; **326**: 697–698.
- [18] HUNT PJ, ESPINER EA, NICHOLLS MG, RICHARDS AM, YANDLE TG. Differing biological effects of equimolar atrial and brain natriuretic peptide infusions in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; **81**: 3871–3876.
- [19] ITOH H, PRATT RE, DZAU VJ. Atrial natriuretic polypeptide inhibits hypertrophy of vascular smooth muscle. *J Clin Invest* 1990; **86**: 1690–1697.
- [20] JOHN S WM, KREGG JH, OLIVER PM i inni. Genetic decreases in atrial natriuretic peptide and salt-sensitive hypertension. *Science* 1995; **267**: 679–681.
- [21] JOHNSON AK. The pre-ventricular antenodal third ventricle (AV3V) its relationship with the subfornical organ and neural systems involved in maintaining body fluid homeostasis. *Brain Res Bull* 1985; **13**: 595–601.
- [22] KATAFUCHI T, TAKASHIMA A, KASHIWAGI M, HAGIWARA H, TAKEI Y, HIROSE S. Cloning and expression of eel natriuretic peptide receptor B NPR-B and its comparison with the mammalian counterparts. *Eur J Biochem* 1994; **222**: 835–842.
- [23] KECSKEMETI V, PACHER P, PANKUCSI C, NANASI P. Comparative study of cardiac electrophysiological effects of atrial natriuretic peptide. *Mol Cell Biochem* 1996; **161**: 53–59.
- [24] KENDE H, BRADFORD KJ, BRUMMEL DA, CHO HT, COSGROVE DJ, FLEMING AJ, GEHRING C, MCQUEEN-MASON S, ROSE JKC, VOESENEKLA CJ. Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins. *Plant Mol Biol* 2004; **55**: 311–314.
- [25] LEVIN E R. Natriuretic peptide C-receptor: more than a clearance receptor. *Am J Physiol* 1993; **264**: 483–489.
- [26] LUDIDI NN, HEAZLEWOOD JL, SEOIGHE C, IRVING HR, GEHRING CA. Expansin-like molecules: novel functions derived from common domains. *J Mol Evol* 2002; **54**: 587–594.
- [27] MAACK T. Receptors of atrial natriuretic factor. *Annu Rev Physiol* 1992; **54**: 11–27.
- [28] MARYANI MM, SHABALA SN, GEHRING CA. Plant natriuretic peptide immunoreactants modulate plasma-membrane H^+ gradients in *Solanum tuberosum* L. leaf tissue vesicles. *Arch Biochem Biophys* 2000; **376**: 457–458.
- [29] MARYANI MM, BRADLEY G, CAHILL DM, GEHRING CA. Natriuretic peptides and immunoreactants modify osmoticum-dependent volume changes in *Solanum tuberosum* L. Mesophyll cell protoplasts. *Plant Sci* 2001; **161**: 443–452.

- [30] MATSUBAYASHI Y, SAKAGAMI Y. Phytosulfokines, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 7623–7627.
- [31] MINORSKY PV. The hot and the classic. *Plant Physiol* 2003; **131**: 383–384.
- [32] MISONO KS, FUKUMI H, GRAMMER RT, INAGAMI T. Rat atrial natriuretic factor: complete sequence and disulfide linkage essential for biological activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; **119**: 524–529.
- [33] MORSE M, PIRONCHEWA G, GEHRING C. AtPNP is a systemically mobile natriuretic peptide immunological analogue with a role in *Arabidopsis thaliana* cell volume regulation. *FEBS Lett* 2004; **556**: 99–103.
- [34] MUKOYAMA M, NAKAO K, HOSODA K et al. Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans: evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *J Clin Invest* 1991; **87**: 1402–1412.
- [35] PATIL RV, HAN Z, WAX MB. Regulation of water channel activity of aquaporin 1 by arginine vasopressin and atrial natriuretic peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **238**: 392–396.
- [36] PETROV V, AMERY A, LIJNEN P. Role of cyclic GMP in atrial-natriuretic-peptide stimulation of erythrocyte Na^+/H^+ exchange. *Eur J Biochem* 1994; **221**: 195–199.
- [37] PHARMAWATI M, BILLINGTON T, GEHRING CA. Stomatal guard cell responses to kinetin and natriuretic peptides are cGMP dependent. *Cell Mol Life Sci* 1998a; **54**: 272–276.
- [38] PHARMAWATI M, GEHRING CA, IRVING HR. An immunoaffinity purified plant natriuretic peptide analogue modulates cGMP levels in the *Zea mays* root stele. *Plant Sci* 1998b; **137**: 107–115.
- [39] PHARMAWATI M, MARYANII MM, NIKOLAPOULOS T, GEHRING CA, IRVING HR. Cyclic GMP modulates stomatal opening induced by natriuretic peptides and immunoreactive analogues. *Plant Physiol Biochem* 2001; **39**: 385–394.
- [40] PISKORNIK Z. Fizjologia roślin dla studentów Wyd. Ogr. PWN, 1987.
- [41] REINECKE M, NEHLS M, FORSSMANN WG. Phylogenetic aspects of cardiac hormones as revealed by immunohistochemistry, electron microscopy, and bioassay. *Peptides* 1985; **3**: 321–331.
- [42] RUSKOHO H. Atrial natriuretic peptide: synthesis, release, and metabolism. *Pharmacol Rev* 1992; **44**: 479–602.
- [43] SAMSON WK, AGUILA MC, MARTINOVIC J, ANTUNES-RODRIGUES J, NORRIS M. Hypothalamic action of atrial natriuretic factor to inhibit vasopressin secretion. *Peptides* 1987; **8**: 449–454.
- [44] SCHWARTZ H, VIGNE P, MOINIER D, FRELIN C, LAZDUNSKI M. A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis anguiceps*). *J Biol Chem* 1992; **267**: 13928–13932.
- [45] STEINHELPER ME, COCHRANE KL, FIELD LJ. Hypotension in transgenic mice expressing atrial natriuretic factor fusion genes. *Hypertension* 1990; **16**: 301–307.
- [46] STOCKAND JD, SAMSON SC. Role of large Ca^{2+} -activated K^+ channels in the regulation of mesangial contraction by nitroprusside and ANP. *Am J Physiol* 1996; **270**: 1773–1779.
- [47] SUDOH T, MINAMINO N, KANGAWA K, MATSUO H. C-type natriuretic peptide P. A new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; **168**: 863–870.
- [48] SUWASTIKA I, GEHRING CA. Natriuretic peptide hormones increase radial water movement from the xylem of *Tradescantia* shoots. *Cell Mol Life Sci* 1998; **54**: 1161–1167.
- [49] SUWASTIKA I, TOOP T, IRVING HR, GEHRING CA. *In situ* and *in vitro* binding of natriuretic peptide hormones in *Tradescantia multiflora*. *Plant Biol* 2000; **2**: 1–3.
- [50] SZEKERS M. Brassinosteroid and systemin: two hormones perceived by the same receptor. *Trends Plant Sci* 2003; **8**: 102–104.
- [51] TAKEI Y, TAKANO M, ITAHARA Y, WATANABE TX, NAKAJIMA K, ONKILIN DJ, DUFF DW, OLSON KR. Rainbow trout ventricular natriuretic peptide: isolation, sequencing, and determination of biological activity. *Gen Comp Endocrinol* 1994; **96**: 420–426.
- [52] TAKEI T. Does the natriuretic peptide system exist throughout the animal and plant kingdom? *Comp Biochem Physiol Part B* 2001; **129**: 559–573.
- [53] TAMURA N, OGAWA Y, YASUDA A, ITOH H, SAITO Y, NAKAO K. Two cardiac peptide genes atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide are organized in tandem in the mouse and human genomes. *J Mol Cell Cardiol* 1996; **28**: 1811–1815.
- [54] TOOP T, DONALD JA, EVANS DH. Natriuretic peptide receptors in the kidney and the ventral and dorsal aortae of the Atlantic hagfish *Myxine glutinosa* (Agnatha). *J Exp Biol* 1995; **198**: 1875–1882.
- [55] TURRIN MQA, SAWAYA ML, SANTOS MCF, VEIGA LV, MANTERO F. Atrial natriuretic peptide ANP increases in the mangrove crab *Ucides cordatus* when exposed to increased environmental salinity. *Comp Biochem Physiol* 1992; **101A**: 803–806.

- [56] VESELY DL, GIORDANO AT. Atrial natriuretic peptide hormonal system in plants. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **179**: 695–700.
- [57] VESELY DL, GIORDANO AT. Atrial natriuretic factor-like peptide and its prohormone within single cell organisms. *Peptides* 1992; **13**: 177–182.
- [58] VESELY DL, GOWER JR. WR, GIORDANO AT. Atrial natriuretic peptides are present throughout the plant kingdom and enhance solute flow in plants. *Am J Physiol* 1993a; **265**: E465–E477.
- [59] VESELY DL, GOWER JR. WR, GIORDANO AT, FRIEDL FE. Atrial natriuretic peptides in the heart and hemolymph of the oyster, *Crassostrea virginica*: a comparison with vertebrates. *Comp Biochem Physiol* 1993b; **106B**: 535–546.
- [60] VESELY DL, DOUGLASS MA, DIETZ JR, GOWER JR WR, MCCORMICK MT, RODRIGUEZ-PAZ G, SCHOCKEN DD. Three peptides from the atrial natriuretic factor prohormone amino terminus lower blood pressure and produce a diuresis, natriuresis and/or kaliuresis in humans. *Circulation* 1994; **90**: 1129–1140.
- [61] VESELY MD, GOWER WR, PEREZ-LAMBOY G, OVERTON RM, GRADDY L, VESELY DL. Evidence for an atrial natriuretic peptide-like gene in plants. *Exp Biol Med* 2001; **226**: 61–65.
- [62] YANG Q, MATSUBAYASHI Y, NAKAMURA K, SAKAGAMI Y. *Oryza sativa* PSK gene encodes a precursor of phytosulfokine- α , a sulfated peptide growth factor found in plants. *Proc NATO Acad Sci USA* 1999b; **96**: 13560–13565.
- [63] ZEIDEL M L. Hormonal regulation of inner medullary collecting duct sodium transport. *Am J Physiol* 1993; **265**: F159–F173.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 01.03.2005 r.

Przyjęto: 10.05.2005 r.

87-100 Toruń

e-mail: wrotek@biol.uni.torun.pl