

AUTOREFERAT

1. Imię i Nazwisko: **Krzysztof Leśniewicz**

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:

- magister nauk biologicznych, Wydział Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu, 1989r.
- doktor nauk biologicznych, Wydział Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu, 1998r.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

- 1.10.1989 – 18.06.1998 - asystent w Zakładzie Biologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu.
- 19.06.1998 – do dzisiaj – adiunkt w Zakładzie Biologii Molekularnej Roślin przemianowanym w późniejszym okresie na Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu.

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,

Identyfikacja i charakterystyka roślinnych nukleaz degradujących zależnych od jonów wapnia

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

Leśniewicz K., Karłowski W.M., Pienkowska J.R., Krzywkowski P. and Poreba E. (2013) "The plant S1-like nuclease family has evolved a highly diverse range of catalytic capabilities". *Plant Cell Physiol.* doi: 10.1093/pcp/pct061

Leśniewicz K., Poręba E., Smolarkiewicz M., Wolff N., Stanisławski S. and Wojtaszek P. (2012) Plant plasma membrane-bound staphylococcal-like DNases as a novel class of eukaryotic nucleases. *BMC Plant Biol.* 12:195.

Leśniewicz K., Pienkowska J. and Poreba E. (2010) Characterization of nucleases involved in seedling development of cauliflower. *J Plant Physiol.* 167:1093-100.

Nuc K., Leśniewicz K., Nuc P. and Słomski R. (2008) Yellow lupine cyclophilin interacts with nucleic acids. *Protein Pept Lett.* 15:719-23.

Nawrot R., Leśniewicz K., Pienkowska J. and Goździcka-Józefiak A. (2007) A novel extracellular peroxidase and nucleases from a milky sap of *Chelidonium majus*. *Fitoterapia.* 78:496-501.

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Aktywność enzymów nukleolitycznych wykorzystywana jest zarówno przez organizmy prokariotyczne jak i eukariotyczne do realizacji wielu różnych procesów molekularnych. Specyficzność substratowa jest jednym z kryteriów, jakie przyjmuje się na potrzeby klasyfikacji enzymów tej klasy. Uważa się, że nukleazy uczestniczące w takich procesach jak rekombinacja lub naprawa DNA, rozpoznają określone motywy sekwencji lub struktury przestrzennej kwasów nukleinowych. W przeciwieństwie do nich, degradujące enzymy nukleolityczne nie wykazują specyficzności w stosunku do substratu. Ponadto, charakterystyczną właściwością genów kodujących nukleazy degradujące jest korelacja pomiędzy profilem ich ekspresji a procesami degradacyjnymi zachodzącymi podczas programowanej śmierci komórki (PCD). Ponieważ degradację jądrowego DNA obserwuje się zarówno w komórkach apoptycznych zwierząt jak i w tkankach roślinnych podlegających PCD, fakt ten według wielu badaczy świadczy o istnieniu wspólnych mechanizmów prowadzących do do programowanej śmierci komórek przedstawicieli obu tych podkrólestw (Reape i McCabe, 2008). Jednak badania ostatnich lat dostarczają coraz liczniejszych danych wskazujących na specyficzny charakter procesu PCD u roślin (van Doorn i wsp. 2008). Kontrolowana degradacja materiału genetycznego jest jednym z przykładów tej specyfiki, gdyż zarówno mechanizm tego procesu jak i jego konsekwencje biologiczne są różne u roślin i zwierząt. Przyjmuje się, że u zwierząt hydroliza genomowego DNA komórek apoptycznych ma na celu głównie ochronę organizmu przed stanami zapalnymi, jakie mogłyby być efektem przedostania się DNA do tkanek nie podlegających apoptozie (Nagata i wsp. 2003). Tymczasem u roślin degradacja DNA i RNA jest najprawdopodobniej związana głównie z redystrybucją składników budulcowych wchodzących w skład kwasów nukleinowych, takich jak azot i fosfor, których niedobór jest ważnym czynnikiem limitującym wzrost (Thomas i wsp. 2003; Guo i wsp. 2004).

W początkowym okresie badań, gdy nie dysponowano jeszcze wiedzą na temat sekwencji aminokwasowych roślinnych nukleaz degradujących, badacze koncentrowali się głównie na identyfikacji i charakterystyce aktywności tych enzymów w różnych tkankach. W wyniku tych badań zidentyfikowano aktywność enzymatyczną, którą przypisywano białkom definiowanym ogólnie jako rodzina nukleazy I (Johnson i Laskowski, 1970). Nukleazy te posiadały masę cząsteczkową w zakresie od 30 do 45 kDa i wykazywały aktywność enzymatyczną indukowaną

jonami Zn^{2+} oraz niskim pH. Aktywność ta prowadzi do wydajnej degradacji jednoniciowego DNA (ssDNA) oraz RNA, natomiast w znacznie słabszym stopniu skierowana jest przeciwko nieindenatuowanemu, dwuniciowemu DNA (dsDNA). Jednym z pierwszych poznanych członków tej rodziny była nukleaza Mung Bean, która obecnie jest szeroko stosowana w pracach biotechnologicznych jako enzym dostępny komercyjnie.

W późniejszym okresie, rozwój technik klonowania umożliwił identyfikację pierwszych genów kodujących nukleazy, których właściwości katalityczne odpowiadały enzymom z rodziny nukleazy I. Do pierwszych i najlepiej dotychczas poznanych białek tej klasy należy nukleaza ZEN1 z *Zinnia elegans*, która odpowiedzialna jest za degradację jądrowego DNA podczas różnicowania elementów trachealnych (Iti i Fukuda, 2002), nukleaza Ben I z jęczmienia, wydzielana przez komórki aleuronowe do bielma podczas kiełkowania nasion (Aoyagi i wsp. 1998) oraz nukleaza BFN1 z *Arabidopsis thaliana*, zaangażowana w proces starzenia (Perez-Amador i wsp. 2000). Ponieważ wszystkie te białka uczestniczą w procesach należących do różnych form PCD, powszechnie uważa się, że ich główną funkcją jest degradacja genomowego DNA. Analiza sekwencji aminokwasowej tych białek wykazała natomiast, że są one homologami dobrze poznanych grzybowych nukleaz S1 z *Aspergillus oryzae* i P1 z *Penicillium citrinum* (Desai i Shankar, 2003). Fakt, że nukleazy P1 i S1 mają takie same wymagania jonowe i substratowe jak ich poznane roślinne homologi, utrwalił przekonanie, że właściwości białek z rodziny nukleazy I odzwierciedlają ich związek filogenetyczny z enzymami grzybowymi (Sugiyama i wsp. 2000).

Jednak badania prowadzone nad aktywnością nukleolityczną pojawiającą się w częściach roślin podlegających PCD wykazały, że w organach tych oprócz nukleaz aktywnych w niskim pH i zależnych od jonów Zn^{2+} , obserwuje się również złożony profil bardzo aktywnych nukleaz aktywowanych jonami Ca^{2+} (Mittler i Lam, 1997; Ito i Fukuda, 2002; Domínguez i Cejudo, 2006). Co ciekawe nukleazy te, w przeciwieństwie do znanych enzymów z rodziny S1/P1 podlegały inhibicji pod wpływem jonów cynku i niskiego pH. Obserwacje te skłoniły badaczy do postawienia hipotezy, zgodnie z którą aktywacja poszczególnych nukleaz jest ściśle związana ze stanem fizjologicznym ich środowiska komórkowego. Wiadomo bowiem, że w jądrze i cytoplazmie młodych oraz dojrziałych komórek wartość pH utrzymuje się na neutralnym poziomie. W środowisku tym utrzymuje się również bardzo niskie stężenie jonów Ca^{2+} i Zn^{2+} . Natomiast środowisko wakuoli i apoplastu charakteryzuje się niższym poziomem pH (ok. 5,5) (Martin i wsp. 1982). Ponadto, ponieważ wakuola bierze udział w gromadzeniu metali ciężkich, stężenie jonów Zn^{2+} w jej wnętrzu przekracza wartości typowe dla cytoplazmy. Z tego względu często zakłada się, że nukleazy zależne od Ca^{2+} przenoszone są do jądra na wczesnym etapie PCD, gdzie w neutralnym

pH mogą one inicjować fragmentację jądrowego DNA. Natomiast w końcowej fazie PCD, pęknięcie tonoplastu uwalnia zawartość wakuoli, prowadząc do zakwaszenia cytoplazmy oraz do wzrostu stężenia jonów Zn^{2+} (Hara-Nishimura i Hatsugai, 2011). Przyjmuje się, że w tych warunkach aktywacji ulegają kwaśne nukleazy zależne od jonów cynku, które efektywnie kontynuują dalszą degradację DNA komórkowego (Sugiyama i wsp. 2000).

Pomimo, że powyższy model może odnosić się tylko do niektórych przypadków PCD, to stanowi on dobry przykład obrazujący zależność pomiędzy wymaganiami katalitycznymi danej nukleazy a jej rolą w mechanizmie degradacji DNA. Jednak ważną przeszkodą na drodze do poznania funkcji poszczególnych nukleaz zależnych od Ca^{2+} stanowił brak informacji o ich sekwencjach aminokwasowych. Z tego względu główny wysiłek moich prac wykonanych w Zakładzie Biologii Molekularnej i Komórkowej koncentrował się na identyfikacji i charakterystyce enzymów tej klasy. Punktem wyjścia dla moich poszukiwań były eksperymenty, których celem było dokonanie całościowego przeglądu różnych, roślinnych aktywności nukleolitycznych. W efekcie tych prac zidentyfikowaliśmy aktywność 14 deoksyrybonukleaz ulegających ekspresji w nasionach oraz w różnych organach kalafiora na etapie siewki a także dojrzalej rośliny (Leśniewicz i wsp. 2010). Poznanie wymagań substratowych, jonowych oraz pH, warunkujących aktywność enzymatyczną tych białek, pozwoliło nam na ich zaszeregowanie do kilku, różnych grup katalitycznych. Oprócz 4 enzymów zależnych od Zn^{2+} , wykazujących aktywność typową dla nukleazy I, zidentyfikowaliśmy również pięć nukleaz zależnych od Ca^{2+} oraz trzy nukleazy aktywowane przez Ca^{2+}/Mg^{2+} . Ustaliliśmy również, że niektóre z tych nukleaz ulegają ekspresji w różnych częściach roślin i na różnych etapach rozwoju, podczas gdy inne związane były z rozwojem tylko niektórych organów. Zaobserwowaliśmy również, że ekspresja trzech nukleaz indukowana jest stresem suszy i nadtlenkiem wodoru. Najbardziej złożony wzór aktywności DNazowej zidentyfikowaliśmy w tych częściach roślin w których następowały intensywne procesy redystrybucji składników budulcowych, czyli w liścieniach i starzejących się liściach. Wyniki te skłoniły nas do przypuszczeń, że wysoka różnorodność enzymów odpowiedzialnych za hydrolizę DNA odzwierciedla złożoność mechanizmów molekularnych, które zaangażowane są w degradację materiału genetycznego w różnych tkankach roślin.

Ponieważ sekwencje aminokwasowe roślinnych nukleaz zależnych od jonów wapnia pozostawały wciąż nieznane a uzyskane przez nas wyniki wskazywały, że w procesach rozwojowych pełnią one równie ważną rolę jak nukleazy zależne od jonów cynku, w dalszej części moich badań skupiłem się na identyfikacji kodujących je genów. W tym celu dokonałem przeglądu białkowych baz danych *Arabidopsis thaliana*, koncentrując się na identyfikacji białek

zawierających potencjalne domeny nukleolityczne. Moją uwagę zwróciły dwa białka posiadające konserwatywny motyw wykazujący homologię do domeny katalitycznej obecnej u stosunkowo dobrze scharakteryzowanych nukleaz bakteryjnych z rodziny S_{Nc} (ang. *Staphylococcus aureus* nuclease) (Tang i wsp. 2008). W okresie tym, dane literaturowe dotyczące roślinnych homologów nukleaz S_{Nc} ograniczały się do jednej pracy typu „short sequence-paper” (Isono i wsp. 2000), której autorzy wykazali, że jedno z dwóch białek tej rodziny obecnych u *A.thaliana*, nazwane CAN (At3g56170), po nadekspresji w bakteriach wykazuje aktywność DNazową zależną od Ca²⁺. W celu dokonania dokładnej analizy molekularnej i funkcjonalnej obu białek tej rodziny, nazwanych przeze mnie CAN1 (At3g56170) i CAN2 (At2g40410), sklonowałem kodujące je sekwencje cDNA oraz poddałem je nadekspresji w protoplastach. Uzyskane w ten sposób białka rekombinowane poddaliśmy analizie, która wykazała, że w neutralnym pH oraz w obecności Ca²⁺, wykazują one właściwości nukleolityczne w stosunku do ssDNA, dsDNA jak również do RNA (Leśniewicz i wsp. 2012). Aktywność ta blokowana jest w warunkach niskiego pH a także w obecności jonów Zn²⁺. Ustaliliśmy ponadto, że interesującą właściwością domeny S_{Nc} nukleaz CAN jest obecność w jej obszarze dodatkowego motywu posiadającego homologię do domeny, która u niektórych syntetaz tRNA wiąże antykodonową pętlę bakteryjnych cząsteczek tRNA. Chociaż obie te domeny mają pochodzenie bakteryjne to nie występują one razem w tego typu aranżacji u żadnych innych poznanych dotychczas białek prokariotycznych oraz eukariotycznych. Ponieważ usunięcie domeny potencjalnie wiążącej tRNA ograniczało, lecz nie eliminowało aktywności nukleolitycznej enzymu, przypuszczamy, że wzmacnia ona wydajność katalityczną nukleaz CAN.

Wykonana przez nas wszechstronna analiza dostępnych wyników mikromacierzowych (Hruz i wsp. 2008) oraz doświadczenia identyfikujące aktywność endogennych form obu nukleaz wykazały, że białko CAN1 podlega specyficznej ekspresji podczas dwóch procesów rozwojowych prowadzących do kontrolowanej śmierci komórek - ksylogenezy i starzenia. Ponadto, wzrost poziomu transkrypcji genu kodującego CAN1 stanowi reakcję na atak patogenów wirusowych i bakteryjnych. Natomiast białko CAN2 w tkankach roślin podlega ekspresji na zasadniczo niezmiennym poziomie.

Szczególnie interesujących informacji dostarczyła nam analiza lokalizacji komórkowej obu nukleaz CAN, gdyż wykazała ona, że oba te białka w wyniku mirystylacji i palmitylacji zachodzącej na ich aminowych końcach podlegają zakotwiczeniu w zewnętrznej błonie komórkowej. Nukleazy, które badane były dotychczas identyfikowano w przedziałach komórkowych zawierających kwasy nukleinowe, takich jak jądro oraz plastydy i mitochondria, lub w organelach, w których są one przechowywane przed ostatecznym wykorzystaniem, np. w wakuoli lub w

lizosomach. Zgodnie z dotychczasową wiedzą, białka CAN1 i CAN2 są jedynymi poznanymi nukleazami roślinnymi związanymi z błoną komórkową. Oprócz nich, stosunkowo dobrze poznane zostały nukleazy błonowe, obecne w bakteriach należących do rodzaju *Mycoplasma* sp. (Schmidt i wsp. 2007; Li i wsp. 2010). Ponieważ bakterie te są pozbawione enzymów umożliwiających syntezę nukleotydów, źródłem tych składników są dla nich produkty degradacji kwasów nukleinowych zasiedlanego przez nie gospodarza. W celu ich pozyskania bakterie te wykorzystują system transporterów ABC, który obejmuje między innymi nukleazy połączone z błoną komórkową. Ponieważ sekwencje analizowanych przez nas roślinnych nukleaz CAN także zawierają motyw aminokwasowy homologiczny do niektórych składników transporterów ABC, przypuszczamy, że komórki roślinne wykorzystują dodatkowy, niezidentyfikowany dotychczas mechanizm, który odpowiedzialny jest za degradację kwasów nukleinowych oraz międzykomórkowy transport produktów tej degradacji.

Chociaż charakterystyka obu białek CAN w znacznym stopniu przyczyniła się do poznania neutralnych, roślinnych nukleaz zależnych od Ca^{2+} , to nie wyjaśnia ona do końca pochodzenia wszystkich aktywności tego typu, jakie pojawiają się w tkankach roślinnych podlegających PCD. Z tego względu poszukiwania enzymów należących do tej klasy prowadziłem również wśród innych układów roślinnych. W wyniku współpracy z Zakładem Wirusologii Molekularnej Uniwersytetu im. A. Mickiewicza, w soku mlecznym *Chelidonium majus* zidentyfikowaliśmy wapniowo-zależną nukleazę sekrecyjną, której niska masa cząsteczkowa (20kDa) sugeruje, że należy ona do rodziny innej niż znane nukleazy SNc czy S1/P1 (Nawrot i wsp. 2007). Ponadto, ponieważ niektóre dane literaturowe sugerowały, że wapniowo-zależną aktywność nukleolityczną mogą również wykazywać niektóre prokariotyczne i eukariotyczne cyklofiliny zaangażowane w procesy lityczne (Montague i wsp. 1994), we współpracy z Katedrą Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Nauk Przyrodniczych w Poznaniu analizowaliśmy aktywność rekombinowanej cyklofiliny z Łubinu żółtego. Chociaż wyniki tych badań nie wykazały, by białko to mogło hydrolizować kwasy nukleinowe, to ustaliliśmy, że wykazuje ono zdolność do wiązania jedno- jak i dwuniciowego DNA a także RNA (Nuc i wsp. 2008).

Największy postęp w naszych poszukiwaniach nukleaz aktywowanych jonami Ca^{2+} był wynikiem badań prowadzonych nad roślinnymi białkami z rodziny S1/P1. Autorzy prac, w których zaprezentowano charakterystykę kilku białek tej rodziny, zwracali uwagę, że wykazują one aktywność katalityczną analogiczną do ich grzybowych ortologów. Uznałem jednak, że na bazie tych danych nie można formułować ogólnych wniosków dotyczących wymagań katalitycznych wszystkich roślinnych nukleaz S1/P1, gdyż opublikowane wyniki odnoszą się tylko do

pojedynczych członków tej rodziny, izolowanych z różnych gatunków. Z drugiej strony należy pamiętać, że u tych gatunków dla których poznane zostały pełne sekwencje gnomowe, geny kodujące nukleazy S1/P1 występują w postaci rodzin wielogenowych. Ponadto, należy mieć na uwadze, że metody stosowane przez różne laboratoria do identyfikacji aktywności nukleolitycznej, różnią się znacznie między sobą, co w konsekwencji może prowadzić do mylnych uogólnień. Z tego względu, aby określić wymagania katalityczne roślinnych nukleaz S1/P1 postanowiłem zbadać aktywność wszystkich pięciu członków tej rodziny kodowanych przez genom *Arabidopsis*. Uznałem bowiem, że jednoczesna analiza wszystkich paralogów tej rodziny stanowić będzie lepszą podstawę do dalszych wnioskowań niż porównywanie pojedynczych ortologów z różnych gatunków. W efekcie, wykonane przez nas badania wykazały, że poszczególne nukleazy S1/P1 reprezentują zaskakująco dużą różnorodność aktywności nukleolitycznych (Lesniewicz i wsp. 2013). W rzeczywistości tylko dwa z pięciu enzymów tej rodziny posiadają aktywność katalityczną typową dla białek definiowanych jako rodzina nukleazy I. Oprócz obu tych, Zn^{2+} -zależnych nukleaz (ENDO3 i EDNO5), rodzina ta obejmuje również nukleazy, których aktywność indukowana jest jonami Ca^{2+} lub Mn^{2+} (ENDO1 i ENDO4), a także nukleazę aktywowaną równoczesnym podaniem jonów Ca^{2+} i Zn^{2+} (ENDO2). Ponieważ nukleazy te różnią się także wymaganiami substratowymi oraz pH, sugeruje to, że są one zaangażowane w procesy zachodzące w tkankach, ewentualnie w przedziałach komórkowych, charakteryzujących się znaczną różnorodnością warunków fizjologicznych.

Aby zidentyfikować procesy, w które zaangażowane są poszczególne nukleazy tej rodziny dokonałem przeglądu dostępnych baz danych mikromacierzowych (Hruz i wsp. 2008). Generalnie, wyniki te ujawniły, że ekspresja poszczególnych członków tej rodziny jest wysoce specyficzna w stosunku do określonych tkanek, ewentualnie do różnych faz ich rozwoju. Fakty te sugerują, że ewolucja roślinnych nukleaz z rodziny S1/P1 doprowadziła do zwiększenia różnorodności katalitycznej tych białek, a także do zróżnicowania ich specyficzności tkankowej. Analiza filogenetyczna wszystkich roślinnych nukleaz S1/P1, wykonana w oparciu o dostępne dane genomowe głównych taksonów roślinnych, także potwierdziła te obserwacje (Lesniewicz i wsp. 2013).

Grzybowa nukleaza P1 uważana jest za modelowy enzym, którego centrum katalityczne prowadzi hydrolizę wiązań fosfodwuestrowych w oparciu o kompleks obejmujący trzy jony Zn^{2+} . Zgodnie z naszą wiedzą, mechanizm tej reakcji badany był dotychczas wyłącznie z uwzględnieniem udziału jonów cynku (Romier i wsp. 1998, Liao i wsp. 2010). Jednak wyniki naszych badań jednoznacznie wykazały, że centra katalityczne niektórych roślinnych homologów białka P1,

współpracują z jonami Ca^{2+} lub Mn^{2+} , podczas gdy jony Zn^{2+} są czynnikiem blokującym ich aktywność. Odkrycie tej różnorodności otwiera nowe perspektywy dla badań, których celem będzie poznanie mechanizmu wykorzystywanego przez ten typ enzymów do reakcji katalitycznej.

Podsumowując, badania które wykonałem w Zakładzie Biologii Molekularnej i Komórkowej w znaczący sposób poszerzyły naszą wiedzę na temat roślinnych, degradujących nukleaz zależnych od jonów Ca^{2+} . Wykazałem, że u roślin w degradacji kwasów nukleinowych uczestniczą nukleazy wapniowo-zależne należące do dwóch odrębnych rodzin filogenetycznych. Jedna z nich obejmuje białka, których domena katalityczna wykazuje podobieństwo do bakteryjnych nukleaz S_{Nc}. Nietypowa lokalizacja komórkowa tych białek wskazuje na istnienie u roślin nowego, niescharakteryzowanego dotychczas mechanizmu degradacji DNA i RNA. Druga grupa degradujących nukleaz zależnych od Ca^{2+} należy natomiast do rodziny charakteryzującej się homologią do grzybowych nukleaz typu S1/P1. Fakt, że poszczególne enzymy tej rodziny, wykazują tak dużą różnorodność właściwości katalitycznych pokazuje, że mogą one być zaangażowane w procesach charakteryzujących się znacznie większą różnorodnością warunków fizjologicznych, niż przypuszczano dotychczas. Wyniki te rzucają również nowe światło na stosowany dotychczas podział roślinnych nukleaz, który oparty był na mylnym założeniu, że właściwości katalityczne poszczególnych nukleaz odzwierciedlają ich pokrewieństwo filogenetyczne.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

Drugi nurt badań, w którym uczestniczyłem w okresie po uzyskaniu stopnia doktora, dotyczył analizy protoonkogenu cMyc oraz Mono-ADP-rybozylotransferazy PARP10. Badania te realizowałem we współpracy z niemieckim ośrodkiem naukowym - Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Klinikum, RWTH, w Aachen.

Protoonkogen c-Myc jest czynnikiem transkrypcyjnym kontrolującym różne aspekty biologii komórki, takie jak proliferacja, różnicowanie i apoptoza. Zakłócenia w poziomie ekspresji c-Myc obserwuje się w większości przypadków raka (Lüscher i Vervoorts, 2012). Dane, które dostępne były w okresie gdy podejmowałem współpracę z ośrodkiem niemieckim sugerowały, że białko cMyc może wykorzystywać różne mechanizmy za pomocą których wpływa ono na ekspresję genów docelowych (Lüscher i wsp. 2001). Jednak wciąż nie było wiadomo, jakie dokładnie czynniki decydują o czasie i miejscu aktywacji białka cMyc. W celu rozwiązania tego problemu, podjęliśmy starania mające na celu identyfikację białek oddziałujących z cMyc. W ich efekcie oczyszczono kompleks, w którym cMyc związany był z nieznanym dotychczas białkiem o wielkości 150 kDa, oznaczonym jako PARP10. Jak ustaliliśmy, białko to posiada domenę homologiczną do polimeraz

poli(ADP-rybozy). Analiza molekularna wykazała natomiast, że domena ta ma zdolność do ADP-rybozylacji własnej sekwencji aminokwasowej, jak również sekwencji histonów rdzeniowych.

Analiza funkcji białka PARP10 pokazała, że wpływa ono na zablokowanie procesu transformacji nowotworowej fibroblastów embrionalnych szczura, w której pośredniczy cMyc oraz E1A. Funkcja ta jest niezależna od aktywności ADP-rybozylotransferazy lecz na jej realizację ma wpływ obecności funkcjonalnej domeny NES (ang. nuclear export sequence). Podsumowując, nasze badania doprowadziły do identyfikacji nowego enzymu PARP, zaangażowanego w kontrolę proliferacji komórek (Yu i wsp. 2005).

Podjęliśmy również badania nad budową mysiego locus kodującego białko PARP10. Zauważyliśmy, że sekwencja z 3' końca genu *Parp10* pokrywa się z 5' końcową sekwencją genu *plektyny 1*, w orientacji głowa-do-ogona. Szczegółowa analiza tego obszaru wykazała, że dwa ostatnie egzony genu *Parp10* (egzon 10 i 11), wykorzystywane są również jako 5' końcowy fragment genu *plektyny 1*. Chociaż egzony te obejmują sekwencję kodującą genu *Parp10*, to jako element genu *plektyny 1* stanowią one sekwencję niekodującą, z powodu braku na ich obszarze kodonu startowego. Odkrycie to oznacza, że jeden z promotorów genu *plektyny 1* zlokalizowany jest w bardzo nietypowym obszarze, bo w obrębie 9 intronu genu *Parp10* (Lesniewicz i wsp. 2005).

ADP-rybozylotransferazy (ART) oraz polimerazy poli-ADP-rybozy (PARP) katalizują odpowiednio mono- i poli-ADP-rybozylację białek. Mechanizm tych reakcji uzależniony jest od glutaminianu, zlokalizowanego w konserwatywnej części centrum katalitycznego enzymu (Han i Tainer, 2002). Zauważyliśmy jednak, że PARP10, w przeciwieństwie do dobrze poznanego białka PARP1 nie zawiera tego glutaminianu w centrum katalitycznym, a także, że białko to wykazuje aktywność transferazy a nie polimerazy. Pomimo tych różnic PARP10 również modyfikuje kwaśne aminokwasy białek docelowych. Analiza tego problemu doprowadziła nas do odkrycia alternatywnego mechanizmu katalitycznego białka PARP10. Mechanizm ten wyjaśnia, dlaczego nowo odkryty enzym PARP10 nie może funkcjonować jako polimeraza. Odkrycie to pomogło również wyjaśnić różne funkcje biologiczne mono- i poli-ADP-rybozylacji białek w komórkach zwierząt (Kleine i wsp. 2008).

Bibliografia

- Aoyagi S., Sugiyama M. and Fukuda H. (1998) BEN1 and ZEN1 cDNAs encoding S1-type DNases that are associated with programmed cell death in plants. *FEBS Lett.*, 429: 134-8.
- Desai, N.A. and Shankar, V. (2003) Single-strand-specific nucleases. *FEMS Microbiol Rev.* 26: 457-91.
- Domínguez F. and Cejudo FJ. (2006). Identification of a nuclear-localized nuclease from wheat cells undergoing programmed cell death that is able to trigger DNA fragmentation and apoptotic morphology on nuclei from human cells. *Biochem J.*, 397:529-36

- Guo Y., Cai Z., Gan S. (2004) Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence. *Plant Cell Environ*, 27:521 – 549.
- Han S. and Tainer J.A. (2002) The ARTT motif and a unified structural understanding of substrate recognition in ADP-ribosylating bacterial toxins and eukaryotic ADP-ribosyltransferases. *Int J Med Microbiol.*, 291:523-9.
- Hruz T., Laule O., Szabo G., Wessendorp F., Bleuler S., Oertle L., Widmayer P., Gruissem W. and Zimmermann P. (2008) Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv Bioinformatics.*, 420747.
- Isono K., Satoh K. and Kobayashi H. (2000) Molecular cloning of a cDNA encoding a novel Ca²⁺ – dependent nuclease of Arabidopsis that is similar to staphylococcal nuclease. *Biochim Biophys Acta*, 1491:267 – 72.
- Ito J. and Fukuda H. (2002) ZEN1 is a key enzyme in the degradation of nuclear DNA during programmed cell death of tracheary elements. *Plant Cell*. 14: 3201-11.
- Johnson P.H. and Laskowski M. Sr. (1970) Mung bean nuclease I. II. Resistance of double stranded deoxyribonucleic acid and susceptibility of regions rich in adenosine and thymidine to enzymatic hydrolysis. *J Biol Chem.*, 245: 891-8.
- Lesniewicz K., Karłowski W.M., Pienkowska J.R., Krzywkowski P., Poreba E. (2013) The Plant S1-Like Nuclease Family Has Evolved A Highly Diverse Range Of Catalytic Capabilities. *Plant Cell Physiol*. doi: 10.1093/pcp/pct061.
- Leśniewicz K., Pieńkowska J. and Poreba E. (2010) Characterization of nucleases involved in seedling development of cauliflower. *J Plant Physiol.*, 167:1093-100.
- Leśniewicz K., Poręba E., Smolarkiewicz M., Wolff N., Stanisławski S., Wojtaszek P. (2012) Plant plasma membrane-bound staphylococcal-like DNases as a novel class of eukaryotic nucleases. *BMC Plant Biol*. 12:195.
- Li L., Krishnan M., Baseman J.B. and Kannan T.R. (2010) Molecular cloning, expression, and characterization of a Ca²⁺-dependent, membrane-associated nuclease of *Mycoplasma genitalium*. *J Bacteriol*, 192:4876– 84.
- Liao R.Z., Yu J.G. and Himio F. (2010) Phosphate mono- and diesterase activities of the trinuclear zinc enzyme nuclease P1--insights from quantum chemical calculations. *Inorg Chem*. 49: 6883-8.
- Lüscher B. and Vervoorts J. (2012) Regulation of gene transcription by the oncoprotein MYC. *Gene.*, 494:145-160.
- Lüscher B. (2001) Function and regulation of the transcription factors of the Myc/Max/Mad network. *Gene.*, 277:1-14..
- Martin J.B., Bligny R., Rebeille F., Douce R., Leguay J.J., Mathieu Y. and Guern J.A.P. (1982) Nuclear Magnetic Resonance Study of Intracellular pH of Plant Cells Cultivated in Liquid Medium. *Plant Physiol.*, 70:1156-61.
- Mittler R. and Lam E. (1997). Characterization of nuclease activities and DNA fragmentation induced upon hypersensitive response cell death and mechanical stress. *Plant Mol. Biol*. 34: 209–221.
- Montague J. W., Gaido M. L., Frye C. and Cidlowski J. A. (1994) A calcium-dependent nuclease from apoptotic rat thymocytes is homologous with cyclophilin. *J. Biol. Chem*. 269:18877-18880.
- Nagata S., Nagase H., Kawane K., Mukae N. and Fukuyama H (2003) Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ*, 10:108 – 16.
- Pérez-Amador M.A., Abler M.L., De Rocher E.J., Thompson D.M., van Hoof A., LeBrasseur N.D., Lers A. and Green, P.J. (2000) Identification of BFN1, a bifunctional nuclease induced during leaf and stem senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 122: 169-80.

- Reape T.J. and McCabe P.F. (2008) Apoptotic-like programmed cell death in plants. *New Phytol.* 180:13-26
- Romier C., Dominguez R., Lahm A., Dahl O. and Suck D. (1998) Recognition of single-stranded DNA by nuclease P1: high resolution crystal structures of complexes with substrate analogs. *Proteins.* 32: 414-24.
- Schmidt J.A., Browning G.F. and Markham P.F. (2007) *Mycoplasma hyopneumoniae* mhp379 is a Ca^{2+} – dependent, sugar-nonspecific exonuclease exposed on the cell surface. *J Bacteriol.* 189:3414 – 24.
- Sugiyama M., Ito J., Aoyagi S. and Fukuda H. (2000) Endonucleases. *Plant Mol Biol.* 44: 387-97.
- Tang J., Zhou R., Shi X., Kang M., Wang H. and Chen H. (2008) Two thermostable nucleases coexisted in *Staphylococcus aureus*, evidence from mutagenesis and in vitro expression. *FEMS Microbiol Lett.* 284:176 – 83.
- Thomas H., Ougham H.J., Wagstaff C. and Stead A.D. (2003) Defining senescence and death. *J Exp Bot.* 54:1127 – 32.
- van Doorn W.G. (2011) Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. *J Exp Bot.* 62:4749-61.

Poznań 5 maja 2013 r.


dr Krzysztof Leśniewicz