

ROLA α -ARESTYN W UBIKWITYNACJI I HOMEOSTAZIE BIAŁEK BŁONY KOMÓRKOWEJ

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

Kacper ZBIERALSKI, Donata WAWRZYCKA

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

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

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

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

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

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

WPROWADZENIE

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

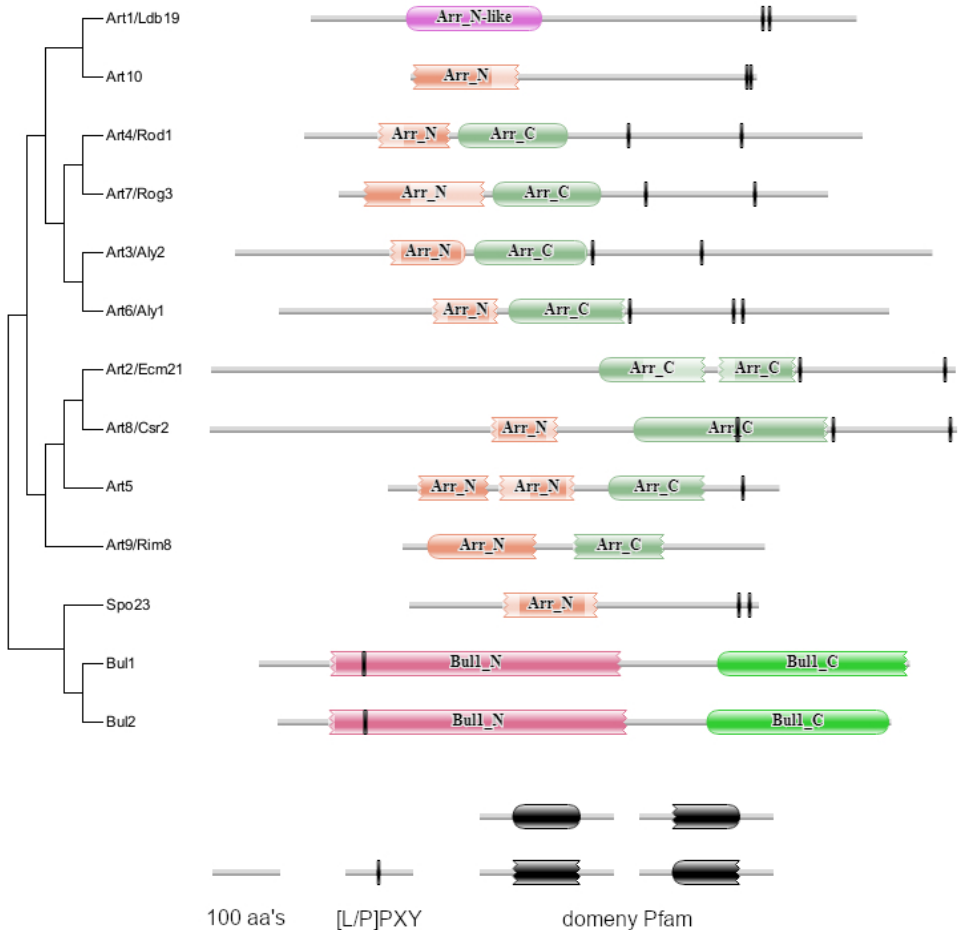
Przyłączenie cząsteczki ubikwityny do białka błonowego zachodzi na drodze 3-stopniowego szlaku reakcji enzymatycznych, w których udział biorą kolejno: enzymy aktywujące ubikwitynę (E1), enzymy wiążące ubikwitynę (E2) oraz ligazy ubikwityny (E3). Istotnym elementem procesu ubikwitynacji jest specyficzne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

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

ADAPTORY ARTs: KONSERWATYWNE BIAŁKA Z KLANU ARESTYN

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

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



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

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

arestyn wdrokowych (odtąd nazywanych β -arestynami) oraz innych białek posiadających domenę arestynową [2]. Jednocześnie wykazano, że α -arestyny są białkami występującymi powszechnie u wszystkich eukariontów poza roślinami, u których nie stwierdzono obecności także ligaz Rsp5/Nedd4 [2]. Jedną z pierwszych zidentyfikowanych α -arestyn było białko PalF u *Aspergillus nidulans*, zaangażowane w ścieżkę sygnałną pH poprzez wiązanie receptora PalH [25]. U ludzi zidentyfikowano co najmniej 6 α -arestyn: ARRDC1-5 (ang. *arrestin-domain containing 1-5*) oraz TXNIP (ang. *thioredoxin-interacting protein*) [2]; u drożdży *S. cerevisiae*, które stanowią główny model badań nad α -arestynami, zidentyfikowano 14 białek należących do tej rodziny, w tym białka Art1-10 [51] oraz Bull1-3 [53] (**Ryc. 1**)(**Tab. 1**).

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

WIELOFUNKCYJNOŚĆ LUDZKICH α -ARESTYN

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

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

Drożdżowa α-arestyna	Charakterystyka	Odnosiniki
Art1/Ldb19	regulacja endocytozy Mup1, Can1, Tat2, Fur4, Lyp1, Ste2, Ste3	[19,51,60]
Art2/Ecm21	regulacja endocytozy Smf1, Tat2, Fur4, Lyp1, Thi7, Thi72, Nrt1	[51,62]
Art3/Aly2	regulacja endocytozy Gap1, Dip5, Ste3	[13,55,60]
Art4/Rod1	regulacja endocytozy Jen1, Hxt6, Hxt1, Hxt3,	[17,51,56]
Art5	regulacja endocytozy Itr1	[51]
Art6/Aly1	regulacja endocytozy Gap1, Dip5, Ste3	[13,55,60]
Art7/Rog3	regulacja endocytozy Hxt1, Hxt3	[56]
Art8/Csr2	regulacja endocytozy Smf1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7	[30,51,68]
Art9/Rim8	regulacja endocytozy i sortowania Rim21	[23,24]
Art10	nieznana funkcja; nadekspresja skutkuje zwiększeniem oporności na arsenin	[72]
Bul1	regulacja endocytozy Jen1, Gap1, Ptr2, Tat1, Tat2, Ctr1, Put4, Dal5	[1,13,17,32,41,75]
Bul2	regulacja endocytozy Jen1, Gap1, Ptr2, Tat1, Tat2, Ctr1, Put4, Dal5	[1,13,17,32,41,75]
Bul3 (BSC5/YNR068C)	nieznana funkcja; usunięcie skutkuje zwiększeniem wrażliwości na temperaturę	[53]
Spo23	nieznana funkcja; związana z mejotycznym białkiem Spo1	[74]
Ludzka α-arestyna	Charakterystyka	Odnosiniki
ARRDC1	regulacja ubikwitynacji DMT1, Notch, YAP1; rekrutacja TSG101 do sekrecji pęcherzyków ARMMs	[44,49,61,81]
ARRDC2	przypuszczalnie regulacja post-endocytarnego sortowania β 2-AR	[21]
ARRDC3	regulacja endosomalnego sortowania PAR1; regulacja post-endocytarnego sortowania β 2-AR; regulacja ubikwitynacji YAP1, ITG β 4, IR	[6,14,21,69,81]
ARRDC4	przypuszczalnie regulacja post-endocytarnego sortowania β 2-AR; regulacja ubikwitynacji DMT1, MDA5, V2R	[21,44,46,66]
ARRDC5	nieznana funkcja	
TXNIP	udział w procesach redoks poprzez wiązanie tioredoksyny; regulacja apoptozy; regulacja endocytozy GLUT1, GLUT4	[63,77,80,83]

glukozy przez promowanie degradacji transporterów glukozy GLUT1 oraz GLUT4 (ang. *glucose transporter*) pod wpływem wewnątrzkomórkowego stężenia glukozy oraz insuliny [77, 80]. α -Arestyny współpracują także z β -arestynami w regulacji obrotu receptora β 2-AR, choć zaangażowana w ten proces α -arestyna ARRDC3 uczestniczy jedynie w post-endocytarnym sortowaniu ubikwitynowanego już receptora do ciał wielopęcherzykowych (ang. *multivesicular bodies*, MVB) i odgrywa mniejszą rolę w jego obrocie – głównymi adaptorami dla receptora β 2-AR są β -arestyny [21]. Niedawno odkryto uczestnictwo białek ARRDC1 i ARRDC3 w hamowaniu rozwoju jasnokomórkowego raka nerki poprzez współdziałanie z ligazami Nedd4 w kierowaniu na ścieżkę degradacji onkogenu YAP1 (ang. *Yes-associated protein 1*) [81]. Nowe badania pokazują, że ARRDC3 uczestniczy w sortowaniu receptora GPCR PAR1 (ang. *protease-activated receptor 1*) do MVB poprzez promowanie ubikwitynacji endosomalnego białka ALIX (ang. *ALG-interacting protein X*) [14], a także pośredniczy w ubikwitynacji integryny β 4, hamując jej recykling i sekrecję w komórkach raka piersi oraz kierując ją na ścieżkę degradacji lizosomalnej [69]. Badania na myszach pokazały, że białko ARRDC3 jest silnie zaangażowane także w procesy metaboliczne w wątrobie. W warunkach hiperinsulinemii ekspresja genu *ARRDC3* w wątrobie ulega regulacji w sposób zależny od aktywności receptora insuliny (ang. *insulin receptor*, IR) – u myszy pozbawionych IR w wątrobie obserwowano znaczne zmniejszenie *ARRDC3* mRNA [6], natomiast delecja genu *ARRDC3* skutkowała zwiększonym stężeniem IR w błonie komórkowej oraz zwiększoną wrażliwością komórek na insulinę [6]. Wyniki te wskazują na rolę ARRDC3 w pętli regulującej odpowiedź komórek wątroby na insulinę. Inne badania wskazywały na rolę ARRDC3 oraz ARRDC4 w rekrutacji ligazy Nedd4 do receptorów GPCR [66]. ARRDC4, a także ARRDC1, pośredniczą w ubikwitynacji także transportera DMT1 (ang. *divalent metal ion transporter 1*), co pozytywnie reguluje jego uwalnianie w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych (ang. *extracellular vesicles*, EVs) [44]. Pokazano też, że α -arestyna ARRDC1 współdziała wraz z β -arestynami w negatywnej regulacji ścieżki sygnałnej Notch, rekrutując ligazę Itch do ubikwitynacji receptora Notch, co promuje jego degradację lizosomalną [61]. Co ciekawe, powyższa praca zasugerowała zdolność α - i β -arestyn do heterodimeryzacji poprzez domenę arestynową i kooperację w wiązaniu substratów dla ligazy E3. Wcześniej pokazano już, że obie rodziny arestyn mają zdolność do homodimeryzacji [49,71]. W przypadku receptora Notch, nadekspresja nierozpoznawanego przez ligazy Nedd4 mutantu ARRDC1 pozbawionego motywu PY spowodowała znaczne zahamowanie ubikwitynacji i degradacji receptora Notch oraz wzrost kompleksów Notch/ β -arestyna-1, prawdopodobnie ze względu na nieefektywną degradację tego receptora [61]. Możliwość formowania heterodimerów sugerowały także inne badania, gdzie nadekspresja ARRDC3 i ARRDC4 prowadziła do koimmunoprecypitacji ich kompleksów z β -arestynami [66].

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

DROŹDZOWE α -ARESTYNY JAKO ADAPTORY ENDOCYTARNE

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

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

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

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

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

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

SPECYFICZNOŚĆ SUBSTRATOWA DROŹDŻOWYCH α -ARESTYN

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

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

REGULACJA AKTYWNOŚCI ARESTYN

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

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

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

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

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

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

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

proponowano model opierający się na przeciwstawnej TORC1-zależnej aktywności kinazy efektorowej Npr1 oraz fosfatazy Sit4. W niekorzystnych warunkach (np. dostępności ubożego źródła azotu w przypadku Gap1), TORC1 jest nieaktywny, za to fosfataza Sit4 warunkuje hipofosforylację kinazy Npr1, aktywując ją. Aktywne Npr1 fosforyluje adaptory Bull1-2, co warunkuje ich wiązanie do białek 14-3-3 i hamuje aktywność kompleksów adaptor-Rsp5, a tym samym stabilizuje Gap1 w błonie komórkowej. W korzystnych warunkach kompleks TORC1 jest aktywowany i fosforyluje kinazę Npr1 oraz białko Tap42. Hiperfosforylowana kinaza Npr1 ulega inaktywacji, a Tap42p wiąże się z fosfatazą Sit4, która w takim kompleksie rozpoznaje białka Bull1-2 i defosforyluje je, uwalniając je z kompleksów z białkami 14-3-3 i umożliwiając rekrutację ligazy Rsp5, co warunkuje ubikwitynację i degradację Gap1 [47, 57]. Defosforylacji białek Bul towarzyszy też ich monoubikwitynacja, ale znaczenie tej modyfikacji pozostaje nieznane [47].

W regulację obrotu Gap1 zaangażowane są także adaptory Art6/Aly1 oraz Art3/Aly2, ale ich rola wydaje się opierać przede wszystkim na regulacji wewnątrzkomórkowego sortowania Gap1 [54]. α -Arestyny te biorą udział w promowaniu transportu Gap1 z endosomów do sieci transaparatu Golgiego (ang. *trans-Golgi network*, TGN) i recykling tej permeazy [54]. Wykazano, że w warunkach stresu azotowego Art3/Aly2 ulega fosforylacji przez kinazę Npr1, modyfikacja ta nie inaktywuje jej jednak, a umożliwia jej wejście w bezpośrednią interakcję z kompleksem AP-1 w endosomach, promując klatryno-zależny transport Gap1 do TGN, skąd w warunkach niedoboru azotu dochodzi do ponownej sekrecji Gap1 do błony komórkowej [54]. Przy dużej dostępności azotu kinaza Npr1 pozostaje z kolei nieaktywna i nie fosforyluje Aly2/Art6, a Gap1 kierowane jest na ścieżkę degradacji wakuolarniej [54]. Nowsze badania pokazały, że białko Art6/Aly1 zaangażowane jest także w degradację transportera kwasu asparaginowego i glutaminowego Dip5, gdzie pełni funkcję w promowaniu jej Rsp5-zależnej ubikwitynacji i degradacji wakuolarniej [55]. Wykazano, że skierowanie Dip5 do wakuoli wymaga defosforylacji Art6/Aly1, za co odpowiada Ca^{2+} -zależna fosfataza białkowa kalcyneuryna [55]. Należy zauważyć, że defosforylacja Art6/Aly1 wydaje się jednak nieistotna dla samego wiązania Dip5 i jego ubikwitynacji ani nie warunkuje stabilności Art6/Aly1 [55]. Wykazano także, że choć Art6/Aly1 potencjalnie może wiązać się z białkami 14-3-3, kalcyneuryno-zależna fosforylacja prawdopodobnie nie bierze udziału w regulacji tej interakcji, a także nie wpływa na Art6/Aly1-zależny obrót białka Gap1 [55]. Wykazano również, że w szczególnych warunkach adaptory Art6/Aly1 i Art3/Aly2, razem z białkami Bull1-2, także mogą rozpoznawać Gap1 w błonie komórkowej i promować jego ubikwitynację przez Rsp5 oraz degradację wakuolarną, a odpowiedzialny za to mechanizm różni się od dotychczas scharakteryzowanego dla białek Bull1-2 [13]. W warunkach stresu wywołanego dysfunkcją kompleksu TORC1, wciąż ufosforylowane adaptory Bull1-2 oraz Art6/Aly1 i Art3/Aly2, prawdopodobnie nadal

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

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

PODSUMOWANIE

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

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

PODZIĘKOWANIA

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

LITERATURA

- [1] ABE F, IIDA H. Pressure-induced differential regulation of the two tryptophan permeases Tat1 and Tat2 by ubiquitin ligase Rsp5 and its binding proteins, Bul1 and Bul2. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 7566-7584.
- [2] ALVAREZ CE. On the origins of arrestin and rhodopsin. *BMC Evol Biol* 2008; **8**: 222.
- [3] ANDOH T, HIRATA Y, KIKUCHI A. PY motifs of Rod1 are required for binding to Rsp5 and for drug resistance. *FEBS Lett* 2002; **525**: 131-134.
- [4] AUBRY L, GUETTA D, KLEIN G. The arrestin fold: variations on a theme. *Curr Genomics* 2009; **10**: 133-142.
- [5] AUBRY L, KLEIN G. True arrestins and arrestin-fold proteins: a structure-based appraisal. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2013; **118**: 21-56.
- [6] BATISTA TM, DAGDEVIREN S, CARROLL SH, CAI W, MELNIK VY, NOH HL, SAENGNIPANTHKUL S, KIM JK, KAHN, CR, LEE RT. Arrestin domain-containing 3 (Arrdc3) modulates insulin action and glucose metabolism in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020; **117**: 6733-6740.
- [7] BECUWE M, LÉON S. Integrated control of transporter endocytosis and recycling by the arrestin-related protein Rod1 and the ubiquitin ligase Rsp5. *Elife* 2014; **3**: e03307.
- [8] BECUWE M, VIEIRA N, LARA D, GOMES-REZENDE J, SOARES-CUNHA C, CASAL M, HAGUENAUER-TSAPIS R, VINCENT O, PAIVA S, LÉON S. A molecular switch on an arrestin-like protein relays glucose signaling to transporter endocytosis. *J Cell Biol* 2012; **196**: 247-259.
- [9] BELGAREH-TOUZÉ N, LÉON S, ERPAPAZOGLU Z, STAWIECKA-MIROTA M, URBAN-GRIMAL D, HAGUENAUER-TSAPIS R. Versatile role of the yeast ubiquitin ligase Rsp5p in intracellular trafficking. *Biochem Soc Trans* 2008; **36**: 791-796.
- [10] BOEHMER C, HENKE G, SCHNIEPP R, PALMADA M, ROTHSTEIN JD, BRÖER, LANG F. Regulation of the glutamate transporter EAAT1 by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum and glucocorticoid-inducible kinase isoforms SGK1/3 and protein kinase B. *J Neurochem* 2003; **86**: 1181-1188.
- [11] BOEHMER C, OKUR F, SETIAWAN I, BRÖER S, LANG F. Properties and regulation of glutamine transporter SN1 by protein kinases SGK and PKB. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **306**: 156-162.

- [12] BOTSTEIN D, FINK GR. Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. *Genetics* 2011; **189**: 695-704.
- [13] CRAPEAU M, MERHI A, ANDRÉ B. Stress conditions promote yeast Gap1 permease ubiquitylation and down-regulation via the arrestin-like Bul and Aly proteins. *J Biol Chem* 2014; **289**: 22103-22116.
- [14] DORES MR, LIN H, J GRIMSEY N, MENDEZ F, TREJO J. The α -arrestin ARRDC3 mediates ALIX ubiquitination and G protein-coupled receptor lysosomal sorting. *Mol Biol Cell* 2015; **26**: 4660-4673.
- [15] DUPRÉ S, URBAN-GRIMAL D, HAGUENAUER-TSAPIS R. Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1695**: 89-111.
- [16] FINLEY D, ULRICH HD, SOMMER T, KAISER P. The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2012; **192**: 319-360.
- [17] FUJITA S, SATO D, KASAI H, OHASHI M, TSUKUE S, TAKEKOSHI Y, GOMI K, SHINTANI T. The C-terminal region of the yeast monocarboxylate transporter Jen1 acts as a glucose signal-respondering degron recognized by the α -arrestin Rod1. *J Biol Chem* 2018; **293**: 10926-10936.
- [18] GHADDAR K, MERHI A, SALIBA E, KRAMMER EM, PRÉVOST M, ANDRÉ B. Substrate-induced ubiquitylation and endocytosis of yeast amino acid permeases. *Mol Cell Biol* 2014; **34**: 4447-4463.
- [19] GUINEY EL, KLECKER T, EMR SD. Identification of the endocytic sorting signal recognized by the Art1-Rsp5 ubiquitin ligase complex. *Mol Biol Cell* 2016; **27**: 4043-4054.
- [20] GUPTA R, KUS B, FLADD C, WASMUTH J, TONIKIAN R, SIDHU S, KROGAN NJ, PARKINSON J, ROTIN D. Ubiquitination screen using protein microarrays for comprehensive identification of Rsp5 substrates in yeast. *Mol Syst Biol* 2007; **3**: 116.
- [21] HAN SO, KOMMADDI RP, SHENOY SK. Distinct roles for β -arrestin2 and arrestin-domain-containing proteins in β 2 adrenergic receptor trafficking. *EMBO Rep* 2013; **14**: 164-171.
- [22] HATAKEYAMA R, KAMIYA M, TAKAHARA T, MAEDA T. Endocytosis of the aspartic acid/glutamic acid transporter Dip5 is triggered by substrate-dependent recruitment of the Rsp5 ubiquitin ligase via the arrestin-like protein Aly2. *Mol Cell Biol* 2010; **30**: 5598-5607.
- [23] HERRADOR A, HERRANZ S, LARA D, VINCENT O. Recruitment of the ESCRT machinery to a putative seven-transmembrane-domain receptor is mediated by an arrestin-related protein. *Mol Cell Biol* 2010; **30**: 897-907.
- [24] HERRADOR A, LIVAS D, SOLETTI L, BECUWE M, LÉON S, VINCENT O. Casein kinase 1 controls the activation threshold of an α -arrestin by multisite phosphorylation of the interdomain hinge. *Mol Biol Cell* 2015; **26**: 2128-2138.
- [25] HERRANZ S, RODRÍGUEZ JM, BUSSINK HJ, SÁNCHEZ-FERRERO JC, ARST HN, PEÑALVA MA, VINCENT O. Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; **102**: 12141-12146.
- [26] HETTEMA EH, VALDEZ-TAUBAS J, PELHAM HR. Bsd2 binds the ubiquitin ligase Rsp5 and mediates the ubiquitination of transmembrane proteins. *EMBO J* 2004; **23**: 1279-1288.
- [27] HICKE L, DUNN R. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003; **19**: 141-172.
- [28] HICKE L, ZANOLARI B, RIEZMAN H. Cytoplasmic tail phosphorylation of the alpha-factor receptor is required for its ubiquitination and internalization. *J Cell Biol* 1998; **141**: 349-358.
- [29] HORÁK J. The role of ubiquitin in down-regulation and intracellular sorting of membrane proteins: insights from yeast. *Biochim Biophys Acta* 2003; **1614**: 139-155.
- [30] HOVSEPIAN J, DEFENOULLÈRE Q, ALBANÈSE V, VÁCHOVÁ L, GARCIA C, PALKOVÁ Z, LÉON S. Multilevel regulation of an α -arrestin by glucose depletion controls hexose transporter endocytosis. *J Cell Biol* 2017; **216**: 1811-1831.
- [31] HUIBREGTSE JM, SCHEFFNER M, BEAUDENON S, HOWLEY PM. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase [published correction appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 May 23; **92**: 5249]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; **92**: 2563-2567.

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

- [54] O'DONNELL AF, APFFEL A, GARDNER RG, CYERT MS. Alpha-arrestins Aly1 and Aly2 regulate intracellular trafficking in response to nutrient signaling. *Mol Biol Cell* 2010; **21**: 3552-3566.
- [55] O'DONNELL AF, HUANG L, THORNER J, CYERT MS. A calcineurin-dependent switch controls the trafficking function of α -arrestin Art6/Aly1. *J Biol Chem* 2013; **288**: 24063-24080.
- [56] O'DONNELL AF, MCCARTNEY RR, CHANDRASHEKARAPPA DG, ZHANG BB, THORNER J, SCHMIDT MC. 2-Deoxyglucose impairs *Saccharomyces cerevisiae* growth by stimulating Snf1-regulated and α -arrestin-mediated trafficking of hexose transporters 1 and 3. *Mol Cell Biol* 2015; **35**: 939-955.
- [57] O'DONNELL AF. The running of the Bulls: control of permease trafficking by α -arrestins Bull1 and Bull2. *Mol Cell Biol* 2012; **32**: 4506-4509.
- [58] PALMADA M, DIETER M, SPEIL A, BÖHMER C, MACK AF, WAGNER HJ, KLINGEL K, KANDOLF R, MURER H, BIBER J, CLOSS EI, LANG F. Regulation of intestinal phosphate cotransporter NaPi IIb by ubiquitin ligase Nedd4-2 and by serum- and glucocorticoid-dependent kinase 1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; **287**: G143-G150.
- [59] PATWARI P, EMILSSON V, SCHADT EE, CHUTKOW WA, LEE S, MARSILI A, ZHANG Y, DOBRIN R, COHEN DE, LARSEN PR, ZAVACKI AM, FONG LG, YOUNG SG, LEE RT. The arrestin domain-containing 3 protein regulates body mass and energy expenditure. *Cell Metab* 2011; **14**: 671-683.
- [60] PROSSER DC, PANNUNZIO AE, BRODSKY JL, THORNER J, WENDLAND B, O'DONNELL AF. α -Arrestins participate in cargo selection for both clathrin-independent and clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Sci* 2015; **128**: 4220-4234.
- [61] PUCA L, CHASTAGNER P, MEAS-YEDID V, ISRAËL A, BROU C. A-arrestin 1 (ARRDC1) and β -arrestins cooperate to mediate Notch degradation in mammals. *J Cell Sci* 2013; **126**: 4457-4468.
- [62] SAVOCCO J, NOOTENS S, AFOKPA W, BAUSART M, CHEN X, VILLERS J, RENARD HF, PRÉVOST M, WATTIEZ R, MORSOMME P. Yeast α -arrestin Art2 is the key regulator of ubiquitylation-dependent endocytosis of plasma membrane vitamin B1 transporters. *PLoS Biol* 2019; **17**: e3000512.
- [63] SAXENA G, CHEN J, SHALEV A. Intracellular shuttling and mitochondrial function of thioredoxin-interacting protein. *J Biol Chem* 2010; **285**: 3997-4005.
- [64] SCHEFFNER M, KUMAR S. Mammalian HECT ubiquitin-protein ligases: biological and pathophysiological aspects. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1843**: 61-74.
- [65] SEN A, ACOSTA-SAMPSON L, ALVARO CG, AHN JS, CATE JH, THORNER J. Internalization of Heterologous Sugar Transporters by Endogenous α -Arrestins in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 2016; **82**: 7074-7085.
- [66] SHEA FF, ROWELL JL, LI Y, CHANG TH, ALVAREZ CE. Mammalian α arrestins link activated seven transmembrane receptors to Nedd4 family e3 ubiquitin ligases and interact with β arrestins. *PLoS One* 2012; **7**: e50557.
- [67] SHENOY SK, XIAO K, VENKATARAMANAN V, SNYDER PM, FREEDMAN NJ, WEISSMAN AM. Nedd4 mediates agonist-dependent ubiquitination, lysosomal targeting, and degradation of the beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 2008; **283**: 22166-22176.
- [68] SNOWDON C, VAN DER MERWE G. Regulation of Hxt3 and Hxt7 turnover converges on the Vid30 complex and requires inactivation of the Ras/cAMP/PKA pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 2012; **7**: e50458.
- [69] SOUNG YH, FORD S, YAN C, CHUNG J. The Role of Arrestin Domain-Containing 3 in Regulating Endocytic Recycling and Extracellular Vesicle Sorting of Integrin β 4 in Breast Cancer. *Cancers (Basel)* 2018; **10**: 507.
- [70] STIMPSON HE, LEWIS MJ, PELHAM HR. Transferrin receptor-like proteins control the degradation of a yeast metal transporter. *EMBO J* 2006; **25**: 662-672.
- [71] STOREZ H, SCOTT MGH, ISSAFRAS H, BURTEY A, BENMERAH A, MUNTANER O, PILOTT T, TRAMIER M, COPPEY-MOISAN M, BOUVIER M, LABBÉ-JULLIÉ C, MARULLO S. Homo- and hetero-oligomerization of beta-arrestins in living cells. *J Biol Chem* 2005; **280**: 40210-40215.

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

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 21.07.2020

Przyjęto: 03.08.2020

Donata Wawrzycka

Zakład Genetyki i Fizjologii Komórki

Instytut Biologii Eksperymentalnej

Uniwersytet Wrocławski

ul. Kanonia 6/8; 50-328 Wrocław

tel.: 713754128

e-mail: donata.wawrzycka@uwr.edu.pl