

BARBARA ZAGDAŃSKA

Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie

Mechanizmy degradacji białek i ich znaczenie w odporności roślin na mróz i suszę

Mechanisms of protein degradation and their role in plant resistance to frost and drought

Poziom białek wewnątrzkomórkowych zależy zarówno od intensywności ich syntezy jak i degradacji. Procesy degradacji białek mogą przebiegać na dwóch różnych szlakach: mniej selektywnym, wakuolarnym i pozawakuolarnym, bardziej selektywnym. Proteoliza wakuolarna jest niezależna od energii, jakkolwiek pewna jej część jest zużywana do transportu substratów do wakuoli. Proteoliza pozawakuolarna może być zależna jak i niezależna od energii. W procesie przebudowy białek pszenicy podczas deficytu wody biorą udział w różnym stopniu oba szlaki degradacji białek. U genotypów odpornych na odwodnienie stopień tolerancji wiąże się ze zmniejszoną indukcją proteolizy wakuolarniej, w tym proteinaz cysteinowych przy równoczesnej derepresji proteolizy zależnej od ATP. Tego typu kompensacja aktywności proteolitycznych nie występuje u genotypów odpornych na suszę w fazie kłoszenia jak również genotypowa zależność tolerancji od stopnia derepresji proteolizy zależnej od ATP zanika u roślin zaaklimatyzowanych do suszy.

W obrębie przebadanych rodów pszenicy ozimej stopień indukcji endoproteinaz cysteinowych jest wysoce ujemnie skorelowany zarówno z poziomem mrozoodporności badanych rodów jak i z poziomem tolerancji na odwodnienie. Można więc przypuszczać, że genetycznie uwarunkowana odpowiedź na stresy abiotyczne jest przynajmniej na wstępnym etapie ogólna i objawia się intensywnością z jaką usuwane są zbędne lub uszkodzone białka na drodze proteolizy wakuolarniej.

Słowa kluczowe: endoproteinazy cysteinowe, mrozoodporność, odporność na suszę, proteoliza wakuolarna, proteoliza zależna od ATP

The intracellular protein level depends both on the rate of synthesis and degradation. Protein degradation may proceed by two main pathways: the less selective vacuolar pathway and the selective non-vacuolar pathway. The vacuolar proteolysis is energy-independent, although energy is required for the transport of substrates to vacuoles. The non-vacuolar proteolysis may be either energy-dependent or energy-independent. The remodelling of cellular proteins in dehydrated wheat leaves is associated with an extensive proteolysis mediated by both vacuolar and non-vacuolar, ATP-dependent pathways. Experiments with ten genotypes of spring wheat differing in dehydration tolerance and acclimation ability indicate that dehydration tolerance is associated with a lower induction of the vacuolar proteolysis, including cysteine endoproteases and derepression of the ATP-dependent proteolysis as compared with drought sensitive genotypes. At the heading phase similar compensation did not occur in the drought tolerant genotypes as well as genotype-dependent dehydration tolerance was not related to the derepression of ATP-dependent proteolysis in acclimated leaves.

Among the winter wheat genotypes, induction of cysteine endoproteinases was significantly negatively correlated with the level of both frost resistance and dehydration tolerance. One can suppose that genetically-dependent response of wheat to abiotic stresses is generally reflected by the rate of removal of non-required or damaged proteins by the vacuolar proteolysis.

Key words: ATP-dependent proteolysis, cysteine endoproteinases, dehydration tolerance, frost resistance, vacuolar proteolysis

W przeciwieństwie do ogromnego postępu badań nad biosyntezą białek roślinnych, mechanizmy ich degradacji pozostają rozszyfrowane w znacznie mniejszym stopniu. Dopiero odkrycie pozalizosomalnej wewnątrzkomórkowej degradacji białek, w której ubikwityna kowalencyjnie związana z różnymi białkami przy udziale ATP tworzy „sygnał degradacyjny” (Hershko i Ciechanover, 1982) spowodowało rosnące zainteresowanie proteolizą białek roślinnych z uwagi na jej znaczenie w wielu procesach słabo poznanych u roślin (Callis, 1995; Ingram i Bartels, 1996; von Kampen i in., 1996; Barakat i in., 1998; Staszczak i Zdunek, 1999). W świetle najnowszych badań degradacja białek jest niezbędnym elementem regulatorowym w metabolizmie komórki, zachodzącym niemal ustawicznie w każdym jej przedziale. Proteoliza wewnątrzkomórkowa odgrywa ważną rolę w procesach katabolicznych, a w latach 90 zaczęto ją uważać za główny mechanizm kontroli biochemicznej. Zadecydowała o tym jej główna cecha, a mianowicie nieodwracalność procesu, którego wynikiem jest całkowita hydroliza łańcuchów polipeptydowych lub jedynie usunięcie niektórych sekwencji aminokwasowych (ograniczona proteoliza). Proteolityczna modyfikacja białek jest końcowym etapem ich biosyntezy i na tej drodze większość białek osiąga swoją dojrzałą formę. Proces dojrzewania białek obejmuje usunięcie metioniny lub N-formylometioniny z nowo syntetyzowanych łańcuchów polipeptydowych, usunięcie peptydu sygnałowego warunkującego transport przez błony i prawidłową lokalizację białka w komórce, a także przekształcanie nieaktywnych probiałek w formy biologicznie aktywne. Ograniczona proteoliza jest jedną z możliwości post-translacyjnej modyfikacji białek, powszechnego mechanizmu regulacji procesów fizjologicznych w komórce. Degradacja białek jest ważnym mechanizmem pozwalającym organizmowi utrzymać homeostazę, szczególnie podczas rozwoju lub w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne, gdyż jest środkiem do zakończenia okresu życia wielu białek regulatorowych, składników szlaku przekazywania sygnałów itp. Także jedną z ważniejszych funkcji wewnątrzkomórkowej proteolizy jest utrzymywanie funkcjonalnego stanu białek poprzez eliminację uszkodzonych, zmutowanych lub nieprawidłowych białek. Prawidłowa struktura białek, podobnie jak prawidłowa sekwencja aminokwasów w białkach są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu i dlatego muszą być bezustannie kontrolowane i monitorowane.

SZYBKOŚĆ DEGRADACJI BIAŁEK

Degradacja indywidualnych białek podlega ścisłej kontroli zarówno przestrzennie w komórce, jak i w czasie życia komórki, aby zapobiegać degradacji białek nie przeznaczonych do destrukcji. Procesy degradacji poszczególnych białek przebiegają z

różną szybkością. Okres życia różnych białek nie zależy od ich lokalizacji w komórce i wynosi od kilku minut (dekarboksylaza ornitynowa) do kilku godzin (4,3 godziny dla α -amylazy), a w przypadku białek strukturalnych nawet do kilku tygodni lub miesięcy (Vierstra, 1993). Przyczyny tych różnic nie są jeszcze w pełni wyjaśnione, chociaż zgodnie z jedną z najnowszych hipotez tzw. regułą N-końca (Bachmair in., 1986; Varshavsky, 1997 a) o długości życia białka decyduje N-końcowa reszta aminokwasowa. Resztami destabilizującymi białko okazały się reszty takich aminokwasów, jak lizyna, leucyna, izoleucyna, fenyloalanina, tyrozyna czy tryptofan. Okres półtrwania białka, w którym N-końcowym aminokwasem jest którykolwiek z wymienionych aminokwasów nie przekracza 30 min. Do reszt silnie stabilizujących strukturę białka, o okresie półtrwania powyżej 20 godzin należą: reszty glicyny, alaniny, cysteiny, seryny, proliny, metioniny, treoniny i waliny. Jeśli aminokwasem N-końcowym jest glutamina lub kwas glutaminowy i asparagina lub kwas asparaginowy to okres półtrwania białka można określić na około 3–30 min. W przypadku wielu białek ulegających szybkiej degradacji zlokalizowano tzw. sekwencje PEST, czyli regiony bogate w prolinę (P), kwas glutaminowy (E), serynę (S) i treoninę (T). Fosforylacja tych regionów może przyspieszać degradację niektórych białek.

Podstawową strategią kontroli degradacji białek jest kompartmentacja, tj. ograniczenie działania proteolizy do tych miejsc, do których docierają białka zawierające sygnał degradacyjny. Takim przedziałem może być organella ograniczona błonami, np. wakuola. Białka, które są w takim przedziale komórki degradowane muszą do niego dotrzeć specyficznymi szlakami (Hicke i Riezman, 1996). Inną formą regulacji jest autokompartamentacja w wieloenzymatycznych kompleksach, np. w proteasomie (Tanaka, 1998).

Degradacja białek jest procesem wielofazowym, początkowe cięcie proteolityczne jest bardzo specyficzne i jego szybkość jest ograniczona, a późniejsza hydroliza aż do wolnych aminokwasów jest prowadzona przez mniej specyficzne endo- i egzopeptydazy.

CHARAKTERYSTYKA ENZYMÓW PROTEOLITYCZNYCH

Systematyczna nazwa enzymów proteolitycznych zawiera nazwę aminokwasu, z którego zbudowane jest centrum aktywne, gdyż klasyfikacja enzymów proteolitycznych opiera się na podobieństwach budowy centrów aktywnych. Należą one do hydrolaz, a biorąc pod uwagę specyfikę działania tych enzymów dzielimy je na endo- i egzoproteinazy. Endoproteinazy są to enzymy hydrolizujące wiązania wewnątrz łańcucha białkowego, podczas gdy egzopeptydazy hydrolizują wiązania N i C końcowej reszty aminokwasowej. Enzymy odszczepiające aminokwas N-końcowy to aminopeptydazy (EC 3.3.4.11), a enzymy hydrolizujące wiązanie peptydowe przed C-końcowym aminokwasem noszą nazwę karboksypeptydaz (EC 3.4.16 do 3.4.18).

Podstawowym kryterium klasyfikacji endoproteinaz jest ich reakcja na typowe dla nich inhibitory. Resztami katalitycznymi centrum aktywnego endoproteinaz serynowych (EC 3.4.21) są reszty seryny i histydyny, stąd DFP (diizopropylodifluorofosforan) lub PMSF (fenylometylosulfofluorek) charakteryzują endoproteinazy serynowe. Enzymy te wykazują maksimum aktywności zwykle pomiędzy pH 7–9. Informacje o roślinnych endoproteinazach serynowych są dość skąpe.

Endoproteinazy cysteinowe (3.4.22) posiadają w centrum aktywnym resztę cysteiny, a ich inhibitorami diagnostycznymi są jodooctan, jodoacetamid i E 64 (trans-epoksybursztynylo-leucyloamido-(4-guanidyno) butan). Optimum pH działania tej klasy endoproteinaz obejmuje zarówno pH kwaśne, jak i obojętne. Endoproteinyzyny cysteinowe dość powszechnie występują w tkankach wegetatywnych, a najlepiej scharakteryzowane zostały w kiełkujących nasionach jęczmienia (Rogers i in., 1985; Holverda i in., 1992; Holverda i Rogers, 1992) i ryżu Watanabe, 1991).

Centrum aktywne endoproteinaz aspartylowych (EC 3.4.23) utworzone jest przez połączone wiązaniem wodorowym dwie reszty kwasu asparaginowego. Wykazują one najwyższą aktywność w zakresie pH od 1,5 do 5,0. Enzymy te preferują hydrolizę wiązań peptydowych utworzonych przez aminokwasy hydrofobowe jak Phe-Phe, Phe-Tyr oraz Tyr-Leu (Mutlu i Gal, 1999). Aktywność proteolityczna endoproteinaz aspartylowych hamowana jest przez pepstatynę. Są one dość powszechnie występującymi enzymami roślinnymi (Davies, 1990; Rawlings i Barret, 1995). Najlepiej scharakteryzowanymi endoproteinazami aspartylowymi są endoproteinazy zlokalizowane w nasionach, w obu typach wakuol, zarówno litycznych jak i zawierających białka zapasowe (Martilla i in., 1995; Bethke i in., 1996; Paris i in., 1996; Swanson i in., 1998). Ich przypuszczalną funkcją jest udział w dojrzewaniu białek zapasowych podczas rozwoju nasion (Mutlu i Gal, 1999), jak również hydroliza białek zapasowych podczas kiełkowania (Higgins, 1984; Belozersky i in., 1989; Bethke i in., 1996; Mutlu i Gal, 1999). Enzymy te znaleziono również w innych częściach roślin, takich jak liście (Rodrigo i in., 1989, 1991; Kuwabara i Suzuki, 1995), kwiaty (Heimgartner i in., 1990; Cordeiro i in., 1994 a, b; Verissimo i in., 1996; Ramalho-Santos i in., 1997), pyłek (Radłowski in., 1996). Wydaje się, że biorą one udział w degradacji białek podczas starzenia się liści (Kervinen i in., 1990) i kwiatów (Heimgartner i in., 1990). Ostatnie badania przeprowadzone na komórkach z czapeczki korzenia (Runenberg-Roos i Saarma, 1998) sugerują, że endoproteinazy aspartylowe biorą udział w programowanej śmierci komórki.

Metaloproteinazy (EC 3.4.24) preferują hydrolizę substratów mających aminokwasy z niepolarnymi łańcuchami bocznymi (Leu, Phe), a ich aktywność jest najwyższa w środowisku o pH około 7. Metaloproteinazy w swoim centrum aktywnym posiadają Zn^{2+} i dlatego typowymi inhibitorami diagnostycznymi są EDTA, 1,10-fenantrolina i 2,2-dipirydyna. Bardzo mało wiadomo o enzymach tej klasy pochodzących z materiału roślinnego. Jak dotąd enzymy te znaleziono głównie w nasionach roślin zarówno jedno- jak i dwuliściennych (Shutov i Vaintraub, 1987), a także w liściach fasoli zwykłej i kielkach ryżu. Lokalizacja komórkowa tych enzymów nie była badana, natomiast przypisywany im jest udział w procesie uruchamiania białek zapasowych nasion. Metaloproteinazy inicjują trawienie białka na drodze ograniczonej proteolizy. Tak zmodyfikowane białka są następnie dalej trawione przez endoproteinazy cysteinowe i karboksypeptydazy (Shutov i Vaintraub, 1987).

Endoproteinaza treoninowa (EC 3.4.99), zwana inaczej proteasomem, jest multikatalitycznym enzymem, dla którego diagnostycznym inhibitorem jest laktacystyna (Fenteany i in., 1995). Proteasom 26S z komórek eukariotycznych jest proteinazą o masie cząsteczkowej 2 MDa, przejawiającą optymalną aktywność w środowisku zasadowym.

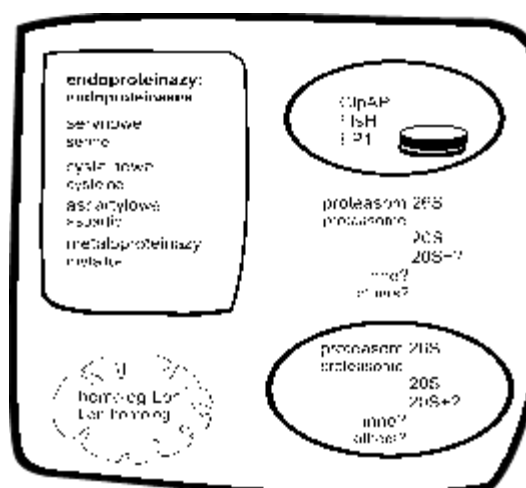
Rechsteiner i wsp. (1993) wykazali, że w komórce występują dwie proteiny: jedna będąca 20S proteasomem i inna, aktywowana przez ATP proteinaza o stałej sedymentacji 26S. Większy 26S proteasom zawiera 20S proteasom (700 kDa) stanowiący część korową tej multikatalitycznej proteiny oraz dwa asymetryczne kompleksy regulatorowe o stałej sedymentacji 19S (19S caps) zasocjowane na jego końcach (Baumeister i in., 1998). Kompleksy regulatorowe 19S zawierają około 15–20 różnych podjednostek o aktywności ATPazowej, wiążącej ubikwitynę oraz aktywności izopeptydazowej (Tanaka, 1998). Podjednostki te biorą udział w rozpoznawaniu sygnałów degradacyjnych i rozfałdowywaniu białek (unfoldases) przed ich skierowaniem do rdzenia proteolitycznego. Ten multikatalityczny kompleks proteasomowy zaangażowany jest w degradację nieprawidłowo zbudowanych i zdenaturowanych białek, a także białek o krótkim okresie półtrwania. Ponieważ proteasom katalizuje rozpad białek nie tylko w sposób nieodwracalny, ale także szybko i w ściśle określonym czasie, uważa się go za nowy, istotny mechanizm regulacyjny metabolizmu, nieodłącznie związany z takimi ważnymi procesami, jak regulacja cyklu komórkowego, kontrola jakości białek, przewodzenie sygnałów, odpowiedź immunologiczna rośliny, a także przypisuje mu się funkcję „przełącznika” decydującego o proliferacji komórki lub też o jej programowanej śmierci, apoptozie (Hilt i Wolf, 1996; Lupas i in., 1997; Varshavsky, 1997b; Tanaka, 1998).

SZLAKI DEGRADACJI BIAŁEK

Proteoliza wakuolarna

Przyjmuje się obecnie, że wszystkie endoproteiny, z wyjątkiem proteasomu zlokalizowane są w wakuoli (rys. 1), natomiast sam mechanizm proteolizy nie jest jasny. Jak to się dzieje, że enzym i substrat są w tym samym przedziale, a do degradacji białka dochodzi w ściśle określonym czasie? Otóż do niedawna nasza wiedza o budowie i funkcji wakuol była oparta głównie na obserwacjach morfologicznych (Vierstra, 1993; Callis, 1995). Dzięki zastosowaniu nowoczesnych technik badawczych okazało się, że wakuole są bardzo dynamicznymi organellami, a cytologiczna definicja wakuoli odpowiada różnym funkcjom zarówno biochemicznym, jak i fizjologicznym (Marty, 1999). W większości komórek tkanek roślinnych wakuola zajmuje centralną pozycję, a w tonoplaście tych wakuol występują akwaporyny (białka charakteryzujące się zdolnością transportu wody) typu γ -TIP (tonoplast intrinsic protein). Wydaje się, że takie wakuole pełnią funkcję analogiczną do lizozymów tkanek zwierzęcych. Natomiast w tkankach zapasowych nasion i owoców występują wakuole wyspecjalizowane w przechowywaniu białek zapasowych (Herman i Larkins, 1999), a w ich błonach występują charakterystyczne dla nasion akwaporyny typu α -TIP (Swanson i in., 1998). Białka zapasowe są także syntetyzowane i akumulowane w wyspecjalizowanych komórkach części roślin, a w tonoplaście tych wakuol występują akwaporyny typu δ -TIP (Neuhaus i Rogers, 1998). Najnowsze badania sugerują, że różne wakuole mogą funkcjonować jednocześnie w tej samej komórce, np. w komórkach czapeczki jęczmienia i w komórkach tytoniu w różnych tkankach części nadziemnej znaleziono wakuole zarówno typu α -TIP jak i γ -TIP (Marty, 1999). Tak więc wakuole charakteryzujące się występowaniem akwaporyn typu α -TIP są

wakuolami zapasowymi, w których białka są chronione przed enzymami degradacyjnymi, a wakuole typu γ -TIP są to typowe wakuole lityczne. Jeśli komórka tworzy dużą centralną wakuolę to wydaje się, że oba przedziały komórkowe się łączą, ponieważ w tonoplaście występują zarówno akwaporyny typu α , jak i γ -TIP (Marty, 1999). Degradacja białek może być także wspomagana przez licznie występujące w komórce autofagiczne wakuole, które są aktywne niezależnie od dużej centralnej wakuoli (Aubert i in., 1996; Moriyasu i Ohsumi, 1996). Po zakończeniu trawienia białek, te małe wakuole są włączane do centralnej wakuoli. Białka przeznaczone do degradacji są dostarczane do wakuol przez szlak sekrecyjny, na który składa się zarówno transport autofagiczny, jak i transport endocytamy. Natomiast podczas mobilizacji rezerw nasiennych zawartych w wakuolach, w których zdeponowane były białka zapasowe dochodzi do zmiany funkcji tych organelli: z typowo zapasowych wakuol stają się one lityczną organellą o niskim pH. To przejście z przedziału zapasowego do organelli litycznej jest regulowane hormonalnie (Bethke i in., 1998).



Endoproteiny wymienione w poszczególnych organellach komórkowych opisano w pracy. Znaki zapytania dotyczą tych endoproteinaz, które prawdopodobnie występują w komórkach roślinnych, ale jak dotąd nie zostały scharakteryzowane. Endoproteases indicated in each organelle have been described in the text. A question mark indicates that the additional endoproteolytic activities probably exist in the plant cell but have not been characterized hitherto.

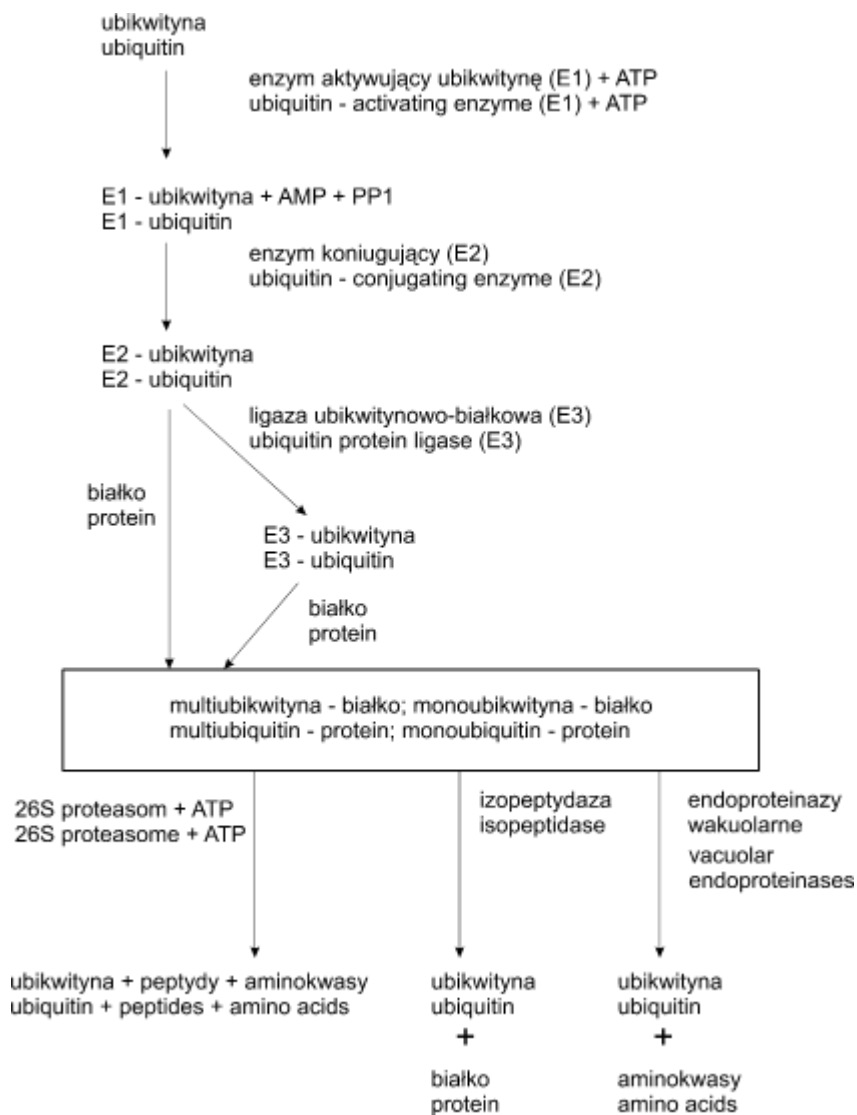
Rys. 1. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja endoproteinaz roślinnych
Fig. 1. Intracellular location of plant endoproteases

Dotychczasowe badania wskazują, że wakuolarny szlak degradacji białek nie wymaga nakładów energii w postaci ATP, stąd często jest nazywany ATP-niezależną proteolizą. Jednakże nie wyklucza się, że energia jest niezbędna do transportu, przynajmniej niektórych białek, do wakuoli (Hicke i Riezman, 1996). Przyjmuje się, że na tej drodze są degradowane białka zapasowe i o długim okresie półtrwania.

Proteoliza zależna od ATP

Degradacja białek przez proteasom (endoproteinazę treoninową) wymaga nakładów energii (Vierstra, 1993; Callis, 1995). Było to dość niespodziewane odkrycie, jako że hydroliza wiązań peptydowych jest reakcją egzoergiczną i funkcjonowanie wszystkich znanych dotychczas proteinaz było niezależne od nakładów energii. Najważniejszym odkryciem przybliżającym znajomość mechanizmu degradacji białek w cytoplazmie i w jądrze było opisanie głównego szlaku degradacji białek w komórkach eukariotycznych, w którym bierze udział konserwatywny, 76 aminokwasowy polipeptyd, ubikwityna (Herschko i Ciechanover, 1992). Ubikwityna to białko o zbitej, globularnej strukturze stabilizowanej przez wiązania wodorowe, która zapewnia jej niewrażliwość na działanie kwasów i zasad oraz denaturację cieplną. Roślinna ubikwityna występuje głównie w cytoplazmie i jądrze, chociaż niewielkie ilości znaleziono w chloroplastach, wakuoli i frakcji błon (Vierstra, 1993; Ehlers i in., 1996). Ubikwityna pełni rolę markera, selektywnie znaczącego białka przeznaczone do degradacji. Związanie ubikwityny z białkiem przeznaczonym do degradacji jest procesem wieloetapowym, w którym biorą udział cztery układy enzymatyczne (rys. 2). Etapem wstępnym w procesie ligacji (związania) ubikwityny z białkiem jest jej aktywacja przez enzym E1. Jest to reakcja wymagająca ATP. Enzym E2 (koniugujący) przejmuje zaktywowaną ubikwitynę i przenosi ją albo bezpośrednio na grupę aminową substratów białkowych, albo za pośrednictwem ligazy ubikwitynowo-białkowej (enzym E3). Substrat białkowy może być mono- lub multiubikwitynowany. Znanych jest wiele białek modyfikowanych tylko jedną cząsteczką ubikwityny np. histony, białka regulatorowe błon, kalmodulina. Białka multiubikwitynowane mogą zawierać kilka pojedynczo podstawionych cząsteczek ubikwityny lub rozgałęziony i nierozgałęziony łańcuch poliubikwityny. Ubikwitynowane białka mogą wejść w jeden z kilku szlaków metabolicznych, ale nadal nie jest jasne co decyduje o losie koniugatów białkowych. Do niedawna uważano, że substraty o połączeniach multiubikwitynowych mają kinetyczną przewagę podczas degradacji (Vierstra, 1993; von Kampen i in., 1996). Obecnie przeważa pogląd, że jedynie poliubikwitynacja białka co najmniej czterema cząsteczkami ubikwityny przyłączonych do lizyny 48 prowadzi do ich degradacji przy udziale zależnego od ATP proteasomu 26S (Weissman, 2001). Monoubikwitynowane białka z przyłączoną ubikwityną poprzez lizynę 63 są kierowane do wakuoli, gdzie są degradowane przez endoproteinazy wakuolarnie (Hicke, 2001). Wiązanie różnych reszt lizyny (11, 29, 48 i 63) w ubikwitynie warunkuje zróżnicowane przeznaczenie ubikwitynowanych białek. począwszy od transportu białek błonowych do regulacji transkrypcji (von Kampen i in., 1996; Hicke, 2002). Szlak degradacji białek, zależny od ATP i ubikwityny, wydaje się odgrywać istotną rolę w metabolicznym obrocie roślinnych białek wewnątrzkomórkowych. Ubikwitynacja białek jest procesem dynamicznym i odwracalnym, ponieważ w komórce znajduje się

wiele enzymów deubikwitynujących białko (D'Andrea i Pellman, 1998). Deubikwitynazy są proteinazami cysteinowymi, specyficznie odcinającymi ubikwitynę od koniugatów ubikwityna — białko (patrz izopeptydaza, rys. 2).



Na schemacie przedstawiono dwie funkcje ubikwityny w komórce: znakowanie białek do odwracalnej, funkcjonalnej modyfikacji oraz do nieodwracalnej, ale selektywnej ich destrukcji.

Diagrammatic representation of a double action of ubiquitin in the plant cell: targeting of proteins to reversible functional modification or to irreversible but selective destruction.

Rys. 2. Udział enzymów E1, E2 i E3 w ubikwitynylacji substratu

Fig. 2. The sequential action of three enzymes, E1, E2 and E3, in substrate ubiquitinylation

Mogą one brać udział praktycznie na każdym poziomie szlaku degradacji białek, zależnego od ATP i ubikwityny. W zależności od miejsca działania enzymy te mogą albo wspomagać degradację, albo stabilizować substrat białkowy. Wydaje się, że niektóre enzymy, działające przed skierowaniem białka na proteasom chronią je przed degradacją, natomiast działające na poziomie proteasomu, przyspieszają degradację. Fizjologiczna rola deubikwitynaz nie jest jeszcze poznana, a danych o roślinnych deubikwitynazach jest ciągle brak.

Jednakże ubikwityno- i ATP-zależny szlak degradacji białek nie jest jedynym szlakiem katabolicznym zależnym od energii. Degradacja białek w innych kompartmentach komórkowych może być niezależna od ubikwityny, chociaż ciągle zależna od ATP. Chloroplasty zawierają do 50% wszystkich białek występujących w komórce i do niedawna przypuszczano, że są one degradowane przez proteinazy wakuolarnie (Vierstra, 1993). Obecnie wiadomo, że w stromie chloroplastów występuje ATP-zależna proteinaza typu serynowego (homolog bakteryjnej ClpA/P) oraz ATP-zależna metaloproteinaza EP1 (rys. 1). W tylakoidach występuje natomiast proteinaza typu serynowo-cysteinowego zależna od ATP oraz proteinaza serynowa, również zależna od ATP, o dużym powinowactwie do bakteryjnej ATP-zależnej metaloproteinazy FtsH (Andersson i Aro, 1997). Podobnie w mitochondriach roślinnych znaleziono endoproteinazę zależną od ATP o dużej homologii do bakteryjnej proteinazy typu Lon (Callis, 1995).

Coraz to więcej danych doświadczalnych potwierdza wcześniejszą hipotezę, że na drodze proteolizy zależnej od ATP degradowane są białka zarówno o krótkim, jak i długim okresie półtrwania, ale pełniące kluczową rolę w takich ważnych procesach jak cykl komórkowy, kontrola transkrypcji, przewodzenie sygnałów i regulacja metabolizmu (Varshavsky, 1997 b; Tanaka, 1998). Sprawowanie kontroli przez ten szlak degradacji nad jakością białek sprawia, że szlak ten odgrywa kluczową rolę w ochronie komórki zarówno roślinnej, jak i zwierzęcej przed negatywnymi konsekwencjami stresów środowiskowych zarówno abiotycznych, jak i biotycznych.

ODPOWIEDŹ PROTEOLITYCZNA ROŚLINY NA MRÓZ I SUSZĘ

Odpowiedź metaboliczna rośliny na deficyt wody wyraża się zmianami w ilości i składzie białek rozpuszczalnych (Callis, 1995). Można zatem przypuszczać, że genetycznie uwarunkowana odpowiedź na stresy abiotyczne jest odzwierciedleniem równowagi pomiędzy akumulacją białek indukowanych przez te stresy (białka stresowe), a eliminacją białek zbędnych tzn. takich, które w określonej sytuacji metabolicznej przestają odgrywać swoją rolę, białek uszkodzonych w wyniku odwodnienia komórki i nieprawidłowych, powstałych wskutek błędów indukowanych stresem. Na taką możliwość wskazywały zaobserwowane przesunięcia dystrybucji energii na proteolizę, przy zmniejszonych nakładach na biosyntezę RNA i białek w liściu pszenicy wykazującym deficyt wody (Zagdańska, 1995). W komórkach liści pszenicy funkcjonują oba wyżej opisane szlaki degradacji białek: proteoliza wakuolarna, charakteryzująca się kwaśnym optimum pH (Zagdańska i Wiśniewski, 1996) i zależna od energii, proteoliza pozawakuolarna, o optimum pH 8.2 (Zagdańska i Wiśniewski, 1998). Aktywność obu szlaków

proteolitycznych jest zależna od stadium rozwojowego rośliny i od genotypu pszenicy (Zagdańska i Wiśniewski, 1996, 1998; Wiśniewski i Zagdańska, 2001). W odpowiedzi na deficyt wody aktywność endoproteinaz wakuolarnych zwiększa się siedmiokrotnie, a aktywność proteolizy zależnej od ATP maleje dziesięciokrotnie przy porównywalnym deficycie wody. Dominujący udział (około 50%) endoproteinaz serynowych w całkowitej proteolizie praktycznie nie ulega zmianie, natomiast dwukrotnie zwiększa się udział proteinaz cysteinowych przy dwukrotnie zmniejszonym udziale proteinaz aspartylowych. Podobną indukcję proteinaz cysteinowych obserwowano w przypadku innych stresów np. wysokiej i niskiej (chłodowej) temperatury (Schaffer i Fisher, 1990), ale także deficytu wody (Guerrero i in., 1990; Jones i Mullet, 1995; Vincent i Brewin, 2000) i podczas starzenia się liści (Miller i Huffaker, 1981). Proces aklimatyzacji nie ma zasadniczego wpływu na indukcję zmian jakościowych w proteolizie wakuolamej (Zagdańska i Wiśniewski, 1996), zwiększa natomiast udział proteolizy zależnej od ATP w całkowitej hydrolizie (Zagdańska i Wiśniewski, 1998). W oparciu o doświadczenia z dziesięcioma genotypami pszenicy jarej różniących się zdolnością do tolerowania odwodnienia i aklimatyzacji wykazano, że tolerancja wiąże się ze zmniejszoną indukcją proteolizy wakuolarniej, w tym proteinaz cysteinowych i derepresją proteolizy zależnej od ATP (Wiśniewski i Zagdańska, 2001). Tak więc wydaje się, że w fazie strzelania w źdźbło obniżona indukcja proteolizy wakuolarniej jest kompensowana przez genotypy bardziej tolerancyjne wzmocnioną proteolizą zależną od ATP. Podobną wzajemną kompensację aktywności proteolitycznych obserwowano w fazie kłoszenia u genotypów wrażliwych na suszę, natomiast nie występowała ona u genotypów odpornych na suszę. Znamienne jest jednak, że genotypowa zależność tolerancji odwodnienia od stopnia derepresji ATP-zależnej proteolizy zanika u roślin zaaklimatyzowanych do suszy. Aktywność proteolizy zależnej od ATP jest bowiem taka sama u wszystkich badanych genotypów niezależnie od stopnia ich zdolności do tolerowania odwodnienia (Wiśniewski i Zagdańska, 2001). Obserwowane zależności występujące pomiędzy genetycznie uwarunkowanym poziomem tolerancji odwodnienia a intensywnością degradacji białek na jakimkolwiek szlaku są bardzo złożone i do chwili obecnej nieznane są mechanizmy decydujące o tym, którym szlakiem jest degradowane to samo białko (Tanaka, 1998; Staszczak i Zdunek, 1999). Wydaje się jednak, że współzależności metaboliczne pomiędzy proteolizą zależną i niezależną od ATP związane są z precyzyjną regulacją nakładów energii lub też mogą być wynikiem różnic w metabolizmie energii występujących pomiędzy genotypami odpornymi i wrażliwymi na suszę. Decydujące znaczenie może mieć też dostępność ATP. Indukcja aktywności endoproteinaz cysteinowych, niezależnie od fazy rozwoju rośliny jest wysoce negatywnie skorelowana z poziomem tolerancji na odwodnienie u dziesięciu form pszenicy jarej (Wiśniewski i Zagdańska, 2001). Zwiększoną ekspresję genu kodującego endoproteinazę cysteinową zaobserwowano u rzodkiewnika, grochu i pomidora pod wpływem utraty turgoru, egzogennie podanego ABA i niskiej temperatury (Guerreiro i in., 1990; Williams i in., 1994; Jones i Mullet, 1995; Vincent i Brewin, 2000). Znaczenie fizjologiczne zwiększonej aktywności tych enzymów nie jest jasne. Przypuszcza się, że enzymy te mogą być odpowiedzialne za degradację białek zdenaturowanych w warunkach stresu (Guerrero i in., 1990) lub za dostarczenie materiału do biosyntezy białek

indukowanych przez stres np. akwaporyn (Miao i Verma, 1993; Kjellbom i in., 1994), albo mogą mieć znaczenie przystosowawcze poprzez dostarczanie aminokwasów i niewielkich peptydów do utrzymywania turgoru (Vincent i Brewin, 2000). Dlatego było interesujące sprawdzenie na szerszym materiale roślinnym (20 rodzajów pszenicy ozimej), czy stopień indukcji endoproteinaz cysteinowych odzwierciedla poziom odporności na dehydratację badanych genotypów i czy inny stres środowiskowy np. niska temperatura powoduje podobną indukcję endoproteinaz cysteinowych, zależną od tolerancji mrozowej. W obrębie przebadanych rodzajów pszenicy ozimej stopień indukcji endoproteinaz cysteinowych jest wysoce ujemnie skorelowany z poziomem mrozooporności badanych rodzajów i z poziomem tolerancji odwodnienia (dane nie publikowane). Można więc podejrzewać, że genetycznie uwarunkowana odpowiedź na stresy abiotyczne jest odzwierciedleniem intensywności usuwania zbędnych lub uszkodzonych białek na drodze proteolizy wakuolarnej. Jak wynika z tego krótkiego przeglądu, degradacja białek stanowi integralną część fizjologii komórki, znaczącą nie tylko początek i koniec jej rozwoju (kiełkowanie i starzenie), ale jest procesem ciągłym zachodzącym nieustannie podczas całego życia rośliny. Przełomowym momentem w zrozumieniu mechanizmu hydrolizy białek będzie umiejętność jego wykorzystania do kontroli akumulacji białek czy zmiany stabilności określonych białek. Wreszcie może być pomocne w sterowaniu w roślinach produkcji specyficznych białek dla przemysłu i celów farmaceutycznych.

LITERATURA

- Andersson B., Aro E. M. 1997. Proteolytic activities and proteases of plant chloroplasts. *Physiol. Plant.* 100: 794 — 805.
- Aubert S., Gout E., Bligny R., Marty-Mazars F., Alabouvette J., Marty F., Douce R. 1996. Ultrastructural and biochemical characterization of autophagy in higher plant cells subjected to carbon deprivation: Control by the supply of mitochondria with respiratory substrates. *J. Cell Biol.* 133, 1251 — 1263.
- Bachmair A., Finley D., Varschavsky A. 1986. In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234: 179 — 186.
- Barakat S., Pearce D. A., Sherman F., Rapp W. D. 1998. Maize contains a *Lon* protease gene that partially complements a yeast *pim-1* deletion mutant. *Plant Mol. Biol.* 37: 141-154.
- Baumeister W., Walz J., Zühl F., Seemüller E. 1998. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92: 367 — 380.
- Belozersky M. A., Sarbakanova S. T., Dunaevsky Y. E. 1989. Aspartic proteinase from wheat seeds: location, properties and action on gliadin. *Planta* 177: 321 — 326.
- Bethke P. C., Hillmer S., Jones R. L. 1996. Isolation of intact protein storage vacuoles from barley aleurone. Identification of aspartic and cysteine proteases. *Plant Physiol.* 110: 521 — 529.
- Bethke P. C., Swanson S. J., Hillmer S., Jones R. L. 1998. From storage compartment to lytic organelle: the metamorphosis of the aleurone protein storage vacuole. *Ann. Bot.* 82: 399 — 412.
- Callis J. 1995. Regulation of protein degradation. *The Plant Cell* 7: 845 — 857.
- Cordeiro M. C., Pais M. S., Brodelius P. E. 1994 a. Tissue-specific expression of multiple forms of cyprosin (aspartic proteinase) in flowers of *Cynara cardunculus*. *Physiol. Plant.* 92: 645 — 653.

- Cordeiro M. C., Xue Z. T., Pietrzak M., Pais M. S., Brodelius P. E. 1994 b. Isolation and characterization of a cDNA from flowers of *Cynara cardunculus* encoding cyprosin (an aspartic proteinase) and its use to study the organ-specific expression of cyprosin. *Plant Mol. Biol.* 24: 733 — 741.
- D'Andrea A., Pellman D. 1998. Deubiquitinating enzymes: a new class of biological regulators. *CR Biochem. Mol. Biol.* 33: 337 — 352.
- Davies D.R. 1990. The structure and function of the aspartic proteinases. *Annu Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 19: 189 — 215.
- Ehlers K., Schulz M., Kollmann R. 1996. Subcellular localization of ubiquitin in plant protoplasts and the function of ubiquitin in selective degradation of outer-wall plasmodesmata in regenerating protoplasts. *Planta* 199: 139 — 151.
- Fenteany G., Standaert R. F., Lane W. S., Choi S., Corey E. J., Schreiber S. L. 1995. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-acid terminal threonine modification by lactacystin. *Science*, 268: 726 — 731.
- Guerrero F. D., Jones J. T., Mullet J. E. 1990. Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted and expression of three inducible genes. *Plant Mol. Biol.* 15: 11 — 26.
- Heimgartner U., Pietrzak M., Geertsens R., Brodelius P., da Silva Figueiredo A.C., Pais M.S.S. 1990. Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochem.* 29: 1405 — 1410.
- Herman E.M., Larkins B. 1999. Protein storage bodies and vacuoles. *Plant Cell* 11: 601 — 613.
- Hershko A., Ciechanover A. 1982. Mechanisms of intracellular protein breakdown. *Ann. Rev. Biochem.* 51: 335 — 364.
- Hershko A., Ciechanover A. 1992. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 761 — 807.
- Hicke L., Riezman H. 1996. Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell* 84: 277 — 287.
- Hicke, L. 2001. Protein regulation by monoubiquitin. *Nature Reviews* 2 (3): 195 — 201.
- Higgins T.J.V. 1984. Synthesis and regulation of major proteins in seeds. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 191 — 221.
- Hilt W., Wolf D. H. 1996. Protesomes: destruction as a programme. *Trends Plant Sci.* 21: 96 — 101.
- Holverda B. C., Padgett H. S., Rogers J. C. 1992. Proaleurain vacuolar targeting is mediated by short contiguous peptide interactions. *Plant Cell* 4: 307 — 318.
- Holverda B.C., Rogers J.C. 1992. Purification and characterization of aleurain. A plant thiol protease functionally homologous to mammalian cathepsin H. *Plant Physiol.* 99: 848 — 855.
- Guerrero F.D., Jones J.T., Mullet J.E., 1990. Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted: sequence and expression of three inducible genes. *Plant Mol. Biol.* 15: 11 — 26.
- Ingram J., Bartels D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 377 — 403.
- Jones J.T., Mullet J.E. 1995. A salt- and dehydration-inducible pea gene, *Cyp15a*, encodes a cell-wall protein with sequence similarity to cysteine proteases. *Plant Mol. Biol.* 28: 1055 — 1065.
- Kervinen J., Konturi M., Mikola J. 1990. Changes in the proteinase composition of barley leaves during senescence in field conditions. *Cereal Res. Commun.* 18: 191 — 197.
- Kjellbom P., Larsson C., Johansson I., Karlsson M., Johanson U. 1994. Aquaporins and water homeostasis in plants. *Trends Plant Sci* 4: 308 — 314.
- Kuwabara T., Suzuki K. 1995. Reversible changes in conformation of the 25-kDa protein of photosystem II and their relationship to the susceptibility of the protein to a proteinase from photosystem II membranes. *Plant Cell Physiol.* 36: 495 — 504.

- Lupas A., Flanagan J. M., Tamura T., Baumeister W. 1997. Self-compartmentalizing proteases. 22: 399 — 404.
- Martilla S., Jones B. L., Mikkonen A. 1995. Differential localization of two acid proteinases in germinating barley (*Hordeum vulgare*) seed. *Physiol. Plant.* 93: 317 — 327.
- Marty F. 1999. Plant vacuoles. *The Plant Cell* 11: 587 — 599.
- Miao G. H., Verma D. P. S. 1993. Soybean nodulin-26 gene encoding a channel protein is expressed only in the infected cells of nodules and is regulated differently in roots of homologous and heterologous plants. *Plant Cell* 5: 781 — 794.
- Miller B. L., Huffaker R. C. 1981. Partial purification and characterization of endoproteinases from senescing barley leaves. *Plant Physiol.* 68: 930 — 936.
- Moriyasu Y., Ohsumi Y. 1996. Autophagy in tobacco suspension — cultured cells in response to sucrose starvation. *Plant Physiol.* 111: 1233 — 1241.
- Mutlu A., Gal S. 1999. Plant aspartic proteinases: enzymes on the way to a function. *Physiol. Plant.* 105: 569 — 576.
- Neuhaus J. M., Rogers J. C. 1998. Sorting of proteins to vacuoles in plant cells. *Plant Mol. Biol.* 38: 127 — 144.
- Paris N., Stanley C. M., Jones R. L., Rogers J. C. 1996. Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments. *Cell* 85: 563 — 572.
- Radłowski M., Kalinowski A., Adamczyk J., Królikowski Z., Bartkowiak S. 1996. Proteolytic activity in the maize pollen wall. *Physiol. Plant.* 98: 172 — 178.
- Ramallo-Santos M., Pissarra J., Verissimo P., Pereira S., Salema R., Pires E., Faro C. 1997. Cardosin A, an abundant aspartic proteinase accumulates in protein storage vacuoles in the stigmatic papillae of *Cynara cardunculus* L. *Planta* 203: 204 — 212.
- Rawlings N. D., Barret A. J. 1995. Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism. *Meth. Enzymol.* 248: 105 — 120.
- Rechsteiner M., Hoffman L., Dubiel W. 1993. The multicatalytic and 26S proteases. *J. Biol. Chem.* 268: 6065 — 6068.
- Rodrigo I., Vera P., Conejero V. 1989. Degradation of tomato pathogenesis — related protein by an endogenous 37 kDa aspartyl endoproteinase. *Eur. J. Biochem.* 184: 663 — 669.
- Rogers J. C., Dean D., Heck G. R. 1985. Aleurain: a barley thiol protease closely related to mammalian cathepsin H. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 82: 6512 — 6516.
- Runenberg-Roos P., Saarma M. 1998. Phytapsin, a barley vacuolar aspartic proteinase is highly expressed during autolysis of developing tracheary elements and sieve cells. *Plant J.* 15: 139 — 145.
- Schaffer M. A. A., Fisher R. L. 1990. Transcriptional activation by heat and cold of a thiol protease gene in tomato. *Plant Physiol.* 93: 1486 — 1492.
- Shuthov A. D., Vaintraub I. A. 1987. Degradation of storage proteins in germinating seeds. *Phytochemistry* 26: 1557 — 1566.
- Staszczak M., Zdunek E. 1999. Proteoliza wewnątrzkomórkowa. *Postępy Biochemii* 45: 32 — 41.
- Swanson S. J., Bethke P. C., Jones R. L. 1998. Barley aleurone cells contain two types of vacuoles: characterization of lytic organelles by use of fluorescent probes. *Plant Cell* 10: 685 — 698.
- Tanaka K. 1998. Proteasomes: structure and biology. *J. Biochem.* 123: 195 — 204.
- von Kampen J., Wettren M., Schulz M. 1996. The ubiquitin system in plants. *Physiol. Plant.* 97: 618 — 624.
- Varshavsky A. 1997 a. The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes and Cells* 2: 13 — 28.
- Varshavsky A. 1997 b. The ubiquitin system. *Trends Biochem. Sci* 22: 383 — 387.
- Verissimo P., Faro C., Moir A.J.G., Lin Y., Tang J., Pires E. 1996. Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunculus* L. *Eur. J. Biochem.* 235: 762 — 768.
- Vierstra R. D. 1993. Protein degradation in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 385 — 410.
- Vincent J. L., Brewin N. J. 2000. Immunolocalization of a cysteine protease in vacuoles, vesicles, and symbiosomes of pea nodule cells. *Plant Physiol.* 123: 521 — 530.

- Watanabe H., Abe K., Emori K., Hosoyama H., Arai S. 1991. Molecular cloning and gibberellin — induced expression of multiple cysteine proteinases of rice seeds (oryzains). *J. Biol. Chem.* 266: 16897 — 16902.
- Weissman A. M. 2001. Themes and variations on ubiquitylation. *Nature Reviews* 2(3): 169 — 178.
- Williams R. J., Bullman M., Huttly A., Phillips A., Neil S. 1994. Characterization of a cDNA from *Arabidopsis thaliana* encoding a potential thiol protease whose expression is induced independently by wilting and abscisic acid. *Plant Mol. Biol.* 25: 259 — 270.
- Wiśniewski K., Zagdańska B. 2001. Genotype — dependent proteolytic response of spring wheat to water deficiency. *J. Exp. Bot.* 52 (w druku).
- Zagdańska B. 1995. Respiratory energy demand for protein turnover and ion transport in wheat leaves upon water deficit. *Physiol. Plant.* 95: 428 — 436.
- Zagdańska B., Wiśniewski K. 1996. Endoproteinase activities in wheat leaves upon water deficits. *Acta Bioch. Pol.* 43: 512 — 520.
- Zagdańska B., Wiśniewski K. 1998. ATP-dependent proteolysis contributes to the acclimation — induced drought resistance in spring wheat. *Acta Physiol. Plant.* 20: 55 — 58.