PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

Postępy Biologii Komórki

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

VOL. 47, ISSUE 3/2020
(223–336)

www.pbkom.pl

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej
Quarterly of the Polish Anatomical Society, the Polish Society of Cell Biology and the Foundation for Cell Biology and Molecular Biology

Redaguje Kolegium – Editors:

Barbara CHWIROT – *biologia komórki, biologia nowotworów botanika bchwirot@umk.pl*

Agata FILIP – *genetyka medyczna, onkologia a.filip@umlub.pl*

Grażyna HOSER – *cytometria, komórki macierzyste graho@cmpk.edu.pl*

Lilla HRYNIEWIECKA – *energetyka komórki, mitochondria lillah@amu.edu.pl*

Bożena KAMIŃSKA-KACZMAREK – *neurobiologia, biologia molekularna bozenakk@nencki.gov.pl*

Jerzy KAWIAK – *immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów jkawiak@cmkp.edu.pl*

Wincenty KILARSKI – *mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek wincenty.kilarski@uj.edu.pl*

Andrzej K. KONONOWICZ – *komórki roślinne, regulacja ekspresji genów u Pro- i Eukaryota, inżynieria genetyczna akononow@biol.uni.lodz.pl*
Krzysztof LEWANDOWSKI – *hematologia, onkologia, komórki macierzyste krzysztof.lewandowski@sk1.am.poznan.pl*

Marek MALESZEWSKI – *biologia komórki, embriologia zwierząt maleszewski@biol.uw.edu.pl*

Janusz MASZEWSKI – *komórki roślinne, regulacja cyklu komórkowego, organizacja jądra komórkowego i struktura chromatyny jmasz@biol.uni.lodz.pl*

Michał NOWICKI – *hemopoeza, nefrologia, organizacja i rozwój naczyń krwiononośnych mnowicki@ump.edu.pl*

Barbara PŁYTYCZ – *immunologia barbara.plytycz@uj.edu.pl*

Zdzisław SMORĄG – *klonowanie zwierząt, zwierzęta transgeniczne, regulacja płci, hodowla gamet i zarodków in vitro, sterowan rozród zwierząt zdzislaw.smorag@izoo.krakow.pl*

Maciej ZABEL – *histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek mazab@amp.edu.pl*

Jan ŻEROMSKI – *patologia, immunologia, cytometria jzeromski@amp.edu.pl*

Rada Redakcyjna – Advisory Board:
Andrzej ŁUKASZYK – przewodniczący, Szczepan BILIŃSKI, Mieczysław CHORĄŻY, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI, Lech WOJTCZAK

Adres Redakcji – Editorial Office:
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań, tel. 61 854 64 53, fax 61 854 64 40 *mnowicki@ump.edu.pl*
Redaktor techniczny – Zuzanna Podemska-Jedrzejczak *zpodemsk@ump.edu.pl*
@ Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej – *Foundation for Cell Biology and Molecular Biology*
Indexed in: Biological Abstracts, Science Citation Index Expanded (SciSearch), Journal Citation Reports/Science Edition, BIOSIS Previews, Ulrich`s International Periodicals Directory, New Jersey, AGROS.

Wszystkie prawa zastrzeżone. Zabrania się kopiowania części lub całości bez uprzedniego pisemnego zezwolenia Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.
All rights reserved. No part of this publication may be reproduced in any form or by any means without the prior written permission of the publisher. Requests to the publisher for permission should be addressed to the Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

Poznań, 2020-11-30

BIAŁKA B-BOX U ROŚLIN – HETEROGENICZNOŚĆ STRUKTURALNA I FUNKCJONALNA

B-BOX PROTEINS IN PLANTS – STRUCTURAL AND FUNCTIONAL HETEROGENEITY

Klaudia GRĄDZKA, Agnieszka KIEŁBOWICZ-MATUK

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, Poznań

Streszczenie: Wzrost i rozwój roślin jest precyzyjnie kontrolowany przez interakcje między czynnikami endogennymi a środowiskiem. Wśród różnych bodźców zewnętrznych, światło odgrywa kluczową rolę regulacyjną w procesie morfogenezy i prawidłowym funkcjonowaniu organizmów. Rośliny wyczuwają zmiany natężenia, jakości i kierunku padania światła słonecznego i dostosowują do nich swój cykl życiowy. Zidentyfikowano wiele białek, które są zaangażowane w liczne procesy rozwojowe u roślin regulowane przez światło. Spośród nich, na szczególną uwagę zasługuje rodzina białek B-box (BBX) zawierających domeny palca cynkowego typu B-box.
Roślinne białka BBX są zaangażowane w nadzór wielu *istotnych* aspektów rozwojowych. Pełnią rolę zarówno pozytywnych, jak i negatywnych regulatorów fotomorfogenezy. Niektóre białka B-box sprawują kluczowe funkcje w kontroli czasu kwitnienia i rozwoju kwiatów. Inne, zasadniczo należące do grupy strukturalnej IV, są zaangażowane w mechanizm unikania cienia. Wybrani członkowie rodziny BBX odgrywają ważną rolę w szlakach sygnalizacji hormonalnej. Oprócz funkcji białek BBX w ontogenezie roślin, są one także zaangażowane w odpowiedź organizmów na różne stresy środowiskowe. Ponadto uczestniczą w mechanizmach tolerancji roślin na stresy abiotyczne.
W niniejszej pracy podjęto próbę kompleksowego przedstawienia najnowszych osiągnięć, dotyczących rodziny białek B-box, jako reprezentantów strukturalnego i funkcjonalnego polimorfizmu u roślin. Zwrócono również uwagę na udział białek B-box w szlakach sygnałowych generowanych przez zegar biologiczny.

Słowa kluczowe: białka B-box, palce cynkowe, fotomorfogeneza, kwitnienie, zegar okołodobowy

Summary: Plant growth and development are precisely controlled by interactions between endogenous factors and the environment. Among many various external stimuli, light plays an essential regulatory role in the process of morphogenesis and the proper functioning of organisms. Plants sense changes in the intensity, quality, and direction of sunlight and adapt their development accordingly. Several proteins that are involved in numerous light-regulated developmental processes in plants have been identified. The B-box family of proteins (BBX), including direct or indirect transcriptional regulators, containing B-box zinc finger domains, deserve special attention. The genome of *A. thaliana* contains 32 *BBX* genes which have been divided into five different structural groups. The groups were made by analyzing their amino acid similarity, the presence, and the number of characteristic domains.

Plant-based BBX proteins are involved in the control of many important developing aspects. They play the role of positive or negative regulators in photomorphogenesis. Certain B-box proteins in *A. thaliana* are essential in regulating the flowering time and flower development itself. Others, which belong to the structural group IV, are involved in the shadow avoidance mechanism. Selected members of the BBX family play an important role in endocrine signaling pathways in plants. Apart from their function in developmental processes, they are also involved in the response of organisms to various environmental stresses. They also participate in mechanisms of plant tolerance to abiotic stresses.
In this paper, we have attempted to comprehensively present the latest achievements regarding the family of B-box proteins, as representatives of structural and functional polymorphisms in plants, especially focusing on *A. thaliana* as the *model organism*. The importance of B-box proteins in signaling pathways generated by the biological clock was also underlined.

Keywords: B-box proteins, zinc fingers, photomorphogenesis, flowering, circadian clock

WSTĘP

Wzrost i rozwój roślin jest wynikiem współdziałania czynników zewnętrznych, takich jak światło, długość fotoperiodu, temperatura, dostępność wody i soli mineralnych oraz wewnętrznych, do których zaliczamy regulatory wzrostu i hormony roślinne oraz mechanizm zegara biologicznego. Interakcja pomiędzy tymi czynnikami jest niezbędna aby roślina rozwijała się prawidłowo [8, 47]. Wśród różnych sygnałów środowiskowych, światło odgrywa kluczową rolę regulacyjną w prawidłowym rozwoju i funkcjonowaniu organizmów [50]. Rośliny wyczuwają jakość, ilość i kierunek światła, aby regulować liczne procesy rozwojowe, takie jak kiełkowanie, fotomorfogeneza czy kwitnienie. Działanie światła jest regulowane przez rozległe sieci sygnalizacyjne obejmujące różne receptory, przekaźniki sygnału i białka efektorowe. Światło o różnych długościach fali jest odbierane przez zestaw wyspecjalizowanych fotoreceptorów. U roślin zidentyfikowano kilka grup fotoreceptorów, które pochłaniają fale świetlne różnej długości. Należą do nich fitochromy, które absorbują światło czerwone ($\lambda_{max} \approx 660$ nm) i daleką czerwień ($\lambda_{max} \approx 730$ nm), fototropiny pochłaniające światło niebieskie ($\lambda_{max} \approx 490$ nm) i UV-A oraz kryptochromy i receptory zawierające domenę LOV pochłaniające światło niebieskie [11, 13, 68].

Dotychczas zidentyfikowano wiele białek, które odgrywają istotną rolę w procesach wzrostu i rozwoju roślin regulowanych przez światło. Spośród nich na szczególną uwagę zasługuje rodzina białek B-box (BBX), które zawierają domeny palców cynkowych typu B-box [27]. Roślinne białka BBX są kluczowymi regulatorami wielu procesów, takich jak kiełkowanie nasion, fotomorfogeneza siewek, unikanie cienia, fotoperiodyczna kontrola kwitnienia [4, 47]. Obecność genów *BBX* w genomach różnych gatunków roślin, począwszy od alg po rośliny jednoliścienne i dwuliścienne, wskazuje na ich pradawne pochodzenie [15]. Szybka ekspansja białek BBX w trakcie ewolucji oraz fakt, że domeny B-box są wysoce

zachowawcze w całym królestwie roślin, sugerują, że białka BBX mogły odgrywać kluczową rolę w adaptacji roślin lądowych [15]. Co ciekawe, u różnych gatunków roślin, występuje podobna ilość genów *BBX* np. 32 u *Arabidopsis thaliana* [40], 30 u *Solanum tuberosum* [78], 29 u *Solanum lycopersicum* [14], 25 u *Pyrus bretschneideri Rehd* [6] i 30 u *Oryza sativa* [35].

BIAŁKA Z MOTYWEM PALCA CYNKOWEGO

Aktualne dane zawarte w bazie Plant TFDB wskazują, że genom *Arabidopsis thaliana* koduje 2296 czynników transkrypcyjnych, które zostały sklasyfikowane na 58 rodzin [38, 79]. Jak dotąd liczne czynniki transkrypcyjne zostały scharakteryzowane pod względem strukturalnym i funkcjonalnym. Dla wielu z nich zidentyfikowano specyficznie docelowe sekwencje DNA (elementy *cis*-regulatorowe), z którymi się wiążą, jak również białka regulatorowe, z którymi oddziałują tworząc kompleksy aktywujące lub hamujące transkrypcję.

Czynniki transkrypcyjne z motywem palca cynkowego to stosunkowo duża rodzina. U roślin jej członkowie stanowią około 15% wszystkich dotychczas zidentyfikowanych białek [38, 79]. Domeny palca cynkowego to motywy sekwencji, w których reszty aminokwasowe cysteiny i/lub histydyny koordynują atom/y cynku. Są one obecne zarówno u organizmów eukariotycznych, jak i prokariotycznych. Białka zawierające w swojej strukturze domeny palców cynkowych mogą oddziaływać z DNA, RNA i innymi białkami [23, 25]. Pierwotnie klasyfikacja białek zawierających palce cynkowe została przeprowadzona w oparciu o liczbę reszt cysteiny i histydyny koordynujących atom cynku. Aktualna klasyfikacja zasadniczo opiera się na kształcie szkieletu domeny białkowej odpowiadającej za wiązanie atomu cynku [44]. Biorąc pod uwagę różnorodność strukturalną domeny biorącej udział w wiązaniu atomu cynku, białka z motywem palców cynkowych zostały podzielone na 23 rodziny [52]. Spośród nich rodzina białek z domeną palca cynkowego typu B-box (BBX) jest w ostatnich latach przedmiotem zainteresowania wielu grup badawczych.

BUDOWA ROŚLINNYCH BIAŁEK B-BOX

Roślinne białka B-box (BBX) charakteryzują się obecnością pojedynczej domeny lub dwóch domen palca cynkowego typu B-box, zlokalizowanych w regionie N-końcowym [15, 27, 40]. Niektórzy członkowie rodziny BBX posiadają domenę CCT i motyw walina-prolina położone na C-końcu [15, 27, 40]. Ponadto, zidentyfikowano siedem nowych motywów (M1-M7) specyficznych dla każdej grupy strukturalnej [15]. Jednakże dotychczas ich rola nie została określona, za

wyjątkiem motywu M6, który może mieć istotny wpływ w determinacji funkcji białek BBX należących do tej samej grupy strukturalnej. Wykazano, że zamiana motywu M6 u białka AtBBX21 na motyw M6 z białka AtBBX24, znosi jego funkcję w promowaniu fotomorfogenezy [39, 94].

DOMENY B-BOX

Białka BBX mogą zawierać odpowiednio jedną lub dwie domeny B-box o długości około 40 aminokwasów, które zlokalizowane są na końcu aminowym cząsteczki. W zależności od ich sekwencji konsensusowej i odległości między zachowawczymi resztami cysteiny i histydyny wiążącymi atom cynku, domeny B-box dzieli się na dwa typy: B-box1 (B1) oraz B-box2 (B2) [15]. Badania filogenetyczne obejmujące 214 białek BBX u 12 gatunków roślin wykazały, że motywy B-box1 i B-box2 prawdopodobnie pochodzą z duplikacji segmentowych i zdarzeń delecji wewnętrznej [15]. Obecność dwóch domen B-box u jednokomórkowego glonu Chlamydomonas sugeruje, że zdarzenie duplikacji domeny B-box miało miejsce dużo wcześniej niż lądowa kolonizacja roślin [15]. Wykazano, że zachowawcze reszty aminokwasowe w domenach B-box mają kluczowe znaczenie w oddziaływaniach białko-białko i regulacji transkrypcji [66]. Badania ujawniły, że substytucje aminokwasowe w obrębie domeny B1 (Ala na Val) lub B2 (His na Tyr) w białku BBX1 u *A. thaliana* zaburzają jego prawidłowe funkcjonowanie [69]. Z kolei zamiana aminokwasu Asp na Ala w obrębie domeny B2 w białku BBX22 u *A. thaliana* zakłóca jego interakcję z białkiem HY5 (ang. *ELONGATED HYPOCOTYL 5*) [20].

DOMENA CTT

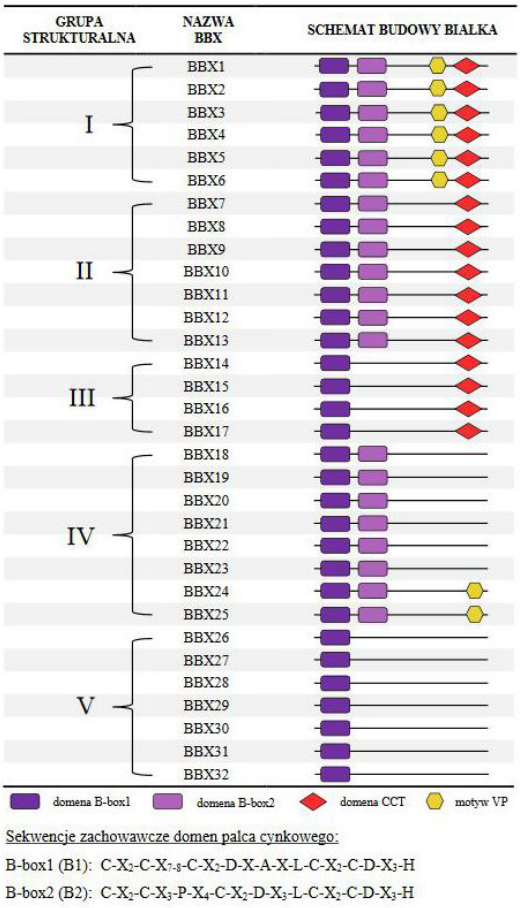
Dodatkowo w białkach BBX może występować domena CCT (ang. *CONSTANS, CO-LIKE, TIMING OF CAB1: TOC1*) [15, 27]. Pierwotnie obecność domeny CCT stwierdzono w białkach CONSTANS (CO, BBX1), CO-LIKE (COL) i TIMING OF CAB1 (TOC1) u *Arabidopsis thaliana*, które pełnią funkcję kluczowych regulatorów procesu kwitnienia.

Domena CCT składa się z 42-43 aminokwasów i jest zlokalizowana na C-końcu cząsteczki białka. W obrębie domeny CCT znajduje się sygnał lokalizacji jądrowej, który umożliwia transport białka do jądra komórkowego [27]. Porównanie sekwencji aminokwasowej białek BBX u różnych gatunków roślin ujawniło, że domena CCT jest wysoce zachowawcza [15]. Wykazano, że obecność domeny CCT w białku CO u *A. thaliana* jest niezbędna aby mogło ono związać się do rejonu promotorowego genu *FT* (ang. *Flowering Locus T*) [80]. Ponadto, domena CCT pośredniczy w interakcji białka CO z ligazami ubikwityny E3, takimi jak COP1 (ang. *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC1*) i HOS1 (ang. *HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES1*), które regulują stabilność białka CO [49, 56]. Z drugiej strony, Gendron i in. [29] wykazali, że zmiana w sekwencji amino-

kwasowej w obrębie domeny CCT białka TOC1 (ang. *TIMING OF CABEXPRESSION 1*), znosi jego udział w negatywnej regulacji ekspresji genów *CCA1* i *LHY*, stanowiących kluczowy element centralnego oscylatora zegara biologicznego.

MOTYW VP

Niektóre białka B-box mogą zawierać motyw VP (ang. *VALINE-PROLINE*, VP), który składa się z sześciu aminokwasów o sekwencji konsensusowej G-I / VV-P-S / T-F [22]. Motyw VP jest zlokalizowany na końcu karboksylowym cząsteczki białka i oddzielony jest 16-20 aminokwasami od domeny CCT [33]. U wielu białek, takich jak HY5, HYH, UVR8 i SIZ1 motyw VP pośredniczy



RYCINA 1. Klasyfikacja strukturalna białek BBX u *A. thaliana* (wg [27], zmodyfikowane)
FIGURE 1. Structural classification of BBX proteins in *A. thaliana* (according to [27], modified)

w interakcji z domeną WD40 w białku COP1. Wykazano, że mutacje w obrębie motywu VP całkowicie znoszą zdolność tych białek do oddziaływania z białkiem COP1 [33, 57, 96]. Badania ujawniły, że białka BBX, które wchodzą w interakcję z białkiem COP1, takie jak AtBBX4, AtBBX20, AtBBX21, AtBBX22, AtBBX24 i AtBBX25, również posiadają motyw VP [19, 20, 24, 28, 90, 95].

```
AtBBX1   --MLKQESNDIGSGENNRARPCDTCRS-NACTVYCHADSAYLCMSCDAQVHSANRVASRHKRVR----------------
AtBBX7   -----------------MGYMCDFCGE-QRSMVYCRSDAACLCLSCDRSVHSANALSKRHSRTL----------------
AtBBX16  MVVDVESRTASVTGEKMAARGCDACMKRSRASWYCPADDAFLCQSCDASIHSANHLAKRHERVRLQSSSPTETADKTTSV
AtBBX24  -----------------MKIQCDVCEK-APATVICCADEAALCPQCDIEIHAANKLASKHQRLHLNSLS-----------
AtBBX32  -----------------MVSFCELCGA--EADLHCAADSAFLCRSCDAKFHASNFLFARHFRRVICPNCKS---------

AtBBX1   ------------VCESCERAPAAFLCEADDASLCTACDSEVHSA------NPLARRHQRVPILPISGNSFSSMTTTHHQS
AtBBX7   ------------VCERCNAQPATVRCVEERVSLCQNCDWSGHNNSNNNNSSSSSTSPQQHKRQTISCYSGCPSSSELASI
AtBBX16  WYEGFRRKARTPRSKSCAFEKLLQIESNDPLVPELGGDEDDGFFS----FSSVEETEESLNCCVPVFDPFSDMLIDDING
AtBBX24  --------TKFPRCDICQEKAAFIFCVEDRALLCRDCDESIHVA------NSRSANHQRFLATGIKVALTSTICSKEIEK
AtBBX32  ------LTQNFVSGPLLPWPPRTTCCSESSSSSCCSSLDCVSSS-------ELSSTTRDVNRARGRENRVNAKAVAVTVA

AtBBX1   EKTMTDPEKRLVVDQEEGEEGDKDAKEVASWLFPNSDKNNNNQNNGLLFSDEYLNLVDYNSSMDYKFTGEYSQHQQNCSV
AtBBX7   WSFCLDLAGQSICEQELGMMNIDDDGPTDKKTCNEDKKDVLVGSSSIPETSSVPQGKSSSAKDVGMCEDDFYGNLGMDEV
AtBBX16  FCLVPDEVNNTTTNGELGEVEKAIMDDEGFMGFVPLDMDLEDLTMDVESLLEEEQLCLGFKEPNDVGVIKEENKVGFEIN
AtBBX24  NQPEPSNNQQKANQIPAKSTSQ-----------------------------------------------QQQQPSSATPL
AtBBX32  DGIFVNWCGKLGLNRDLTNAVVS-----------------------------------------------YASLALAVETR

AtBBX1   PQTSYGGDRVVPLKLEESRGHQCHNQQNFQFNIKYGSSGTHYNDNGSINHNAYISSMETGVVPESTACVTTASHPRTPKG
AtBBX7   DMALENYEELFGTAFNPSEELFGHGGIDSLFHKHQTAPEGGNSVQPAGSNDSFMSSKTEPIICFASKPAHSNISFSGVTG
AtBBX16  CKDLKRVKDEDEEEEEAKCENGGSKDSDREASNDKDRKTSLFLRLDYGAVISAWDNHGSPWKTGIKPECMLGGNTCLPHV
AtBBX24  PWAVDDFFHFSDIESTDKKGQLDLGAGELDWFSDMGFFGDQINDKALPAAEVPELSVSHLGHVHSYKPMKSNVSHKKPRF
AtBBX32  PRATKRVFLAAAFWFGVKNTTTWQNLKKVEDVTGVSAG--------------------------MIRAVESKLARAMTQQ

AtBBX1   TVEQQPDPASQMITVTQLS------------------PMDREARVLRYREKRKTRKFEKTIRYASRKAYAEIRPRVNGRF
AtBBX7   ESSAGDFQECGASSSIQLSGEPPWYPPTLQDNNACSHSVTRNNAVMRYKEKKKARKFDKRVRYASRKARADVRRRVKGRF
AtBBX16  VGGYEKLMSSDGSVTRQQGRDGGG------------SDGEREARVLRYKEKRRTRLFSKKIRYEVRKLNAEQRPRIKGRF
AtBBX24  ETRYDDDDEEHFIVPDLG-------------------------------------------------------------
AtBBX32  LRRWRVDSEEGWAENDNV-------------------------------------------------------------

AtBBX1   AKREIEAEEQGFNTMLMYNTGYGIVPSF
AtBBX7   VKAGEAYDYDPLTPTRSY----------
AtBBX24  ---------------------------
AtBBX32  ---------------------------
AtBBX16  VKRTSLLT--------------------
```

RYCINA 2. Porównanie sekwencji aminokwasowej wybranych białek BBX należących do różnych grup strukturalnych rodziny BBX z *A. thaliana* za pomocą ClustalW2. AtBBX1 (ID: Q39057) – I grupa strukturalna, AtBBX7 (ID: Q9SSE5) – II grupa strukturalna, AtBBX16 (ID: Q9C9A9) – III grupa strukturalna, AtBBX24 (ID: Q96288) – IV grupa strukturalna, AtBBX32 (ID: Q9LJB7) – V grupa strukturalna. Odstępy pomiędzy symbolami aminokwasów zostały wprowadzone dla maksymalnego dopasowania sekwencji. Domenę B-box1 zaznaczono kolorem żółtym, domenę B-box2 zaznaczono kolorem niebieskim, domenę CCT pogrubiono i podkreślono, motyw VP zaznaczono kolorem zielonym. Zachowawcze reszty cysteiny koordynujące atom cynku zaznaczono kolorem czerwonym

FIGURE 2. Comparison of amino acid sequences of selected BBX proteins belonging to different structural groups of the BBX family in *A. thaliana* using ClustalW2. AtBBX1 (ID: Q39057) – I structural group, AtBBX7 (ID: Q9SSE5) – II structural group, AtBBX16 (ID: Q9C9A9) – III structural group, AtBBX24 (ID: Q96288) – IV structural group, AtBBX32 (ID: Q9LJB7) – V structural group. Spaces between the amino acid have been introduced for maximum sequence alignment. The B-box1 domain is highlighted in yellow, the B-box2 domain is highlighted in blue, the CCT domain is in bold and underlined, the VP motif is highlighted in green. Conservative cysteine residues coordinating the zinc atom are marked in red

RODZINA BIAŁEK BBX U *ARABIDOPSIS THALIANA*

W genomie *A. thaliana* są obecne 32 geny *BBX*, które kodują białka zawierające domenę palca cynkowego typu B-box. Biorąc pod uwagę podobieństwo aminokwasowe, liczbę domen B-box oraz obecność lub brak domeny CCT, białka należące do rodziny B-box zostały podzielone na pięć różnych grup strukturalnych (I-V) (Ryc. 1) [27, 40]. Białka BBX należące do grupy I (AtBBX1-AtBBX6) posiadają dwie domeny B-box (B1 i B2) oraz domenę CCT (Ryc. 1 i 2). Przedstawiciele grupy II (AtBBX7-AtBBX13) zawierają również dwie domeny B-box (B1 i B2) i domenę CCT, jednakże od grupy I różnią się sekwencją konsensusową w obrębie domeny B2 (Ryc. 1 i 2). Białka z grupy III (AtBBX14-AtBBX17) posiadają jedną domenę B-box (B1) i domenę CCT (Ryc. 1 i 2). Członkowie grupy IV (AtBBX18-AtBBX25) zawierają dwie domeny B-box (B1 i B2) (Ryc. 1 i 2), natomiast reprezentanci grupy V (AtBBX26-AtBBX32) mają tylko jedną domenę B-box (B1) (Ryc. 1 i 2) [27, 40]. U innych gatunków roślin, klasyfikacja strukturalna białek BBX jest oparta na podobnych kryteriach jak u *Arabidopsis thaliana*.

FUNKCJE BIAŁEK BBX W PROCESACH WZROSTU I ROZWOJU ZALEŻNYCH OD ŚWIATŁA

ROLA BIAŁEK BBX W FOTOMORFOGENEZIE SIEWEK

Światło reguluje procesy zachodzące w roślinach podczas całego ich życia. Fotomorfogeneza siewek jest procesem kontrolowanym przez światło, które promuje de-etiolację siewek czyli „przełączenia się" rośliny ze wzrostu w ciemności na wzrost na świetle. Proces de-etiolacji charakteryzuje się zahamowaniem wydłużenia łodygi, otwieraniem liścieni i przekształceniem etioplastów w chloroplasty [3]. Aby procesy fotomorfogenetyczne mogły zachodzić, światło musi być zaabsorbowane przez wyspecjalizowane cząsteczki fotoreceptorów roślinnych, które następnie przekazują sygnały świetlne do nadrzędnych białek, takich jak PIFs (ang. *PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS*), HY5 (ang. *ELONGATED HYPOCOTYL 5*), HYH (ang. *TRANSCRIPTION FACTOR HY5-LIKE*) i COP1 (ang. *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1/ E3 ubiquitin-protein ligase COP1*) pełniących rolę pozytywnych lub negatywnych regulatorów fotomorfogenezy [81]. Białko COP1 jest kluczowym negatywnym regulatorem fotomorfogenezy. W ciemności białko COP1 aktywuje ubikwitylację białek promujących fotomorfogenezę w tym białka HY5, kierując je do degradacji w proteasomie [48].

Niedawno ujawniono, że białka B-box działają jako negatywne bądź pozytywne regulatory fotomorfogenezy w szlaku, w którym pośredniczy białko HY5 [54]. U *A. thaliana* białka AtBBX4 [19], AtBBX20 [89], AtBBX21 [93], AtB-

BX22 [9] i AtBBX23 [97] promują fotomorfogenezę, podczas gdy białka AtBBX18 [88], AtBBX19 [84], AtBBX24 [39, 95], AtBBX25 [28], AtBBX28 [54] i AtBBX32 [34] tłumią fotomorfogenezę. Badania wykazały, że białka BBX biorą udział w procesie de-etiolacji siewek, kontrolują wzrost hipokotylu, wzrost korzeni bocznych i rozwój liścieni, a ponadto są zaangażowane w reguluję akumulacji chlorofilu i wytwarzanie antocyjanów (Tab. 1).

TABELA 1. Regulacja fotomorfogenezy przy udziale białek BBX u *A. thaliana*
TABLE 1. Regulation of photomorphogenesis mediated by BBX proteins in *A. thaliana*

BIAŁKO BBX	PARTNER INTERAKCJI	EFEKT	ROLA BIAŁKA BBX
AtBBX4	COP1	promuje	Wchodzi w bezpośrednią interakcję z białkiem COP1 i tłumi jego funkcję. Pozytywnie reguluje zależny od światła rozwój i tworzenie korzeni bocznych. Ponadto, sprzyja rozgałęzianiu się pędów, szczególnie w warunkach krótkiego dnia [19].
AtBBX18	Gibereliny	tłumi	Hamuje wydłużanie hipokotylu za pośrednictwem światła niebieskiego poprzez zwiększenie poziomów bioaktywnych giberelin [88].
AtBBX19	COP1 ELF3	tłumi	Wiąże się z białkiem ELF3 i kieruje je do ubikwitylacji za pośrednictwem białka COP1, umożliwiając tym samym ekspresję czynników transkrypcyjnych PIF4 i PIF5, prowadzącą do zwiększonego wzrostu hipokotylu [84].
AtBBX20	COP1 HY5	promuje	Oddziałuje z białkiem COP1 i na świetle hamuje jego aktywność. Może również w kompleksie z białkiem HY5, regulować ekspresję genów docelowych. Ponadto, AtBBX20 pozytywnie reguluje poziom transkryptu i białka w HY5 [89].
AtBBX21	COP1 HY5	promuje	Bezpośrednio wiąże się do rejonu promotorowego genu *HY5* i pozytywnie reguluje jego transkrypcję [90, 93]. Ponadto, AtBBX21 reguluje aktywność HY5 na poziomie potranskrypcyjnym poprzez oddziaływanie i zakłócanie wiązania białka HY5 do rejonu promotorowego genu *ABI5* [39]. Oddziałuje z białkiem COP1 i hamuje jego aktywność.
AtBBX22	COP1 HY5	promuje	Oddziałuje z białkiem COP1 i na świetle hamuje jego aktywność. Ponadto, wchodzi w bezpośrednią interakcję z białkiem HY5. Pozytywnie reguluje poziom transkryptu i białka HY5, w konsekwencji prowadząc do hamowania wydłużenia hipokotylu i indukcji akumulacji antocyjanów [9].
AtBBX23	HY5 COP1	promuje	Oddziałuje z białkiem HY5, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania ekspresji genów związanych z wydłużaniem komórek i do aktywacji transkrypcji genów związanych z fotosyntezą [97]. Tymczasem interakcja z białkiem COP1 prowadzi do degradacji białka BBX23 w ciemności.

BIAŁKO BBX	PARTNER INTERAKCJI	EFEKT	ROLA BIAŁKA BBX
AtBBX24	COP1 HY5	tłumi	Bezpośrednio oddziałuje z białkiem COP1 wzmacniając jego funkcję, a także w wyniku ujemnego sprzężenia zwrotnego ulega za jego pośrednictwem degradacji [95]. Oddziałuje z białkiem HY5, uniemożliwiając jego wiązanie do rejonu promotorowego genu *CHS* [39].
AtBBX25	COP1 HY5 AtBBX24	tłumi	Bezpośrednio oddziałuje z białkiem COP1 wzmacniając jego funkcję, a także w wyniku ujemnego sprzężenia zwrotnego za jego pośrednictwem ulega degradacji. Hamuje aktywność białka HY5. Bezpośrednie oddziaływanie białka AtBBX25 i HY5 prowadzi do powstania nieaktywnego heterodimeru. Dodatkowo, AtBBX25 w kompleksie z białkiem AtBBX24 działa addytywnie na białko HY5, prowadząc do zahamowania jego aktywności w regulacji transkrypcji genu *AtBBX22* [28].
AtBBX28	COP1 HY5	tłumi	Tworzy heterodimer z białkiem HY5 i zapobiega wiązaniu HY5 do genów docelowych, takich jak *CHS*, *FHY1*. Ekspozycja na światło stabilizuje zarówno białko AtBBX28, jak i białko HY5 poprzez dezaktywację COP1 [54].
AtBBX32	AtBBX21	tłumi	Negatywnie reguluje aktywności białka HY5 poprzez bezpośrednią interakcję z białkiem AtBBX21 [34].

BIAŁKA BBX W PROCESIE KWITNIENIA

W ontogenezie roślin okrytonasiennych wyróżnić można dwa główne okresy: wegetatywny, podczas którego następuje różnicowanie się i wzrost rośliny oraz generatywny, w którym roślina nabiera zdolności do rozmnażania się, wytwarza kwiaty, a następnie nasiona. Przejście roślin z rozwoju wegetatywnego w generatywny jest procesem bardzo złożonym i w ostatnich latach bardzo intensywnie badanym [36]. U większości gatunków proces kwitnienia zależy od czynników środowiskowych, takich jak światło i temperatura [51]. Określone warunki temperaturowe i świetlne są impulsem indukcyjnym decydującym o przejściu tych roślin ze stanu wegetatywnego w generatywny.

Cykl życiowy wielu roślin powiązany jest z porami roku, których zmiana jest sygnalizowana przez zmieniające się dobowo warunki świetlne otoczenia. W toku ewolucji rośliny dostosowały wzrost i rozwój do okresowych zmian długości dnia i nocy. Ścisła regulacja czasu kwitnienia jest niezbędna do sukcesu reprodukcyjnego rośliny, umożliwiając zakończenie rozwoju nasion w sprzyjających warunkach środowiskowych [64].

Mechanizm fotoperiodycznej indukcji kwitnienia został najlepiej poznany i scharakteryzowany u *Arabidopsis thaliana* [2, 61, 72, 73]. Do kluczowych elementów mechanizmu regulacyjnego proces kwitnienia należą białka FT (ang. *FLOWERING LOCUS T*) i CO/BBX1 (ang. *CONSTANS*). Klasyczna koncepcja sugerowała istnienie przenośnego sygnału tzw. ”florigen”, który jest wytwarzany

w liściach i transportowany do merystemu wierzchołkowego pędu (SAM) w celu indukcji kwitnienia. Dalsze badania ujawniły, że białko FT u *Arabidopsis thaliana* jest kluczowym składnikiem tego mobilnego sygnału [65]. Wykazano, że w warunkach dnia długiego, dochodzi do indukcji ekspresji genu *FT* [2]. Białko FT jest syntetyzowane w komórkach towarzyszących łyka i transportowane do SAM przez elementy sitowe łyka. Biorąc pod uwagę niewielką masę cząsteczkową białka FT długo uważano, że może ono przenikać do elementów sita na drodze dyfuzji. Jednakże dalsze badania sugerowały istnienie specyficznego, zależnego od fotoperiodu mechanizmu, który umożliwiałby wydajne przemieszczanie białka FT do elementów sita. Ostatnie dane dowodzą, że bardziej prawdopodobny od dyfuzji biernej jest aktywny mechanizm transportu białka FT [22]. Znane są dwa czynniki, które odgrywają sekwencyjną, ale niezależną rolę w transporcie białka FT. Jednym z nich jest białko błonowe retikulum endoplazmatycznego, FTIP1 (ang. *FT-INTERACTING PROTEIN 1),* które reguluje przeniesienie białka FT z komórek towarzyszących łyka do elementów sitowych [55]. Drugim jest białko NaKR1 (ang. *SODIUM POTASSIUM ROOT DEFECTIVE*), które oddziałuje z białkiem FT i bierze udział w jego transporcie przez elementy sita do wierzchołków pędów [99]. W merystemie wierzchołkowym białko FT tworzy kompleks z czynnikiem transkrypcyjnym FD (ang. *FLOWERING LOCUS D*) i wspólnie aktywują ekspresję genów kodujących czynniki transkrypcyjne SPLs (ang. *SQUAMOSA BINDING PROTEINS LIKE*), które z kolei indukują transkrypcję genów tożsamości kwiatowej [1].

Białko AtBBX1 (CO/CONSTANS)

Pierwszym zidentyfikowanym i scharakteryzowanym genem należącym do rodziny BBX był gen *BBX1* z *A. thaliana* kodujący białko AtBBX1 (CO/CONSTANS). Badania wykazały, że białko AtBBX1 odgrywa ważną rolę w regulacji czasu kwitnienia i rozwoju kwiatów [83]. Ekspresja genu *AtBBX1* (*CO/CONSTANS)* na poziomie transkryptu i białka jest ściśle kontrolowana przez periodyczne następstwo okresów światła i ciemności (fotoperiod), rytm okołodobowy oraz liczne czynniki transkrypcyjne i białka regulatorowe. Najważniejszą funkcją białka CO jest promowanie transkrypcji genu *FT* (ang. *FLOWERING LOCUS T*), poprzez specyficzne wiązanie się domeny CCT białka CO do elementów *cis*-regulatorowych CORE (ang. *CO RESPONSIVE ELEMENTS*) i CCAAT-box obecnych w promotorze genu *FT*. Moduł CO-FT jest wysoce zachowawczy u różnych gatunków roślin [2]. Transkrypcyjna i potranslacyjna regulacja CO zapewnia odpowiednią kontrolę ekspresji genu *FT*. Indukowana przez światło transkrypcja genu *CO* możliwa jest dzięki interakcji dwóch białek: GI (ang. *GIGANTEA*) i FKF1 (ang. *FLAVIN BINDING KELCH REPEAT F-BOX1*), stanowiących kluczowe elementy zegara okołodobowego. Białka GI i FKF1 aktywują ekspresję genu *CO*,

która z kolei jest hamowana przez białka CDF1 i CDF2 (ang. *CYCLING DOF FACTORS 1 i 2*). Podczas dnia długiego, białka GI i FKF1 tworzą zależny od światła kompleks, który ubikwitynuje i kieruje białka CDFs na drogę degradacji proteasomalnej [2]. Potranslacyjna regulacja *CO*, również stanowi niezbędny element wpływający na kontrolę szlaku indukcji kwitnienia podczas długich i krótkich dni. Wykazano, że białko CO za pośrednictwem domeny CCT, wchodzi w interakcję z białkami COP1 i SPA1 (ang. *SUPPRESSOR PHYTOCHROME A 1*), co prowadzi do jego ubikwitynacji i degradacji przez proteasom 26S [37]. Aktywność tego kompleksu jest tłumiona przez światło, dzięki czemu degradacja białka CO zachodzi głównie w ciemności, podczas gdy silną akumulację białka CO odnotowuje się pod koniec długiego dnia [2]. Stabilizacja CO pod koniec długiego dnia jest możliwa dzięki działaniu PHYA (ang. *PHYTOCHROME A,* receptor dalekiego światła czerwonego) i CRY2 (ang. *CRYPTOCHROME 2*, receptor światła niebieskiego). Bezpośrednia interakcja między aktywowanym białkiem CRY2 a kompleksem SPA1/COP1 zmniejsza aktywność katalityczną COP1-SPA1 w świetle, w następstwie czego białko CO nie ulega efektywnej degradacji [100]. Białko PHYA również może blokować kompleks COP1-SPA1, jednakże mechanizm jego działania jest nieznany [70]. Ponadto, po południu białko FKF1 w odpowiedzi na światło niebieskie wiąże się z białkiem CO, zwiększając jego stabilność [74]. Z kolei rano, białko HOS1 (ang. *HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES 1*) będące ligazą ubikwityny, przyczynia się do degradacji białka CO. Prawdopodobnie interakcja białek HOS1 i CO odbywa się w sposób zależny od PHYB (ang. *PHYTOCHROME B*, receptor światła czerwonego) [49]. Fakt, że białko HOS1 łączy się z CO na początku dnia, a białka COP1 i SPA1 w nocy, dowodzą na istnienie odmiennych mechanizmów angażujących ligazy ubikwityny w celu regulacji ilość białka CO w ciągu doby.

Inne białka B-box zaangażowane w proces kwitnienia

Oprócz białka CO (AtBBX1/CONSTANS) u *A. thaliana* zidentyfikowano kilka innych białek należących do rodziny BBX, które również odgrywają kluczową rolę w regulacji czasu kwitnienia (Tab. 2). Wśród nich można wyróżnić białka wykazujące wysokie podobieństwo sekwencji do białka CO tzw. COL (ang. *CO-like*), takie jak AtBBX4/COL3 [81], AtBBX6/COL5 [31], AtBBX7/COL9 [12], AtBBX10/COL12 [60] i AtBBX17/COL8 [77] (Tab. 2).

BIAŁKA BBX A SYNDROM UNIKANIA CIENIA

Ponieważ rośliny wyższe są fotoautotrofami, konkurencja o światło jest cechą charakterystyczną dla zbiorowisk roślinnych. Aby wykryć i zareagować na obecność większych roślin w bliskim sąsiedztwie, rośliny unikające cienia dysponują rozmaitymi mechanizmami, które pomagają im przystosować swój wzrost i roz-

TABELA 2. Regulacja kwitnienia przy udziale białek BBX u *A. thaliana*
TABLE 2. Participation of BBX proteins in the regulation of flowering in *A. thaliana*

BIAŁKO BBX	EFEKT	ROLA BIAŁKA BBX
AtBBX4	tłumi	Opóźnia kwitnienie poprzez hamowanie ekspresji genu *FT*. Aby proces ten miał miejsce wymagana jest interakcja białka AtBBX4 z białkiem AtBBX32 [81].
AtBBX6	promuje	Zwiększa ekspresję genów *FT* i *SOC1* [31].
AtBBX7	tłumi	Hamuje ekspresję genu *CO*, tym samym wpływając na poziom akumulacji białka FT [12].
AtBBX10	tłumi	Zmniejsza aktywną pulę białka CO, co prowadzi do hamowania aktywacji transkrypcji genu *FT* [60].
AtBBX17	tłumi	Opóźnia kwitnienie poprzez hamowanie ekspresji genu *FT* [77].
AtBBX19	tłumi	Zmniejsza ilość białka CO, prowadząc do hamowania transkrypcji genu *FT* [84].
AtBBX24	promuje	Tłumi ekspresję genu *FLC* oraz aktywuje syntezę białek FT i SOC1. Może być również zaangażowany w regulację czasu kwitnienia za pośrednictwem etylenu lub brassinosteroidów [52].
AtBBX30	tłumi	Tworzy trimeryczny kompleks razem z białkiem CO i ko-represorem transkrypcji białkiem TPL, co prowadzi do zahamowania ekspresji genu *FT* i opóźnienia kwitnienia [30].
AtBBX31	tłumi	Tworzy trimeryczny kompleks razem z białkiem CO i ko-represorem transkrypcji białkiem TPL, co prowadzi do zahamowania ekspresji genu *FT* i opóźnienia kwitnienia [30].
AtBBX32	tłumi	Interakcja białka AtBBX32 z białkiem AtBBX4 umożliwia wiązanie AtBBX32 do rejonu promotorowego genu *FT*. W konsekwencji dochodzi do zahamowania transkrypcji genu *FT* [81].

wój do panujących warunków środowiska i umożliwiają skuteczne rywalizowanie z sąsiadami [5, 71]. Jednakże, do realizacji tego procesu niezbędna jest stała percepcja intensywności i jakości światła. Badania wykazały, że kiedy roślina jest zacieniona, zachodzi znacząca zmiana w proporcji między czerwienią a daleką czerwienią. Zmiany w stosunku ilości światła czerwonego (ang. *Red,* R) do dalekiej czerwieni (ang. *Far Red,* FR) są wykrywane przez fitochromy. W ciemności syntetyzowany jest fitochrom pochłaniający światło czerwone (Pr, maksimum absorpcji ok. 660 nm), który jest uważany za nieaktywny biologicznie. Pochłanianie kwantów światła czerwonego przez Pr powoduje jego fotokonwersję do postaci absorbującej dalekie czerwone światło (Pfr, maksimum absorpcji ok. 730 nm). Zmniejszony stosunek R:FR, prowadzący do stosunkowo niskich stężeń Pfr, jest uważany za kluczową oznakę światła odbijanego lub przechodzącego przez rośliny znajdujące się w najbliższym sąsiedztwie [26]. W odpowiedzi na sygnał o ni-

skim stosunku R:FR, będącym zapowiedzią przyszłej konkurencji, wiele roślin zwiększa tempo wzrostu wydłużania łodyg i ogonków liściowych, często kosztem rozwoju liści i organów spichrzowych. Takie reakcje, zwane syndromem unikania cienia (ang. *SHADE AVOIDANCE RESPONSE*, SAR), służą do unoszenia liści w kierunku światła dziennego i zapewniają przetrwanie w szybko rosnących populacjach [7]. Badania molekularne nad zjawiskiem SAR u *A. thaliana* dowodzą na istnienie dwóch odrębnych strategii w reakcji unikania cienia. Pierwsza, określana jako „detekcja sąsiada", charakteryzuje się indukcją zwiększonej syntezy auksyn, ich akumulacją i transportem oraz transdukcją sygnału auksynowego sprzężoną z up-regulacją kilu genów kodujących czynniki transkrypcyjne i aktywacją wielu szlaków hormonalnych [45]. Ta strategia molekularna jest czymś w rodzaju „sygnału ostrzegawczego", który szybko się włącza i wyłącza, w zależności od intensywności światła docierającego do rośliny, co wpływa na stabilność ujemnego regulatora SAR, białka HRF1/SICS1 (ang. *HYPOCOTYL IN FAR RED 1*/SLENDER IN CANOPY SHADE *1)* [32]. Druga strategia, zwana „cieniem baldachimu" następuje nieco później i częściowo pokrywa się ze strategią „detekcji sąsiada". To długoterminowe podejście ma na celu umożliwienie aklimatyzacji roślin do nowych warunków środowiskowych, które charakteryzują się zmniejszoną efektywnością energii docierającej do roślin w postaci światła [32, 63]. Wykazano, że w regulację tego programu również jest zaangażowana sygnalizacja auksynowa, prawdopodobnie poprzez zmianę wrażliwości roślin na auksyny.

Istnieją dowody wskazujące, że niektóre białka BBX u *A. thaliana* należące do grupy IV są zaangażowane w mechanizm unikania cienia. Wykazano, że białka AtBBX21 i AtBBX22 biorące udział w szlaku sygnałowym COP1 [16], pozytywnie regulują ekspresję wczesnych negatywnych regulatorów SAR, takich jak PAR1 (ang. *PHYTOCHROME RAPIDLY REGULATED 1*), PIL1 (ang. *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE 1)*, HFR1 (ang. *LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED 1*) i HD-ZIP protein 4 (ang. *HOMEOBOX-LEUCINE ZIPPER PROTEIN HAT4*) w krótkotrwałym cieniu [16]. Co ciekawe, białko AtBBX21 negatywnie reguluje SAR w długotrwałym cieniu, poprzez zmniejszanie ekspresji szeregu genów zaangażowanych w szlaki hormonalne etylenu, brassinosteroidów i auksyny [16, 17]. Z kolei białko AtBBX16, gromadzi się w sposób zależny od aktywnego Pfr i reguluje reakcję unikania cienia poprzez tłumienie sygnalizacji auksynowej [86]. Inne białko AtBBX24 promuje SAR poprzez bezpośrednie oddziaływanie z białkiem GAI (ang. *GIBBERELLIC ACID-INSENSITIVE*), co prowadzi do zniesienia represji genu *PIF4*. PIF4 jest ważnym integratorem sygnałów środowiskowych i hormonalnych, a także promuje SAR, wiążąc się z domeną G-box w promotorze genów wrażliwych na zacienienie [18]. Co więcej wykazano, że białka BBX24 i BBX25 wspólnie promują wzrost hipokotylu u *A. thaliana* w cieniu w sposób zależny od białka COP1 [28].

UDZIAŁ BIAŁEK BBX W SZLAKACH HORMONALNYCH

Niektórzy członkowie rodziny genów *BBX* u *A. thaliana* odgrywają ważną rolę w szlakach sygnalizacji hormonalnej (Tab. 3) [82]. W rejonach promotorowych tych genów, stwierdzono obecność jednego lub kilku elementów *cis*-regulatorowych związanych z odpowiedzią roślin na działanie fitohormonów.

KWAS ABSCYSYNOWY (ABA)

Do tej pory funkcję BBX w sygnalizacji ABA określono dla trzech białek BBX u *A. thaliana*, takich jak BBX1/CO, BBX5/COL4 i BBX21/STH2. Badania wykazały, że podczas suszy białko BBX1 pośredniczy w indukowanej przez ABA aktywacji transkrypcyjnej genu *FT*, promując indukcję kwitnienia [67]. Co więcej udowodniono, że białko ABI3 (ang. *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3*) oddziałuje z domeną CCT w białku BBX1, jednakże biologiczne znaczenie tej interakcji nie zostało jeszcze poznane. Min i in. [58] wykazali, że ekspresja genu *BBX5* u *A. thaliana* jest indukowana w odpowiedzi na ABA, zasolenie i stres osmotyczny. Autorzy ujawnili, że mutant *bbx5* charakteryzuje się zwiększoną wrażliwością na ABA i zasolenie podczas kiełkowania i zazieleniania liścieni, podczas gdy rośliny z nadekspresją genu *BBX5* są mniej wrażliwe na działanie kwasu abscysynowego i wysokie stężenie soli [58]. Co ciekawe, w obecności ABA lub 150 mN NaCl odnotowano silna akumulację transkryptu genów związanych z biosyntezą ABA i odpowiedzią na stres u roślin z nadekspresją *BBX5* w porównaniu do mutantów *bbx5*. Inne białko, BBX21, uczestniczy w kontroli kiełkowania nasion zależnej od ABA, poprzez bezpośrednią interakcję z białkiem HY5 i ABI5 (ang. ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3). Wykazano, że białko BBX21 negatywnie reguluje ekspresję genu *ABI5*, zakłócając wiązanie się czynnika transkrypcyjnego HY5 do rejonu promotorowego genu *ABI5* [91]. Ponadto, białko BBX21 również jest negatywnym regulatorem indukcji ekspresji genu *ABI3* [91].

GIBERELINY (GA)

Gibereliny należą do fitohormonów, które wywierają ogromny wpływ na procesy wzrostu i dojrzewania roślin, takie jak kiełkowanie nasion, wydłużanie hipokotyli i międzywęźli, indukcja kwitnienia, rozwój kwiatów oraz dojrzewanie owoców. Jak dotąd, zidentyfikowano kilka białek BBX, które są zaangażowane w szlak giberelinowy. Białko BBX18 u *A. thaliana* promuje wydłużanie hipokotylu w warunkach światła niebieskiego poprzez zwiększenie poziomu bioaktywnych GA [88]. Analiza ekspresji genów odpowiedzialnych za metabolizm GA wykazała, że białko BBX18 hamuje transkrypcję genu kodującego oksydazę *GA2ox1* i *GA2ox8*, a indukuje ekspresję genu kodującego dioksygenazę *GA3ox1* i oksydazę *GA20ox1* w świetle niebieskim [88]. Następnie udowodniono, że podjednostka β białka G, AGB1, która odgrywa istotną rolę w rozwoju hipokotylu, wchodzi w bezpośrednią interakcję z białkiem BBX21 u *A. thaliana*. Związanie AGB1

z C-końcowym rejonem białka BBX21, prowadzi do zahamowania ekspresji genu *BBX21* oraz jego genów docelowych, w tym genu *GA2ox1* [92]. Dalsze badania dowiodły, że dwa białka CO/AtBBX1 i AtBBX24 mogą oddziaływać z białkami DELLA, które są głównymi negatywnymi regulatorami sygnalizacji GA [15, 85].

TABELA 3. Udział białek AtBBX w szlakach sygnalizacji fitohormonów
TABLE 3. Participation of AtBBX proteins in phytohormone signaling pathways

BIAŁKO BBX	HORMON	ROLA BIAŁKA BBX
AtBBX1	Kwas abscysynowy	Białko AtBBX1 pośredniczy w indukowanej przez ABA aktywacji ekspresji genu *FT* w warunkach stresu suszy [67].
	Gibereliny	Oddziałuje z białkami DELLA [85], które są głównymi represorami sygnalizacji GA [21].
	Kwas salicylowy	Oddziałuje z białkiem TGA4, które odgrywa kluczową rolę w indukowanej SA ekspresji białek związanych z patogenezą [75].
AtBBX5	Kwas abscysynowy	Poziom akumulacji białka AtBBX5 zwiększa się pod wpływem ABA, w odpowiedzi na stres solny, osmotyczny i odwodnienie [58].
AtBBX16	Auksyna	Aktywuje ekspresję genu *SUR2* kodującego supresor biosyntezy auksyny, a tym samym ogranicza przekazywanie sygnałów za pośrednictwem auksyny podczas odpowiedzi unikania cienia [86, 98].
AtBBX18	Gibereliny	Przeciwdziała zależnemu od niebieskiego światła tłumieniu wydłużania hipokotylu poprzez zwiększanie ilości GA [88].
AtBBX20	Brassinosteroidy	Wykazuje zwiększoną ekspresję w warunkach niedoboru BR i jest hamowany przez BZR1, główne białko sygnałowe BR zaangażowane w represje fotmorfogenezy w ciemności [76].
AtBBX21	Kwas abscysynowy	Jest ważnym czynnikiem łączącym ścieżki sygnałowe światła i ABA. Reguluje szlak sygnalizacji kwasu abscysynowego poprzez interakcję z białkiem HY5 (główny pozytywny regulator ścieżki świetlnej) i ABI5 (centralny pozytywny regulator szlaków sygnałowych ABA) [91].
	Gibereliny	Aktywuje gen katabolizmu giberelin *GA2ox1* [92].
	Etylen Auksyny Brassinosteroidy	Zmniejsza ekspresję szeregu genów zaangażowanych w szlaki hormonalne etylenu, brassinosteroidów i auksyny [16].
AtBBX24	Gibereliny	Wchodzi w bezpośrednią interakcję z białkiem GAI (ujemny regulator sygnalizacji GA), promując indukowane giberelinami wydłużanie komórek [18].
AtBBX28	Etylen	Jego ekspresja indukowana jest przez etylen za pośrednictwem czynnika transkrypcyjnego EIN3, który działa jako pozytywny regulator w szlaku odpowiedzi etylenu [10].
AtBBX32	Kwas jasmonowy	W odpowiedzi na zranienie roślin, ekspresja genu *BBX32* za pośrednictwem OPDA (prekursor JA) zwiększa się [53].

ROLA BIAŁEK BBX W ODPOWIEDZI ROŚLIN NA STRESY

Oprócz funkcji białek BBX w procesach rozwojowych u roślin, uczestniczą one także w odpowiedzi na stresy środowiskowe. Analizy transkryptomiczne wykazały podwyższony poziom transkryptu dla wielu genów *BBX* w odpowiedzi na różne stresy abiotyczne, takie jak chłód, susza i zasolenie. Ponadto odnotowano, że nadekspresja niektórych genów *BBX* prowadzi do zwiększenia tolerancji na niektóre stresy. U *A. thaliana* białko BBX24, bierze udział w sygnalizacji stresu solnego. Pomimo, że ekspresja genu *BBX24* nie jest indukowalna stresem solnym, u roślin z nadekpresją genu *BBX24* stwierdzono podwyższoną tolerancję na zasolenie w porównaniu z roślinami typu dzikiego [59]. Wykorzystując drożdżowy system dwuhybrydowy, zidentyfikowano białko HPPBF-1 (ang. *H-PROTEIN PROMOTER BINDING FACTOR-1*), które bezpośrednio oddziałuje z białkiem BBX24 i którego ekspresja jest indukowana stresem solnym. Co więcej wykazano, że białko HPPBF-1 jest czynnikiem transkrypcyjnym typu MYB, który wiąże się specyficznie do rejonu promotorowego genów zaangażowanych w odpowiedź na stres solnym [59]. Natomiast u gatunku uprawnego *Solanum tubersoum* udowodniono, że ekspresja genu *BBX24* jest indukowana w odpowiedzi na zasolenie [42]. Co więcej, ekspresja genu *BBX24* pod wpływem zasolenia jest zależna od pory dnia, w której rośliny poddano działaniu czynnika stresowego [42]. Dalsze badania wykazały, że inne białko, AtBBX18, pełni negatywną rolę w tolerancji roślin na stres cieplny. Wykazano, że rośliny *A. thaliana* z nadekspresją genu *BBX18* mają zmniejszoną odporność na wysoką temperaturę [87].

BIAŁKA BBX A ZEGAR OKOŁODOBOWY

Większość procesów zachodzących w organizmach żywych ewoluuje w sposób cykliczny. Rytmiczny przebieg zjawisk jest wynikiem adaptacji organizmów do periodycznie zmieniających się warunków panujących na Ziemi. U roślin, synchronizacja cyklu rozwojowego z cyklicznymi zmianami w środowisku jest możliwa dzięki wykształceniu endogennego mechanizmu zegara biologicznego, który generuje rytmy o okresie ~ 24-godzinnym. Ponieważ ekspresja prawie 1/3 genów u *Arabidopsis thaliana* jest kontrolowana na poziomie transkryptu przez zegar okołodobowy, można przypuszczać, że zegar biologiczny koordynuje prawie wszystkie procesy życiowe zachodzące na poziomie fizjologicznym, metabolicznym i molekularnym, dopasowując je do dziennych oraz sezonowych zmian w środowisku [41].

Wiele genów, których ekspresja jest kontrolowana przez zegar biologiczny, koduje białka zawierające domenę palca cynkowego typu B-box [35, 42, 46, 78]. W regionach promotorowych tych genów, stwierdzono obecność specyficznych

cis-elementów 'CAANNNNATC' związanych z okołodobową regulacją [62, 78]. Przy zastosowaniu drożdżowego systemu jednohybrydowego zidentyfikowano białko StZPR1 należące do rodziny palca cynkowego typu C_4, które wiąże się do motywu 'CAACAGCATC' określonego terminem CIRC (ang. *Circadian Regulated*) w promotorze genu *StBBX24* u uprawnego gatunku *Solanum tuberosum* [43]. Dalsze badania wykazały, że w roślinach transgenicznych *S. tuberosum* z wyłączoną ekspresją genu *StZPR1* następuje zakłócenie okołodobowej oscylacji niektórych genów *BBX*, takich jak *StBBX24, StBBX5*, *StBBX9*, *StBBX18* i *StBBX27* [43].

PODSUMOWANIE I PERSPEKTYWY

Pomimo, że w ciągu ostatnich lat odnotowano znaczny postęp w poznaniu funkcji białek B-box w procesach wzrostu i rozwoju roślin, jak również w reakcji roślin na stresy, fizjologiczna rola wielu białek B-box oraz molekularne mechanizmy ich działania, nadal pozostają niewiadomą.

Do tej pory udowodniono, że czynniki transkrypcyjne z rodziny BBX są ważnymi regulatorami wielu procesów rozwojowych u roślin, jak wykazała analiza szeregu mutantów. Liczne dane wskazują również, że ekspresja wielu genów *BBX* jest indukowana bądź ulega zmianie w obliczu stresu, a ponadto białka BBX mogą uczestniczyć w tolerancji roślin na różne czynniki stresowe.

Poznanie partnerów białkowych, z którymi białka B-box oddziałują w różnych warunkach w cyklu okołodobowym oraz identyfikacja kluczowych regulatorów ich transkrypcji, pozwoli zgłębić wiedzę odnośnie molekularnych zależności między strukturą i funkcją tej rodziny białek, jak również poznać nowe elementy szlaków sygnałowych generowanych przez zegar biologiczny z ich udziałem.

PODZIĘKOWANIA

Projekt badawczy finansowany przez Narodowe Centrum Nauki nr 2018/29/B/NZ9/01457.

LITERATURA

[1] ABE M, KOSAKA S, SHIBUTA M, NAGATA K, UEMURA T, NAKANO A, KAYA H. Transient activity of the florigen complex during the floral transition in *Arabidopsis thaliana*. *Dev* 2019; **146**: dev171504.

[2] ANDRÉS F, COUPLAND G. The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nat Rev Genet* 2012; **13**: 627-639.

[3] ARMAREGO-MARRIOTT T, SANDOVAL-IBAÑEZ O, KOWALEWSKA Ł. Beyond the darkness: recent lessons from etiolation and de-etiolation studies. *J Exp Bot 2019;* **71**: 1215-1225.
[4] BAI B, LU N, LI Y, GUO S, YIN H, HE Y, SUN W, LI W, XIE X. OsBBX14 promotes photomorphogenesis in rice by activating OsHY5L1 expression under blue light conditions. *Plant Sci* 2019; **284**: 192-202.BALLARÉ CL, PIERIK R. The shade-avoidance syndrome: multiple signals and ecological consequences. *Plant Cell Environ 2017;* **40***:* 2530-2543.
[5] CAO Y, HAN Y, MENG D, LI D, JIAO C, JIN Q, LIN Y, CAI Y. B-BOX genes: genome-wide identification, evolution and their contribution to pollen growth in pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.). *BMC Plant Biol* 2017; **17**: 156.
[6] CASAL JJ. Photoreceptor signaling networks in plant responses to shade. *Annu Rev Plant Biol* 2013; **64**: 403-427.
[7] CHAIWANON J, WANG W, ZHU J-Y, OH E, WANG Z-Y. Information integration and communication in plant growth regulation. *Cell* 2016; **164**: 1257-1268.
[8] CHANG CS, MALOOF JN, WU SH. COP1-mediated degradation of BBX22/LZF1 optimizes seedling development in Arabidopsis. *Plant Physiol* 2011; **156**: 228-239.
[9] CHANG KN, ZHONG S, WEIRAUCH MT, HON G, PELIZZOLA M, LI H, HUANG SS, SCHMITZ RJ, URICH MA, KUO D, NERY JR, QIAO H, YANG A, JAMALI A, CHEN H, IDEKER T, REN B, BAR-JOSEPH Z, HUGHES TR, ECKER JR. Temporal transcriptional response to ethylene gas drives growth hormone cross-regulation in Arabidopsis. *Elife* 2013; **2**: e00675.
[10] CHEN M, CHORY J. Phytochrome signaling mechanisms and the control of plant development. *Trends Cell Biol* 2011; **21**: 664-671.
[11] CHENG XF, WANG ZY. Overexpression of COL9, a CONSTANS-LIKE gene, delays flowering by reducing expression of *CO* and *FT* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2005; **43**: 758-768.
[12] CHRISTIE JM, BLACKWOOD L, PETERSEN J, SULLIVAN S. Plant flavoprotein photoreceptors. *Plant Cell Physiol* 2015; **56**: 401-413.
[13] CHU Z, WANG X, LI Y, YU H, LI J, LU Y, LI H, OUYANG B. Genomic organization, phylogenetic and expression analysis of the B-box gene family in tomato. *Front Plant Sci* 2016; **7**: 1552.
[14] CROCCO CD, BOTTO JF. BBX proteins in green plants: insights into their evolution, structure feature and functional diversification. *Gene* 2013; **531**: 44-52.
[15] CROCCO CD, HOLM M, YANOVSKY MJ, BOTTO JF. AtBBX21 and COP1 genetically interact in the regulation of shade avoidance. *Plant J* 2010; **64**: 551-562.
[16] CROCCO CD, HOLM M, YANOVSKY MJ, BOTTO JF. Function of B-BOX under shade. *Plant Signal Behav* 2011; **6**: 101-104.
[17] CROCCO CD, LOCASCIO A, ESCUDERO CM, ALABADI D, BLAZQUEZ MA AND BOTTO JF. The transcriptional regulator BBX24 impairs DELLA activity to promote shade avoidance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Commun* 2015; **6**: 6202.
[18] DATTA S, HETTIARACHCHI GH, DENG XW, HOLM M. Arabidopsis CONSTANS- LIKE3 is a positive regulator of red light signaling and root growth. *Plant Cell* 2006; **18**: 70-84.
[19] DATTA S, JOHANSSON H, HETTIARACHCHI C, IRIGOYEN ML, DESAI M, RUBIO V, HOLM M. LZF1/SALT TOLERANCE HOMOLOG3, an Arabidopsis B-box protein involved in light-dependent development and gene expression, undergoes COP1 mediated ubiquitination. *Plant Cell* 2008; **20**: 2324-2338.
[20] DAVIÈRE J-M, ACHARD P. A pivotal role of DELLAs in regulating multiple hormone signals. *Mol Plant* 2016; **9**: 10-20.
[21] ENDO M, YOSHIDA M, SASAKI Y, NEGISHI K, HORIKAWA K, DAIMON Y, KUROTANI K-I, NOTAGUCHI M, ABE M, ARAKI T. Re-Evaluation of florigen transport kinetics with separation of functions by mutations that uncouple flowering initiation and long-distance transport. *Plant Cell Physiol* 2018; **59**: 1621-1629.
[22] EOM KS, CHEONG JS, LEE SJ. Structural analyses of zinc finger domains for specific interactions with DNA. *J Microbiol Biotechnol* 2016; **26**: 2019-2029.

[23] FAN XY, SUN Y, CAO DM, BAI MY, LUO XM,YANG HJ, WEI CQ, ZHU SW, SUN Y, CHONG K, WANG ZY. BZS1, a B-box protein, promotes photomorphogenesis downstream of both brassinosteroid and light signaling pathways. *Mol Plant* 2010; **5**: 591-600.

[24] FONT J, MACKAY JP. Beyond DNA: zinc finger domains as RNA-binding modules. *Methods Mol Biol* 2010; **649**: 479-491.

[25] FRASER DP; HAYES S; FRANKLIN KA. Photoreceptor crosstalk in shade avoidance. *Curr Opin Plant Biol* 2016; **33**: 1-7.

[26] GANGAPPA SN, BOTTO JF. The BBX family of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* 2014; **19**: 460-470.

[27] GANGAPPA SN, CROCCO CD, JOHANSSON H, DATTA S, HETTIARACHCHI C, HOLM M, BOTTO JF. The Arabidopsis B-BOX protein BBX25 interacts with HY5, negatively regulating BBX22 expression to suppress seedling photomorphogenesis. *Plant Cell* 2013; **25**: 1243-1257.

[28] GENDRON JM, PRUNEDA-PAZ JL, DOHERTY CJ, GROSS A.M., KANG SE, KAY SA. Arabidopsis circadian clock protein, TOC1, is a DNA-binding transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; **109**: 3167-3172.

[29] GRAEFF M, STRAUB D, EGUEN T, DOLDE U, RODRIGUES V, BRANDT R, WENKEL S. MicroProtein-mediated recruitment of CONSTANS into a TOPLESS trimeric complex represses flowering in Arabidopsis. *PLoS Genet* 2016; **12**: e1005959.

[30] HASSIDIM M, HARIR Y, YAKIR E, KRON I, GREEN MR. Over-expression of CONSTANS-LIKE 5 can induce flowering in short-day grown Arabidopsis. *Planta* 2009; **230**: 481-491.

[31] HERSCH M, LORRAIN S, DE WIT M, TREVISAN M, LJUNG K, BERGMANN S, FANKHAUSER C. Light intensity modulates the regulatory network of the shade avoidance response in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; **111**: 6515-6520.

[32] HOLM M, MA LG, QU LJ, DENG XW. Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in Arabidopsis. *Genes Dev* 2002; **16**: 1247-1259.

[33] HOLTAN HE, BANDONG S, MARION CM, ADAM L, TIWARI S, SHEN Y, MALOOF JN, MASZLE DR, OHTO M, PREUSS A, MEISTER R, PETRACEK M, REPETTI PP, REUBER TL, RATCLIFFE OJ, KHANNA R. BBX32, an Arabidopsis B-Box protein, functions in light signaling by suppressing HY5-regulated gene expression and interacting with STH2/BBX21. *Plant Physiol* 2011; **156**: 2109-2123.

[34] HUANG J, ZHAO X, WENG X, WANG L, XIE W. The rice B-box zinc finger gene family: genomic identification, characterization, expression profiling and diurnal analysis. *PLoS One* 2012; **7**: 15-17.

[35] HUIJSER P, SCHMID M. The control of developmental phase transitions in plants. *Dev* 2011; **138**: 4117-4129.

[36] JANG S, MARCHAL V, PANIGRAHI K, WENKEL S, SOPPE W, DENG XW, VALVERDE F, COUPLAND G. Arabidopsis COP1 shapes the temporal pattern of CO accumulation conferring a photoperiodic flowering response. *EMBO J* 2008; **27**: 1277-1288.

[37] JIN J, TIAN F, YANG DC, MENG YQ, KONG L, LUO J, GAO G. Plant TFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. *Nucleic Acids Res* 2017; **45**: D1040-D1045.

[38] JOB N, YADUKRISHNAN P, BURSCH K, DATTA S, JOHANSSON H. Two B-box proteins regulate photomorphogenesis by oppositely modulating HY5 through their diverse C-terminal domains. *Plant Physiol* 2018; **176**: 2963-2976.

[39] KHANNA R, KRONMILLER B, MASZLE DR, COUPLAND G, HOLM M, MIZUNO T, WU SH. The Arabidopsis B-box zinc finger family. *Plant Cell* 2009; **21**: 3416-3420.

[40] KIEŁBOWICZ-MATUK A, CZARNECKA J. Interplays of plant circadian clock and abiotic stress response network. *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance. Volume 1-Biological Techniques, 1st Edition, Elsevier* 2014; **20**: 487-506.

[41] KIEŁBOWICZ-MATUK A, REY P, RORAT T. Interplay between circadian rhythm, time of the day and osmotic stress constraints in the regulation of the expression of a Solanum Double B-box gene. *Ann Bot* 2014; **113**: 831-842.
[42] KIEŁBOWICZ-MATUK A, CZARNECKA J, BANACHOWICZ E, REY P, RORAT T. *Solanum tuberosum* ZPR1 encodes a light-regulated nuclear DNA-binding protein adjusting the circadian expression of *StBBX24* to light cycle. *Plant Cell Environ* 2017; **40**: 424-440.
[43] KLUSKA K, ADAMCZYK J, KRĘŻEL A. Metal binding properties, stability and reactivity of zinc fingers. *Coord Chem Rev* 2018; **367**: 18-64.
[44] KOHNEN MV, SCHMID-SIEGERT E, TREVISAN M, PETROLATI LA, SENECHAL F, MULLER-MOULE P, MALOOF J, XENARIOS I, FANKHAUSER C. Neighbor detection induces organ-specific transcriptomes, revealing patterns underlying hypocotyl-specific growth. *Plant Cell* 2016; **28**: 2889-2904.
[45] KUMAGAI T, ITO S, NAKAMICHI N, NIWA Y, MURAKAMI M, YAMASHINO T, MIZUNOT. The common function of a novel subfamily of B-box zinc finger proteins with reference to circadian-associated events in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008; **72**: 1539-1549.
[46] KUSHWAHA AK, RAMACHANDRAN H, JOB N. The B-box bridge between light and hormones in plants. *J Photochem Photobiol B* 2018; **191**: 164-174.
[47] LAU OS, DENG XW. The photomorphogenic repressors COP1 and DET1: 20 years later. *Trends Plant Sci* 2012; **17**: 584-593.
[48] LAZARO A, VALVERDE F, PINEIRO M, JARILLO JA. The Arabidopsis E3 ubiquitin ligase HOS1 negatively regulates CONSTANS abundance in the photoperiodic control of flowering. *Plant Cell* 2012; **24**: 982-999.
[49] LEGRIS M, NIETO C, SELLARO R, PRAT S, CASAL JJ. Perception and signalling of light and temperature cues in plants. *Plant J* 2017; **90**: 683-69.
[50] LI L, LI X, LIU Y, LIU H. Flowering responses to light and temperature. *Sci China Life Sci* 2016; 59: 403-408.
[51] LI F, SUN J, WANG D, BAI S, CLARKE AK, HOLM M. The B-box family gene STO (BBX24) in *Arabidopsis thaliana* regulates flowering time in different pathways. *PLoS One* 2014; **9**: e87544.
[52] LIBAULT M, WAN J, CZECHOWSKI T, UDVARDI M, STACEY G. Identification of 118 Arabidopsis transcription factor and 30 ubiquitin-ligase genes responding to chitin, a plant-defense elicitor. *Mol Plant Microbe Interact* 2007; **20**: 900-911.
[53] LIN F, JIANG Y, LI J, YAN T, FAN L, LIANG J, CHEN ZJ, XU D, DENG XW. B-BOX DOMAIN PROTEIN 28 negatively regulates photomorphogenesis by repressing the activity of transcription factor HY5 and undergoes COP1-mediated degradation. *Plant Cell* 2018; **30**: 2006-2019.
[54] LIU L, LIU C, HOU X, XI W, SHEN L, TAO Z, WANG Y, YU H. FTIP1 is an essential regulator required for florigen transport. *PLoS Biol* 2012; **10**: e1001313.
[55] LIU LJ, ZHANG YC, LI QH, SANG Y, MAO J, LIAN HL, WANG L, YANG HQ. COP1-mediated ubiquitination of CONSTANS is implicated in cryptochrome regulation of flowering in Arabidopsis. *Plant Cell* 2008; **20**: 292-306.
[56] MAZUR MJ, KWAAITAAL M, MATEOS MA, MAIO F, KINI RK, PRINS M, VAN DEN BURG HA. The SUMO conjugation complex self-assembles into nuclear bodies independent of SIZ1 and COP1. *Plant Physiol* 2019; **179**: 168-183.
[57] MIN JH, CHUNG JS, LEE KH, KIM CS. The CONSTANS-like 4 transcription factor, AtCOL4, positively regulates abiotic stress tolerance through an abscisic acid-dependent manner in Arabidopsis. *J Integr Plant Biol* 2015; **57**: 313-324.
[58] NAGAOKA S, TAKANO T. Salt tolerance-related protein STO binds to a Myb transcription factor homologue and confers salt tolerance in Arabidopsis. *J Exp Bot* 2003; **54**: 2231-2237.
[59] ORDONEZ-HERRERA N, TRIMBORN L, MENJE M, HENSCHEL M, ROBERS L, KAUFHOLDT D, HANSCH R, ADRIAN J, PONNU J, HOECKER U. The transcription factor COL12 is a substrate

of the COP1/SPA E3 ligase and regulates flowering time and plant architecture. *Plant Physiol* 2018; **176**: 1327-1340.

[60] PAJORO A, BIEWERS S, DOUGALI E, LEAL VALENTIM F, MENDES MA, PORRI A,COUPLAND G, VAN DE PEER Y, VAN DIJK AD, COLOMBO L, DAVIES B, ANGENENT GC. The (r)evolution of gene regulatory networks controlling Arabidopsis plant reproduction: a two-decade history. *J Exp Bot* 2014; **65**: 4731-4745.

[61] PIECHULLA B, MERFORTH N, RUDOLPH B. Identification of tomato Lhc promoter regions necessary for circadian expression. *Plant Mol Biol* 1998; **38**: 655-662.

[62] PUCCIARIELLO O, LEGRIS M, COSTIGLIOLO ROJAS C, IGLESIAS MJ, HERNANDO CE, DEZAR C, VAZQUEZ M, YANOVSKY MJ, FINLAYSON SA, PRAT S, CASAL J. Rewiring of auxin signaling under persistent shade. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018; **115**: 5612-5617.

[63] PURUGGANAN MD, FULLER DQ. The nature of selection during plant domestication. *Nature* 2009; **457**: 843-848.

[64] PUTTERILL J, VARKONYI-GASIC E. FT and florigen long-distance flowering control in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2016; **33**: 77-82.

[65] QI Q, GIBSON A, FU X, ZHENG M, KUEHN R, WANG Y, WANG Y, NAVARRO S,MORRELL JA, JIANG D, SIMMONS G, BELL E, IVLEVA NB, MCCLERREN AL, LOIDA P, RUFF TG, PETRACEK ME, PREUSS SB. Involvement of the N-terminal B-box domain of Arabidopsis BBX32 protein in interaction with soybean BBX62 protein. *J Biol Chem* 2012; **287**: 31482-31493.

[66] RIBONI M, TEST AR, GALBIATI M, TONELLI C, CONTI L. ABA-dependent control of GIGANTEA signalling enables drought escape via up-regulation of FLOWERING LOCUS T in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 2016; **67**: 6309-6322.

[67] RIZZINI L, FAVORY J, CLOIX C, FAGGIONATO D, O'HARA A, KAISERLI E, BAUMEISTER R, SCHÄFER E, NAGY F, JENKINS IG, ULM R. Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. *Science* 2011; **332**: 103-106.

[68] ROBSON F, COSTA MM, HEPWORTH SR, VIZIR I, PIÑEIRO M, REEVES PH, PUTTERILL J, COUPLAND G. Functional importance of conserved domains in the flowering time gene CONSTANS demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants. *Plant J* 2001; **28**: 619-631.

[69] SAIJO Y, ZHU D, LI J, RUBIO V, ZHOU Z, SHEN Y, HOECKER U, WANG H, DENG XW. Arabidopsis COP1/SPA1 complex and FHY1/FHY3 associate with distinct phosphorylated forms of phytochrome A in balancing light signaling. *Mol Cell* 2008; **31**: 607-613.

[70] SESSA G, CARABELLI M, POSSENTI M, MORELLI G, RUBERTI I. Multiple pathways in the control of the shade avoidance response. *Plants (Basel)* 2018; **7**: 102.

[71] SHIM JS, IMAIZUMI T. Circadian clock and photoperiodic response in Arabidopsis: from seasonal flowering to redox homeostasis. *Biochem* 2015; **54**: 157-170.

[72] SONG H, SHIM JS, KINMONTH-SCHULTZ1 HA, IMAIZUMI T. Photoperiodic flowering: time measurement mechanisms in leaves. *Annu Rev Plant Biol* 2015; **66**: 441-464.

[73] SONG YH, SONG NY, SHIN SY, KIM HJ, YUN DJ, LIM CO, LEE SY, KANG KY, HONG JC. Isolation of CONSTANS as a TGA4/OBF4 interacting protein. *Mol Cells* 2008; **25**: 559-565.

[74] SONG YH, SMITH RW, TO BJ, MILLAR AJ, IMAIZUMI T. FKF1 conveys timing information for CONSTANS stabilization in photoperiodic flowering. *Science* 2012; **336**: 1045-1049.

[75] SUN Y, FAN XY, CAO DM, TANG W, HE K, ZHU JY, HE JX, BAI MY, ZHU S, OH E, PATIL S, KIM TW, JI H, WONG WH, RHEE SY, WANG ZY. Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in Arabidopsis. *Dev Cell* 2010; **19**: 765-777.

[76] TAKASE T, KAKIKUBO Y, NAKASONE A, NISHIYAMA Y, YASUHARA M, TOKIOKA-ONO Y, KIYOSUE T. Characterization and transgenic study of CONSTANS-LIKE8 (COL8) gene in *Arabidopsis thaliana*: expression of 35S:COL8 delays flowering under long-day conditions. *Plant Biotechnol* 2011; **28**: 439-446.

[77] TALAR U, KIEŁBOWICZ-MATUK A, CZARNECKA J, RORAT T. Genome-wide survey of B-box proteins in potato (*Solanum tuberosum*) – identification, characterization and expression patterns during diurnal cycle, etiolation and de-etiolation. *PLoS One* 2017; **12**: e0177471.

[78] TIAN F, YANG DC, MENG YQ, JIN JP, GAO G. PlantRegMap: charting functional regulatory maps in plants. *Nucleic Acids Res 2019;* **48**: D1104-D1113.

[79] TIWARI SB, SHEN Y, CHANG HC, HOU Y, HARRIS A, MA SF, MCPARTLAND M, HYMUS GJ, ADAM L, MARION C, BELACHEW A, REPETTI PP, REUBER TL, RATCLIFFE OJ. The flowering time regulator CONSTANS is recruited to the FLOWERING LOCUS T promoter via a unique *cis*-element. *New Phytol* 2010; **187**: 57-66.

[80] TRIPATHI P, CARVALLO M, HAMILTON EE, PREUSS S, KAY SA. Arabidopsis B-BOX32 interacts with CONSTANS-LIKE3 to regulate flowering. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; **114**: 172-177.

[81] VAISHAK KP, YADUKRISHNAN P, BAKSHI S, KUSHWAHA AK, RAMACHANDRAN H, JOB N, BABU D, DATTA S. The B-box bridge between light and hormones in plants. *J Photochem Photobiol* B 2019; **191**: 164-174.

[82] VALVERDE F. CONSTANS and the evolutionary origin of photoperiodic timing of flowering. *J Exp Bot 2011;* **62**: 2453-2463.

[83] WANG CQ, SARMAST MK, JIANG J, DEHESH K. The transcriptional regulator BBX19 promotes hypocotyl growth by facilitating cop1-mediated early flowering3 degradation in Arabidopsis. *Plant Cell* 2015; **27**: 1128-1139.

[84] WANG H, PAN J, LI Y, LOU D, HU Y, YU D. The DELLA-CONSTANS transcription factor cascade integrates gibberellic acid and photoperiod signaling to regulate flowering. *Plant Physiol* 2016; **172**: 479-488.

[85] WANG H, ZHANG Z, LI H, ZHAO X, LIU X, ORTIZ M, LIN CH, LIU B. CONSTANS-LIKE 7 regulates branching and shade avoidance response in Arabidopsis. *J Exp Bot* 2013; **64**: 1017-1024.

[86] WANG Q, TU X, ZHANG J, CHEN X, RAO L. Heat stress-induced BBX18 negatively regulates the thermotolerance in Arabidopsis. *Mol Biol Rep* 2013; **40**: 2679-2688.

[87] WANG Q, ZENG J, DENG K, TU X, ZHAO X, TANG D, LIU X. DBB1a, involved in gibberellin homeostasis, functions as a negative regulator of blue light-mediated hypocotyl elongation in Arabidopsis. *Planta* 2011; **233**: 13-23.

[88] WEI CH-Q, CHIEN CH-W, AI L-F, ZHAO J, ZHANG Z, LI KH, BURLINGAME AL, SUN Y, WANG Z-Y. The Arabidopsis B-box protein BZS1/BBX20 interacts with HY5 and mediates strigolactone regulation of photomorphogenesis. *J Genet Genomics* 2016; **43**: 555-563.

[89] XU D, JIANG Y, LI J, LIN F, HOLM M, DENG XW. BBX21, an Arabidopsis B-box protein, directly activates HY5 and is targeted by COP1 for 26S proteasome-mediated degradation. *Proc Natl Acad Sci USA 2016;* **113***:* 7655-7660.

[90] XU D, LI J, GANGAPPA SN, HETTIARACHCHI C, LIN F, ANDERSSON MX, JIANG Y, DENG XW, HOLM M. Convergence of light and ABA signaling on the ABI5 promoter. *PLoS Genet* 2014; **10**: e1004197.

[91] XU DB, GAO SQ, MA YN, WANG XT, FENG L, LI LC, XU ZS, CHEN YF, CHEN M, YZ MA. The G-protein beta subunit AGB1 promotes hypocotyl elongation through inhibiting transcription activation function of BBX21 in Arabidopsis. *Mol Plant* 2017; **10**: 1206-1223.

[92] XU DQ, JIANG Y, LI J, HOLM M, DENG XW. The B-Box domain protein BBX21 promotes photomorphogenesis. *Plant Physiol* 2018; **176**: 2365-2375.

[93] YADUKRISHNAN P, JOB N, JOHANSSON H, DATTA S. Opposite roles of group IV BBX proteins: Exploring missing links between structural and functional diversity. *Plant Signal Behav* 2018; **13**: e1462641.

[94] YAN H, MARQUARDT K, INDORF M, JUTT D, KIRCHER S, NEUHAUS G, RODRIGUEZ-FRANCO M. Nuclear localization and interaction with COP1 are required for STO/BBX24 function during photomorphogenesis. *Plant Physiol* 2011; **156**: 1772-1782.

[95] YIN R, ARONGAUS AB, BINKERT M, ULM R. Two distinct domains of the UVR8 photoreceptor interact with COP1 to initiate UV-B signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* 2015; **27**: 202-213.
[96] ZHANG X, HUAI J, SHANG F, XU G, TANG W, JING Y, LIN R. A PIF1/PIF3-HY5-BBX23 transcription factor cascade affects photomorphogenesis. *Plant Physiol* 2017; **174**: 2487-2500.
[97] ZHANG Z, JI R, LI H, ZHAO T, LIU J, LIN C, LIU B. CONSTANS-LIKE 7 (COL7) is involved in phytochrome B (phyB)-mediated light-quality regulation of auxin homeostasis. *Mol Plant* 2014; **7**: 1429-1440.
[98] ZHU Y, LIU L, SHEN L, YU H. NaKR1 regulates long-distance movement of FLOWERING LOCUS T in Arabidopsis. *Nat Plants* 2016; **2**: 16075.
[99] ZUO Z, LIU H, LIU B, LIU X, LIN C. Blue light-dependent interaction of CRY2 with SPA1 regulates COP1 activity and floral initiation in Arabidopsis. *Curr Biol* 2011; **21**: 841-847.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 15.09.2020
Przyjęto: 03.10.2020
Agnieszka Kiełbowicz-Matuk
Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk
ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań
email: akie@igr.poznan.pl
tel.: (+48 61) 65 50 216
fax: (+48 61) 65 50 301

TUMOUR NECROSIS FACTOR ALPHA INHIBITORS IN RHEUMATOID ARTHRITIS THERAPY

INHIBITORY CZYNNIKA MARTWICY NOWOTWORU ALFA W TERAPII REUMATOIDALNEGO ZAPALENIA STAWÓW

Małgorzata ŁĄCZNA, Maciej TARNOWSKI,
Patrycja KOPYTKO, Joanna BUJAK, Andrzej PAWLIK

Department of Physiology, Pomeranian Medical University, Szczecin, Poland

Summary: Tumour necrosis factor alpha (TNFα) is the proinflammatory cytokine that plays an important role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA). Anti-TNFα therapy is a promising method for biological RA treatment. This article summarises the role of TNFα in RA pathogenesis, the role of TNFα antagonists in RA therapy, adverse effects of TNFα inhibitors and factors that predispose patients to a positive response to anti-TNFα therapy.

Keywords: TNFα, rheumatoid arthritis, TNFα inhibitors, biological treatment

Streszczenie: Czynnik martwicy nowotworu alfa (TNFα) jest cytokiną prozapalną, która odgrywa ważną rolę w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS). Terapia anty-TNFα jest obiecującą metodą biologicznego leczenia RZS. W artykule podsumowano rolę TNFα w patogenezie RZS, rolę antagonistów TNFα w terapii RZS, niekorzystne działanie inhibitorów TNFα oraz czynniki predysponujące pacjentów do pozytywnej odpowiedzi na terapię anty-TNFα.

Słowa kluczowe: TNFα, reumatoidalne zapalenie stawów, inhibitory TNFα, terapia biologiczna

Abbreviations: **ACR**–American College of Rheumatology, **DMARDs**–disease modifying anti-rheumatic drugs, **Fab**–antigen-binding fragment, **GM-CSF**–granulocyte monocyte-colony stimulating factor, HBV hepatitis B virus, **ICAM-1**–intracellular adhesion molecule 1,**IL,** interleukin, **mAbs**–monoclonal antibodies, **MHC I**–class I major histocompatibility complex, **NSAIDs**–nonsteroidal anti-inflammatory drugs, **RA**–rheumatoid arthritis, **TACE**–TNFα-converting enzyme, **TNF**–tumour necrosis factor, **TNFα**–tumour necrosis factor alpha, **TNFR1**–tumour necrosis factor receptor type 1, **TNFR2**tumour necrosis factor receptor type 2, **TNFRSF**–tumour necrosis factor receptor superfamily, **TNFSF**–tumour necrosis factor super family.

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory, autoimmune disease characterised by pain, swollen and stiff of joints, synovial inflammation and deterioration of cartilage and bone. Untreated RA can lead to permanent disability and premature death. Rheumatoid arthritis affects women three times more than men[56]. Because of the chronic nature of RA, annual costs associated with treatment reach $27,000 per patient in the US and $17,400 in Europe. All treatments in total amount to $52,90 and $58 billion respectively. Over the past two decades, there have been many changes in RA treatment. Traditional therapy with synthetic drugs, such as disease modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) in conjunction with nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), resulted in the improvement of patients' lives by reducing joint and bone damage. However, this first-line of treatment is not an option for a large portion of patients who exhibit intolerance to this therapy. Fortunately, recent discoveries in the pathogenesis of RA has led to the identification of new molecular therapeutic targets[58, 1]. The disturbance in the extremely complex, interactive network of cytokines and cells is responsible for the pathogenesis of RA. Abnormalities in molecular mechanisms lead to typical signs and symptoms of RA, such as inflammation of the synovial membrane, followed by cartilage and bone erosion. Although knowledge about RA pathogenesis is still incomplete, tumour necrosis factor alpha (TNFα) was identified as a key factor in the chronic inflammation process. TNFα, a pivotal proinflammatory cytokine, induces the activity of other cytokines in the proinflammatory cascade that lead to RA development. It has been proven that inhibition of TNFα expression can reduce the production of other proinflammatory cytokines[66]. Therefore, neutralisation of TNFα activity is now commonly used to treat RA patients[56]. In this review we described current anti-TNFα therapeutics and summarised up-to-date progress in RA therapy based on blocking TNFα.

RHEUMATOID ARTHRITIS

Rheumatoid arthritis is the one of the most common, chronic, autoimmune diseases, that affects 0.5% to 1.0% of the global population. It is characterised by joint synovium inflammation (synovitis), followed by joint, cartilage and bone destruction, resulting in functional disability. Patients affected by RA have a higher rate of morbidity and mortality. Although the exact trigger of the autoimmune response is still undetermined, it is commonly known that a complex, interactive network of cells and proinflammatory cytokines are involved in the pathogenesis of RA[66]. Synovitis is characterised by cellular proliferation and activation and

infiltration of various inflammatory cells, including macrophages, plasma cells, endothelial cells, CD4+ T cells, B cells and neutrophils. All cells that infiltrate the synovial membrane, secrete great amounts of proinflammatory cytokines including TNFα, interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) and proteases. All these factors are triggers for macrophages and fibroblasts activation, which results in the secretion of other inflammatory factors. This proinflammatory cascade results in the formation of synovitis, followed by pannus formation. The pannus triggers joint destruction, followed by cartilage and bone erosion. Bone erosion is the result of osteoclasts differentiation and proliferation. Even though activated cells secrete large amounts of many different inflammatory factors, TNFα plays a key role in this complex, interactive network, therefore becoming a critical target in RA treatment[12].

TNFα

TNFα is a member of the tumour necrosis factor super family (TNFSF) which consist of at least 20 different peptides [18]. To date, it has been demonstrated that there are over 35 specific ligand-receptor pairs between TNFSF and members of tumour necrosis factor receptor superfamily (TNFRSF). Although there are many TNFSF representatives, TNFα appears to be a central inflammatory cytokine that demonstrates pleiotropic effects on various cell types [73].

The human TNFα coding gene is located on chromosome 6 and the cytokine is initially generated as a precursor peptide called transmembrane TNFα because it is displayed on the plasma membrane of many cell types. Newly synthesised transmembrane TNFα consist of 233 amino acid residues and lacks a classic signal peptide. Subsequently, the TNFα precursor peptide is cleaved by TNFα-converting enzyme (TACE) into a soluble, mature 17-kDa protein, consisting of 157 amino acid residues [37, 69]. TACE belongs to a class of membrane-associated enzymes that consist of disintegrin and matrix metalloprotease domains. Even though the TACE substrates are not completely understood, it appears that the biological functions of TACE are not exclusively limited to TNFα processing [18]. Knock-out of the TACE gene was developmentally lethal in a mouse model, while TNFα gene knock out had no significant influence on the development, growthand reproduction of animals[51]. This observation indicates that TACE enzyme is also crucial for the processing of the other regulatory proteins[18]. Soluble TNFα, as well as transmembrane TNFα, are homotrimers composed of three identical subunits that can interact with type 1 and type 2 tumour necrosis factor receptors (TNFR1 and TNFR2). Peptide binding to the receptor causes many biological effects such as apoptosis, cell proliferation and cytokine production [12, 18, 37].

The biological activity of TNFα is very broad. However, the cytotoxicity of TNFα to tumour cell lines was the first TNFα activity discovered. In the 1970s, Lloyd Old, along with his colleagues, had identified a substance derived from macrophages that induced haemorrhagic necrosis of solid tumours[18]. This observation led to the discovered product being named tumour necrosis factor (TNF). TNFα is produced primarily by macrophages and monocytes, but also by other immune cells (B-cells, T-cells, eosinophils, basophils, neutrophils, natural killer cells, dendritic cells and mast cells). Many of the non-immune cells such as fibroblasts, astrocytes, glial cells, granuloma cells, keratinocytes, neurons, osteoblasts, retinal pigment epithelial cells, smooth muscle cells and tumour cells also produce TNFα. Even though the biological activity of TNFα is very comprehensive, the most important in terms of RA pathogenesis is its ability to promote and support the process of chronic inflammation.

TNFα CONTRIBUTION TO RA PATHOGENESIS

Physiologically, TNFα plays a crucial role in both innate and acquired immunity in the response to inflammation. In the condition of homoeostasis, there is a close balance between pro- and anti-inflammatory cytokines, which allows immunity to perform its complex functions effectively. Unfortunately, sometimes the balance is disturbed in favour of the proinflammatory response. An uncontrolled proinflammatory response leads to inappropriate TNFα synthesis and release, and by extension, the overproduction of other proinflammatory cytokines. This proinflammatory cascade, with TNFα playing a key role, is one of the characteristic attributes of RA.

TNFα is overproduced in the serum and the synovial tissue in many patients with RA[47, 74, 68, 64, 54]. TNFα gene expression can be induced by various biological, chemical and physical factors and stimuli. In RA pathogenesis, the primary trigger of an uncontrolled immune response is unknown, but TNFα expression can be stimulated by viruses, bacterial or parasitic products, tumour cells, ischaemia, trauma, irradiation and many other stimuli [18]. TNFα is a potent autocrine stimulator and a paracrine inducer of other proinflammatory cytokines. It stimulates cells to secrete interleukins (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18), granulocyte monocyte-colony stimulating factor (GM-CSF) and adhesion molecules such as intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) [12, 18]. Macrophages are the primary source of TNFα in the synovial membrane. Clinical outcomes correlate with an increased number of infiltrating macrophages and overproduction of TNFα [64]. Another study demonstrated that pro-arthritic effects of TNFα can be mediated by local interactions between TNFα ligands (soluble and transmembrane) and its receptors [74]. In RA, TNFα mediates the most

critical events in the acute and chronic synovial membrane inflammation, inducing multiple proinflammatory cytokines and chemokines, expression of adhesion molecules and elevated levels of class I major histocompatibility complex (MHC I) determinants. TNFα triggers cartilage and bone erosion by inducing synovial fibroblasts to synthesise and release proteases and prostaglandin E2 [14, 15]. Taking all the data into consideration, TNFα is a key component in the cascade of cytokines induced in RA, therefore the reduction of excess TNFα in inflammation sites was expected to be promising in RA therapy.

LIGAND-RECEPTOR BINDING AND NATURAL TNFα INHIBITION

TNFα, as a key mediator of proinflammatory cascade induced in RA, exerts its influence on target cells through binding to TNFR1 and TNFR2. TNFR1 is expressed on almost all cell types that contain a nucleus, whereas TNFR2 is mostly expressed on endothelial and hematopoietic cells[18, 37]. There were several models for the molecular events between TNFα and its receptors discussed by researchers, but the model of molecular-switch is the most preferred. The molecular-switch model assumes that signal transduction is a direct effect of conformational changes within the cytoplasmic domain of the receptor[29]. Both TNFα receptors are transmembrane proteins, but they can also be produced naturally as soluble molecules in the process of proteolytic cleavage of extracellular domains. Soluble receptors are natural inhibitors of TNFα action because they compete with transmembrane receptors for binding to TNFα. The binding of TNFα to a soluble receptor has no biological effect, therefore TNFα action is blocked[22]. Understanding molecular events underlying TNFα's mechanism of action permits researchers to develop novel strategies for RA treatment. These novel strategies are based on biological agents that mimic naturally occurring mechanisms of TNFα inhibition. To date, biological agents licensed for the treatment of RA can be divided in two major types. One type is a group of monoclonal antibodies against TNFα and the second type is a group of recombinant soluble fusion proteins [66].

STRUCTURE OF TNFα ANTAGONISTS

Biological agents responsible for the inhibition of TNFα activity, by interfering with TNFα-TNFR binding, are called TNFα antagonists or inhibitors. To date, five different TNFα antagonists are licensed for clinical use as therapeutics for RA: infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab and golimumab[67].

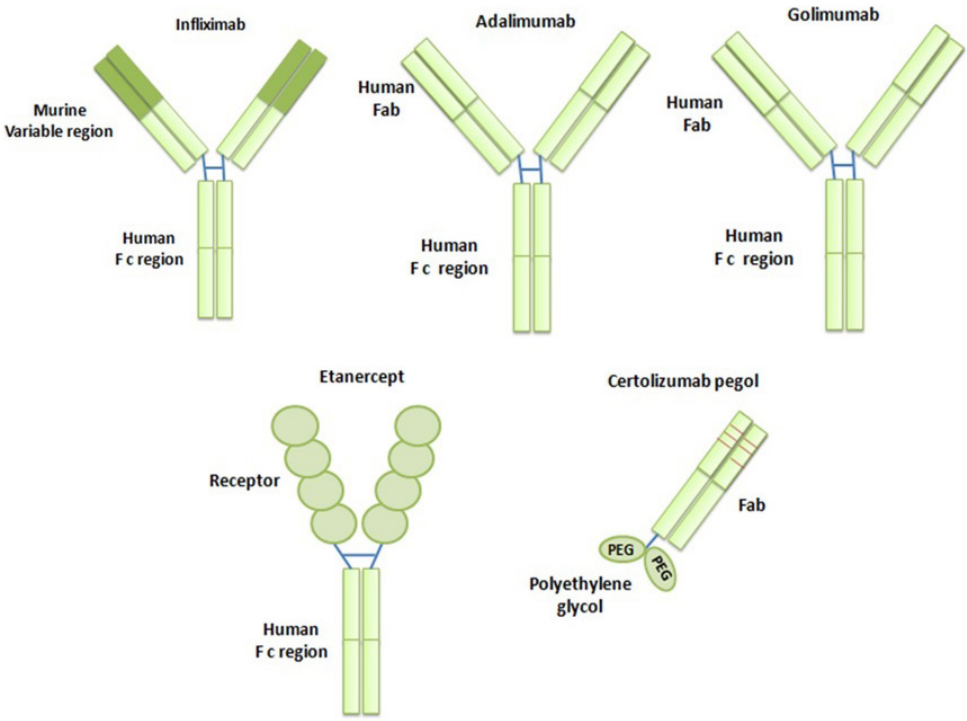


FIGURE 1. Schematic representation of the molecular structures of all five TNFα inhibitors licensed for the RA treatment. Infliximab is a chimeric human-mouse mAb. Adalimumab and golimumab are fully human mAbs. Etanercept is a fusion protein that consists of two recombinant, soluble TNFα receptors fused with the Fc region of human IgG. Certolizumab is a humanised IgG mAb fragment, without an Fc region

RYCINA 1. Schematyczne przedstawienie struktur molekularnych wszystkich pięciu inhibitorów TNFα zarejestrowanych w terapii RZS. Infliksymab jest chimerycznym ludzko-mysim przeciwciałem. Adalimumab i golimumab są w pełni ludzkimi przeciwciałami. Etanercept jest białkiem fuzyjnym, które składa się z dwóch rekombinowanych, rozpuszczalnych receptorów TNFα połączonych z regionem Fc ludzkiej IgG. Certolizumab jest humanizowanym fragmentem przeciwciała IgG bez regionu Fc

Schematic structures of these therapeutics, with their similarities and differences, are shown in **figure 1**. Infliximab, adalimumab, certolizumab and golimumab are monoclonal antibodies (mAbs) or monoclonal antibody fragments[58]. Infliximab, adalimumab and golimumab are full-length IgG mAbs, whereas certolizumab is a humanised antigen-binding fragment (Fab) covalently conjugated to polyethylene glycol. Etanercept is a soluble fusion protein[67].

Infliximab is a chimeric human-mouse mAb (75% human, 25% mouse) which binds to TNFα with high specificity and affinity. Infliximab binds to both soluble and transmembrane TNFα and inhibits the biological effects of TNFα by blocking

TNFα-TNFRs interactions. It is also cytotoxic to cells which express TNFα [56]. Adalimumab and golimumab are fully human mAbs that also bind to soluble and transmembrane TNFα with high affinity. Certolizumab is a humanised IgG mAb fragment, without an Fc region, and therefore lacks effector functions. Instead of an Fc region, the hinge region of certolizumab is modified and covalently conjugated to two chains of polyethylene glycol [67]. One of the TNFα inhibitors is not structurally a mAb, but a recombinant, soluble TNFα receptor. Etanercept is a fusion protein that consists of two recombinant, soluble TNFα receptors fused with the Fc region of human IgG. The dimeric structure of etanercept significantly influences its efficiency to neutralise TNFα. Dimeric, soluble TNFα receptors are approximately 1000 times more efficient in inhibiting TNFα than monomeric TNFα receptors. Etanercept prevents interactions between TNFα and its receptor by binding to the cytokine. The mechanism of action of etanercept mimics the naturally occurring process of TNFα inhibition.

Despite the structural differences between individual TNFα inhibitors, the primary mechanism of action of these biologics is to neutralise TNFα activity. In many randomised clinical trials, all TNFα antagonists exhibit a high efficiency in reducing clinical signs of chronic inflammation in RA patients. A large portion of patients, in which disease modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) failed, appear to be responsive to treatment with TNFα inhibitors To date, unfortunately, only few comparative clinical trials have been performed comparing individual TNFα inhibitors, thus the determination of the most effective agent is still impossible[1].

TNFα INHIBITORS EFFICIENCY AND SAFETY

The efficiency of clinical outcomes during treatment with TNFα inhibitors is calculated based on the American College of Rheumatology (ACR) score. The ACR score is a set of seven disease activity outcomes used to measure changes in RA symptoms. Different degrees of improvement are referred to as ACR20, ACR50 and ACR70. ACR20 means that there is 20% improvement in tender or swollen joint counts, as well as 20% improvement in three of the other five criteria. ACR50 and ACR70 correspond to 50% and 70% improvements, respectively[58]. The additional measure of TNFα antagonists' efficiency is disease activity score 28 (DAS28). The DAS28 is a weighted score of tender and swollen joint counts, overall patient assessment of disease activity and acute phase reactants[1]. The data of efficacy and safety of anti-TNFα agents, from randomised clinical trials, have shown that TNFα inhibitors are effective in reducing clinical signs of inflammation in RA patients[40, 45, 43, 72, 33, 34, 55, 60, 35]. Many of the RA patients, in which DMARDs therapy failed, achieved ACR20 and DAS28

scores[25-28]. Furthermore, in these clinical trials, a significant number of patients also achieved improvement on the ACR50 and ACR70 level[43, 72, 33, 34, 55, 60, 35]. Moreover, TNFα antagonists exhibited their efficiency in reducing radiographic progression[33, 55, 35]. The results of the ARMADA trial showed that adalimumab was effective in most patients treated with a TNFα inhibitor, taking concomitant methotrexate [72]. In the GO-FORWARD clinical trial, the efficacy and safety of golimumab were estimated after five years of treatment. This trial confirmed both efficacy and safety of subcutaneous administration of golimumab to RA patients [35]. Similar outcomes were reported in previous, independent studies of other TNFα inhibitors[8].The most recent data confirms previous reports regarding safety and efficacy of TNFα inhibitors. Long-term safety and effectiveness of adalimumab were confirmed during the 3-year treatment period [28]. Similar clinical responses to golimumab in different doses were reported through week 120[65]. Several recent studies confirm the advantage of using TNFα inhibitors compared to the traditional therapies. Treat-to-target study conducted in regions with limited biologic access have shown that combination of etanercept and DMARD is more effective in maintenance of remission than DMARDs therapy alone [49]. The C-OPERA clinical trial evaluated efficacy and safety of combination therapy using certolizumab pegol and methotrexate, compared to using methotrexate alone. This study showed that combination therapy was superior to methotrexate alone, bringing clinical benefit for further 2 years, even after certolizumab withdrawal[75, 4]. Although, most of the data supports the use of biologic agents after failure of methotrexate monotherapy in RA, one study reports an evidence that a combination of conventional therapies can be more effective than TNFα inhibitors [50].

Another aspect of long-term clinical outcome of TNFα is the patients' reaction to drug dose reduction or withdrawal. The main goal of dose tapering or drug withdrawal is to optimise the treatment by decreasing the risk of adverse effects and to lower the treatment costs. The authors of DRESS trial published results of the 3-year study, in which a long-term outcomes of TNFα inhibitors dose reduction were assessed. It has been proven that safety and efficacy of disease activity guided TNFα inhibitors dose reduction were maintained for up to 3 years, with a significant reduction of TNFα inhibitors use [6]. These reports have been confirmed by the results of other, independent studies[75, 31]. Tapering of TNFα inhibitors by 33% does not cause any loss of clinical response[31]. The C-OPERA clinical trial demonstrated that withdrawal of certolizumab pegol has no negative impact on radiographic progression or clinical benefits[75]. The most recent PREDICTRA study aim to generate data on patient and disease characteristics that may predict the clinical course of fixed dose-reduction regimen with adalimumab. This clinical trial hasbegun in February 2018 and is still ongoing[19].

The last aspect of clinical outcome of biologic therapy is to evaluate how individual TNFα inhibitors differ from each other in terms of efficacy and safety. To date, there are still only few studies tackling this issue[30, 36, 61]. Golimumab appeared to be effective and well-tolerated in patients who had shown inadequate response to DMARDs or other anti-TNFα agents[30, 36].The results of head-to-head comparison of certolizumab pegol versus adalimumab demonstrated equivalence of these drugs, simultaneously showing that switching from one to another TNFα inhibitor is safe and effective[36].

In summary, all five clinically licensed anti-TNFα therapeutics have been evaluated in a series of randomised, controlled clinical trials. All TNFα inhibitors were effective and safe for most of the patients. The therapeutic effect was manifested by a reduction of chronic inflammation and erosive damage, which was visualised by radiography. Additionally, the quality of life of RA patients was improved. However, a large portion of RA patients were non-responsive to anti-TNFα treatment and did not achieve ACR20. For this reason, in the future, it would be helpful to identify some predictors for anti-TNFα therapy response [71].

SAFETY, IMMUNOGENICITY AND EFFICACY OF BIOSIMILAR DRUGS

Biosimilar agents are similar versions of an original biological substance already licensed for clinical use as therapeutics. Access to effective biologicals, due to the high cost, is restricted only to certain patients and countries. However, biosimilars can remove that inequality by reducing cost and making the treatment more accessible. To date, there are few phase III clinical trials comparing original TNFα inhibitors and biosimilar agents. The infliximab was compared to the biosimilar SB2 product in terms of its efficacy, safety, immunogenicity and pharmacokinetics[44]. The results of this study demonstrated bioequivalence of these drugs. After approval of biosimilar SB2, the agent has been examined in terms of switching from infliximab to SB2 [62]. The goal of this transition period was to compare results in RA patients who switched from infliximab to biosimilar SB2 with those who continue receiving infliximab or biosimilar SB2. The results have shown no significant differences between groups up to week 78, therefore suggesting that the clinical profile of SB2 is comparable with originator infliximab, even when administrated long term. The SB4 and LBEC0101 are etanercept biosimilar agents. The SB4 clinical profile was evaluated in two different phase III studies [19, 20]. In the first study, the efficacy and safety of SB4 were evaluated at week 24, and in the second up to week 52. The results of both studies have demonstrated similarities in clinical profile between SB4 and etanercept. Last

year, the other etanercept biosimilar- LBEC0101 was also evaluated in phase III, multicentre, double-blind, randomised, parallel-group study [42]. As a result, the clinical efficacy of LBEC0101 and its similarity to etanercept reference products were proven. SB5 is a biosimilar agent to adalimumab and likewise SB2 and SB4 was evaluated in two phase III randomized clinical trials [36, 23]. The first study assessed the clinical profile of SB5 at week 24. The second study evaluated patients who switched from adalimumab to SB5 or who maintained treatment with SB5 or adalimumab up to 52 weeks. In both studies the SB5 was well tolerated and had comparable safety profile to adalimumab.

THE ADVERSE EFFECTS OF TNFα INHIBITORS

There are several adverse effects of TNFα inhibitors that were identified during administration of the biological therapy. The most common adverse effects were: allergic reactions directly related to the administration of the drug as an infusion, skin reactions after injections and various types of infections. The less common adverse effects were: idiopathic pulmonary fibrosis, optic neuritis, multiple sclerosis intensification, hepatomegaly, and aplastic anaemia[21].

TNFα is a key factor that is synthesised and secreted by cells as a part of immune response to various kinds of infections. Therefore, inhibiting TNFα synthesis can increase the potential risk of serious infections [70]. Other factors can also influence the increased risk of infections after TNFα inhibitors administration: the advanced age of the patient, administration of corticosteroids, especially at medium and high doses, advanced disease activity, and comorbidities such as diabetes, chronic lung diseases or kidney failure[63, 17].There are three types of infections that were identified during administration of TNFα inhibitor therapy: bacterial, viral and opportunistic. The most frequent were bacterial infections of the upper respiratory tract, urogenital system and skin and soft tissues [38]. Due to the increased risk of pneumococcal infection, it is recommended that RA patients receive a pneumococcal vaccine before biological therapy begins [59]. Patients with RA are also at high risk for viral infections. Scientists reported an increased frequency of herpes zoster infection, with a high percentage of hospitalisation, especially after therapy with monoclonal antibodies [10]. As a result, it is also recommended that RA patients receive a vaccine for herpes zoster before biological therapy administered [59]. Patients infected with the hepatitis B virus are at risk of reactivation of the infection, and therefore hepatitis B virus (HBV) serology should be determined before the implementation of TNFα inhibitor therapy [7]. In the case of negative HBV serology, vaccination is recommended. No contraindications to biological therapy were identified in the case of hepatitis C virus infections [59]. Opportunistic infections did not cause disease in a healthy host

with a normal, functioning immune system. However, RA patients that undergo therapy with TNFα inhibitors are at a serious risk of opportunistic infections, especially Mycobacterium tuberculosis infection. In RA patients, tuberculosis developed within the first month of biological therapy implementation. There is a significant difference between classic and biological therapy-related tuberculosis. The reported cases of tuberculosis infection induced by TNFα inhibitor treatment involved extrapulmonary sites of infection and were life threatening[24]. The extrapulmonary sites of a tuberculosis infection suggest a latent form of the disease. Due to previous observations, there is a recommendation that tests for the latent form of tuberculosis be performed before TNFα inhibitors are administered. Testing for the latent form of tuberculosis would significantly reduce the number of life-threatening cases[10, 26].

The relationship between implementing TNFα inhibitor therapy and the risk of cancer is still unclear. To date, some data shows that RA patients that undergo biological therapy are at an increased risk for cancer compared to the general population [5].In a clinical trial for RA patients, biological therapy has not been associated with an increased risk of malignancy compared with other DMARDs or placebo[39]. Other studies on the incidence of solid malignancies also show a minor increase of cancer risk in RA patients treated with TNFα antagonists compared to non-biological DMARDs [3, 11]. No evidence of a higher incidence of lymphoma and leukaemia in TNFα antagonists-treated patients was found[2]. A few studies showed an increased risk of skin cancer, especially non-melanoma cancers, although other studies found no significant difference [52, 53]. Moreover, prolonged administration of TNFα inhibitors has not been associated with an increased risk of cancer. Also, there is no evidence of a correlation between malignancies following biological therapy and worse post-cancer survival rates[52]. Nevertheless, therapy with TNFα inhibitors is not recommended in RA patients with a medical history of cancer, except for treated solid malignancies in remission over five years [59].

Generally, RA patients have an increased risk for cardiovascular disease when compared to the general population. The increased risk of cardiovascular disease is associated with chronic inflammation, which is the hallmark of RA [41, 25]. However, there are no significant differences in the risk of acute myocardial infarction between RA patients that undergo biological treatment and patients receiving traditional DMARDs. Interestingly, some data indicates that treatment with TNFα inhibitors reduces the risk of all cardiovascular events [16]. These observations are most likely the result of TNFα inhibitors' activity. TNFα, as a proinflammatory cytokine, plays an important pathological role in thrombotic mechanisms, leading to the increased risk of cardiovascular events in RA patients. TNFα inhibitors by blocking TNFα, suppress these pathological mechanisms, therefore reducing the cardiovascular risk associated with RA. In contrast, patients with a history of cardiovascular

disease have an increased risk for heart failure when treated with TNFα inhibitors[41]. Therefore, patients with a history of cardiovascular disease should not receive TNFα antagonists. It is worth drawing attention to the fact that some of the patients enrolled in the study, who experienced cardiac insufficiency, received greater than standard dosage of TNFα inhibitors [9, 13]. In conclusion, more clinical data is needed to correctly assess the cardiovascular risk associated with TNFα inhibitors therapy.

Many of the adverse events described to date are affected by various skin reactions, including autoimmune diseases. The main pathological conditions induced by TNFα inhibitors treatment are: vitiligo, spot baldness, cutaneous lupus erythematosus, cutaneous vasculitis, relapsing polychondritis and various psoriasis-like skin lesions. The large number of cutaneous adverse events reported to date indicate that skin is the target organ for adverse effects of the TNFα inhibitor therapy.

THE THERAPEUTIC RESPONSE TO TNFα INHIBITORS – THE EFFECTS OF GENE POLYMORPHISMS IN THE TUMOUR NECROSIS FACTOR

Among RA patients, there is a substantial heterogeneity in the clinical response to TNFα inhibitors. Considering the high costs of biological therapy, there is a serious need to find the predictors of treatment response. Such predictors would be useful in the selection of the appropriate agents. To date, few studies show that polymorphisms in TNFα influence the clinical response to TNFα inhibitors. Most of the studies were focused on the polymorphism at position -308 in the TNFα gene promoter. A study in France examined whether the G-to-A polymorphism at position -308 in the TNFα gene promoter has any influence on the clinical response to infliximab. They found that patients with TNFα-308G/G genotype respond better to infliximab compared to patients with A/A or A/G genotypes [46]. A similar study was performed concerning the response to etanercept, where two groups of patients were compared: -308 A/G genotype and -308 G/G genotype [27]. Similar to the results of the study by Guis et al. patients with TNF-308G/G genotype respond to the biological therapy better than patients with a -308 A/G genotype. These results were confirmed by a study conducted recently, in which the authors demonstrated the impact of the same polymorphism on responsiveness of RA patients to three TNFα inhibitors: infliximab, etanercept and adalimumab[57]. In this study, they also proved that patients with a TNF-308G/G genotype are better responders to anti-TNFα therapy than those with A/A or A/G genotypes. In addition, a study conducted in Sweden revealed that the combination of two polymorphisms: -308G/G in TNFα gene promoter and -1087G/G in the interleukin 10 gene was associated with good response of RA patients to etanercept[48]. The impact of C-to-T polymorphism at the position -857 of the TNFα gene pro-

moter on responsiveness to etanercept therapy was demonstrated in another study [32]. The results demonstrated that RA patients with the TNFα-857C/T genotype respond better to etanercept therapy than homozygotes for the C allele. This single nucleotide polymorphism can become another useful predictor of etanercept treatment. In conclusion, the presented results indicate that TNFα gene promoter is an important determinant of biological treatment response.

CONCLUSION

Anti-TNFα therapy is a promising therapeutic method for the treatment of RA. Although this therapy is relatively safe in many patients, various adverse events can occur during treatment. Prevention of toxicity and other adverse effects of this therapy requires a better understanding of the molecular mechanisms and pathways involved in the toxicity of these drugs. The search for biomarkers that predispose patients to a positive response to anti-TNFα therapy will be the primary focus of research in the coming years. These studies may enable the identification of patients who are most likely to respond to treatment with anti-TNFα inhibitors. At present, we should search for new TNFα inhibitors that may enable safer and more effective treatment of RA.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

This manuscript has been written by Małgorzata Łączna, Patrycja Kopytko and Joanna Bujak; Maciej Tarnowski and Andrzej Pawlik have participated in drafting the article or revising it critically for important intellectual content. All authors have given final approval of the version to be submitted and any revised version.

FUNDING

The project was financed by the Minister of Science and Higher Education in the “Regional initiative of excellence” program, in years 2019–2022, no. 002/RID/2018/19.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

[1] AGARWAL SK. Biologic Agents in Rheumatoid Arthritis: An Update for Managed Care Professionals. *J Manag Care Pharm* 2016; **17**(9) Supp B: S14-S18.

[2] ASKLING J, et al. Haematopoietic malignancies in rheumatoid arthritis: Lymphoma risk and characteristics after exposure to tumour necrosis factor antagonists. *Ann Rheum Dis* 2005; **64**(10): 1414-1420.

[3] ASKLING S, et al. Risks of solid cancers in patients with rheumatoid arthritis and after treatment with tumour necrosis factor antagonists. *Ann Rheum Dis* 2005; **64**(10): 1421-1426.
[4] ATSUMI T, et al. The first double-blind, randomised, parallel-group certolizumab pegol study in methotrexate-naïve early rheumatoid arthritis patients with poor prognostic factors, C-OPERA, shows inhibition of radiographic progression. *Ann Rheum Dis* 2016; **75**(1): 75-83.
[5] BONGARTZ T, SUTTON AJ, SWEETING MJ, BUCHAN I, MATTESON EL. Anti-TNF Antibody Therapy in Rheumatoid Arthritis and the Risk of Serious Infections and Malignancies. *Jama* 2014; **295**(19): 2275-2285.
[6] BOUMAN CAM, et al. Long-term outcomes after disease activity-guided dose reduction of TNF inhibition in rheumatoid arthritis: 3-year data of the DRESS study–A randomised controlled pragmatic non-inferiority strategy trial. *Ann Rheum Dis* 2017; **76**(10): 1716-1722.
[7] CABRERA VILLALBA SR, HERNANDEZ MIGUEL MV, SANMARTI SALA R. How does one manage patients with rheumatoid arthritis and positive serology to hepatitis B, hepatitis C, human immunodeficiency virus? *Reumatol Clínica* (English Ed) 2011; **7**(3): 203-207.
[8] CALABRO A, CATERINO AL, ELEFANTE E, VALENTINI V, VITALE A, TALARICO R, CANTARINI L, FREDIANI B. One year in review 2016: Novelties in the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2016; **34**(3): 357-372.
[9] CANETE JD, HERNANDEZ MV, SANMARTI R. Safety profile of biological therapies for treating rheumatoid arthritis. *Expert Opin Biol* 2017; **17**(9): 1089-1103.
[10] CARMONA I, et al. Effectiveness of recommendations to prevent reactivation of latent tuberculosis infection in patients treated with tumor necrosis factor antagonists. *Arthritis Rheum* 2005; **52**(6): 1766-1772.
[11] CARMONA L, et al. Cancer in Patients with Rheumatic Diseases Exposed to TNF Antagonists. *Semin Arthritis Rheum* 2011; **41**(1): 71-80.
[12] CHOY EHS, PANAYI GS. Cytokine Pathways and Joint Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* 2002; **344**(12): 907-916.
[13] CHUNG ES, PACKER M, LO KH, FASANMADE AA, WILLERSON JT. Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor-α, in patients with moderate-to-severe heart failure: Results of the anti-TNF therapy against congestive heart failure. *Circulation* 2003; **107**(25): 3133-3140.
[14] DAYER JM, BEUTLER B, CERAMI C. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med* 1985; **162**(6): 2163-2168.
[15] DIAKUN G, FAIRALL L, KLUG A. © 1986 Nature Publishing Group. *Nature* 1986; **324**: 698-699.
[16] DIXIN WG, et al. Reduction in the incidence of myocardial infarction in patients with rheumatoid arthritis who respond to anti-tumor necrosis factor α therapy: Results from the British Society for Rheumatology Biologics Register. *Arthritis Rheum* 2007; **56**(9): 2905-2912.
[17] DORAN MF, CROWSON CS, POND GR, O'FALLON WM, GABRIEL SE. Frequency of infection in patients with rheumatoid arthritis compared with controls: A population-based study. *Arthritis Rheum* 2002; **46**(9): 2287-2293.
[18] EDWARDS CK, DINARELLO CA, STERRY W, SCHOTTELIUS AJG, ASADULLAH K, MOLDAWER LL. Biology of tumor necrosis factor-alpha- implications for psoriasis. *Exp Dermatol* 2004; **13**(4): 193-222.
[19] EMERY P, BURMESTER GR, NAREDO E, ZHOU Y, HOJNIK M, CONAGHAN PG. Design of a phase IV randomised, double-blind, placebo-controlled trial assessing the ImPact of Residual Inflammation Detected via Imaging TEchniques, Drug Levels and Patient Characteristics on the Outcome of Dose TaperIng of Adalimumab in Clinical Remission Rheumatoid ArThritis (RA) patients. *BMJ Open* 2018; **8**(2): 1-10.
[20] EMERY P, et al. 52-week results of the phase 3 randomized study comparing SB4 with reference etanercept in patients with active rheumatoid arthritis. *Rheumatol (United Kingdom)* 2017; **56**(12): 2093-2101.
[21] FILIPOWICZ-SOSNOWSKA A. Skuteczność i bezpieczeństwo inhibitorów TNF – wyniki randomizowanych , kontrolowanych badań klinicznych. *Reumatologia* 2006; **6**(44): 309-314.

[22] FOX DA. Cytokine Blockade as a New Strategy to Treat Rheumatoid Arthritis. Arch Intern Med 2003; **160**(4): 437.
[23] GHIL J, et al. Switching From Reference Adalimumab to SB5 (Adalimumab Biosimilar) in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2018; **70**(6): 832-840.
[24] GOMEZ-REINO JJ, CARMONA L, RODRIGUEZ VALVERDE V, MOLA E, MONTERO EM. Treatment of rheumatoid arthritis with tumor necrosis factor inhibitors may predispose to significant increase in tuberculosis risk: A multicenter active-surveillance report. *Arthritis Rheum* 2003; **48**(8): 2122-2127.
[25] GOODSON NJ, WILES NJ, LUNT M, BARRET EM, SILMAN AJ, SYMMONS DPN. Mortality in early inflammatory polyarthritis: Cardiovascular mortality is increased in seropositive patients. *Arthritis Rheum* 2002; **46**(8): 2010-2019.
[26] GROVES R, et al. The risk of tuberculosis related to tumour necrosis factor antagonist therapies: a TBNET consensus statement. *Eur Respir J* 2010; **36**(5): 1185-1206.
[27] GUIS S, et al. Influence of -308 A/G polymorphism in the tumor necrosis factor α gene on etanercept treatment in rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res* 2007; **57**(8): 1426-1430.
[28] HARIGAI M, TSUCHIYA T, KAWANA K, KURIMOTO S. Long-term safety and effectiveness of adalimumab for the treatment of Japanese patients with rheumatoid arthritis: 3-year results from a postmarketing surveillance of 552 patients. *Mod Rheumatol* 2018; **28**(1): 30-38.
[29] HOSPITAL BI. Seminars in Medicine of the Medicine (Baltimore). 1995; **334**(26): 638-644.
[30] HUFSTUTTER JE, et al. Clinical response to golimumab in rheumatoid arthritis patients who were receiving etanercept or adalimumab: results of a multicenter active treatment study. *Curr Med Res Opin* 2017; **33**(4): 657-666.
[31] IBRAHIM F, et al. Optimizing treatment with tumour necrosis factor inhibitors in rheumatoid arthritis-A proof of principle and exploratory trial: Is dose tapering practical in good responders? *Rheumatol (United Kingdom)* 2017; **56**(11): 2004-2014.
[32] KANG CP, LEE KW, YOO DH, KANG C, BAE SC. The influence of a polymorphism at position -857 of the tumour necrosis factor α gene on clinical response to etanercept therapy in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2005; **44**(4): 547-552.
[33] KEYSTONE E, et al. Certolizumab pegol plus methotrexate is significantly more effective than placebo plus methotrexate in active rheumatoid arthritis: Findings of a fifty-two-week, phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Arthritis Rheum* 2008; **58**(11): 3319-3329.
[34] KEYSTONE E, et al. Golimumab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate therapy: 52-week results of the GO-FORWARD study. *Ann Rheum Dis* 2010; **69**(6): 1129-1135.
[35] KEYSTONE EC, et al. Safety and efficacy of subcutaneous golimumab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate therapy: Final 5-year results of the GO-FORWARD trial. *J Rheumatol* 2016; **43**(2): 298-306.
[36] LEGANI C, et al. Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: analysis of results obtained in the DULCIS study. *Int J Lab Hematol* 2015; **38**(1): 42-49.
[37] LIM H, et al. Structural biology of the TNFα antagonists used in the treatment of rheumatoid arthritis. *Int J Mol Sci* 2018; **19**(3): 1-14.
[38] LISTING J, et al. Infections in patients with rheumatoid arthritis treated with biologic agents. *Arthritis Rheum* 2005; **52**(11): 3403-3412.
[39] LOPEZ-OLIVO MA, et al. Risk of malignancies in patients with rheumatoid arthritis treated with biologic therapy: A meta-analysis. *JAMA–J Am Med* Assos 2012;308(9): 898-908.
[40] MAINI R, et al. Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor α monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: A randomised phase III trial. *Lancet* 1999; **354**(9194): 1932-1939.
[41] MARADIT-KREMERS H, et al. Increased unrecognized coronary heart disease and sudden deaths in rheumatoid arthritis: A population-based cohort study. *Arthritis Rheum* 2005; **52**(2): 402-411.
[42] MATSUNO H, TOMOMITSU M, HAGINO A, SHIN S, Lee J, SONG YW. Phase III, multicentre, double-blind, randomised, parallel-group study to evaluate the similarities between LBEC0101 and

etanercept reference product in terms of efficacy and safety in patients with active rheumatoid arthritis inadequately responding to m. Ann Rheum Dis 2018; **77**(4): 488-494.

[43] ME W, et al. A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *N Engl J Med* 1999; **340**(4): 253-259.

[44] MEKIC M, et al. A randomised, double-blind, phase III study comparing SB2, an infliximab biosimilar, to the infliximab reference product Remicade in patients with moderate to severe rheumatoid arthritis despite methotrexate therapy. *Ann Rheum Dis* 2015; **76**(1): 58-64.

[45] MORELAND LW, et al. Etanercept therapy in rheumatoid arthritis: A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 1999; **130**(6): 478-86.

[46] MUGNIER B, BALANDRAUD M, DARQUE A, ROUDIER C, ROUDIER J, REVIRON D. Polymorphism at position -308 of the tumor necrosis factor α gene influences outcome of infliximab therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; **48**(7): 1849-1852.

[47] NEIDEL J, SCHULZE M, LINDSCHAU J. Association between degree of bone-erosion and synovial fluid-levels of tumor necrosis factor α in the knee-joints of patients with rheumatoid arthritis. *Inflamm Res* 1995; **44**(5): 217-221.

[48] Padyukov L, et al. Genetic markers for the efficacy of tumour necrosis factor blocking therapy in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003; **62**(6): 526-529.

[49] PAVELKA K, et al. Maintenance of remission with combination etanercept–DMARD therapy versus DMARDs alone in active rheumatoid arthritis: results of an international treat-to-target study conducted in regions with limited biologic access. *Rheumatol Int* 2017; **37**(9): 1469-1479.

[50] PEPER SM, et al. Rheumatoid Arthritis Treatment After Methotrexate: The Durability of Triple Therapy Versus Etanercept. *Arthritis Care Res* 2017; **69**(10): 1467-1472.

[51] PESCHON JJ, et al. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 1998; **282**(5395): 1281-1284.

[52] RAASCHOU P, SIMARD JF, NEOVIUS M, ASKLING J. Does cancer that occurs during or after anti-tumor necrosis factor therapy have a worse prognosis?: A national assessment of overall and site-specific cancer survival in rheumatoid arthritis patients treated with biologic agents. *Arthritis Rheum* 2011; **63**(7): 1812-182

[53] SMITTEN AL, SIMON TA, HOCHBERG MC, SUISSA S. A meta-analysis of the incidence of malignancy in adult patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2008; **10**(2): 1-8.

[54] SAXNE T, TALAL N, WOLLHEIM FA, PALLADINO MA, HEINAGARD D. Detection of tumor necrosis factor α but not tumor necrosis factor β in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum. *Arthritis Rheum* 2007; **31**(8): 1041-1045.

[55] SCHIFF M, et al. Efficacy and safety of certolizumab pegol plus methotrexate in active rheumatoid arthritis: the RAPID 2 study. A randomised controlled trial. *Ann Rheum Dis* 2008; **68**(6): 797-804.

[56] SCOTT DL, KINGSLEY GH. Tumor Necrosis Factor Inhibitors for Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* 2006; **355**(7): 704-712.

[57] SEITZ M, WIRTMULLER U, MOLLER B, VILLIGER PM. The -308 tumour necrosis factor-α gene polymorphism predicts therapeutic response to TNFα-blockers in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis patients. *Rheumatology* 2007; **46**(1): 93-96.

[58] SIEBERT S, TSOUKAS A, ROBERTSON J, MCINNES I. Cytokines as Therapeutic Targets in Rheumatoid Arthritis and Other Inflammatory Diseases. *Pharmacol Rev* 2015; **67**(2): 280-309.

[59] SINGH JA, et al. 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2016; **68**(1): 1-25.

[60] SMOLEN JS, et al. Golimumab in patients with active rheumatoid arthritis after treatment with tumour necrosis factor α inhibitors (GO-AFTER study): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase III trial. *Lancet* 2009; **374**(9685): 210-221.

[61] SOLEN JS, et al. Head-to-head comparison of certolizumab pegol versus adalimumab in rheumatoid arthritis: 2-year efficacy and safety results from the randomised EXXELERATE study. *Lancet* 2016; **388**(10061): 2763-2774.

[62] STAYKOV I, et al. Safety, immunogenicity and efficacy after switching from reference infliximab to biosimilar SB2 compared with continuing reference infliximab and SB2 in patients with rheumatoid arthritis: results of a randomised, double-blind, phase III transition study. *Ann Rheum Dis* 2017; **77**(2): 234-240.
[63] STRAND V, et al. High disease activity is associated with an increased risk of infection in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2011; **70**(5): 785-791.
[64] TAK PP, et al. Analysis of the synovial cell infiltrate in early rheumatoid synovial tissue in relation to local disease activity. *Arthritis Rheum* 1997; **40**(2): 217-225.
[65] TAKEUCHI T, et al. Clinical efficacy, radiographic, and safety results of golimumab monotherapy in Japanese patients with active rheumatoid arthritis despite prior therapy with disease-modifying antirheumatic drugs: Final results of the GO-MONO trial through week 120. *Mod Rheumatol* 2018; **28**(5): 770-779.
[66] TAKEUCHI T. Addendum to Treatment of rheumatoid arthritis with biological agents — as a typical and common immune-mediated inflammatory disease. *Proc Japan Acad Ser B* 2018; **94**(1): 56-57.
[67] TRACEY D, KLARESKOG L, SASSO EH, SALFELD JG, TAK PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacol Ther* 2008; **117**(2): 244-279.
[68] ULFGREN AK, LINDBLAD S, KLARESKOG L, ANDERSSON J, ANDERSSON U. Detection of cytokine producing cells in the synovial membrane from patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1995; **54**(8): 654-661.
[69] VASANTHI P, NALINI G, RAJASEJHAR G. Role of tumor necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis: A review. *APLAR J Rheumatol* 2007; **10**(4): 270-274.
[70] VASHISHT P, O'DELL J. Not all TNF inhibitors in rheumatoid arthritis are created equal: important clinical differences. *Expert Opin Biol Ther* 2017; **17**(8): 989-999.
[71] VASTESAEGER N, et al. Prediction of remission and low disease activity in disease-modifying anti-rheumatic drug-refractory patients with rheumatoid arthritis treated with golimumab. *Rheumatol (United Kingdom)* 2016; **55**(8): 1466-1476.
[72] WEINBLATT ME, et al. Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor α monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: The ARMADA trial. *Arthritis Rheum* 2003; **48**(1): 35-45.
[73] WIENS GD, GLENNEY GW. Origin and evolution of TNF and TNF receptor superfamilies. *Dev Comp Immunol* 2011; **35**(12): 1324-1335.
[74] WINTER, ALSALAMEH, WENDLER, KALDEN, AL-WARD, KINNE. Distribution of TNF-?, TNF-R55 and TNF-R75 in the Rheumatoid Synovial Membrane: TNF Receptors are Localized Preferentially in the Lining Layer; TNF-? is Distributed Mainly in the Vicinity of TNF Receptors in the Deeper Layers. *Scand J Immunol* 2003; **49**(3): 278-285.
[75] YAMAMOTO K, et al. Clinical benefit of 1-year certolizumab pegol (CZP) add-on therapy to methotrexate treatment in patients with early rheumatoid arthritis was observed following CZP discontinuation: 2-year results of the C-OPERA study, a phase III randomised trial. *Ann Rheum Dis* 2017; **76**(8): 1348-1356.

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 17.12.2020
Przyjęto: 08.01.2021
Małgorzata Łączna
Department of Physiology, Pomeranian Medical University
Powstancow Wlkp. 72, 70-111 Szczecin, Poland
e-mail: malgorzata.lubecka@pum.edu.pl

CHARAKTERYSTYKA EUKARIOTYCZNYCH REDUKTAZ ARSENIANOWYCH Z NADRODZINY RODANAZ

CHARACTERIZATION OF EUKARYOTIC ARSENATE REDUCTASES OF RHODANESE SUPERFAMILY

Małgorzata NOWICKA, Katarzyna MIZIO,
Ewa MACIASZCZYK-DZIUBIŃSKA

Zakład Genetyki i Fizjologii Komórki, Instytut Biologii Eksperymentalnej,
Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski

Streszczenie: Arsen jest pierwiastkiem powszechnie występującym w środowisku. Zanieczyszczenia gleb i wód pochodzenia naturalnego, jak i antropogenicznego, występujące w wielu krajach stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia i życia milionów ludzi. Związki arsenu są silnie toksyczne dla organizmów żywych, a ich obecność może powodować szereg negatywnych efektów zdrowotnych. Arsen z uwagi na właściwości cytotoksyczne znalazł również szerokie zastosowanie w terapiach przeciwpasożytniczych czy przeciwnowotworowych.

Arseniany są jedną z najczęstszych form nieorganicznego arsenu znajdowanych w wodzie pitnej. Wnikają do komórek z bardzo dużą wydajnością poprzez transportery specyficzne dla fosforanów, na zasadzie mimikry molekularnej. Gdy As(V) wniknie do komórki musi najpierw zostać zredukowany do As(III), aby mogło dojść do kolejnych, niezbędnych etapów jego detoksyfikacji i usuwania z komórki. Białka z podrodziny ACR2 są najlepiej poznanymi reduktazami arsenianowymi. Należą one do nadrodziny rodanaz i posiadają konserwatywny motyw $C(X)_5R$. Do tej pory scharakteryzowano dziesięć eukariotycznych reduktaz ACR2, jednak wciąż odkrywane są kolejne białka wykazujące właściwości redukujące arseniany.

Dokładne poznanie i scharakteryzowanie wszystkich białek biorących udział w procesie redukcji arsenianów przyczyni się do powstania skuteczniejszych terapii przeciwpasożytniczych, antynowotworowych oraz do zminimalizowania negatywnych skutków ostrych i przewlekłych zatruć arsenem lub innymi metalami i metaloidami. Wiedza ta może być również wykorzystana do stworzenia roślin transgenicznych akumulujących mniejsze ilości tego pierwiastka, co ostatecznie mogłoby zmniejszyć podaż arsenu wraz z dostarczanym pożywieniem.

Słowa kluczowe: arsen, toksyczność, reduktazy arsenianowe, rodanazy

Summary: Arsenic is an abundant environmental element. Soil and water arsenic contamination of both natural and anthropogenic origin is present in many countries. It poses a threat to health and

lives of millions of people. Arsenic compounds are highly toxic to organisms and may lead to serious health problems. Due to its cytotoxic properties, arsenic is widely used in antiprotozoan and anticancer therapies.
Arsenate is one of the most prevalent inorganic arsenic species found in drinking water. It enters the cell via phosphate transporters, using molecular mimicry. In order to be extruded out of the cell or to enter other detoxification pathways, arsenate must be reduced to arsenite.
ACR2 proteins are the most studied arsenate reductases. They belong to rhodanese superfamily and contain a conserved $HC(X)_5R$ motif. Thus far, ten eukaryotic arsenate reductases has been characterized. Nonetheless, more proteins with arsenate reductase activity are being discovered.
Characterization of all proteins participating in arsenate reduction pathways will contribute to the development of more effective drug therapies and reducing negative consequences of arsenic and other metalloid or metal poisonings. It might also be applied in engineering transgenic plants accumulating lower quantities of arsenic, thus reducing arsenic supply in crops.

Keywords: arsenic, toxicity, arsenate reductase, rhodanese

WSTĘP

Arsen jest toksycznym pierwiastkiem, który występuje naturalnie w skorupie ziemskiej oraz ma szerokie zastosowanie w przemyśle. Według Międzynarodowej Agencji Badań nad Nowotworami (IARC) arsen klasyfikowany jest w pierwszej grupie czynników o właściwościach kancerogennych [29]. Główną drogą ekspozycji na arsen jest woda pitna oraz skażony pokarm. Długotrwała ekspozycja na arsen w zależności od dawki, źródła, czasu i drogi ekspozycji może prowadzić do zmian chorobowych, w tym nowotworzenia, w obrębie skóry, układu pokarmowego, układu krążenia, układu oddechowego, układu endokrynnego, układu moczowo-płciowego i układu nerwowego [54]. Każdego dnia ponad 140 mln ludzi może pić wodę zawierającą arsen w ilości większej niż 10 ppb, co jest przyjęte za graniczną, bezpieczną ilość arsenu w wodzie pitnej [55].

Nieorganiczne związki arsenu są również wykorzystywane w medycynie. Arsen długo stosowany był w leczeniu trypanosomatozy (śpiączki afrykańskiej) przed wprowadzeniem eflornityny. Obecnie wykorzystuje się go w nowoczesnych terapiach przeciwnowotworowych, przy leczeniu m.in. ostrej białaczki promielocytowej [2, 19]. Niestety w wielu przypadkach, w wyniku powstania niewyjaśnionej do tej pory oporności komórek nowotworowych na arsen, terapia przeciwnowotworowa z wykorzystaniem arsenu bywa nieskuteczna [84]. Stanowi to poważny problem, ze względu na brak alternatywnych metod leczenia. Stąd tak ważne jest poznanie i zrozumienie molekularnych mechanizmów leżących u podstaw oporności komórek eukariotycznych na arsen. Co więcej, istotne jest wyjaśnienie podstaw toksyczności arsenu ze względu na dużą szkodliwość i liczbę ludzi narażonych na jego długotrwałe działanie.

Naturalnie arsen może występować na czterech stopniach utlenienia: -3, 0, +3 i +5. Najczęściej występującymi formami w środowisku i organizmach żywych są związki na +3 i +5 stopniu utlenienia. Formy trójwartościowe są bardziej toksyczne i dominują w środowiskach beztlenowych o właściwościach redukujących, jak np. skały czy muł rzeczny. Formy pięciowartościowe są mniej toksyczne dla komórek. Występują głównie w warunkach tlenowych, jak wody powierzchniowe czy gleba. W środowisku wodnym, o neutralnym pH As(V) występuje głównie w postaci oksyanionu $H_2AsO_4^-$ [60].

W komórkach organizmów żywych nieorganiczne związki arsenu mogą ulegać biotransformacji do form organicznych poprzez tworzenie kompleksów z glutationem lub metylację. Dodatkowo mogą wchodzić w skład biologicznie czynnych cząsteczek i tworzyć ich arsenowe pochodne (np. arsenocholina, arsenobetaina, arsenolipidy), które mogą być wbudowywane w struktury komórki lub być włączane w szlaki metaboliczne, zakłócając lub całkowicie blokując ich funkcjonowanie [76, 85].

Arsen był obecny w środowisku od początków życia na ziemi, stworzyło to silną presję selekcyjną na wytworzenie mechanizmów umożliwiających detoksyfikację komórek. Początkowo dominującą formą arsenu w środowisku był As(III), względem którego pierwotne komórki wykształciły różnorodne metody detoksyfikacji polegające na ograniczeniu wnikania czy zwiększeniu wydajności usuwania As(III) z komórek lub biotransformacji do mniej toksycznych form. Pojawienie się fotosyntetyzujących cyjanobakterii około 2.5 mld lat temu spowodowało zmianę charakteru środowiska na bardziej utleniające [51]. W wyniku czego przeważającą formą arsenu w środowisku stał się As(V). Większość organizmów, by przetrwać, wykształciła zdolność redukcji As(V) do bardziej toksycznego As(III), by w następnych etapach wykorzystać istniejące już szlaki detoksyfikacji As(III). Obecnie znany jest tylko jeden organizm (*Pseudomonas aeruginosa*), który wykształcił odrębny szlak detoksyfikacji As(V), w którym nie dochodzi do powstawania As(III) [13].

Enzymy zaangażowane w redukcję As(V) zazwyczaj współdziałają z elementami systemów redukujących grupy sulfonowe i wiązania dwusiarczkowe w komórce. W większości komórek, w tym w komórkach eukariotycznych, poziom redoks utrzymywany jest z wykorzystaniem glutationu, glutaredoksyny oraz reduktazy glutationu. Niektóre bakterie gram-dodatnie, jak *Staphylococcus aureus*, nie produkują glutationu. Homeostaza redoks w tych komórkach utrzymywana jest przez produkcję zredukowanej formy koenzymu A (CoA), którego pula odnawiana jest przez reduktazy CoA zależne od NADPH. Dodatkowo, obecny jest system redukcji mostków dwusiarczkowych, również zależny od NADPH, oparty na tioredoksynie (TRX) i reduktazie tioredoksyny. System ten występuje również u innych prokariotów i eukariotów [53].

Najlepiej poznanymi prokariotycznymi reduktazami arsenianowymi są białka ArsC obecne na plazmidzie R773 *Escherichia coli*, wykorzystujące glutation i glu-

taredoksynę [26] oraz ArsC wyizolowane z plazmidu pI258 S*taphylococcus aureus,* wykorzystujące tioredoksynę i reduktazę tioredoksyny w procesie redukcji As(V) [30, 40]. W komórkach eukariotycznych geny reduktaz zlokalizowane są w genomie jądrowym i wykorzystują glutaredoksynę oraz glutation jako pierwotnego donora elektronów, podobnie jak w przypadku R773 ArsC *E. coli* [43, 46].

WIĘKSZOŚĆ REDUKTAZ ARSENIANOWYCH NALEŻY DO NADRODZINY RODANAZ

Pierwsze białko z rodziny rodanaz zostało opisane w 1933 r. Był to enzym TST klasyfikowany jako sulfotransferaza tiosiarczanu, zaangażowany między innymi w detoksyfikację cyjanku w tkankach ssaczych, katalizując powstanie mniej toksycznego związku tiocyjanianowego(SCN-). W wyniku tej reakcji powstaje tiocyjanian, nazywany również rodankiem, stąd grupę enzymów przeprowadzających przeniesienie grup tiolowych nazwano rodanazami [16].

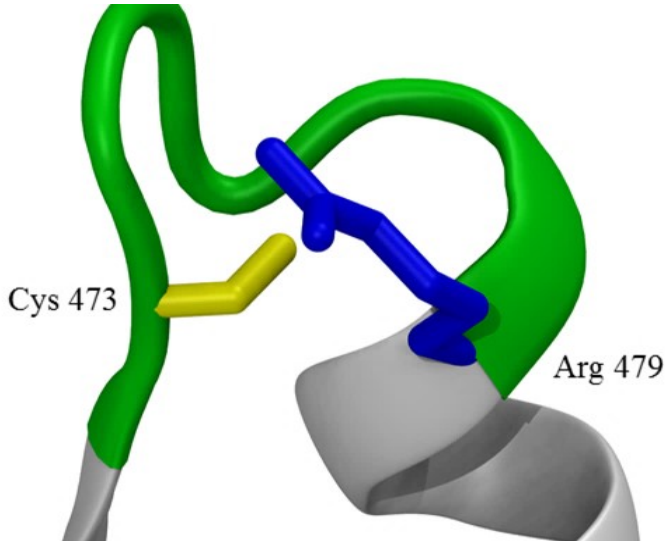
Białka należące do nadrodziny rodanaz powszechnie występują u eukariotów, prokariotów oraz archeonów. Wykazują odmienne funkcje biologiczne a ich budowa jest wysoce heterogenna, o niskim stopniu homologii. Wyjątek stanowi motyw rodanazowy, który jest wśród nich wysoce konserwatywny, a jego najbardziej zachowaną częścią jest motyw pętli aktywnej z katalityczną resztą cysteinową, która bierze udział w reakcji podwójnej wymiany, poprzez bezpośrednie wiązanie atomu siarki [8].

Ogólną reakcję katalizowaną przez rodanazy można podzielić na dwa etapy. W pierwszym – siarka jest przenoszona z tiosiarczanowego związku donorowego na cysteinę znajdującą się w pętli aktywnej, z powstaniem formy pośredniej – sulfanylo cysteiny (Cys-SSH). W drugim etapie przyłączona wcześniej siarka zostaje przeniesiona na tiofilowy akceptor – jon cyjankowy (CN-) w celu zregenerowania aktywności enzymu. W wyniku tej reakcji powstaje związek tiocyjanowy (SCN-) oraz związek z grupą siarczynową (SO_3^{2-}) [34, 35].

Istnieje kilka metod klasyfikacji białek zawierających motyw rodanazowy, np. w zależności od właściwości katalitycznych białek lub od struktury i rozproszenia domen rodanazowych w białkach.

Białka o właściwościach fosfatazowych, posiadające domenę rodanazową, tworzą nadrodzinę CC3 (ang. *Cysteine-based Class III*, inaczej rodanaz), w której wyróżnia się tylko jedną rodzinę CDC25 z 2 podrodzinami: CDC25 – w skład której wchodzą jedynie białka CDC25 o właściwościach fosfatazowych oraz podrodzinę ACR2 – do której należą białka o aktywności reduktazy arsenianowej, wśród których część wykazuje dodatkową aktywność fosfatazową [14].

Odmienny sposób klasyfikacji pomija funkcję białek i bierze pod uwagę ilość domen rodanazowych w białku oraz budowę i strukturę pętli aktywnej. W klasyfikacji tej pojedyncze białko może posiadać kilka domen rodanazowych ułożonych tandemowo lub rozproszonych lub posiadać domeny niezwiązane ewolucyjnie [15]. Stąd w nadrodzinie rodanaz wyróżnia się 4 podrodziny: białka jednodomenowe, białka o tandemowym ułożeniu domen, białka wielodomenowe oraz białka z wydłużoną pętlą aktywną. Białka z pierwszych trzech wymienionych podrodzin zaangażowane są w reakcje wykorzystujące siarkę, gdzie między innymi biorą udział w transferze siarki między różnorodnymi cząsteczkami [16]. Białka z podrodziny o wydłużonej pętli aktywnej, posiadają motyw $C(X)_5R$, gdzie C oznacza katalityczną resztę cysteinową, reszty X tworzą pętle wiążącą substrat, a R oznacza konserwatywną resztę argininową. Dzięki większej, 7 aminokwasowej, kieszeni wiążącej substrat mogą wiązać fosfor lub chemicznie podobny arsen, o większym niż siarka promieniu van der Waals'a. Białka o krótszej pętli, posiadające motyw $C(X)_4R$, mogą wchodzić w interakcje z atomami siarki i selenu, a według doniesień zespołu Sanchez-Bermejo, również arsenu [8, 27, 59].



RYCINA 1. Struktura domeny katalitycznej ludzkiego białka CDC25B (PBD: 1QB0). Kolorem zielonym oznaczono reszty aminokwasowe wchodzące w skład pętli aktywnej, kolorem żółtym oznaczono łańcuch boczny katalitycznej reszty cysteinowej, a kolorem niebieskim oznaczono łańcuch boczny konserwatywnej reszty argininowej

FIGURE 1. Crystal structure of human CDC25B catalytic domain (PBD: 1QB0). Active site loop residues are coloured green, catalytic cysteine side chain is coloured yellow and conserved arginine is coloured blue

```
ScACR2      59 GLSDTFSSSQFVK I HCTG KNR  KV AKFETY QEEDI----TSKFESCILVGGFYA
CrACR2.1    64 IA------GKAEMVVVHCMFSQQRGPRCAMALARRLEAME--QPLSPIPQVFVLRGGFTS
CrACR2.2    74 QL------AGAEQVVVHCHFSKVRGPTCARALNERLKALGL----DNAPEVKVLAGGVAG
PpACR2      61 EV------KNKETVVFHCAFSQVRGPTCARKLSEHLNNAKTFGKIEKVPSIVVLERGFNG
PvACR2      62 KL------EGQEAVVLHCCKSQHSGPACANKLVEHLATLLSKKEIEAAPQVYILEKGFTG
AtACR2      61 NV------KDKDTLVFHCALSQVRGPTCARRLVNYLDEKKED---TGIKNIMILERGFNG
OsACR2.1    60 AT------GDKDTVVFHCALSKVRGPSCAKMFSDYLSETKEE---SGTKNIMVLERGFNG
OsACR2.2    59 AT------KGKETLVFHCALSKVRGPSCAQMYLDYLSEADED---SDVKNIMVLERGFNG
LmACR2     166 FE------EKKELAVFHCAQSLVRAPKGANRFALA--QKK---LGYVLPAVYVLRGGWEA
HsCDC25B   476 SL------DKRVILIFHCEFSSERGPRMCRFIRERDRAVN-DYPSLYYPEMYILKGGYKE
```

RYCINA 2. Przyrównanie sekwencji motywów $HC(X)_5R$ w homologach ACR2; Sc – *Saccharomyces cerevisiae*; Cr – *Chlamydomonas reinhardtii;* Pp – *Physcomitrella patens;* Pv – *Pteris vittata;* At – *Arabidopsis thaliana;* Os – *Oryza sativa;* Lm – *Leishmania major;* Hs – *Homo sapiens*
FIGURE 2. Alignment of $HC(X)_5R$ motif of ACR2 homologues; Sc – *Saccharomyces cerevisiae*; Cr – *Chlamydomonas reinhardtii;* Pp – *Physcomitrella patens;* Pv – *Pteris vittata;* At – *Arabidopsis thaliana;* Os – *Oryza sativa;* Lm – *Leishmania major;* Hs – *Homo sapiens*

U eukariotów scharakteryzowano wiele reduktaz arsenianowych należących do podrodziny ACR2 o motywie $C(X)_5R$. Są to między innymi: *Sc*Acr2 u drożdży piekarniczych *Saccharomyces cerevisiae* [7, 44], *Lm*ACR2 z pasożytniczego wiciowca *Leishmania major* [83], AtACR2 *z Arabidopsis thaliana* [5], OsACR2 z ryżu siewnego *Oryza sativa* [21], HlACR2 z byliny *Holcus lanatus* [5] oraz PvACR2 z paproci *Pteris vittata* [22].

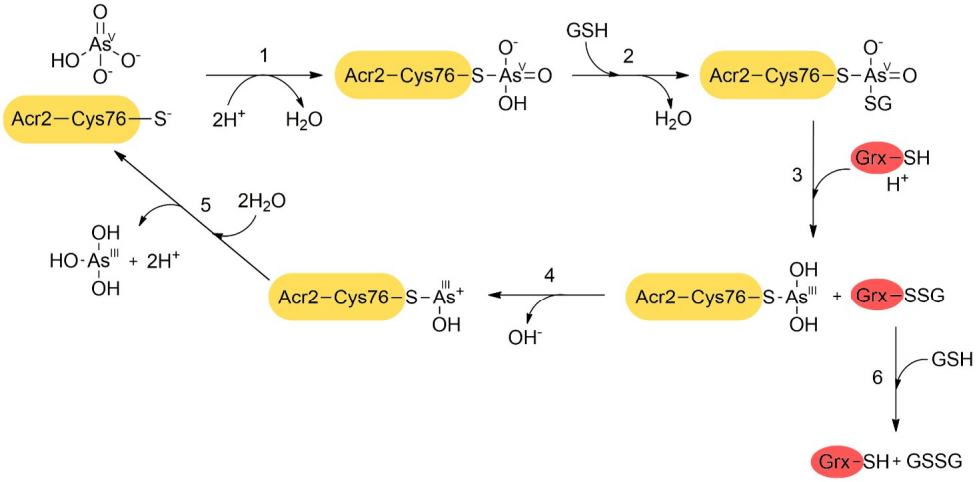
PIERWSZA REDUKTAZA ACR2 ZOSTAŁA ZIDENTYFIKOWANA U DROŻDŻY *S. CEREVISIAE*

U drożdży *S. cerevisiae* za oporność na nieorganiczne związki arsenu odpowiedzialne są produkty genów *ACR1, ACR2* oraz *ACR3*. Po raz pierwszy zostały one wyizolowane, z wykorzystaniem plazmidów wysokokopijnych, których obecność w komórkach, znacznie podniosła oporność na As(III) i As(V) [7]. Gen *ScACR1* koduje czynnik transkrypcyjny Yap8, który w obecności As(III) lub Sb(III) aktywuje ekspresję genów *ScACR2* i *ScACR3* znajdujących się pod wspólnym promotorem [6, 7, 73]. Gen *ScACR2* koduje cytoplazmatyczną reduktazę As(V) [44, 46], a gen *ScACR3* koduje błonowy antyporter As(III)/H+ oraz Sb(III)/H+ umożliwiający wypływ As(III) i Sb(III) z komórki drożdżowej [37, 38, 72].

Białko Acr2 *S. cerevisiae* jest pierwszą i jedyną do tej pory opisaną reduktazą arsenianową w tych komórkach. Gen *ScACR2* zlokalizowany jest na krótszym ramieniu chromosomu XVI, w pobliżu sekwencji telomerowej. Gen ten koduje białko *Sc*Acr2 o masie 16 kDa, składające się ze 130 aminokwasów, które izolowane jest jako homodimer o masie 34 kDa. Występują w nim trzy reszty cysteinowe, ale tylko

Cys76 wraz z Arg82 wchodzą w skład motywu $C(X)_5R$. Właściwości katalityczne Cys76 potwierdzono poprzez jej substytucję na resztę alaninową lub serynową, w wyniku czego komórki ekspresjonujące tak zmodyfikowane białko wykazywały fenotyp o zwiększonej wrażliwości na As(V). Udowodniono również, że reszta Arg82 jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania białka. Wprowadzenie mutacji R82A powodowało inaktywację enzymu, a komórki wykazywały większą wrażliwość na pięciowartościowe związki arsenu [45].

Aktywność reduktazową białka *Sc*Acr2 potwierdzono również *in vitro* poprzez wyizolowanie natywnego białka *Sc*Acr2, a następnie inkubację w obecności 100 mM Na_3AsO_4, GSH oraz *Sc*Grx. W tym badaniu redukcja As(V) była mierzona pośrednio, poprzez monitorowanie wzrostu ilości utlenionych form NADPH, gdzie poziom utlenionych form NADPH zwiększa się w czasie wskutek redukcji GSSG.



RYCINA 3. Mechanizm redukcji As(V) katalizowany przez *Sc*Acr2**.** (1) Do zredukowanej Cys76 białka Acr2 przyłącza się częściowo zdysocjowany kwas arsenowy(V) ($HAsO_4^{2-}$) poprzez wiązanie kowalencyjne. (2) W miejsce grupy hydroksylowej kwasu arsenowego(V) przyłącza się glutation. (3) Glutaredoksyna (Grx-SH) wiąże, wcześniej przyłączoną, resztę glutationu powodując redukcję As(V) do As(III) oraz dochodzi do uwolnienia kompleksu Grx-SSG. (4) Powstaje monohydroksylowa forma przejściowa kwasu arsenowego(III). (5) Dochodzi do uwolnienia kwasu arsenowego(III) i zregenerowania zredukowanej formy Acr2. (6) Kompleks Grx-SSG redukowany jest z udziałem GSH w wyniku czego dochodzi do regeneracji Grx-SH oraz powstania GSSG [40, 46]

FIGURE 3. Acr2-dependent As(V) reduction mechanism. (1) $HAsO_4^{2-}$ binds covalently to reduced Cys76 residue of Acr2. (2) Hydroxyl group is displaced by glutathione. (3) Glutaredoxin (Grx-SH) binds previously attached glutathione residue, resulting in As(V) to As(III) reduction and Grx-SSG complex release. (4) Intermediate monohydroxylated form of arsenite is formed. (5) Arsenite is released and reduced form of Acr2 regenerated. (6) Grx-SSG complex is reduced by GSH, resulting in Grx-SH regeneration and GSSG formation [40, 46]

Z kolei powstawanie GSSG jest bezpośrednio związane z procesem redukcji As(V) katalizowanym przez *Sc*Acr2. Wyniki uzyskane przez zespół Mukhopadhyay potwierdzają funkcję *Sc*Acr2 jako reduktazy As(V) oraz wskazują, że do redukcji As(V) przez *Sc*Acr2 niezbędna jest obecność glutaredoksyny oraz GSH [46].

Do komórek *S. cerevisiae* As(V) może wnikać z wykorzystaniem transporterów fosforanowych o wysokim i niskim powinowactwie, takich jak Pho84 i Pho87 [52, 79]. W związku z czym, wewnątrzkomórkowe steżenie As(V) może osiągać znacznie wyższe wartości niż stężenie zewnątrzkomórkowe. Nie dziwi więc fakt, iż *Sc*Acr2 wykazuje małe powinowactwo do As(V), zaczynające się dopiero przy stężeniu 30mM, a pomimo tego jest w stanie wydajnie pełnić swoje funkcje w komórce [46].

*Sc*Acr2 pomimo tej samej funkcji i podobnych mechanizmów działania co reduktazy bakteryjne wykazuje jedynie znikomy stopień homologii sekwencji, względem obu klas bakteryjnych reduktaz ArsC. Co więcej, R773 ArsC z *E. coli* jest monomerem, który wykazuje klasyczną kinetykę reakcji enzymatycznej, w którym szybkość reakcji enzymatycznej zależy jedynie od stężenia substratu. Z kolei *Sc*Acr2 jest homodimerem, a kinetyka jego reakcji wykazuje pozytywną kooperatywność typową dla białek multimerycznych. Fakty te przemawiają za hipotezą, iż enzymy te powstały niezależnie od siebie na drodze konwergencji [40, 46].

Co ciekawe, heterologiczna ekspresja R773 ArsC z *E. coli* w komórkach *S. cerevisiae* pozbawionych genu *ScACR2* komplementowała fenotyp wrażliwości na As(V). Ponadto, ekspresja *Sc*ACR2 w komórkach *E.coli* bez R773 ArsC jest również w stanie przywrócić oporność komórek na As(V). Mimo, że *Sc*Acr2 i R773 ArsC są enzymami niespokrewnionymi ewolucyjnie, to kofaktory obecne w komórkach bakteryjnych i drożdżowych umożliwiają ich prawidłowe funkcjonowanie podczas heterologicznej ekspresji [46].

Choć *Sc*Acr2 posiada miejsce katalityczne ^{76}C-TGSKN-R^{82}, podobne do ludzkich fosfataz tyrozynowych Cdc25A/B [23], nie wykazuje aktywności fosfatazy. Wynika to z braku motywu bogatego w reszty glicynowe GXGXXG odpowiedzialnego za wiązanie fosforanów. Mutageneza ukierunkowana w białku *Sc*Acr2 trzech reszt aminokwasowych S79G, N81G, P84G doprowadziła do powstania białka *Sc*Acr2 posiadającego motyw bogaty w glicynę ^{76}C-TG<u>G</u>K<u>G</u>-R-G<u>G</u>^{84}. Białko to uzyskało aktywność fosfatazy tyrozynowej oraz straciło zdolność do redukcji As(V). Co więcej, As(V) inhibował aktywność fosfatazową zmutowanego białka. Jest to dowód na możliwą ewolucję eukariotycznych reduktaz As(V) z fosfataz tyrozynowych, w wyniku presji ewolucyjnej związanej z pojawieniem się w środowisku arsenu na piątym stopniu utlenienia, w następstwie wzbogacenia się atmosfery ziemskiej w tlen [51, 47].

Istnieje hipoteza, że Acr2 nie pełni funkcji reduktazy As(V), bądź też nie jest jedyną reduktazą arsenianową obecną w komórkach drożdży *S. cerevisiae.* Wskazuje na to fakt, że As(V) jest wydajnie redukowany do As(III) w szczepach z de-

lecją *ScACR2* [36], a mimo to komórki są znacznie bardziej wrażliwe na As(V) w porównaniu do typu dzikiego [44]. Możliwe, że *Sc*Acr2 pełni funkcję reduktazy tylko w określonych kompartmentach komórkowych chroniąc zachodzące w nich procesy metaboliczne przed działaniem As(V). Innym wyjaśnieniem może być udział *Sc*Acr2 przy formowaniu kompleksów As(III) z grupami tiolowymi, takich jak As(III) GS_3, w wyniku czego dochodziłoby do zwiększenia tolerancji komórek na arsen [36].

W komórkach drożdży rozszczepkowych *Schizosaccharomyces pombe* nie znaleziono odpowiednika genu *ACR2* z *S. cerevisiae*. W tych komórkach może dochodzić do redukcji As(V) z udziałem fosfatazy *Sp*Cdc25, która wykazuje homologię do *Sc*Acr2 oraz fosfataz Cdc25 obecnych u ludzi czy ryżu siewnego [57]. Do tej pory nie dowiedziono, by którakolwiek z fosfataz obecnych w komórkach *S. cerevisiae* posiadała aktywność redukującą As(V), np. białko *Sc*Ych1 nie posiada właściwości redukujących As(V), a delecja genu fosfatazy *ScYCH1* nie wpływa na wrażliwość komórek na As(V) [46].

REDUKTAZY ARSENIANOWE U ROŚLIN

Obecnie coraz poważniejszy staje się problem zanieczyszczenia gleb i wód odpadami postprodukcyjnymi zawierającymi metale ciężkie i metaloidy, tj. arsen, antymon, kadm czy ołów. Intensywnie poszukuje się sposobów na remediację skażonych gruntów. Jednym ze sposobów może być wykorzystanie gatunków roślin wykazujących zdolność do wzrostu w środowisku zanieczyszczonym metaloidami i metalami ciężkimi, określanych jako metalofity, bądź hiperakumulatory. Poznanie szlaków asymilacji i detoksyfikacji metaloidów i metali ciężkich pozwoli na konstrukcję modyfikowanych roślin, w tym uprawnych, które będą gromadzić w tkankach jeszcze większe stężenia szkodliwych substancji lub takich, które będą akumulowały toksyny w mniejszych ilościach, co ograniczy ostateczną podaż tych związków dostarczanych wraz z pożywieniem [61].

Szlaki detoksyfikacji arsenu w komórkach roślinnych są dobrze poznane i wykazują duże podobieństwo między gatunkami oraz ze szlakami obecnymi u *S. cerevisiae.* Dla przykładu reduktazy ACR2 z *A. thaliana* i *O. sativa* wykazują aktywność fosfatazową, natomiast ACR2 z *P. vittata* takiej aktywności nie posiada [22, 77].

As(V) jest transportowany do komórek rośliny przez transportery fosforanowe z rodziny PHT o wysokim powinowactwie dzięki molekularnemu podobieństwu do fosforanów. Są to głównie AtPHT1;1 i AtPHT1;4 u *A. thaliana* [65, 66], PvPHT1;3 u *P. vittata* [20] i OsPHT1;8 u *O. sativa* [70, 71]. Kluczową rolę PHT we wnikaniu As(V) do komórek roślinnych potwierdza delecja OsPHT1;8, która zmniejsza ilość pobieranego As(V) o 33-57% oraz znacząco zwiększa tolerancję *O. sativa* na As(V) [70].

W komórce As(V) jest redukowany do As(III) przez reduktazy arsenianowe. Większość roślin posiada wysoki poziom aktywności endogennych reduktaz arsenianowych, mogących redukować ponad 95% pobranego As(V). Powstały As(III) jest wysoce reaktywny i łatwo tworzy kompleksy z grupami tiolowymi. W większości roślin formy As(III) są magazynowane w korzeniach. Jest to mechanizm chroniący przed dotarciem związków arsenu do wiązek przewodzących a wraz z nimi do liści i części generatywnych rośliny, gdzie mógłby wpływać na wydajność fotosyntezy [1] oraz wywoływać stres oksydacyjny [69]. Mechanizm enzymatycznej redukcji As(V) do As(III) jest więc kluczowym etapem uniemożliwiającym transport związków arsenu do tkanek nadziemnych [18].

Zahamowanie procesu redukcji As(V) w komórkach roślin prowadzi do kilkukrotnego wzrostu ilości akumulowanego arsenu w tkankach. Istotnie wzrasta też ilość arsenu zgromadzonego w częściach nadziemnych roślin, co umożliwia bardziej wydajne usuwanie arsenu ze środowiska podczas zbioru tych części roślin. Możliwe, że w przyszłości tak zmodyfikowane rośliny będą wykorzystywane w fitoremediacji gleb skażonych arsenem [18, 48, 59]. Z kolei zwiększenie aktywności endogennych reduktaz As(V) może wpłynąć na zmniejszenie ilości arsenu akumulowanego w roślinach i transportowanego do części nadziemnych. Proces ten można wykorzystać do zmniejszenia ilości arsenu akumulowanego w pędzie i ziarnach roślin jadalnych, takich jak ryż siewny [64, 74].

DWIE ODMIENNE REDUKTAZY U *A. THALIANA*

Arabidopsis thaliana jest roślinnym organizmem modelowym ze względu na mały, dobrze poznany genom oraz względnie krótki cykl życiowy. Dlatego powszechnie wykorzystywana jest w badaniach podstawowych w biologii komórki i biologii molekularnej roślin.

W komórkach *A. thaliana* obecnie wyróżnia się dwie reduktazy arsenianowe ACR2 oraz HAC1. Gen *AtACR2* jest zlokalizowany na chromosomie V i składa się z 3 egzonów, koduje 146 aminokwasowe białko AtACR2 o masie 14.5 kDa. AtACR2 wykazuje 33% identyczności i 42% podobieństwa do *Sc*Acr2, posiada również charakterystyczny dla rodanaz motyw aminokwasowy $C(X)_5R$ [18, 49].

AtACR2 wykazuje *in vitro* aktywność fosfatazy tyrozynowej i przypuszcza się, że może brać u *A. thaliana* udział w regulacji cyklu komórkowego [33]. Mutant *A. thaliana* pozbawiony genu *ACR2 (acr2)* jest bardziej wrażliwy na hydroksymocznik (czynnik wywołujący stres replikacyjny) niż rośliny typu dzikiego [68]. Z kolei heterologiczna ekspresja *AtACR2* u *S. pombe* prowadzi do zmniejszenia rozmiaru komórek z powodu zwiększenia szybkości podziałów mitotycznych [67]. Jednakże nie obserwuje się różnic fenotypowych w warunkach kontrolnych między roślinami z delecją lub nadekspresją genu *AtACR2* a roślinami typu dzikiego [18, 36, 48]. Co ciekawe, białko fuzyjne AtACR2-Gfp lokalizuje

się w mitochondriach [50]. Lokalizacja ta zdaje się pozostawać w sprzeczności z możliwym zaangażowaniem AtACR2 w regulację cyklu komórkowego.

Główną postulowaną funkcją AtACR2 jest redukcja As(V) do As(III) z udziałem Cys136 i Cys145 [49]. Zdolność do redukcji As(V) przez AtACR2 w ostatnich latach poddawana jest jednak w wątpliwość, mimo to zdecydowana większość badań potwierdza aktywność reduktazową AtACR2 [18, 22, 36, 48]. Za właściwościami redukującymi As(V) AtACR2 przemawiają badania zespołu Dhankher, podczas których wyciszono ekspresję *AtACR2* z wykorzystaniem RNAi, w wyniku czego doszło do 5-6 krotnego zmniejszenia świeżej masy roślin rosnących na podłożu z As(V) w porównaniu do roślin typu dzikiego. Ekspresja heterologiczna *AtACR2* w komórkach *E. coli* pozbawionych *ArsC* prowadziła do komplementacji fenotypu wrażliwości komórek bakterii na As(V) [18]. Z kolei badania zespołu Liu wskazują na brak właściwości redukujących As(V) przez białko AtACR2. W badaniu stworzono linie mutantów insercyjnych T-DNA *A. thaliana* z wyłączonym genem *acr2* oraz linię nadekspresjonującą *AtACR2*. W liniach insercyjnych nie zaobserwowano zmniejszenia poziomu redukcji As(V), ani zmian ilościowych w pobieraniu As(V) do komórek czy wypływu As(III) z komórek. Nadekspresja *AtACR2* nie miała wpływu na ilość As(III) magazynowanego w roślinach. Wszystkie pomiary ilości arsenu w roślinach dokonywano po maksymalnie 1 tygodniu inkubacji roślin z As(V) w podłożu. Co więcej, mutacja ani nadekspresja *AtACR2* nie miały wpływu na długość korzeni roślin hodowanych na podłożu z As(V) [36]. Wykorzystanie odmiennych metod tworzenia linii *A. thaliana* pozbawionych aktywności AtACR2 przez obi egrupy może tłumaczyć rozbieżność w wynikach. Z uwagi na to, że *AtACR2* i *AtHAC1* wykazują podobieństwo sekwencji w regionie, który został użyty do wyciszenia ekspresji *AtACR2* przez zespół Dhankher możliwe, że wykorzystane RNAi nie tylko wyciszało ekspresję *AtACR2*, ale również *AtHAC1*. Tłumaczyłoby to fenotyp wrażliwości na As(V) roślin obserwowany przez zespół Dhankher [58]. Zespół Liu nie odniósł się, ani nie powtórzył wyników heterologicznej ekspresji *AtACR2* w komórkach *E. coli* pozbawionych *ArsC*, gdzie roślinna reduktaza ACR2 komplementowała fenotyp wrażliwości na As(V).

Wyniki grupy Liu pokazują, że po 1 tygodniowej inkubacji mutantów insercyjnych *acr2 A. thaliana* ze 100mM As(V) ilość całkowitego akumulowanego arsenu w liniach mutantów jest taka sama jak w roślinach typu dzikiego. Może to dowodzić braku właściwości redukujących As(V) przez produkt genu *AtACR2,* a w konsekwencji braku akumulacji arsenu w komórkach *A. thaliana*. Grupa Nahar powtórzyła i potwierdziła wyniki grupy Liu z 2012 roku, ale również wskazała, że przy dłuższym, 3 tygodniowym, okresie inkubacji mutantów *acr2* ze 100mM As(V) całkowita ilość zakumulowanego arsenu w zmutowanej linii jest 3- krotnie większa niż w roślinach typu dzikiego. Co wskazuje na aktywność reduktazową AtACR2 oraz

wpływ na akumulację arsenu w komórkach *A. thaliana* i jest podstawą do twierdzenia, że białko AtACR2 posiada właściwości reduktazy arsenianowej [36, 48].

W 2014 r. badanie asocjacyjne całego genomu (GWAS) *A. thaliana* wskazało na istnienie nieznanego wcześniej białka HAC1 o aktywności reduktazy arsenianowej. Białko AtHAC1 należy do nadrodziny rodanaz, ale nie do podrodziny ACR2, ponieważ posiada krótszy motyw pętli aktywnej $C(X)_4R$ oraz wykazuje większe podobieństwo w budowie do sulfotransferaz niż do białek z podrodziny ACR2. AtHAC1 zbudowane jest ze 169 aminokwasów oraz wykazuje 46% identyczności i 62% podobieństwa do białka AtSTR16 o aktywności sulfotransferazy tiosiarczanu, a względem AtACR2 wykazuje jedynie 16% identyczności i 33.7% podobieństwa [12, 59].

Najwyższy poziom ekspresji *AtHAC1* obserwowany jest w korzeniach, a białko w fuzji z Gfp lokalizuje się cytoplazmatycznie i jądrowo. *In vitro* AtHAC1 wykazuje aktywność reduktazy arsenianowej o parametrach podobnych do wcześniej zidentyfikowanych eukariotycznych reduktaz arsenianowych. Mutant insercyjny T-DNA *hac1* wykazuje zwiększoną wrażliwość na As(V) oraz akumuluje znacznie większą ilość arsenu w korzeniach i pędzie. Wnioskować z tego można, że redukcja As(V) z udziałem AtHAC1 w korzeniach ogranicza ilość arsenu ładowanego do ksylemu i transportowanego do pędu. Heterologiczna ekspresja *AtHAC1* w komórkach *E. coli* pozbawionych endogennej reduktazy ArsC, przywraca komórkom fenotyp oporności na As(V). Co więcej dowiedziono, że między AtHAC1 i AtACR2 nie występują interakcje epistatyczne, co może sugerować ich odmienny mechanizm działania lub zaangażowanie w różne szlaki metaboliczne [12, 59].

REDUKTAZY ARSENIANIOWE U *ORYZA SATIVA*

Genom ryżu *O. sativa* zawiera dwa homologii ACR2: *OsACR2.1* i *OsACR2.2.* Obie sekwencje kodują białka zdolne do redukcji As(V). Badania wykazały, że heterologiczna ekspresja *OsACR2*.1 komplementuje wrażliwy na arsen fenotyp szczepów Δ*arsC E. coli* oraz *acr2*Δ *S. cerevisiae*, choć *OsACR2.2* w znacznie mniejszym stopniu. Co ciekawe, oczyszczone OsACR.1 i OsACR2.2 charakteryzują się nie tylko aktywnością reduktazową, ale również fosfatazową. Ponadto, mutageneza reszty cysteinowej w motywie $HC(X)_5R$ doprowadziła do niemal całkowitej utraty aktywności reduktazy arsenianowej i fosfatazy [21].

Ekspresja obydwu genów w *O. sativa* zachodzi na niskim poziomie, w tym *OsACR2.2* jedynie w korzeniach. Po ekspozycji na As(V) ekspresja *OsACR2.1* w pędach i korzeniach silnie wzrasta, *OsACR2.2* wzrasta w korzeniach, ale w mniejszym stopniu [21]. Regulacja ekspresji arsenem występuje również w przypadku *ScACR2* [38]. Warto też wspomnieć, że niewielki wzrost ekspresji w stresie As(V) zaobserwowano u *AtACR2* [66].

O. sativa posiada przynajmniej 12 homologów omawianej już reduktazy arsenianowej AtHAC, z których funkcje trzech zostały opisane: OsHAC1;1, OsHAC1;2 oraz OsHAC4. Ekspresja *OsHAC1;1* i *OsHAC1;2* komplementuje wrażliwy na arsen fenotyp Δ*arsC E. coli*, a oba enzymy wykazują aktywność reduktazy aresniano-

wej. Ekspozycja roślin na As(V) znacząco zwiększa ekspresję obu genów. Ponadto delecja *OsHAC1;1* lub *OsHAC1;2* zmniejsza redukcję As(V) do As(III) w korzeniach, zmniejszając tym samym wyrzut As(III) do medium, przy jednoczesnym wzroście akumulacji arsenu w korzeniach. Z kolei nadekspresja każdego z genów zwiększała wyrzut As(III) do medium i tolerancję na As(V) [64].

OsHAC4 zwrócił uwagę badaczy podczas poszukiwania mutantów hiperwrażliwych na As(V). Wykazuje duże podobieństwo w sekwencji aminokwasowej z OsHAC1;1 (89%) i OsHAC1;2 (81%), a białko fuzyjne OsHAC4-eGFP ekspresjonowane w komórkach liści tytoniu *Nicotiana benthamiana* lokalizowało się w cytoplazmie oraz na terenie jądra [74], podobnie jak AtHAC1 [59]. *OsHAC4* ekpresjonowany heterologicznie w Δ*arsC E. coli*, komplementuje wrażliwy na arsen fenotyp i wykazuje aktywność reduktazową na poziomie podobnym do OsHAC1;1. W *O. sativa* ulega wysokiej ekspresji w korzeniach i jest indukowany As(V). Co więcej, nadekspresja *OsHAC4* zwiększa tolerancję na As(V) i jednocześnie zmniejsza akumulację arsenu w tkankach [74]. Wyniki te wskazują na kluczową rolę badanych homologów AtHAC1 w mechanizmach redukcji As(V) i detoksyfikacji komórek *O. sativa*.

EKSPRESJA *ACR2* W HIPERAKUMULATORACH

Pteris vittata jest gatunkiem paproci będącym hiperakumulatorem arsenowym. Może tolerować stężenia arsenu do 1500 mg*kg-1 w glebie [63] i jest w stanie akumulować nawet do 19,300 ppm [80]. U gatunku tego zidentyfikowano dwie reduktazy arsenianowe ACR2: PvACR2 oraz Pv2.5-8. Ulegają one konstytutywnej ekspresji w liściach, korzeniach i gametofitach i do redukcji wykorzystują glutation [11]. Co ciekawe, poziom mRNA *ACR2* i *Pv2.5-8* zwiększa się w korzeniach traktowanych arsenem, ale nie w liściach. Różnice te nie przekładają się jednak na poziom produktów białkowych.

PvACR2 (134 aa) dzieli 25% identyczności i 47% podobieństwa z *Sc*Acr2. PvACR2 jest jedynym homologiem ACR2, w którym w miejscu konserwatywnej reszty argininowej w motywie $HC(X)_5R$ występuje reszta serynowa. Heterologiczna ekspresja *PvACR2* w komórkach drożdżowego szczepu delecyjnego *acr2*Δ komplementuje fenotyp wrażliwości na As(V). Oczyszczone PvACR2 wykazuje aktywność reduktazy arsenianowej, ale nie fosfatazy [22].

Masa wyizolowanego Pv2.5-8 wynosi około 34.55 kDa i jest dużo mniejsza niż masa przewidywana na podstawie sekwencji nukleotydowej (45 kDa). Być może Pv2.5-8 ulega modyfikacjom potranslacyjnym. Co ciekawe, w elektroforezie dwukierunkowej (2-DE) Pv2.5-8 migruje w postaci sześciu prążków z pI w zakresie od 8.3 do 8.9 [11].

Warto dodać, że PvACR2 i Pv2.5-8 nie są jedynymi opisanymi reduktazami aresnianowymi u *Pteris vittata*. PvGSTF1 to S-transferaza glutationu, która *in vitro* wykazuje aktywność reduktazową [10], a jej ekspresja w *E. coli* komplementuje wrażliwy na As(V) fenotyp szczepu Δ*arsC* [32].

REDUKTAZY ARSENIANOWE U MCHÓW I ZIELENIC

Reduktaza As(V) została również zidentyfikowana u modelowego gatunku mchów – *Physcomitrella patens*. *P. patens* może zakumulować aż do 565,4 mg As/kg suchej masy [78], co może być związane z adaptacją do życia w warunkach ekspozycji na metaloidy, ponieważ mszaki występują powszechnie w środowiskach, gdzie obecny jest nieorganiczny arsen.

Białko PpACR2 zbudowane jest ze 134 reszt aminokwasowych i wykazuje 39% podobieństwa do CrACR2 i 41% do AtACR2. Heterologiczna ekspresja *PpACR2* w szczepie *E. coli* Δ*arsC* nadaje komórkom zdolność do redukcji As(V). Ponadto, aktywność reduktazy zaobserwowano przez wzrost utleniania NADPH w obecności oczyszczonego białka PpACR2 i GSH, glutaredoksyny-2 i As(V), co odzwierciedla redukcję As(V) do As(III) [78].

Chlamydomonas reinhardtii to gatunek jednokomórkowych zielenic, u których redukcja As(V) pełni ważną rolę w detoksyfikacji. Zidentyfikowano u niego dwa homologii ACR2: CrACR2.1 (135 aa) i CrACR2.2 (147 aa). Białka te dzielą odpowiednio 27,46% i 25% podobieństwa z OsACR2. Ekspresja obu genów, w pozbawionym reduktazy szczepie *E. coli* Δ*arsC,* zwiększa jego oporność na As(V), przy czym *CrACR2.2* tylko przy niskim stężeniu arseninu. Ponadto, Δ*arsC* ekspresjonujący *CrACR2.1* i *CrACR2.2* wykazuje aktywność reduktazową [77].

*Lm*ACR2 BIERZE UDZIAŁ W AKTYWACJI PENTOSTAMU

Leiszmanioza to pasożytnicza choroba wywoływana przez wiciowce z rodzaju *Leishmania*. Pentostam i glucantime stosowane w terapii przeciw leiszmaniozie zawierają pięciowartościowy antymon, który w celu przejścia do aktywnej formy leku musi ulec redukcji do formy trójwartościowej. Za aktywację leku przynajmniej częściowo odpowiada należąca do rodziny ACR2 reduktaza *Lm*ACR2 [83].

Ekspresja *Lm*Acr2 komplementuje fenotyp wrażliwości na As(V) szczepu *S. cerevisiae* z delecją genu *ScACR2*, a także w szczepie *E. coli* Δ*arsC*. *Lm*ACR2 do aktywności reduktazowej wymaga obecności GSH i glutaredoksyny. Redukuje zarówno Sb(V) (Km=7uM), jak i As(V) (Km=6mM), przy czym proces jest ten zdecydowanie wydajniejszy dla Sb(V) [83].

Białko *Lm*ACR2 jest zbudowane ze 127 reszt aminokwasowych. Wykazuje 28% identyczności i 44% podobieństwa do białka *Sc*Acr2. Oba homologii posiadają motyw $FHC(X)_5R$ [45, 83]. Analiza mutacyjna wykazała, że również w *Lm*ACR2 motyw $HC(X)_5R$ jest odpowiedzialny za aktywność katalityczną [82]. W odróżnieniu od homodimerycznego *Sc*Acr2, *Lm*ACR2 jest białkiem monomerycznym [83].

LmAcr2 oprócz właściwości redukujących, posiada aktywność fosfatazy tyrozynowej. Oczyszczony enzym *in vitro* wykazuje zdolność do defosforylacji reszt ty-

rozynowych syntetycznego peptydu LCK_{50} [82]. Co ciekawe, *Leishmania* w swoim cyklu życiowym nie jest narażona na bezpośrednie działanie As(V) czy Sb(V), które mogłyby wywrzeć presję ewolucyjną na *Lm*ACR2. Główną funkcją enzymu wydaje się być raczej defosforylacja substratów. Pozostawałoby to w zgodzie z koncepcją ewolucji eukariotycznych reduktaz z fosfataz tyrozynowych [42, 47].

LUDZKIE FOSFATAZY CDC25 WYKAZUJĄ AKTYWNOŚĆ REDUKTAZOWĄ

Kompleksy CDK są kluczowymi regulatorami cyklu komórkowego i są inhibowane przez fosforylację dwóch reszt aminokwasowych znajdujących się w pętli wiążącej ATP (Thr14 i Tyr15 CDK1), przez kinazy WEE1 i MYT113. Fosfatazy Cdc25 aktywują kompleksy CDK właśnie przez defosforylację tych dwóch reszt, umożliwiając tym samym progres cyklu komórkowego. Stąd nadekspresja Cdc25A i Cdc25B jest często spotykana w wielu nowotworach [9]

Katalityczna domena ludzkiej fosfatazy Cdc25 dzieli homologię z reduktazami ACR2 (**Ryc.2**). Razem należą do nadrodziny rodanaz/Cdc25 i posiadają motyw $C(X)_5R$. Zidentyfikowano trzy izoformy Cdc25: Cdc25A, Cdc25B i Cdc25C. Domeny katalityczne Cdc25 wykazują aktywność fosfatazową, ale co ciekawe – u Cdc25B i Cdc25C obserwuje się również aktywność reduktazy arsenianowej. Substytucja reszty cysteinowej lub argininowej w motywie $C(X)_5R$ skutkuje utratą aktywności fosfatazowej [75], ale także reduktazowej [4].

Struktury krystaliczne Cdc25A [23] i Cdc25B [56] oraz *Lm*ACR2 [42] zostały rozwiązane. Ich porównanie wykazało, że konformacja pętli zawierającej miejsce aktywne *Lm*ACR2 jest podobna do konformacji domeny katalitycznej enzymów Cdc25 i każda z nich zawiera motyw $C(X)_5R$ [4].

PODSUMOWANIE

Związki arsenu występują powszechnie w wodzie i glebie stwarzając poważne zagrożenie dla ludzi, zwierząt i roślin. Szacuje się że miliony osób na całym świecie mogą być wystawione na długotrwałą ekspozycję na związki arsenu, co może prowadzić do nowotworzenia lub nawet ostrych zatruć arsenem. Dokładne poznanie białek umożliwiających wnikanie, procesowanie i usuwanie arsenu z komórek jest niezbędne do powstania skutecznych terapii antynowotworowych z wykorzystaniem związków arsenu oraz do rozwoju bardziej skutecznych terapii przy zatruciach arsenem. Możliwe jest również wykorzystanie obecnej wiedzy przy projektowaniu roślin transgenicznych, które w zależności od potrzeby byłyby w stanie akumulować mniejsze lub znacznie większe ilości arsenu w swoich tkankach.

Jednym z głównych mechanizmów toksyczności arsenu jest wywoływanie stresu oksydacyjnego. W komórkach powstaje przede wszystkim znaczna ilość reaktywnych form tlenu i azotu, prawdopodobnie w wyniku zastępowania fosforu przez arsen w białkach i substratach zaangażowanych w oddychanie komórkowe. Dodatkowo, dochodzi do zmniejszenia ilości GSH względem GSSG w komórkach wskutek wykorzystywania GSH w procesie redukcji As(V) oraz w czasie formowania koniugatów $As(GS)_3$ [24].

W trakcie leczenia pacjentów zatrutych arsenem, często stosuje się związki chelatujące jony metali, które dzięki obecności grup tiolowych w ich strukturze są w stanie wiązać jony arsenu, unieczynniając je, dzięki czemu mogą zostać usunięte przez nerki wraz moczem. Obecność grup tiolowych może również przyczyniać się do zmniejszania ilość reaktywnych form tlenu i azotu w komórkach. Przy zatruciach arsenem podaje się głównie DMPS (kwas 2,3-dimerkapto-1-propanosulfonowy), ale również stosuje się dimerkaprol i DMSA (kwas 2,3-dimerkaptobursztynowy) chociaż są one bardziej toksyczne i mniej skuteczne niż DMPS. Obecnie intensywne badania prowadzone są również nad izoamylową pochodną DMSA, MiADMSA, która ze względu na większą lipofilowość miałaby lepiej przenikać przez barierę krew-mózg [25]

Badania wskazują że podawanie naturalnych lub sztucznych antyoksydantów również może zmniejszać stres oksydacyjny wywołany arsenem. Przebadane zostały między innymi kwas askorbinowy (wit. C), α-tokoferol (wit. B), ryboflawina (wit. B2) [31, 81], β-karoten [28], tauryna [24], kwercetyna, kwas liponowy [3] czy N-acetylocysteina (NAC) [17]. Dodatkowo zastosowanie terapii kombinowanej z wykorzystaniem witaminy C oraz DMSA na modelu szczurzym, dało lepsze efekty terapeutyczne niż monoterapie [41]. W przyszłości terapie kombinowane wykorzystujące zarówno chelatory, jak i antyoksydanty mogą być najskuteczniejszą formą leczenia przewlekłych i ostrych zatruć arsenem.

Antymon pięciowartościowy jest składnikiem najczęściej stosowanych leków w terapii przeciw leiszmaniozie (Pentostam, Glucantime). W celu aktywacji musi zostać zredukowany do wysoce toksycznej formy trójwartościowej. Do redukcji zachodzi zarówno w zarażonych postacią amastigota makrofagach, jak i komórkach *Leishmania*. Sb(V) jest pobierany przez makrofagi zarażone amastigota. Następnie część pobranego Sb(V) ulega redukcji do Sb(III) i jest transportowana do amastigota przez AQP1. Pozostały niezredukowany Sb(V) jest również pobierany przez amastigota i następnie redukowany do Sb(III) przez *Lm*ACR2 [83]. Ponadto, podatność na Sb(V) związana jest z poziomem aktywności reduktazowej *Leishmania* [62]. Niestety gatunki *Leishmania* wykazują różną wrażliwość na Sb(III), co może być związane z odmienną regulacją ekspresji genów uczestniczących w ścieżce aktywacji leków, np. AQP1 [39]. Szersze zbadanie tych mechanizmów pozwoli w przyszłości na opracowanie skuteczniejszych terapii.

PODZIĘKOWANIA

Artykuł finansowany z „Subwencja 2020 – Działalność Badawcza (501) – Nauki Biologiczne (73) (Zakład Genetyki i Fizjologii Komórki)”

LITERATURA

[1] Azizur Rahman M, Hasegawa H, Mahfuzur Rahman M, Nazrul Islam M, Majid Miah MA, Tasmen A. Effect of arsenic on photosynthesis, growth and yield of five widely cultivated rice (Oryza sativa L.) varieties in Bangladesh. *Chemosphere* 2007; **67**: 1072-1079.

[2] Aznab M, Rezaei M. Induction, consolidation, and maintenance therapies with arsenic as a single agent for acute promyelocytic leukaemia in a 11-year follow-up. *Hematological Oncology* 2017; **35**: 113-117.

[3] Bhatt K, Flora SJS. Oral co-administration of α-lipoic acid, quercetin and captopril prevents gallium arsenide toxicity in rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 2009; **28**: 140-146.

[4] Bhattacharjee H, Sheng J, Ajees AA, Mukhopadhyay R, Rosen BP. Adventitious arsenate reductase activity of the catalytic domain of the human Cdc25B and Cdc25C phosphatases. *Biochemistry* 2010; **49**: 802-809.

[5] Bleeker PM, Hakvoort HWJ, Bliek M, Souer E, Schat H. Enhanced arsenate reduction by a CDC25-like tyrosine phosphatase explains increased phytochelatin accumulation in arsenate-tolerant Holcus lanatus. *Plant J* 2006; **45**: 917-929.

[6] Bobrowicz P, Ułaszewski S. Arsenical – induced transcriptional activation of the yeast Saccharomyces cerevisiae ACR2 and ACR3 genes requires the presence of the ACR1 gene product. *Cellular and Molecular Biology Letters* 1998; 1.03.

[7] Bobrowicz P, Wysocki R, Owsianik G, Goffeau A, Ułaszewski S. Isolation of three contiguous genes, ACR1, ACR2 and ACR3, involved in resistance to arsenic compounds in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Yeast* 1997; **13**: 819-828.

[8] Bordo D, Bork P. The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. Sequence-structure-function relations. *EMBO Rep* 2002; **3**: 741-746.

[9] Boutros R, Lobjois V, Ducommun B. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer* 2007; **7**: 495-507.

[10] Cai C, Lanman NA, Withers KA et al. Three Genes Define a Bacterial-Like Arsenic Tolerance Mechanism in the Arsenic Hyperaccumulating Fern Pteris vittata. *Curr Biol* 2019; **29**: 1625-1633.e3.

[11] Cesaro P, Cattaneo C, Bona E, Berta G, Cavaletto M. The arsenic hyperaccumulating Pteris vittata expresses two arsenate reductases. *Sci Rep* 2015; **5**: 14525.

[12] Chao D-Y, Chen Y, Chen J et al. Genome-wide association mapping identifies a new arsenate reductase enzyme critical for limiting arsenic accumulation in plants. *PLoS Biol* 2014; **12**: e1002009.

[13] Chen J, Yoshinaga M, Garbinski LD, Rosen BP. Synergistic interaction of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase and ArsJ, a novel organoarsenical efflux permease, confers arsenate resistance. *Mol Microbiol* 2016; **100**: 945-953.

[14] Chen MJ, Dixon JE, Manning G. Genomics and evolution of protein phosphatases. *Sci Signal* 2017; **10**: 474.

[15] Cipollone R, Ascenzi P, Tomao P, Imperi F, Visca P. Enzymatic detoxification of cyanide: clues from Pseudomonas aeruginosa Rhodanese. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2008; **15**: 199-211.

[16] Cipollone R, Ascenzi P, Visca P. Common themes and variations in the rhodanese superfamily. *IUBMB Life* 2007; **59**: 51-59.

[17] Crinelli R, Zara C, Smietana M, Retini M, Magnani M, Fraternale A. Boosting GSH Using the Co-Drug Approach: I-152, a Conjugate of N-acetyl-cysteine and β-mercaptoethylamine. *Nutrients* 2019; **11**: 1291.

[18] Dhankher OP, Rosen BP, McKinney EC, Meagher RB. Hyperaccumulation of arsenic in the shoots of Arabidopsis silenced for arsenate reductase (ACR2). *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 5413-5418.

[19] Dilda PJ, Hogg PJ. Arsenical-based cancer drugs. *Cancer Treat Rev* 2007; **33**: 542-564.

[20] DiTusa SF, Fontenot EB, Wallace RW et al. A member of the Phosphate transporter 1 (Pht1) family from the arsenic-hyperaccumulating fern Pteris vittata is a high-affinity arsenate transporter. *New Phytol* 2016; **209**: 762-772.

[21] Duan G-L, Zhou Y, Tong Y-P, Mukhopadhyay R, Rosen BP, Zhu Y-G. A CDC25 homologue from rice functions as an arsenate reductase. *New Phytol* 2007; **174**: 311-321.

[22] Ellis DR, Gumaelius L, Indriolo E, Pickering IJ, Banks JA, Salt DE. A novel arsenate reductase from the arsenic hyperaccumulating fern Pteris vittata. *Plant Physiol* 2006; **141**: 1544-1554.

[23] Fauman EB, Cogswell JP, Lovejoy B et al. Crystal structure of the catalytic domain of the human cell cycle control phosphatase, Cdc25A. *Cell* 1998; **93**: 617-625.

[24] Flora SJS. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radic Biol Med* 2011; **51**: 257-281.

[25] Flora SJS. Preventive and Therapeutic Strategies for Acute and Chronic Human Arsenic Exposure. *Arsenic in Drinking Water and Food*. Singapore: Springer, 2020; 341-370.

[26] Gladysheva TB, Oden KL, Rosen BP. Properties of the arsenate reductase of plasmid R773. *Biochemistry* 1994; **33**: 7288-7293.

[27] Hofmann K, Bucher P, Kajava AV. A model of Cdc25 phosphatase catalytic domain and Cdk-interaction surface based on the presence of a rhodanese homology domain. *J Mol Biol* 1998; **282**: 195-208.

[28] Hsueh YM, Chiou HY, Huang YL et al. Serum beta-carotene level, arsenic methylation capability, and incidence of skin cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; **6**: 589-596.

[29] IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISK TO HUMANS. Arsenic and arsenic compounds. *Arsenic, Metals, Fibres and Dusts*. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2012; 1-526.

[30] Ji G, Silver S. Reduction of arsenate to arsenite by the ArsC protein of the arsenic resistance operon of Staphylococcus aureus plasmid pI258. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 9474-9478.

[31] Kadirvel R, Sundaram K, Mani S, Samuel S, Elango N, Panneerselvam C. Supplementation of ascorbic acid and alpha-tocopherol prevents arsenic-induced protein oxidation and DNA damage induced by arsenic in rats. *Hum Exp Toxicol* 2007; **26**: 939-946.

[32] Khan AA, Ellis DR, Huang X et al. Glutathione-S-transferase from the arsenic hyperaccumulator fern Pteris vittata can confer increased arsenate resistance in Escherichia coli. *BioRxiv* 2018; **1**: 379511.

[33] Landrieu I, Hassan S, Sauty M et al. Characterization of the Arabidopsis thaliana Arath; CDC25 dual-specificity tyrosine phosphatase. *Biochemical and biophysical research communications* 2004;**322**: 734-739.

[34] Leininger KR, Westley J. The Mechanism of the Rhodanese-catalyzed Thiosulfate-Cyanide Reaction THERMODYNAMIC AND ACTIVATION PARAMETERS. *Journal of Biological Chemistry* 1968; **243**: 1892-1899.

[35] Libiad M, Motl N, Akey DL et al. Thiosulfate sulfurtransferase-like domain–containing 1 protein interacts with thioredoxin. *Journal of Biological Chemistry* 2018; **293**: 2675-2686.

[36] Liu W, Schat H, Bliek M et al. Knocking out ACR2 does not affect arsenic redox status in Arabidopsis thaliana: implications for as detoxification and accumulation in plants. *PLoS One* 2012; **7**: e42408.

[37] Maciaszczyk-Dziubinska E, Migocka M, Wysocki R. Acr3p is a plasma membrane antiporter that catalyzes As (III)/H+ and Sb (III)/H+ exchange in Saccharomyces cerevisiae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 2011; **1808**: 1855-1859.

[38] Maciaszczyk-Dziubinska E, Wawrzycka D, Sloma E, Migocka M, Wysocki R. The yeast permease Acr3p is a dual arsenite and antimonite plasma membrane transporter. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 2010; **1798**: 2170-2175.
[39] Mandal G, Mandal S, Sharma M et al. Species-specific antimonial sensitivity in Leishmania is driven by post-transcriptional regulation of AQP1. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; **9**: e0003500.
[40] Messens J, Silver S. Arsenate reduction: thiol cascade chemistry with convergent evolution. *Journal of molecular biology* 2006; **362**: 1-17.
[41] Mittal M, Chatterjee S, Flora SJS. Combination therapy with vitamin C and DMSA for arsenic–fluoride co-exposure in rats. *Metallomics* 2018; **10**: 1291-1306.
[42] Mukhopadhyay R, Bisacchi D, Zhou Y, Armirotti A, Bordo D. Structural characterization of the As/Sb reductase LmACR2 from Leishmania major. *Journal of molecular biology* 2009; **386**: 1229-1239.
[43] Mukhopadhyay R, Rosen BP, Phung LT, Silver S. Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol Rev* 2002; **26**: 311-325.
[44] Mukhopadhyay R, Rosen BP. Saccharomyces cerevisiae ACR2 gene encodes an arsenate reductase. *FEMS microbiology letters* 1998; **168**: 127-136.
[45] Mukhopadhyay R, Rosen BP. The phosphatase C(X)5R motif is required for catalytic activity of the Saccharomyces cerevisiae Acr2p arsenate reductase. *J Biol Chem* 2001; **276**: 34738-34742.
[46] Mukhopadhyay R, Shi J, Rosen BP. Purification and characterization of ACR2p, the Saccharomyces cerevisiae arsenate reductase. *J Biol Chem* 2000; **275**: 21149-21157.
[47] Mukhopadhyay R, Zhou Y, Rosen BP. Directed evolution of a yeast arsenate reductase into a protein-tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 2003; **278**: 24476-24480.
[48] Nahar N, Rahman A, Ghosh S, Nawani N, Manual A. Functional studies of AtACR2 gene putatively involved in accumulation, reduction and/or sequestration of arsenic species in plants. *Biologia* 2017; **72**: 520-526.
[49] Nahar N, Rahman A, Moś M et al. In silico and in vivo studies of an Arabidopsis thaliana gene, ACR2, putatively involved in arsenic accumulation in plants. *J Mol Model* 2012; **18**: 4249-4262.
[50] Narsai R, Law SR, Carrie C, Xu L, Whelan J. In-depth temporal transcriptome profiling reveals a crucial developmental switch with roles for RNA processing and organelle metabolism that are essential for germination in Arabidopsis. *Plant physiology* 2011; **157**: 1342-1362.
[51] Och LM, Shields-Zhou GA. The Neoproterozoic oxygenation event: environmental perturbations and biogeochemical cycling. *Earth-Science Reviews* 2012; **110**: 26-57.
[52] Persson BL, Petersson J, Fristedt U, Weinander R, Berhe A, Pattison J. Phosphate permeases of Saccharomyces cerevisiae: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1422**: 255-272.
[53] Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol* 2003; **66**: 1499-1503.
[54] Rasheed H, Slack R, Kay P. Human health risk assessment for arsenic: a critical review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 2016; **46**: 1529-1583.
[55] Ravenscroft P, Brammer H, Richards K. Arsenic Pollution. *A Global Synthesis*. Singapore: John Wiley & Sons, 2011.
[56] Reynolds RA, Yem AW, Wolfe CL, Deibel MR, Chidester CG, Watenpaugh KD. Crystal structure of the catalytic subunit of Cdc25B required for G2/M phase transition of the cell cycle. *J Mol Biol* 1999; **293**: 559-568.
[57] Salgado A, López-Serrano Oliver A, Matia-González AM et al. Response to arsenate treatment in Schizosaccharomyces pombe and the role of its arsenate reductase activity. *PLoS ONE* 2012; **7**: e43208.
[58] Salt DE. Would the real arsenate reductase please stand up? *New Phytol* 2017; **215**: 926-928.
[59] Sánchez-Bermejo E, Castrillo G, Del Llano B et al. Natural variation in arsenate tolerance identifies an arsenate reductase in Arabidopsis thaliana. *Nature Communications* 2014; **5**: 1-9.

[60] Sarkar A, Paul B. The global menace of arsenic and its conventional remediation – A critical review. *Chemosphere* 2016; **158**: 37-49.
[61] Sarwar N, Imran M, Shaheen MR et al. Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: Modifications and future perspectives. *Chemosphere* 2017; **171**: 710-721.
[62] Shaked-Mishan P, Ulrich N, Ephros M, Zilberstein D. Novel Intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in Leishmania donovani. *J Biol Chem* 2001; **276**: 3971-3976.
[63] Shen H, He Z, Yan H et al. The fronds tonoplast quantitative proteomic analysis in arsenic hyperaccumulator Pteris vittata L. *J Proteomics* 2014; **105**: 46-57.
[64] Shi S, Wang T, Chen Z et al. OsHAC1;1 and OsHAC1;2 Function as Arsenate Reductases and Regulate Arsenic Accumulation. *Plant Physiol* 2016; **172**: 1708-1719.
[65] Shin H, Shin H-S, Dewbre GR, Harrison MJ. Phosphate transport in Arabidopsis: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments. *Plant J* 2004; **39**: 629-642.
[66] Shukla T, Kumar S, Khare R, Tripathi RD, Trivedi PK. Natural variations in expression of regulatory and detoxification related genes under limiting phosphate and arsenate stress in Arabidopsis thaliana. *Frontiers in plant science* 2015; **6**: 898.
[67] Sorrell DA, Chrimes D, Dickinson JR, Rogers HJ, Francis D. The Arabidopsis CDC25 induces a short cell length when overexpressed in fission yeast: evidence for cell cycle function. *New Phytol* 2005; **165**: 425-428.
[68] Spadafora ND, Doonan JH, Herbert RJ et al. Arabidopsis T-DNA insertional lines for CDC25 are hypersensitive to hydroxyurea but not to zeocin or salt stress. *Ann Bot* 2011; **107**: 1183-1192.
[69] Stoeva N, Bineva T. Oxidative changes and photosynthesis in oat plants grown in As-contaminated soil. *Bulg J Plant Physiol* 2003; **29**: 87-95.
[70] Wang P, Zhang W, Mao C, Xu G, Zhao F-J. The role of OsPT8 in arsenate uptake and varietal difference in arsenate tolerance in rice. *J Exp Bot* 2016; **67**: 6051-6059.
[71] Wu Z, Ren H, McGrath SP, Wu P, Zhao F-J. Investigating the contribution of the phosphate transport pathway to arsenic accumulation in rice. *Plant Physiol* 2011; **157**: 498-508.
[72] Wysocki R, Bobrowicz P, Ułaszewski S. The Saccharomyces cerevisiae ACR3 gene encodes a putative membrane protein involved in arsenite transport. *J Biol Chem* 1997; **272**: 30061-30066.
[73] Wysocki R, Fortier P-K, Maciaszczyk E et al. Transcriptional activation of metalloid tolerance genes in Saccharomyces cerevisiae requires the AP-1-like proteins Yap1p and Yap8p. *Mol Biol Cell* 2004; **15**: 2049-2060.
[74] Xu J, Shi S, Wang L et al. OsHAC4 is critical for arsenate tolerance and regulates arsenic accumulation in rice. *New Phytol* 2017; **215**: 1090-1101.
[75] Xu X, Burke SP. Roles of active site residues and the NH2-terminal domain in the catalysis and substrate binding of human Cdc25. *J Biol Chem* 1996; **271**: 5118-5124.
[76] Ye J, Rensing C, Rosen BP, Zhu Y-G. Arsenic biomethylation by photosynthetic organisms. *Trends Plant Sci* 2012; **17**: 155-162.
[77] Yin X, Wang L, Duan G, Sun G. Characterization of arsenate transformation and identification of arsenate reductase in a green alga Chlamydomonas reinhardtii. *J Environ Sci* 2011; **23**: 1186-1193.
[78] Yin X, Wang L, Liu Y, Jiang T, Gao J. Characterization of Arsenic Biotransformation by a Typical Bryophyte Physcomitrella patens. *Bull Environ Contam Toxicol* 2017; **98**: 251-256.
[79] Yompakdee C, Bun-ya M, Shikata K, Ogawa N, Harashima S, Oshima Y. A putative new membrane protein, Pho86p, in the inorganic phosphate uptake system of Saccharomyces cerevisiae. *Gene* 1996; **171**: 41-47.
[80] Yong JWH, Tan SN, Ng YF et al. Arsenic hyperaccumulation by Pteris vittata and Pityrogramma calomelanos: a comparative study of uptake efficiency in arsenic-treated soils and waters. *Water Sci Technol* 2010; **61**: 3041-3049.
[81] Zablotska LB, Chen Y, Graziano JH et al. Protective effects of B vitamins and antioxidants on the risk of arsenic-related skin lesions in Bangladesh. *Environ Health Perspect* 2008; **116**: 1056-1062.

[82] Zhou Y, Bhattacharjee H, Mukhopadhyay R. Bifunctional role of the leishmanial antimonate reductase LmACR2 as a protein tyrosine phosphatase. *Mol Biochem Parasitol* 2006; **148**: 161-168.
[83] Zhou Y, Messier N, Ouellette M, Rosen BP, Mukhopadhyay R. Leishmania major LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug pentostam. *J Biol Chem* 2004; **279**: 37445-37451.
[84] Zhu H-H, Qin Y-Z, Huang X-J. Resistance to arsenic therapy in acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* 2014; **370**: 1864-1866.
[85] Zhu Y-G, Yoshinaga M, Zhao F-J, Rosen BP. Earth Abides Arsenic Biotransformations. *Annu Rev Earth Planet Sci* 2014; **42**: 443-467.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 06.07.2020
Przyjęto: 03.08.2020
Ewa Maciaszczyk-Dziubińska,
Zakład Genetyki i Fizjologii Komórki, Instytut Biologii Eksperymentalnej
ul. Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław
email: ewa.maciaszczyk-dziubinska@uwr.edu.pl
tel.: 713754128, fax: 713754118

ROLA α-ARESTYN W UBIKWITYNACJI I HOMEOSTAZIE BIAŁEK BŁONY KOMÓRKOWEJ

ROLE OF α-ARRESTINS IN UBIQUITINATION AND PROTEIN HOMEOSTASIS AT THE PLASMA MEMBRANE

Kacper ZBIERALSKI, Donata WAWRZYCKA

Zakład Genetyki i Fizjologii Komórki, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław

Streszczenie: Recykling lub degradacja białek błonowych na drodze zależnej od ubikwitynacji endocytozy jest jednym z najważniejszych mechanizmów regulacji homeostazy komórkowej. W regulacji obrotu białek błonowych istotną rolę odgrywa proces selektywnego naprowadzania ligaz ubikwityny na odpowiednie substraty białkowe dzięki aktywności tzw. białek adaptorowych z rodziny konserwowanych ewolucyjnie arestyn. Od wielu lat badano pod tym kątem β-arestyny, które umożliwiają ubikwitynację wielu ssaczych białek błonowych. Nowo wyodrębnioną podrodziną arestyn, która okazała się ewolucyjnie starsza od β-arestyn, są α-arestyny. Białka z rodziny arestyn występują powszechnie od drożdży po ludzi i zaangażowane są w wiele procesów komórkowych, a ich dysfunkcje mogą prowadzić do poważnych zaburzeń w funkcjonowaniu komórek, co czyni arestyny ważnym obiektem badań. Różnorodność i zmienność lokalizacji α-arestyn mogą sugerować zaangażowanie tych białek w wiele różnych procesów komórkowych. Większość dotychczasowych informacji na temat funkcji i mechanizmu działania α-arestyn pochodzi z badań prowadzonych na drożdżach piekarniczych *Saccharomyces cerevisiae.* α-Arestyny wchodzą w interakcję z Rsp5, ligazą ubikwityny z rodziny Nedd4, poprzez motywy PY i domeny WW rekrutując ją do specyficznych substratów. Natomiast rozpoznawanie białek substratowych przez odpowiednie α-arestyny możliwe jest dzięki tzw. sygnałom degronowym (degrony), najprawdopodobniej stanowiącym krótkie sekwencje aminokwasowe. Badania wskazują na regulację aktywności α-arestyn poprzez modyfikacje potranslacyjne np. fosforylację i ubikwitynację. Modyfikacje potranslacyjne wpływają na zmianę specyficzności substratowej α-arestyn co pozwala na ścisłą regulację i sprawną odpowiedź w systemie kontroli białek błonowych, umożliwiając szybką adaptację komórki do zmieniających się warunków środowiska.

Słowa kluczowe: α-arestyny, białka błonowe, ubikwitynacja, adaptory, degradacja

Summary: Recycling or degradation of membrane proteins by ubiquitination-dependent endocytosis is one of the most important mechanisms of regulation of cellular homeostasis. The proces of selective targeting of ubiquitin ligases to the appropriate protein substrates, due to the activity of the so-called adapter proteins from the family of evolutionarily conserved arrestins, plays an important role in regulation of the membrane proteins turnover. The role of β-arrestins which enable ubiquitination of many

mammalian membrane proteins have been studied for many years. A newly separated subfamily of arrestins, which turned out to be evolutionarily older than β-arrestins, is the subfamily of -arrestins. Arrestin family proteins are ubiquitous from yeast to humans and are involved in many cellular processes. Their dysfunction can lead to serious disorders in the functioning of the cell, making arrestins an important research target. The variability of the subcellular location of -arrestins may suggest the involvement of these proteins in many different cellular processes. Most of the information on the function and mechanism of action of α-arestins comes from studies conducted with the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. α-Arrestins interact with Rsp5, the Nedd4 family E3 ubiquitin ligase, via PY motifs and WW domains, and recruit it to the specific substrate. The recognition of substrate proteins by α-arrestins is possible thanks to the so-called degron signals (degrons), most likely short amino acid sequences. The regulation of α-arrestin activity through post-translational modifications, e.g. phosphorylation and ubiquitination may modulate the substrate specificity of α-arrestins, which allows a tight regulation and efficient response in the membrane protein control system, enabling the cell quick adaptation to changing environmental conditions.

Keywords: α-arrestins, plasma membrane proteins, ubiquitination, adaptors, protein degradation

WPROWADZENIE

Jednym z najważniejszych sposobów regulacji poboru substancji ze środowiska zewnątrzkomórkowego oraz komunikacji międzykomórkowej we wszystkich komórkach eukariotycznych jest endocytoza i recykling lub degradacja białek błonowych. Regulacja obecności transporterów, kanałów i receptorów w błonie komórkowej poprzez degradację endocytarną, zależna jest od wielu procesów komórkowych, w tym modyfikacji lipidów, formowania koszy klatrynowych, czy zmian szkieletu aktynowego [15]. W regulacji obrotu białek błonowych istotną rolę odgrywa także ubikwitynacja [27, 29], odpowiedzialna za inicjację endocytozy oraz warunkowanie prawidłowego sortowania endosomalnego i degradację wakuolarną, zarówno u eukariontów niższych (np. drożdży), jak i ssaków [37, 73].

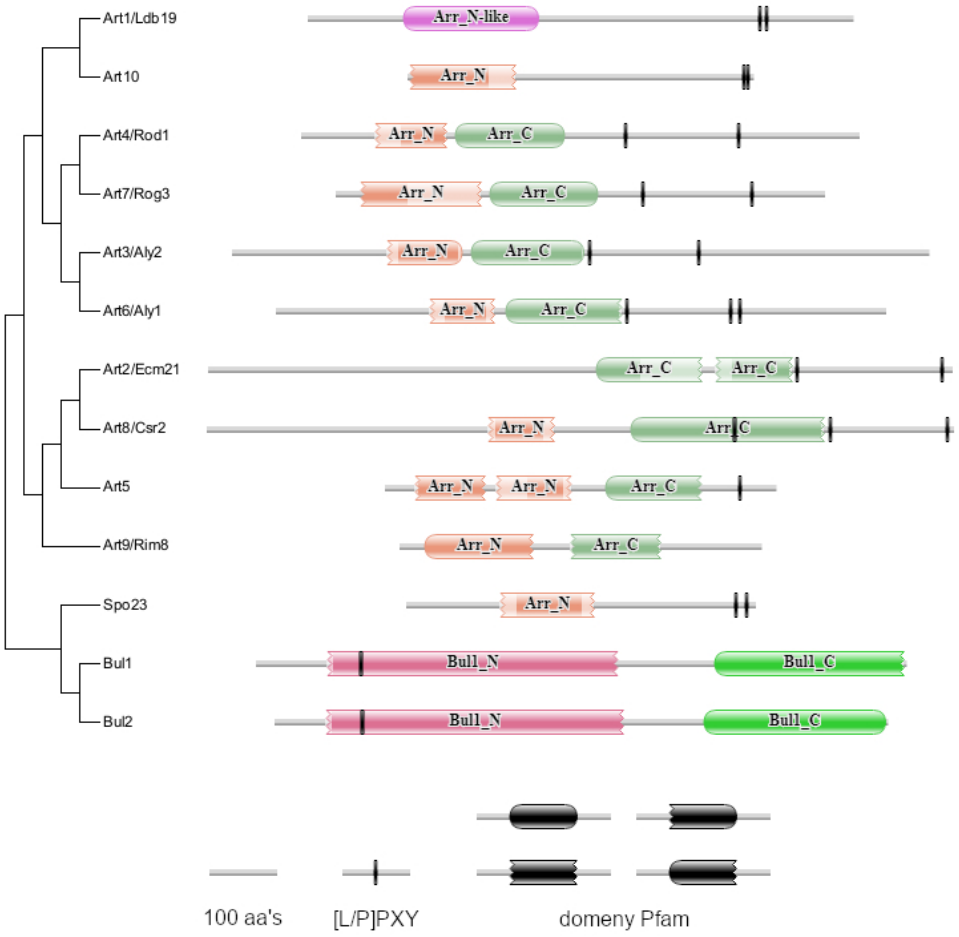
Przyłączenie cząsteczki ubikwityny do białka błonowego zachodzi na drodze 3-stopniowego szlaku reakcji enzymatycznych, w których udział biorą kolejno: enzymy aktywujące ubikwitynę (E1), enzymy wiążące ubikwitynę (E2) oraz ligazy ubikwityny (E3). Istotnym elementem procesu ubikwitynacji jest specyficzne i selektywne rozpoznawanie białek przeznaczonych do degradacji przez enzymy E3. Ligazy ubikwityny wykazują największą różnorodność spośród enzymów maszynerii ubikwitynowej (odkryto 60-100 ligaz E3 u drożdży [16] i ponad 600 u ludzi [35]), jednak tylko nieliczne z nich zaangażowane są w rozpoznawanie białek błonowych. Rozpoznawanie substratów przez ligazy E3 zachodzi poprzez sygnały degradacyjne (degrony) np. w postaci określonej sekwencji aminokwasowej, lecz zazwyczaj wymagane są również modyfikacje potranslacyjne substratów lub ligaz E3, a także interakcje z białkami adaptorowymi. W proces ubikwitynacji białek błonowych zaangażowane są ligazy z rodziny Rsp5/Nedd4, należące do

grupy ligaz HECT (ang. *homologous to the E6AP carboxyl terminus*) zdolnych do bezpośredniego katalizowania reakcji przenoszenia cząsteczki ubikwityny na białko docelowe [31,48]. Wiązanie przez nie substratów zachodzi jednak najczęściej pośrednio, przy udziale białek adaptorowych z rodziny arestyn (arestyny wzrokowe i β-arestyny) oraz spokrewnionych z nimi słabiej poznanych białek z rodziny ARTs (ang. *arrestin-related trafficking adaptors*), nazywanych też α-arestynami [2]. Jako że białka z klanu arestyn występują powszechnie od drożdży po ludzi i zaangażowane są w wiele procesów komórkowych, takich jak regulacja degradacji i recyklingu białek błonowych w różnych warunkach, kontrola aktywności receptorów sprzężonych z białkami G (ang. *G-protein-coupled receptors*, GPCRs), czy udział w przekazywaniu sygnałów komórkowych, ich dysfunkcje mogą prowadzić do poważnych zaburzeń w funkcjonowaniu komórek, co czyni arestyny ważnym obiektem badań. Większość dotychczasowych informacji na temat funkcji i mechanizmu działania ARTs pochodzi z badań prowadzonych na drożdżach piekarniczych *Saccharomyces cerevisiae*, które są organizmem modelowym w biologii molekularnej eukariotów [12].

ADAPTORY ARTs: KONSERWATYWNE BIAŁKA Z KLANU ARESTYN

Jedną z głównych ról arestyn jest naprowadzanie ligaz z rodziny Rsp5/Nedd4 na substraty błonowe i pośredniczenie w reakcji ich ubikwitynacji. Od wielu lat badano pod tym kątem β-arestyny, które umożliwiają ubikwitynację wielu ssaczych białek błonowych, dodatkowo stymulując endocytozę poprzez wiązanie klatryny oraz endocytarnego kompleksu AP-2 [34]. U ludzi, rodzina Nedd4 składa się z 9 ligaz E3 [64], z których ligaza Nedd4 wydaje się być najstarsza ewolucyjnie i wykazuje dużą homologię do drożdżowej ligazy Rsp5, co wskazuje, że białka te są konserwowane ewolucyjnie [82]. Ligazy Rsp5/Nedd4 rozpoznają swoje substraty dzięki domenom WW wiążącym motywy PY ([L/P]PxY) lub ufosforylowane reszty seryny/treoniny w pobliżu reszty prolinowej [42]. Jednakże, wiele białek ubikwitynowanych przez te ligazy nie posiada w strukturze motywów PY, co rodzi konieczność interakcji z białkami adaptorowymi [39]. Co ciekawe, arestyny wzrokowe i β-arestyny również nie posiadają w swojej strukturze motywów PY, a inne bogate w prolinę sekwencje w ich strukturze nie są rozpoznawane przez ligazy Nedd4 [67], co najprawdopodobniej świadczy o niekanonicznych interakcjach między tymi białkami. Stosunkowo niedawno, bo dopiero w 2008 r., Alvarez opisał grupę białek adaptorowych zaangażowanych w ubikwitynację *cargo* – białka ARTs – przypominające ssacze β-arestyny i wchodzące w interakcję z ligazami Rsp5/Nedd4 poprzez motywy PY i domeny WW [2]. Analiza filogenetyczna wykazała, że β-arestyny i arestyny wzrokowe wywodzą się z tej

samej ancestralnej rodziny arestyn, która dała początek białkom ARTs oraz innym białkom podobnym od arestyn [2]. Ze względu na ewolucyjnie starsze pochodzenie, adaptory ARTs nazwano α-arestynami, odróżniając je od rodziny β-arestyn/



RYCINA 1. Drzewo filogenetyczne i schemat organizacji domenowej α-arestyn u drożdży *S. cerevisiae.* Drzewo filogenetyczne stworzono za pomocą metody Neighbor-joining method, przy użyciu programów ClustalW oraz MEGA7. Domeny przewidziane przez HmmerWeb 2.41.1 (https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/) w oparciu o bazę Pfam 32.0 odpowiadają następującym numerom dostępu Pfam-A: Arr_N (Arresin_N): PF00339, Arr_C (Arrestin_C): PF02752, Arr_N-like (LDB19): PF13002, Bul1_N: PF04425, Bul1_C: PF04426

FIGURE 1. Phylogenetic tree and schematic representation of the domain organization of yeast *S.cerevisiae* α-arrestins. Phylogenetic tree was created with Neighbor-joining method using ClustalW and MEGA7 programs. Domains based on Pfam 32.0 and detected by HmmerWeb 2.41.1 (https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/) correspond to the following Pfam-A accessions: Arr_N (Arresin_N): PF00339, Arr_C (Arrestin_C): PF02752, Arr_N-like (LDB19): PF13002, Bul1_N: PF04425, Bul1_C: PF04426

arestyn wzrokowych (odtąd nazywanych β-arestynami) oraz innych białek posiadających domenę arestynową [2]. Jednocześnie wykazano, że α-arestyny są białkami występującymi powszechnie u wszystkich eukariontów poza roślinami, u których nie stwierdzono obecności także ligaz Rsp5/Nedd4 [2]. Jedną z pierwszych zidentyfikowanych α-arestyn było białko PalF u *Aspergillus nidulans*, zaangażowane w ścieżkę sygnalną pH poprzez wiązanie receptora PalH [25]. U ludzi zidentyfikowano co najmniej 6 α-arestyn: ARRDC1-5 (ang. *arrestin-domain containing 1-5*) oraz TXNIP (ang. *thioredoxin-interacting protein*) [2]; u drożdży *S. cerevisiae*, które stanowią główny model badań nad α-arestynami, zidentyfikowano 14 białek należących do tej rodziny, w tym białka Art1-10 [51] oraz Bul1-3 [53] (**Ryc. 1**)(**Tab. 1**).

Strukturalną cechą wspólną dla arestyn i białek z nimi spokrewnionych jest obecność charakterystycznie ułożonych nici β formujących dwie domeny o strukturze β kanapek połączonych domeną zawiasową (ang. *arrestin fold*) [2, 4, 5, 40, 76]. β-arestyny charakteryzują się także elementami strukturalnymi, których starsze ewolucyjnie α-arestyny nie posiadają, np. motywy wiążące klatrynę u β-arestyny-1 i -2 i N-końcowa α-helisa, której rola u β-arestyn nie została jednoznacznie określona [2]. Znaczącą różnicą między α- i β-arestynami jest powszechna obecność motywów PY w strukturze α-arestyn [2] (**Ryc. 1**), co zgodnie z obserwacjami pozwala im na kanoniczne wiązanie przez ligazy Rsp5/Nedd4 i efektywne pełnienie roli w regulacji endocytozy i sortowania endosomalnego białek błonowych [3, 19 ,20 ,22 ,52] (**Tab. 1**).

WIELOFUNKCYJNOŚĆ LUDZKICH α-ARESTYN

Białka α-arestyn lokalizują się w komórkach różnie w zależności od przedstawiciela rodziny, a także w zależności od warunków panujących w komórce. Ludzka α-arestyna TXNIP może lokalizować się w błonie komórkowej [80] lub ulegać translokacji do mitochondriów, a wchodząc w interakcję z importyną-α może krążyć między cytosolem a jądrem komórkowym [63]. Z kolei ludzkie ARRDC3 i drożdżowe Art9/Rim8 oprócz błony komórkowej lokalizują się także w błonie endosomu, gdzie wchodzą w interakcję z białkami endosomalnymi [14, 24]. Różnorodność i zmienność lokalizacji mogą sugerować zaangażowanie α-arestyn w wiele różnych procesów komórkowych, tak jak w przypadku β-arestyn. Strukturalne podobieństwo między α- i β-arestynami, również wskazuje na podobne funkcje tych białek. Pomimo intensywnych badań na przestrzeni ostatnich lat, rola α-arestyn w komórkach zwierzęcych nadal pozostaje słabo poznana, a ostatnie odkrycia pokazują, że α-arestyny, tak jak i β-arestyny, mogą pełnić istotną rolę w regulacji proteostazy. Wykazano, że α-arestyna TXNIP odgrywa znaczącą rolę w promowaniu apoptozy komórek β trzustki oraz procesach redoks w komórce [63]. Zgodnie z nowszymi doniesieniami, TXNIP pełni także ważną funkcję w regulacji poboru

TABELA 1. Drożdżowe i ludzkie α-arestyny
TABLE 1. Yeast and human α-arrestins

Drożdżowa α-arestyna	Charakterystyka	Odnośniki
Art1/Ldb19	regulacja endocytozy Mup1, Can1, Tat2, Fur4, Lyp1, Ste2, Ste3	[19,51,60]
Art2/Ecm21	regulacja endocytozy Smf1, Tat2, Fur4, Lyp1, Thi7, Thi72, Nrt1	[51,62]
Art3/Aly2	regulacja endocytozy Gap1, Dip5, Ste3	[13,55,60]
Art4/Rod1	regulacja endocytozy Jen1, Hxt6, Hxt1, Hxt3,	[17,51,56]
Art5	regulacja endocytozy Itr1	[51]
Art6/Aly1	regulacja endocytozy Gap1, Dip5, Ste3	[13,55,60]
Art7/Rog3	regulacja endocytozy Hxt1, Hxt3	[56]
Art8/Csr2	regulacja endocytozy Smf1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7	[30,51,68]
Art9/Rim8	regulacja endocytozy i sortowania Rim21	[23,24]
Art10	nieznana funkcja; nadekspresja skutkuje zwiększeniem oporności na arsenin	[72]
Bul1	regulacja endocytozy Jen1, Gap1, Ptr2, Tat1, Tat2, Ctr1, Put4, Dal5	[1,13,17,32,41,75]
Bul2	regulacja endocytozy Jen1, Gap1, Ptr2, Tat1, Tat2, Ctr1, Put4, Dal5	[1,13,17,32,41,75]
Bul3 (BSC5/ YNR068C)	nieznana funkcja; usunięcie skutkuje zwiększeniem wrażliwości na temperaturę	[53]
Spo23	nieznana funkcja; związana z mejotycznym białkiem Spo1	[74]
Ludzka α-arestyna	**Charakterystyka**	**Odnośniki**
ARRDC1	regulacja ubikwitynacji DMT1, Notch, YAP1; rekrutacja TSG101 do sekrecji pęcherzyków ARMMs	[44,49,61,81]
ARRDC2	przypuszczalnie regulacja post-endocytarnego sortowania β2-AR	[21]
ARRDC3	regulacja endosomalnego sortowania PAR1; regulacja post--endocytarnego sortowania β2-AR; regulacja ubikwitynacji YAP1, ITG β4, IR	[6,14,21,69,81]
ARRDC4	przypuszczalnie regulacja post-endocytarnego sortowania β2-AR; regulacja ubikwitynacji DMT1, MDA5, V2R	[21,44,46,66]
ARRDC5	nieznana funkcja	
TXNIP	udział w procesach redoks poprzez wiązanie tioredoksyny; regulacja apoptozy; regulacja endocytozy GLUT1, GLUT4	[63,77,80,83]

glukozy przez promowanie degradacji transporterów glukozy GLUT1 oraz GLUT4 (ang. *glucose transporter*) pod wpływem wewnątrzkomórkowego stężenia glukozy oraz insuliny [77, 80]. α-Arestyny współpracują także z β-arestynami w regulacji obrotu receptora β2-AR, choć zaangażowana w ten proces α-arestyna ARRDC3 uczestniczy jedynie w post-endocytarnym sortowaniu ubikwitynowanego już receptora do ciał wielopęcherzykowych (ang. *multivesicular bodies*, MVB) i odgrywa mniejszą rolę w jego obrocie –głównymi adaptorami dla receptora β2-AR są β-arestyny [21]. Niedawno odkryto uczestnictwo białek ARRDC1 i ARRDC3 w hamowaniu rozwoju jasnokomórkowego raka nerki poprzez współdziałanie z ligazami Nedd4 w kierowaniu na ścieżkę degradacji onkogenu YAP1 (ang. *Yes-associated protein 1*) [81]. Nowe badania pokazują, że ARRDC3 uczestniczy w sortowaniu receptora GPCR PAR1 (ang. *protease-activated receptor 1*) do MVB poprzez promowanie ubikwitynacji endosomalnego białka ALIX (ang. *ALG-interacting protein X*) [14], a także pośredniczy w ubikwitynacji integryny β4, hamując jej recykling i sekrecję w komórkach raka piersi oraz kierując ją na ścieżkę degradacji lizosomalnej [69]. Badania na myszach pokazały, że białko ARRDC3 jest silnie zaangażowane także w procesy metaboliczne w wątrobie. W warunkach hiperinsulinemii ekspresja genu *ARRDC3* w wątrobie ulega regulacji w sposób zależny od aktywności receptora insuliny (ang. *insulin receptor,* IR) – u myszy pozbawionych IR w wątrobie obserwowano znaczne zmniejszenie *ARRDC3* mRNA [6], natomiast delecja genu *ARRDC3* skutkowała zwiększonym stężeniem IR w błonie komórkowej oraz zwiększoną wrażliwością komórek na insulinę [6]. Wyniki te wskazują na rolę ARRDC3 w pętli regulującej odpowiedź komórek wątroby na insulinę. Inne badania wskazywały na rolę ARRDC3 oraz ARRDC4 w rekrutacji ligaz Nedd4 do receptorów GPCR [66]. ARRDC4, a także ARRDC1, pośredniczą w ubikwitynacji także transportera DMT1 (ang. *divalent metal ion transporter 1*), co pozytywnie reguluje jego uwalnianie w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych (ang. *extracellular vesicles*, EVs) [44]. Pokazano też, że α-arestyna ARRDC1 współdziała wraz z β-arestynami w negatywnej regulacji ścieżki sygnalnej Notch, rekrutując ligazę Itch do ubikwitynacji receptora Notch, co promuje jego degradację lizosomalną [61]. Co ciekawe, powyższa praca zasugerowała zdolność α- i β-arestyn do heterodimeryzacji poprzez domenę arestynową i kooperację w wiązaniu substratów dla ligazy E3. Wcześniej pokazano już, że obie rodziny arestyn mają zdolność do homodimeryzacji [49,71]. W przypadku receptora Notch, nadekspresja nierozpoznawanego przez ligazy Nedd4 mutanta ARRDC1 pozbawionego motywu PY spowodowała znaczne zahamowanie ubikwitynacji i degradacji receptora Notch oraz wzrost kompleksów Notch/β-arestyna-1, prawdopodobnie ze względu na nieefektywną degradację tego receptora [61]. Możliwość formowania heterodimerów sugerowały także inne badania, gdzie nadekspresja ARRDC3 i ARRDC4 prowadziła do koimmunoprecypitacji ich kompleksów z β-arestynami [66].

Podobieństwa w funkcjonowaniu między β- i α-arestynami wskazują na równie istotną rolę tych drugich w prawidłowym funkcjonowaniu komórek, a tym samym potencjalne poważne skutki zaburzeń ich ekspresji czy mutacji. Niestety, obecnie nadal dysponujemy niewielką wiedzą na temat powiązań między α-arestynami a stanami chorobowymi. Przykładem stwierdzonych zależności są obserwacje zwiększonej ekspresji białka TXNIP w związku z cukrzycą. TXNIP promuje apoptozę komórek β, a niedobory tego białka promują przeżycie tych komórek oraz poprawiają sekrecję i wrażliwość na insulinę, białko to stanowi więc obiecujący cel w terapiach farmakologicznych – inhibitory TXNIP lub znaczne obniżenie jego ekspresji mogłoby chronić przed cukrzycą typu I oraz II [79]. Podobnie potencjalnym celem w leczeniu chorób związanych z dysfunkcją gospodarki insulinowej mogłoby być białko ARRDC3. Zaobserwowano, że globalna delecja ARRDC3 u myszy chroniła je przed otyłością, insulinoopornością oraz stłuszczeniem wątroby, a analiza genomowa u ludzi wykazała powiązanie między otyłością u mężczyzn a rzadkim haplotypem w obrębie *locus* genu *ARRDC3* [59]. Najnowsze badania udowodniły, że delecja ARRDC3 u myszy poprawia ich ogólną wrażliwość na insulinę, zwiększając ilość receptorów insuliny w błonie komórek wątroby, a także zwiększa ekspresję glukokinazy i karboksykinazy PEPCK (ang. *phosphoenolpyruvate carboxykinase 1*), co przekłada się na zwiększoną syntezę glikogenu [6]. α-Arestyny mogą też brać udział w zapobieganiu nowotworzeniu, co pokazało wspomniane wcześniej badanie nad rolą ARRDC1 i ARRDC3 w degradacji onkogenu YAP1 [81]. Przykłady te pokazują, że ludzkie α-arestyny mają duży potencjał terapeutyczny, jednak aby lepiej poznać ich funkcję niezbędne są dalsze badania.

DROŻDŻOWE α-ARESTYNY JAKO ADAPTORY ENDOCYTARNE

Najczęściej obserwowaną funkcją α-arestyn jest współdziałanie z ligazami Rsp5/Nedd4 w degradacji określonych białek i proces ten jest konserwatywny od drożdży po ludzi, dlatego dobrym modelem do szczegółowego zgłębiania interakcji między tymi ligazami E3 a ich adaptorami mogą być drożdże *S. cerevisiae*. W 2008, kiedy Alvarez po raz pierwszy opisywał α-arestyny, jako przedstawicieli tej rodziny u *S. cerevisiae* zidentyfikowano jedynie 3 białka: Art4/Rod1, Art7/Rog3 oraz Art9/Rim8 [2]. W kolejnych latach do rodziny α-arestyn zaliczono także adaptory Art1/Ldb19 [40], Art2/Ecm21 [40], Art3/Aly2 [40], Art5 [40], Art6/Aly1 [40], Art8/Csr2 [40], Art10 [51], Bul1-3 [53] i Spo23 [5] (**Ryc. 1**)(**Tab. 1**). Choć wszystkie te białka posiadają domeny arestynowe, a w większości także motywy PY, nadal nie poznano funkcji części z nich. Białka te przede wszystkim naprowadzają ligazę Rsp5 (jedyną ligazę Nedd4 u drożdży) na jej białka substratowe, a tym samym regulują endocy-

tozę i sortowanie białek błonowych do MVB [9]. Rozpoznawanie białek substratowych przez odpowiednie adaptory możliwe jest dzięki tzw. sygnałom degronowym (degrony), stanowiącym krótkie sekwencje aminokwasowe (np. PEST – sekwencje bogate w prolinę, glutaminian, serynę i treoninę) [45], motywy strukturalne, pojedyncze reszty aminokwasowe, czy wolne grupy α-aminowe.

Strukturalnie i funkcjonalnie wśród drożdżowych α-arestyn wyróżnia się białko Art9/Rim8, ponieważ jako jedyne w swojej strukturze nie posiada motywu PY i (podobnie do swojego homologa PalF u *A. nidulans*) zaangażowane jest w odpowiedź na zmiany pH otoczenia na ścieżce sygnalnej RIM (ang. *regulator of IME2*), poprzez modulację aktywności czynnika transkrypcyjnego Rim101 [23]. Art9/Rim8 funkcjonuje tu jako adaptor łączący receptor GPCR Rim21 z białkami endosomalnych kompleksów ESCRT (ang. *endosomal sorting complex required for transport*) [23, 24]. Nowe badania nad wpływem cykloheksymidu na proteom błonowy komórek *S. cerevisiae* wyłoniły wiele białek ulegających α-arestyno-zależnej ubikwitynacji i endocytozie pod wpływem tego antybiotyku [62]. Wśród tak odkrytych substratów α-arestyn wymienić można transportery witaminy B1 (tiaminy): Thi7 oraz blisko spokrewnione z nim transportery Nrt1 i Thi72, które wiązane są przez Art2/Ecm21 [62]. Delecja Art2/Ecm21 skutkowała zahamowaniem endocytozy tych transporterów, a interakcja między Art2/Ecm21 i Thi7 warunkowana jest zmianami konformacyjnymi i aktywnością tego transportera [62]. Inne badania pokazały, że drożdżowe transportery heksoz z rodziny Hxt (ang. *hexose transporters*), homologi ssaczych transporterów GLUT, ulegają ubikwitynacji przez ligazę Rsp5 w sposób zależny od bliskospokrewnionych arestyn Art4/Rod1 i Art7/Rog3, a także Art8/Csr2 [8, 30, 51, 56, 68]. Rozpoznawanie substratów dla ligazy Rsp5 wydaje się jednak być uzależnione od czynników indukujących degradację danego białka – wiązanie transportera Hxt6 przez Art4/Rod1 indukowane jest wysokim stężeniem glukozy, cykloheksymid z kolei pobudza wiązanie tego transportera przez Art8/Csr2 [51]. Obserwacje te stanowią jeden z wielu dowodów istnienia mechanizmu selektywnej regulacji białek błonowych, w której różne α-arestyny promują ubikwitynację, endocytozę i degradację tych samych substratów ligazy Rsp5 w odpowiedzi na różne warunki. Co ciekawe, Art4/Rod1 i Art7/Rog3 (ale też Art6/Aly1 i Art3/Aly2), odpowiedzialne były za degradację heterologicznie ekspresjonowanych w komórkach *S. cerevisiae* transporterów cukrowych CDT-1 i CDT-2 *Neurospora crassa*, co może świadczyć o pewnej konserwatywności sekwencji degronowych [65]. Białko Art4/Rod1 powiązane jest z homeostazą cukrową [8], co potwierdziły najnowsze badania nad degradacją permeazy mleczanowej Jen1, której C-końcowy degron wiązany jest przez Art4/Rod1 w obecności fermentowalnego źródła węgla [17]. Jen1p rozpoznawane jest także przez α-arestyny Bul1 i Bul2, które wiążą zupełnie inny region transportera niż Art4/Rod1 (N-koniec) i robią to w odmiennych warunkach, co dowodzi zaangażowania wielu α-arestyn w degradację tych samych substratów w różnych warunkach [17]. Innym białkiem rozpoznawanym przez kil-

ka α-arestyn jest transporter manganu Smf1, w którego degradację zaangażowane są m.in. blisko spokrewnione białka Art2/Ecm21 i Art8/Csr2 [52].

Arestyny Bul1 oraz Bul2 charakteryzują się jak dotąd największą ilością stwierdzonych substratów [1, 13, 17, 32, 41, 75], które często są jednak rozpoznawane także przez inne α-arestyny wiążące odmienne degrony w strukturze tych substratów, np. Art4/Rod1 w przypadku transportera Jen1 [17], Art6/Aly1 i Art3/Aly2 przy indukowanej stresem degradacji permeazy Gap1 [13] czy Art1/Ldb19, Art2/Ecm21 i Art8/Csr2 w przypadku permeazy Fur4 [51]. Nietypowym przypadkiem jest trzeci zidentyfikowany przedstawiciel rodziny Bul – Bul3, który jest produktem dwóch sąsiadujących otwartych ramek odczytu (ang. *open reading frames,* ORF): *BSC5* (*YNR069C*) oraz *YNR068C*, transkrybowanych z pominięciem kodonu stop [50]. Produkty białkowe *BSC5 i YNR068C* wykazują homologię do odpowiednio N- i C-końcowej domeny Bul1 i białko to posiada motyw PY, co może sugerować funkcje podobne do pozostałych białek Bul [53]. Analiza funkcji Bul3p wykazała, że w zależności od formy białka (skróconej lub pełnej) wchodzi ono w interakcje z ligazą Rsp5 poprzez różne domeny WW tej ligazy [53]. Usunięcie *BSC5/YNR068C* skutkowało zwiększoną wrażliwością komórek drożdżowych na temperaturę, ale nie potwierdzono dotąd interakcji Bul3p z żadnym substratem błonowym. Wykazano także, że wszystkie białka Bul wiążą się *in vitro* z różnymi domenami WW Rsp5, a kombinacje ich delecji mogą dawać antagonistyczne skutki, dlatego postawiono hipotezę, zgodnie z którą adaptory Bul mogłyby funkcjonować jako modulatory aktywności Rsp5, które łącząc się z różnymi domenami WW regulują jej zdolność do wiązania substratów [53].

Analiza dotychczasowych odkryć pokazuje, że α-arestyny tworzą wysoce złożoną sieć Rsp5-adaptor, która nadaje ligazie Rsp5 swoistość substratową, pozwala na ścisłą regulację wielu białek błonowych i sprawną odpowiedź na szybko zmieniające się warunki otoczenia oraz funkcjonuje w systemie kontroli jakości białek błonowych, zapewniając komórce drożdżowej homeostazę. Sieć Rsp5-adaptor współtworzą także inne drożdżowe białka adaptorowe posiadające motywy PY, ale nie należące do rodziny arestyn (np. Bsd2, Tre1/2, Ear1 oraz Ssh4), zaangażowane m.in. w rekrutację ligazy Rsp5 do ubikwitynacji Smf1p czy sortowanie *cargo* do MVB [26, 38, 70].

SPECYFICZNOŚĆ SUBSTRATOWA DROŻDŻOWYCH α-ARESTYN

Wciąż niewiele wiadomo o mechanizmie rozpoznawania substratów ligazy Rsp5 przez α-arestyny. Rozpoznawanie białek błonowych jako przeznaczonych do internalizacji i recyklingu lub degradacji wiąże się często ze zmianą warunków panujących wewnątrz lub na zewnątrz komórki. Sygnały degronowe białek błony komórkowej mogą ulegać ekspozycji dla maszynerii endocytarnej m.in. z powo-

du indukowanego stresem rozfałdowania (np. przy szoku cieplnym) [84], ale też w wyniku zmian konformacyjnych towarzyszących transportowi substratów przez błonowe permeazy [18]. Endocytoza i degradacja białek może być też efektem aktywacji receptorów i ich ścieżek sygnalnych [67] lub zmiany stężenia różnych substancji wewnątrz komórki [30]. Istotna jest także sama struktura sygnałów degradacyjnych. Badania nad degradacją permeazy metioninowej Mup1 i permeazy argininowej Can1 wykazały, że oba białka posiadają w pobliżu ulegających ubikwitynacji reszt lizynowych skupisko kwaśnych reszt aminokwasowych (tzw. *acidic patch*), którego obecność jest konieczna dla rekrutacji Art1/Ldb19 i ubikwitynacji tych białek. Mutacje w obrębie *acidic patch* obu transporterów skutkowały ich wyraźną stabilizacją w błonie komórkowej [19]. Dalsze badania nad interakcją między Mup1 a Art1/Ldb19 doprowadziły do identyfikacji regionu bogatego w zasadowe reszty aminokwasowe w Art1/Ldb19 jako potencjalne miejsce interakcji z *acidic patch* Mup1. Rzeczywiście, mutacje zmieniające charakter odpowiednich reszt aminokwasowych Art1/Ldb19 pozwalały na supresję efektu mutacji w obrębie *acidic patch* Mup1, przywracając endocytozę tej permeazy [19]. Uzyskane wyniki pozwoliły na sformułowanie hipotezy, według której powszechny mechanizm odpowiedzialny za interakcje między α-arestynami a substratami ligazy Rsp5 mógłby opierać się na oddziaływaniach elektrostatycznych [19]. Ujemnie naładowane reszty aminokwasowe rozpoznano jako istotne w degradacji także innych białek błonowych, w tym Gap1 [13], Jen1 [17] oraz antyportera Acr3 [78]. Wciąż nie wiadomo co stanowi sygnał do związania się adaptora w obrębie sekwencji degronowej. W niektórych przypadkach do prawidłowej degradacji białek błonowych konieczna jest fosforylacja, np. Smf1p musi ulec fosforylacji w pobliżu ubikwitynowanych reszt lizynowych na N-końcu – mutant Smf1, którego N-końcowe reszty serynowe zmieniono na reszty alaninowe, był słabiej wiązany przez Art2/Ecm21 [52]. Przypomina to sposób interakcji między β-arestynami a receptorami GPCR, które aby zostać związane przez adaptor muszą ulec najpierw aktywacji i fosforylacji. Podobnie receptor Ste2 oraz permeaza Fur4 posiadają w swojej strukturze charakterystyczne sekwencje, odpowiednio SINNDAKSS oraz PEST, w obrębie których zachodzi fosforylacja niezbędna dla degradacji tych białek [28, 45]. Cechą wspólną łączącą kwaśne oraz ufosforylowane reszty aminokwasowe jest obecność ujemnego ładunku, który wydaje się niezbędny dla interakcji wielu białek błonowych z ich adaptorami, co idzie w parze z hipotezą dotyczącą oddziaływań elektrostatycznych jako podstawy tych interakcji.

REGULACJA AKTYWNOŚCI ARESTYN

Zmiana warunków zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych wpływa nie tylko na konformację i aktywność białek błonowych, ale także aktywuje różnorodne ścieżki sygnalne warunkujące odpowiedź na te zmiany. Ważnym elementem tych

odpowiedzi są modyfikacje potranslacyjne białek, dotyczące również maszynerii endocytarnej, np. fosforylacja substratów błonowych [28, 36, 45] lub ligaz ubikwityny [10, 11, 58]. Ścisłej regulacji poprzez modyfikacje post-translacyjne (takie jak fosforylacja czy ubikwitynacja) ulegają także adaptory dla enzymów E3, dzięki czemu komórki mogą lepiej kontrolować ich aktywność w odpowiedzi na zmiany w środowiska i efektywnie regulować proteom błonowy.

Ubikwityna jest znanym regulatorem aktywności α-arestyn, ale (w przeciwieństwie do β-arestyn) ich ubikwitynacja zależy od ligaz Rsp5/Nedd4, co czyni je jednocześnie adaptorami i substratami dla ligaz z tej rodziny. Zdolność α-arestyn do ulegania ubikwitynacji wydaje się być kluczowa dla prawidłowego funkcjonowania wielu procesów w komórce. Zaobserwowano, że ludzka α-arestyna ARRDC1 zdolna jest do rekrutacji endosomalnego białka TSG101 (ang. *tumor susceptibility gene 101*) (homolog drożdżowego Vps23p) do błony komórkowej, co skutkuje sekrecją podobnych do egzosomów mikropęcherzyków zawierających ARRDC1 (ang. *ARRDC1-mediated microvesicles,* ARMMs) na zewnątrz komórek [49]. Autorzy wskazują na potencjalną funkcję ARMMs jako sposób komunikacji międzykomórkowej (pęcherzyki mogą zawierać RNA lub białka), a utworzenie ich wymaga ubikwitynacji ARRDC1 przez ligazę WW2 z rodziny Nedd4 [49]. Inna ligaza Nedd4 – Itch – reguluje aktywność białka TXNIP [83]. α-Arestyna ta funkcjonuje jako antyoksydant i regulator redoks zdolny do hamowania proliferacji i promowania apoptozy, dlatego w komórkach nowotworowych obserwuje się regulację aktywności poprzez poliubikwitynację i degradację proteasomalną [83].

Regulację aktywności arestyn poprzez ubikwitynację zaobserwowano też u drożdży. Badania w tym modelu pokazały, że drożdżowa α-arestyna Art4/Rod1 ulega ubikwitynacji w odpowiedzi na glukozę, promując endocytozę permeazy Jen1 [8]. Zmutowany wariant Art4/Rod1 nieulegający ubikwitynacji był ekspresjonowany w komórkach Δ*rod1* na poziomie podobnym do typu dzikiego, ale nie był zdolny do promowania glukozo-zależnej endocytozy Jen1 [8]. Podobnie substytucja ubikwitynowanej reszty lizynowej białka Art1/Ldb19 na resztę argininową skutkowała stabilizacją wiązanej przez nią permeazy Can1 w błonie komórkowej [40]. Mutacja ta wpływała nie tylko na aktywność arestyny, ale także na jej lokalizację subkomórkową (białko dzikiego typu obserwowano w diktiosomach aparatu Golgiego, natomiast mutant lizynowy był rozproszony w cytoplazmie) [40]. Zaobserwowano także C-końcową Rsp5-zależną monoubikwitynację drożdżowej α-arestyny Art9/Rim8, która pozwala na jej stabilne wiązanie z podjednostką Vps23 kompleksu ESCRT-I dzięki motywowi SxP w strukturze arestyny oraz domenie wiążącej ubikwitynę UEV (ang. *ubiquitin E2 variant*) w strukturze Vps23 [23]. Warto zauważyć, że w komórkach Δ*vps23* ubikwitynacja Art9/Rim8 nie zachodzi, co sugeruje, że to wiązanie Art9/Rim8 przez Vps23 promuje ubikwitynację tej arestyny. Proponowany model tego procesu zakłada dwustopniową ubikwitynację Art9/Rim8, w której najpierw dochodzi do utworzenia kompleksu

podjednostki Vps23 z arestyną (poprzez jej motyw SxP) oraz ligazą Rsp5 z przyłączoną cząsteczką ubikwityny (poprzez domenę UEV białka Vps23) – dopiero później zachodzi przeniesienie cząsteczki ubikwityny z enzymu E3 na arestynę. Utworzenie takiego kompleksu umożliwiałoby odpowiednie pozycjonowanie Art9/Rim8 i przeniesienie na nią cząsteczki ubikwityny, co stabilizowałoby kompleks arestyna-Vps23 [23]. Przypuszcza się, że położony na C-końcu motyw SxP Art9/Rim8 może być związany z motywem P[S/T]xP, który wiązany jest zarówno przez drożdżowe Vps23, jak i jego ludzki homolog TSG101 [23]. Co ciekawe, ludzka α-arestyna ARRDC1 posiada na swoim końcu motyw PSAP, który jest niezbędny do interakcji z TSG101 i formowaniem ARMMs [49], co sugeruje konserwatywność takiej interakcji.

Innym regulatorem aktywności α-arestyn jest modyfikacja przez fosforylację. Zgodnie z najnowszymi odkryciami, białko ARRDC3, które w mysich komórkach wątroby odpowiada za regulację obecności receptora insuliny w błonie komórkowej, aby związać się z tym receptorem wymaga stymulowanej insuliną fosforylacji konserwatywnej reszty tyrozynowej, położonej między dwoma C-końcowymi motywami PY [6]. Zwiększoną fosforylację reszty tyrozynowej w C-końcowej domenie ARRDC3 zaobserwowano w komórkach nowotworów charakteryzujących się mutacjami aktywującymi receptor EGF (ang. *epidermal growth factor receptor*), co może sugerować fosforylację C-końca ARRDC3 przez receptory kinazy tyrozynowej [6]. W ostatnich latach pojawiło się także wiele dowodów przemawiających za fosfoinhibicją jako powszechnym mechanizmem regulacji aktywności α-arestyn. Choć opisana wcześniej monoubikwitynacja Art9/Rim8 stabilizuje jej kompleks z białkiem Vps23, modyfikacja ta nie wydaje się mieć istotnego znaczenia dla ścieżki sygnalnej RIM [23]. Dużą rolę w kontroli aktywności Art9/Rim8 odgrywa za to fosforylacja zarówno ubikwitynowanego, jak i nieubikwitynowanego wariantu tej arestyny, katalizowana przez kinazę kazeinową I (ang. *casein kinase I,* CKI) [24]. Zmiany pH z kwaśnego na neutralny/zasadowy skutkują relokalizacją Art9/Rim8 z cytoplazmy do błony komórkowej, gdzie wiąże się z Rim21 i (podobnie do mysiej β-arestyny-2 [33]) ulega fosforylacji w regionie zawiasowym tego białka, co hamuje aktywność tej arestyny, a tym samym całą ścieżkę sygnalną RIM [24].

U drożdży scharakteryzowano fosfoinhibicyjną regulację aktywności α-arestyn Bul1 i Bul2 na ścieżce TORC1/Npr1/14-3-3. TORC1 (ang. *the target of rapamycin complex 1*), wysoce konserwatywny wielopodjednostkowy kompleks kinazy zaangażowany w odpowiedź m.in. na zmianę dostępności substancji odżywczych i sygnały wzrostowe, pośrednio wpływa na endocytozę błonowych transporterów substancji odżywczych w sposób globalny (w odpowiedzi na stres) oraz indywidualnie (w odpowiedzi na substraty danej permeazy), regulując fosforylację adaptorów endocytarnych wiążących odpowiednie białka transporterowe, np. Gap1, Can1, Mup1 i Fur4 [43, 47, 57]. W oparciu o badania nad degradacją permeazy Gap1 za-

proponowano model opierający się na przeciwstawnej TORC1-zależnej aktywności kinazy efektorowej Npr1 oraz fosfatazy Sit4. W niekorzystnych warunkach (np. dostępności ubogiego źródła azotu w przypadku Gap1), TORC1 jest nieaktywny, za to fosfataza Sit4 warunkuje hipofosforylację kinazy Npr1, aktywując ją. Aktywne Npr1 fosforyluje adaptory Bul1-2, co warunkuje ich wiązanie do białek 14-3-3 i hamuje aktywność kompleksów adaptor-Rsp5, a tym samym stabilizuje Gap1 w błonie komórkowej. W korzystnych warunkach kompleks TORC1 jest aktywowany i fosforyluje kinazę Npr1 oraz białko Tap42. Hiperfosforylowana kinaza Npr1 ulega inaktywacji, a Tap42p wiąże się z fosfatazą Sit4, która w takim kompleksie rozpoznaje białka Bul1-2 i defosforyluje je, uwalniając je z kompleksów z białkami 14-3-3 i umożliwiając rekrutację ligazy Rsp5, co warunkuje ubikwitynację i degradację Gap1 [47, 57]. Defosforylacji białek Bul towarzyszy też ich monoubikwitynacja, ale znaczenie tej modyfikacji pozostaje nieznane [47].

W regulację obrotu Gap1 zaangażowane są także adaptory Art6/Aly1 oraz Art3/Aly2, ale ich rola wydaje się opierać przede wszystkim na regulacji wewnątrzkomórkowego sortowania Gap1 [54]. α-Arestyny te biorą udział w promowaniu transportu Gap1 z endosomów do sieci transaparatu Golgiego (ang. *trans-Golgi network*, TGN) i recykling tej permeazy [54]. Wykazano, że w warunkach stresu azotowego Art3/Aly2 ulega fosforylacji przez kinazę Npr1, modyfikacja ta nie inaktywuje jej jednak, a umożliwia jej wejście w bezpośrednią interakcję z kompleksem AP-1 w endosomach, promując klatryno-zależny transport Gap1 do TGN, skąd w warunkach niedoboru azotu dochodzi do ponownej sekrecji Gap1 do błony komórkowej [54]. Przy dużej dostępności azotu kinaza Npr1 pozostaje z kolei nieaktywna i nie fosforyluje Aly2/Art6, a Gap1 kierowane jest na ścieżkę degradacji wakuolarnej [54]. Nowsze badania pokazały, że białko Art6/Aly1 zaangażowane jest także w degradację transportera kwasu asparaginowego i glutaminowego Dip5, gdzie pełni funkcję w promowaniu jej Rsp5-zależnej ubikwitynacji i degradacji wakuolarnej [55]. Wykazano, że skierowanie Dip5 do wakuoli wymaga defosforylacji Art6/Aly1, za co odpowiada Ca^{2+}-zależna fosfataza białkowa kalcyneuryna [55]. Należy zauważyć, że defosforylacja Art6/Aly1 wydaje się jednak nieistotna dla samego wiązania Dip5 i jego ubikwitynacji ani nie warunkuje stabilności Art6/Aly1 [55]. Wykazano także, że choć Art6/Aly1 potencjalnie może wiązać się z białkami 14-3-3, kalcyneuryno-zależna fosforylacja prawdopodobnie nie bierze udziału w regulacji tej interakcji, a także nie wpływa na Art6/Aly1-zależny obrót białka Gap1 [55]. Wykazano również, że w szczególnych warunkach adaptory Art6/Aly1 i Art3/Aly2, razem z białkami Bul1-2, także mogą rozpoznawać Gap1 w błonie komórkowej i promować jego ubikwitynację przez Rsp5 oraz degradację wakuolarną, a odpowiedzialny za to mechanizm różni się od dotychczas scharakteryzowanego dla białek Bul1-2 [13]. W warunkach stresu wywołanego dysfunkcją kompleksu TORC1, wciąż ufosforylowane adaptory Bul1-2 oraz Art6/Aly1 i Art3/Aly2, prawdopodobnie nadal

związane z białkami 14-3-3, dalej mogą pośredniczyć w ubikwitynacji Gap1 i innych permeaz błonowych [13]. Zauważono też, że te ufosforylowane α-arestyny wchodzą w interakcję z odmiennymi regonami cytoplazmatycznymi Gap1 niż ma to miejsce w przypadku degradacji Gap1 warunkowanej wewnątrzkomórkowym stężeniem aminokwasów [13]. Reasumując, wyniki wyraźnie pokazują obecność kilku różnych współdziałających mechanizmów promowania ubikwitynacji permeaz błonowych poprzez białka Bul1-2 oraz Art6/Aly1 i Art3/Aly2, w zależności od modyfikacji α-arestyn w odpowiedzi na zmieniające się warunki w komórce [13] co pozwala na zwiększenie możliwości adaptacyjnych.

Inny opisany mechanizm regulacji α-arestyn związany jest z odpowiedzią na zmianę stężenia glukozy w komórce. Drożdżowa α-arestyna Art4/Rod1, odpowiedzialna za degradację m.in. transporterów Hxt oraz Jen1, przy braku glukozy ulega fosforylacji przez kinazę Snf1 i, podobnie do białek Bul1-2, pozostaje nieaktywna w kompleksie z białkami 14-3-3 [8]. Pojawienie się glukozy w komórce skutkuje defosforylacją Art4/Rod1 przez fosfatazę białkową I (ang. *protein phosphatase I,* PPI), jej uwolnieniem z kompleksu z białkiem 14-3-3 i ubikwitynacją przez ligazę Rsp5. Aktywowane białko Art4/Rod1 bierze udział nie tylko w rekrutacji Rsp5 do *cargo* w błonie komórkowej, ale także w sortowaniu internalizowanych oraz ulegających sekrecji białek w TGN [7]. Stymulowana defosforylacją ubikwitynacja Art4/Rod1 wydaje się niezbędna do prawidłowego rozpoznawania transportera Jen1 przez tę arestynę, ale dokładny mechanizm tej zależności pozostaje nieznany [8]. Spadek stężenia glukozy w komórce skutkuje fosforylacją Art4/Rod1 i jej ponownej rozproszeniem w cytosolu [7]. Co ciekawe, podobny mechanizm regulacji w odpowiedzi na glukozę opisano dla ludzkiej α-arestyny TXNIP. Białko TXNIP, w obecności glukozy zaangażowane jest w endocytozę transporterów GLUT1 i GLUT4 [80]. W sytuacji stresu energetycznego ulega jednak fosforylacji przez ludzkiego homologa drożdżowej kinazy Snf1, kinazę AMPK (ang. *5'-AMP-activated protein kinase*) [80], a fosforylacja ta skutkuje gwałtowną degradacją TXNIP [80]. Mutacje w obrębie motywów PY tego białka hamowały jego indukowaną fosforylacją degradację, co sugeruje, że fosforylacja TXNIP powoduje uzewnętrznienie się jego motywów PY i umożliwia jego rozpoznanie przez ligazę Nedd4 jako substratu przeznaczonego do degradacji [80]. Taki mechanizm regulacji pozwala na stworzenie auto-inhibicyjnej pętli odpowiedzi na zewnątrzkomórkowe stężenie glukozy, modulowane AMPK-zależną degradacją białka TXNIP.

PODSUMOWANIE

Przedstawiciele klanu arestyn to wielofunkcyjne białka zaangażowane w szereg istotnych funkcji związanych z wieloma procesami komórkowymi, zwłaszcza w regulację obrotu białek błonowych jako białka adaptorowe dla ligaz ubikwi-

tyny z rodziny Rsp5/Nedd4. Na szczególną uwagę zasługuje rodzina α-arestyn, której przedstawiciele występują powszechnie od drożdży po ludzi. α-Arestyny, choć ewolucyjnie starsze od zwierzęcych β-arestyn, odkryte zostały relatywnie niedawno i mimo intensywnych badań prowadzonych na przestrzeni ostatnich lat, wiele aspektów ich biologii pozostaje niewyjaśnionych. Niewiele wiadomo na temat funkcji niektórych przedstawicieli tej rodziny, mechanizmów selektywnego i specyficznego rozpoznawania przez nie białek przeznaczonych do internalizacji i recyklingu lub degradacji lizosomalnej/wakuolarnej, a także o mechanizmach molekularnych stojących za ich regulacją na drodze fosforylacji i ubikwitynacji w odpowiedzi na zmieniające się czynniki środowiska, dlatego zagadnienia te pozostają wyzwaniem na kolejne lata badań.

PODZIĘKOWANIA

Praca powstała dzięki wsparciu finansowemu z projektu badawczego NCN 2015/19/B/NZ1/00327 i projektu badawczego NCN 2019/35/B/NZ3/00379.

LITERATURA

[1] ABE F, IIDA H. Pressure-induced differential regulation of the two tryptophan permeases Tat1 and Tat2 by ubiquitin ligase Rsp5 and its binding proteins, Bul1 and Bul2. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 7566-7584.

[2] ALVAREZ CE. On the origins of arrestin and rhodopsin. *BMC Evol Biol* 2008; **8**: 222.

[3] ANDOH T, HIRATA Y, KIKUCHI A. PY motifs of Rod1 are required for binding to Rsp5 and for drug resistance. *FEBS Lett* 2002; **525**: 131-134.

[4] AUBRY L, GUETTA D, KLEIN G. The arrestin fold: variations on a theme. *Curr Genomics* 2009; **10**: 133-142.

[5] AUBRY L, KLEIN G. True arrestins and arrestin-fold proteins: a structure-based appraisal. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2013; **118**: 21-56.

[6] BATISTA TM, DAGDEVIREN S, CARROLL SH, CAI W, MELNIK VY, NOH HL, SAENGNIPANTHKUL S, KIM JK, KAHN, CR, LEE RT. Arrestin domain-containing 3 (Arrdc3) modulates insulin action and glucose metabolism in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020; **117**: 6733-6740.

[7] BECUWE M, LÉON S. Integrated control of transporter endocytosis and recycling by the arrestin-related protein Rod1 and the ubiquitin ligase Rsp5. *Elife* 2014; **3**: e03307.

[8] BECUWE M, VIEIRA N, LARA D, GOMES-REZENDE J, SOARES-CUNHA C, CASAL M, HAGUENAUER-TSAPIS R, VINCENT O, PAIVA S, LÉON S. A molecular switch on an arrestin-like protein relays glucose signaling to transporter endocytosis. *J Cell Biol* 2012; **196**: 247-259.

[9] BELGAREH-TOUZÉ N, LÉON S, ERPAPAZOGLOU Z, STAWIECKA-MIROTA M, URBAN-GRIMAL D, HAGUENAUER-TSAPIS R. Versatile role of the yeast ubiquitin ligase Rsp5p in intracellular trafficking. *Biochem Soc Trans* 2008; **36**: 791-796.

[10] BOEHMER C, HENKE G, SCHNIEPP R, PALMADA M, ROTHSTEIN JD, BRÖER, LANG F. Regulation of the glutamate transporter EAAT1 by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum and glucocorticoid-inducible kinase isoforms SGK1/3 and protein kinase B. *J Neurochem* 2003; **86**: 1181-1188.

[11] BOEHMER C, OKUR F, SETIAWAN I, BRÖER S, LANG F. Properties and regulation of glutamine transporter SN1 by protein kinases SGK and PKB. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **306**: 156-162.

[12] BOTSTEIN D, FINK GR. Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. *Genetics* 2011; **189**: 695-704.
[13] CRAPEAU M, MERHI A, ANDRÉ B. Stress conditions promote yeast Gap1 permease ubiquitylation and down-regulation via the arrestin-like Bul and Aly proteins. *J Biol Chem* 2014; **289**: 22103-22116.
[14] DORES MR, LIN H, J GRIMSEY N, MENDEZ F, TREJO J. The α-arrestin ARRDC3 mediates ALIX ubiquitination and G protein-coupled receptor lysosomal sorting. *Mol Biol Cell* 2015; **26**: 4660-4673.
[15] DUPRÉ S, URBAN-GRIMAL D, HAGUENAUER-TSAPIS R. Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1695**: 89-111.
[16] FINLEY D, ULRICH HD, SOMMER T, KAISER P. The ubiquitin-proteasome system of Saccharomyces cerevisiae. *Genetics* 2012; **192**: 319-360.
[17] FUJITA S, SATO D, KASAI H, OHASHI M, TSUKUE S, TAKEKOSHI Y, GOMI K, SHINTANI T. The C-terminal region of the yeast monocarboxylate transporter Jen1 acts as a glucose signal-responding degron recognized by the α-arrestin Rod1. *J Biol Chem* 2018; **293**: 10926-10936.
[18] GHADDAR K, MERHI A, SALIBA E, KRAMMER EM, PRÉVOST M, ANDRÉ B. Substrate-induced ubiquitylation and endocytosis of yeast amino acid permeases. *Mol Cell Biol* 2014; **34**: 4447-4463.
[19] GUINEY EL, KLECKER T, EMR SD. Identification of the endocytic sorting signal recognized by the Art1-Rsp5 ubiquitin ligase complex. *Mol Biol Cell* 2016; **27**: 4043-4054.
[20] GUPTA R, KUS B, FLADD C, WASMUTH J, TONIKIAN R, SIDHU S, KROGAN NJ, PARKINSON J, ROTIN D. Ubiquitination screen using protein microarrays for comprehensive identification of Rsp5 substrates in yeast. *Mol Syst Biol* 2007; **3**: 116.
[21] HAN SO, KOMMADDI RP, SHENOY SK. Distinct roles for β-arrestin2 and arrestin-domain-containing proteins in β2 adrenergic receptor trafficking. *EMBO Rep* 2013; **14**: 164-171.
[22] HATAKEYAMA R, KAMIYA M, TAKAHARA T, MAEDA T. Endocytosis of the aspartic acid/glutamic acid transporter Dip5 is triggered by substrate-dependent recruitment of the Rsp5 ubiquitin ligase via the arrestin-like protein Aly2. *Mol Cell Biol* 2010; **30**: 5598-5607.
[23] HERRADOR A, HERRANZ S, LARA D, VINCENT O. Recruitment of the ESCRT machinery to a putative seven-transmembrane-domain receptor is mediated by an arrestin-related protein. *Mol Cell Biol* 2010; **30**: 897-907.
[24] HERRADOR A, LIVAS D, SOLETTO L, BECUWE M, LÉON S, VINCENT O. Casein kinase 1 controls the activation threshold of an α-arrestin by multisite phosphorylation of the interdomain hinge. *Mol Biol Cell* 2015; **26**: 2128-2138.
[25] HERRANZ S, RODRÍGUEZ JM, BUSSINK HJ, SÁNCHEZ-FERRERO JC, ARST HN, PEÑALVA MA, VINCENT O. Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; **102**: 12141-12146.
[26] HETTEMA EH, VALDEZ-TAUBAS J, PELHAM HR. Bsd2 binds the ubiquitin ligase Rsp5 and mediates the ubiquitination of transmembrane proteins. *EMBO J* 2004; **23**: 1279-1288.
[27] HICKE L, DUNN R. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003; **19**: 141-172.
[28] HICKE L, ZANOLARI B, RIEZMAN H. Cytoplasmic tail phosphorylation of the alpha-factor receptor is required for its ubiquitination and internalization. *J Cell Biol* 1998; **141**: 349-358.
[29] HORÁK J. The role of ubiquitin in down-regulation and intracellular sorting of membrane proteins: insights from yeast. *Biochim Biophys Acta* 2003; **1614**: 139-155.
[30] HOVSEPIAN J, DEFENOUILLÈRE Q, ALBANÈSE V, VÁCHOVÁ L, GARCIA C, PALKOVÁ Z, LÉON S. Multilevel regulation of an α-arrestin by glucose depletion controls hexose transporter endocytosis. *J Cell Biol* 2017; **216**: 1811-1831.
[31] HUIBREGTSE JM, SCHEFFNER M, BEAUDENON S, HOWLEY PM. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase [*published correction appears in Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 May 23; **92**: 5249]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; **92**: 2563-2567.

[32] KAWAI K, MORIYA A, UEMURA S, ABE F. Functional implications and ubiquitin-dependent degradation of the peptide transporter Ptr2 in Saccharomyces cerevisiae. *Eukaryot Cell* 2014; **13**: 1380-1392.
[33] KHOURY E, NIKOLAJEV L, SIMAAN M, NAMKUNG Y, LAPORTE SA. Differential regulation of endosomal GPCR/β-arrestin complexes and trafficking by MAPK. *J Biol Chem* 2014; **289**: 23302-23317.
[34] KIM YM, BENOVIC JL. Differential roles of arrestin-2 interaction with clathrin and adaptor protein 2 in G protein-coupled receptor trafficking. *J Biol Chem* 2002; **277**: 30760-30768.
[35] KOMANDER D. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem Soc Trans* 2009; **37**: 937-953.
[36] KÜHN H, HALL SW, WILDEN U. Light-induced binding of 48-kDa protein to photoreceptor membranes is highly enhanced by phosphorylation of rhodopsin. *FEBS Lett* 1984; **176**: 473-478.
[37] LAUWERS E, JACOB C, ANDRÉ B. K63-linked ubiquitin chains as a specific signal for protein sorting into the multivesicular body pathway. *J Cell Biol* 2009; **185**: 493-502.
[38] LÉON S, ERPAPAZOGLOU Z, HAGUENAUER-TSAPIS R. Ear1p and Ssh4p are new adaptors of the ubiquitin ligase Rsp5p for cargo ubiquitylation and sorting at multivesicular bodies. *Mol Biol Cell* 2008; **19**: 2379-2388.
[39] LÉON S, HAGUENAUER-TSAPIS R. Ubiquitin ligase adaptors: regulators of ubiquitylation and endocytosis of plasma membrane proteins. *Exp Cell Res* 2009; **315**: 1574-1583.
[40] LIN CH, MACGURN JA, CHU T, STEFAN CJ, EMR SD. Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. *Cell* 2008; **135**: 714-725.
[41] LIU J, SITARAM A, BURD CG. Regulation of copper-dependent endocytosis and vacuolar degradation of the yeast copper transporter, Ctr1p, by the Rsp5 ubiquitin ligase. *Traffic* 2007; **8**: 1375-1384.
[42] LU PJ, ZHOU XZ, SHEN M, LU KP. Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules. *Science* 1999; **283**: 1325-1328.
[43] MACGURN JA, HSU PC, SMOLKA MB, EMR SD. TORC1 regulates endocytosis via Npr1-mediated phosphoinhibition of a ubiquitin ligase adaptor. *Cell* 2011; **147**: 1104-1117.
[44] MACKENZIE K, FOOT NJ, ANAND S, DALTON HE, CHAUDHARY N, COLLINS BM, MATHIVANAN S, KUMAR S. Regulation of the divalent metal ion transporter via membrane budding. *Cell Discov* 2016; **2**: 16011.
[45] MARCHAL C, HAGUENAUER-TSAPIS R, URBAN-GRIMAL D. Casein kinase I-dependent phosphorylation within a PEST sequence and ubiquitination at nearby lysines signal endocytosis of yeast uracil permease. *J Biol Chem* 2000; **275**: 23608-23614.
[46] MENG J, YAO Z, HE Y, ZHANG R, ZHANG Y, YAO X, YANG H, CHEN L, ZHANG Z, ZHANG H, BAO X, HU G, WU T, CHENG J. ARRDC4 regulates enterovirus 71-induced innate immune response by promoting K63 polyubiquitination of MDA5 through TRIM65. *Cell Death Dis* 2017; **8**: e2866.
[47] MERHI A, ANDRÉ B. Internal amino acids promote Gap1 permease ubiquitylation via TORC1/Npr1/14-3-3-dependent control of the Bul arrestin-like adaptors. *Mol Cell Biol* 2012; **32**: 4510-4522.
[48] METZGER MB, HRISTOVA VA, WEISSMAN AM. HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *J Cell Sci* 2012; **125**: 531-537.
[49] NABHAN JF, HU R, OH RS, COHEN SN, LU Q. Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; **109**: 4146-4151.
[50] NAMY O, DUCHATEAU-NGUYEN G, HATIN I, HERMANN-LE DENMAT S, TERMIER M, ROUSSET JP. Identification of stop codon readthrough genes in Saccharomyces cerevisiae. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**: 2289-2296.
[51] NIKKO E, PELHAM HR. Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma membrane transporters. *Traffic* 2009; **10**: 1856-1867.
[52] NIKKO E, SULLIVAN JA, PELHAM HR. Arrestin-like proteins mediate ubiquitination and endocytosis of the yeast metal transporter Smf1. *EMBO Rep* 2008; **9**: 1216-1221.
[53] NOVOSELOVA TV, ZAHIRA K, ROSE RS, SULLIVAN JA. Bul proteins, a nonredundant, antagonistic family of ubiquitin ligase regulatory proteins. *Eukaryot Cell* 2012; **11**: 463-470.

[54] O'DONNELL AF, APFFEL A, GARDNER RG, CYERT MS. Alpha-arrestins Aly1 and Aly2 regulate intracellular trafficking in response to nutrient signaling. *Mol Biol Cell* 2010; **21**: 3552-3566.
[55] O'DONNELL AF, HUANG L, THORNER J, CYERT MS. A calcineurin-dependent switch controls the trafficking function of α-arrestin Art6/Aly1. *J Biol Chem* 2013; **288**: 24063-24080.
[56] O'DONNELL AF, MCCARTNEY RR, CHANDRASHEKARAPPA DG, ZHANG BB, THORNER J, SCHMIDT MC. 2-Deoxyglucose impairs Saccharomyces cerevisiae growth by stimulating Snf1-regulated and α-arrestin-mediated trafficking of hexose transporters 1 and 3. *Mol Cell Biol* 2015; **35**: 939-955.
[57] O'DONNELL AF. The running of the Buls: control of permease trafficking by α-arrestins Bul1 and Bul2. *Mol Cell Biol* 2012; **32**: 4506-4509.
[58] PALMADA M, DIETER M, SPEIL A, BÖHMER C, MACK AF, WAGNER HJ, KLINGEL K, KANDOLF R, MURER H, BIBER J, CLOSS EI, LANG F. Regulation of intestinal phosphate cotransporter NaPi IIb by ubiquitin ligase Nedd4-2 and by serum- and glucocorticoid-dependent kinase 1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; **287**: G143-G150.
[59] PATWARI P, EMILSSON V, SCHADT EE, CHUTKOW WA, LEE S, MARSILI A, ZHANG Y, DOBRIN R, COHEN DE, LARSEN PR, ZAVACKI AM, FONG LG, YOUNG SG, LEE RT. The arrestin domain-containing 3 protein regulates body mass and energy expenditure. *Cell Metab* 2011; **14**: 671-683.
[60] PROSSER DC, PANNUNZIO AE, BRODSKY JL, THORNER J, WENDLAND B, O'DONNELL AF. α-Arrestins participate in cargo selection for both clathrin-independent and clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Sci* 2015; **128**: 4220-4234.
[61] PUCA L, CHASTAGNER P, MEAS-YEDID V, ISRAËL A, BROU C. A-arrestin 1 (ARRDC1) and β-arrestins cooperate to mediate Notch degradation in mammals. *J Cell Sci* 2013; **126**: 4457-4468.
[62] SAVOCCO J, NOOTENS S, AFOKPA W, BAUSART M, CHEN X, VILLERS J, RENARD HF, PRÉVOST M, WATTIEZ R, MORSOMME P. Yeast α-arrestin Art2 is the key regulator of ubiquitylation-dependent endocytosis of plasma membrane vitamin B1 transporters. *PLoS Biol* 2019; **17**: e3000512.
[63] SAXENA G, CHEN J, SHALEV A. Intracellular shuttling and mitochondrial function of thioredoxin-interacting protein. *J Biol Chem* 2010; **285**: 3997-4005.
[64] SCHEFFNER M, KUMAR S. Mammalian HECT ubiquitin-protein ligases: biological and pathophysiological aspects. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1843**: 61-74.
[65] SEN A, ACOSTA-SAMPSON L, ALVARO CG, AHN JS, CATE JH, THORNER J. Internalization of Heterologous Sugar Transporters by Endogenous α-Arrestins in the Yeast Saccharomyces cerevisiae. *Appl Environ Microbiol* 2016; **82**: 7074-7085.
[66] SHEA FF, ROWELL JL, LI Y, CHANG TH, ALVAREZ CE. Mammalian α arrestins link activated seven transmembrane receptors to Nedd4 family e3 ubiquitin ligases and interact with β arrestins. *PLoS One* 2012; **7**: e50557.
[67] SHENOY SK, XIAO K, VENKATARAMANAN V, SNYDER PM, FREEDMAN NJ, WEISSMAN AM. Nedd4 mediates agonist-dependent ubiquitination, lysosomal targeting, and degradation of the beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 2008; **283**: 22166-22176.
[68] SNOWDON C, VAN DER MERWE G. Regulation of Hxt3 and Hxt7 turnover converges on the Vid30 complex and requires inactivation of the Ras/cAMP/PKA pathway in Saccharomyces cerevisiae. *PLoS One* 2012; **7**: e50458.
[69] SOUNG YH, FORD S, YAN C, CHUNG J. The Role of Arrestin Domain-Containing 3 in Regulating Endocytic Recycling and Extracellular Vesicle Sorting of Integrin β4 in Breast Cancer. *Cancers (Basel)* 2018; **10**: 507.
[70] STIMPSON HE, LEWIS MJ, PELHAM HR. Transferrin receptor-like proteins control the degradation of a yeast metal transporter. *EMBO J* 2006; **25**: 662-672.
[71] STOREZ H, SCOTT MGH, ISSAFRAS H, BURTEY A, BENMERAH A, MUNTANER O, PIOLOT T, TRAMIER M, COPPEY-MOISAN M, BOUVIER M, LABBÉ-JULLIÉ C, MARULLO S. Homo- and hetero-oligomerization of beta-arrestins in living cells. *J Biol Chem* 2005; **280**: 40210-40215.

[72] TAKAHASHI T, YANO T, ZHU J, HWANG GW, NAGANUMA A. Overexpression of FAP7, MIG3, TMA19, or YLR392c confers resistance to arsenite on Saccharomyces cerevisiae. *J Toxicol Sci* 2010; **35**: 945-946.
[73] TERRELL J, SHIH S, DUNN R, HICKE L. A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor. *Mol Cell* 1998; **1**: 193-202.
[74] TEVZADZE GG, PIERCE JV, ESPOSITO RE. Genetic evidence for a SPO1-dependent signaling pathway controlling meiotic progression in yeast. *Genetics* 2007; **175**: 1213-1227.
[75] VILLERS J, SAVOCCO J, SZOPINSKA A, DEGAND H, NOOTENS S, MORSOMME P. Study of the Plasma Membrane Proteome Dynamics Reveals Novel Targets of the Nitrogen Regulation in Yeast. *Mol Cell Proteomics* 2017; **16**: 1652-1668.
[76] VISHNIVETSKIY SA, HIRSCH JA, VELEZ MG, GUREVICH YV, GUREVICH VV. Transition of arrestin into the active receptor-binding state requires an extended interdomain hinge. *J Biol Chem* 2002; **277**: 43961-43967.
[77] WALDHART AN, DYKSTRA H, PECK AS, BOGUSLAWSKI EA, MADAJ ZB, WEN J, VELDKAMP K, HOLLOWELL M, ZHENG B, CANTLEY LC, MCGRAW TE, WU N. Phosphorylation of TXNIP by AKT Mediates Acute Influx of Glucose in Response to Insulin. *Cell Rep* 2017; **19**: 2005-2013.
[78] WAWRZYCKA D, SADLAK J, MACIASZCZYK-DZIUBIŃSKA E, WYSOCKI R. Rsp5-dependent endocytosis and degradation of the arsenite transporter Acr3 requires its N-terminal acidic tail as an endocytic sorting signal and arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2019; **1861**: 916-925.
[79] WONDAFRASH DZ, NIRE'A AT, TAFERE GG, DESTA DM, BERHE DA, ZEWDIE KA. Thioredoxin-Interacting Protein as a Novel Potential Therapeutic Target in Diabetes Mellitus and Its Underlying Complications. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2020; **13**: 43-51.
[80] WU N, ZHENG B, SHAYWITZ A, DAGON Y, TOWER C, BELLINGER G, SHEN CH, WEN J, ASARA J, MCGRAW TE, KAHN BB, CANTLEY LC. AMPK-dependent degradation of TXNIP upon energy stress leads to enhanced glucose uptake via GLUT1. *Mol Cell* 2013; **49**: 1167-1175.
[81] XIAO J, SHI Q, LI W, MU X, PENG J, LI M, CHEN M, HUANG H, WANG C, GAO K, FAN J. ARRDC1 and ARRDC3 act as tumor suppressors in renal cell carcinoma by facilitating YAP1 degradation. *Am J Cancer Res* 2018; **8**: 132-143.
[82] YANG B, KUMAR S. Nedd4 and Nedd4-2: closely related ubiquitin-protein ligases with distinct physiological functions. *Cell Death Differ* 2010; **17**: 68-77.
[83] ZHANG P, WANG C, GAO K, WANG D, MAO J, AN J, XU C, WU D, YU H, LIU JO, YU L. The ubiquitin ligase itch regulates apoptosis by targeting thioredoxin-interacting protein for ubiquitin-dependent degradation. *J Biol Chem* 2010; **285**: 8869-8879.
[84] ZHAO Y, MACGURN JA, LIU M, EMR S. The ART-Rsp5 ubiquitin ligase network comprises a plasma membrane quality control system that protects yeast cells from proteotoxic stress. *Elife* 2013; **2**: e00459.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 21.07.2020
Przyjęto: 03.08.2020
Donata Wawrzycka
Zakład Genetyki i Fizjologii Komórki
Instytut Biologii Eksperymentalnej
Uniwersytet Wrocławski
ul. Kanonia 6/8; 50-328 Wrocław
tel.: 713754128
e-mail: donata.wawrzycka@uwr.edu.pl

DIETARY PHENOLIC COMPOUNDS IN PLANTS: THEIR ANTIOXIDANT AND PHARMACOLOGICAL POTENTIAL

Naima FARHAT[1], Shabbir HUSSAIN[1], Shahzada Khurram SYED[2], Muhammad AMJAD[3], Mohsin JAVED[3], Muhammad IQBAL[4], Mazhar HUSSAIN[4], Shah Muhammad HAROON[3], Hamid RAZA[3], Shumaila Zulfiqar BUTT[1], Rabia KIRAN[1], Shakila RIAZ[1]

[1]Department of Chemistry, Lahore Garrison University, Lahore, Pakistan
[2]Department of Basic Medical Sciences, School of Health Sciences, University of Management and Technology, Lahore, Pakistan
[3]Department of Chemistry, School of Science, University of Management and Technology, Lahore, Pakistan
[4]Department of Chemistry, Govt College University Faisalabad, Faisalabad, Pakistan

Summary: The phenolic compounds from plants have a significant role in human diet as antioxidants. Their main sources are fruits, vegetables and beverages etc. However, by-products from food and agriculture also have valuable amounts of phenolic antioxidants. These phenolic compounds are effective in curing of many diseases including cancer, cardiovascular, contagious, viral and inflammatory diseases. Dietary phenolic contents were compared in various plant materials including rosemary extract, basil extract, laurel extract, cumin extract, ginger extract, extra virgin olive oil, high bush, low bush, cranberry, strawberry, high bush blue berry, low bush blue berry, wild mulberry, black plum skin, rough lettuce, red cabbage, wheat, date, rice kernel, rice bran, honey, red wine, white wine and green tea extract; the phenolics were found in the range of 0.25-147 mg/g, with the exceptionally higher value reported for basil extract (147 mg/g) and the lowest value (0.25 mg/g) for white wine. Among all the investigated fruits, vegetables, commercial fruit juices, beverages and wines, the highest amounts of phenolic contents were found in apple (296.3 mg/100g), mint (399.8 mg/100g), orange (339 mg/100g), instant coffee (146-151 mg/100g) and Italian red wine (3314-4177 mg/100g), respectively.

Keywords: dietary, phenolic, antioxidant, pharmacological

INTRODUCTION

There are many free radicals including reactive oxygen species which are continuously produced as by products in human body as a result of metabolism [1]. If these reactive oxygen species and free radicals are not excluded from body, they can cause oxidative stress in body which may lead to oxidation of bio molecules such as protein, lipids and DNA and thus leading ultimately to cancer [52]. If the production of free radicals is prolonged it may cause different diseases such as age related problem, atherosclerosis, neurodegenerative problems and inflammation etc [9]. It is much necessary to control these oxidant species by some antioxidant species which are abundantly found in common fruits and vegetables [40].

Plants are mostly rich in antioxidants which are not only necessary for life but also help to control the free radical activities. The phenolic compounds present in plants show antioxidant properties; these properties depend upon the nature of plants, growing conditions, harvesting time, packing conditions and type of solvent used in their extraction [30]. Crude extracts of plant materials, spices and herbs rich in phenolics are very important for food industry because they the ability to stop oxidative degradation of lipids and are thus important to improve the quality and nutritional value of food [57]. The phenolic compounds actively participate in adsorption, neutralization of free radicals and reduction of singlet and triplet oxygen and decomposition of peroxides. Plants also contain a variety of phytochemicals which are effective to control various health issues like high blood pressure, obesity and diabetes [21, 35]. The antioxidants lower the incidences of degenerative diseases such as brain dysfunction, heart disease, inflammation, arthritis, arteriosclerosis and cancer [19]. The Phenolic compounds in guava help to cure cancerous cells and prevent skin aging before time [35].

Keeping in view the value of antioxidant potential of plants, current studies were performed to compare the antioxidant dietary phenolic contents in various plants and their products.

PHENOLIC COMPOUNDS IN DIETARY CONSTITUENTS

Phenolic compounds, ubiquitous in plants are an essential part of the human diet. They are of considerable interest owing to their antioxidant properties [3]. They have various chemical structures which are responsible for their colors and rigidity. They belong to a class of plant secondary metabolites and may consist of simple structures (e.g. phenolic acids), polyphenols (e.g., flavonoids) or polymeric forms [11]. There have been a larger number of investigations on the role of pheno-

lic compounds in food and beverages during last few years [17, 34]. These compounds play a *vital* role in defense responses including anti-proliferative activities, antioxidant, anti-inflammatory and anti-aging. Therefore, it is beneficial to eat the plant foods comprising of high antioxidant contents, which lower the incidences of certain chronic diseases e.g., cardiovascular, cancer and diabetes through the management of oxidative stress [27]. **Table 1** shows the comparison of phenolic content in some plant materials [17].

TABLE 1. Amount of Phenolic contents (mg/g) in some plant materials

PRODUCTS	TOTAL PHENOLIC CONTENT	PRODUCTS	TOTAL PHENOLIC CONTENT
Rosemary extract	2.19±0.15	Wild mulberry	3.73±0.11
Basil extract	147±160	Black plum skin	92.5
Laurel extract	92.0±2.45	Rough lettuce	0.53±0.09
Cumin extract	37.4±0.32	Red cabbage	1.78±0.14
Ginger extract (dw)	39.9±2.6	Wheat	1.86
Extra virgin olive oil	0.27	Date	2.47
High bush	2.78	Rice kernel	1.85
Low bush	3.49	Rice bran	16.4
Cranberry	1.71	Honey	0.35
Strawberry	2.57±0.02	Red wine	1.85±2.32
High bush blue berry	3.86±0.14	White wine	0.25±0.05
Low bush blue berry	4.71±0.19	Green tea extract	59.8±1.8

Phenolic contents (**Tab. 1**) in some plant materials (rosemary extract, basil extract, laurel extract, cumin extract, ginger extract, extra virgin olive oil, high bush, low bush, cranberry, strawberry, high bush blue berry, low bush blue berry, wild mulberry, black plum skin, rough lettuce, red cabbage, wheat, date, rice kernel, rice bran, honey, red wine, white wine, green tea extract) were found in the range of 0.27-147 mg/g with the exceptionally higher value reported for basil extract (147 mg/g), black plum skin (92.5 mg/g) and laurel extract (92.5 mg/g), green tea extract (59.8.5 mg/g), ginger extract (39.9 mg/g) and rice bran (16.4 mg/g) while the lowest values were observed for white wine (0.25 mg/g), extra virgin olive oil (0.27 mg/g) and rough lettuce (0.53 mg/g).

CLASSIFICATION OF PHENOLIC COMPOUNDS

Phenolic compounds are distributed into many groups on the basis of their chemical structures on the basis of differences in position and number of hydroxyl groups on aromatic ring which result in change of simple phenolic compounds to complex polymer compounds. Thus they may be classified into flavonoids, phenolic acids, tannins (hydrolysable and condensed) stilbenes and lignans on the basis of structures [23].

FLAVONOIDS

One of the most abundant phenolic compounds in our diet is flavonoids. The structures of flavonoids containing 15 carbon atoms with flavan nucleus exist in three rings (C6-C3-C6). Flavonoids are further distributed into six subgroups i.e. flavanols, flavonols, flavones, flavanones, isoflavones, anthocyanin on the basis of the oxidation state of central C-ring (**Fig. 1**) [13, 14].

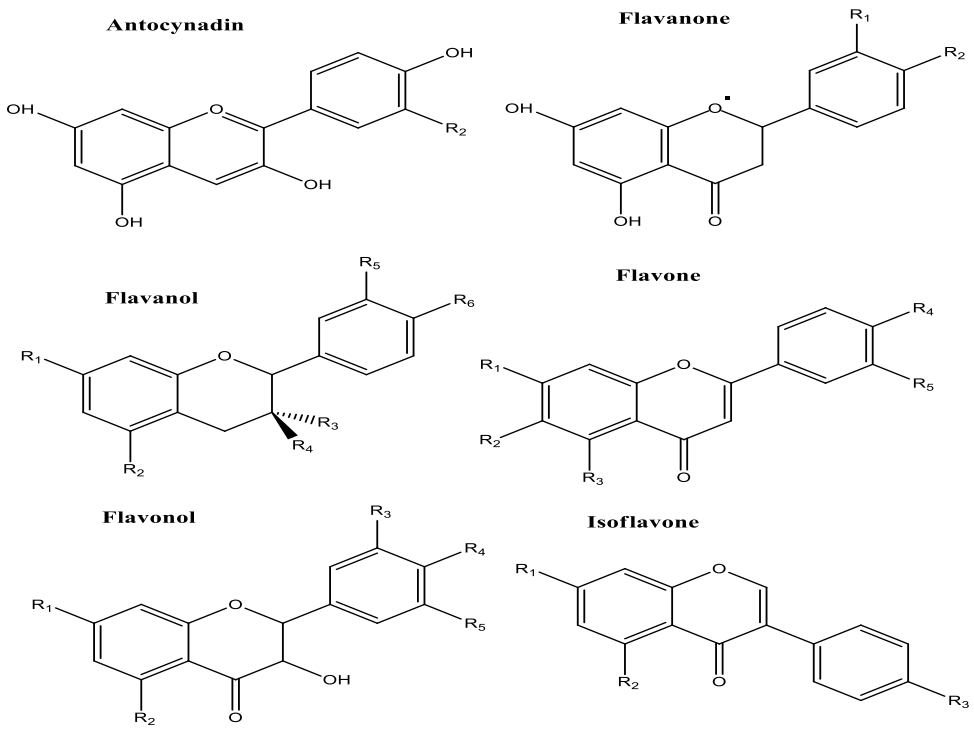


FIGURE 1. Structures of six important flavonoids

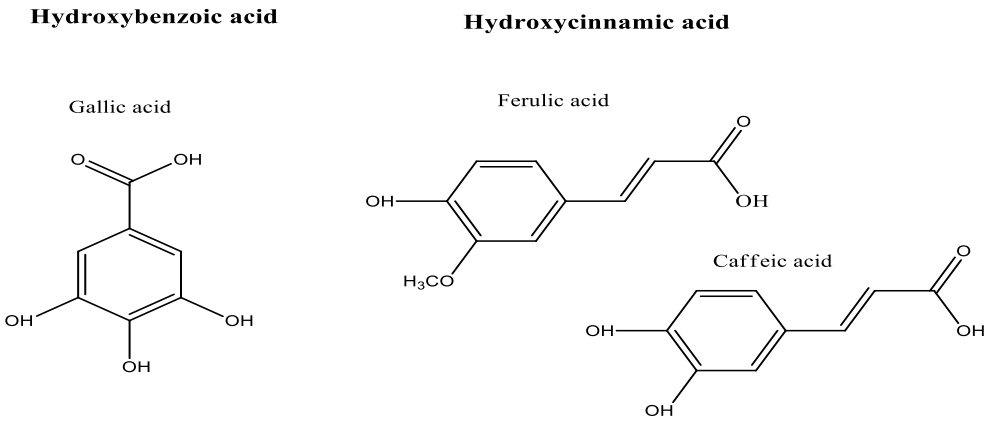


FIGURE 2. Structures of important phenolic acids

PHENOLIC ACID

Phenolic acids are further divided into two sub groups (**Fig. 2**) i.e., derivatives of benzoic acid (Gallic acid) and cinnamic acid (caffeic acid and Ferullic acid) [16]. **Figure 2** displays the structures of important phenolic acids.

TANNINS

Tannins are the one of major groups of polyphenols in human diet and distributed into two subgroups:

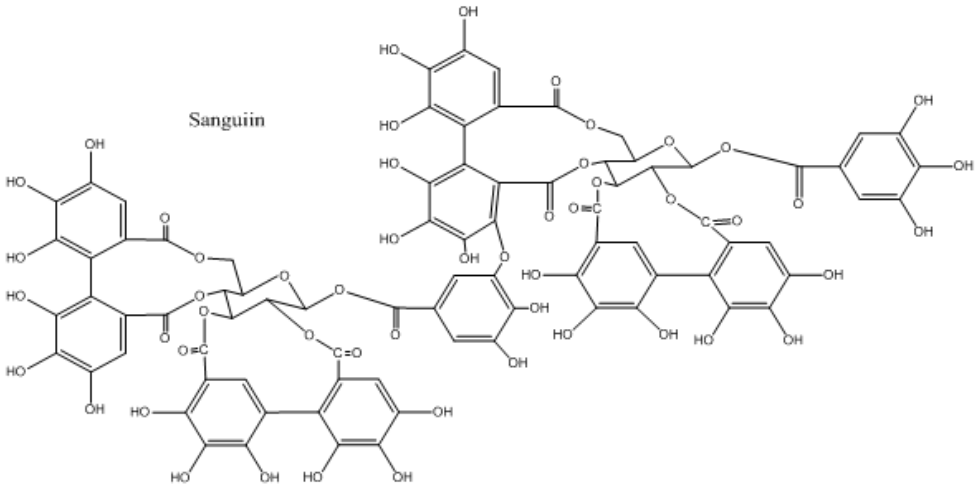


FIGURE 3. Structure of ellagitannine

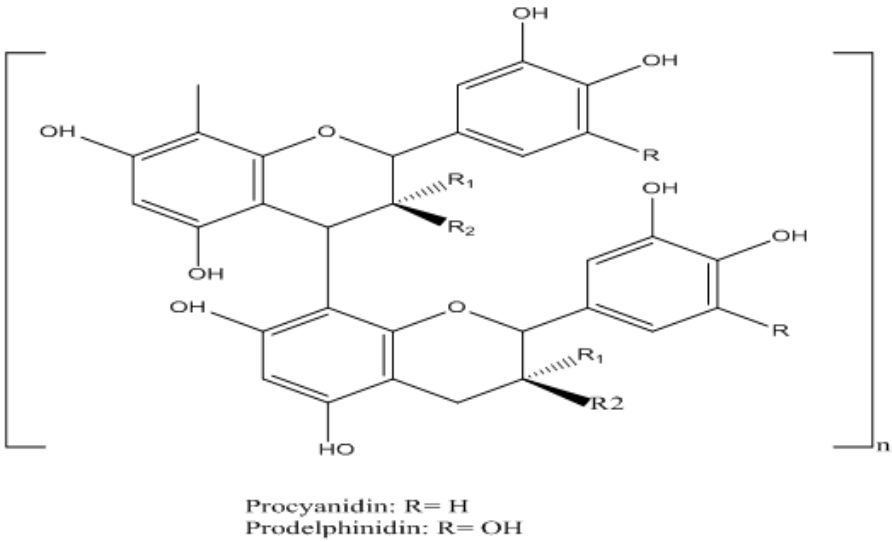


FIGURE 4. Structure of proanthocyanidins

Hydrolysable tannins

They have central core of glucose or polyol esterified with gallic acid (an hexahydroxydiphenic acid) and known as gallotannins and ellagitannins, respectively. **Figure 3** displays the structure of sanguiin which is a ellagitannine.

Condensed tannins

They are mentioned as proanthocyanidins (**Fig. 4**) in which polymers or oligomers of flavan-3-ol are attached through an interflavan carbon bond [30, 57].

MECHANISM OF ACTION OF PHENOLIC ANTIOXIDANTS

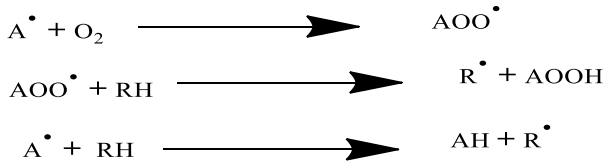
The property of phenolic compounds as antioxidant depends upon the structure including number and position of hydroxyl group in phenolic compounds. A phenolic antioxidant can provide hydrogen atom to a lipid radical for the production of antioxidant radicals and lipid derivatives. The free radicals of antioxidants may hinder further propagation reactions.

$$R^{\bullet}/RO^{\bullet}/ROO^{\bullet} + AH \longrightarrow A^{\bullet} + RH/\ ROH/\ ROOH$$

$$RO^{\bullet}/\ ROO^{\bullet} + A^{\bullet} \longrightarrow ROA/\ ROOA$$

$$ROO^{\bullet} + RH \longrightarrow ROOH + R^{\bullet}$$

The antioxidant free radical can undergo redox reaction in the presence of oxygen and any alkyl group such as:



The phenyl radical gets stable due to the unpaired electrons delocalization around the benzene ring and terminates the chain reaction. Ethyl radical or n-butyl radical may increase the antioxidant property of phenolic compounds more than methyl radical by substitution at para position. However, as chain gets long and branched antioxidant property is lowered [37, 46, 47]. The resonance structures of phenyl radicals are given in **figure 5** [45].

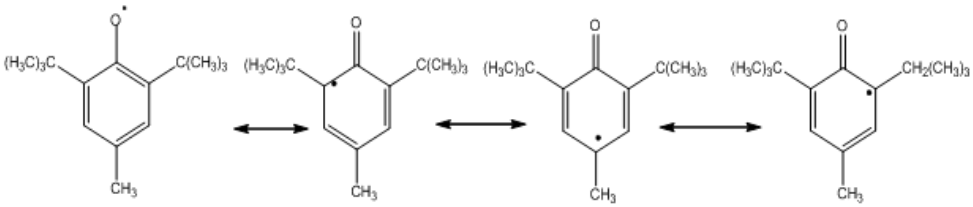


FIGURE 5. The resonance structures of phenyl radicals

PHENOLIC COMPOUNDS IN SOME PLANT MATERIALS

Almost all the plants in human diet including vegetables, fruits and beverages are the main sources of phenolic compounds. Many edible plants show much inhibitory potential for oxidants [43].

VEGETABLES AND FRUITS

Phenolic compounds such as flavonoids are produced in the plants and fruits naturally as secondary metabolites [56]. Vegetables and fruits are normally very rich in antioxidational and nutritional contents. There is an extensive variation amongst total phenolic contents in different vegetables and fruits. The phenolic contents in different plants vary due to the complexity of the groups, analysis and extractions techniques. Phenolic contents were identified in some fruits like apple, banana, cherry, guava and mango, litchi and vegetables like broccoli, carrot, cucumber, mint and spinach *etc* [6, 25, 35, 36, 44, 50]. Spinach contained greater content of

flavonoids as compared to other common vegetables [20, 22, 39]. Spinach contains unique flavonoid compounds such as glucuronides and acylated di-andtriglycosides of methylated and methylenedioxy derivatives of 6-oxygenated flavonols [2, 18].

Rice is the most consumed crop by all human population all over the world. Studies have shown that rice are full of phytochemicals which are associated with the reduced risk of many diseases [28, 58]. Near Infra-Red Spectroscopy was used to characterize the rice and it has shown the presence of many phytochemicals such as tocopherol, tocotrienol, kernel phenolic, antioxidant capacity and flavonoid contents [4, 24, 31].

Olive is the major crop which is grown in Mediterranean region as a source of olive oil and other edible parts of olive plant. Besides its nutritional values it is also full of many other phytochemicals which are important for health and the control of diseases [8]. Researchers have shown that olive is full of antioxidant chemicals such as phenolic compounds. These phenolic compounds may attribute to the food quality such as flavor and health benefits [41]. The concentration of phenolic compounds in olive fruits could reach values ranging between 1 and 3% of the fresh pulp weight [49, 54].

BEVERAGES

Significant quantities of phenolic contents in the human diet are obtained from fruit juices, wines and tea of plants. The composition of phenolic contents differs in juices depending upon commercial processing procedures. In the similar way composition of phenolic contents in wines may be varied by several aspects such as quality of the grapes used, rising conditions, manufacture techniques and processing limitations [14, 32].

Everyone is familiar with the consumption of lemon juice. It is most likely used juices among citrus fruit juices [33, 53]. Lemon has acquired much importance due to high content of flavonoid such as flavanones and flavone glycosides [10]. Other phenolic compounds such ashydroxycinnamic acids are present in this juice at a lower concentration than flavanones and flavones. The main flavanones detected in lemon juice are eriocitrin and hesperidin [5, 12].

AGRO-INDUSTRIAL BY-PRODUCTS

It is documented that some agricultural by-products such as buck wheat hulls, rice hulls and pistachio hulls contain phenolic compounds. By-products from agriculture provide valuable amounts of phenolic antioxidants. The peels of different fruits and vegetables have been reported to comprise greater number of phenolic compounds than the edible fleshy parts. By-products and waste of olives, grape seed peels, grape juices by products and white wine production also provide the reasonable amounts of phenolic compounds [3, 7, 48, 51]. **Table 2** shows dietary phenolic contents in some fruits, vegetables, fruit juices and beverages.

TABLE 2. Phenolic compounds in some common foods

SOURCES	TOTAL PHENOLIC CONTENT	SOURCES	TOTAL PHENOLIC CONTENT
Fruits			
Apple	296.3±6.4	Guava	126.4±6.0
Banana	90.4±3.2	Litchi	3.35±0.05
Blueberry	270-930	Mango	6.25±0.05
Cherry	105.4±27.5	Strawberry	160±1.2
Vegetables			
Broccoli	101.6±1.24	Mint	399.8±3.2
Brssel sprouts	68.8±1.3	Spinach	91.0±8.5
Cabbage	54.6±7.0	Tomato	25.9-50.0
Carrot	56.4±5.1	Yellow onion	76.3±1.9
Commercial fruit juices			
Apple	339±8.5	Pineapple	358±3
Grape fruit	535±11	Prune	441±59
Orange	755±18		
Beverages			
Black tea	80.5-134.9	Instant coffee	146-151
Green tea	117.3	Ground coffee	52.5-57.0
Red wines			
Argentine	1593-1637	Japanese	1810-2151
French	1847-2600	Spanish	1869
Italian	3314-4177		
White wines			
Argentine	216	Japanese	295-556
Italian	439-854	Spanish	292
Rose wines			
Italian	1304	Japanese	340

Table 2 shows demonstrates that the highest amounts of phenolic contents were found in apple (296.3 mg/100g), mint (399.8 mg/100g), orange (339 mg/100g), instant coffee (146-151 mg/100g) and Italian red wine (3314-4177) among the list of all currently reviewed fruits, vegetables, commercial fruit juices, beverages and wines, respectively.

HEALTH POTENTIAL OF PHENOLIC COMPOUNDS

The consumption of dietary Phenolic compounds depends upon the liking and eating practices of individuals. The average dietary intake of polyphenols per person approximately is 1 gram. Phenolic compounds show their activities in *vitro* as antioxidants and found active against many diseases like cancer, cardiovascular diseases [55]. It has been investigated that oral administration of orange peel, caffeine and black tea extracts are effective in reduction of body weight gain and formation of adipose tissues. A study has also shown the reduction of synergistic effect on antioxidant activity by using the combination of four fruits such as apple, orange, grapes and blueberry [46].

Polymethoxyflavones being important components of orange peel are found effective as anti-inflammatory, anti-carcinogenic, anti-viral, anti-oxidant, anti--thrombogenic and anti-athrogenic agents. It was investigated that hydroxytyrosol-a key component of olive oil had a good potential to reduce the coronary heart disease and atherosclerosis by itself. Soy comprises isoflavones which are effective against chronic diseases including different kinds of cancer, osteoporosis, cardiovascular ailments and menopausal symptoms. Isoflavones are also effective to reduce allergic rhinitis [15, 26, 38, 45]. Numerous plants i.e. grapes, pistachio, peanuts and berry fruits have phenolic compounds which are beneficial in neurological disorders and type 2 diabetes [29].

Revertrol has been proved to be supportive in reduction of body weight at higher given doses and also showed cardio protective effects. It helps in reduction of fats by inhibiting adipogenesis and increasing the rate of apoptosis in adipocytes which affect the gene expressions to moderate mitochondrial functions [42].

CONCLUSIONS

Phenolic antioxidants from plants in human diet are natural antioxidants which have an aromatic ring containing one or more hydroxyl groups at different positions of the ring. The number of hydroxyl groups and their positions determine the potential of phenolic compounds as antioxidants. The valuable sources of

phenolic antioxidants are fruits, vegetables, beverages, by-product and waste from agriculture. The health benefits such as anti-inflammation, anti-infection, anti-cancer and anti-proliferation are usually attributed to the type of pleotropic bio-chains present in them. The phenolic components in the investigated plant materials (rosemary extract, basil extract, laurel extract, cumin extract, ginger extract, extra virgin olive oil, high bush, low bush, cranberry, strawberry, high bush blue berry, low bush blue berry, wild mulberry, black plum skin, rough lettuce, red cabbage, wheat, date, rice kernel, rice bran, honey, red wine, white wine, green tea extract) were found in the range of 0.25-147 mg/g with the exceptionally higher value reported for basil extract (147 mg/g) and the lowest value (0.25 mg/g) for white wine. The highest amounts of phenolic contents were found in apple (296.3 mg/100g), mint (399.8 mg/100g), orange (339 mg/100g), instant coffee (146-151 mg/100g) and Italian red wine (3314-4177) among the list of all currently reviewed fruits, vegetables, commercial fruit juices, beverages and wines, respectively.

REFERENCES

[1] APEL, KLAUS. HIRT, HERIBERT. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology. 2004*;* **55**(373-399.

[2] ARITOMI, MASAKAZU. KAWASAKI, TOSHIO. Three highly oxygenated flavone glucuronides in leaves of Spinacia oleracea. Phytochemistry. 1984*;* **23**(9): 2043-2047.

[3] BALASUNDRAM, NAGENDRAN, SUNDRAM, KALYANA. SAMMAN, SAMIR. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chemistry. 2006*;* **99**(1): 191-203.

[4] BERGMAN, CJ. XU, Z. Genotype and environment effects on tocopherol, tocotrienol, and γ-oryzanol contents of Southern US rice. Cereal Chemistry. 2003*;* **80**(4): 446-449.

[5] BERHOW, MARK. Survey of phenolic compounds produced in Citrus. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service Technical Bulletin. 1998*;* **1856**(16-18.

[6] BHARDWAJ, RAJU LAL. PANDEY, SHRUTI. Juice blends—a way of utilization of under-utilized fruits, vegetables, and spices: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2011*;* **51**(6): 563-570.

[7] BRAVO, LAURA. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutrition Reviews. 1998*;* **56**(11): 317-333.

[8] BULOTTA, STEFANIA, CELANO, MARILENA, LEPORE, SAVERIO MASSIMO, MONTALCINI, TIZIANA, PUJIA, ARTURO. RUSSO, DIEGO. Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases. Journal of Translational Medicine. 2014*;* **12**(1): 219.

[9] CAI, YIZHONG, LUO, QIONG, SUN, MEI. CORKE, HAROLD. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. Life Sciences. 2004*;* **74**(17): 2157-2184.

[10] CARISTI, CORRADO, BELLOCCO, ERSILIA, PANZERA, VINCENZA, TOSCANO, GIOVANNI, VADALÀ, ROSA. LEUZZI, UGO. Flavonoids detection by HPLC-DAD-MS-MS in lemon juices from Sicilian cultivars. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003*;* **51**(12): 3528-3534.

[11] CHEYNIER, VÉRONIQUE. Phenolic compounds: from plants to foods. Phytochemistry Reviews. 2012*;* **11**(2-3): 153-177.

[12] CLIFFORD, MICHAEL N. Chlorogenic acids and other cinnamates–nature, occurrence and dietary burden. Journal of the Science of Food and Agriculture. 1999; **79**(3): 362-372.

[13] D ARCHIVIO, MASSIMO, FILESI, CARMELA, DI BENEDETTO, ROBERTA, GARGIULO, RAFFAELLA, GIOVANNINI, CLAUDIO. MASELLA, ROBERTA. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. Annali-Istituto Superiore di Sanita. 2007; **43**(4): 348.

[14] DAI, JIN. MUMPER, RUSSELL J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules. 2010; **15**(10): 7313-7352.

[15] DIMITRIOS, BOSKOU. Sources of natural phenolic antioxidants. Trends in Food Science & Technology. 2006; **17**(9): 505-512.

[16] DUNN, CHRISTIAN. FREEMAN, CHRIS. The role of molecular weight in the enzyme-inhibiting effect of phenolics: the significance in peatland carbon sequestration. Ecological Engineering. 2018; **114**(162-166.

[17] FERNANDEZ-PANCHON, MS, VILLANO, D, TRONCOSO, AM. GARCIA-PARRILLA, MC. Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro results to in vivo evidence. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2008; **48**(7): 649-671.

[18] FERRERES, FEDERICO, CASTAÑER, MARISOL. TOMÁS-BARBERÁN, FRANCISCO A. Acylated flavonol glycosides from spinach leaves (Spinacia oleracea). Phytochemistry. 1997; **45**(8): 1701-1705.

[19] FESKANICH, DIANE, ZIEGLER, REGINA G, MICHAUD, DOMINIQUE S, GIOVANNUCCI, EDWARD L, SPEIZER, FRANK E, WILLETT, WALTER C. COLDITZ, GRAHAM A. Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women. Journal of the National Cancer Institute. 2000; **92**(22): 1812-1823.

[20] GIL, MARÍA I, FERRERES, FEDERICO. TOMÁS-BARBERÁN, FRANCISCO A. Effect of postharvest storage and processing on the antioxidant constituents (flavonoids and vitamin C) of fresh-cut spinach. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1999; **47**(6): 2213-2217.

[21] HE, QIAN. VENANT, NIHORIMBERE. Antioxidant power of phytochemicals fromPsidium guajava leaf. Journal of Zhejiang University-Science A. 2004; **5**(6): 676-683.

[22] HOWARD, LR, PANDJAITAN, N, MORELOCK, T. GIL, MI. Antioxidant capacity and phenolic content of spinach as affected by genetics and growing season. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002; **50**(21): 5891-5896.

[23] IGNAT, IOANA, VOLF, IRINA. POPA, VALENTIN I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. Food Chemistry. 2011; **126**(4): 1821-1835.

[24] JIANG, SL, WU, JG, FENG, Y, YANG, XE. SHI, CH. Correlation analysis of mineral element contents and quality traits in milled rice (Oryza stavia L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2007; **55**(23): 9608-9613.

[25] KEVERS, CLAIRE, FALKOWSKI, MICHAEL, TABART, JESSICA, DEFRAIGNE, JEAN-OLIVIER, DOMMES, JACQUES. PINCEMAIL, JOËL. Evolution of antioxidant capacity during storage of selected fruits and vegetables. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2007; **55**(21): 8596-8603.

[26] LI, SHIMING, PAN, MIN-HSIUNG, LO, CHIH-YU, TAN, DI, WANG, YU, SHAHIDI, FEREIDOON. HO, CHI-TANG. Chemistry and health effects of polymethoxyflavones and hydroxylated polymethoxyflavones. Journal of Functional Foods. 2009; **1**(1): 2-12.

[27] LIN, DERONG, XIAO, MENGSHI, ZHAO, JINGJING, LI, ZHUOHAO, XING, BAOSHAN, LI, XINDAN, KONG, MAOZHU, LI, LIANGYU, ZHANG, QING. LIU, YAOWEN. An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. Molecules. 2016; **21**(10): 1374.

[28] LIU, RUI HAI. Whole grain phytochemicals and health. Journal of Cereal Science. 2007; **46**(3): 207-219.

[29] MARQUES, FRANCINE Z, MARKUS, M ANDREA. MORRIS, BRIAN J. Resveratrol: cellular actions of a potent natural chemical that confers a diversity of health benefits. The international journal of biochemistry & cell biology. 2009; **41**(11): 2125-2128.

[30] MARTINS, NATÁLIA, BARROS, LILLIAN. FERREIRA, ISABEL CFR. In vivo antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. Trends in Food Science & Technology. 2016*;* **48**(1-12.

[31] MILLER, ANDREAS. ENGEL, KARL-HEINZ. Content of γ-oryzanol and composition of steryl ferulates in brown rice (Oryza sativa L.) of European origin. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2006*;* **54**(21): 8127-8133.

[32] MINATEL, IGOR OTAVIO, BORGES, CRISTINE VANZ, FERREIRA, MARIA IZABELA, GOMEZ, HECTOR ALONZO GOMEZ, CHEN, CHUNG-YEN OLIVER. LIMA, GIUSEPPINA PACE PEREIRA. Phenolic compounds: Functional properties, impact of processing and bioavailability. Phenolic compounds—Biological activity. 2017: 236.

[33] MIYAKE, YOSHIAKI, YAMAMOTO, KANEFUMI. OSAWA, TOSHIHIKO. Metabolism of antioxidant in lemon fruit (Citrus limon BURM. f.) by human intestinal bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1997*;* **45**(10): 3738-3742.

[34] MONAGAS, MARIA, BARTOLOME, BEGONA. GOMEZ-CORDOVES, CARMEN. Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2005*;* **45**(2): 85-118.

[35] NASEER, SUMRA, HUSSAIN, SHABBIR, NAEEM, NAUREEN, PERVAIZ, MUHAMMAD. RAHMAN, MADIHA. The phytochemistry and medicinal value of Psidium guajava (guava). Clinical Phytoscience. 2018*;* **4**(1): 32.

[36] NASEER, SUMRA, HUSSAIN, SHABBIR. ZAHID, ZARK. Nutritional and Antioxidant Potential of Common Vegetables in Pakistan. RADS Journal of Biological Research & Applied Sciences. 2019*;* **10**(1): 36-40.

[37] POHL, PAWEL, SERGIEL, IWONA. STECKA, HELENA. Determination and fractionation of metals in honey. Critical Reviews in Analytical Chemistry. 2009*;* **39**(4): 276-288.

[38] POURMORAD, F, HOSSEINIMEHR, SJ. SHAHABIMAJD, N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. African Journal of Biotechnology. 2006*;* **5**(11).

[39] PRICE, KEITH R, CASUSCELLI, FRANCESCO, COLQUHOUN, IAN J. RHODES, MICHAEL JC. Composition and content of flavonol glycosides in broccoli florets (Brassica olearacea) and their fate during cooking. Journal of the Science of Food and Agriculture. 1998*;* **77**(4): 468-472.

[40] RICE-EVANS, CATHERINE A, MILLER, NICHOLAS J. PAGANGA, GEORGE. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology and Medicine. 1996*;* **20**(7): 933-956.

[41] RYAN, DANIELLE. ROBARDS, KEVIN. Critical Review. Phenolic compounds in olives. Analyst. 1998*;* **123**(5): 31R-44R.

[42] SCALBERT, AUGUSTIN, MANACH, CLAUDINE, MORAND, CHRISTINE, RÉMÉSY, CHRISTIAN. JIMÉNEZ, LILIANA. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2005*;* **45**(4): 287-306.

[43] SCHREINER, MONIKA. HUYSKENS-KEIL, SUSANNE. Phytochemicals in fruit and vegetables: health promotion and postharvest elicitors. Critical Reviews in Plant Sciences. 2006*;* **25**(3): 267-278.

[44] SEPTEMBRE-MALATERRE, AXELLE, STANISLAS, GIOVÉDIE, DOURAGUIA, ELISABETH. GONTHIER, MARIE-PAULE. Evaluation of nutritional and antioxidant properties of the tropical fruits banana, litchi, mango, papaya, passion fruit and pineapple cultivated in Réunion French Island. Food Chemistry. 2016*;* **212**(225-233.

[45] SHAHIDI, FEREIDOON. AMBIGAIPALAN, PRIYATHARINI. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects–A review. Journal of Functional Foods. 2015*;* **18**(820-897.

[46] SHAHIDI, FEREIDOON, JANITHA, PK. WANASUNDARA, PD. Phenolic antioxidants. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 1992*;* **32**(1): 67-103.

[47] SHERWIN, ER. Oxidation and antioxidants in fat and oil processing. Journal of the American Oil Chemists' Society. 1978*;* **55**(11): 809-814.

[48] SHRIKHANDE, ANIL J. Wine by-products with health benefits. Food Research International. 2000; **33**(6): 469-474.
[49] SILVA, S, GOMES, L, LEITAO, F, COELHO, AV. BOAS, L VILAS. Phenolic compounds and antioxidant activity of Olea europaea L. fruits and leaves. Food Science and Technology International. 2006; **12**(5): 385-395.
[50] SONG, WEI, DERITO, CHRISTOPHER M, LIU, M KESHU, HE, XIANGJIU, DONG, MEI. LIU, RUI HAI. Cellular antioxidant activity of common vegetables. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2010; **58**(11): 6621-6629.
[51] SPANOS, GEORGE A, WROLSTAD, RONALD E. HEATHERBELL, DAVID A. Influence of processing and storage on the phenolic composition of apple juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1990; **38**(7): 1572-1579.
[52] TANG, SOON YEW, WHITEMAN, MATTHEW, PENG, ZHAO FENG, JENNER, ANDREW, YONG, EU LEONG. HALLIWELL, BARRY. Characterization of antioxidant and antiglycation properties and isolation of active ingredients from traditional Chinese medicines. Free Radical Biology and Medicine. 2004; **36**(12): 1575-1587.
[53] TOMÁS-BARBERÁN, FRANCISCO A. CLIFFORD, MICHAEL N. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones–nature, occurrence and dietary burden. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2000; **80**(7): 1073-1080.
[54] UYLAŞER, VILDAN. YILDIZ, GÖKÇEN. The historical development and nutritional importance of olive and olive oil constituted an important part of the Mediterranean diet. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2014; **54**(8): 1092-1101.
[55] VELDERRAIN-RODRÍGUEZ, GR, PALAFOX-CARLOS, H, WALL-MEDRANO, A, AYALA-ZAVALA, JF, CHEN, CY O, ROBLES-SÁNCHEZ, M, ASTIAZARAN-GARCÍA, H, ALVAREZ-PARRILLA, E. GONZÁLEZ-AGUILAR, GA. Phenolic compounds: their journey after intake. Food & Function. 2014; **5**(2): 189-197.
[56] VINSON, JOE A, DABBAGH, YOUSEF A, SERRY, MAMDOUH M. JANG, JINHEE. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1995; **43**(11): 2800-2802.
[57] WOJDYŁO, ANETA, OSZMIAŃSKI, JAN. CZEMERYS, RENATA. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chemistry. 2007; **105**(3): 940-949.
[58] ZHANG, CAIYA, SHEN, YUN, CHEN, JIAN, XIAO, PENG. BAO, JINSONG. Nondestructive prediction of total phenolics, flavonoid contents, and antioxidant capacity of rice grain using near-infrared spectroscopy. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2008; **56**(18): 8268-8272.

Editor – Michał Nowicki

Received: 29.09.2020
Accepted: 16.12.2020
Shabbir Hussain
e-mail: dr.shabbirhussain@lgu.edu.pk, shabchem786@gmail.com
mob # +92-3214140130

PHYTOCHEMICAL COMPOSITION OF *MORINGA OLEIFERA* ITS NUTRITIONAL AND PHARMACOLOGICAL IMPORTANCE

Muhammad KAMRAN[1], Shabbir HUSSAIN[1]*, Muhammad Amin ABID[2]*, Shahzada Khurram SYED[3], Muhammad SULEMAN[4], Muhammad RIAZ[5], Muhammad IQBAL[6], Sajid MAHMOOD[7], Iram SABA[5], Rahman QADIR[5]

[1]Department of Chemistry, Lahore Garrison University, Lahore, Pakistan
[2]Department of Chemistry, University of Sahiwal, Sahiwal, Pakistan
[3]Department of Basic Medical Sciences, School of Health Sciences, University of Management and Technology, Lahore, Pakistan
[4]Department of Chemistry, Riphah International University Faisalabad Campus, Pakistan
[5]Department of Chemistry, University of Sargodha, Sargodha, Pakistan
[6]Department of Chemistry, Govt College University Faisalabad, Faisalabad, Pakistan
[7]Department of Chemistry, University of Education, Vehari Campus Vehari, Pakistan

Summary: Moringa oleifera is regarded as a multipurpose plant. It is an excellent source of nutrients, natural energy booster and a nature's medicine cabinet. This plant contains numerous important compounds e.g., glucose, rhamnose, glucosinolates, isothiocyanates, methionine, cysteine, tryptophan, phenylalanine, lysine, histidine, isoleucine, leucine, valine, alanine, threonine, glycine, glutamic acid and aspartic acid. It is used a food in many countries because it is rich in important nutrients including vitamins (A, B and K), minerals (K, Ca, Zn, Fe, P). It is leaves are comparable to milk and eggs in protein contents. The plant is an affordable source of vital nutrients and can be used to treat malnutrition. *M. oleifera* shows antimicrobial, hepatoprotective, cholesterol lowering, antidiabetic, antispasmodic, antiulcer, antitumor, antihypertensive, anti-inflammatory, antioxidant, antipyretic and diuretic potential. The plant is highly beneficial to treat depression, malnutrition, general weakness, osteoporosis, pregnancy, diabetes, lactation, semen deficiency, scurvy, psoriasis, hysteria, abnormal blood pressure, fever, eye and ear infections, cough, conjunctivitis, glandular issues, blood impurities, catarrh, bronchitis, anxiety, blackheads, skin infections, anemia, hysteria, pimples, shortness of breath, scouring, dementia, sore throat, sprains and tuberculosis. The plant is also used to cure neurological disorders, musculoskeletal disorders, cancer, cholera, chest congestions, asthma, headache, swellings, cough, diarrhea, blood pressure abnormality, pains in joints,

pimps, respiratory disorder, pimple, seizures, intestinal worms, breastfeeding, diabetes and hypertension. *M. oleifera* an an excellent source of antioxidants especially the leaves are a wealthy supply of antioxidant compounds.

Keywords: Moringa oleifera, phytochemicals, nutrients; malnutrition, diseases, multipurpose

INTRODUCTION

Plants serve as sources of food and form the basis of obtaining numerous unlimited medicinal and nutritional products. The plants like rice, cereals, wheat or corn are the main sources of human food and they fulfill nearly 60% food requirements of the world [24]. *Moringa oleifera* is a nutritious vegetable tree, which finds a broad range of uses and has its origin from the Northern part of the India. This plant is commonly familiar as *Moringa*, Drumstick and Horseradish (in English), as *Moringa oleifera* (in Latin), Sahjan (in Hindi), Surajana (in Punjabi), Swejan or Sajiwan (in Nepali), Sojne danta (Bengali) and Surajana (in Sanskrit). *Moringa* is not only important for human and animals but it also finds numerous industrial applications. The leaves contain high protein content (27%). In the 1980s, *Moringa oleifera* was grown as a herb for treating HIV in Uganda. In Pakistan, India, Afghanistan and Bangladesh it used in folk medicine. *Drumstick* is referred as a "miracle tree" or "wonder tree" [23]. It is a well-known multi-purpose tree having nutritious pod and poisonous free flowers and leaves. It finds applications as a good source of food, animal feed, cosmetic oils, medicines and water coagulants [49]. The oil (yield = 30-40% w/w) of *Moringa* seed is commercially called "Ben" or "Behen" oil due to the presence of high content of behenic acid. This oil meets with most of the required conditions of biodiesel standards of Europe, United States of America and Germany. So MO has been recognized an industrial crop for sustainable biodiesel production in many countries [57]. The roots, leaves, seeds, stem-bark, root-bark and pods have therapeutic properties. The close flowers are used as a vegetable in food and making tea which gives sufficient quantity of the potassium in addition to calcium [25]. *Drumstick is* erratically label as a "Miracle Tree", which means God's Gift to Man, "Tree of Life", Savior of poor, Mother's Best Friend. In several areas of Africa, it is usually used for the self-medication by the patient which are affected by hypertension, diabetes and HIV/AIDS [34].

Plants have been widely studied owing to their nutritional and medicinal value [42, 43, 44, 45]. There are recently greater investigations on *M. oleifera* since its every part possesses beneficial properties [36]. Current studies carried out to review the phytochemical composition, nutritional value and pharmacological importance of *Moringa oleifera*.

PHYTOCHEMICAL COMPOSITION

Drumstick tree is rich in the compounds especially common sugar, rhamnose, glucosinolate, isocytosinate *etc*. Its stem bark is comprised of two alkaloids namely moringinine and moringine [3]. The leaves are comprised of zinc (Zn), sodium (Na), iron (Fe), calcium (Ca), potassium (K), copper (Cu), manganese (Mn) and magnesium (Mg) [48]. Phytochemicals analysis of the leaves have shown the existence of tannins, anthocyanin, cardiac glycoside, carotenoid, terpenoids, saponins, steroids, alkaloids, flavonoid and anthraquinone in ethanolic as well as aqueous extracts. However, the ethanolic extract is comprised of lower amounts of phytochemicals than the aqueous extract as shown by quantitative analysis. The aqueous extract was found to contain higher amounts of alkaloids (3.07 ± 0.00), anthraquinone (11.68 ± 0.04), carotenoids (1.16 ± 0.05), steroids (3.21 ± 0.00), cardiac glycoside (0.36 ± 0.03), terpenoids (4.84 ± 0.05) and tannins (9.36 ± 0.04) while the ethanolic extracts possessed excessive saponins (1.46 ± 0.03) in addition to flavonoid (3.56 ± 0.03) all in g/100g [47]. *The stem and leaves tissues of M. oleifera* were found to contain a total of 32 metabolites out of which 22 metabolites were present in both the stem and leave tissues. The glutamine, tryptophan and glutamate were present only in stem tissues while *p*-cresol, tyrosine, guanosine, adenosine and 4-aminobutyrate were found only in leaf tissues [31]. The purified whole-gum exudate of M. *oleifera* shows the presence of D-glucose (9.37), D-xylose (2.93), L-rhamnose (6.15), L-arabinose (43.50), D-mannose (3.0) and D-galactose (34.00%) whereas the degraded gum was found to contain L-glucose (23.2), L-mannose (6-O) and L-galactose (70.4%) [5].

Moringa leaves demonstrate an energy value of 1440 Kcal/100g and contain an appreciable amount of crbohydrates (63.11%), crude proteins (17.01%), ash (7.93%), fatty acid (1.69%), crude fat (2.11%) and crude fibre (7.09%). The leaves also contain essential minerals including copper (6.10ppm), manganese (81.65ppm), phosphorous (30.15ppm), zinc (60.06 ppm), iron (107.48 ppm), sodium (192.95 ppm), potassium (0.97%), magnesium (0.38%) and calcium (1.91%) [48].

The ethanolic extracts of leaves, seeds and flowers, of *M. oleifera* were investigated. The flowers have shown the presence of Dodecanal, Decanoic acid, Sipo, Ocenol, Satol, Oleol, *cis*-9–Octadecen-1–ol and 9-Octadecen-1-ol. Seeds contain majorly the 9-Octadecenoic acid, Veridiflorol and Roridin E. The leaves were comprised of 15 components especially Safflower oil, Hi-oleic safflower oil, 2,6-Dimethyl-1,7-octadiene-3-ol, 4-Hexadecen-6-yne, 2-hexanone, 3-cyclohexyliden-4-ethyl-E2-dodecenylacetate, hexadecanoic acid, palmitic acid ethyl ester and ethyl palmitate [46]. In another studies, the leaves have also been reported to contain alanine, aspartic acids, valine, glycine glutamic acids, threonines, leucines, methionines, cysteines, tryptophans, phenylalanines, lysines, histidine, isoleucines while the flowers have shown the presence of Kaempferol-3-rutinoside 34 while

β-sitosterone, β-sitosterol, octacosonoic acid, vanillin and 4-hydroxy mellein were investigated in the steam [55]. There are also reports that seeds have several amino acids, 4-(α-L-rhamnosyloxy)benzyl isothiocyanate and moringyne [20]. Benzyl isothiocyanate was reported in the *Moringa* roots. The antimicrobil activity of plant against bacteria (both gram positive and gram negative) is owed to the presence of pterygospermin and spirochin components of the plant. **Figure 1** displays the structures of some phytoconstituents isolated from *M. oleiferea* [36].

The acid hydrolysis of the *Moringa* gum gives aldotriouronic acid and is characterized as O-(β-D-glucopyranosyluronic acid) (1→6)-β-D-galactopyranosyl,(1→6)-D-galactose [55].

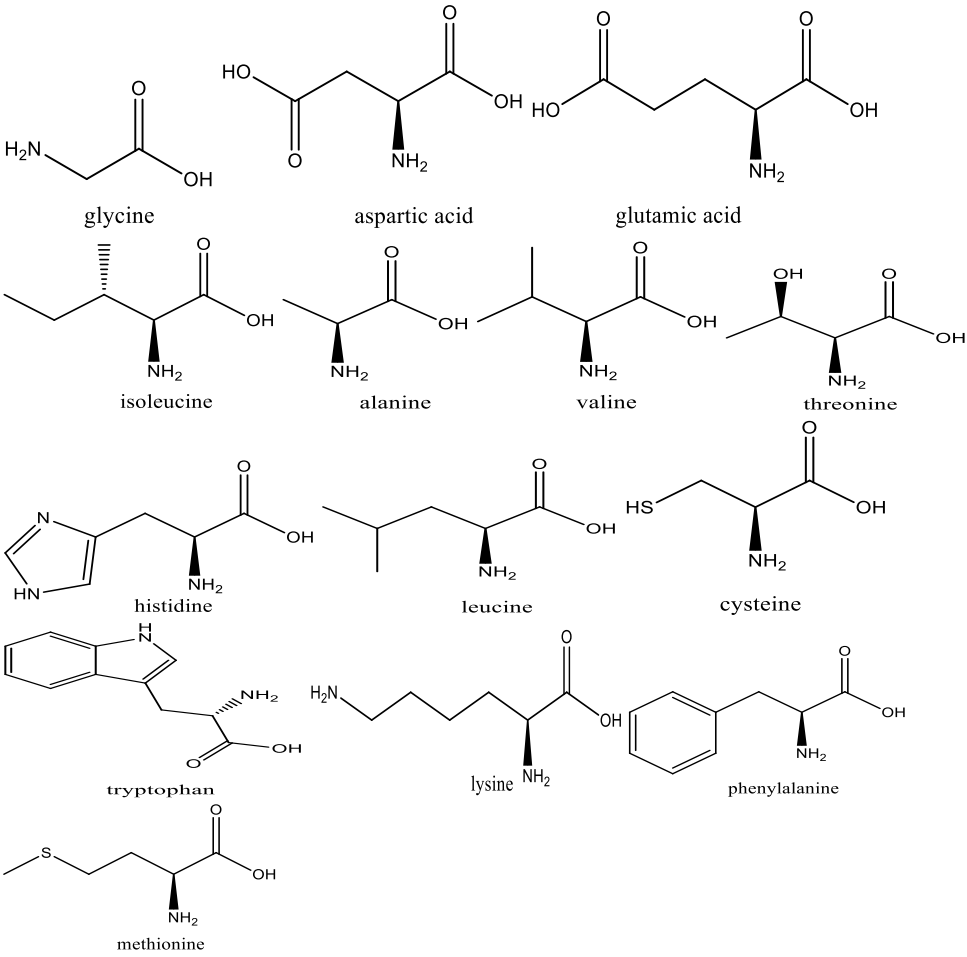


FIGURE 1. Structures of some phytoconstituents isolated from *M. oleiferea* [36]

NUTRITIONAL IMPORTANCE

M. oleifera is familiar as a natural energy booster and an excellent source of nutrition [22]. It is rich in nutritional ingredients like calcium, phosphorus, iron, vitamins (A,B and C), potassium, carotene and acts as an excellent source of natural antioxidants such as flavonoids, ascorbic acids, phenolics as well as carotenoids [2, 53]. *Moringa* leaves contain more quantity of the calcium, iron, vitamin A, potassium and vitamin C as compared to that of milk, spinach, carrots, bananas and oranges, respectively. The protein content in leaves is comparable to that present in milk and eggs [12]. Vitamin A provides defense against eye and skin diseases, ailments of heart, ailments of gastro-intestine and extra problems related to health; vitamin C enhances immunity against flu and cold; calcium gives strength to bone and teeth and prevents from osteoporosis; vitamin K is necessary for the proper functioning of proteins and brain [30; 41]. *M. oleifera* contains the highest amounts of vitamin C, vitamin E, iron and β-carotene when compared with other 3 species (*stenopetala, peregrine and drouhardii*) of *Moringa* while its protein content was second highest (highest was that of *stenopetala*) among the said species [15]. Each part of *Moringa oleifera* is safe to eat [25] as a food especially its tuberous roots, which show higher resistance to the arid and drought conditions. The immature flowers, pods or leaves of *Moringa* tree are useful for the cooking purposes in various parts of the world [32]. The plant is an affordable source of vital nutrients as well as nutraceuticals and can be used to eliminate malnutrition and hunger [57].

Asian people use flower, pods and young leaves of *M. oleifera* as a vegetable in their diet. Each part of this plant is re-newable source of phenolic compounds, γ-tocopherols, protein, vitamin C, β-carotene, sulfur containing amino acids, cysteine and methionine [14]. The fruit, immature pods, flowers and leaves of *M. Oleifera* serve as an excellent nutrititional vegetable in many countries including Pakistan, Africa, Hawaii, India and Philippines [40]. Vitamins "A" is present in fresh leaves of this plant and plays important role in the numerous physiological actions such as the, visions, reproduction, growth of embryo, developments, competences of immune system, cell explosion, cell differentiations and apoptosis [28]. The leaves of *M. Oleifera* are edible and excellent sources of nutrition for the all aged people. They are used to make salads and soups and also cooked and eaten like spinach. They contain essential, disease preventing nutrients and are rich source of vitamins (A, B, C), minerals (especially iron) and sulphur-containing amino acids cystine and methionine. The leaves consist of a well-balanced quantity of the amino acids (building blocks of proteins) which is unusual for a plant source [37].

The leaves serve as an excellent boon to people who are unable to obtain protein from meat or other sources. The presence of histidine and argentine components makes *M. Oleifera* a fantastic source of proteins for infants who could not make enough proteins according to the requirement of their growth [33].

The dried leaves of *M. Oleifera* contain even higher percentage of micro--nutrients including vitamin A (10 ten times than carrots), calcium (17 times than milk), potassium (15 times as than bananas), iron (25 times than spinach) and proteins (9 times than yogurt) [29, 33]. It is better to dry the leaves in shade (which retains 50-70% vitamin A) as compared to direct sunlight which retains 20-40% vitamin A). Moreover, the proteins of leaves may be broken down under the influence of high temperature [54]. The clean dried powder of *Moringa* leaves can reabsorb humidity during or after grinding so it should be placed at 50 °C for 30 minutes in order to lower its moisture content. The powder can be stored upto 6 months below 24°C in air-tight containers in the absence of light and humidity. Moringa is effective to combat malnutrition, particularly in nursing women and infants. For children aged 1-3, one rounded tablespoon (8 g of powder) is sufficient to satisfy nearly all the vitamin A needs, 23% of the iron, 40% of the calcium and 14% of the protein. A woman's daily calcium and iron requirements during breast-feeding or pregnancy are can be fulfilled by 6 rounded spoonful of leaf powder. Moringa was recommended as a natural nutrition for the tropics especially by 3 NGOs (non-governmental organizations) namely Educational Concerns for Hunger Organization, Church World Service and Trees for Life. This plant is full of leaves even at the end of a dry season when there is scarcity of other foods. The leaves of *M. Oleifera* can be eaten fresh or cooked. Moreover, they can be stored as dried powder without refrigeration for many months while their nutritional value is not lost. They also find applications in food fortification [16, 37]. The spoonful addition of the powder into the vegetables, soups and baby food can add the nutritional value without changing the taste. The powder also finds usage in place of fresh leaves to produce lead sauces, or its few spoonful can be added to other sauces just before serving. The taste of the sauce is not significantly changed by adding a small amount of this powder. Hence, there is always availability of Moringa leaves for good nutritional intake on regular basis [16]. The plant has very low demand of water and soil nutrients for its growth so it can easily be grown. The leaves have great commercial potential as they can be incorporated in common food diet to alleviate the deficiency of micronutrients and to prevent from chronic degenerative disorders. Thus the leaves may not only be an excellent source of income generation, employment and exports but they may also be used to treat malnutrition in poor countries, as good alternatives to imported food supplies [37]. There were investigations that the leaves of *M. oleifera* (from Lafia, Nigeria) can act as good good supplements for better health and growth performance of poultry [48].

Oxalate and oligosaccharides were investigated as the anti-nutrient factors in the leaves of *Moringa*. Raffinose and stachyose were not present in mature leaves, but present in seeds (22−98 mg/g dry weight) and in the young leaves (0− 14 mg/g dry weight) [65]. In the developing nations, drumstick plant used as a food, alter-

native to the imported foods supplements for treatment of malnutrition, especially between nursing mothers as well as infants by the virtue of the chemical constituents [1]. The excessive used part in this tree is leaves mainly that were use for the human's diet and animal's diet and use in the conventional medicine, which used for treatment of animals. Leaves have high content of proteins, iron, calcium, potassium, β-carotene, vitamins (relatively C and E), and in bioactive addition to antioxidant compound for example glucosinolates, phenolic acids, flavonoid and isothiocyanates, saponins and tannins. The special features of this plant make it suitable for fighting against the malnutrition and it is used as medicinal plant in the developing countries and underdeveloped countries [27]. **Table 1** displays the nutrient contents of mature *Moringa* leaves.

TABLE 1. Nutrient contents of mature *Moringa* leaves (100 g fresh weight) [65]

Species	DM-Protein		Ascorbate	Iron	Carotene	Calcium	Tocopherols
	(g)		(mg)				
Stenopetala	24	5.8	400	5.4	13	711	18
Oleifera	24	5.7	249	9.2	15	638	25
Peregrine	21	2.9	264	5.6	5	458	28
Drouhardii	29	5.0	388	8.7	11	745	14

PHARMACOLOGICAL VALUE

M. oleifera is a nature's medicine cabinet [22]. Its roots, leaves, bark, flowers, fruit of immature pods and seeds possess a number of therapeutic properties such as antimicrobial, hepatoprotective, cholesterol lowering, antidiabetic, antispasmodic, antiulcer, antitumor, antihypertensive, anti-inflammatory, antioxidant, antipyretic and diuretic potential. Moringa is highly beneficial in osteoporosis, general weakness, malnutrition and depression [2]. *Moringa* was widely used in traditional medicines for the treatment of hysteria, pimples, shortness of breath, scouring, dementia, sore throat, sprains, tuberculosis [13], pregnancy, diabetes, lactation, semen deficiency, scurvy, psoriasis, hysteria, abnormal blood pressure, fever, eye and ear infections, cough, conjunctivitis, glandular issues, blood impurities, catarrh, bronchitis, anxiety, blackheads, skin infections and for anemia. There are reports of uses of *Moringa* in ancient cultures due to its healing properties. Oil of *Moringa* finds an important value in cosmetics and use as a moisturizer (for hairs and body) and skin conditioner. It has been used in skin preparations and various ointments since Egyptian times [16, 38, 58].

M. oleifera is also used to cure neurological disorders, musculoskeletal disorders, cancer, cholera, chest congestions, asthma, headache, swellings, cough, diarrhea, blood pressure abnormality, pains in joints, pimps, respiratory disorder, pimple, seizures, intestinal worms, breastfeeding, diabetes and hypertension [60]. Plant can synthesize flavonoids as a response to the microbial infection. Eating the flavonoids has shown protection against various chronic diseases related to-oxidative stress, cancer and cardiovascular diseases. Leaf of this plant is a best source of the flavonoids [62].

The medicinal value of *Moringa* owes to its antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, antispasmodic and antitumor activities, which are described below:

ANTIMICROBIAL ACTIVITY

In vitro antimicrobial potential of leaves, seeds, bark and roots of *M. oleifera* was tested against the bacteria, dermatophytes, yeast and helminths by disc-diffusion method. Aqueous extracts of fresh leaf juice and seeds lowered the growth of the *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. However, no action were demonstrated against *Candida albicans* [7]. Antibacterial potential of plant extracts against *Vibrio cholera*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* is also reported [63]. The existence of the 4-α-L-rhamnosyloxy benzyl isothiocyanates in root extract renders antimicrobial potential to the plant [11]. *M. Oleifera* is also comprised of antibacterial principles e.g., pterygospermin and spirochin which are active against gram negative as well as gram positive bacteria [9, 36]. Its roots and flowers are rich in pterygospermin (an antibiotic substance). The flowers demonstrate both antibacterial and antifungal activities [8]. Seeds of this plant express antibacterial potential due to the presence of benzyl isothiocyanate, moringine and pterygospermin [21]. The bark extract of *Moringa* shows significant antifungal activity [4]; the stem bark juice is active against bacteria e.g., *Staphylococcus aureus* [35]. The juice of M. *oleifera* fresh leaves is found to stop the development of microorganisms (*Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*) which are pathogenic to man [7].

ANTIOXIDANT ACTIVITY

Aqueous ethanolic (70 %) and methanolic (80 %) extracts of frozen dried leaves display the radical scavenging as well as antioxidant activities. Drumstick leaves are considered as a potential source of the natural antioxidants [22]. Antioxidants are of greater significance for the prevention of stress that may cau-

se number of degenerative diseases. Relatively M.*oleifera* has complex profile of flavonoids including malonylglucosides, rutinosides, glucosides, kaempferol and traces of acetylglucosides of isorhamnetin and quercetin which are good antioxidants [59]. Leaf and seed extracts demonstrate bio pesticide activity. Leaves of this plant are a wealthy supply of antioxidant compounds [28]. Due to the existence of numerous sorts of the antioxidants such as carotenoids, flavonoid, phenolics, ascorbic acid, drumstick is able to extend the protection period in foods containing fats [39]. Regulation of thyroid hormone is possible with aqueous leaf extracts, which involve the treatment of hyperthyroidism and demonstrate antioxidant effects [50, 51].

ANTISPASMODIC AND ANTITUMOR ACTIVITY

Pharmacologically studies of *Moringa* leaves initiated that extract of ethanol and its constituent shows antispasmodic activity probably through calcium channel blockages [10]. *Moringa* leaf juice shows stabilizing effects on the blood pressures. The nitriles, thiocarbamates and glycosides of this plant are responsible for lowering effect of the blood pressure. Its roots possess antispasmodic activity and leaves of *Moringa* are the potential source of the anti-tumor activity [26]. *Moringa* is an effective anticancer plant due to the presence of a number of bioactive compounds. The presence of bioactive compounds especially niazimicin and thiocarbamates in leaves renders powerful anticancer activity to M. *oleifera* [19]. The different constituents of this plant show spasmolytic activity which supports the conventional use of this plant in gastrointestinal motility disorders [18].

OTHER ACTIVITIES

Leaves of M. *oleifera* possess centrally opioid and peripherally non-opioid anti-inflammatory and anti-nociceptive constituents. These studies also confirm the traditional uses of drumstick for treatment of diseases related to inflammation and pain. Strong analgesic activity was shown by alcoholic extracts of M.*oleifera* which are equivalent to dose of aspirin (25 mg per kg of the body mass) [6]. Drumstick leaves extracts or aqueous leaf extract showed anti ulcerogenic and anti-ulcer activity respectively demonstrate that antiulcer components dispersed extensively throughout the plant. Roots also possess hepatoprotective activity [64]. Drumstick root extracts reduce carrageenan induced paw oedema to a comparable degree. There were reports regarding the isolation of 1,3 dibenzyl urea and aurantiamide acetate from the roots of *M. Oleifera*. 1,3 dibenzyl urea showed conside-

rable inhibition of IL-2 and significant analgesic activity while aurantiamide acetate exhibited significant inhibition of IL-2 and TNF-α. The results demonstrate the analgesic and anti-inflammatory/anti-arthritic potential of *M. Oleifera* roots. The ethyl acetate and aqueous leaves extract of dried leaf of drumstick possess significant wound healing potential [52]. The presence of blood pressures lowering constituents and decrease of lipid level has made this plant highly valuable for the treatment of circulatory system disorders. The crude extract of drumstick leaves have important cholesterol-lowering action in the serum of more fat diet [61]. Indian use leaves of this plant for herbal drugs as a hypocholesterolemic agent in the overweight patients [17].

The alcoholic and aqueous extracts of flowers or roots of M. oleifera were subjected to antihepatotoxic activity evaluations in paracetamol treated albino rats. Liver function was assessed based on bilirubin, alkaline phosphatase (SALP), serum levels of transaminase (SGPT, SGOT) and body weight ratio. All the extracts were found to exhibit antihepatotoxic potential [56].

CONCLUSIONS

Moringa oleifera from monogeneric group (*Moringa*ceae) of species is the most extensively cultivated plant. Component of the tree contains numerous important mineral, addition to it *moringa* is superior source of the vitamins, β-carotene, protein, phenolics along with various amino acids. M.*oleifera* is very helpful to overcome the malnutrition, mainly in nursing mothers as well as infants due to the existence of high amount of essential nutritional composition. *Moringa* leaf contains extra vitamin A vitamin C and calcium than that of carrots, oranges and milk, excess iron, and potassium than that of spinach and banana and proteins quantity of *Moringa* leaves is superior to eggs and milks.

REFERENCES

[1] AMABYE, TEKLIT GEBREGIORGIS. GEBREHIWOT, KINDEYA. Chemical compositions and nutritional value of Moringa oleifera available in the market of Mekelle. Journal of Food and Nutrition Sciences. 2016; **3**(5): 187-190.

[2] AMJAD, MUHAMMAD SHOAIB, QURESHI, HUMA, ARSHAD, MUHAMMAD, CHAUDHARI, SUNBAL KHALIL. MASOOD, MARIA. The incredible queen of green: Nutritive value and therapeutic potential of Moringa oleifera Lam. J Coast Life Med. 2015; **3**(9): 744-751.

[3] ANWAR, FAROOQ, LATIF, SAJID, ASHRAF, MUHAMMAD. GILANI, ANWARUL HASSAN. Moringa oleifera: a food plant with multiple medicinal uses. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives. 2007; **21**(1): 17-25.

[4] BHATNAGAR, SS, SANTAPAU, H, DESA, JDH, MANIAR, AC, GHADIALLY, NC, SOLOMON, MJ, YELLORE, S. RAO, TNS. Biological Activity of Indian Medicinal Plants. Part I. Antibacterial, Anti-tubercular and Antifungal Action. Indian Journal of Medical Research. 1961; **49**(5): 799-813.

[5] BHATTACHARYA, SUBHAS B, DAS, ASIT K. BANERJI, NILIMA. Chemical investigations on the gum exudate from sajna (Moringa oleifera). Carbohydrate research. 1982; **102**(1): 253-262.

[6] BISWAS, SUBRATA KUMAR, CHOWDHURY, ANUSUA, DAS, JOYSREE, ROY, AJOY. HOSEN, SM ZAHID. Pharmacological potentials of Moringa oleifera Lam.: a review. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2012; **3**(2): 305.

[7] CACERES, ARMANDO, CABRERA, OFYLUZ, MORALES, OFELIA, MOLLINEDO, PATRICIA. MENDIA, PATRICIA. Pharmacological properties of Moringa oleifera. 1: Preliminary screening for antimicrobial activity. Journal of Ethnopharmacology. 1991; **33**(3): 213-216.

[8] DAS, BR, KURUP, PA. NARASIMHA, PL RAO. Antibiotic principle from Moringa pterygosperma. VII. Antibacterial activity and chemical structure of compounds related to pterygospermin. The Indian journal of medical research. 1957; **45**(2): 191-196.

[9] DELHI, NEW. Council of Scientific and Industrial Research; 2005. Anonymous. The Wealth of India: Raw Materials (Ph-Re)[Google Scholar].

[10] DUBEY, DURGESH KUMAR, DORA, JYOTSNA, KUMAR, ANIL. GULSAN, RATAN KUMAR. A multipurpose tree—Moringa oleifera. International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences. 2013; **2**(1): 415-423.

[11] EILERT, U, WOLTERS, B. NAHRSTEDT, A. The antibiotic principle of seeds of Moringa oleifera and Moringa stenopetala. Planta medica. 1981; **42**(05): 55-61.

[12] FAHEY, JED W. Moringa oleifera: A review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. Trees for life Journal. 2005; **1**(5): 21205-22185.

[13] FATIMA, TABASSAM, SAJID, MUHAMMAD SOHAIL, JAWAD-UL-HASSAN, MUHAMMAD, SIDDIQUE, RAO MUHAMMAD. IQBAL, ZAFAR. Phytomedicinal value of Moringa oleifera with special reference to antiparasitics. Pakistan Journal of Agricultural Sciences. 2014; **51**(1).

[14] FERREIRA, PAULO MICHEL PINHEIRO, FARIAS, DAVI FELIPE, OLIVEIRA, JOSÉ TADEU DE ABREU. CARVALHO, ANA DE FÁTIMA URANO. Moringa oleifera: bioactive compounds and nutritional potential. Revista de Nutrição. 2008; **21**(4): 431-437.

[15] FREIBERGER, CE, VANDERJAGT, DJ, PASTUSZYN, A, GLEW, RS, MOUNKAILA, G, MILLSON, M. GLEW, RH. Nutrient content of the edible leaves of seven wild plants from Niger. Plant Foods for Human Nutrition. 1998; **53**(1): 57-69.

[16] FUGLIE, LOWELL J. The miracle tree: Moringa oleifera, natural nutrition for the tropics. 1999.

[17] GHASI, S, NWOBODO, E. OFILI, JO. Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of Moringa oleifera Lam in high-fat diet fed Wistar rats. Journal of Ethnopharmacology. 2000; **69**(1): 21-25.

[18] GILANI, ANWAR H, AFTAB, KHALID, SURIA, AMIN, SIDDIQUI, SALIMUZZAMAN, SALEM, RUBEENA, SIDDIQUI, BINA S. FAIZI, SHAHEEN. Pharmacological studies on hypotensive and spasmolytic activities of pure compounds from Moringa oleifera. Phytotherapy Research. 1994; **8**(2): 87-91.

[19] GUEVARA, AMELIA P, VARGAS, CAROLYN, SAKURAI, HIROMU, FUJIWARA, YASUHIRO, HASHIMOTO, KEIJI, MAOKA, TAKASHI, KOZUKA, MUTZUO, ITO, YOSHOHIRO, TOKUDA, HARUKUNI. NISHINO, HOYOKU. An antitumor promoter from Moringa oleifera Lam. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 1999; **440**(2): 181-188.

[20] GUPTA, ANIL KUMAR. Quality standards of Indian medicinal plants. Indian Council of Medical Research. 2003; **1**(

[21] JAHN, SA, MUSNAD, HASSAN A. BURGSTALLER, HEINZ. The tree that purifies water: cultivating multipurpose Moringaceae in the Sudan. Unasylva. 1986; **38**(152): 23-28.

[22] JS, ANEY, TAMBE, RASHMI, KULKARNI, MAUSHUMI. BHISE, KIRAN. Pharmacological And Pharmaceutical Potential Of Moringa oleifera: A Review. Journal of Pharmacy Research. 2009; **2**(9): 1424-1426.

[23] KASOLO, JOSEPHINE N, BIMENYA, GABRIEL S, OJOK, LONZY, OCHIENG, JOSEPH. OGWAL-OKENG, JASPER W. Phytochemicals and uses of Moringa oleifera leaves in Ugandan rural communities. Journal of Medicinal Plants Research. 2010; **4**(9).

[24] KAWO, A, ABDULLAHI, B, HALILU, A, GAIYA, Z, DABAI, M. DAKARE, M. Preliminary phytochemical screening, proximate and elemental composition of Moringa oleifera lam seed powder. Bayero Journal of Pure and Applied Sciences. 2009; **2**(1): 96-100.

[25] KOUL, BHUPENDRA. CHASE, NEIKOUZO. Moringa oleifera Lam.: Panacea to several maladies. J. Chem. Pharmaceut. Res. 2015; **7**(687-707.

[26] KUMAR, P SUDHIR, MISHRA, DEBASIS, GHOSH, GOUTAM. PANDA, CHANDRA S. Medicinal uses and pharmacological properties of Moringa oleifera. International Journal of Phytomedicine. 2010; **2**(3).

[27] LEONE, ALESSANDRO, FIORILLO, GIOVANNI, CRISCUOLI, FRANCA, RAVASENGHI, STEFANO, SANTAGOSTINI, LAURA, FICO, GELSOMINA, SPADAFRANCA, ANGELA, BATTEZZATI, ALBERTO, SCHIRALDI, ALBERTO. POZZI, FEDERICA. Nutritional characterization and phenolic profiling of Moringa oleifera leaves grown in Chad, Sahrawi Refugee Camps, and Haiti. International journal of molecular sciences. 2015; **16**(8): 18923-18937.

[28] LEONE, ALESSANDRO, SPADA, ALBERTO, BATTEZZATI, ALBERTO, SCHIRALDI, ALBERTO, ARISTIL, JUNIOR. BERTOLI, SIMONA. Cultivation, genetic, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of Moringa oleifera leaves: an overview. International journal of molecular sciences. 2015; **16**(6): 12791-12835.

[29] MAHATAB, SN, ALI, A. ASADUZZAMAN, AHM. Nutritional potential of sajna leaves in goats. Livestock Advisor. 1987; **12**(12): 9-12.

[30] MAHMOOD, KHAWAJA TAHIR, MUGAL, TAHIRA. HAQ, IKRAM UL. Moringa oleifera: a natural gift-A review. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2010; **2**(11): 775-781.

[31] MAHMUD, IQBAL, CHOWDHURY, KAMAL. BOROUJERDI, AREZUE. Tissue-specific metabolic profile study of Moringa oleifera L. using nuclear magnetic resonance spectroscopy. Plant tissue culture & biotechnology/Bangladesh Association for Plant Tissue Culture & Biotechnology; BAPTC&B. 2014; **24**(1): 77-86.

[32] MAIZUWO, ADAMU IDRIS, HASSAN, AMINU SHARIF, MOMOH, HASSANAH. MUHAMMAD, JABIR ABDULLAHI. Phytochemical constituents, biological activities, therapeutic potentials and nutritional values of Moringa oleifera (Zogale): a review. Journal of drug design and medicinal chemistry. 2017; **3**(4): 60.

[33] MANZOOR, MALEEHA, ANWAR, FAROOQ, IQBAL, TAHIRA. BHANGER, MI. Physico-chemical characterization of Moringa concanensis seeds and seed oil. Journal of the American Oil Chemists' Society. 2007; **84**(5): 413-419.

[34] MBIKAY, MAJAMBU. Therapeutic potential of Moringa oleifera leaves in chronic hyperglycemia and dyslipidemia: a review. Frontiers in pharmacology. 2012; **3**(24.

[35] MEHTA, KOMAL, BALARAMAN, R, AMIN, AH, BAFNA, PA. GULATI, OD. Effect of fruits of Moringa oleifera on the lipid profile of normal and hypercholesterolaemic rabbits. Journal of ethnopharmacology. 2003; **86**(2-3): 191-195.

[36] [MISHRA, GARIMA, SINGH, PRADEEP, VERMA, RAMESH, KUMAR, SUNIL, SRIVASTAV, SAURABH, JHA, KK. KHOSA, RL. Traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties of Moringa oleifera plant: An overview. Der Pharmacia Lettre. 2011; **3**(2): 141-164.

[37] MISHRA, SATYA PRAKASH, SINGH, PANKAJ. SINGH, SANJAY. Processing of Moringa oleifera leaves for human consumption. Bulletin of Environment, Pharmacology and life sciences. 2012; **2**(1): 28-31.

[38] MONICA, GM. Miracle tree. KOS, Health Publications. 2005: 16-18.

[39] MOUMINAH, HANEEN HAMED SALEH. Effect of dried Moringa oleifera leaves on the nutritional and organoleptic characteristics of cookies. Alexandria science exchange journal. 2015; **36**(4): 297-302.

[40] MUGHAL, M HASEEB, ALI, GAYOOR, SRIVASTAVA, PS. IQBAL, MUHAMMAD. Improvement of drumstick (Moringa pterygosperma Gaertn.)–a unique source of food and medicine through tissue culture. Hamdard Medicus. 1999; **42**(1): 37-42.

[41] MUKUNZI, DANIEL, NSOR-ATINDANA, JOHN, XIAOMING, ZHANG, GAHUNGU, ARTHUR, KARANGWA, ERIC, MUKAMUREZI, GODELIEVE, AL-DOMI, HAYDER, PRINCEWILL-OGBONNA, IJEOMA L, OGBONNA, PRINCEWILL C. ARIEF, NOVIRMAN JAMARUN. Comparison of volatile profile of Moringa oleifera leaves from Rwanda and China using HS-SPME. Pakistan Journal of Nutrition. 2011; **10**(7): 602-608.

[42] NASEER, S, AFZAL, MS, NISA, A, HUSSAIN, S, AHMAD, MA, PARVEEN, S, ANJUM, F. RIAZ, M. Extraction of brown dye from Eucalyptus bark and its applications in food storage. Quality Assurance and Safety of Crops & Foods. 2019; **11**(8): 769-780.

[43] NASEER, SUMRA, HUSSAIN, SHABBIR. ABID, AMIN. Betalain as a Food Colorant: its Sources, Chemistry and Health Benefits. Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences: B. Life and Environmental Sciences. 2019; **56**(2): 31–37.

[44] NASEER, SUMRA, HUSSAIN, SHABBIR, NAEEM, NAUREEN, PERVAIZ, MUHAMMAD. RAHMAN, MADIHA. The phytochemistry and medicinal value of Psidium guajava (guava). Clinical Phytoscience. 2018; **4**(1): 1-8.

[45] NASEER, SUMRA, HUSSAIN, SHABBIR. ZAHID, ZARK. Nutritional and Antioxidant Potential of Common Vegetables in Pakistan. RADS Journal of Biological Research & Applied Sciences. 2019; **10**(1): 36-40.

[46] NEPOLEAN, P, ANITHA, J. EMILIN, RR. Isolation, analysis and identification of phytochemicals of antimicrobial activity of Moringa oleifera Lam. Current biotica. 2009; **3**(1): 33-37.

[47] NWEZE, NKECHINYERE O. NWAFOR, FELIX I. Phytochemical, proximate and mineral composition of leaf extracts of Moringa oleifera Lam. from Nsukka, South-Eastern Nigeria. 2014.

[48] OGBE, AO. AFFIKU, JOHN P. Proximate study, mineral and anti-nutrient composition of Moringa oleifera leaves harvested from Lafia, Nigeria: potential benefits in poultry nutrition and health. The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 2011; **1**(3): 296.

[49] PADAYACHEE, BERUSHKA. BAIJNATH, HIMANSU. An overview of the medicinal importance of Moringaceae. Journal of Medicinal Plants Research. 2012; **6**(48): 5831-5839.

[50] PAL, SAROJ K, MUKHERJEE, PULOK K. SAHA, BP. Studies on the antiulcer activity of Moringa oleifera leaf extract on gastric ulcer models in rats. Phytotherapy Research. 1995; **9**(6): 463-465.

[51] PAL, SAROJ K, MUKHERJEE, PULOK K, SAHA, KAKALI, PAL, M. SAHA, BP. Antimicrobial action of the leaf extract of Moringa oleifera Lam. Ancient Science of Life. 1995; **14**(3): 197.

[52] PANDEY, A, PANDEY, RD, TRIPATHI, P, GUPTA, PP, HAIDER, J, BHATT, S. SINGH, AV. Moringa Oleifera Lam. Sahijan)-A Plant with a Plethora of Diverse Therapeutic Benefits: An Updated Retrospection. Medicinal and Aromatic Plants. 2012; **1**(1): 1-8.

[53] PATEL, S, THAKUR, AS, CHANDY, A. MANIGAUHA, A. Moringa oleifera: a review of there medicinal and economical importance to the health and nation. Drug invention today. 2010; **2**(7).

[54] PRICE, MARTIN L. The moringa tree. ECHO technical note. 2007; **17391**(1-19.

[55] RASTOGI, RAM P. MEHROTRA, BN. (1990). *Compendium of Indian medicinal plants*: Central Drug Research Institute, Lucknow and National institute of science communication and information resources, New Delhi.

[56] RUCKMANI, K, KAVIMANI, S, AN, R. JAYKAR, B. Effect of Moringa oleifera Lam on paracetamol-induced hepatotoxicity. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 1998; **60**(1): 33-35.

[57] SAINI, RAMESH KUMAR, SIVANESAN, IYYAKKANNU. KEUM, YOUNG-SOO. Phytochemicals of Moringa oleifera: a review of their nutritional, therapeutic and industrial significance. 3 Biotech. 2016; **6**(2): 203.

[58] SAIRAM, TV. (1999). Home remedies, Vol II: A Handbook of Herbal Cures for Commons Ailments: New Delhi, India: Penguin.

[59] SANTOS, ANDRÉA FS, ARGOLO, ADRIANA CC, PAIVA, PATRÍCIA MG. COELHO, LUANA CBB. Antioxidant activity of Moringa oleifera tissue extracts. Phytotherapy research. 2012; **26**(9): 1366-1370.

[60] SILVA, MARCELA FERNANDES, NISHI, LETICIA, FAROOQI, AMMAD. BERGAMASCO, ROSANGELA. The many health benefits of Moringa oleifera. Journal of Medical and Pharmaceutical Innovation. 2014; **1**(9-12.

[61] TOMA, ALEMAYEHU, DEYNO, SERAWIT. HAWASSA, ETHIOPIA. Phytochemistry and pharmacological activities of Moringa oleifera. Int. J. Pharmacogn. 2014; **1**(222-231.

[62] VERGARA-JIMENEZ, MARCELA, ALMATRAFI, MANAL MUSED. FERNANDEZ, MARIA LUZ. Bioactive components in Moringa Oleifera leaves protect against chronic disease. Antioxidants. 2017; **6**(4): 91.

[63] VIERA, GUSTAVO HITZSCHKY FERNANDES, MOURÃO, JOZEANNE ALVES, ÂNGELO, ÂNGELA MARIA, COSTA, RENATA ALBUQUERQUE. VIEIRA, REGINE HELENA SILVA DOS FERNANDES. Antibacterial effect (in vitro) of Moringa oleifera and Annona muricata against Gram positive and Gram negative bacteria. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2010; **52**(3): 129-132.

[64] WADHWA, SHAILENDRA. A review on commercial, traditional uses, phytoconstituents and pharmacological activity of Moringa oleifera. Global journal of traditional medicinal systems. 2013; **2**(1): 01-13.

[65] YANG, RAY-YU, CHANG, LIEN-CHUNG, HSU, JENN-CHUNG, WENG, BRIAN BC, PALADA, MANUEL C, CHADHA, ML. LEVASSEUR, VIRGINIE. Nutritional and functional properties of Moringa leaves–From germplasm, to plant, to food, to health. Moringa leaves: Strategies, standards and markets for a better impact on nutrition in Africa. Moringanews, CDE, CTA, GFU. Paris. 2006.

Editor – Michał Nowicki

Received: 03.08.2020
Accepted: 08.12.2020
Shabbir Hussain
e-mail: dr.shabbirhussain@lgu.edu.pk, shabchem786@gmail.com
mob # +92-3214140130
Muhammad Amin Abid
e-mail: mabiduet@gmail.com
mob # +92-300 4502418

INFORMACJE

INFORMACJA o dostępności pełnych artykułów publikowanych w PBK oraz publikacji elektronicznej

Pełne wersje artykułów opublikowanych w „Postępach Biologii Komórki" do 2017 roku są dostępne *on line* pod: http://www.pbkom.eu/pl/pbk-publikacje. Artykuły opublikowane w roku 2018, 2019 oraz 2020 są podane w wersji skróconej, a zainteresowana osoba może uzyskać darmowy dostęp wyłącznie do streszczenia. Aby uzyskać pełen dostęp do prac z ostatnich dwóch lat należy dokonać opłaty w internetowym sklepie dostępnym pod ww. adresem.

Artykuły **przyjęte do druku** w „Postępach Biologii Komórki" w języku polskim mogą być umieszczone dodatkowo w języku angielskim w wersji elektronicznej „Postępów" (*Advances in Cell Biology*) po przysłaniu w ciągu miesiąca do Redakcji angielskiego tłumaczenia tekstu. Ta wersja „Postępów" jest indeksowana w AGROS.

Przygotowanie publikacji do umieszczenia jej w Advances in Cell Biology (ACB):

1. Pracę przyjętą do „Postępów Biologii Komórki" Autor może umieścić na półce MetaPress w j. angielskim. Dostęp do tej wersji pracy jest bezpłatny i wiele osób korzysta z tej wersji. Szczególnie artykuły przeglądowe, a takie publikują „Postępy", są bardzo cenione, gdy są dostępne bez dodatkowych opłat
2. Tytuł pracy, streszczenie oraz bibliografia pozostają takie same jak w wersji polskiej. Treść pracy w j. angielskim Autor przygotowuje tak, aby odpowiadało to wersji w j. polskim. Ilustracje kolorowe są mile widziane nawet, gdy w wersji polskiej były czarno/białe
3. Przetłumaczoną przez Autora wersję pracy: tekst (ryciny – oddzielnie) należy wysłać pocztą e-mailową do prof Michała Nowickiego na adres: mnowicki@ump.edu.pl
4. Prof Nowicki wysyła ten tekst do odpowiedniego korektora j. angielskiego. Korektor językowy powinien w ciągu l-2 tyg. odesłać poprawiony tekst prof Nowickiemu, który będzie prosić Autora o akceptację korekty
5. Poprawiony tekst po akceptacji Autora prof Nowicki przekazuje do składu a następnie jest umieszczany na stronie *Advances in Cell Biology*
6. Autor nie ponosi kosztów korekty j. angielskiego ani publikacji rycin kolorowych, jak też wersji artykułu w j. angielskim

Dotychczas opublikowane w tej wersji artykuły są dostępne pod adresem:
http://www.degruyter.com/printahead/j/acb

Warunki otrzymywania czasopisma

– złożenie zamówienia: faxem, pocztą itp.
– jednoczesne dokonanie wpłaty na konto:

Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej w Poznaniu
Nr konta w BZWBK: 68 1090 1476 0000 0001 3211 8209
– po otrzymaniu wpłaty wystawiamy fakturę VAT.

W sytuacji, kiedy wpłata nastąpi w trakcie trwania prenumeraty, wysyłamy wszystkie zeszyty (numery) czasopisma, które ukazały się w okresie objętym prenumeratą.

Warunki prenumeraty kwartalnika PBK

Prenumerata roczna
Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty na rok 2020 pod adresem:
FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ
ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań; tel. (61) 854-64-58, fax. (61) 854-64-40
email: zpodemsk@ump.edu.pl
na konto: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ
ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań; BZWBK: 68 1090 1476 0000 0001 3211 8209

Cena prenumeraty rocznika wynosi	na rok 2020
dla instytucji (bibliotek)	230 zł + 8% VAT
dla odbiorców indywidualnych	83 zł + 8% VAT

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2020
should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Swiecickiego str. 6, 60-781 Poznan/Poland
+48 61 854-64-58, fax. +48 61 854-64-40, email: zpodemsk@ump.edu.pl
On account: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ
Swiecickiego str. 6, 60-781 Poznan/Poland, BZWBK: 68 1090 1476 0000 0001 3211 8209
Price per year 80 dollars USA or 55 euro

Cennik dla Autorów rycin i druku w 2020 r.

	publikacja pracy	str. druku (ponad 15) 1 str.
Cena zł	1500,00	50,00

Do ceny należy doliczyć 8% VAT.

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI (PBK) drukują artykuły przeglądowe w języku polskim lub angielskim z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, niepublikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym oraz Słownikiem Biologii Komórki PAU 2008. Artykuły drukowane w PBK bez zgody redakcji nie mogą być publikowane w innych periodykach.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

1) artykuły przeglądowe nie przekraczające 5000 słów (do sumy tej nie wlicza się strony tytułowej, streszczenia, podziękowań, tabel wraz z opisami, opisów rycin oraz literatury) i do 100 pozycji bibliograficznych ze szczególnym uwzględnieniem ostatnich 5 lat;
2) doniesienia z ostatniej chwili nie przekraczające 1500 słów z maksymalnie 10 pozycjami bibliograficznymi z ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji);
3) listy do redakcji (do 350 słów).

Wszystkie artykuły, wyłącznie w wersji elektronicznej, należy kierować na adres mailowy mnowicki@ump.edu.pl

Sposób przygotowania artykułów:

1. list przewodni – kierowany przez autora prowadzącego korespondencję do kolegium redakcyjnego Postępów Biologii Komórki musi zawierać
   i. informację, że artykuł, jak dotąd, nie został opublikowany w innym czasopiśmie (z wyjątkiem streszczenia), jak i nie został wysłany do innego czasopisma celem rozważenia możliwości jego publikacji
   ii. oświadczenie autora zajmującego się korespondencją, że wszyscy współautorzy zapoznali się z treścią artykułu i zaakceptowali jego treść
   iii. oświadczenie o występowaniu lub braku konfliktu interesów autora/autorów artykułu
   iv. przedstawienie zakresu pracy (ang. contribution) włożonego przez każdego z autorów artykułu w przygotowanie manuskryptu
   v. oświadczenie, że artykuł po przyjęciu do druku w PBK przechodzi na własność Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji
2. strona tytułowa musi zawierać tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona i nazwiska autorów z afiliacją, liczbę słów znajdujących się w artykule (z zastrzeżeniami podanymi wyżej), liczbę tabel i rycin, słowa kluczowe (3 – 5 słów zgodnych z Medical Subject Headings), skrót tytułu pracy (maks. 40 znaków), informację o finansowaniu artykułu oraz dane autora prowadzącego korespondencję (adres pocztowy, e-mail, numer telefonu oraz numer faxu)
3. streszczenie artykułu w języku polskim i angielskim – maksymalnie 300 słów
4. w tytule i streszczeniu można wprowadzać jedynie powszechnie przyjęte skróty (np. DNA)
5. zasadniczy tekst (Times New Roman 12 pkt., odstęp 1,5 wiersza) należy podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały (należy przyjąć następujący sposób numeracji rozdziałów i podrozdziałów: 1, 1.1, 1.1.1, 1.1.2 itd.)
6. ostateczna wersja tekstu powinna być zapisane w formacie doc. lub docx.
7. tabele wraz z opisami należy umieszczać na końcu artykułu; jednostki miar muszą być zgodne z układem SI;
8. ryciny i schematy należy zapamiętywać w formacie tiff. lub jpg. w jakości minimum 300 dpi; w przypadku publikowania mikrofotografii należy zamieszczać na nich podziałkę (scale bar); wartość podziałki należy podać w opisie mikrofotografii; jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, a zamieszcza się je w niezmienionej formie, należy podać skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na ich reprodukcję;
9. objaśnienia i podpisy rycin, zdjęć i w tabelach powinny być podane w j. polskim i angielskim
10. sposób przygotowania literatury: skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus; cytowanie literatury w tekście – z zastosowaniem nawiasu kwadratowego (np. [5]); spis literatury należy zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

    [1] BEN-CHETRIT E, CHAN EK, SULLIVAN KF, TAN EM. A 52-kD protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle. J Exp Med 1988; **167**: 1560-1571.

    [2] BEUTLER B. Toll-like receptors and their place in immunology. Nature 2004; **430**: 498-518.

    [3] ELSTON CW. Grading of invasive carcinoma of the breast. In Page DL and Anderson TJ eds. Diagnostic histopathology of the breast. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1987;300-311.

Odpłatność (kwoty brutto)

1. opłata za wydrukowanie artykułu nieprzekraczającego 15 stron druku – 1500 zł
2. strona druku (powyżej 15) – dodatkowo 50 zł za jedną stronę

Skierowanie pracy do PBK celem rozważenia możliwości jej publikacji jest tożsame z akceptacją przez autorów pracy regulaminu przyjmowania, oceny i publikowania artykułów naukowych w tym czasopiśmie.

Poprawioną po recenzji wersję pracy należy zwrócić do redakcji maksymalnie w ciągu 30 dni. Redakcja zrezygnuje z publikacji maszynopisu, którego autorzy do 30 dni od chwili otrzymania recenzji nie odpowiedzą na list redaktora.

Autor zobowiązany jest do wykonywania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu 48 godzin do redakcji. Koszty spowodowane większymi zmianami tekstu, wprowadzanymi w korekcie autorskiej poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów i zmian w manuskrypcie.

Po zaksięgowaniu kwoty związanej z publikacją artykułu w Postępach Biologii Komórki na koncie fundacji wszyscy autorzy otrzymują 1 egzemplarz zeszytu PBK z opublikowaną pracą oraz plik PDF zawierający opracowany przez redakcję manuskrypt (wydrukowane zeszyty oraz plik PDF są wysyłane odpowiednio na adres pocztowy oraz e-mail autora zajmującego się korespondencją). Autorzy mogą również zamówić większą liczbę wydrukowanych reprintów swojej pracy, a ich koszt będzie podany do wiadomości autorów na stosownym druku zamówienia.

TREŚĆ – CONTENTS

GRĄDZKA K., KIEŁBOWICZ-MATUK A.: 225
: Białka B-box u roślin – heterogeniczność strukturalna i funkcjonalna
B-box proteins in plants – structural and functional heterogeneity

ŁĄCZNA M., TARNOWSKI M., KOPYTKO P., BUJAK J., PAWLIK A.: 247
Tumour necrosis factor alpha inhibitors in rheumatoid arthritis therapy
Inhibitory czynnika martwicy nowotworu alfa w terapii reumatoidalnego zapalenia stawów

NOWICKA M., MIZIO K., MACIASZCZYK-DZIUBIŃSKA E.: 265
Charakterystyka eukariotycznych reduktaz arsenianowych z nadrodziny rodanaz
Characterization of eukaryotic arsenate reductases of rhodanese superfamily

ZBIERALSKI K., WAWRZYCKA D.: 287
Rola α-arestyn w ubikwitynacji i homeostazie białek błony komórkowej
Role of α-arrestins in ubiquitination and protein homeostasis at the plasma membrane

FARHAT N., HUSSAIN SH., SYED SH.KH., AMJAD M., JAVED M., IQBAL M., HUSSAIN M., HAROON SH.M., RAZA H., BUTT SH.Z., KIRAN R., RIAZ SH.: 307
Dietary phenolic compounds in plants: their antioxidant and pharmacological potential

KAMRAN M., HUSSAIN SH., ABID M.A., SYED SH.KH., SULEMAN M., RIAZ M., IQBAL M., MAHMOOD S., SABA I., QADIR R.: 321
Phytochemical composition of *moringa oleifera* its nutritional and pharmacological importance

Informacje 335

Indeks 369705