

UBC9 – NOWY PARTNER BIAŁKOWY BRCA1

UBC9 – THE NEW PROTEIN PARTNER OF BRCA1

Zuzanna SOBAŃSKA, Katarzyna WOŹNIAK

Katedra Genetyki Molekularnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska,
Uniwersytet Łódzki

Streszczenie: Białko UBC9 jest jedynym enzymem koniugującym E2 w potranslacyjnej modyfikacji białek, zwanej sumoilacją. Modyfikacja ta polega na przyłączeniu niewielkiego, podobnego do ubikwityny białka o nazwie SUMO. Badania ostatnich lat wskazują, że sumoilacja odgrywa ważną rolę w regulacji ekspresji genów i utrzymaniu stabilności genomowej zachodzącej z udziałem białka BRCA1. Analiza oddziaływań między białkami UBC9 i BRCA1 wykazała, że UBC9 bierze udział w transporcie jądrowym i wpływa na aktywność ligazy ubikwityny BRCA1. Ponadto, białko UBC9 wraz z białkiem BRCA1 odnajdywane jest w skupiskach jądrowych, w których odbywa się naprawa dwuniciowych pęknięć DNA. Co ciekawe, białko UBC9 oddziałuje z BRCA1 i moduluje jego aktywność nie tylko w kontekście reakcji sumoilacji, ale również niezależnie od tej modyfikacji. Doniesienia na temat interakcji białek UBC9 i BRCA1 rzucają nowe światło na złożony proces nowotworzenia.

Słowa kluczowe: UBC9, BRCA1, BARD1, sumoilacja, receptor estrogenowy, naprawa DNA

Summary: UBC9 is an E2 conjugating enzyme that transfers the activated SUMO (small ubiquitin-related modifier) to protein substrates, and thus it plays a key role in sumoylation. The SUMO modification is shown to be involved in BRCA1 regulation of gene expression and maintenance of genome stability. BRCA1 is modified by SUMO in response to genotoxic stress and co-localizes at site of DNA damage with SUMO proteins and UBC9. Analysis of UBC9 and BRCA1 proteins interactions demonstrate that UBC9 is required for BRCA1 ubiquitin ligase activity. Furthermore, UBC9 with BRCA1 are found in the nuclear *foci*, where the repair of DNA double-strand breaks is carried out. Interestingly, UBC9 protein interacts with BRCA1 and affects its activity not only in the context of sumoylation reaction, but also in SUMO-independent manner. Reports on these interactions between UBC9 and BRCA1 proteins show the new light on the complex process of carcinogenesis.

Key words: UBC9, BRCA1, BARD1, sumoylation, estrogen receptor, DNA repair

WSTĘP

Białka powstające na rybosomach w procesie translacji są nieaktywne, i zanim będą mogły pełnić swe rozmaite funkcje, a także osiągnąć odpowiednią lokalizację w komórce poddawane są obróbce potranslacyjnej. Można więc powiedzieć, że modyfikacje potranslacyjne białek są kolejnym etapem procesu ekspresji genomu. Do mechanizmów obróbki potranslacyjnej białek zalicza się: fałdowanie, cięcie proteolityczne, modyfikacje chemiczne i wycinanie intein. Szczególnym typem zmian, którym podlegają białka, są modyfikacje polegające na przyłączeniu innego białka. Do tego typu modyfikacji należy sumoilacja polegająca na kowalencyjnym przyłączeniu białek SUMO (ang. *Small Ubiquitin-Like Modifier*). Białka SUMO są to niewielkie, podobne do ubikwityny polipeptydy, które na drodze enzymatycznej przyłączane są do białka docelowego w postaci jednej cząsteczki lub łańcucha cząsteczek. Zidentyfikowano je pod koniec lat 90. ubiegłego wieku. Sumoilacja, tak jak ubikwitylacja, zachodzi z udziałem trzech, podobnych grup enzymów. Obecnie znamy setki substratów dla białek SUMO. Są to głównie białka jądrowe, które biorą udział w podstawowych procesach komórkowych, takich jak replikacja i naprawa DNA, regulacja transkrypcji, a także kształtowanie przestrzennej organizacji chromatyny.

Jednym z białek ulegających sumoilacji jest BRCA1 (ang. *Breast Cancer type 1 susceptibility protein*). Opisane w pracy wyniki badań wskazują, że mutacje w genie *BRCA1* mogą wpływać na aktywność transkrypcyjną receptora estrogenowego ER- α w komórkach raka piersi, zależnie bądź niezależnie od sumoilacji [35, 46]. Zaburzenia aktywności białka BRCA1 mogą prowadzić do powstania dwóch typów nowotworów – ER- α -negatywnego lub ER- α -pozytywnego raka piersi. Rak piersi jest jedną z najczęstszych przyczyn umieralności kobiet z powodu choroby nowotworowej. W Polsce co roku diagnozuje się około 15 tys. nowych zachorowań na ten typ raka. U 80-90% kobiet, u których stwierdza się mutacje germinalne w genie *BRCA1* rozpoznawany jest potrójnie negatywny rak piersi (ang. *Triple Negative Breast Cancer, TNBC*). Ten typ raka piersi odnosi się do guzów, w przypadku których nie stwierdza się ekspresji receptorów estrogenów, receptora progesteronu oraz receptora naskórkowego czynnika wzrostu HER2 (ang. *Human Epidermal growth factor Receptor 2*) w analizach immunohistochemicznych [32]. Potrójnie negatywny rak piersi cechuje się agresywnym przebiegiem i złym rokowaniem. Rozpoznaje się go u pacjentek w wieku poniżej 50 roku życia. Zrozumienie znaczenia sumoilacji białek biorących udział w sygnalizacji estrogenowej może przyczynić się do powstania nowych terapii leczenia różnych postaci raka piersi, w tym szczególnie niebezpiecznego raka o fenotypie TNBC.

SUMOILACJA

Grupa białek SUMO obejmuje niewielkie cząsteczki (masa cząsteczkowa około 10 kDa), wykazujące strukturalne podobieństwo do ubikwityny. U człowieka zidentyfikowano cztery izoformy białka SUMO – SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3 i SUMO-4, z których SUMO-2 i SUMO-3 cechują się 97% podobieństwem sekwencji. Udział białka SUMO-4 w procesie sumoilacji jest wciąż przedmiotem badań, jego struktura zdaje się uniemożliwiać tworzenie wiązania z cząsteczką potencjalnego substratu [14, 33].

Cykl sumoilacji poprzedzony jest aktywacją białka SUMO, która polega na usunięciu C-końca białka i odsłonięciu dwóch cząsteczek glicyny. Aktywację tę przeprowadzają proteazy SENP (ang. *Sentrin/SUMO-specific Protease*). Następnie białko SUMO ulega związaniu przez heterodimerski enzym E1 – SAE (ang. *SUMO-Activating Enzyme*), składający się z podjednostek SAE1 i SAE2. Z udziałem ATP powstaje kompleks SUMO-E1, w którym cysteina w pozycji 173 (Cys173) podjednostki SAE2 wiąże się wiązaniem tioestrowym z glicyną w pozycji 97 (Gly97) w C-końcu białka SUMO. Kolejny etap stanowi przeniesienie białka SUMO na enzym koniugujący E2, tj. białko UBC9 (ang. *SUMO-E2-conjugating enzyme*). Powstaje kompleks SUMO-UBC9 dzięki wiązaniu tioestrowemu między Gly97 w białku SUMO i Cys93 w zachowanym ewolucyjnie motywie w N-końcu białka UBC9. Enzym ten katalizuje utworzenie wiązania izopeptydowego między grupą karboksylową glicyny na C-końcu białka SUMO i grupą ε-aminową lizyny w białku docelowym [13]. Białko UBC9 przyłącza białko SUMO także za pośrednictwem wiązań niekowalencyjnych [15]. W tego typu interakcji białko SUMO przyłącza się do miejsca leżącego naprzeciwko Cys93 w UBC9. W oddziaływaniu niekowalencyjnym UBC9 z SUMO ważną rolę odgrywają następujące aminokwasy UBC9: Arg13, Arg17, Phe22 i Gly23 [5, 15]. W warunkach *in vitro* szlak sumoilacji może opierać się wyłącznie na enzymach E1 i E2; *in vivo* często niezbędny jest udział czynnika E3, pełniącego funkcję ligazy. W roli E3 najczęściej występują białka PIAS (ang. *Protein Inhibitor of Activated STAT*), białko RanBP2 (Nup358) (ang. *Ran-Binding Protein 2*) i białko Pc-2 należące do rodziny białek *Polycomb*.

Klasyczną sekwencją, w obrębie której dochodzi do sumoilacji jest sekwencja: $\Psi\text{LysXGlu/Asp}$ ($\Psi\text{KXE/D}$), gdzie Ψ oznacza aminokwas hydrofobowy, taki jak izoleucyna, leucyna czy walina, w miejscu X może występować dowolny aminokwas. Wyróżnia się również odwrócony motyw sumoilacji: $\text{Glu/AspXLys}\Psi$ ($\text{E/DXK}\Psi$) oraz motywy rozszerzone: ujemnie naładowany motyw: $\Psi\text{LysXGluXX}(\text{Glu/Asp})_n$ ($\Psi\text{KXEXX}(\text{E/D})_n$) (ang. *negatively charged amino acid-dependent small ubiquitin-li-*

ke modifier (SUMO)-conjugation motif, NDSM) lub motyw zależny od fosforylacji: Ψ LysXGluXXSer/Thr (Ψ KXEXXS/T), zawierający podatną na fosforylację cząsteczkę seryny lub treoniny (ang. *Phosphorylation-Dependent Sumoylation Motifs*, PDSM) [47].

Proteazy SENP, istotne na etapie aktywacji prekursorowego białka SUMO, biorą również udział w desumoilacji, pozwalając na szybkie odwrócenie modyfikacji substratu i odłączenie cząsteczki SUMO. Enzymy SENP różnią się między sobą strukturą, powinowactwem do konkretnych izoform białka SUMO i lokalizacją w komórce [48].

BIĄŁKO UBC9

Kluczowym enzymem cyklu SUMO jest białko UBC9, stanowiące niezbędny element kaskady enzymatycznej. U człowieka gen kodujący białko UBC9 zlokalizowany jest na chromosomie 16, na krótkim ramieniu w prążku 16p13.3. Jest to nieduży gen składający się z 10 eksonów i 6 intronów. Produktem genu *UBC9* jest białko złożone z 158 aminokwasów o masie cząsteczkowej 18 kDa. W białku UBC9 wyróżniamy dwa rodzaje struktur drugorzędowych: cztery α -helisy i cztery β -harmonijki. Pierwsza α -helisa utworzona jest przez aminokwasy od 1-18, druga 109-121, trzecia 131-139 i czwarta 141-154. Cztery struktury β -harmonijki utworzone są przez aminokwasy: 25-30, 36-46, 57-63 i 74-77 i znajdują się w N-końcu białka [44].

Badania dążące do identyfikacji promotora i czynników transkrypcyjnych dla genu *UBC9* pozwoliły stwierdzić, że w komórkach raka piersi MCF-7 w roli regulatorów występują receptor estrogenowy ER- α (ang. *Estrogen Receptor alpha*) i białko NF-Y (ang. *Nuclear Factor Y*), wiążące się do *cis*-elementów (odpowiednio: ERE i dwóch sekwencji CCAAT-box). Dodatkowo aktywność promotora *UBC9* aktywuje 17 β -estradiol [49].

Białko UBC9 człowieka i drożdży ulega autosumoilacji, ale w różnych miejscach; u człowieka modyfikacji ulega Lys14, u drożdży Lys153 [16]. Autosumoilacja nie hamuje aktywności enzymatycznej UBC9, ma natomiast wpływ na przebieg sumoilacji innych białek. Badania wskazują, że autosumoilacja UBC9 silnie wzmacnia sumoilację antygenu jądrowego Sp100 (ang. *Speckled protein of 100 kDa*), który m.in. bierze udział w odpowiedzi antywirusowej.

Enzym UBC9 jest cząsteczką wielofunkcyjną. Jest jedynym białkiem pełniącym funkcję enzymu koniugującego E2 w reakcji sumoilacji. Wyciszenie ekspresji genu *Ubc9* u myszy, a co za tym idzie upośledzenie procesu sumoilacji, prowadzi do wielu zaburzeń na poziomie komórkowym – niewłaściwej struktury jądra i jąderka, błędów podczas kondensacji chromatyny i segregacji chromosomów czy

zaburzeń transportu między jądrem komórkowym a cytoplazmą. W przypadku drożdży obserwowano zahamowanie cyklu komórkowego na etapie G2/M i zmianą morfologię komórki. Również w przypadku zmutowanych osobników *D. melanogaster* i *C. elegans* pozbawionych genu *Ubc9* rozwój był zaburzony, co prowadziło m.in. do niewłaściwej budowy larw. Na mysim modelu wykazano ponadto ważną rolę Ubc9 w rozwoju zarodkowym na etapie tworzenia łożyska, implantacji zarodka i utrzymania rozwijającego się embrionu [17, 30]. Doświadczenia oparte na zastosowaniu siRNA potwierdziły istotność UBC9 w epigenetycznym wyciszaniu genów. Brak sumoilacji deacetylazy histonów HDAC1 (ang. *Histone Deacetylase 1*) czy białka wiążącego się do wysp CpG – MBD1 (ang. *Methyl-Binding Domain protein 1*) prowadzi do nieefektywnego procesu ich wyciszenia i w konsekwencji do reaktywacji ekspresji genów [34].

Liczne badania wykazały, że białko UBC9 ulega nadekspresji w nowotworach, w raku jajnika [24, 36], piersi [35], płuc [21], głowy i szyi [37] oraz w czerniaku [28]. Nadekspresja UBC9 może wskazywać na znaczącą rolę tego białka w biologii komórki nowotworowej. Potwierdzają to liczne badania, w których wykazano m.in. udział białka UBC9 w progresji nowotworów i oporności na chemioterapię [6, 19, 23, 29, 37, 50].

BIAŁKO BRCA1

Białko BRCA1 człowieka kodowane jest przez gen *BRCA1* zlokalizowany na chromosomie 17. Gen ten zawiera 24 eksony, z których 22 to eksony kodujące. Gen *BRCA1* koduje białko o masie cząsteczkowej około 220 kDa złożone z 1863 aminokwasów [31]. Zidentyfikowano kilka naturalnie występujących izoform białka BRCA1, wśród których wyróżnia się dwie główne izoformy, tj. BRCA1a/p110 i BRCA1b/p100. Izoforymy te różnią się od białka BRCA1 brakiem znacznej części najdłuższego kodującego eksonu 11 (między aminokwasami 263-1365) (BRCA1a) i dodatkowo eksonów 9 i 10 (BRCA1b) [20].

BRCA1 jest białkiem supresorowym, kodowanym przez gen należący do grupy tzw. genów opiekuńczych (ang. *caretaker gene*) [38]. Nieprawidłowości związane z funkcjonowaniem BRCA1 wiąże się ze wzrostem prawdopodobieństwa wystąpienia nowotworów piersi, jajników, prostaty, jelita grubego i trzustki. Na poziomie molekularnym białko BRCA1 przejawia kilka aktywności. Wykazano, że oddziałuje ono z białkiem p53, czynnikiem transkrypcyjnym o właściwościach supresorowych, co przekłada się na wpływ białka BRCA1 na indukcję apoptozy, naprawę DNA oraz kontrolę cyklu komórkowego [39, 45]. Najszerzej zbadaną funkcją białka BRCA1 w naprawie DNA jest rola w naprawie dwuniciowych pęknięć DNA. W przypadku pęknięć dwuniciowych możliwe są dwie ścieżki naprawy

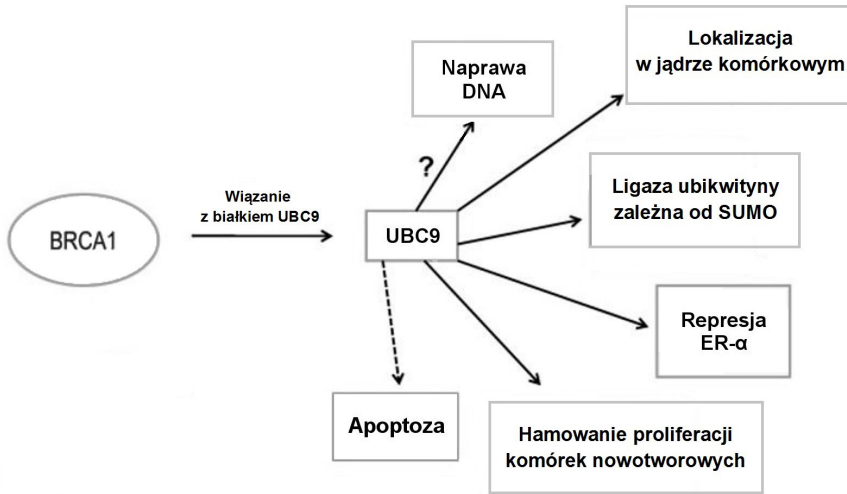
– naprawa przez rekombinację homologiczną (ang. *Homologous Recombination Repair*, HRR) lub naprawa przez łączenie niehomologicznych końców (ang. *Non Homologous End-Joining*, NHEJ). Wybór mechanizmu naprawy zależy m.in. od fazy cyklu komórkowego. Udział białka BRCA1 implikuje proces rekombinacji homologicznej. W trakcie reakcji komórki na uszkodzenia DNA białko BRCA1 zaangażowane jest w trzy kompleksy białkowe o różnych funkcjach, tj. kontrolę punktu kontrolnego G2/M cyklu komórkowego, lokalizację uszkodzenia przez białka BARD1 (ang. *BRCA1-Associated RING Domain protein 1*), BRCA2 (ang. *Breast Cancer type 2 susceptibility protein*) i RAD51 (ang. *Rad51 S. cerevisiae, RecA E. coli homolog*) oraz aktywację miejsca startu replikacji [11]. W oddziaływaniach BRCA1 z innymi białkami ważną rolę odgrywa domena RING zawierająca zachowany ewolucyjnie motyw palca cynkowego C3HC4 typu pierścieniowego, w którym występują dwa miejsca wiązania cynku. Domena ta pozwala na interakcję BRCA1 m. in. z białkiem BARD1 (również posiadającym domenę RING). Utworzenie heterodimeru zapewnia większą stabilność i umożliwia transport kompleksu do miejsca pęknięcia nici DNA [18].

ROLA BIAŁKA UBC9 W TRANSPORCIE BRCA1 DO JĄDRA KOMÓRKOWEGO

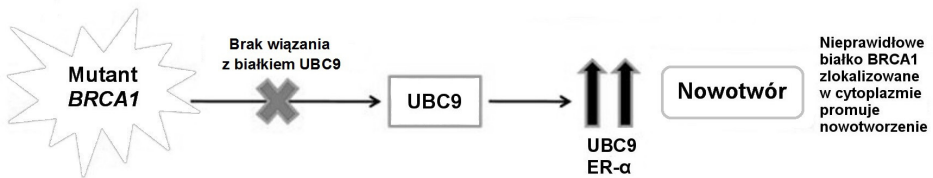
Białko UBC9 jest istotnym, a w niektórych przypadkach niezbędnym elementem umożliwiającym transport BRCA1 do jądra komórkowego. Białko BRCA1 to przede wszystkim białko jądrowe, ale może ono także występować w cytoplazmie i mitochondriach [4]. W niektórych typach nowotworów piersi stwierdzono gromadzenie się tego białka w cytoplazmie [3]. Obserwacje te sugerują, że zaburzenie transportu BRCA1 do jądra komórkowego może być czynnikiem związanym z rozwojem raka.

Przemieszczanie się białka BRCA1 między jądrem komórkowym i cytoplazmą możliwe jest za pośrednictwem dwóch sygnałów lokalizacji jądrowej NLS (ang. *Nuclear Localization Signal*) i sygnału eksportu z jądra NES (ang. *Nuclear Export Signal*). Sygnały NLS i NES zlokalizowane są między następującymi resztami aminokwasowymi: NLS1 501-507, NLS2 607-614, NES1 22-30 i NES2 81-99 [43]. Białko BRCA1 wnika do jądra komórkowego poprzez związanie importyny α , która następnie przyłącza importynę β . W transporcie BRCA1 do jądra komórkowego bierze udział także białko BARD1 [7, 43]. Izoforny BRCA1 nie posiadające sygnałów NLS mogą być transportowane do jądra komórkowego dzięki przyłączeniu się do białka BARD1 poprzez domenę RING [7]. Alternatywna droga transportu prowadzi przez importynę 13, należącą do rodziny importyn β , której substratem jest m.in. białko UBC9 [22]. Poprzez związanie BRCA1 do

A



B



RYCINA 1. Hipotetyczny model przedstawiający funkcjonalne znaczenie interakcji białek UBC9 i BRCA1. Przyłączenie UBC9 do BRCA1 powoduje m.in. represję aktywności receptora ER-α i zahamowanie wzrostu komórek (A). Nieprawidłowe białko BRCA1 nie wiąże się z UBC9, co prowadzi do aktywacji receptora ER-α, lokalizacji cytoplazmatycznej i w konsekwencji do raka (B)

FIGURE 1. Hypothetical model showing how BRCA1, by binding to UBC9 regulates ER-α activity resulting in tumor suppression (A). Mutant BRCA1 is unable to interact with UBC9 resulting in deregulated levels of UBC9, which activates ER-α resulting in cancer (B)

UBC9 możliwy jest import kompleksu do jądra komórkowego – w przypadku izoform BRCA1a i BRCA1b jest to prawdopodobnie jedyny sposób transportu. Qin i wsp. (2011) wykazali, że w komórkach COS-1 transfekowanych fragmentami kodującymi białko BRCA1 oraz jego izoformę BRCA1a lub zawierającymi zmutowane geny *BRCA1/1a* i *BRCA1/1a* (Cys61Gly) występuje istotna różnica w lokalizacji badanych białek [35]. W komórkach transfekowanych *BRCA1/1a* (Lys109Arg) lub *BRCA1/1a* (Cys61Gly) obserwowano znacznie większe ilości białka w cytoplazmie w porównaniu do lokalizacji jądrowej. Prawidłowe białko BRCA1, jak również jego izoforma BRCA1a występowały zarówno w jądrze, jak i w cytoplazmie. Ten sam zespół przeprowadził także doświadczenie z komórkami COS-1, w których dochodziło do ekspresji genu *BRCA1* bez sekwencji

NLS (BRCA1/NLS⁻) [35]. W komórkach tych około 53% nieprawidłowego białka BRCA1/NLS⁻ odnajdywano w cytoplazmie. Co więcej wykazano, że w tych samych komórkach, w których dochodziło do koekspresji białka UBC9, poziom BRCA1/NLS⁻ w cytoplazmie wynosił zaledwie 11%. Wyciszenie ekspresji genu *UBC9* w komórkach MCF-7 prowadziło do akumulacji białka BRCA1 oraz jego izoform BRCA1a i BRCA1b w cytoplazmie. Dane te jednoznacznie wskazują, że białko UBC9 bierze udział w transporcie BRCA1 do jądra komórkowego. W przypadku izoform BRCA1, które nie mają sygnałów NLS, transport z udziałem UBC9 jest jedynym możliwym sposobem dotarcia do jądra. Wskazują one także na podobną do roli białka BARD1, rolę UBC9 w transporcie jądrowym BRCA1 zależnym jedynie od domeny RING. Wyniki przytoczonych badań zostały potwierdzone w badaniach na różnych liniach komórkowych, tj. MCF-10A (prawidłowe komórki nabłonkowe piersi), MCF-7 (komórki raka piersi), LNCaP i PC-3 (komórki raka prostaty), NIHOVCAR3 (komórki raka jajnika) i HCC-70 komórki raka piersi o fenotypie TNBC [35].

Białka BRCA1 i BRCA1a indukują apoptozę i hamują wzrost komórek raka piersi w obecności estrogenu [42]. Przeciwny efekt polegający na promowaniu wzrostu i przeżycia komórek raka piersi zaobserwowano w przypadku braku interakcji z białkiem UBC9 (ryc. 1). Wyniki eksperymentów dotyczących wpływu na transformację i wzrost komórek nowotworowych wskazują jednoznacznie, że białka BRCA1/1a (Lys109Arg) i BRCA1/1a (Cys61Gly) promują transformację komórek MCF-7 *in vitro*, zwiększają przeciętny rozmiar kolonii komórkowych i zwiększają przeżycie komórek w warunkach ograniczonej dostępności składników odżywczych. W komórkach z ekspresją mutantów *BRCA1a*, liniach komórkowych raka piersi i w komórkach pochodzących z guzów piersi stwierdzono ponadto zwiększony poziom białek UBC9 i ER- α [35].

ODDZIAŁYWANIE BIAŁEK UBC9 I BRCA1 W SYGNALIZACJI ESTROGENOWEJ

Temat interakcji UBC9 z BRCA1 w kontekście estrogenozależnego raka piersi poruszony został w badaniach Xu i wsp. (2009) [46]. Zespół ten zidentyfikował konsensusową sekwencję Ψ LysXGlu (Ψ KXE) w N-końcu białek BRCA1/1a/1b, umożliwiającą ich sumoilację. Dowiedziono istotności lizyny w pozycji 109 (Lys109), poprzez porównanie zdolności wiązania UBC9 przez BRCA1 oraz izoformy BRCA1a i BRCA1b w porównaniu z białkiem, w którym Lys109 zastąpiono arginina (Lys109Arg). Tylko prawidłowe białka BRCA1/1a/1b wiązały UBC9. Inna z badanych mutacji *BRCA1* (Cys61Gly) występująca u pacjentek z rakiem piersi powoduje utratę zarówno aktywności ligazy ubikwityny, jak i zdolności BRCA1 do hamowania aktywności receptora ER- α [9]. Zaobserwowano ponad-

to, że mutacja ta uniemożliwia wiązanie białka UBC9. Dalsze analizy wykazały, że dla interakcji białek BRCA1/1a/1b z UBC9 i z receptorem ER- α wystarczający jest N-końcowy fragment BRCA1 o długości 182 aminokwasów. Fragment ten obejmujący eksony 2-8 jest zachowany we wszystkich izoformach BRCA1. Przytoczone dane wskazują na związek między utratą aktywności ligazy ubikwityny i zdolnością do hamowania aktywności receptora ER- α białka BRCA1 a możliwością wiązania UBC9. Obserwacja ta prowadzi do hipotezy o współzawodnicztwie pomiędzy ER- α i UBC9 w przyłączaniu się do regionu aminokwasowego 1-182 białka BRCA1. Kolejne eksperymenty potwierdziły, że zarówno białko UBC9 jak i UBC9 (Cys93Ser) hamują interakcje między BRCA1 (aa 1-182) a receptorem ER- α (aa 338-379), a co za tym idzie zmniejszają hamowanie aktywności ER- α przez BRCA1 [46].

Receptor ER- α jest czynnikiem transkrypcyjnym, który ulega różnym modyfikacjom potranslacyjnym, m. in. fosforylacji, acetylacji i sumoilacji, które regulują jego aktywność. Badania przeprowadzone na komórkach HeLa wykazały, że sumoilacja receptora ER- α i jego kofaktorów prowadzi do represji aktywności [40]. Podobny wyniki zaobserwowali Xu i wsp. (2009) w komórkach raka piersi T47D wykazujących ekspresję receptora ER- α . Koekspresja białek SUMO-1 i UBC9 skutkowałą represją receptora, natomiast koekspresja z białkiem UBC9 Cys93Ser, niezdolnym do wiązania białka SUMO-1, nie wpływała w istotny sposób na aktywność receptora ER- α . Wynik ten świadczy o udziale procesu sumoilacji w hamowaniu aktywności receptora ER- α [46].

Białko BRCA1 hamuje aktywność receptora ER- α indukowaną przez estrogen [8]. Jednakże w obecności białek UBC9 i SUMO-1, BRCA1 może zmniejszać efekt represji receptora ER- α spowodowany jego sumoilacją. Wyciszenie ekspresji genu *UBC9* prowadzi do braku represji BRCA1 w stosunku do receptora ER- α [35].

Białko BRCA1 tworząc poprzez domenę RING kompleks z białkiem BARD1, wykazuje aktywność ligazy ubikwityny [12]. Substratem dla kompleksu BRCA1/BARD1 jest receptor ER- α . Mutacje predysponujące do raka, które występują w domenie RING białka BRCA1 uniemożliwiają ubikwitylację receptora ER- α przez kompleks BRCA1-BARD1, jak również hamują jego transkrypcyjną represję. Xu i wsp. (2009) przeprowadzili badania mające na celu zbadanie wpływu białka UBC9 na degradację receptora ER- α [46]. Do badań tych wykorzystano komórki COS-1 transfekowane fragmentami kodującymi receptor ER- α oraz białka SUMO-1, UBC9 lub UBC9 (Cys93Ser), BRCA1a lub BRCA1a (Lys109Arg). Istotnie niski poziom receptora ER- α stwierdzono w komórkach, w których dochodziło do jednoczesnej ekspresji SUMO-1, białka BRCA1a i dowolnej formy UBC9. Wyniki tych badań sugerują istnienie nowego mechanizmu angażującego BRCA1/1a/1b, jako ligazę ubikwityny, i białko UBC9 w proces ubikwitylacji i degradacji receptora ER- α . Ponieważ UBC9 wykazuje dwoistą aktywność, zależną bądź niezależną od reakcji sumoilacji, zaburzenie aktywności BRCA1 może

prowadzić do powstania dwóch typów nowotworów piersi. W przypadku aktywności UBC9 związanej z sumoilacją dysfunkcja BRCA1 prowadzi do ER- α -negatywnego raka piersi. Brak aktywności BRCA1 w tej sytuacji przekłada się na brak sygnału do ubikwitylacji i degradacji cząsteczek ER- α . Z drugiej strony białko UBC9 w obecności estrogenu może działać jako koaktywator ER- α . Zaburzenia aktywności białka BRCA1, funkcjonującego jako represor, mogą skutkować ER- α -pozytywnym rakiem piersi [35, 46]. Zestawienie różnic funkcjonalnych między prawidłowym białkiem BRCA1/1a i jego dwiema zmienionymi cząsteczkami BRCA1/1a (Lys109Arg) i BRCA1/1a (Cys61Gly) przedstawiono w tabeli 1.

TABELA 1. Zestawienie różnic funkcjonalnych między prawidłowym białkiem BRCA1/1a i jego dwiema zmienionymi cząsteczkami BRCA1/1a (Lys109Arg) i BRCA1/1a (Cys61Gly) [35]

TABLE 1. Summary of functional differences between wild-type and mutant BRCA1/BRCA1a proteins (Lys109Arg) and (Cys61Gly) [35]

| | BRCA1/1a | BRCA1/1a (Lys109Arg) | BRCA1/1a (Cys61Gly) | Literatura |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------|
| Wiązanie białka UBC9 | + | - | - | [46] |
| Wiązanie receptora ER- α (aa 337-379) | + | - | - | [39, 46] |
| Represja aktywności receptora ER- α | + | - | - | [39, 46] |
| Wiązanie białka UBC9 (Cys93Ser) | + | - | - | [46] |
| Hamowanie represji receptora ER- α w obecności białka UBC9 | + | - | - | [46] |
| Represja aktywności receptora ER- α w obecności białka UBC9 (Cys93Ser) | + | - | - | [46] |
| Aktywność ligazy ubikwityny | + | - | - | [12, 46] |
| Hamowanie proliferacji komórek | + | - | - | [35] |
| Lokalizacja komórkowa | Jądro i cytoplazma | Wzmoczona/ Wyłącznie cytoplazma | Wzmoczona/ Wyłącznie cytoplazma | [35] |
| Promowanie proliferacji komórek | - | + | + | [35] |

ROLA SUMOILACJI W NAPRAWIE DNA ZACHODZĄCEJ Z UDZIAŁEM BIAŁKA BRCA1

Dwuniciowe pęknięcia DNA należą do najgroźniejszych uszkodzeń DNA. Mogą być indukowane endogennie przez np. wolnorodnikowe produkty metabolizmu komórki lub na skutek zatrzymania widełek replikacyjnych. Dwuniciowe pęknięcia DNA mogą powstawać także spontanicznie w obrębie przestrzennych struktur DNA, odmiennych od kanonicznej struktury B-DNA [2]. Do czynników pochodzenia zewnętrznego indukujących ten typ uszkodzeń DNA zalicza się m. in. promieniowanie jonizujące, inhibitory topoizomeraz oraz bleomycynę. Nienaprawione dwuniciowe pęknięcia DNA mogą prowadzić do transformacji nowotworowej przez aktywację onkogenów, inaktywację genów supresorowych lub utratę heterozygotyczności.

Naprawa dwuniciowych pęknięć DNA odbywa się za pośrednictwem dwóch różnych procesów – rekombinacji homologicznej i niehomologicznego łączenia końców. Białko BRCA1 za pośrednictwem białka BRCA2 przez reszty aminokwasowe w pozycjach 758-1064, oddziałuje z białkiem RAD51, które jest głównym białkiem naprawy DNA przez rekombinację homologiczną. Obok udziału w naprawie dwuniciowych pęknięć DNA przez rekombinację homologiczną, białko BRCA1 oddziałuje w kompleksie BASC (ang. *BRCA1-Associated genome Surveillance Complex*) także z białkami innego systemu naprawy DNA, tj. naprawy błędnie sparowanych zasad azotowych (ang. *Mismatch Repair*, MMR). Naprawa dwuniciowych pęknięć DNA jest procesem regulowanym przez fosforylację i ubikwitylację uczestniczących w niej białek. W reakcji na uszkodzenie DNA białko BRCA1 jest fosforylowane przez kinazy ATM (ang. *Ataxia Telangiectasia Mutated*), ATR (ang. *Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein*) i CHK2 (ang. *cell cycle Checkpoint Kinase 2*). W ten sposób sygnał o uszkodzeniu DNA jest przekazywany innym białkom naprawczym [31]. Ponadto, jak już wspomniano wcześniej, białko BRCA1 tworząc poprzez domenę RING kompleks z białkiem BARD1, wykazuje aktywność ligazy ubikwityny [12]. Aktywność ta pozwala na przyłączenie cząsteczek ubikwityny do białek znajdujących się w miejscu dwuniciowego pęknięcia DNA [25]. Utrata aktywności ligazy ubikwityny przez białko BRCA1 wiąże się ze zwiększoną predyspozycją do zachorowania na raka piersi [26].

W pierwszym etapie naprawy dwuniciowych pęknięć DNA dochodzi do przyłączenia białka MDC1 (ang. *Mediator of DNA damage Checkpoint 1*) do ufosforylowanego histonu H2AX (γ -H2AX). Białko MDC1 rekrutuje do miejsca uszkodzenia ligazę RNF8 (ang. *RING Finger protein 8*), która generuje fragment poliubikwitynowy przyłączając go do kompleksu białek RAP80 (ang. *Receptor-Associated Protein 80*)/ABRAXAS (ang. *BRCA1-BRCT domain-interacting protein*). Aktywność drugiej ligazy ubikwityny, tj. białka RNF168 (ang. *RING Finger protein 168*) stabilizuje

łańcuch ubikwitynowy i pomaga w rekrutacji BRCA1. Tak więc, BRCA1 jest trzecią w kolejności ligazą ubikwitynową rekrutowaną do miejsca uszkodzenia DNA [27].

Badania przeprowadzone w ostatnich latach wykazały, że w procesie naprawy DNA z udziałem białka BRCA1 istotną rolę, obok innych modyfikacji białek, odgrywa także sumoilacja. Stwierdzono, że przyłączenie białka SUMO zwiększa aktywność BRCA1 jako ligazy ubikwitynowy, co pozwala uznać BRCA1 za białko regulowane przez SUMO – SRUbL (ang. *SUMO-Regulated Ubiquitin ligase*) [27]. Badania wykazały ponadto, że białka SUMO-1, SUMO-2/3 oraz UBC9 kolokalizują z BRCA1 w miejscu dwuniciowego pęknięcia DNA. Istotna jest również rola ligaz SUMO – PIAS1 i PIAS4, które odnajdywane są w miejscu uszkodzenia DNA. Modułują one aktywność BRCA1 i są niezbędne dla prawidłowej lokalizacji BRCA1 w miejscu uszkodzenia DNA. Ich brak powoduje obniżenie poziomu naprawy DNA, zarówno przez rekombinację homologiczną, jak i łączenie niehomologicznych końców [10, 27]. Niedawno wykazano także, że białka SUMO-1, UBC9 oraz ligazy SUMO – PIAS1 i PIAS4 są niezbędne do przyłączenia się białka RAD51 w miejscu dwuniciowego pęknięcia DNA [41].

PODSUMOWANIE

W pracy przedstawiono doniesienia z ostatnich kilku lat na temat oddziaływania białka UBC9 z białkiem BRCA1. Białko UBC9, które ulega nadekspresji w wielu typach nowotworów wpływa na aktywność BRCA1 zarówno, jako enzym koniugujący w reakcji sumoilacji, jak również niezależnie od tej reakcji. Badania wskazują, że zaburzenia interakcji między tymi białkami, wynikające na przykład z mutacji w genie BRCA1, mają znaczenie w przebiegu raka piersi.

Zrozumienie interakcji między białkami UBC9 i BRCA1 może przyczynić się do opracowania testów pomocnych w terapii nowotworów. Pierwsze kroki w tym kierunku poczyniono już w USA, gdzie opracowano test prognostyczny oparty na badaniu interakcji białek UBC9 i BRCA1 (ang. *BRCA1 function-based cellular assay*) (Patent nr US 8 372 580) [1].

LITERATURA

- [1] AYSOLA K, DESAI A, WELCH C, XU J, QIN Y, REDDY V, MATTHEWS R, OWENS C, OKOLI J, BEECH DJ, PIYATHILAKE CJ, REDDY SP, RAO VN. Triple negative breast cancer – An overview *Hereditary Genet* 2013; doi:10.4172/2161-1041.S2-001.
- [2] BACOLLA A, WELLS RD. Non-B DNA conformations as determinants of mutagenesis and human disease. *Mol Carcinog* 2009; **48**: 273-285.
- [3] BOGDANI M, TEUGELS E, DE GREVE J, BOURGAIN C, NEYNS B, PIPELEERS-MARICHAL M. Loss of nuclear BRCA1 localization in breast carcinoma is age dependent. *Virchows Arch* 2002; **440**: 274-279.

- [4] COENE E, HOLLINSHEAD M, WAeyTENS A, SCHELFHOUT V, EECHAUTE W, SHAW M, VAN OOSTVELDT P, VAUX D. Phosphorylated BRCA1 is predominantly located in the nucleus and mitochondria. *Mol Biol Cell* 2005; **16**: 997-1010.
- [5] DUAN X, TRENT JO, YE H. Targeting the SUMO E2 conjugating enzyme Ubc9 interaction for anti-cancer drug design. *Anti-Cancer Agents Med Chem* 2009; **9**: 51-54.
- [6] DÜNNEBIER T, BERMEJO JL, HAAS S, FISCHER HP, PIERL CB, JUSTENHOVEN C, BRAUCH H, BAISCH C, GILBERT M, HARTH V, SPICKENHEUER A, RABSTEIN S, PESCH B, BRUNING T, KO YD, HAMANN U. Common variants in the *UBC9* gene encoding the SUMO-conjugating enzyme are associated with breast tumor grade. *Int J Cancer* 2009; **125**: 596-602.
- [7] FABBRO M, RODRIGUEZ JA, BAER R, HENDERSON BR. BARD1 induces BRCA1 intranuclear foci formation by increasing RING-dependent BRCA1 nuclear import and inhibiting BRCA1 nuclear export. *J Biol Chem* 2002; **277**: 21315-21324.
- [8] FAN S, WANG J-A, YUAN R, MA Y, MENG Q, ERDOS MR, PESTELL RG, YUAN F, AUBORN KJ, GOLDBERG ID, ROSEN EM. BRCA1 inhibition of estrogen receptor signaling in transfected cells. *Science* 1999; **284**: 1354-1356.
- [9] FAN S, MA YX, WANG C, YUAN RQ, MENG Q, WANG JA, ERDOS M, GOLDBERG ID, WEBB P, KUSHNER PJ, PESTELL RG, ROSEN EM. Role of direct interaction in BRCA1 inhibition of estrogen receptor activity. *Oncogene* 2001; **20**: 77-87.
- [10] GALANTY Y, BELOTSERKOVSKAYA R, COATES J, POLO S, MILLER KM, JACKSON SP. Mammalian SUMO E3-ligases PIAS1 and PIAS4 promote responses to DNA double-strand breaks. *Nature* 2009; **7275**: 935-939.
- [11] GREENBERG RA, SOBHIAN B, PATHANIA S, CANTOR SB, NAKATANI Y, LIVINGSTON DM. Multifactorial contributions to an acute DNA damage response by BRCA1/BARD1-containing complexes. *Genes Devel* 2006; **20**: 34-46.
- [12] HASHIZUME R, FUKUDA M, MAEDA I, NISHIKAWA H, OYAKE D, YABUKI Y, OGATA H, OHTA T. The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *J Biol Chem* 2001; **276**: 14537-14540.
- [13] HAY RT. Decoding the SUMO signal. *Biochem Soc Trans* 2013; **41**: 463-473.
- [14] KIM JH, BAEK SH. Emerging roles of desumoylating enzymes. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1792**: 155-162.
- [15] KNIPSCHER P, VAN DIJK WJ, OLSEN JV, MANN M, SIXMA TK. Non-covalent interaction between UBC9 and SUMO promotes SUMO chain formation. *EMBO J* 2007; **26**: 2797-2807.
- [16] KNIPSCHER P, FLOTHO A, KLUG H, OLSEN JV, VAN DIJK WJ, FISH A, JOHNSON ES, MANN M, SIXMA TK, PICHLER A. Ubc9 sumoylation regulates SUMO target discrimination. *Mol Cell* 2008; **31**: 371-382.
- [17] KUEHN MR. Mouse Ubc9 knockout: many path(way)s to ruin. *Develop Cell* 2005; **9**: 727-728.
- [18] LI M, YU X. Function of BRCA1 in the DNA damage response is mediated by ADP-ribosylation. *Cancer Cell* 2013; **23**: 693-704.
- [19] LU Z, WU H, MO Y-Y. Regulation of bcl-2 expression by Ubc9. *Exp Cell Res* 2006; **312**: 1865-1875.
- [20] MANICCIA AW, LEWIS C, BEGUM N, XU J, CUI J, CHIPITSYNA G, AYSOLA K, REDDY V, BHAT G, FUJIMURA Y, HENDERSON B, REDDY ES, RAO VN. Mitochondrial localization, ELK-1 transcriptional regulation and growth inhibitory functions of BRCA1, BRCA1a and BRCA1b proteins. *J Cell Physiol* 2009; **219**: 634-641.
- [21] MCDONIELS-SILVERS AL, NIMRI CF, STONER GD, LUBET RA, YOU M. Differential gene expression in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 2002; **8**: 1127-1138.
- [22] MINGOT JM, KOSTKA S, KRAFT R, HARTMANN E, GORLICH D. Importin 13: A novel mediator of nuclear import and export. *EMBO J* 2001; **20**: 3685-3694.
- [23] MO YY, YU Y, EE PL, BECK WT. Overexpression of a dominant-negative mutant Ubc9 is associated with increased sensitivity to anticancer drugs. *Cancer Res* 2004; **64**: 2793-2798.
- [24] MO YY, YU Y, THEODOSIOU E, EE PL, BECK WT. A role for Ubc9 in tumorigenesis. *Oncogene* 2005; **24**: 2677-2683.

- [25] MORRIS JR, SOLOMON E. BRCA1:BARB1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair. *Hum Mol Genetics* 2004; **13**: 807-817.
- [26] MORRIS JR, PANGON L, BOUTELL C, KATAGIRI T, KEEP NH, SOLOMON E. Genetic analysis of BRCA1 ubiquitin ligase activity and its relationship to breast cancer susceptibility. *Hum Mol Genet* 2006; **15**: 599-606.
- [27] MORRIS JR, BOUTELL C, KEPPLER M, DENSHAM R, WEEKES D, ALAMSHAH A, BUTLER L, GALANTY Y, PANGON L, KIUCHI T, NG T, SOLOMON E. The SUMO modification pathway is involved in the BRCA1 response to genotoxic stress. *Nature* 2009; **7275**: 886-890.
- [28] MOSCHOS SJ, SMITH AP, MANDIC M, ATHANASSIOU C, WATSON-HURST K, JUKIC DM, EDINGTON HD, KIRKWOOD JM, BECKER D. SAGE and antibody array analysis of melanoma-infiltrated lymph nodes: identification of Ubc9 as an important molecules in advanced-stage melanomas. *Oncogene* 2007; **26**: 4216-4225.
- [29] MOSCHOS SJ, JUKIC DM, ATHANASSIOU C, BHARGAVA R, DACIC S, WANG X, KUAN SF, FAYEWICZ SL, GALAMBOS C, ACQUAFONDATA M, DHIR R, BECKER D. Expression analysis of Ubc9, the single small ubiquitin-like modifier (SUMO) E2 conjugating enzyme, in normal and malignant tissues. *Hum Pathol* 2010; **41**: 1286-1298.
- [30] NACERDDINE K, LEHEMBRE F, BHAUMIK M, ARTUS J, COHEN-TANNOUDI M, BABINET C, PANDOLFI PP, DEJEAN A. The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. *Develop Cell* 2005; **9**: 769-779.
- [31] NOWACKA-ZAWISZA M, KRAJEWSKA WM. Rola białek BRCA1, BRCA2 i RAD51 w zachowaniu stabilności genomu. *Postepy Biol Kom* 2009; **36**: 679-694.
- [32] NOWACKA-ZAWISZA M, KRAJEWSKA WM. Potrójnie negatywny rak piersi: molekularna charakterystyka i potencjalne strategie terapeutyczne. *Postepy Hig Med Dosw* 2013; **67**: 1090-1097.
- [33] OWEBACH D, MCKAY EM, YEH ET, GABBAY KH, BOHREN KM. A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **337**: 517-520.
- [34] POLESHKO A, KOSSEKOV AV, SHALGINSKIKH N, PECHERSKAYA A, EINARSON MB, MARIE SKALKA A, KATZ RA. Human factors and pathways essential for mediating epigenetic gene silencing. *Epigenetics* 2014; **9**: 1280-1289.
- [35] QIN Y, XU J, AYSOLA K, BEGUM N, REDDY V, CHAI Y, GRIZZLE WE, PARTRIDGE EE, REDDY ESP, RAO VN. Ubc9 mediates nuclear localization and growth suppression of BRCA1 and BRCA1a proteins. *J Cell Physiol* 2011; **226**: 3355-3367.
- [36] QIN Y, XU J, AYSOLA K, OPREA G, REDDY A, MATTHEWS R, OKOLI J, CANTOR A, GRIZZLE WE, PARTRIDGE EE, REDDY ESP, LANDEN CH, RAO VN. BRCA1 proteins regulate growth of ovarian cancer cells by tethering Ubc9. *Am J Cancer Res* 2012; **2**: 540-548.
- [37] RONEN O, MALONE JP, KAY P, BIVENS C, HALL K, PARUCHURI LP, MO YY, ROBBINS KT, RAN S. Expression of a novel marker, Ubc9, in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 2009; **31**: 845-855.
- [38] ROSEN EM, FAN S, ISAACS C. BRCA1 in hormonal carcinogenesis: basic and clinical research. *Endocr Relat Cancer* 2005; **12**: 533-548.
- [39] ROSEN EM, FAN S, MA Y. BRCA1 regulation of transcription. *Cancer Lett* 2006; **236**: 175-185.
- [40] SENTIS S, ROMANCER ML, BIANCHIN C, ROSTAN M, CORBO L. (2005) Sumoylation of the estrogen receptor α hinge region regulates its transcriptional activity. *Mol Endocr* 2005; **19**: 2671-2684.
- [41] SHIMA H, SUZUKI H, SUN J, KONO K, SHI L, KINOMURA A, HORIKOSHI Y, IKURA T, IKURA M, KANAR R, IGARASHI K, SAITOH H, KURUMIZAKA H, TASHIRO S. Activation of the SUMO modification system is required for the accumulation of RAD51 at sites of DNA damage. *J Cell Science* 2013; **126**: 5284-5292.
- [42] THANGARAJU M, KAUFMANN SH, COUCH FJ. BRCA1 facilitates stress-induced apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines. *J Biol Chem* 2000; **275**: 33487-33496.

- [43] THOMPSON ME. BRCA1 16 years later: nuclear import and export processes. *FEBS J* 2010; **277**, 3072-3078.
- [44] TONG H, HATEBOER G, PERRAKIS A, BERNARDS R, SIXMA TK. Crystal structure of murine/human Ubc9 provides insight into the variability of the ubiquitin-conjugating system. *J Biol Chem* 1997; **272**: 21381-21387.
- [45] XU X, QIAO W, LINKE SP, CAO L, LI WM, FURTH PA, HARRIS CC, DENG CX. Genetic interactions between tumor suppressors Brca1 and p53 in apoptosis, cell cycle and tumorigenesis. *Nat Genet* 2001; **28**: 266-271.
- [46] XU J, WATKINS T, REDDY A, REDDY ESP, RAO VN. A novel mechanism whereby BRCA1/1a/1b fine tunes the dynamic complex interplay between SUMO-dependent/independent activities of Ubc9 on E2-induced ERalpha activation/repression and degradation in breast cancer cells. *Inter J Oncol* 2009; **34**: 939-949.
- [47] YANG XJ, CHIANG CM. Sumoylation in gene regulation, human disease, and therapeutic action. *F1000Prime Reports* 2013; **5**: 45.
- [48] YEH ET. SUMOylation and de-SUMOylation: wrestling with life's processes. *J Biol Chem* 2009; **284**: 8223-8227.
- [49] YING S, DÜNNEBIER T, SI J, HAMANN U. Estrogen receptor alpha and nuclear factor Y coordinately regulate the transcription of the SUMO-conjugating UBC9 gene in MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One* 2013; e75695.
- [50] ZHU S, SACHDEVA M, WU F, LU Z, MO YY. Ubc9 promotes breast cell invasion and metastasis in a sumoylation-independent manner. *Oncogene* 2010; **29**: 1763-1772.

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 26.03.2015

Przyjęto: 01.07.2015

Katarzyna Woźniak

Katedra Genetyki Molekularnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Uniwersytet Łódzki

ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź

tel.: +48-42-635-47-76

fax: +48-42-635-44-84

e-mail: wozniak@biol.uni.lodz.pl

