



Struktura i funkcja cyklofilin

Katarzyna Nuc, Ryszard Słomski

Katedra Biochemii i Biotechnologii, Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań

Structure and Function of Cyclophilins

Summary

Cyclophilins (CyPs) constitute a large class of highly conserved, ubiquitous PPlases (EC 5.2.1.8) that together with FK560 binding proteins (FKBP) and parvulins belong to a superfamily of immunophilins. These three classes of proteins are easily distinguishable by their selective interactions with immunosuppressive drugs. Cyclophilins are targets for cyclosporin A (CsA), parvulins bind juglone (5-hydroxy-1.4-naphthoquinone) and FKBP, they are inhibited either by FK560 drug or by rapamycin. Despite the lack of structural similarity, all these proteins have been shown to act as peptidylprolyl cis-trans isomerases. In all cases, binding of the drug inhibits their PPlase activity. Distinct isoforms of cyclophilins have been localized in the cytoplasm, nucleus, mitochondria, chloroplasts and endoplasmic reticulum.

Key words:

cyclophilins, immunophilins, immunosuppression.

1. Wstęp

Cyklofiliny (CyP)* należą do rodziny immunofilin, białek wpływających na proces odpowiedzi immunologicznej komórki. Badając zastosowanie różnych związków immunosupresyjnych w transplantologii wykazano, że wewnątrzkomórkowym receptorem dla cyklosporyny A (CsA) jest cyklofilina. Kompleks CyPA/CsA wpływa na proces aktywacji limfocytów T poprzez blo-

Adres do korespondencji

Katarzyna Nuc,
Katedra Biochemii
i Biotechnologii,
Akademia Rolnicza
im. Augusta Cieszkowskiego,
ul. Wołyńska 33,
Poznań.

biotechnologia

3 (58) 135–152 2002

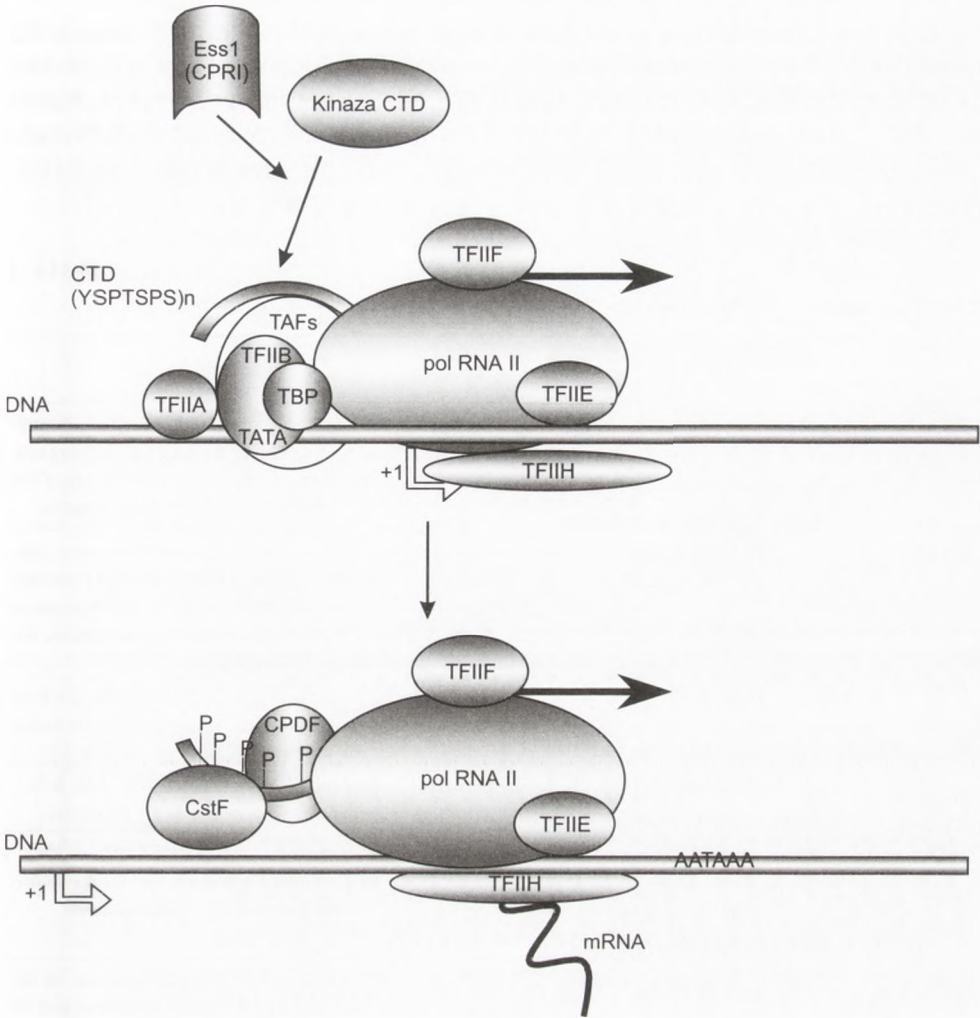
* CyP – cyklofilina, białko oddziałujące z CsA; CsA – cyklosporyna A, peptyd izolowany z grzyba *Tohyopocladium infantum*, posiada właściwości immunosu-

kowanie aktywności fosfatazy kalcyneuryny (1). W konsekwencji niemożliwa jest defosforylacja, a co za tym idzie, wejście do jądra cytoplazmatycznej podjednostki, specyficznego dla aktywnych limfocytów T, czynnika transkrypcyjnego NF-ATc regulującego ekspresję interleukiny IL-2 (2).

Jako immunofiliny klasyfikowane są również białka oddziałujące z FK506 (FKBP) (3) oraz parwuliny (4). Mimo różnej budowy wymienione białka, posiadają aktywność enzymatyczną izomerazy peptydyloproliłowej, która może być blokowana poprzez oddziaływanie ze specyficznymi immunosupresorami. Cyklofiliny są blokowane przez cyklosporynę A (CsA) (5), białko FKBP przez FK506 lub rapamycynę (6) natomiast parwuliny przez 5-hydroksy-1,4-naftochinon (7). Białka te w określonych warunkach mogą wzajemnie się zastępować. W komórkach *Saccharomyces cerevisiae* ekspresji ulega osiem różnych cyklofilin oraz cztery białka FKBP (8). Żadna z tych izomeraz nie jest niezbędna do życia drożdży. Natomiast usunięcie jednego genu kodującego parwulinę *Ess1* drożdży jest mutacją letalną (*ess1^{ts}*).

Najlepiej scharakteryzowanymi przedstawicielami parwulin są *Ess1* (*Saccharomyces cerevisiae*), *Dodo* (*Drosophila melanogaster*) oraz *Pin* (*Homo sapiens*). Charakterystycznymi elementami budowy tych białek jest obecność tzw. domeny WW w N-końcowym regionie oraz domeny izomerazy w regionie C-końcowym. Poprzez domenę WW parwuliny oddziałują z białkami zawierającymi reszty proliny poprzedzone ufosforylowanymi resztami seryny lub treoniny (9). Białko *Ess1* pełni funkcję regulatora transkrypcji. Poprzez izomeryzację odpowiednich wiązań Xaa-Pro (gdzie Xaa oznacza dowolny aminokwas) w domenie CTD (*C-terminal heptapeptide repeat domain*), *Ess1* zmienia jej konformację, przez co wpływa na możliwość oddziaływania polimerazy RNA II z licznymi białkami odpowiedzialnymi za regulację inicjacji, elongacji i terminacji transkrypcji (rys. 1). Przyłączanie białka *Ess1* do domeny CTD jest regulowane przez procesy fosforylacji i defosforylacji reszt seryny lub treoniny, prowadzonych odpowiednio przez kinazę CTD oraz fosfatazę CTD (10). Zaobserwowano, że nadekspresja genu *CPR1* kodującego cytolazmatyczną formę cyklofiliny *CyP1* powoduje zniesienie letalnego charakteru *ess1^{ts}* (11). Mimo braku potrzebnej do oddziaływania z CTD domeny WW, *CPR1* jest zdolna przejąć funkcję *Ess1* jako regulatora transkrypcji poprzez izomeryzację określonych wiązań domeny.

presyjne; FKBP – białko oddziałujące z FK 506; FK 506 – związek otrzymywany z fermentujących hodowli *Streptomyces tsukubaensis*, ma budowę antybiotyku makrolidowego, posiada właściwości immunosupresyjne; CTD – domena największej podjednostki polimerazy RNA II, zajmująca jej karboksylowy rejon; CBD – rejon cyklofilin zawierający centrum aktywne izomerazy oraz miejsce oddziaływania z CsA; Hsp – białko szoku termicznego, chaperon; NLS – sekwencja aminokwasowa kierująca dane białko do jądra komórkowego.



Rys. 1. Na schemacie przedstawiono mechanizm regulacji transkrypcji. Występująca w kompleksie inicjacyjnym polimeraza RNA II posiada nieufosforylowaną domenę CTD. Kinaza CTD fosforyluje odpowiednie reszty seryny lub treoniny przez co stają się substratem dla izomeryzy Ess1 bądź CPR1. W wyniku izomeryzacji odpowiednich wiązań peptydowych konformacja domeny CTD ulega zmianie powodując odłączenie białek kompleksu inicjacyjnego natomiast przyłączają się białka odpowiedzialne za elongację, a następnie terminację transkrypcji.

Cyklofiliny nie stanowią jednolitej grupy białek. Ich cechą charakterystyczną jest obecność domeny wiążącej CsA (*cyclosporine A binding domain* – CBD), będącej jednocześnie centrum aktywnym izomeryzy, otoczonej sekwencjami odpowiedzialnymi za lokalizację danej izoformy w odpowiednim przedziale komórkowym (tab. 1). Jako pierwszą scharakteryzowano cyklofilinę cytoplazmatyczną i nadano jej nazwę

CyPA. W konsekwencji następnym odkrywanym formom cyklofiliny nadawano kolejno nazwy CyPB (zlokalizowana w retikulum endoplazmatycznym ER), CyPC (zlokalizowana w systemie sekrecyjnym) oraz CyPD (zlokalizowana w mitochondriach). W 1994 r. Luan ze względu na małe różnice w budowie zrezygnował z wyróżniania oddzielnie CyPB i CyPC i zaproponował nazewnictwo dla tej grupy białek CyPB/C (12).

Tabela 1

Zestawienie podstawowych form cyklofilin

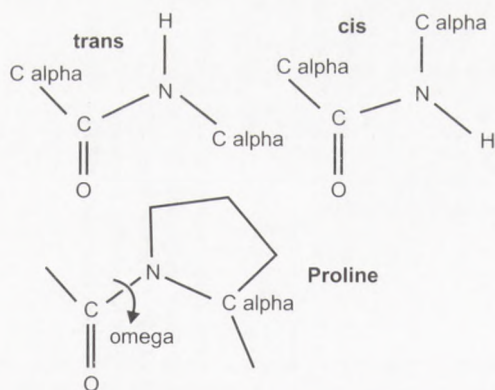
Forma cyklofiliny	Przykłady	Lokalizacja	Budowa
CyPA	CPR1 – <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (8) ROC1 – <i>Arabidopsis thaliana</i> (59) CyPA – <i>Homo sapiens</i> (30)	cytoplazma	18 kDa, podstawowa forma cyklofiliny, centralny rejon około 110 aminokwasów zawiera centrum aktywne oraz miejsce oddziaływania z Csa tzw. domena CBD (<i>Csa binding domain</i>)
CyPB/C	CPR2 – <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (8)	retikulum endoplazmatyczne	21 kDa – 33 kDa, na aminowym końcu znajduje się sekwencja kierująca do ER natomiast na końcu karboksylowym sygnał pozostania w ER, wewnątrz znajduje się podstawowa domena cyklofiliny CBD
	CyPB – <i>Homo sapiens</i> (70)	system sekrecyjny komórki	formy przedostające się do systemu sekrecyjnego komórki nie posiadają na swoim końcu karboksylowym sygnału pozostania w ER
	CyPB – <i>Vicia faba</i> (12) ROC4 – <i>Arabidopsis thaliana</i> (59)	chloroplasty	forma chloroplastowa posiada na swoim N-końcu sekwencję kierującą do chloroplastów
CyPD	CPR3 – <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (8) HCyp22 – <i>Homo sapiens</i> (69) CyPD – <i>Rattus norvegicus</i> (63)	mitochondria	22 kDa, oprócz podstawowej domeny cyklofiliny CBD forma ta posiada na swoim N-końcu sekwencję kierującą do mitochondriów
białka złożone zawierające domenę CyP	HCyp33 – <i>Homo sapiens</i> (68)	jądro	33,4 kDa, na N-końcu białka znajduje się domena wiążąca z RNA, na C-końcu znajduje się domena CBD
	NK-TR – <i>Homo sapiens</i> (67)	jądro	89 kDa, na N-końcu znajduje się domena CBD, C-końcowy rejon zajmują sekwencje bogate w reszty arginy i seryny tzw. domena RS
	Nup 358 – <i>Homo sapiens</i> (17)	cytoplazmatyczna strona poru jądrowego	358 kDa, białko zbudowane jest w kolejności licząc od N-końca: domena zamka leucynowego, domena Ran, domena zawierająca powtórzenia FXRG oraz FG, motyw palca cynkowego Cys ₂ – Cys ₂ powtórzony osiem razy oraz na C-końcu białka zlokalizowana jest domena CBD
	TLP – <i>Spinacia oleracea</i> (16)	chloroplasty	49 kDa, licząc od końca N, kolejno umiejscowione są: sekwencja kierująca do chloroplastów, domena suwaka leucynowego, domena mogąca potencjalnie oddziaływać z fosfatazami oraz domena CBD

Y16088	(1) -MSNPKVFFDWAIGNAPAGRIWVMEIYADTTPTAENFRALCTGKGVGRS-GKPLHYKGSFHRVIPNFCQGGDFTAGNGTGAE-SIYGAKFAADENFLTKR
X74403	(1) -MPNPKVFFDMTIGGAPAGRIVFELYADVTPTAENFRALCTGKGVGRS-GKPVHFKGSIHRVIPNFCQGGDFTAGNGTGE-SIYGAKFAADENFVYK
AB012947	(1) -MSNPKVFFDMTIGGQVGNAGRIIFELFADVTPTAENFRALCTGKGVGRS-GKPLHFKGSSFHRVIPNFCQGGDFTAGNGTGE-SIYGSKFAADENFLTK
X63616	(1) ---MAHCFDMTIGGAPAGRILIMELFPDV-PTAENFRALCTGKGIKGS-GKPMYKGSVHRVIPNFCQGGDFTAGNGRGE-SIYGAKFAADENFLHK
M55018P	(1) ---PKVYFDMTIGVKAAGRIVMELYADVTPTAENFRALCTGKGVGRS-GKPLHYKGSFAHRVIPKEMCQGGDFTAGNGTGE-SIYGAKFAADENFVYK
AF126551	(1) -MANPRVFFDLTIGGAPAGRIVMELFADTTPTAENFRALCTGKGVGRS-GKPLHYKGSFHRVIPNFCQGGDFTAGNGTGE-SIYGAKFAADENFVYK
M55019	(1) -MANPRVFFDLTIGGAPAGRIVMELFADTTPTAENFRALCTGKGVGRS-GKPLHYKGSFHRVIPNFCQGGDFTAGNGTGE-SIYGAKFAADENFVYK
M55021	(1) -MANPRVFFDMTIGGAPAGRIVMELFADTTPTAENFRALCTGKGVGRS-GKPLHYKGSFHRVIPNFCQGGDFTAGNGTGE-SIYGAKFAADENFVYK
L29471	(2) ASKNPKVFFDLTIGKARAGRIVMELFADTTPTAENFRALCTGKGVGRS-GKPLHYKGSFAHRVIPNFCQGGDFTAGNGTGE-SIYGKFAADENFLKR
L32095	(78) AKVTSKIFLFDIEIGESAGRIVIGLFDVAVKTVENFKLSTGAKGYG-----YQGSFHRVIPNFCQGGDFTAGNGTGE-SIYGKFAADENFLKR
L14845	(91) AKVTKVYFFDLTIGGAPAGRIVMELFADTTPTAENFRALCTGKGVGRS-GKPLHYKGSFAHRVIPNFCQGGDFTAGNGTGE-SIYGKFAADENFLKR
P05092	(1) VNPVFFDLTAVDGEPLGRVVSFEFLFADKVPKTAENFRALCTGKGVGRS-GKPLHYKGSFAHRVIPNFCQGGDFTAGNGTGE-SIYGKFAADENFLKR
P14832	(1) ---MSQVYFDEADGQPIGRVVFVLYNDIVPKTAENFRALCTGKGVGRS-----YAGSPFHRVIPNFCQGGDFTAGNGTGE-SIYGKFAADENFLKR
L41840 (3061)	ETNPVFFDVCADGEPGLRITMELFNSIVPRTAENFRALCTGKGVGRS-----FKNSIFHRVIPDFVFCQGGDFITKHDGTGGQ-SIYGKFAADENFDFVH
Y16088	HTGPGLLSMANAGAGTNGSQFFI-CTEKTEWLDGKHVVFGKVI-EGMNVVRDIEKVGSGG--KTSRPVTIADCGQLS-----*
X74403	HTGPGLLSMANAGPTNGSQFFI-CITTKTEWLDGKHVVFGQVV-EGLDVVKDIEKVGSGG--KTRPVAIADCGQLS-----
AB012947	HTGPGLLSMANAGPTNGSQFFI-CTAKTDWLDGKHVVFGQVV-DGLNVVRDIEKVGSGG--KTSRPVVIANGQL-----
X63616	HTGPGLLSMANAGPTNGSQFFI-TTVAIPLDGHVVFGKVI-EGMDVVRKIEATQDRGD-KPLSEVKIAKCGQL-----
M55018	HTGPGLLSMRNAGSNTNGSQFFI-CTEKTSWLDGKHVVFGQVV-EGMDVVRDIEKVGSDG--RTSKKVVTCDCGQL-----
AF126551	HTGPGLLSMANAGPTNGSQFFI-CTAKTEWLDGKHVVFGQVV-EGLDVVKKAEAVGSSG--RCSKPVVADCGQL-----
M55019	HTGPGLLSMANAGPTNGSQFFI-CTAKTEWLDGKHVVFGQVV-EGMDVVKKAEAVGSSG--RCSKPVVADCGQLS-----
L29471	HTGPGLLSMANAGPTNGSQFFI-CTTRITWLDGKHVVFGKVI-DGYTVKMEQVGSVGG--GTAERVLIEDGQLADDDHAN
L32095	HVGPGLLSMANAGPTNGSQFFI-CITVTPWLDNRHVFGHVI-EGLDVVKLESQETSCLDNSPKPKCKIAKSGELPLDG---
L14845	HTGPGLLSMANAGPTNGSQFFI-CITVTKTSWLDNKHVVFGQVI-EGMKLVRLTESQETRAFDF-VPKKGCRIYACGELPLDA---
P05092	HTGPGLLSMANAGPTNGSQFFI-CTAKTEWLDGKHVVFGKVI-EGMNIIVEAMERFGRNGK-TSKKIT-IADCGQLE-----
P14832	HDRPGLLSMANAGPTNGSQFFI-TTVFPCWLDGKHVVFGQVV-DGYDIVKVESLGSPSGA-TKARIV-VAKSGEL-----
L41840	HTGPGLLSMANQQTNNNSQFVI-TLKAEHLDFKHVVFGKVI-DGMDTVKKIESFGSPKGS-VCRRAIT-ITCEGQI-----

Rys. 2. Porównanie sekwencji aminokwasowej wybranych cyklofilin. Gwiazdką zaznaczono wysoce zachowawcze reszty aminokwasowe na przestrzeni wszystkich porównanych sekwencji. Y16088 – *Lupinus luteus*; X74403 – *Phaseolus vulgaris*; AB012947 – *Vicia faba*; X63616 – *Arabidopsis thaliana*; M55018 – *Brassica napus*; AF126551 – *Solanum tuberosum*; M55019 – *Lycopersicon esculentum*; M55021 – *Zea mays*; L29471 (Cyp1) – *Oryza sativa*; L32095 – *Vicia faba* (forma chloroplastowa); L14845 (ROC4) – *Arabidopsis thaliana* (forma chloroplastowa); P05092 (CYPA) – *Homo sapiens*; P14832 (CYP1) – *Saccharomyces cerevisiae*; L41840 – *Nip358*.

Cyklofiliny występują w komórkach wszystkich badanych organizmów, a jej różne izoforny zostały zlokalizowane w poszczególnych przedziałach komórkowych: cytoplazmie (13), mitochondriach (14), chloroplastach (12) i retikulum endoplazmatycznym (15). Masa cząsteczkowa cyklofilin wynosi 18-24 kDa, scharakteryzowano również formy wysokocząsteczkowe, np. CyP40 (16) czy białko TLP (chloroplastowa forma cyklofiliny). Cyklofilina może być częścią większych białek takich jak Nup358 (białko poru jądowego) czy NK-TR (receptor na powierzchni limfocytów T i komórek NK). Nup358 obok motywu ośmiu palców cynkowych oraz zamka leucynowego, zawiera w karboksylowym regionie domenę cyklofiliny (17). Natomiast w NK-TR domena cyklofilinowa zlokalizowana jest w końcu aminowym białka. W obu przypadkach zachowana jest aktywność enzymatyczna izomerazy (18). Mimo różnej lokalizacji komórkowej, cyklofiliny charakteryzują się wysoce konserwatywną budową domeny CBD (rys. 2).

Wiązanie peptydowe Xaa-Pro może występować zarówno w konformacji *cis* jak i *trans* (około 6% występuje jako izomer *cis*) (19) (rys. 3). Przypuszcza się, że na rybosomie tworzone są wyłącznie wiązania *trans*, które następnie w zależności od potrzeb przetwarzane są do konformacji *cis* (20). Etap izomeryzacji *cis/trans* należy do najwolniej przebiegających w procesie fałdowania białek *in vitro* i może być przyspieszony do 300 razy w obecności cyklofiliny (21). Cyklofiliny mogą uczestniczyć w procesie fałdowania nie tylko jako izomerazy, ale także jako chaperony. Drożdżowe cyklofiliny Cpr6 i Cpr7 tworzą aktywne kompleksy z białkami z rodziny Hsp90 (22). CyP40 funkcjonuje w kompleksie z innymi chaperonami Hsp90, Hsp70 oraz Hsp40 regulując dojrzewanie receptorów hormonów steroidowych (23). Inna cyklofilina zwana USA-CyP (w 68% identyczna do CyPA człowieka) bierze udział w tworzeniu kompleksu odpowiedzialnego za dojrzewanie RNA (24). Niektóre formy cyklofilin (np. CyPA i CyPB człowieka) wykazują aktywność nukleazy (25) zależną od jonów wapnia. CsA blokuje aktywność izomerazową cyklofiliny, natomiast nie ma wpływu na jej aktywność nukleazową, co może sugerować, że białko posiada dwa niezależne centra aktywne.



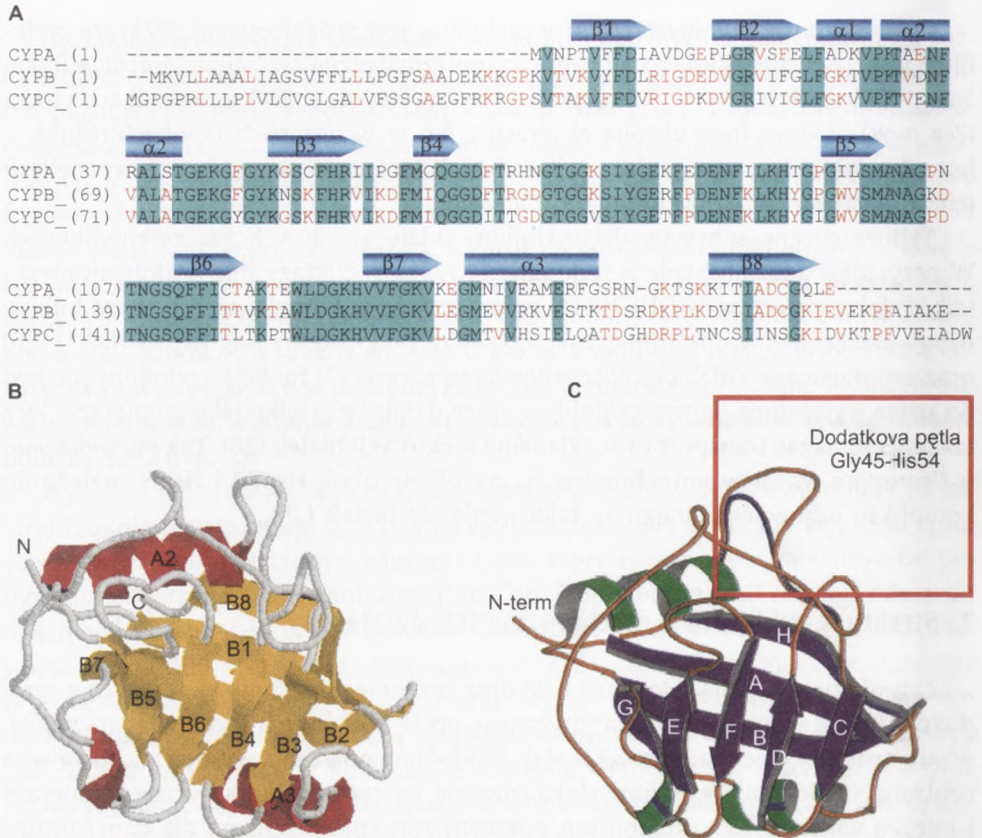
Rys. 3. Izomeryzacja wiązania peptydowego X-Pro.

Ekspresja poszczególnych izoform cyklofiliny jest zróżnicowana. Niektóre cyklofiliny ulegają ekspresji konstytutywnie (cytoplazmatyczna cyklofilina *Arabidopsis thaliana*), dla innych można wykazać podwyższony poziom mRNA w warunkach stresu (*Zea mays*), jeszcze inne ulegają ekspresji tylko w określonych tkankach (NinaA – homolog cyklofiliny występujący w komórkach fotoreceptorowych) czy organellach (chloroplastowa forma cyklofiliny *A. thaliana*).

Tylko nieliczne substraty dla cyklofiliny udało się dotychczas zidentyfikować. W przypadku oddziaływania z rodopsyną 1 (21) i reduktazy dihydrofolianu myszy (*dihydrofolate reductase* – DHFR) (14) wykazano, że w kompleksach tych cyklofilina działa jako izomeraza. Natomiast w przypadku poliproteiny Gag (wirus HIV 1) (26) oraz endonukleazy VirD2 (*Agrobacterium tumefaciens*) (27) funkcja cyklofiliny nie jest do końca wyjaśniona. *In vivo* cyklofilina może działać nie tylko jako izomeraza, lecz także wspomagać transport oraz składanie niektórych białek (28). Tak jak wykazano u *Neurospora crassa* w mitochondriach, cyklofiliny obok Hsp70 i Hsp60 należą do kompleksu odpowiedzialnego za fałdowanie się białek (29).

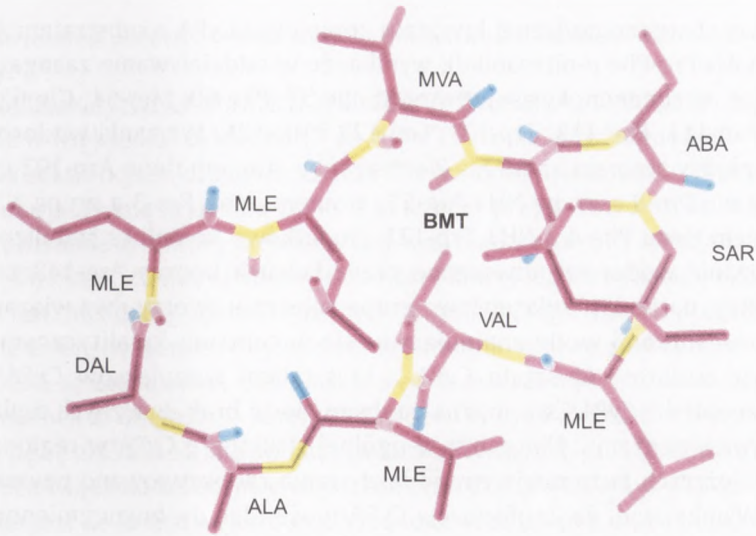
2. Struktura cyklofilin i mechanizmy ich działania

Łatwość poznawania sekwencji DNA oraz rozwinięcie technik związanych z „produkcją” białek w systemie prokariotycznym, np. w komórkach *E. coli*, ułatwia poznanie struktury trzeciorzędowej białek. Cyklofiliny posiadają wysoce zachowawczą centralną część CBD, w której zlokalizowane są centrum katalityczne izomerazy i miejsce wiązania CsA. Region ten otoczony jest specyficznymi, dla danej formy, domenami bądź sekwencjami transportującymi. Porównanie cyklofilin A, B i C z limfocytów *T. H. sapiens* na poziomie struktury pierwszorzędowej, wykazuje około 65% podobieństwa, natomiast centralna część jest zachowawcza w 80%. Na strukturę drugorzędową białka składają się trzy helisy α , osiem łańcuchów β oraz sześć skrętów typu β (rys. 4A). Struktura trzeciorzędowa cyklofiliny (CyPA) układa się w spłaszczony cylinder. Łańcuchy β ułożone są antyrównolegle natomiast helisy α (H2 i H3) ograniczają od dołu i góry cylinder utworzony przez łańcuchy β (rys. 4B). Obydwa końce białka znajdują się blisko siebie i umiejscowione są po przeciwnej stronie miejsca oddziaływania z CsA. Wewnątrz cylindra znajdują się reszty aminokwasowe: Val-6, Phe-8, Val-20, Phe-22, Leu-24, Phe-36, Leu-39, Tyr-48, Phe-53, Ile-56, Leu-98, Met-100, Phe-112, Ile-114 i Phe-129, tworzące zwarty, hydrofobowy rdzeń. Właśnie te reszty aminokwasowe są wysoce zachowawcze na przestrzeni porównanych sekwencji różnych cyklofilin. Centrum aktywne utworzone w hydrofobowym rdzeniu ma kształt kieszeni o rozmiarach $15 \times 20 \text{ \AA}$ i głębokości około 10 \AA (30). Ponieważ zarówno CsA jak i substrat wiążą się z cyklofiliną w tym samym regionie, większość reszt aminokwasowych, hydrofobowej kieszeni, zaangażowana jest w obu typach oddziaływań. Na podstawie danych uzyskanych z analizy NMR oraz badań rentgenograficznych kryształu kompleksu CyPA z CsA, określono reszty aminokwasowe ma-



Rys. 4. A. Porównanie sekwencji aminokwasowych cyklofiliny A, B i C *H. sapiens*. Czcionką żarną na turkusowym tle zaznaczono aminokwasy ściśle konserwatywne, czcionką czerwoną zaznaczono aminokwasy występujące w co najmniej dwóch z porównanych sekwencji. Nad sekwencją zaznaczono strukturę drugorzędową, jaką przyjmuje łańcuch polipeptydowy w danym rejonie: α – helisa α , β – łańcuch β . Numery sekwencji, pod jakimi występują w bazie danych EMBL/GenBank/DDBJ: CyP A – P05092, CyP B – P23284, CyP C – P45877. B. Przestrzenny obraz struktury cyklofiliny A. Obraz uzyskany na podstawie danych uzyskanych z analizy zdjęć dyfrakcji promieni rentgenowskich krystalicznej CyP A z limfocytów T *H. sapiens*. Zaznaczono struktury drugorzędowe odpowiednio A – helisa α , B – łańcuch β . Numer PDB 2CPL. C. Nałożenie dwóch przestrzennych obrazów CyP A *H. sapiens* i CyP B *C. elegans*. Prostopokątem ograniczono rejon różnicujący oba białka. Kolorem czerwonym zaznaczono dodatkową pętlę Gly45-His54, występującą w strukturze CyP B (40).

jące istotne znaczenie dla tego typu oddziaływań, są to: Arg-55, Phe-60, Met-61, Gln-63, Gly-72, Ala-101, Asn-102, Ala-103, Gln-111, Phe-113, Trp-121, Leu-122 i His-126 (31). Natomiast CsA (rys. 5.) oddziałuje z CyPA za pośrednictwem BMT-1, ABA-2, SAR-3, MLE-9, MLE-10 i MVA-11. W tym kompleksie, cyklosporyna A funkcjonuje prawdopodobnie jako kompetencyjny inhibitor, gdyż całkowicie blokuje aktywność enzymatyczną izomeryazy enzymu (32). Wprowadzenie mutacji w strukturze pierw-



Rys. 5. Przestrzenny obraz struktury cyklosporyny A (CsA). Numeracja i pełne nazwy, występujących w CsA aminokwasów: BMT-1 ((4R)-4-[(E)-2-butenyl]-4,N-dimetyl-L-treonina), ABA-2 ((5-hidroksy)norwalina), SAR-3 (sarkozyna), MLE-4 (N-metyleucyna), VAL-5 (walina), MLE-6, ALA-7 (alanina), DAL-8 (D-alanina), MLE-9, MLE-10, MVA-11 (N-metylowalina).

szorządowej CyPA Trp-121 → Phe, powoduje siedemnastokrotne zmniejszenie wrażliwości enzymatycznej CyPA na CsA (33). Trp-121 i His-126 tworzą wiązania wodorowe z resztami aminokwasowymi CsA odpowiednio, MLE-9 i MVA-11. Wymiana His-92 → Tyr znosi aktywność enzymatyczną izomerazy białka i zdolność oddziaływania z CsA. Mutacja ta prawdopodobnie powoduje zmianę konformacji Trp-121 i His-126, uniemożliwiając utworzenie trwałych kompleksów CyPA/CsA jak i CyPA/substrat (34).

Analiza dyfrakcyjna kryształów, CyPA związanej z różnymi dipeptydami: Ala-Pro, Ser-Pro, Gly-Pro i His-Pro (35,36) wykazała duże podobieństwo wszystkich czterech kompleksów. W cząsteczce CyPA w oddziaływaniu udział biorą reszty aminokwasowe: Arg-55, Phe-60, Met-61, Gln-63, Ala-101, Asn-102, Phe-113, Leu-122 i His-126. Łańcuch boczny proliny dwupeptydu wchodzi do hydrofobowej kieszeni białka. N-końcowy atom azotu substratu tworzy wiązania wodorowe z karbonylowym atomem tlenu Asn-102 i dwiema cząsteczkami wody. Natomiast atom tlenu grupy karbonylowej tworzy wiązania wodorowe z łańcuchami bocznymi Arg-55, Gln-63 i dwiema cząsteczkami wody. Mutacja Arg-55 → Ala powoduje stukrotny spadek aktywności enzymatycznej izomerazy enzymu (37). Dodatkowo kompleks stabilizowany jest oddziaływaniami van der Waalsa. Średnie odchylenie atomów C α cyklofiliny A, między wymienionymi kompleksami, waha się od 0,09 do 0,14 Å, natomiast biorąc pod uwagę odchylenie wszystkich atomów CyPA, to różnica wynosi od 0,21 do 0,26 Å (36).

Z analizy rentgenograficznej kryształu kompleksu CyPA z substratem AAPF (sukcynylo-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilid), wynika, że w oddziaływanie zaangażowane są następujące reszty aminokwasowe: Arg-55, Ile-57, Phe-60, Met-61, Gln-63, Ala-101, Asn-102, Gln-111, Phe-113, Trp-121, Leu-122 i His-126. Wiązania wodorowe utworzone są między atomem azotu Ala-2 substratu a atomem tlenu Asn-102 cyklofiliny, atomem tlenu Pro-3 a grupą NH1 Arg-55, atomem tlenu Pro-3 a grupą NH2 Arg-55 oraz atomem tlenu Phe-4 a NH1 Trp-121. Dodatkowo kompleks stabilizowany jest przez wiązanie wodorowe utworzone przez łańcuch boczny Arg-148 z grupą nitrową aniliny, natomiast sukcynylowa grupa substratu tworzy dwa wiązania wodorowe z cząsteczkami wody znajdującymi się w centrum katalitycznym enzymu. Porównując strukturę kryształu CyPA z kryształami kompleksów CyPA/dipeptyd, CyPA/tetrapeptyd i CyPA/CsA, można zaobserwować brak znacznych zmian w centrum aktywnym enzymu. Natomiast w ogólnej strukturze CyPA w regionach 69-81 i 140-154, leżących poza miejscem oddziaływania zaobserwowano pewne odchylenia (36). Wynika stąd, że konformacja CyPA może ulec drobnym zmianom umożliwiającym dopasowanie do odpowiedniego ligandu.

W zaproponowanym mechanizmie izomeryzacji dipeptydu zakłada się, że stan przejściowy wiązania peptydowego Xaa-Pro ma charakter mniej polarny niż stany podstawowe substratu i produktu reakcji. Pierwszym etapem jest odwodnienie wiązania amidowego substratu poprzez wiązanie z enzymem, następnie hydrofilowe oddziaływanie między cząsteczką wody w centrum aktywnym a związanym substratem wymusza izomeryzację wiązania (35). Natomiast w mechanizmie izomeryzacji tetrapeptydu zakłada się, że katalityczną funkcję pełni reszta Arg-55. Mutacja Arg-55 → Ala powoduje stukrotny spadek aktywności enzymatycznej CyPA. Podwójny charakter wiązania peptydowego Ala-Pro substratu AAPF, osłabiony jest poprzez utworzenie wiązania wodorowego między łańcuchem bocznym Arg-55 a imidowym atomem azotu, umożliwiając w ten sposób izomeryzację (38). Cyklofilina należy do enzymów o niewielkiej sprawności (39), zwiększa szybkość reakcji w stosunku do izomeryzacji nieenzymatycznej zaledwie pięciokrotnie.

Poznano również strukturę trzeciorzędową cyklofiliny B z *H. sapiens* (40). Struktury cyklofilin form A i B na podstawie ich kryształów są podobne, różnice pojawiają się na obu końcach białek oraz w pętlach między resztami aminokwasowymi Arg-19 do Asp-24 (odpowiednio w strukturze CyPA są to A-11 do P-16) i Thr-153 do Lys-163 (Phe-145 do Lys-154). Różnice w drugiej z wymienionych pętli mają wpływ na efektywność hamowania przez kompleks CyP/CsA enzymatycznej aktywności fosfatazy kalcyneuryny. Kompleks CyPB/CsA hamuje aktywność kalcyneuryny ($K_i < 21$ nM) z czternastokrotnie lepszą wydajnością niż kompleks CyPA/CsA ($K_i = 336$ nM) (41). Ponieważ CyPA i CyPB wykazują prawie identyczną strukturę trzeciorzędową miejsca oddziaływania z CsA to różnice wynikają raczej ze struktury pierwszorzędowej obu białek. Znaczenie mogą tu mieć reszty aminokwasowe wchodzące w kontakt z kalcyneuryną, są to Arg-69, Lys-125 i Arg-148. Mutacja wprowadzona do CyPA, zmieniająca Arg-148 na Glu (zmutowane białko oznaczono R148EcyPA) po-

woduje dwudziestokrotne zwiększenie efektywności hamowania aktywności kalcyneuryiny.

W cytoplazmatycznych formach cyklofilin roślinnych, w CyP40 z *H. sapiens* i *Bos taurus* oraz u większości cyklofilin (7 na 11) z *Caenorhabditis elegans* (42) występuje dodatkowa sekwencja, o długości od 7 do 8 reszt aminokwasowych. Wykonano analizę rentgenograficzną kryształu CyP-3 z *C. elegans* przy rozdzielczości 1,8 Å. CyP-3 i CyPA na poziomie struktury pierwszorzędowej białka są w 67% identyczne, a w 77% podobne (43). Na poziomie struktury trzeciorzędowej białka wykazują ogólne podobieństwa, tzn. posiadają osiem, ułożonych antyrównolegle katek β ograniczonych dwiema helisami α . Konserwatywne reszty aminokwasowe potrzebne do oddziaływania z CsA są zachowane. CyP-3 różni się od zwierzęcej CyPA obecnością dodatkowej sekwencji o długości 7 reszt (48 Lys-Ser-Gly-Lys-Pro-Leu-His 54), tworzących wystającą pętlę zlokalizowaną ponad centrum aktywnym (rys. 4C). Pętla utrzymywana jest przez wiązania wodorowe utworzone między Glu-83 a Lys-48 i Ser-49. Funkcja pętli nie jest do końca wyjaśniona, być może oddziałuje z innymi białkami. O dużej istotności dodatkowej sekwencji może świadczyć wysoka zachowawczość sekwencji aminokwasów wchodzących w skład pętli na przestrzeni większości białek porównywanych pod tym względem. Reszta histydyny (His-54) występująca w pętli może razem z dwiema resztami cysteiny (Cys-40 i Cys-168), występującymi poza pętlą w formie zredukowanej, koordynować jony metalu, np. Zn^{+2} . Zarówno His-54 jak i Cys-40 i Cys-168 wśród białek posiadających dodatkową sekwencję charakteryzują się wysokim konserwatywnym występowaniem. Jednakże istnieje możliwość, że w określonych warunkach, np. stresu oksydacyjnego, opisane reszty cysteiny, występujące w odległości 5,38 Å, mogą tworzyć mostki dwusiarczkowe. Utworzenie mostka dwusiarczkowego powoduje zmiany w konformacji białka, co może być jednym z elementów kaskady przekazywania sygnału w warunkach stresu. Pewne właściwości mogące wpływać ze struktury białka, jego dodatkowej pętli, zostały potwierdzone w stosunku do niektórych roślinnych i drożdżowych cyklofilin.

3. Cytoplazmatyczna forma cyklofiliny

W cytoplazmie komórkowej występuje głównie CyPA (rozdz. 2). Cechą charakterystyczną tego białka jest brak jakichkolwiek sekwencji liderowych. Poznano wiele sekwencji cDNA oraz nieliczne geny cytoplazmatycznych cyklofilin. Sekwencja DNA kodująca CyPA nie jest podzielona intronami (44-46). Cytoplazmatyczne cyklofiliny często reprezentowane są przez rodziny genów, np. w *Oryza sativa* (47), *Solanum tuberosum* (48), *A. thaliana* (49) i w *Lupinus luteus* (46). Ulegają ekspresji we wszystkich badanych pod tym względem organizmach i ich tkankach. Obserwuje się podwyższony poziom mRNA CyPA w tkankach szybko rosnących i rozwijających się (44,49). Niektóre geny roślinnych CyPA ulegają wzmożonej ekspresji w odpowiedzi na warunki stresowe (12). Nie wszystkie reagują na te same czynniki stresowe. Ekspresja

CyPA z *S. tuberosum* wzmagają się w wyniku skaleczenia czy infekcji grzybowej (48), natomiast w fasoli reaguje na obniżoną temperaturę czy działanie na rośliny solami metali ciężkich (50). Zaobserwowano również znaczne podwyższenie poziomu mRNA cyklofiliny w merystemach brodawek korzeniowych *L. luteus* (46).

Dotychczas udało się zidentyfikować tylko nieliczne białka, z którymi CyPA oddziałuje, jak np. poliproteina Gag wirusa HIV-1 (51). Poliproteina Gag jest produktem ekspresji genu *gag* kodującego wiele białek istotnych dla cyklu wirusa. Po translacji prekursor jest odcinany przez specyficzne proteazy wirusowe dając końcowe produkty (52). W przeprowadzonych bardzo szczegółowych badaniach wykazano, że CyPA człowieka jest włączana do wirionu wirusa (53). CyPA łączy się z Gag, a konkretnie z białkiem kapsydu CA, w trakcie składania wirionu. W wyniku rearanżacji CyPA jest eksponowana na powierzchni wirusowego kapsydu (54). Zamiana Pro-222 → Ala, powoduje utratę możliwości włączania cyklofiliny do wirionu oraz obniża infekcyjność wirusa (15). Kompleks Gag/CyPA jest niezbędny we wczesnym etapie cyklu wirusa, zanim dojdzie do odwrotnej transkrypcji jego RNA i może być rozbity poprzez traktowanie komórek cyklosporyną A. Prawdopodobnie obecność CyPA jest konieczna do destabilizacji oddziaływań między białkami płaszczka w celu uwolnienia RNA. Niektórzy badacze zakładają, że CyPA działa jeszcze wcześniej, na etapie przyłączania wirusa do receptorów na powierzchni komórki. Przeciwciała przeciw CyPA blokują przyłączanie wirusa (55). Prawdopodobnie znajdujące się na powierzchni komórki receptory rozpoznawane są przez eksponowaną na powierzchni kapsydu CyPA, co pozwala na adsorpcję wirusa i oddziaływanie gp120 z receptorem CD4, w konsekwencji dochodzi do wejścia wirusa do komórki (56). Poprzez analogię z innymi białkami wiążącymi heparynę oraz wprowadzając mutacje punktowe, zlokalizowano w strukturze pierwszorzędowej CyPA sekwencję podstawową dla tego typu oddziaływania. Są to reszty aminokwasowe zgromadzone w karboksylowym regionie cyklofiliny: 148-Arg-Asn-Gly-Lys-Thr-Ser-Lys-Lys-155. Z analizy kryształu wynika, że region ten jest eksponowany na powierzchni białka.

Innym białkiem, z którym oddziałuje CyPA jest VirD2 (27). Białko VirD2 jest endonukleazą z bakterii *A. tumefaciens* biorącą udział razem z VirE2 w procesie włączania T-DNA (fragment plazmidu Ti) do genomu gospodarza roślinnego (57). Po infekcji rośliny dochodzi do indukcji genów *vir* znajdujących się na plazmidzie Ti. VirD2 naciina sekwencje graniczne w plazmidzie Ti, dając jednoniciowy fragment T-DNA i pozostaje z nim w kompleksie. Następnie do kompleksu dołącza się VirE2, który jest białkiem wiążącym jednoniciowy DNA dla ochrony przed degradacją, tworząc tzw. kompleks T. Oba białka posiadają sekwencje lokalizacji jądrowej, które wprowadzają kompleks T do jądra komórkowego. Ze strony roślinnego gospodarza z kompleksem T, a dokładniej z VirD2 oddziałuje CyPA, która rozpoznaje domenę w białku VirD2 leżącą między NLS a centrum aktywności enzymatycznej endonukleazy. Warto wspomnieć, że cyklofilina również posiada aktywność nukleazy (25). Cyklosporyna A powoduje rozpad kompleksu T *in vitro*, natomiast *in vivo* traktowanie CsA powoduje, że nie dochodzi do transformacji roślin bakteriami *A. tumefaciens*. Rola cy-

klofiliny w procesie transformacji nie jest wyjaśniona, może funkcjonować jako chaperon, ponieważ białka VirD2 i VirE2 podczas przedostawania się przez błony komórkowe podlegają częściowemu rozpleceniu. Może również działać jako izomeraza wiązań peptydowych Xaa-Pro, albo może uzupełniać aktywność enzymatyczną nukleazy kompleksu umożliwiając wejście T-DNA do genomu gospodarza.

Aktywność nukleazowa cyklofilin została odkryta podczas badania procesu apoptozy w tymocytach szczura. Cechą charakterystyczną apoptozy jest degradacja DNA. W jej wyniku obserwuje się dwa rodzaje fragmentów DNA, o długości około 180-200 pz oraz około 50 kpz. Wyizolowano białko NUC18, charakteryzujące się dużym podobieństwem do znanych sekwencji aminokwasowych cyklofilin, wykazujące aktywność nukleazową. Przeciwciała przeciw NUC18 oraz CyPA (z komórek szczura) rozpoznają się krzyżowo. Porównano aktywność nukleazową trzech form cyklofiliny CyPA (18 kDa), CyPB (21 kDa) i CyPC (22,8 kDa) (25). Wykazano, że CyPC charakteryzuje się stukrotnie większą wydajnością w stosunku do DNA (zarówno w formie jedno- jak i dwuniciowej), niż pozostałe cyklofiliny (CyPA i CyPB). Aktywność nukleazowa CyPA i CyPB stymulowana jest przez jony wapnia oraz magnezu, natomiast do aktywowania CyPC wystarczą jony magnezu. Jony cynku hamują aktywność nukleazową wszystkich trzech cyklofilin. Zbyt duże stężenie jonów potasu (>140 mM) również wpływa hamująco na aktywność nukleazową cyklofilin. Fizjologiczne stężenie jonów potasu w komórce wynosi 140 mM, natomiast w warunkach apoptozy stężenie to maleje, co może uaktywniać aktywność nukleazową cyklofilin.

4. Chloroplastowe formy cyklofilin

Mimo że chloroplasty posiadają własny genom to większość białek jest kodowana przez genom jądrowy. Po translacji w cytoplazmie białka transportowane są do chloroplastów. Aby przejść przez błony białka muszą zmienić swoją konformację (ulegają częściowemu rozfałdowaniu). Wewnątrz docelowego przedziału komórkowego białka dojrzewają i ulegają prawidłowemu fałdowaniu (58). W chloroplastach występują dwie formy cyklofiliny. W stromie chloroplastów zlokalizowano cyklofilinę o masie cząsteczkowej 21 kDa, charakteryzującą się budową typową dla izoformy CyPB/C (rozdz. 2). Dotychczas scharakteryzowano CyPB/C występujące w chloroplastach *A. thaliana* (59) i *Vicia faba* (12). Oba białka posiadają sekwencję tranzytową, zlokalizowaną w N-końcowym regionie, charakterystyczną dla białek transportowanych do chloroplastów (60). Region ten jest bogaty w reszty seryny, lizyny i arginy, ma wyraźnie charakter zasadowy. Sekwencja tranzytowa odcinana jest wewnątrz po przejściu przez błony. Dojrzałe białko wykazuje wysoki stopień podobieństwa do cytoplazmatycznej formy cyklofiliny z zachowaniem konserwatywnej domeny CBD. Chloroplastowa CyPB/C straciła w porównaniu z roślinnymi cytoplazmatycznymi cyklofilinami odcinek długości siedmiu aminokwasów (Gly48-His54).

Ekspresja genów chloroplastowych CyPB/C zarówno u *A. thaliana*, jak i u *V. faba* regulowana jest przez światło. Jedynie w tkankach zielonych obserwowano mRNA CyPB/C. Zaobserwowano wzmożoną ekspresję genów chloroplastowej CyPB/C w warunkach stresu temperaturowego (12). W odróżnieniu od genów cytoplazmatycznych cyklofilin, gen chloroplastowej CyPB/C u *A. thaliana* (ROC4) podzielony jest sześcioma intronami (49).

Drugą formą cyklofiliny zlokalizowaną w przestrzeni tylakoidalnej chloroplastów jest TLP (*thylakoid lumen PPlase*) (16). Białko TLP należy do białek złożonych. Licząc od końca N, kolejno umiejscowione są domeny: suwaka leucynowego, mogąca potencjalnie oddziaływać z fosfatazami oraz cyklofilinowa. Białko prekursorowe TLP ma masę cząsteczkową 49,8 kDa, posiada niezwykle długą (104 reszty aminokwasowe), dwuczęściową sekwencję tranzytową. Dwuczęściowa sekwencja tranzytowa jest charakterystyczna dla białek, których docelowym przedziałem komórkowym są tylakoidy. Pierwsza część, odcinana po przejściu białka przez podwójną błonę chloroplastów, ma strukturę charakterystyczną dla białek kierowanych do stromy. Ma charakter hydrofilowy i jest bogata w reszty seryny, leucyny i argininy. Miejsce cięcia poprzedzone jest regionem dodatnio naładowanym (dziesięć reszt aminokwasowych, z czego siedem posiada ładunek dodatni). Cięcie zachodzi między 50 a 54 resztą aminokwasową (region ten tworzy skręt β). Pozostała część sekwencji tranzytowej ma charakter hydrofobowy i przypomina trochę sekwencję kierującą do ER. Miejsce odcinania części sekwencji tranzytowej jest typowe dla białek tylakoidów, znajduje się w pozycji od -1 do -3 reszt aminokwasowych (Asp-Leu-Ala). Masa cząsteczkowa dojrzałego białka TLP wynosi 38,2 kDa. Pierwszą domenę TLP, po odcięciu sekwencji tranzytowej, stanowi struktura suwaka leucynowego. Możliwe, że za pomocą tej domeny białko TLP oddziałuje z powierzchnią błony tylakoidalnej, bądź tworzy homo- albo heterodimery (16). Za domeną suwaka leucynowego znajduje się region bogaty w aminokwasy kwasowe, z którym potencjalnie mogą oddziaływać inne białka, takie jak chaperony czy fosfatazy (61). Karboksylowy region białka stanowi domena cyklofilinowa. Można wyróżnić w niej motywy charakterystyczne dla rodziny cyklofilin. Białko TLP charakteryzuje się, podobnie jak chloroplastowa CyPB, brakiem siedmiu reszt aminokwasowych (w porównaniu z roślinnymi cytoplazmatycznymi formami). Nie stwierdzono obecności reszty tryptofanowej w pozycji 120 (licząc od pierwszej reszty aminokwasowej domeny cyklofilinowej), co spowodowało brak wrażliwości aktywności enzymatycznej PPlazy białka na CsA. TLP u wielu roślin kodowany jest przez jeden gen, jego ekspresja wykrywana jest w tkankach, etiolowanych i zielonych. Obecność cyklofilin zarówno w stromie jak i w przestrzeni tylakoidalnej wskazuje na ich rolę w procesie prawidłowego fałdowania białek przechodzących przez błony chloroplastowe.

5. Mitochondrialne formy cyklofilin

Podobnie jak w przypadku chloroplastów, białka mitochondrialne w większości syntetyzowane są w cytoplazmie, a następnie transportowane są w stanie częściowego rozplecenia, przez błonę mitochondrialną. Do fałdowania białek dochodzi w matriks mitochondrialnym. Zewnętrzna błona mitochondrium jest gładka i przepuszczalna dla jonów i małych cząsteczek. Błona wewnętrzna jest pofałdowana, tworząc wypustki zwane grzebieniami i ma charakter wysoce selektywny, zawiera pory, których otwieranie i zamykanie uwarunkowane jest odpowiednim stężeniem jonów Ca^{+2} . Fosforylacja oksydacyjna umiejscowiona jest w błonie wewnętrznej, natomiast reakcje cyklu kwasu cytrynowego zachodzą w matriks mitochondrialnym.

W badaniach prowadzonych na mitochondriach z wątroby i serca *Rattus norvegicus* wykazano obecność w matriks mitochondrialnej cyklofiliny o masie cząsteczkowej 18,8 kDa (CyPD), która może wiązać się z wewnętrzną błoną mitochondrialną na zasadzie oddziaływań elektrostatycznych (62,63). Wewnętrzna błona mitochondrialna w warunkach podwyższonego stężenia jonów wapnia, stresu oksydacyjnego lub niskiego stężenia ATP, wykazuje zmniejszoną selektywność w stosunku do przepuszczania pewnych jonów i cząsteczek mniejszych niż 1500 Da. Zjawisko to nazwano zmianą przepuszczalności błony mitochondrialnej – MPT (*mitochondrial permeability transition*) i jest jednym z pierwszych etapów apoptozy. Za zmianę przepuszczalności odpowiedzialne są pory utworzone z połączenia: białka ANT (*adenine nucleotide translocase* – nośnik nukleotydów adeninowych) umiejscowionego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej i kanału anionowego, zależnego od potencjału VDAC (*voltage-dependent anion channel*) białka zlokalizowanego w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Trzecią składową poru jest mitochondrialna cyklofilina D (CyPD). W warunkach podwyższonego stężenia jonów wapnia CyPD oddziałuje z białkiem ANT, uaktywniając nieselektywne przepuszczanie poru. W warunkach *in vitro* dodanie CsA do mitochondriów, powoduje zablokowanie możliwości oddziaływania CyPD z ANT. Wskazuje to na to, że cyklosporyna oddziałując z CyPD albo blokuje miejsce oddziaływania, albo zmienia konformację cyklofiliny uniemożliwiając powstanie kompleksu ANT/CyPD.

W doświadczeniach prowadzonych na *S. cerevisiae* potwierdzono udział mitochondrialnej cyklofiliny w procesie prawidłowego fałdowania białek transportowanych do mitochondriów (14). Badano wpływ CsA na fałdowanie wprowadzonego do mitochondriów białka, reduktazy dihydrofolianu myszy (DHFR), która posiada w swojej strukturze pierwszorzędowej 13 reszt proliny. Porównano dwa szczepy drożdżowe, dziki JK9-3d i zmutowany Δcpr3 charakteryzujący się brakiem genu mitochondrialnej cyklofiliny *cpr3p*. W obu przypadkach CsA nie blokuje transportu DHFR do mitochondriów. W szczepie dzikim CsA spowalnia prawidłowe fałdowanie DHFR w matriks mitochondrialnym. W szczepie zmutowanym reduktaza DHFR fałdowana jest spontanicznie, ale znacznie wolniej niż w szczepie dzikim. Tempo fałdowania określono na tym samym poziomie, co w szczepie dzikim traktowanym CsA. Mito-

chondrialna cyklofilina z *S. cerevisiae* CPR3 (odpowiednik CyPD) w porównaniu z cytoplazmatycznymi formami posiada dwudziestoaminokwasową (głównie reszty posiadające dodatni ładunek) sekwencję transportującą (64), typową dla sekwencji kierujących do mitochondriów (65). Sekwencja ta jest odcinana po wejściu cyklofiliny do matryksu.

Niewiele sekwencji kodujących mitochondrialne cyklofiliny, udało się dotychczas scharakteryzować. U *N. crassa* cDNA mitochondrialnej cyklofiliny powstaje w wyniku alternatywnego składania genu, z którego powstaje jednocześnie cytoplazmatyczna forma białka (66). Gen *CyPD* *H. sapiens* znajduje się na chromosomie 10 i jest podzielony pięcioma intronami, natomiast gen mitochondrialnej cyklofiliny *Tolypocladium niveum* podzielony jest czterema intronami.

6. Uwagi końcowe

Cyklofiliny są białkami powszechnie występującymi w komórkach badanych pod tym względem organizmów. Występują zarówno w cytoplazmie, jak i organellach komórki, co stwarza możliwość traktowania uzyskanych wyników badań jako badania modelowe. Szerokie występowanie cyklofilin umożliwia również porównanie wyników badań uzyskiwanych dla różnych gatunków. Duży stopień zachowawczości sekwencji aminokwasowej pomiędzy nawet znacznie oddalonymi od siebie organizmami, wskazuje na silną presję selekcyjną do zachowania tej właśnie struktury w toku ewolucji, sugerując duże znaczenie i uniwersalność cyklofilin w procesach życiowych. Podwyższona ekspresja genów niektórych cyklofilin w warunkach stresu wskazuje, że mogą być istotnym elementem systemu obronnego roślin.

Literatura:

1. Liu J., Farmer J. D. Jr, Lane W. S., Friedman J., Weissman I., Schreiber S. L., (1991), *Cell*, 23, 807-815.
2. McCaffrey P. G., Perrino B. A., Soderling T. R., Rao A., (1993), *J. Biol. Chem.*, 15, 3747-3752.
3. Galat A., (1993), *Eur. J. Biochem.*, 216, 689-707.
4. Rahfeld J. U., Schierhorn A., Mann K., Fischer G., (1994), *FEBS Lett.*, 343, 65-69.
5. Handschumacher R., Harding M., Rice J., Drugge R., (1984), *Science*, 226, 544-546.
6. Siekierka J. J., Staruch M. J., Hung S. H., Sigal N. H., (1989), *J. Immunol.*, 143, 1580-1583.
7. Hennig L., Christner C., Kipping M., Schelbert B., Rucknagel K. P., Grabley S., Kullertz G., Fischer G., (1998), *Biochemistry*, 28, 5953-5960.
8. Dolinski K., Muir S., Cardenas M., Heitman J., (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 25, 13093-13098.
9. Yaffe M. B., Schutkowski M., Shen M., Zhou X. Z., Stukenberg P. T., Rahfeld J. U., Xu J., Kuang J., Kirschner M. W., Fischer G., Cantley L. C., Lu K. P., (1997), *Science*, 12, 1957-1960.
10. Wu X., Wilcox C. B., Devasahayam G., Hackett R. L., Arevalo-Rodriguez M., Cardenas M. E., Heitman J., Hanes S. D., (2000), *EMBO J.*, 17, 3727-3738.
11. Arevalo-Rodriguez M., Cardenas M. E., Wu X., Hanes S. D., Heitman J., (2000), *EMBO J.*, 17, 3739-3749.
12. Luan S., Lane W. S., Schreiber S. L., (1994), *Plant Cell*, 6, 885-892.
13. Schreiber S. L., (1991), *Science*, 251, 283-287.

14. Matouschek A., Rospert S., Schmid K., Glick B. S., Schatz G., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 6319-6323.
15. Price E., Zydowsky L., Jin M., Bacer C., McKeon F., Walsh C., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1903-1907.
16. Fulgosi H., Vener A. V., Altschmied L., Herrmann R. G., Andersson B., (1998), *EMBO J.*, 17, 1577-1587.
17. Wu J., Matunis M. J., Kraemer D., Blobel G., Coutavas E., (1995), *J. Biol. Chem.*, 9, 14209-14213.
18. Rinfret A., Collins C., Menard R., Anderson S. K., (1994), *Biochemistry*, 22, 1668-1673.
19. Freskgard P. O., Bergenhem N., Jonsson B. H., Svensson M., Carlsson U., (1992), *Science*, 258, 466-468.
20. Fisher G., Wittmann-Liebold B., Lang K., Kiefhaber T., Schmid F. X., (1989), *Nature*, 337, 695-697.
21. Baker E. K., Colley N. J., Zuker C. S., (1994), *EMBO J.*, 13, 4886-4895.
22. Duina A. A., Hui-Chen J. C., Marsc J. A., Lindquist S., Gaber R. F., (1996), *Science*, 272, 1713-1715.
23. Kosano H., Stensgard B., Charlesworth M. C., McMahon N., Toft D., (1998), *J. Biol. Chem.*, 273, 32973-32979.
24. Horowitz D. S., Kobayashi R., Krainer A. R., (1997), *RNA*, 3, 1374-1387.
25. Montague J. W., Hughes F. M., Cidlowski J. A., (1997), *J. Biol. Chem.*, 272, 6677-6684.
26. Luban J., (1996), *Cell*, 87, 1157-1159.
27. Deng W., Chen L., Wood D. W., Metcalfe T., Liang X., Gordon M. P., Comai L., Nester E. W., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 7040-7045.
28. Galat A., Metcalfe S. E., (1995), *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 63, 67-118.
29. Rassow J., Mohrs K., Koidl S., Barthelmess I., Pfanner N., Tropschug M., (1995), *Mol. Cell. Biol.*, 15, 2654-2662.
30. Ke H. M., Zydowsky L. D., Liu J., Walsh C. T., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 9483-9487.
31. Spitzfaden C., Weber H. P., Braun W., Kallen J., Wider G., Widmer H., Walkinshaw M.D., Wuthrich K., (1992), *FEBS Lett.*, 6, 291-300.
32. Liu J., Walsh C. T., (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 4028-4032.
33. Liu J., Chn C., Walsh C. T., (1991), *Biochemistry*, 30, 2306-2310.
34. Cardenas M. E., Lim E., Heitman J., (1995), *J. Biol. Chem.*, 270, 20997-21002.
35. Ke H. M., Mayrose D., Cao W., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 3324-3328.
36. Zhao Y., Ke H. M., (1996), *Biochemistry*, 35, 7362-7368.
37. Zydowsky L. D., Etkorn F. A., Chang H. Y., Ferguson S. B., Stolz L. A., Ho S. I., Walsh C. T., (1992), *Protein Sci.*, 1, 1092-1099.
38. Korfan J. L., Kuzmic P., Kichore V., Colon-Bonilla E., Rich D. H., (1991), *Biochemistry*, 30, 6127-6134.
39. Radzicka A., Acheson S. A., Wolfenden R., (1995), *Science*, 267, 90-93.
40. Mikol V., Kallen J., Walkinshaw M. D., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 5183-5186.
41. Etkorn F. A., Chang Z. Y., Stolz L. A., Walsh C. T., (1994), *Biochemistry*, 8, 2380-2388.
42. Page A. P., MacNiven K., Hengartner M. O., (1996), *Biochem J.*, 1, 179-185.
43. Dornan J., Page A. P., Taylor P., Wu S., Winter A. D., Husi H., Walkinshaw M. D., (1999), *J. Biol. Chem.*, 274, 34877-34883.
44. Marivet J., Frendo P., Burkard G., (1995), *Mol. Gen. Genet.*, 247, 222-228.
45. Saito T., Ishiguro S., Ashida H., Kawamukai M., Matsuda H., Ochiai H., Nakagawa T., (1995), *Plant Cell Physiol.*, 36, 377-382.
46. Nuc K., Nuc P., Słomski R., (2001), *MPMI*, 14, 1384-1394.
47. Buchholz W. G., Harris-Haller L., DeRose R. T., Hall T. C., (1994), *Plant Mol. Biol.*, 25, 837-843.
48. Godoy A. G., Lazzaro A. S., Casalogue C. A., Segundo B. S., (2000), *Plant Science*, 152, 123-134.
49. Chou I. T., Gasser, C. S., (1997), *Plant Mol. Biol.*, 35, 873-892.
50. Marivet J., Margis-Pinheiro M., Frendo P., Burkard G., (1994), *Plant Mol. Biol.*, 26, 1181-1189.
51. Luban J., Bossolt K. L., Franke E. K., Kalpana G. V., Goff S. P., (1993), *Cell*, 73, 1067-1078.
52. Kaplan A. H., Manchester M., Swanstrom R., (1994), *J. Virol.*, 68, 6782-6786.
53. Franke E. K., Yuan H. E. H., Luban J., (1994), *Nature (London)*, 372, 359-362.
54. Gamble T. R., Vajdos F. F., Yoo S., Worthylake D. K., Houseweart M., Sundquist W. I., Hill C. P., (1996), *Cell*, 67, 1285-1294.

55. Sherry B., Zybarth G., Alfano M., Dubrowski L., Mitchell R., Rich D., Ulrich P., Bucala R., Cerami A., Bukrinsky M., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 1758-1763.
56. Saphire A. C. S., Bobardt M. D., Gallay P. A., (1999), *EMBO J.*, 18, 6771-6785.
57. Rossi L., Hohn B., Tinland B., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 126-130.
58. Gatenby A. A., Ellis R. J., (1990), *Annu. Rev. Cell Biol.*, 6, 125-149.
59. Lippuner V., Chou I. T., Scot S. V., Ettinger W. F., Theg S. M., Gasser C. S., (1994), *J. Biol. Chem.*, 269, 7863-7868.
60. van Heijne G., Steppuch J., Herrmann R. G., (1987), *Eur. J. Biochem.*, 180, 535-545.
61. Aldape R. A., Futer O., DeCenzo M. T., Jarrett B. P., Murcko M. A., Livingston D. J., (1992), *J. Biol. Chem.*, 267, 16029-16032.
62. Woodfield K. Y., Price N. T., Halestrap A. P., (1997), *BBA*, 1351, 27-30.
63. Tanveer A., Virji S., Andreeva L., Totty N., Hsuan J. J., Ward J. M., Cropton M., (1996), *Eur. J. Biochem.*, 238, 166-172.
64. Davis E. S., Becker A., Heitman J., Hall M. N., Brennan M. B., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 11169-11173.
65. Attardi G., Schatz G., (1988), *Annu. Rev. Cell Biol.*, 4, 289-333.
66. Tropschug M., Nicholson D. W., Hartl F. U., Kohler H., Pfanner N., Wachter E., Neupert W., (1988), *J. Biol. Chem.*, 263, 14433-14440.
67. Nestel F. P., Colwill K., Harper S., Pawson T., Anderson S. K., (1996), *Gene*, 180, 151-155.
68. Mi H., Kops O., Zimmermann E., Jaschke A., Tropschug M., (1996), *FEBS Letters*, 398, 201-205.
69. Bergsma D. J., Eder C., Gross M., Kersten H., Sylvester D., Appelbaum E., Cusimano D., Livi G.P., McLaughlin M. M., Kasyan K., Porter T. G., Silverman C., Dunnington D., Hand A., Prichett W. P., Boscard M. J., Brandt M., Levy M. A., (1991), *J. Biol. Chem.*, 266, 23204-23214.
70. Carpentier M., Allain F., Haendler B., Denys A., Mariller C., Benaissa M., Spik G., (1999), *J. Biol. Chem.*, 274, 10990-10998.