

PROTEASOMALNA DEGRADACJA BIAŁEK KOMÓRKOWYCH

PROTEASOME-DEPENDENT DEGRADATION OF CELLULAR PROTEINS

Marcin BURY, Anna NIEMIERKO

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Centrum Biostruktury,
Akademia Medyczna w Warszawie

Streszczenie: Artykuł przedstawia podstawowe informacje dotyczące wewnątrzkomórkowej degradacji białek przez proteasomy z udziałem ubikwityny. Omówiono proces ubikwitynacji białek przeznaczonych do degradacji proteasomalnej oraz udział ubikwityny w procesach komórkowych niezwiązanych z proteolizą. Przedstawiono budowę proteasomów 20S, 26S i aktywatora PA700. Omówiono rolę immunoproteasomów w odpowiedzi immunologicznej oraz proteasomalną degradację białek niewyznaczonych łańcuchami ubikwityny. Przedstawiono zarys biogenezy proteasomów oraz możliwości zastosowania terapeutycznego inhibitorów proteasomów.

Słowa kluczowe: proteasom, immunoproteasom, ubikwityna, proteoliza, PA700, PA28, inhibitory proteasomów.

Summary: The article gives basic information on proteasome- and ubiquitin-dependent system of protein degradation. The ubiquitination process of proteins designated for proteasomal breakdown and ubiquitin involvement in extraproteasomal cellular events is discussed. The article explains the structure of 20S, 26S and PA700 complexes, the role of immunoproteasomes in the immune response and proteasomal proteolysis independent of ubiquitination. Moreover, it gives the outline of proteasomal biogenesis and possible clinical application of proteasome inhibitors.

Key words: proteasome, immunoproteasome, ubiquitin, proteolysis, PA700, PA28, proteasome inhibitors.

WSTĘP

Degradacja białek w komórce odbywa się z udziałem proteasomów, lizosomów i proteaz cytoplazmatycznych. Początkowo przypisywano główne znaczenie degradacji z udziałem proteaz zawartych w lizosomach i endosomach późnych. Obecnie wiadomo,

że proteoliza zależna od proteasomów i ubikwityny to u *Eukaryota* główny układ degradujący białka wewnątrzkomórkowe.

Proteasomy degradują białka, które z różnych powodów powinny być usunięte z komórki. Są to białka o nieprawidłowej konformacji wywołanej zaburzeniami translacji, mutacjami, uszkodzeniem przez wolne rodniki czy temperaturę [41]. Również białka regulacyjne, jak np. cykliny [28], enzymy, jak np. fruktozo-1,6-bisfosfataza [76], czy kalmomodulina [79], zostają zdegradowane po spełnieniu swej roli. Także większość peptydów prezentowanych przez cząsteczki MHC klasy I powstaje w wyniku proteosomalnej degradacji białek [46].

Przed proteolizą proteosomalną białka ulegają ubikwitynacji polegającej na przyłączeniu łańcuchów ubikwityny i są kierowane do proteasomów 26S, w których ulegają hydrolizie z uwolnieniem ubikwityny [36;65]. Zarówno proteasomy 20S, jak i 26S mogą także degradować białka, które nie zostały wyznakowane przez przyłączenie reszt ubikwityny [64].

UBIKWITYNA I JEJ UDZIAŁ W PROCESACH WENĄTRZKOMÓRKOWYCH

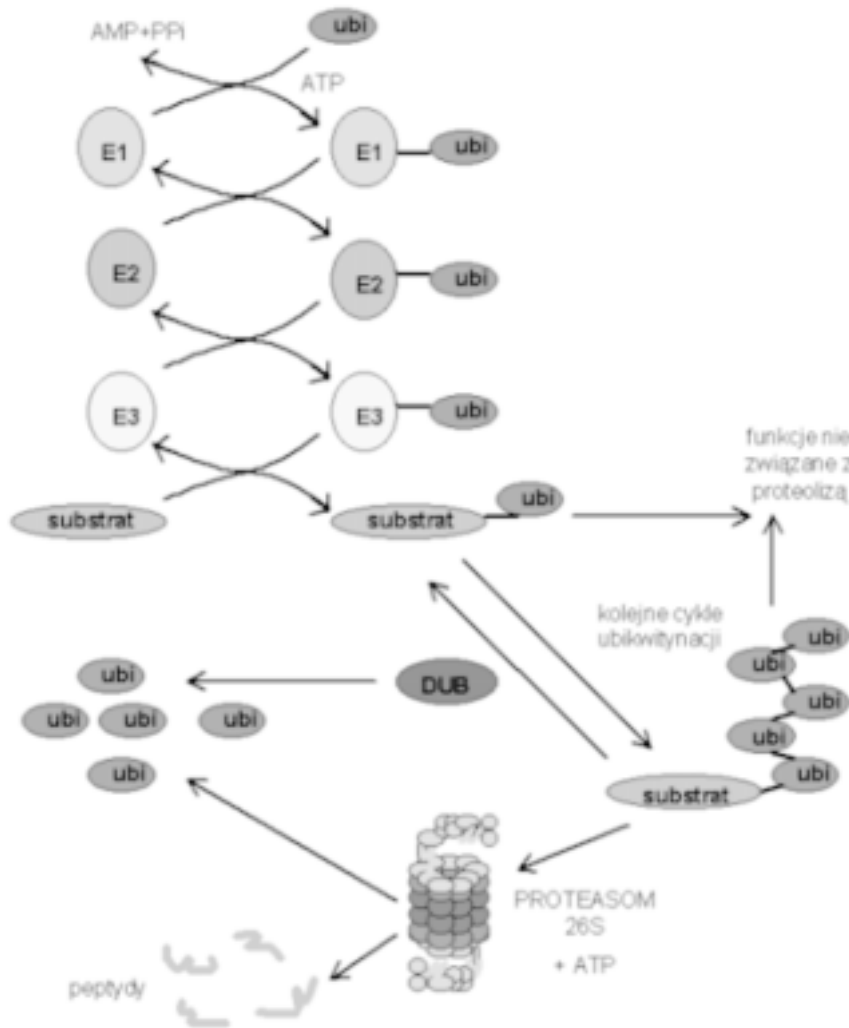
Za badania nad ubikwityną i jej rolą w komórce, A. Hershko, A. Ciechanover i I. Rose otrzymali w 2004 roku Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii.

Ubikwityna to 76-aminokwasowy polipeptyd występujący we wszystkich zbadanych dotychczas komórkach i tkankach organizmów eukariotycznych. Białko to ma wysoką międzygatunkową homologię sekwencyjną. Ubikwityna drożdży różni się od ludzkiej tylko 3 resztami aminokwasowymi. Ze względu na strukturę, oprócz termostabilności ubikwitynę cechuje także odporność na proteolizę i zmiany pH [92].

Rozpoznanie substratu przez proteasom wymaga jego poliubikwitynacji poprzez przyłączanie cząsteczki ubikwityny do Lys-48 ostatniej reszty ubikwitynowej w łańcuchu [80]. Łańcuchy poliubikwityny powstają na skutek tworzenia wiązania izopeptydowego pomiędzy karboksy-końcową resztą glicyny w cząsteczce ubikwityny a końcową grupą aminową lub grupą ε-aminową w wewnętrznej reszcie lizyny białka docelowego. W reakcji transestryfikacji zależnej od ATP ubikwityna ulega aktywacji i przyłączeniu do grupy –SH reszty cysteinowej enzymu aktywującego (E1, UBA, *ubiquitin activating*) (ryc. 1). Następnie cząsteczka ubikwityny jest przenoszona na resztę cysteinową enzymu koniugującego (E2, UBC, *ubiquitin conjugating*). E2 samodzielnie lub przy pomocy enzymu zwanego ligazą ubikwitynową (E3, UBL, *ubiquitin ligase*) przenosi resztę ubikwityny na substrat. Niektóre enzymy E3, np. Rsp5, mogą modyfikować substraty poprzez przyłączenie pojedynczych cząsteczek ubikwityny, jak i jej łańcuchów [72]. Pewne substraty wymagają do swej poliubikwitynacji współdziałania czynnika elongacji łańcucha (E4) [48].

Dotychczas w komórkach ssaków opisano tylko jeden E1, około 20 E2 i bardzo wiele specyficznych substratowo E3. Taki układ pozwala na wybiórczość działania kaskady enzymatycznej związanej z ubikwitynacją [1,33].

Niekiedy białka przeznaczone do degradacji proteosomalnej, zamiast łańcuchami ubikwityny, są znakowane przez związanie z białkami adaptorowymi, np. antyzymem [13].



RYCINA 1. Schemat przedstawiający szlak proteolizy zależnej od ubikwityny i proteasomów. Enzymy E3 rozpoznają substraty i pośredniczą w przeniesieniu reszt ubikwityny (ubi) z enzymów E2, które z kolei otrzymują je poprzez transfer z E1. Ubikwitynowane substraty ulegają degradacji przez proteasomy 26S z udziałem ATP. Proteasomy uwalniają ubikwitynę i degradują substraty do krótkich peptydów. Mono- i poliubikwitynowane substraty mogą ulec deubikwitynowacji dzięki działaniu enzymów deubikwitynujących (DUB). DUB mogą także rozkładać wolne, niesprężone z substratem łańcuchy ubikwityny (wg Wójcika [92], zmodyfikowane)

Proces ubikwitynowania jest regulowany przez enzymy deubikwitynujące (DUB). Enzymy te mają zdolność hydrolizy łańcuchów ubikwityny tworzonych przez kaskadę E1-E2-E3 zarówno uwolnionych z substratów rozłożonych przez proteasomy, jak i związanych z nieodegradowanymi białkami. W tym drugim przypadku, DUB mogą chronić substrat przed hydrolizą proteasomalną [92]. DUB mogą też skracać łańcuchy poliubikwitynowe połączone z cząsteczkami substratu [89].

UDZIAŁ UBIKWITYNY W PROCESACH NIEZWIĄZANYCH Z PROTEOLIZĄ PROTEASOMALNĄ

Ubikwityna pełni w komórce również inne funkcje, niezwiązane ze szlakiem proteasomalnym. Łańcuchy poliubikwityny połączone poprzez Lys-63 lub Lys-48 biorą udział w mechanizmach naprawy uszkodzeń DNA i w endocytozie [66]. Znakowanie białek poprzez przyłączanie pojedynczych reszt ubikwityny to proces odgrywający rolę w regulacji aktywności jądrowych czynników transkrypcyjnych [60] oraz kierowaniu białek z błony komórkowej do kompartmentu endosomalnego [38] lub sieci *trans* aparatu Golgiego u drożdży [56]. Ubikwityna jest także związana z przemieszczaniem białek z endosomów do ciałek wielopęcherzykowych [43]. Typowym przykładem błonowych białek, które przed internalizacją ulegają ubikwitynacji, są związane z białkami G receptory Ste2 i Ste3 drożdży [71].

PROTEASOMY

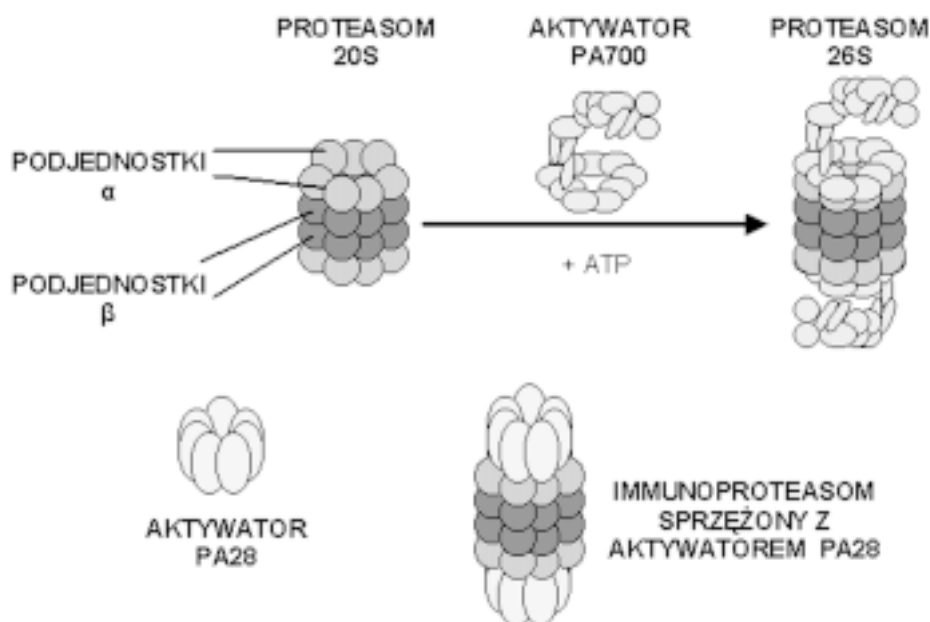
Proteasomy oczyszczono po raz pierwszy w 1980 roku z wołowych przysadek mózgowych [91]. Są to złożone kompleksy białkowe o stałej sedymentacji 20S. Ze względu na to, iż proteasomy, w obrębie jednego kompleksu, wykazują różne aktywności enzymatyczne, początkowo nazwano je wielokatalitycznymi kompleksami proteinaz MPC (*multicatalytic proteinase complex*) [91]. Nazwę proteasom zaproponowano w 1988 roku [6].

Proteasomy eukariotyczne występują w 2 podstawowych formach: 20S i 26S. Proteasom 26S powstaje poprzez przyłączenie kompleksów aktywatorowych PA700 do proteasomu 20S. Proteasomy 20S nie są zdolne do proteolizy ubikwitynowanych białek komórkowych [18], jednak mogą, nawet efektywniej niż proteasomy 26S, hydrolizować niektóre niesprężone z ubikwityną białka, takie jak p21-GFP czy α -synukleina-GFP [54]. Proteasomy 26S mają zdolność hydrolizy białek połączonych z łańcuchami ubikwityny.

Interferon γ indukuje w komórkach syntezę szczególnych podjednostek proteasomalnych (tzw. immunopodjednostek) oraz podjednostek aktywatora PA28 [70]. Proteasomy zawierające immunopodjednostki i połączone z kompleksami aktywatora PA28 to tzw. immunoproteasomy biorące udział w generowaniu peptydów prezentowanych limfocytom T przez cząsteczki MHC klasy I.

Budowa proteasomów 20S

Proteasomy 20S są zbudowane z 4 pierścieni. Każdy pierścień składa się z 7 różnych podjednostek, których masa cząsteczkowa waha się pomiędzy 20 i 35 kDa [31] (ryc. 2). Zewnętrzne pierścienie są zbudowane z 7 podjednostek α (α 1- α 7) każdy, a dwa pierścienie wewnętrzne – z 7 różnych podjednostek β (β 1- β 7). Rolę w utrzymywaniu połączenia pomiędzy pierścieniami β odgrywa podjednostka β 7. U drożdży, oddziaływanie pomiędzy karboksy-końcowym fragmentem tej podjednostki a podjednostkami β 1



RYCINA 2. Schemat budowy proteasomu. Proteasom 20S jest złożony z 2 zewnętrznych pierścieni α i 2 wewnętrznych pierścieni β. Może połączyć się on z aktywatorem PA700, tworząc proteasom 26S. Immunoproteasomy występują w kompleksach z aktywatorem PA28

i β2 z przeciwległego pierścienia β bierze udział w stabilizacji proteasomu 20S [68]. Amino-końcowe fragmenty łańcuchów podjednostek α zamykają kanał wiodący do wnętrza proteasomu [30]. U *Thermoplasma* zwięzają one ten kanał, natomiast u drożdży i kręgowców prawie całkowicie go zamykają. Do otwarcia kanału i aktywacji proteasomu może dojść wskutek przyłączenia aktywatorów (PA700, PA28) lub chemicznie, np. pod wpływem SDS [31].

Wszystkie podjednostki α i większość β są nieaktywne enzymatycznie. Jedynie podjednostki β1, β2 i β5 mają centra aktywne [3]. Różnią się one między sobą wrażliwością na inhibitory i pH optymalnym dla swej aktywności. W badaniach *in vitro* wyróżniono 3 podstawowe aktywności proteasomu 20S: chymotrypsynopodobną (odpowiada za nią podjednostka β5), trypsynopodobną (podjednostka β2) i hydrolizującą wiązania peptydyloglutamylowe (nazywana też aktywnością kaspazopodobną; podjednostka β1). Oprócz tego, wyróżnia się dodatkowo aktywności hydrolizujące wiązania peptydowe: rozgałęzionych aminokwasów (np. leucyny) i małych, obojętnych elektrycznie aminokwasów (np. glicyny). Są one związane z tymi samymi miejscami aktywnymi podjednostek β, co aktywności podstawowe [45,62]. Proteasom nie jest jednak zgrupowaniem niezależnych od siebie podjednostek, tylko funkcjonalną całością, w której na podjednostki katalityczne oddziałują podjednostki sąsiadujące [40]. U drożdży, karboksy-końcowy fragment podjednostki β7, tworzący kilka wiązań wodorowych z podjednostką β1 poprzez stabilizację centrum aktywnego podjednostki β1, jest konieczny dla aktywności kaspazopodobnej [68].

Jedynie podjednostka $\alpha 5$ proteasomu jest wykrywana jako wolne, niezwiązane z proteasomem białko zarówno w jądrze komórkowym, jak i cytoplazmie [42].

W proteasomalnych podjednostkach aktywnych enzymatycznie, nukleofilem jest grupa hydroksylowa N-końcowej reszty Thr1 [55], a akceptorem protonu w czasie aktywacji grupy hydroksylowej jest Lys33 [4]. Na modelu *Thermoplasma acidophilum* wykazano, iż delecja reszty Thr1 lub jej zamiana na alaninę prowadzi do inaktywacji enzymatycznej i upośledzenia proteolizy [19]. Proteasomy zalicza się do nowej grupy proteaz treoninowych.

Proteasomy 26S

Proteasom 26S powstaje poprzez połączenie proteasomu 20S z kompleksem aktywatora PA700 (*proteasome activator*) [17] (ryc. 2). Przyłączenie aktywatora otwiera kanał proteasomu 20S zamknięty amino-końcowymi częściami łańcuchów podjednostek α . Aktywator PA700 składa się z podstawy (*base*) i wieczka (*lid*). Podstawa jest połączona z podjednostkami α proteasomu 20S.

W skład podstawy aktywatora PA700 wchodzi pierścień 6 ATPaz nazywanych Rpt (Rpt1-Rpt6) i 3 podjednostki niemające aktywności ATPaz (Rpn1, Rpn2, Rpn10) [14;26]. U drożdży z podstawą PA700 dodatkowo łączy się podjednostka Ubp6/USP14 (*Ubiquitin Specific Proteases*; specyficzne proteazy ubikwityny) [34]. Proteasomy 20S nie wykazują aktywności ATP-azowej. Aktywność ta jest ściśle związana z aktywatorem PA700 [5], a ściślej – z jego podstawą. Wieczko PA700 jest zbudowane z niemających aktywności ATP-az podjednostek: Rpn3, Rpn5-Rpn9, Rpn11, Rpn12, UCH37 [27,53].

Podjednostki podstawy PA700 pełnią różnorodne funkcje. Podjednostki Rpt biorą udział w wiązaniu i rozwijaniu substratów białkowych [10]. Podjednostka Rpn10 wiąże zubikwitynowany substrat poprzez domenę UIM (*ubiquitin-interacting motif*) [21,51]. Dla wiązania przez proteasom ma znaczenie długość łańcucha ubikwityny połączonego z substratem (co najmniej 4 reszty ubikwityny). Rpt2 to podjednostka biorąca udział w otwarciu kanału proteasomu 20S zamkniętego amino-końcowymi częściami łańcuchów podjednostek α . Bierze ona także udział w przemieszczaniu substratu do komory proteasomu i uwalnianiu z niej produktów [49]. Podjednostki Rpt4 i Rpt6 są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania proteasomu 26S [73]. Rpn1 oddziałuje z dwoma białkami mającymi domeny zbliżone do ubikwityny (Ubl, *ubiquitin-like domains*), Rad23 i Dsk2, które wiążą zubikwitynowany substrat i nakierowują go na proteasom. Rad23 i Dsk2 wiążą się z łańcuchami ubikwityny poprzez tzw. domenę związaną ze szlakiem ubikwityny (UBA, *ubiquitin-pathway-associated*). Wykazano, że białka mające w swej strukturze domenę UBA (jak np. produkt genu *mud1+* drożdży) mają silne powinowactwo do łańcuchów poliubikwitynowych [88].

Jak już wspomniano, wieczko aktywatora PA700 jest złożone z podjednostek: Rpn3, Rpn5-Rpn9, Rpn11, Rpn12, UCH37 [27,53]. Białko enzymatyczne UCH37 (*Ubiquitin C-terminal Hydrolases*; C-końcowe hydrolazy ubikwityny) tworzy kompleks z podjednostką Rpn12. UCH37 jest integralnym składnikiem PA700 u ssaków i *Drosophila*, natomiast nie stwierdza się tej podjednostki u drożdży [53]. Białko UCH37 odcina reszty ubikwityny znajdujące się na wolnym końcu łańcucha. Przepuszcza się,

że enzym ten powoli skraca łańcuch ubikwityny, co może prowadzić do uwolnienia z proteasomu białka, którego hydroliza jest z jakichś powodów opóźniona [90].

Funkcją wieczka PA700 jest rozpoznanie i odszczepienie od substratu łańcucha reszt ubikwityny. Metaloproteaza Rpn11 oraz związane z kompleksem PA700 białka UCH37, Ubp6/USP14 (*Ubiquitin Specific Proteases*; specyficzne proteazy ubikwityny) i Ubp4 (*Ubiquitin isopeptidase*; izopeptydaza ubikwityny) mają aktywność izopeptydazy, dzięki której deubikwitynują substrat częściowo zagłębiony w kanale proteasomu [25;35]. Po uwolnieniu, łańcuch ubikwityny ulega rozkładowi na pojedyncze podjednostki, które mogą wziąć udział w ubikwitynacji kolejnej cząsteczki białka. Brak deubikwitynacji substratu związanego z proteasomem blokuje przemieszczanie się całości łańcucha białkowego do wnętrza proteasomu [85].

Podjednostki PA700 u ssaków, np. Rpn10, mogą występować w komórce w kilku formach, na skutek różnej potranskrypcyjnej obróbki mRNA [44].

Immunoproteasomy i ich udział w odpowiedzi immunologicznej

Interferon γ (IFN- γ) indukuje w komórkach syntezę podjednostek proteasomalnych (tzw. immunopodjednostek) oraz podjednostek aktywatora PA28 [70].

Immunopodjednostki to aktywne enzymatycznie β 1i, β 2i oraz β 5i, które ulegają wbudowaniu do nowo powstających proteasomów w miejsce 3 aktywnych enzymatycznie, konstytutywnych podjednostek β 1, β 2 i β 5 [47]. Przypuszcza się, że inkorporacja immunopodjednostek powoduje dyskretne zmiany strukturalne całego kompleksu 20S, wpływając na jego aktywność hydrolityczną. Niektóre peptydy powstają jedynie wówczas, gdy ich białko prekursorowe jest degradowane przez immunoproteasomy [46].

Kolejnym składnikiem układu proteasomów indukowanym przez IFN- γ jest kompleks aktywatora PA28, zwany też 11S [93]. Ma on masę 180–200 kDa i składa się z podjednostek α oraz β . Prawdopodobnie jest to kompleks o składzie $\alpha_3\beta_4$ [46]. W skład kompleksu PA28 może też wchodzić podjednostka γ , wykrywana głównie w jądrze komórkowym [8,24]. Przypuszcza się, że PA28 γ wpływa na ilość biologicznie aktywnych peptydów w jądrze komórkowym [87]. Aktywator PA28 łączy się z pierścieniami α proteasomu 20S w sposób niezależny od ATP (ryc. 2). Przyłączenie aktywatora prowadzi do otwarcia kanału proteasomu 20S zamkniętego amino-końcowymi częściami łańcuchów podjednostek α [86]. Przyłączenie PA28 do proteasomu aktywuje hydrolizę peptydów i nie ma wpływu na hydrolizę białek [92]. Połączenie z PA28 zwiększa powinowactwo do substratu i nie zmienia maksymalnej aktywności kompleksu enzymatycznego. Aktywność proteasomu wzrasta dzięki zwiększeniu pobierania substratu lub uwalniania produktu [78].

Immunoproteasomy będące w kompleksie z PA28 są głównym źródłem prekursorów peptydów, które łączą się z cząsteczkami MHC klasy I i są przez nie prezentowane limfocytom T. Prekursory te składają się z 10–12 reszt aminokwasowych, które w świetle szorstkiej siateczki śródplazmatycznej ulegają skróceniu przez aminoogzopeptydazy do 8–10-aminokwasowych peptydów łączących się poprzez sekwencje kotwiczące z rowkami w cząsteczkach MHC I [59].

Tripeptydyl peptydaza II i kilka innych oligopeptydaz mogą również generować peptydy prezentowane przez MHC I, jednak najważniejszym ich źródłem są immuno-proteasomy [46].

IFN- γ indukuje także powstanie proteasomów o mieszanym składzie, zawierających podjednostki konstytutywne i immunopodjednostki [46]. Zawartość poszczególnych typów proteasomów (konstytutywnych, mieszanych i immunoproteasomów) jest różna w różnych tkankach i narządach [15].

BIOGENEZA PROTEASOMÓW

Biogeneza proteasomów 26S to złożony i nie do końca poznany proces. Na podstawie danych doświadczalnych można w nim wyróżnić następujące etapy: powstanie pierścienia podjednostek α , prekursora 13S (zbudowanego z pierścienia podjednostek α oraz podjednostek $\beta 2$, $\beta 3$ i $\beta 4$), prekursora 16S (zbudowanego z pierścienia podjednostek α i pierścienia podjednostek β), powstanie proteasomu 20S, utworzenie proteasomu 26S.

Nie jest jasne, czy pierwszym etapem biosyntezy proteasomu u *Eukaryota* jest powstanie samodzielnego pierścienia podjednostek α , czy też do jego utworzenia konieczne jest współdziałanie podjednostek α i β , co prowadzioby do powstania prekursora 13S, z pominięciem etapu wolnego pierścienia α . W ludzkich komórkach stwierdza się występowanie kompleksów o stałej sedymentacji pomiędzy 4S i 9S, złożonych co najmniej z podjednostek $\alpha 7$ i $\alpha 4$ [2]. Przypuszcza się, że u człowieka te właśnie podjednostki pełnią najważniejszą rolę w powstaniu pierścienia podjednostek α , gdyż ich amino-końcowe fragmenty wchodzą w interakcje ze wszystkimi pozostałymi podjednostkami α .

Prekursor 13S powstaje wyniku połączenia pierścienia podjednostek α z 3 podjednostkami β : $\beta 2$, $\beta 3$ i $\beta 4$ [74]. Podjednostki $\beta 3$ i $\beta 4$ to jedyne, które są syntetyzowane jako dojrzałe białka bez amino-końcowej prosekwencji [61]. Do prekursora 13S wbudowują się kolejno dalsze podjednostki β (a właściwie – ich prekursorzy zawierające amino-końcowe prosekwencje), co prowadzi do powstania prekursora 16S. Ważną rolę w tym procesie odgrywają prosekwencje podjednostek β [40]. U drożdży ważną funkcją prosekwencji aktywnych enzymatycznie podjednostek β jest także ochrona Thr1 przed N- α -acetylacją (α -acetylacją końcowej grupy aminowej) [4,40].

Proces dojrzewania podjednostek β zachodzi w czasie dimeryzacji prekursorów 16S. Prekursorzy te składają się z pierścienia podjednostek α i pierścienia prekursorów podjednostek β . Wbudowanie ostatnich prekursorów podjednostek β do kompleksu 13S (czyli powstanie prekursora 16S) pobudza jego dimeryzację z innym kompleksem, co prowadzi do powstania prekursora proteasomu 20S. Jest to stadium o krótkim okresie półtrwania (sekundy), w którym zachodzi dojrzewanie podjednostek β poprzez odcięcie ich prosekwencji. W wyniku tego procesu powstaje dojrzały proteasom 20S [50]. Dojrzewanie aktywnych enzymatycznie podjednostek proteasomu jest dwustopniowe: najpierw sąsiednie centra aktywne skracają prosekwencje, a potem w autokatalitycznej reakcji prosekwencje są całkowicie odcinane z utworzeniem centrum aktywnego Thr1

[46]. Propeptydy nieaktywnych enzymatycznie podjednostek β są odcinane przez aktywne podjednostki [57].

Proteasom 26S powstaje w wyniku zależnego od ATP połączenia się aktywatora PA700 z proteasomem 20S. Kompleks PA700 składa się z wielu różnych podjednostek o masie od 25 do 110 kDa. Amino-końcowe sekwencje ATP-az wchodzących w skład kompleksu zawierają domeny odpowiedzialne za ich prawidłowe umiejscowienie w kompleksie w trakcie biogenezy aktywatora PA700 [29].

Do tej pory zidentyfikowano pięć komórkowych białek opiekuńczych związanych z biogenezą proteasomów. Białka z tej grupy swoiste dla biogenezy proteasomów to UMP1 u ssaków [11] i Nob1 u drożdży [81]. Białka opiekuńcze, które nie są swoiste jedynie dla biogenezy proteasomów, to Hsp90 [39] i Blm3 u drożdży [22] oraz hsc73 u ssaków [75].

PROTEASOMALNA DEGRADACJA BIAŁEK

Proteasomy 20S

Proteasomy 20S stanowią większość proteasomów komórkowych. Nie są zdolne do rozkładu ubiquitynowanych białek, ponieważ w swojej budowie nie mają aktywatora PA700. Degradują natomiast niektóre peptydy oraz nieubiquitynowane białka o wadliwej strukturze przestrzennej [79,92].

Proteasomy 20S skuteczniej niż kompleksy 26S degradują niektóre białka uszkodzone przez wolne rodniki, takie jak: kalmodulina, hemoglobina, mioglobina, G6PDH (dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa; *glucose-6-phosphatase dehydrogenase*) [16,23,32].

Proteoliza nieubiquitynowanych białek przez proteasomy 20S jest możliwa dzięki różnym mechanizmom. Niekiedy sam substrat wiąże się z proteasomem, jak w przypadku białka p21^{Cip}, które poprzez swój koniec karboksylowy łączy się z podjednostką $\alpha 7$ [82]. Część substratów, jak niezwinęte białka p21^{Cip} i α -synukleina same otwierają kanał proteasomu 20S, który w stanie spoczynkowym jest zamknięty na obu końcach przez amino-końcowe łańcuchy podjednostek α [54]. Pewne cząsteczki niebędące substratem także mogą otwierać kanał proteasomu 20S [30]. Prawdopodobnie w ten sposób niskie stężenia histonu H3 pobudzają degradację kazeiny i lizozymu [63].

Proteasomy 26S

Proteasomy 26S degradują przede wszystkim białka sprzężone z ubiquityną. W trakcie tego procesu rozwijają łańcuch białkowy i przemieszczają go do wnętrza komory proteasomu z równoczesnym uwolnieniem ubiquityny do cytosolu. Za te procesy odpowiadają podjednostki aktywatora PA700. Hydrolizę wiązań peptydowych przeprowadzają aktywne enzymatycznie podjednostki β proteasomu.

Proteasomy 26S mają także zdolność proteolizy niektórych białek niesprężonych z łańcuchami poliubiquityny. Przykładem jest dekarboksylaza ornitynowa. Jej powinowactwo do proteasomu 26S zwiększa się po utworzeniu dimeru z antyzymem. Cząsteczka antyzymu znajdująca się w kompleksie nie jest degradowana przez proteasom 26S i

– po proteolizie cząsteczki dekarboksylazy ornityny – może łączyć się z kolejną cząsteczką dekarboksylazy [12]. Innymi białkami ulegającymi degradacji przez proteasomy 26S bez uprzedniego wyznakowania przez łańcuchy poliubikwityny są: p53 [7], troponina C i kalmodulina [9,79], p21^{Cip}[77].

Biologiczne znaczenie niezależnej od ubikwityny proteosomalnej proteolizy białek nie jest do końca poznane. Pełne wyjaśnienie roli tego zjawiska w fizjologii komórki wymaga dalszych badań.

UWAGI KOŃCOWE

Proteolizę proteosomalną można zablokować licznymi inhibitorami. Najczęściej stosowane w doświadczeniach grupy inhibitorów to aldehydy peptydów (np. PSI, MG132), pochodne kwasu boronowego (np. PS341, czyli bortezomib), epoksyketony (np. epoksymycyna i eponemycyna) oraz laktacystyna i jej pochodne (np. PS-519) [94]. Inhibitory te w wielu liniach komórek nowotworowych wywołują zahamowanie cyklu komórkowego i apoptozę [67,92]. Wyniki doświadczeń na modelach zwierzęcych wskazują również, że te substancje mogłyby znaleźć zastosowanie także jako leki przeciwnowotworowe [58], hipotensyjne czy przeciwkaczkowe [91]. Niektóre inhibitory proteasomów są już obecnie w fazie badań klinicznych jako leki przeciwnowotworowe (bortezomib [52]) lub przeciwzapalne (PS-519 [20,84,95]). Należy się spodziewać, że w najbliższej przyszłości kolejne inhibitory proteasomów znajdą zastosowanie w leczeniu.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ADAMS J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat Rev* 2003; **29** Suppl 1: 3–9.
- [2] APCHER GS, MAITLAND J, DAWSON S, SCHEPPARD P, MAYER J. The $\alpha 4$ and $\alpha 7$ subunits and assembly of the 20S proteasome. *FEBS Lett* 2004; **569**: 211–216.
- [3] ARENDT CS, HOCHSTRASSER M. Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 7156–7161.
- [4] ARENDT CS, HOCHSTRASSER M. Eukaryotic 20S proteasome catalytic subunit propeptides prevent active site inactivation by N-terminal acetylation and promote particle assembly. *EMBO J* 1999; **18**: 3575–3585.
- [5] ARMON T, GANOTH D, HERSHKO A. Assembly of the 26 S complex that degrades proteins ligated to ubiquitin is accompanied by the formation of ATPase activity. *J Biol Chem* 1990; **265**: 20723–20726.
- [6] ARRIGO AP, TANAKA K, GOLDBERG AL, WELCH WJ. Identity of the 19S «prosome» particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature* 1988; **331**: 192–194.
- [7] ASHER G, LOTEM J, SACHS L, KAHANA C, SHAUL Y. Mdm-2 and ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation regulated by NQO1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 13125–13130.
- [8] BARTON LF, RUNNELS HA, SCHELL TD, CHO Y, GIBBONS R, TEVETHIA SS, DEEPE GSJ, MONACO J. Immune defects in 28-kDa proteasome activator gamma-deficient mice. *J Immunol* 2004; **172**: 3948–3954.
- [9] BENAROUDJ N, TARCSA E, CASCIO P, GOLDBERG AL. The unfolding of substrates and ubiquitin-independent protein degradation by proteasomes. *Biochimie* 2001; **83**: 311–318.
- [10] BRAUN BC, GLICKMAN M, KRAFT R, DAHLMANN B, KLOETZEL PM, FINLEY D, SCHMIDT M. The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol* 1999; **1**: 221–226.

- [11] BURRI L, HOCKENDORFF J, BOEHM U, KLAMP T, DOHMEN RJ, LEVY F. Identification and characterization of a mammalian protein interacting with 20S proteasome precursors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 10348–10353.
- [12] CHEN H, MACDONALD A, COFFINO P. Structural elements of antizymes 1 and 2 are required for proteasomal degradation of ornithine decarboxylase. *J Biol Chem* 2004; **277**: 45957–45961.
- [13] COFFINO P. Regulation of cellular polyamines by antizyme. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; **2**: 188–194.
- [14] CONFALONIERI F, DUGUET M. A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function. *Bioessays* 1995; **17**: 639–650.
- [15] DAHLMANN B, RUPPERT T, KLOETZEL PM, KUEHN L. Subtypes of 20S proteasomes from skeletal muscle. *Biochimie* 2001; **83**: 295–299.
- [16] DAVIES KJ. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie* 2001; **83**: 301–310.
- [17] DeMARTINO GN, PROSKE RJ, MOOMAW CR, STRONG AA, SONG X, HISAMATSU H, TANAKA K, SLAUGHTER CA. Identification, purification, and characterization of a PA700-dependent activator of the proteasome. *J Biol Chem* 1996; **271**: 3112–3118.
- [18] DeMARTINO GN, SLAUGHTER CA. The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J Biol Chem* 1999; **274**: 22123–22126.
- [19] DITZEL L, HUBER R, MANN K, HEINEMEYER W, WOLF DH, GROLL M. Conformational constraints for protein self-cleavage in the proteasome. *J Mol Biol* 1998; **279**: 1187–1191.
- [20] ELLIOTT PJ, ZOLLNER TM, BOEHNCKE WH. Proteasome inhibition: a new anti-inflammatory strategy. *J Mol Med* 2003; **81**: 235–245.
- [21] ELSASSER S, GALI RR, SCHWICKART M, LARSEN CN, LEGGETT DS, MULLER B, FENG MT, TUBING F, DITTMAR GA, FINLEY D. Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nat Cell Biol* 2002; **4**: 725–730.
- [22] FEHLKER M, WENDLER P, LEHMANN A, ENENKEL C. Bim3 is part of nascent proteasomes and is involved in a late stage of nuclear proteasome assembly. *EMBO Rep* 2003; **4**: 959–963.
- [23] FERRINGTON DA, SUN H, MURRAY KK, COSTA J, WILLIAMS TD, BIGELOW DJ, SQUIER TC. Selective degradation of oxidized calmodulin by the 20 S proteasome. *J Biol Chem* 2001; **276**: 937–943.
- [24] GAO X, LI J, PRATT G, WILK S, RECHSTEINER M. Purification procedures determine the proteasome activation properties of REG gamma (PA28 gamma). *Arch Biochem Biophys* 2004; **15**: 158–164.
- [25] GLICKMAN M, ADIR N. The proteasome and the delicate balance between destruction and rescue. *PLoS Biology* 2004; **2**: 25–27.
- [26] GLICKMAN MH, RUBIN DM, COUX O, WEFES I, PFEIFER G, CJEKA Z, BAUMEISTER W, FRIED VA, FINLEY D. A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* 1998; **94**: 615–623.
- [27] GLICKMAN MH, RUBIN DM, FRIED VA, FINLEY D. The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 3149–3162.
- [28] GLOTZER M, MURRAY AW, KIRSCHNER MW. Cyclin is degraded by ubiquitin pathway. *Nature* 1991; **349**: 132–138.
- [29] GORBEA C, TAILLANDIER D, RECHSTEINER M. Assembly of the regulatory complex of the 26S proteasome. *Mol Biol Rep* 1999; **26**: 15–19.
- [30] GROLL M, BAJOREK M, KOHLER A, MORODER L, RUBIN DM, HUBER R, GLICKMAN MH, FINLEY D. A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* 2000; **7**: 1062–1067.
- [31] GROLL M, HUBER R. Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; **35**: 606–616.
- [32] GRÜNE T, MERKER K, SANDIG G, DAVIES KJ. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **305**: 709–718.
- [33] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Oligo- i monomeryczne ligazy ubikwitynowe E3 z domeną *ring finger* – budowa i działanie. *Post Biol Kom* 2004; **31**: 373–392.
- [34] GUTERMAN A, GLICKMAN M. Complementary roles for Rpn11 and Ubp6 in deubiquitination and proteolysis by the proteasome. *J Biol Chem* 2004; **279**: 1729–1738.
- [35] GUTERMAN A, GLICKMAN M. Deubiquitinating enzymes are IN/9trinsic to proteasome function. *Curr Protein Pept Sci* 2004; **5**: 201–211.
- [36] HARTMANN-PETERSEN R, SEEGER M, GORDON C. Transferring substrates to the 26S proteasome. *Trends Biochem Sci* 2003; **28**: 26–31.
- [37] HERSHKO A, CIECHANOVER A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998; **67**: 425–479.
- [38] HICKE L. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; **2**: 195–201.

- [39] IMAI J, MARUYA M, YASHIRODA H, YAHARA I, TANAKA K. The molecular chaperone Hsp90 plays a role in the assembly and maintenance of the 26S proteasome. *EMBO J* 2003; **22**: 3557–3567.
- [40] JAGER S, GROLL M, HÜBER R, WOLF DH, HEINEMEYER W. Proteasome beta-type subunits: unequal roles of propeptides in core particle maturation and a hierarchy of active site function. *J Mol Biol* 1999; **291**: 997–1013.
- [41] JESENBERGER V, JENTSCH S. Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; **3**: 112–121.
- [42] JORGENSEN L, HENDIL KB. Proteasome subunit zeta, a putative ribonuclease, is also found as a free monomer. *Mol Biol Rep* 1999; **26**: 119–123.
- [43] KATZMANN DJ, ODORIZZI CG, EMR SD. Receptor downregulation and multivesicular body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; **3**: 893–905.
- [44] KAWAHARA H, KASAHARA M, NISHIYAMA A, OHSUMI K, GOTO T, KISHIMOTO T, SAEKI Y, YOKOSAWA H, SHIMBARA N, MURATA S, CHIBA T, SUZUKI K, TANAKA K. Developmentally regulated, alternative splicing of the Rpn10 gene generates multiple forms of 26S proteasomes. *EMBO J* 2000; **19**: 4144–4153.
- [45] KISSELEV AF, AKOPIAN TN, CASTILLO V, GOLDBERG AL. Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown. *Mol Cell* 1999; **4**: 395–402.
- [46] KLOETZEL PM. Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; **2**: 179–187.
- [47] KLOETZEL PM. Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat Immunol* 2004; **5**(7): 661–669.
- [48] KOEGL M, HOPPE T, SCHLENKER S, ULRICH HD, MAYER TU, JENTSCH S. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 1999; **96**: 635–644.
- [49] KOHLER A, CASCIO P, LEGGETT DS, WOO KM, GOLDBERG AL, FINLEY D. The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol Cell* 2001; **7**: 1143–1152.
- [50] KRÜGER E, KLOETZEL PM, ENENKEL C. 20S proteasome biogenesis. *Biochimie* 2001; **83**: 289–293.
- [51] LAM YA, LAWSON TG, VELAYUTHAM M, ZWEIER JL, PICKART CM. A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature* 2002; **416**: 763–767.
- [52] LENZ HJ. Clinical update: proteasome inhibitors in solid tumors. *Cancer Treat Rev* 2003; **29** Suppl 1: 41–48.
- [53] LI T, DUAN W, YANG H, LEE MK, BTE MUSTAFA F, LEE BH, TEO TS. Identification of two proteins, S14 and UIP1, that interact with UCH37. *FEBS Lett* 2001; **488**: 201–205.
- [54] LIU CW, CORBOY MJ, DeMARTINO GN, THOMAS PJ. Endoproteolytic activity of the proteasome. *Science* 2003; **299**: 408–411.
- [55] LOWE J, STOCK D, JAP B, ZWICKL P, BAUMEISTER W, HUBER R. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* 1995; **268**: 533–539.
- [56] MAGASANIK B, KAISER CA. Nitrogen Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 2002; **290**: 1–18.
- [57] MEINERS S, HEYKEN D, WELLER A, LUDWIG A, STANGL K, KLOETZEL PM, KRÜGER E. Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and *de novo* formation of Mammalian proteasomes. *J Biol Chem* 2003; **278**: 21517–21525.
- [58] MEINERS S, LAULE M, ROTHER W, GUENTHER C, PRAUKA I, MUSCHICK P, BAUMANN G, KLOETZEL PM, STANGL K. Ubiquitin-proteasome pathway as a new target for the prevention of restenosis. *Circulation* 2002; **105**: 483–489.
- [59] MO XY, CASCIO P, LEMERISE K, GOLDBERG AL, ROCK K. Distinct proteolytic processes generate the C and N termini of MHC class I-binding peptides. *J Immunol* 1999; **163**: 5851–5859.
- [60] MURATANI M, TANSEY WP. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; **4**: 192–201.
- [61] NANDID, WOODWARD E, GINSBURG DB, MONACO JJ. Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor beta subunits. *EMBO J* 1997; **16**: 5363–5375.
- [62] ORLOWSKI M. The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochemistry* 1990; **29**: 10289–10297.
- [63] ORLOWSKI M. Selective activation of the 20 S proteasome (multicatalytic proteinase complex) by histone h3. *Biochemistry* 2001; **40**: 15318–15326.
- [64] ORLOWSKI M, WILK S. Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Arch Biochem Biophys* 2003; **415**: 1–5.

- [65] PETERS JM. Proteasomes: protein degradation machines of the cell. *Trends Biochem Sci* 1994; **19**: 377–382.
- [66] PICKART CM. Ubiquitin enters the new millennium. *Mol Cell* 2001; **8**: 499–504.
- [67] PLEBAN E, BURY M, MŁYNARCZUK I, WÓJCIK C. Effects of proteasome inhibitor PSI on neoplastic and non-transformed cell lines. *Folia Histochem Cytobiol* 2001; **39**: 133–134.
- [68] RAMOS PC, MARQUES AJ, LONDON MK, DOHMEN RJ. Role of C-terminal Extensions of Subunits beta2 and beta7 in Assembly and Activity of Eucaryotic Proteasomes. *J Biol Chem* 2004; **279**: 14323–14330.
- [69] REITS EAJ, VOS JC, GROMME M, NEFFJES J. The major substrates for TAP *in vivo* are derived from newly synthesized proteins. *Nature* 2000; **404**: 744–748.
- [70] ROCK KL, GOLDBERG AL. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* 1999; **17**: 739–779.
- [71] ROTH AF, SULLIVAN DM, DAVIS NG. A large PEST-like sequence directs the ubiquitination, endocytosis, and vacuolar degradation of the yeast a-factor receptor. *J Cell Biol* 1998; **142**: 949–961.
- [72] ROTIN D, STAUB O, HAGUENAUER-TSAPIS R. Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J Membr Biol* 2000; **176**: 1–17.
- [73] RUSSELL SJ, GONZALEZ F, JOSHUA-TOR L, JOHNSTON SA. Selective chemical inactivation of AAA proteins reveals distinct functions of proteasomal ATPases. *Chem Biol* 2001; **8**: 941–950.
- [74] SCHMIDT M, SCHMIDTKE G, KLOETZEL PM. Structure and structure formation of the 20S proteasome. *Mol Biol Rep* 1997; **24**: 103–112.
- [75] SCHMIDTKE G, SCHMIDT M, KLOETZEL PM. Maturation of mammalian 20 S proteasome: purification and characterization of 13 S and 16 S proteasome precursor complexes. *J Mol Biol* 1997; **268**: 95–106.
- [76] SCHORK SM, BEE G, THUMM M, WOLF DH. Catabolite inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast is mediated by the proteasome. *FEBS Lett* 1994; **349**: 270–274.
- [77] SHEAFF RJ, SINGER JD, SWANGER J, SMITHERMAN M, ROBERTS JM, CLURMAN BE. Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination. *Mol Cell* 2000; **5**: 403–410.
- [78] STOHWASSER R, SALZMANN U, GIESEBRECHT J, KLOETZEL PM, HOLZHUTTER HG. Kinetic evidences for facilitation of peptide channelling by the proteasome activator PA28. *Eur J Biochem* 2000; **267**: 6221–6230.
- [79] TARCSA E, SZYMANSKA G, LECKER S, O'CONNOR CM, GOLDBERG AL. Ca²⁺-free calmodulin and calmodulin damaged by *in vitro* aging are selectively degraded by 26 S proteasomes without ubiquitination. *J Biol Chem* 2000; **275**: 20295–20301.
- [80] THROWER JS, HOFFMAN L, RECHSTEINER M, PICKART CM. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* 2000; **19**: 94–102.
- [81] TONE Y, TOH E. Nob1p is required for biogenesis of the 26S proteasome and degraded upon its maturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 2002; **16**: 3142–3157.
- [82] TOUITOU R, RICHARDSON J, BOSE S, NAKANISHI M, RIVETT J, ALLDAY MJ. A degradation signal located in the C-terminus of p21WAF1/CIP1 is a binding site for the C8 alpha-subunit of the 20S proteasome. *EMBO J* 2001; **20**: 2367–2375.
- [83] TURNER GC, VARSHAVSKY A. Detecting and measuring cotranslational protein degradation *in vivo*. *Science* 2000; **289**: 2117–2120.
- [84] VANDERLUGT CL, RAHBE SM, ELLIOTT PJ, DAL CANO MC, MILLER SD. Treatment of established relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with the proteasome inhibitor PS-519. *J Autoimmunol* 2000; **14**: 205–211.
- [85] VERMA R, ARAVIND L, OANIA R, MCDONALD WH, YATES JR, III, KOONIN EV, DESHAIES RJ. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 2002; **298**: 611–615.
- [86] WHITBY FG, MASTERS EI, KRAMER L, KNOWLTON JR, YAO Y, WANG CC, HILL CP. Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature* 2000; **408**: 115–120.
- [87] WILK S, CHEN WE, MAGNUSSON RP. Properties of the nuclear proteasome activator PA28gamma (REGgamma). *Arch Biochem Biophys* 2000; **383**: 265–271.
- [88] WILKINSON CR, SEEGER M, HARTMANN-PETERSEN R, STONE M, WALLACE M, SEMPLE C, GORDON C. Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains. *Nat Cell Biol* 2001; **3**: 939–943.

- [89] WILKINSON KD. Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin Cell Dev Biol* 2000; **11**: 141–148.
- [90] WILKINSON KD. Cell biology: unchaining the condemned. *Nature* 2002; **419**: 351–353.
- [91] WÓJCIK C. Ubiquitin- and proteasome-dependent pathway of protein degradation as an emerging therapeutic target. *Emerging Therapeutic Targets* 2000; **4**: 89–111.
- [92] WÓJCIK C. Regulation of apoptosis by the ubiquitin and proteasome pathway. *J Cell Mol Med* 2002; **6**: 25–48.
- [93] WÓJCIK C, DeMARTINO GN. Intracellular localization of proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; **35**: 579–589.
- [94] WÓJCIK C, Di NAPOLI M. Ubiquitin-proteasome system and proteasome inhibition: New strategies in stroke therapy. *Stroke* 2004; **35**: 1506–1518.
- [95] ZOLLNER TM, PODDA M, PIEN C, ELLIOTT PJ, KAUFMANN R, BOEHNCKE WH. Proteasome inhibition reduces superantigen-mediated T cell activation and the severity of psoriasis in a SCID-hu model. *J Clin Invest* 2002; **109**: 671–679.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 23.02.2005 r.

Przyjęto: 05.05.2005 r.

ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa;

e-mail: marcin_bury@yahoo.com