

Struktura i funkcje białek DnaJ

Marcin Schmidt

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Zakład Wirusologii Molekularnej
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
Poznań

1. Wstęp

Białka szoku termicznego należą do dużej rodziny funkcjonalnie pokrewnych polipeptydów będących jednymi z najbardziej konserwatywnych protein, które kiedykolwiek pojawiły się w toku ewolucji. Ich konserwatywność bardzo dobrze obrazuje główna rodzina białek szoku termicznego — Hsp70, której struktura pierwszorzędowa u ssaków wykazuje prawie 50% homologię z bakteryjną formą Hsp70, zwaną DnaK. Białka te pojawiają się w komórce w odpowiedzi na różnorodne bodźce środowiskowe: podwyższoną temperaturę, sole, etanol, metale ciężkie, analogi aminokwasów, infekcje wirusowe itp. Większość z nich to czynniki naruszające strukturę i konformację białek. Białka szoku termicznego, zaliczane są do chaperonin (ang. *chaperone proteins*) czyli tzw. białek „opiekuńczych”. Biorą one udział w dystrybucji polipeptydów do różnych przedziałów komórkowych, pomagają polipeptydom w wytworzeniu i utrzymaniu właściwej konformacji oraz chronią je przed tworzeniem agregatów. Funkcje białek Hsp są regulowane przez inne białka komórkowe. Jednym z nich jest białko DnaJ, będące także białkiem szoku termicznego.

2. Elementy strukturalne białka DnaJ

Białko DnaJ wyizolowane z *Escherichia coli* należy do zespołu białek Hsp70 (DnaK, DnaJ, GrpE) (1). Jest ono kodowane przez gen *dnaJ* wchodzący w skład operonu promotor-*dnaK-dnaJ*, przy czym gen *grpE* zlokalizowany jest w innym miejscu genomu bakteryjnego (2,3,4). W niektórych organizmach wszystkie trzy geny tworzą jeden operon *grpE-dnaK-dnaJ* (2). Białko DnaJ *Escherichia coli* składa się z 376 aminokwasów (5), ma masę cząsteczkową 43 kDa i w roztworach tworzy dimery (3). W strukturze białka można wyróżnić cztery domeny (od N-końca): „J”, „G/F”, „Cys” oraz C-końcową nie wykazującą stałych motywów (3,4).

Domena „J” zbudowana jest z 70 aminokwasów. Sekwencja aminokwasowa tego regionu sugeruje, że składa się ona z dwóch α -helikalnych odcinków przedzielonych regionem bardziej elastycznym. Domena ta jest najbardziej zachowawcza strukturalnie wśród całej rodziny DnaJ i występuje we wszystkich białkach do niej należących (3,4,6).

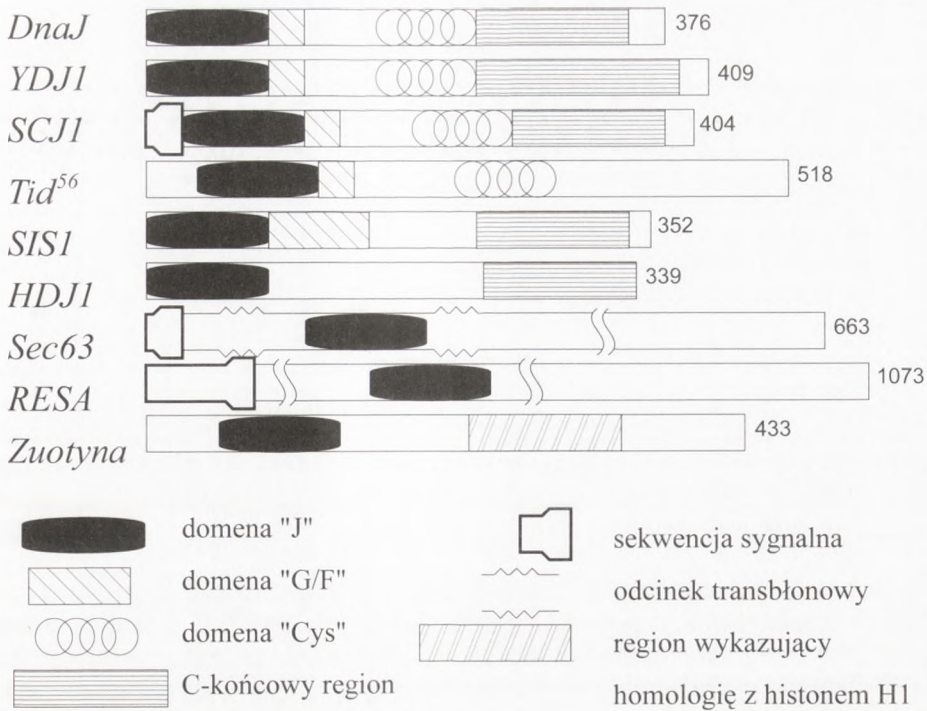
Domena „G/F” bogata jest w glicynę i fenyloalaninę. Aminokwasy te mają mały wpływ na strukturę drugorzędową polipeptydu, a rejon ten przypuszczalnie oddziela domenę „J” od reszty polipeptydu tworząc rejon zawiasowy (ang. *hinge region*) (3). Nie wyklucza się jednak poważniejszej roli tego odcinka. Region ten może funkcjonować jako stabilizator domeny „J” w cytoplazmatycznych białkach DnaJ w komórkach eukariotycznych. Związane z błoną białko Sec63, posiadające domenę „J”, nie posiada sekwencji „G/F”, a dwa odcinki transbłonowe, jak się zdaje, pełnią rolę stabilizatora domeny „J” w zastępstwie „G/F” (4).

Dalszy odcinek białka DnaJ, czyli domena „Cys”, zawiera cztery powtórzenia struktury Cys-X-X-Cys-X-Gly-X-Gly (gdzie X oznacza aminokwasy obdarzone ładunkiem lub polarne). Podobne ułożenie cysteiny posiadają białka wiążące cynk (3,4).

Najbardziej zmiennym regionem jest odcinek C-końcowy, któremu przypisuje się rolę w wiązaniu substratów polipeptydowych (1,6) i razem z częścią domeny „Cys” łączenie białek DnaJ w dimery (6).

Rodzina białek DnaJ wyróżniona została na podstawie obecności w danym białku sekwencji homologicznej do domeny „J” z DnaJ *Escherichia coli*. Obejmuje ona białka szoku termicznego i chaperoniny. Ich podobieństwa do białka DnaJ nie oznaczają identyczności z nim. Wskazują one raczej na zmienność funkcji DnaJ w czasie ewolucji (4). Białka te można podzielić na dwie grupy opierając się na podobieństwie ich sekwencji do prototypu z *Escherichia coli*. Do pierwszej grupy zaliczymy białka o podobnym do DnaJ układzie domen, które prawdopodobnie są jego funkcjonalnymi homologami. Każde z nich posiada N-kończącą domenę „J”, region „G/F”, w centrum domenę bogatą w cysteinę i podobieństwa sekwencji w C-kończącym odcinku z DnaJ. Do tej grupy zaliczamy białka drożdży SCJ1, YDJ1 oraz roślinne ANJ1 i LDJ1. Druga grupa wykazuje się bardziej ograniczonym podobieństwem sekwencji. Zaliczamy do niej białka z N-kończącą domeną „J” i „G/F” (czasami wykazujące podobieństwa z odcinkiem C-kończącym), lecz nie posiadające domeny bogatej w cysteinę (np. SIS1 drożdży oraz ludzkie HSJ1 i HDJ1) oraz takie, które posiadają tylko domenę „J” (Sec63, Zuotyna, CSP i RESA). Białka z tej grupy mogą posiadać domenę „J” zarówno przy N-końcu, jak w DnaJ z *E. coli*, jak i we wnętrzu polipeptydu (3).

Rodzina białek DnaJ wykazuje typowe cechy białek mozaikowych, które składają się z odmiennie zbudowanych odcinków o różnorodnej funkcji (3,7). Strukturę niektórych białek należących do rodziny DnaJ przedstawiono na rysunku 1. Większość dotychczas poznanych białek należących do rodziny DnaJ przedstawiono w tabeli 1. Ujmuje ona także ich lokalizację w komórce i podobieństwo strukturalne do białka DnaJ z *Escherichia coli*.



Rys. 1. Mozaikowa budowa białek DnaJ (wg 5,7,8).

3. Funkcje białek DnaJ

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że rola białka DnaJ polega na ich bezpośrednim udziale jako białka szoku termicznego lub chaperonin w wielu procesach, lub poprzez pośrednie oddziaływanie na inne białka szoku termicznego lub współdziałanie z nimi. Do podstawowych funkcji białek z rodziny DnaJ należą:

(I) działanie jako specyficzny znacznik substratów dla DnaK (1-4,6,7,11,12);

(II) regulacja działania białek szoku termicznego, np. DnaK, poprzez stymulację jego aktywności ATPazowej (1-4,6,7,11-14) lub regulację jego ekspresji (15);

(III) stabilizacja natywnych białek poprzez wiązanie się z nimi w celu ochrony przed denaturacją i agregacją (3);

(IV) wiązanie się ze zdenaturowanymi białkami chroniąc je przed agregacją (1,6,22) i ich renaturacją (5,16,22);

(V) poprzez wiązanie się do powstających polipeptydów chronią je przed przedwczesnym fałdowaniem i uczestnicząc w ich posttranslacyjnym składaniu wpływają na dojrzewanie białek (1,6,11-13);

TABELA 1
RODZINA BIAŁEK DNAJ

Białko	Organizm	Lokalizacja	Domeny			
			J	G/F	Cys	C-koniec
DnaJ	<i>Escherichia coli</i>		+	+	+	+
MtdnaJ	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>		+	+	+	+
NoIC	<i>Rhizobium fredii</i>		+	+	-	-
YDJ1 (MAS5)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	cytoplazma	+	+	+	+
SCJ1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	mitochondria	+	+	+	+
SIS1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	cytoplazma/jądro	+	+	-	+
Sec63(Npl1)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	błona ER	+	-	-	-
Zoutyna	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	jądro	+	-	-	-
SCJ1	<i>Caenorhabditis elegans</i>		+	+	+	+
ANJ1	<i>Atriplex nummularia</i>		+	+	+	+
LDJ1	<i>Allium porrum</i>		+	+	+	+
CSP	<i>Drosophila melanogaster</i>	błony presynaptyczne	+	-	-	-
Tid ⁵⁶	<i>Drosophila melanogaster</i>		+	+	(+)	-
CCCS ₁	<i>Torpedo californica</i>		+	-	-	-
HSJ1a i b	człowiek		+	+	-	-
HDJ1	człowiek		+	-	-	+
Hsp40	człowiek	cytoplazma/jądro	+			
HLADRB 10401	człowiek		(+)			
RESA	<i>Plasmodium falciparum</i>	błona erythrocytu	+	-	-	-

gdzie „+” oznacza występowanie danego regionu, „-” brak, „(+)” niekompletną homologię względem odpowiadającej mu domeny w DnaJ z *Escherichia coli*. Na podstawie (4) uzupełnione z (3,5,7,9,10).

(VI) uczestniczą w transporcie białek i translokacji przez błony do mitochondriów, ER (1,3,8,11-15, 17,18) i jądra (3,8) oraz w procesach sekrecji i endocytozy (15);

(VII) wpływają na proteolizę i obieg białek (1,11-13);

(VIII) uczestniczą w procesach replikacji DNA plazmidowego i fagowego (1,2,4,6,8,12,14,15) oraz syntezy RNA (1,15);

(IX) wiążą się z DNA nie wykazując specyficzności względem sekwencji (4) lub preferencyjnie łącząc się z formą Z-DNA (8) przez co wpływać mogą na dostępność nici kwasu nukleinowego dla czynników replikacji czy transkrypcji;

(X) wpływają na cykl komórkowy (1,8,15), segregację chromosomów i migrację jądra podczas mitozy (7);

(XI) jak ostatnio wykazano biorą udział w supresji transformacji nowotworowej (5,19).

Większość wymienionych funkcji DnaJ ujawnia się podczas działania na komórki warunków stresowych. Pozwala to na, w miarę prawidłowe, funkcjonowanie komórki w warunkach odbiegających od optimum fizjologicznego.

4. Udział homologu genu dnaJ w supresji nowotworowej

Z analizy genów związanych z kancerogenezą i rozwojem nowotworów u kręgowców wynika, że złośliwy wzrost nowotworu może być rezultatem aktywacji lub represji funkcji genów normalnie związanych z takimi procesami jak: różnicowanie, kontrola oddziaływań międzykomórkowych, zahamowanie wzrostu, regulacja transkrypcji, apoptoza, zatrzymanie wzrostu przez cytokiny lub inhibicji syntezy DNA. Zarówno inicjacja jak i rozwój nowotworu może być rezultatem mutacji w genach kwalifikowanych jako a) dominujące, zaktywowane komórkowe onkogeny i b) recesywne, zinaktywowane geny supresorowe (5).

Do rodziny białek DnaJ należy, na przykład, białko będące produktem genu *lethal(2)tumorous imaginal discs (l(2)tid*) supresji nowotworowej. Gen *l(2)tid* odkryty został u *Drosophila melanogaster* na chromosomie politenicznym między prążkami 59F4,5 obejmującymi około 20 kpz. Odcinek kodujący białko ma długość 1554pz i jest przedzielony intronem o długości 142pz na dwa egzony. Duży 5' egzon (pierwszy; 1326pz) i mały 3' (drugi; 225pz). Gen *l(2)tid* zlokalizowany jest w intronie (2,6kpz) innego genu supresji nowotworowej — *lethal(2)neighbour of tid (l(2)not)* — na przeciwnej nici DNA czyli transkrypcja tych genów zachodzi w przeciwnych kierunkach (znane są już cztery inne przypadki „genu w genie” u *Drosophila*). Mutacje w genie *l(2)tid* powodują u homozygotycznych osobników wzrost złośliwych nowotworów w dyskach imaginalnych co prowadzi do śmierci zmutowanej larwy w stadium przepoczwarzania się. Z analizy sekwencji tego genu wynika, że kodowane przezeń białko (Tid⁵⁶) składa się z 518 aminokwasów i ma teoretyczny ciężar cząsteczkowy 56 kDa. Jest to silnie spolaryzowane zasadowe białko o teoretycznym punkcie izoelektrycznym w pH 9,5. Struktura drugorzędowa, przewidywana za pomocą wielu odmiennych metod, wykazuje przynajmniej dziesięć odcinków α -helikalnych poprzedzielanych β -harmonijkami i pętlami. Białko Tid⁵⁶ posiada domenę „J” usytuowaną pomiędzy 60 a 150 resztą aminokwasową N-końca wykazującą dużą homologię (w zakresie od 45,5 do 60,9%) do analogicznego regionu prokariotycznych i eukariotycznych białek DnaJ. Region „G/F” oraz „Cys”, którego dwa z czterech powtórzeń są w 100% identyczne z sekwencją Cys-X-X-Cys-X-Gly-X-Gly charakterystyczną dla tej domeny (5).

Gen *l(2)tid* nie podlega indukcji przez szok termiczny, przez co nie możemy białka Tid⁵⁶ zaliczyć do białek szoku termicznego. Jakkolwiek, opierając się na rozległej homologii prawdopodobnego białka Tid⁵⁶ do wielu białek z rodziny DnaJ można sądzić, że białko to posiadać może właściwości chaperonin

i przypuszczalnie jest odpowiedzialne za właściwe fałdowanie specyficznych białek uczestniczących w różnicowaniu komórek dysków imaginalnych. W dalszych badaniach wykazano, że oba geny *l(2)tid* i *l(2)not* wymagane są do prawidłowego przepoczwarczenia się *Drosophila melanogaster*. Można przypuszczać, że tworzą one funkcjonalną jednostkę podobną do układu genów *sina-RH4* (5,19).

5. Wnioski

Chaperoniny biorą udział we wszystkich etapach metabolizmu komórkowego, podczas biosyntezy białek i ich dojrzewania, w ochronie przed stresem środowiskowym, w rearanżacji makromolekuł podczas różnych cykli oraz w degradacji białek. Duży postęp został osiągnięty w charakteryzacji chaperonin należących do trzech głównych rodzin białek szoku termicznego i w identyfikacji licznych „niespokrewnionych” białek, które także regulują i ułatwiają fałdowanie polipeptydów w komórce. Główne zadanie tkwi teraz w wyjaśnieniu specyficznych molekularnych mechanizmów, dzięki którym chaperoniny rozpoznają swój peptydowy substrat i wpływają na jego fałdowanie i składanie. Zaakceptowanie udziału chaperonin we wspomnianych procesach wymaga rewizji dotychczasowych poglądów na spontaniczność procesów fałdowania polipeptydów (14,20).

Poznanie właściwości molekularnych chaperonin odkrywa nowe perspektywy dla medycyny i biotechnologii. Poza faktem, że chaperoniny należą do białek szoku, są także głównymi antygenami w infekcjach bakteryjnych człowieka i uczestniczą w wielu chorobach autoimmunizacyjnych. Czyni to bardzo prawdopodobnym fakt istnienia chorób „chaperoninowych”, w których zaburzony jest proces właściwego składania białek z powodu zmian w sekwencji substratu, co utrudnia jego rozpoznanie, albo z powodu zmian w sekwencji samych chaperonin. Sytuacji takich dopatrywać się możemy w miopatiach mitochondrialnych (20) i chorobie Alzheimerera (4,21). Fakt, że niektóre bakteriofagi wymagają chaperonin do replikacji zwiększa prawdopodobieństwo, że niektóre wirusy roślinne i zwierzęce także wymagają wsparcia ze strony chaperonin gospodarza. Możliwość ta powinna zostać zbadana w kierunku wykorzystania mutacji odpowiednich chaperonin w celu umożliwienia replikacji wirusa nie naruszając komórki gospodarza. Produkcja rekombinowanych białek w bakteriach, czy w drożdżach jest limitowana w wielu przypadkach przez błędy w składaniu białek do aktywnej konformacji; typowym problemem są tutaj nierozpuszczalne agregaty — ciała inkluzyjne (ang. *inclusion bodies*). W takich sytuacjach należałoby zbadać biogenezę danego białka w komórkach, w których powstaje ono naturalnie, w celu odkrycia potencjalnych chaperonin uczestniczących w tym procesie. Wiadomości takie pozwalałyby tworzyć rekombinanty, które wyposażone byłyby także w „maszynię” potrzebną do właściwego składania produktu. Możliwe jest też stworzenie systemów *in vitro* zawierających chaperoniny do produkcji aktywnych białek ze zdenaturowanych ciał inkluzyjnych (20,22).

Produkty ekspresji genów indukowanych przez warunki stresowe mogą służyć jako markery stanów fizjologicznych komórki. Znajomość działania chaperonin w zakresie renaturacji i zapobieganiu tworzenia agregatów pozwoli udoskonalić wiele technik badawczych, np. PCR, natywną elektroforezę czy samo przechowywanie enzymów przez użycie chaperonin jako składnika buforów.

Autor wyraża podziękowanie prof. dr hab. Annie Goździckiej-Józefiak za pomoc w przygotowaniu tego artykułu.

Praca wykonana w ramach realizacji projektu badawczego Nr 4 PO5E 003 09.

Literatura

1. Skowrya D., McKenney K., Wickner S. H., (1995), *Sem. in Virol.*, 6, 43-51.
2. Ang D., Liberek K., Skowrya D., Zyllich M., Georgopoulos C., (1991), *J. Biol. Chem.*, 266, 24233-24236.
3. Caplan A. J., Cyr D. M., Douglas M. G., (1993), *Molecular Biology of the Cell*, 4, 555-563.
4. Cheetham M. E., Brion J.-P., Anderton B. H., (1994), *Heat-Shock Proteins in the Nervous System*, Acad. Press Ltd. New Yourk-San Francisco-London, 169-190.
5. Kurzik-Dumke U., Gundacker D., Rentrop M., Gateff E., (1995), *Develop. Genet.*, 16, 64-76.
6. Wall D., Zyllich M., Georgopoulos C., (1994), *J. Biol. Chem.*, 269, 5446-5451.
7. Bork P., Sander C., Valencia A., Bukau B., (1992), *TIBS*, 17, 129.
8. Zhang S., Lockshin C., Herbert A., Winter E., Rich A., (1992), *EMBO J.*, 11, 3787-3796.
9. Albani S., Tuckwell J. E., Esparza L., Carson D. A., Roudier J., (1992), *J. Clin. Invest.*, 89, 327-331.
10. Bessoule J.-J., (1993), *FEBS*, 12444, 323, 51-54.
11. Beckmann R. P., Mizzen L. A., Welch W. J., (1990), *Science*, 248, 850-854.
12. Hendrick J. P., Hartl F.-U., (1993), *Annu. Rev. Biochem.*, 62, 349-384.
13. Cyr D. M., Lu X., Douglas M. G., (1992), *J. Biol. Chem.*, 267, 20927-20931.
14. Gething M.-J., Sambrook J., (1992), *Nature*, 355, 33-45.
15. Craig E. A., Gross C. A., (1991), *TIBS*, 16, 135-140.
16. Cheetham M. E., Brion J.-P., Anderton B. H., (1992), *Biochem. J.*, 284, 469-476.
17. Hattori H., Liu Y.-C., Tohnai I., Ueda M., Kaneda T., Kobayashi T., Tanabe K., Ohtsuka K., (1992), *Cell Structure and Function*, 17, 77-86.
18. Rapoport T. A., (1992), *Science*, 258, 931-936.
19. Kurzik-Dumke U., Phannavong B., Gundacker D., Gateff E., (1992), *Differentiation*, 51, 91-104.
20. Ellis J. R., van der Vies S.M., (1991), *Annu. Rev. Biochem.*, 60, 321-347.
21. Kłyszajko-Stefanowicz L., (1995), *Cytobiochemia*, PWN, Warszawa, 552.
22. Szczepanek A., Płucienniczak A., (1994), *Biotechnologia*, 27, 102-125.

Structure and function of DnaJ proteins

Summary

DnaJ, DnaK and GrpE make together a molecular chaperone system of the heat shock protein 70. The DnaJ protein originally identified in *Escherichia coli* gave the beginning of the DnaJ protein family, which now consists of over 20 members of both prokaryotic and eukaryotic

origin. The proteins of the DnaJ family are phylogenetically highly conserved and they show very similar modular architecture. They are involved at all stages of the cellular metabolism, during protein biosynthesis and maturation, in rearrangements of cellular macromolecules during functional cycles of assembly and disassembly, and of course in the protection against environmental stress.

Some of the latest research has shown that a DnaJ homolog is related to tumor suppression — the Tid⁵⁶ putative protein, a product of the *lethal(2)tumorous imaginal discs* gene.

Key words:

DnaJ homolog, heat shock protein, chaperone, tumor suppression.

Adres do korespondencji:

Marcin Schmidt, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM, Zakład Wirusologii Molekularnej, ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań, fax 615-596.