

Received: 2015.07.29
Accepted: 2016.05.27
Published: 2016.12.31

Molekularna charakterystyka oraz fizjologiczne znaczenie DOPA-dekarboksylazy

Molecular characteristic and physiological role of DOPA-decarboxylase

Joanna Guenter¹, Robert Lenartowski²

¹Zakład Genetyki, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

²Pracownia Izotopowa i Analizy Instrumentalnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Streszczenie

DOPA-dekarboksylaza jest jednym z istotnych elementów układu dopaminergicznego mózgu oraz sytemu wychwytu i dekarboksylacji prekursorów amin w tkankach obwodowych. Oprócz amin katecholowych, enzym DDC odpowiada za biogenezę serotoniny oraz amin śladowych. Sekwencja aminokwasowa DDC jest zachowywana w toku ewolucji. Aktywność funkcjonalnej cząsteczki enzymu jest regulowana przez stymulację/hamowanie wielu typów receptorów błonowych, fosforylację reszt serynowych oraz bezpośrednie interakcje DDC z białkami regulatorowymi. Jednokopiowy gen *DDC* jest matrycą dla izoform mRNA różniących się sekwencją 5' UTR, a także obecnością alternatywnych eksonów. Swoista tkankowo ekspresja genu *DDC* jest kontrolowana przez dwie sekwencje promotorowe – obwodową i neuronalną, które pozostają w przestrzennym oddaleniu od siebie. Mapowanie miejsc regulatorowych w promotorze neuronalnym wykazało, że jest wiązany przez białka z rodziny POU i HNF. Ze względu na położenie genu *DDC* w konserwowanym ewolucyjnie obszarze częściowo podlegającym piętnowaniu rodzicielskiemu, sugeruje się zaangażowanie mechanizmów epigenetycznych w regulację ekspresji DDC. Nieprawidłowe funkcjonowanie lub niedobór tego białka wywołuje dysfunkcję układu nerwowego, zaburzenia psychiczne oraz koreluje z procesem nowotworzenia. Oprócz wymienionych problemów, w pracy zwrócono uwagę na rolę DDC w etiologii chorób gruczołu krokowego, afektywnej dwubiegunowej, Parkinsona oraz niedoboru DDC. Omówiono również nowoczesne i perspektywiczne metody kuracji chorych oparte na terapii genowej oraz wykorzystujące komórki macierzyste.

Słowa kluczowe:

DOPA-dekarboksylaza • dekarboksylaza L-aminokwasów aromatycznych • regulacja transkrypcyjna • regulacja potranskrypcyjna • regulacja potranslacyjna • regulacja epigenetyczna • choroba Parkinsona • niedobór DDC • choroba afektywna dwubiegunowa • nowotworzenie

Summary

The enzyme DOPA decarboxylase (aromatic-L-amino-acid decarboxylase, DDC) plays an important role in the dopaminergic system and participates in the uptake and decarboxylation of amine precursors in the peripheral tissues. Apart from catecholamines, DDC catalyses the biosynthesis of serotonin and trace amines. It has been shown that the DDC amino acid sequence is highly evolutionarily conserved across many species. The activity of holoenzyme is regulated by stimulation/blockade of membrane receptors, phosphorylation of serine residues, and DDC interaction with regulatory proteins. A single gene codes for DDC both in neuronal and non-neuronal tissue, but synthesized isoforms of mRNA differ in the 5' UTR and in the presence of alternative exons. Tissue-specific expression of the *DDC* gene is controlled by two spatially distinct promoters – neuronal and non-neuronal. Several consensus sequences recognized by the HNF and POU family proteins have been mapped in the neuronal *DDC* promoter.

Keywords:	DOPA decarboxylase • aromatic-L-amino-acid decarboxylase • transcriptional regulation • posttranscriptional regulation • posttranslational regulation • epigenetic regulation • Parkinson's disease • DDC deficiency • bipolar affective disorder • neoplasia
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?CID=1227773
Word count:	6629
Tables:	–
Figures:	5
References:	130

Adres autora: dr Robert Lenartowski, Pracownia Izotopowa i Analizy Instrumentalnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska UMK w Toruniu, ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń; e-mail: rlenart@umk.pl

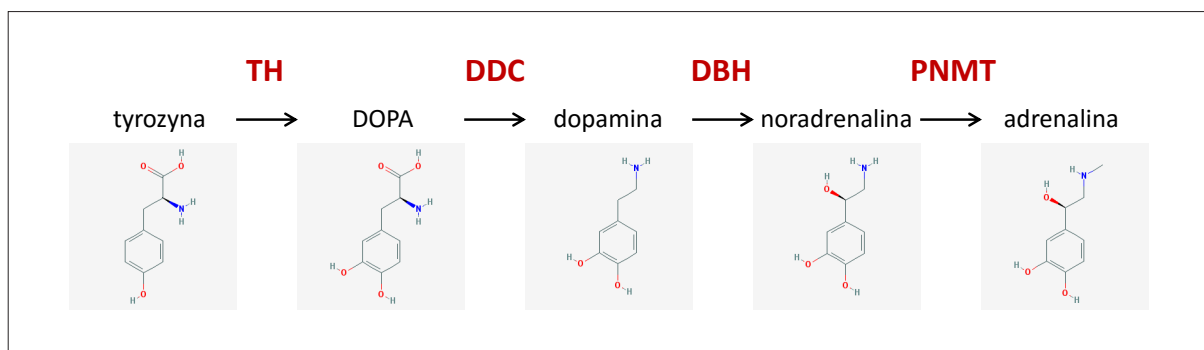
Wykaz skrótów: **aa** – reszty aminokwasowe, **AAV** – wirus towarzyszący adenowirusom (Adeno-Associated Virus), **ADHD** – zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (Attention Deficit Hyperactivity Disorder), **APUD** – system wychwyty i dekarboksylacji prekursorów amin katecholowych (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation), **AR** – receptor androgenowy (Androgene Receptor), **ASN** – α-synukleina (α-synuclein), **BPAD** – choroba afektywna dwubiegunowa (Bipolar Affective Disorder), **CaMKII** – kinaza białkowa II zależna od wapnia/kalmoduliny (Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II), **DA** – dopamina, **DAT** – transporter dopaminy (Dopamine Transporter), **DDC** – DOPA-dekarboksylaza (DOPA Decarboxylase), **DDC⁺** – komórki wykazujące ekspresję genu DDC, **DJ-1** – peptydaza białkowa DJ-1, **DOPA** – L-3,4-dihydroksyfenyloalanina, **EMSA** – test opóźnienia migracji DNA w żelu (Electromobility Shift Assay), **ERK** – kinaza białkowa regulowana sygnałami zewnątrzkomórkowymi (Extracellular Signal-Regulated Kinase), **GAF** – białko rozpoznające powtórzenia GA (GAGA Factor), **GCH1** – gen kodujący cyklohydrolazę-GTP (GTP-Cyklohydrolase 1), **GDNF** – czynnik neurotroficzny pochodzenia glejowego (Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor), **Grb10** – gen kodujący białko adapterowe receptora czynnika wzrostu (Growth Factor Receptor-Bound Protein 10), **HNF** – rodzina czynników transkrypcyjnych z konserwowanym motywem winged helix/forkhead (Hepatocyte Nuclear Factor), **Ikzf1** – gen kodujący białko Ikaros wiążące DNA (DNA-Binding Protein Ikaros), **iPS** – indukowane pluripotentne komórki macierzyste (Induced Pluripotent Stem Cells), **kDa** – kilodaltony, **LCC-PK₁** – linia komórkowa wyprowadzona z komórek epitelialnych nerki świni, **L-DOPA** – lewo-DOPA (Levodopum), **MN9D** – nowotworowa, mysia linia komórkowa, **MORE** – element rozpoznawany przez czynniki transkrypcyjne nOct (More Palindromic Oct Factor Recognition Element), **MSN** – średnie neurony kolczaste (Medium Spiny Neurons), **nDDC** – DOPA-dekarboksylaza obecna w neuronach, **NF-Y** – jądrowy czynnik transkrypcyjny Y (Nuclear Transcription Factor Y), **NGFI-A** – czynnik wzrostu neuronów (Nerve Growth Factor-Induced Protein A), **N-Oct** – rodzina neuronalnych czynników transkrypcyjnych rozpoznających sekwencję oktameru (Neuronal Octamer Transcription Factor), **Nurr1** – jądrowy receptor sierocy (Nuclear Receptor Related 1), **oDDC** – DOPA-dekarboksylaza obecna w tkankach obwodowych, **ORF** – otwarta ramka odczytu (Open Reading Frame), **PC12** – nowotworowa, szczurza linia komórkowa, **PD** – choroba Parkinsona (Parkinson's Disease), **PKA** – białkowa kinaza zależna od cAMP (Protein Kinase A), **PKC** – białkowa kinaza C (Protein Kinase C), **PKG** – białkowa kinaza zależna od cGMP (Protein Kinase G), **PLP** – fosforan pirydoksalu (Pyridoxal 5'-phosphate), **POU** – rodzina czynników transkrypcyjnych z konserwowaną domeną POU, **PP2A** – fosfataza białkowa 2A (Protein Phosphatase 2A), **pz** – pary zasad, **Receptor D1, D2** – receptor dopaminowy D1, D2, **Ser** – reszta seryny, **SH-SY5Y** – nowotworowa, ludzka linia komórkowa, **SP-1** – czynnik transkrypcyjny SP-1 (Specificity Protein 1), **TH** – hydroksylaza tyrozynowa (Tyrosine Hydroxylase), **Thr** – reszta treoniny, **TPH** – hydroksylaza tryptofanu (Tryptophan Hydroxylase), **UTR** – region niepodlegający translacji (Untranslated Region), **VMAT₂** – pęcherzykowy transporter monoamin (Vesicular Monoamine Transporter 2).

WSTĘP

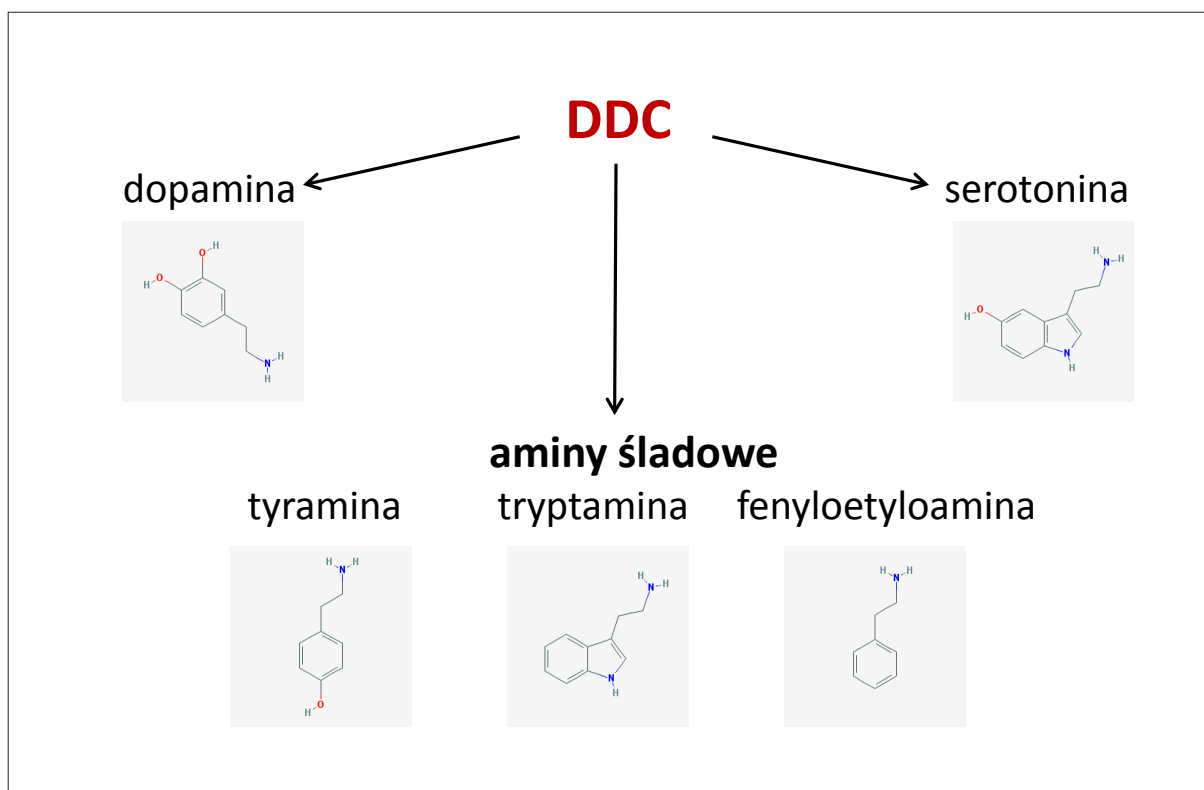
DOPA-dekarboksylaza (dekarboksylaza L-aminokwasów aromatycznych, aromatic-L-amino-acid decarboxylase, DOPA-decarboxylase, DDC, AADC) (EC 4.1.1.28) jest drugim enzymem szlaku syntezy amin katecholowych (ryc. 1). Ze względu na rodzaj przeprowadzanej reakcji oraz wykorzystywany koenzym, DDC należy do II podgrupy rodziny α -aminotransferaz [12]. Aktywny enzym w obecności cząsteczki fosforanu pirydoksalu (PLP), dekarboksyluje L-3,4-dihydroksyfenyloalaninę (DOPA) do dopaminy (DA) [128].

Po raz pierwszy obecność DDC stwierdzono w latach 30 ub.w. w ekstraktach białkowych pochodzących z ssa-

czekich nerek [128]. Wyniki otrzymane przez wielu badaczy wykazały, że enzym uczestniczy nie tylko w syntezie DA, ale i serotoniny oraz amin śladowych (tyraminy, 2-fenyletyloaminy i tryptaminy) (ryc. 2) [128]. Możliwość syntezy różnych produktów przez DDC może wynikać z dywergencyjnej ewolucji obserwowanej w grupie dekarboksylaz i poszerzenia zakresu substratowego tego enzymu [124]. Ze względu na sposób syntezy i tkankowe umiejscowienie wyróżniono neuronalną (nDDC) oraz obwodową (oDDC) DDC. nDDC jak i kodujący ją transkrypt występują głównie w neuronach katecholaminergicznych, serotoninerdycznych oraz komórkach chromochłonnych rdzenia nadnerczy. Enzym występuje również w neuronach pozbawionych aktywno-



Ryc. 1. Schemat szlaku syntezy amin katecholowych. Powyżej strzałek umieszczono skrótowe nazwy enzymów. Nazwy substratów i produktów znajdują się przed i za strzałkami; TH – hydroksylaza tyrozynowa, DDC – DOPA dekarboksylaza, DBH – β -hydroksylaza dopaminy, PNMT – N-metylotransferaza



Ryc. 2. Produkty reakcji katalizowanych przez enzym DDC

ści hydroksylazy tyrozynowej (TH) i tryptofanowej (TPH) [11] oraz komórkach glejowych [66,75]. Ekspresję oDDC wykazano m.in. w komórkach nerek, wątroby, płuc, serca, przewodu pokarmowego i trzustki, a także w tkance tłuszczowej i keratynocytach [11,26]. W obu przypadkach powstający polipeptyd charakteryzuje się podobnymi właściwościami biochemicznymi, choć jest syntetyzowany na matrycach jednego z dwóch rodzajów mRNA, powstającego po aktywacji promotora – neuronalnego lub obwodowego [4,5]. Fizjologiczne znaczenie oDDC nie zostało jeszcze w pełni opisane poza nielicznymi tkankami/organami. Wykazano, że wytwarzanie dopaminy w nerkach jest związane z istnieniem endokrynnych komórek systemu APUD, biorących udział w wychwycie i dekarboksylacji prekursorów amin, istotnym w regulacji stężenia sodu oraz fosforu w organizmie [7,33,62]. Ponadto, oDDC budzi zainteresowanie badaczy głównie ze względu na rolę w terapii PD prowadzonej za pomocą podawanej egzogennie L-DOPA, której skuteczność jest zależna od zablokowania aktywności DCC metabolizującej lek w tkankach obwodowych [33,45].

BUDOWA, FUNKCJA I CZYNNIKI REGULUJĄCE AKTYWNOŚĆ ENZYMU DDC

Budowa cząsteczki enzymu DCC oraz jej właściwości

Porównanie składu sekwencji aminokwasowych DDC różnych gatunków zwierząt wykazało, że białko to jest zachowywane w toku ewolucji. DDC człowieka jest ponad 88% identyczne z sekwencjami bydła, świni czy szczura. Najniższy (59%) poziom identyczności stwierdzono między ludzką DDC a sekwencjami pochodzącymi z filogenetycznie odległej grupy organizmów, jakimi są owady [79]. Duże podobieństwo sekwencji aminokwasowej, struktury oraz kinetyki prowadzonej reakcji występuje również między DDC zwierząt a ich roślinnymi odpowiednikami – dekarboksylazą L-tryptofanu i L-tyrozyny [38]. Funkcjonalna DDC jest homodimerem o masie około 100 kDa [29,77,78,89,108]. W monomerze DDC człowieka wyróżniono trzy występujące po sobie domeny N, L i C, których granice wyznaczają 85 i 360 aa łańcucha [42] (ryc. 3). Domena N ma budowę charakterystyczną dla II grupy dekarboksylaz – stwierdzono w niej obecność trzech helis α odpowiedzialnych za wytworzenie miejsca styku między dwoma monomerami DDC i nadanie enzymowi struktury czwartorzędowej [42]. Poszczególne motywy domeny N, a także przyległej do niej dużej domeny L, łączą pętle o niskim poziomie strukturalnego uporządkowania [23,42]. Wiele reszt aminokwasowych trzech pierwszych pętli tworzy wiązania z substratem DDC [23] (ryc. 3). Centralną częścią domeny L jest motyw strukturalny, w skład którego wchodzi siedmioniciowa harmonijka β typu mieszanego, oskrzydłona przez osiem helis α o typowym układzie α/β [23]. W obszarze tym znajduje się centrum aktywne enzymu, którego krytycznym elementem jest reszta lizyny 303 odpowiedzialna za wiązanie PLP (ryc. 3) – aktywnej postaci witaminy B6 [13]. Niedobór bądź nieprawidłowości w przemiach związków z grupy witaminy B6 powodują spadek

aktywności DDC. Dziedziczne zaburzenia metabolizmu tych związków mogą być mylone z niedoborem DDC, ponieważ obraz kliniczny oraz charakterystyka biochemiczna obu schorzeń jest podobna [7,114]. Mała domena C, podobnie jak domena L, wykazuje budowę typową dla rodziny aminotransferaz asparaginowych, zawiera czteroniciową przeciwrównoległą harmonijkę β oraz trzy helisy α [23]. Region ten uczestniczy w stabilizacji konformacji enzymu przez utworzenie krótkiej, dwuniciowej struktury harmonijki β z kilkoma aa domeny N [23,42].

Badania kinetyczne i krystalograficzne wykazały, że czwartorzędowa struktura DCC pozostaje w ścisłym związku z liczbą cząsteczek kofaktora przyłączanych przez enzym [42]. Otwarta konformacja apoenzymu umożliwia stopniowe wysycenie miejsc dla PLP z przewagą wiązania przez jedną z dwóch asymetrycznie ułożonych podjednostek. Proces ten wywołuje aktywację i wyższy stopień strukturalnego uporządkowania monomerów, zwłaszcza w obrębie niesfałdowanych pętli. Dochodzi do zbliżenia obu domen L i przyjęcia przez holoenzym zamkniętej struktury [23,42]. Przejście konformacyjne wiąże się z obniżeniem tempa degradacji enzymu w wyniku stabilizacji jego konformacji [13]. Potwierdzeniem tej hipotezy są doświadczenia Matsuda i wsp., które wykazały 20-krotnie wyższy poziom degradacji apoenzymu w porównaniu z holoenzymem w komórkach szczurzej linii PC12 [80]. Wiązanie kofaktora przez apoenzym zależy od stężenia PLP i jest uważane za jeden z mechanizmów regulujących liczbę cząsteczek DDC w komórce [80]. Zaobserwowano, że wśród 23 mutacji punktowych genu *DDC* występujących u chorych z zaburzeniami syntezy neuroprzekazników 16 to mutacje strukturalne, przekładające się na zmiany konformacji białka [42] oraz zaburzenia w strukturze miejsca wiązania kofaktora [12].

Wyniki doświadczeń opartych na frakcjonowaniu, immunoblotingu oraz pomiarach aktywności enzymatycznej, prowadzone na nieneuronalnych i neuronalnych ssaczych liniach komórkowych lub izolowanych tkankach, wykazały obecność aktywnej postaci DDC we frakcji błonowej oraz frakcji białek rozpuszczalnych [25,70,71,98]. Towarzyszący procesowi dysocjacji z frakcji błonowej wzrost aktywności enzymatycznej DDC może stanowić mechanizm kontrolujący właściwości katalityczne tego białka [25]. Badania lizatów szczyrzego prądkowia dokumentują koprecypitację DDC z występującym w błonie pęcherzykowym transportem monoamin ($VMAT_2$), zaangażowanym w transport neuroprzekazników do wnętrza pęcherzyków synaptycznych [24]. Jak wykazano, DDC nie jest jedynym białkowym partnerem $VMAT_2$. Jednoczesne interakcje transportera z pierwszym w kolejności enzymem szlaku syntezy katecholamin, którym jest TH oraz DDC przypuszczalnie umożliwiają skoordynowanie procesu syntezy dopaminy i jej magazynowania w pęcherzykach synaptycznych [24]. Ponadto wykazano, że czynnikami decydującymi o rozpuszczalności enzymu jest

pH środowiska oraz stężenie jonów metali dwuwartościowych [25].

Regulacja aktywności DCC

Zróznicowany, zależny od bodźca, sposób regulacji DDC leży u podstaw poprawnego działania całego układu dopaminergicznego. Stymulacja neuronów DDC⁺ doprowadza do powstania odpowiedzi komórki na stres, pozostającej w ścisłym związku z czasem i rodzajem czynnika zaburzającego homeostazę [45]. W czasie odpowiedzi krótkotrwałej wykorzystana zostaje pula zsyntetyzowanej DDC, podczas gdy stężenia mRNA DDC oraz białka pozostają bez zmian [11,63]. Do aktywacji enzymu dochodzi w wyniku jego interakcji z białkami regulatorowymi, do których należy DJ1 i/lub procesu fosforylacji DDC przez swoiste kinazy białkowe [11,45,63]. Wydłużenie czasu pobudzania powoduje wejście neuronów DDC⁺ w drugą fazę odpowiedzi – długotrwałą. Prócz opisanej mobilizacji dostępnej puli enzymu, dochodzi wówczas do aktywacji transkrypcyjnej genu oraz uruchomienia mechanizmów potranskrypcyjnej i potranslacyjnej regulacji DDC [22,27,28,47].

Regulacja DDC przez receptory błonowe

Złożona, plastyczna odpowiedź komórki dopaminergicznej po stymulacji/hamowaniu adrenergicznych, cholinergicznych, dopaminergicznych, GABA-ergicznych, glutaminergicznych i serotonergicznymi receptorów błonowych obejmuje etap regulacji aktywności DDC [45]. Sposób i poziom aktywacji enzymu pozostaje w ścisłym związku z profilem farmakologicznym oraz typem docelowego receptora [27,28,130]. Uważa się, że podanie antagonistów receptorów zwiększa aktywność DDC, natomiast ich stymulacja wiąże się ze spadkiem aktywności enzymu [27,28,45,47,129]. Pogląd ten potwierdzają doświadczenia, w których hamowanie receptorów dopaminergicznymi, serotonergicznymi czy glutaminergicznymi wywoływało aktywację DDC w neuronach prążkowania gryzoni [27,46,47,87]. Wzrost aktywności DDC obserwowano także po podaniu niektórych rodzajów agonistów [27,28,46,47]. Omawiany skutek aktywacji może wystąpić zarówno w mechanizmie krótko- jak i długoterminowej odpowiedzi na bodziec [45]. Ponadto, aktywność DDC może być zdeterminowana genetycznie. U osób będących nosicielami allelu A1 genu receptora D2, u których funkcja tego receptora jest zaburzona, występuje wrodzona podwyższona aktywność enzymu w prążkowie [73]. Stymulacja neuronów DDC⁺ może doprowadzić do uruchomienia odmiennych mechanizmów komórkowych w czasie odpowiedzi długoterminowej. Rodzaj wywołwanego efektu oraz jego natężenie jest zależne od umiejscowienia neuroanatomicznego neuronu dopaminergicznego [45]. Długotrwałe podawanie myszom antagonistów receptorów D1 (SCH23390) i D2 (haloperidolu) powoduje wzrost aktywności oraz nagromadzenie białka DDC w prążkowie, a także zwiększa stężenie transkryptu DDC w śródmózgowiu [28]. Również pojedyncza iniekcja klozapiny – mało selek-

tywnego antagonisty receptorów dopaminergicznymi oraz serotonergicznymi, powoduje akumulację DDC w prążkowie oraz zróznicowany wzrost stężenia mRNA DDC w neuronach brzusznej części nakrywy, istoty czarnej, miejsca sinawego oraz jąder szwu u myszy [87]. Nie odnotowano natomiast wpływu długotrwałego podawania agonisty receptorów D1 (SKF38393) na aktywność enzymatyczną DDC, ani na stężenie kodującego ją transkryptu [28].

Regulacja aktywności DDC w procesie fosforylacji

Obserwowany *in vivo* wzrost aktywności DDC w prążkowie i śródmózgowiu myszy po dokomorowym podaniu aktywatorów białkowej kinazy A zależnej od cAMP (PKA) pozwolił na postawienie hipotezy o jej udziale w regulacji aktywności dekarboksylazy [125,126]. Badania *in vitro* z użyciem natywnej DDC izolowanej z obu wymienionych obszarów mózgu oraz rekombinowanej bydlęcej DDC dowodzą bezpośredniej fosforylacji przez PKA [34]. Osiągnięcie *in vivo* większej aktywności przez rekombinowaną DDC autorzy tłumaczą częściową fosforylacją natywnego enzymu [34]. Inną kinazą zdolną do modyfikacji sekwencji DDC jest umiejscowiony w neuronach dopaminergicznymi oraz serotonergicznymi typ Iα białkowej kinazy zależnej od cGMP (PKG). Inkubacja zarówno natywnej DDC uzyskanej z prążkowania myszy, jak i zrekombinowanej postaci enzymu z PKG, powoduje istotny wzrost aktywności dekarboksylazy [35]. Proces aktywacji z udziałem PKG został potwierdzony w obecności swoistego inhibitora, po dodaniu którego nie obserwowano zmian kinetyki DDC [35]. Ponadto wykazano, że sekwencja DDC jest modyfikowana przez kinazę białkową II zależną od wapnia/kalmoduliny (CaMKII), biorącą udział w kontroli aktywności takich enzymów neuronalnych jak TH i TPH [44]. Mimo że sekwencja aminokwasowa DDC jest rozpoznawana przez wiele kinaz, jak dotąd nie zmapowano doświadczalnie aa bezpośrednio włączonych w ten proces. Analiza wyłonionej na podstawie cDNA sekwencji aminokwasowej DDC myszy wskazuje, że mogą nimi być Ser²²⁰, Ser³³⁶, Ser³⁵⁹, Thr³²⁰ i Ser⁴²⁹ [34,44]. Fosforylacja różnych aa przez kinazy aktywowane odmiennymi szlakami sygnałowymi może być jednym z mechanizmów kontrolujących aktywność DDC w czasie krótko- lub długoterminowej odpowiedzi na bodziec docierający do komórki.

Fizjologiczne znaczenie procesu fosforylacji DDC, zwłaszcza w przypadku oDDC, jest wciąż niewyjaśnione. Doświadczenia Waymire'a i Haycocka [111] z użyciem homogenatów komórek chromochłonnych nadnerczy nie wykazały zmian w poziomie ufosforylowania oraz aktywności DDC po zadziałaniu aktywatorami (forskolina, dwumaslan forbolu) lub inhibitorami (kwas okadaikowy) kinaz, a także związkami zwiększającymi aktywność wydzielniczą komórek (jony potasu, acetylocholina) [122]. Dlatego też, otrzymane w warunkach *in vitro* wyniki wymagają uzupełnienia i wykorzystania modeli badawczych umożliwiających zdefiniowanie znaczenia tego procesu *in vivo*.

WPEŁY BIAŁEK REGULATORYWYCH NA KINETYKĘ DDC

Białko α -synukleina

A-synukleina (ASN) jest białkiem opiekuńczym odpowiedzialnym m.in. za utrzymaniem homeostazy DA w układzie dopaminergicznym. ASN może pełnić tę funkcję bezpośrednio przez interakcje z docelowymi białkami, w tym polipeptydami włączonymi w syntezę DA [68]. Pośrednia regulacja obejmuje aktywację białek o charakterze regulatorowym i/lub wpływ na ekspresję genów kodujących ich mRNA [9]. Wśród białek odpowiadających za proces syntezy DA regulowanych przez ASN znajduje się: kinaza białkowa regulowana sygnałami zewnątrzkomórkowymi (ERK), białkowa kinaza C (PKC), fosfataza białkowa 2A (PP2A) oraz enzym TH [64,91,93,94]. Ponadto wykazano, że mutacja sekwencji kodującej ASN A53T skutkująca powstaniem nieprawidłowego białka, uniemożliwia ich regulację i jest uważana za jedną z przyczyn dziedzicznej postaci choroby Parkinsona (PD) [96].

Jednym z przejawów wpływu ASN na funkcjonowanie układu dopaminergicznego są interakcje tego białka z TH. Mogą być podstawą do zrozumienia przypuszczalnego mechanizmu regulacji DDC przez ASN. Wiązanie TH przez ASN pozostaje w ścisłej zależności ze stopniem fosforylacji enzymu. Nieaktywna, a tym samym nieufosforylowana postać TH, pozostaje skompleksowana z ASN. Zmiana poziomu fosforylacji enzymu TH powoduje wymianę dotychczasowego partnera białkowego na białko 14-3-3. Wiąże się to jednocześnie z utrzymaniem wysokiego stopnia fosforylacji przez TH, stabilizacją i wydłużeniem czasu półtrwania cząsteczki enzymu. Zdarzenia te mają bezpośredni wpływ na poziom syntezy DOPA [93,94]. Tak jak w przypadku enzymu TH, doświadczenia immunoprecypitacji z użyciem homogenatów białkowych i przeciwciał skierowanych przeciwko ASN, wykazały bezpośrednie interakcje białka ASN oraz DDC izolowanej z prązkowia szczura. Wykazano, że nadekspresja ASN lub postaci A53T tego białka hamuje aktywność DDC nie wywołując jednoczesnego spadku jego stężenia w komórkach linii PC12 i MN9D. Obserwowany skutek jest przypuszczalnie wywołany niskim stopniem ufosforylowania dekarboksylazy, w którym pośredniczy ASN. Brak jak dotąd bezpośrednich dowodów, że ASN analogicznie jak w mechanizmie regulacji aktywności TH, hamuje aktywność DDC przez aktywację fosfatazy PP2A [115]. Poza negatywnym wpływem na poziom syntezy DA, nadekspresja dzikiej oraz zmutowanej A53T ASN doprowadza także do zahamowania syntezy serotoniny, drugiego produktu DDC [115].

Białko DJ-1

DJ-1 jest homodimerycznym białkiem należącym do rodziny peptydaz. Występuje w cytosolu, jądrze komórkowym oraz mitochondriach. Umiejscowienie mitochondrialne tego białka jest związane z odpowiedzią komórki na stres oksydacyjny. DJ-1 jest polipeptydem wielofunkcyjnym, wykazującym aktywność białka opiekuńczego zależną od stanu redoks środowiska. Białko to jako koaktywator wpływa na poziom ekspresji wielu genów, w tym sekwencji, których produkty są włączone w biosyntezę DA [8,63,106,127]. Dysfunkcje układu dopaminergicznego obserwowane w postaci sporadycznej lub rodzinnej PD wiążą się z występowaniem niefunkcjonalnych białek DJ-1, w tym postaci L166P [8,16]. Badania zespołu Ishikawa [63] wykazały, że knock-out genu *DJ-1* w ludzkich komórkach dopaminergicznym SH-SY5Y znacznie redukuje aktywność enzymatyczną DDC, bez zmian w poziomie jej ekspresji [63]. Immunoprecypitacja z użyciem ekstraktów białkowych komórek SH-SY5Y w obecności przeciwciał skierowanych przeciwko DJ-1 oraz doświadczenia typu pull-down z etykietowaną postacią DJ-1, dokumentują bezpośrednie interakcje DDC-DJ-1. Obserwacje te potwierdzają wyniki badań immunocytochemicznych, w których wykazano współwystępowanie obu białek w komórkach linii SH-SY5Y [63]. Powstanie kompleksu DJ-1-DDC podnosi aktywność dekarboksylazy w obecności dzikiej, a nie zmutowanej L166P postaci DJ-1. Ekspresja L166P DJ-1 doprowadza do dramatycznego obniżenia poziomu ekspresji TH oraz spadku aktywności tego enzymu. Kompleks DJ-1-DDC jest także formowany w komórce w warunkach stresu tlenowego, lecz wraz z postępującą oksydacją reszt cysteinowych DJ-1 zanika stymulujący wpływ tego białka na DDC [63]. DJ-1 uczestniczy również w regulacji białka ASN [127] i może pośrednio wpływać na aktywność DDC.

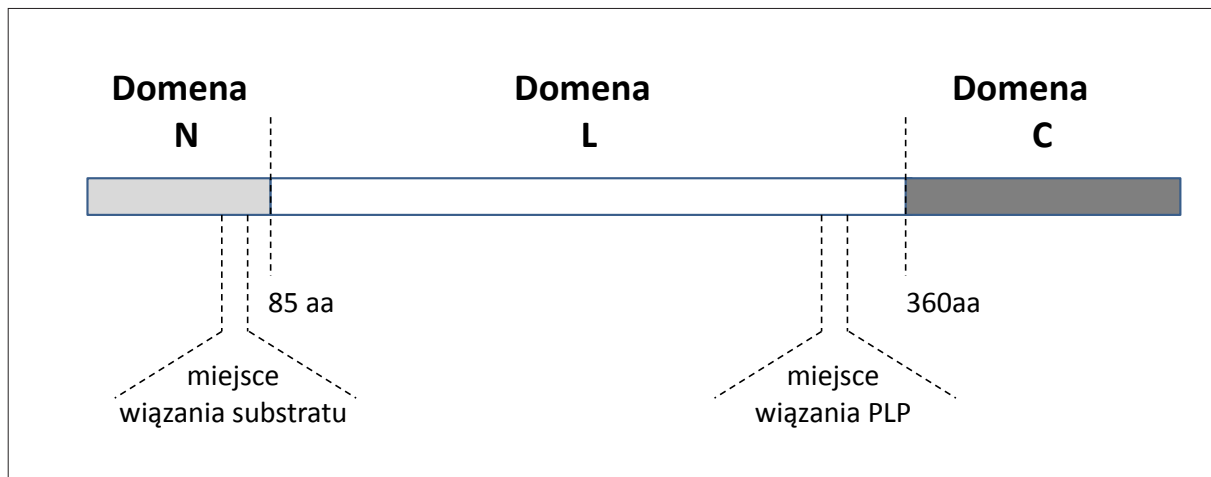
cyjnym, wykazującym aktywność białka opiekuńczego zależną od stanu redoks środowiska. Białko to jako koaktywator wpływa na poziom ekspresji wielu genów, w tym sekwencji, których produkty są włączone w biosyntezę DA [8,63,106,127]. Dysfunkcje układu dopaminergicznego obserwowane w postaci sporadycznej lub rodzinnej PD wiążą się z występowaniem niefunkcjonalnych białek DJ-1, w tym postaci L166P [8,16]. Badania zespołu Ishikawa [63] wykazały, że knock-out genu *DJ-1* w ludzkich komórkach dopaminergicznym SH-SY5Y znacznie redukuje aktywność enzymatyczną DDC, bez zmian w poziomie jej ekspresji [63]. Immunoprecypitacja z użyciem ekstraktów białkowych komórek SH-SY5Y w obecności przeciwciał skierowanych przeciwko DJ-1 oraz doświadczenia typu pull-down z etykietowaną postacią DJ-1, dokumentują bezpośrednie interakcje DDC-DJ-1. Obserwacje te potwierdzają wyniki badań immunocytochemicznych, w których wykazano współwystępowanie obu białek w komórkach linii SH-SY5Y [63]. Powstanie kompleksu DJ-1-DDC podnosi aktywność dekarboksylazy w obecności dzikiej, a nie zmutowanej L166P postaci DJ-1. Ekspresja L166P DJ-1 doprowadza do dramatycznego obniżenia poziomu ekspresji TH oraz spadku aktywności tego enzymu. Kompleks DJ-1-DDC jest także formowany w komórce w warunkach stresu tlenowego, lecz wraz z postępującą oksydacją reszt cysteinowych DJ-1 zanika stymulujący wpływ tego białka na DDC [63]. DJ-1 uczestniczy również w regulacji białka ASN [127] i może pośrednio wpływać na aktywność DDC.

MOLEKULARNA CHARAKTERYSTYKA GENU *DDC* ORAZ MECHANIZMY REGULUJĄCE BIOSYNTEZĘ DDC

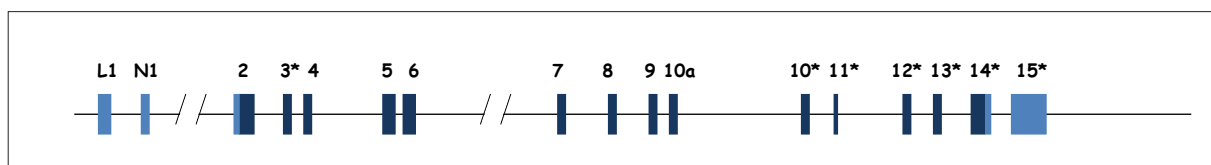
Budowa ludzkiego genu *DDC*

Ustalenie przez Ichinose i wsp. [60] składu nukleotydowego sekwencji kodującej DOPA-dekarboksylazy stało się punktem wyjścia w procesie identyfikacji ludzkiego genu *DDC* [60]. Przeszukanie biblioteki genomowej człowieka sondami cDNA *DDC* różnej długości pozwoliło na wyłonienie komplementarnych klonów i określenie budowy molekularnej poszukiwanej jednostki transkrypcyjnej [110]. W wyniku intensywnych prac badawczych udało się sklonować sekwencje *DDC* *Drosophila*, bydła domowego, szczura, kawi domowej, myszy oraz świni [4,15,21,53,67,112,113].

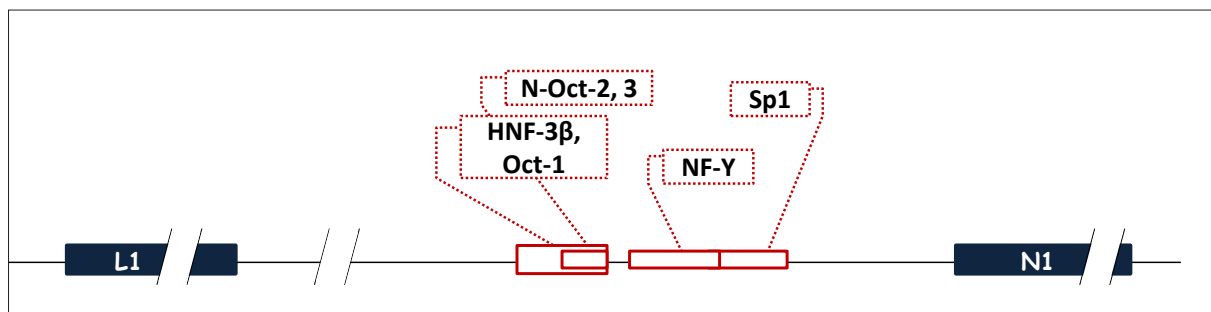
Gen *DDC* człowieka zajmuje obszar ponad 107 kbp na krótkim ramieniu chromosomu 7 w prążku 12.2 [86]. Sekwencja nukleotydowa *DDC* jest zachowywana ewolucyjnie, a podobieństwo genu *DDC* myszy, szczura i szympansa do sekwencji genu człowieka wynosi 84-99% [41]. Ponadto, analiza porównawcza obszaru oskrzydłającego locus *DDC* (sekwencja zawarta między genami *Ikzf1* a *Grb10*) u myszy, szczura i człowieka wykazała jego synteniczny charakter [86,119]. W skład ludzkiego genu *DDC* wchodzi 17 eksonów, w tym dwa niekodujące, swiste tkankowo eksony 1 (postać obwodowa – L1, neuronalna – N1), alternatywny ekson 10 oraz odpowiadająca im liczba intronów (ryc. 4). Długość eksonów waha się



Ryc. 3. Schemat budowy domenowej białka DDC. Na schemacie zaznaczono granice domen w łańcuchu aminokwasowym oraz przybliżoną lokalizację miejsc wiązania substratu oraz kosustratu



Ryc. 4. Schemat budowy ludzkiego genu *DDC*. Granatowymi i niebieskimi prostokątami znaczone odpowiednio eksony oraz 5' i 3' UTR. Eksony podlegające procesowi alternatywnego splicingu oznaczono „*„ „10a” – alternatywny ekson 10, występujący w jednej ze skróconych form mRNA *DDC*



Ryc. 5. Schemat promotora neuronalnego ludzkiego genu *DDC*. Granatowe prostokąty z wpisanymi symbolami symbolizują niekodujące eksony N1 i L1. Funkcjonalne miejsca wiązania białek regulatorowych przedstawiono w postaci pustych prostokątów, powyżej umieszczono nazwy polipeptydów rozpoznających docelowe elementy *cis*.

od 19 (ekson 11) do 407 pz (ekson 15), podczas gdy wielkość najkrótszego i najdłuższego zsekwencjonowanego intronu wynosi odpowiednio 0,6 i 24 kpz [61,86,110,116]. Sekwencję *DDC* człowieka regulują dwa swoiste tkankowo promotory. Pierwszy, obwodowy zmapowano 5' powyżej miejsca +1 eksonu L1 (ryc. 4). Drugi promotor, odpowiadający za aktywację transkrypcyjną *DDC* w tkankach pochodzenia neuronalnego, znajduje się w intronie oskrzydłonym sekwencjami eksonów L1 i N1 (ryc. 4) [61]. W obu obszarach regulatorowych wykazano obecność sekwencji TATA o niekanonicznej budowie. Analiza promotora obwodowego wykazała obecność dwóch sekwencji *cis* dla czynników AP-1 (Activated Protein 1) i SP-1 (Specificity Protein 1), podczas gdy w promotorze neuronalnym wytypowano zarówno potencjalne

i funkcjonalne elementy regulatorowe. Należy do nich sekwencja CAAT oraz miejsca wiązania takich czynników białkowych jak NF-Y (Nuclear Transcription Factor Y), Oct1-2 (Octamer Transcription factor), MRE (Metal Response Element Binding Transcription Factor), NF-κB (Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells), AP-1, AP-3 (Activated Protein 3), HSE (Heat Shock Factor), E4TF1, Pit1/GHF1 (Pituitary-Specific Transcription Factor/Growth Hormone Factor 1), ERE (Estrogen Response Element), IL6-RE-BP (Interleukin 6 Response Element Binding Factor), HNF-3 (Hepatocyte Nuclear Factor 3), Brn2/N-Oct-3, C2/FOXC2 (Forkhead Box Protein C2), H-APF-1 i AP2 (Activated Protein 2) [5,61,74,102,110]. Mechanizm swoistej tkankowo ekspresji genu *DDC* wydaje się oparty na wzajemnie wyklu-

czającej się aktywności sekwencji jednego z dwóch promotorów. Aguanno i wsp. [3] sformułowali hipotezę, w której aktywacja promotora obwodowego w tkankach obwodowych decyduje o blokowaniu położonego poniżej promotora neuronalnego [3]. Niezgodne z prezentowanym przez Aguanno i wsp. poglądem pozostają wyniki badań wykonanych przez Blechingberga i wsp. [15], które dokumentują obecność zarówno neuronalnej jak i obwodowej postaci transkrypty w zdefiniowanych rejonach mózgu (pień mózgu oraz jądra podstawne) podczas ontogenezy świni [15]. Z tego powodu mechanizm aktywacji/inaktywacji promotorów *DDC* wymaga dalszych badań i ustalenia, czy jest to mechanizm uniwersalny czy też swoisty gatunkowo.

Schemat budowy genu *DDC* człowieka oraz przedstawicieli innych grup kręgowców wyższych wykazuje znaczne podobieństwo [15,21,48,86]. Organizmy o niższym stopniu rozwoju ewolucyjnego charakteryzuje odmienny typ organizacji zarówno obszaru kodującego jak i promotorowego *DDC* [55]. Badania genu *DDC* u *Drosophila* wykazały, że 200 pz 5' powyżej miejsca +1 eksonu N1 jest w pełni wystarczające do jego ekspresji w hipodermie, podczas gdy do powstawania neuronalnej postaci enzymu jest wymagana aktywacja dodatkowych elementów regulatorowych położonych w rejonie -1623/-760 [65]. Ponadto, sekwencja ludzkiego genu *DDC* jest matrycą syntezy cząsteczki antysensownego, niekodującego RNA o niezdefiniowanej dotąd roli [86,107].

Sekwencja promotora genu *DDC*

Doświadczenia z użyciem wektorów plazmidowych niosących różnej długości obszary promotorowe *DDC* wraz z 5' regionem niepodlegającym translacji (UTR), a także zastosowanie metody EMSA, pozwoliło na analizę 9000 pz neuronalnego promotora genu *DDC* człowieka. Wykazano w nim obecność 5 regionów bogatych w elementy *cis*, które są włączone w regulację transkrypcyjną dekarboksylazy [74,102]. Wyniki eksperymentów transfekcji nieneuronalnych i neuronalnych linii komórkowych wyżej wymienionymi konstruktami pozwoliły na wskazanie obszarów, w których znajdowały się sekwencje wzmacniające transkrypcję oraz elementy regulatorowe, wykazujące zróżnicowany potencjał wyciszenia aktywności *DDC* [74,102]. Końcowym wynikiem badań było ustalenie minimalnego obszaru promotora niezbędnego do osiągnięcia swoistej komórkowo ekspresji genu. Wykazano, że 560 pz 5' powyżej miejsca startu transkrypcji znajdującego się w eksonie N1 jest wystarczające do osiągnięcia aktywności genu *DDC* w liniach komórek nerwowych [74].

Obwodowy promotor *DDC* człowieka wciąż wymaga badań, które doprowadzą do pełnej charakterystyki funkcjonalnej. Jak dotąd, jedyne dane dla tego obszaru pozyskano w sposób pośredni. Podobieństwo proksymalnej części obwodowego promotora człowieka i szczura pozwala na wyciągnięcie wniosku, że wyniki doświadczeń otrzymane z użyciem sekwencji regula-

torowej gryzoni mogą być uniwersalne i odnosić się do analogicznego obszaru ludzkiego genu *DDC*. W pierwszych 80 pz 5' powyżej miejsca +1 w eksonie L1 potwierdzono obecność istotnych elementów regulatorowych, w tym miejsc decydujących o aktywności szczurzego *DDC* w tkankach obwodowych. Mapowanie z wykorzystaniem metod footprint, EMSA oraz transfekcji linii komórek LCC-PK₁ konstruktami niosącymi deleccje dystalnych fragmentów obwodowego promotora lub jego zmutowane postaci wykazało, że w regionie -49/-25 pz znajduje się element bogaty w pary A/T (5'AATTA-ATGTTTAAC3'), wiązany przez swoisty dla hepatocytów czynnik HNF-1 [2].

PROMOTOR NEURONALNY

Sekwencja -72/-36

Zastosowanie metody EMSA umożliwiło identyfikację czynników *trans* i docelowych miejsc *cis* w proksymalnej części promotora genu *DDC* człowieka. W obszarze -72/-36 pz zaobserwowano formowanie sześciu kompleksów białkowych o odmiennej ruchliwości elektroforetycznej. W skład dwóch o największej i najmniejszej masie cząsteczkowej wchodziły odpowiednio polipeptydy powszechnie występujące w komórkach człowieka oraz charakterystyczne dla komórek pochodzenia neuronalnego [102]. Skracanie sekwencji sond molekularnych użytych w teście EMSA doprowadziło do zawężenia badanego obszaru i zmapowania miejsca bezpośrednich interakcji białko-DNA. Pierwszą sekwencję, położoną między -53 a -36 pz powyżej miejsca startu transkrypcji, wiązał czynnik Sp1. Drugą, znajdującą się w pozycji -72/-53 pz, rozpoznawało białko NF-Y (ryc. 5) [102]. Analiza skutku mutacji punktowych lub deleccji kasety NF-Y w konstrukcjach promotorowych wykazała, że wprowadzane zmiany powodowały znaczny spadek stężenia mRNA genu reporterowego. Obserwacja wskazuje na rolę miejsca NF-Y jako pozytywnego regulatora podczas neuronalnej aktywacji *DDC* [36,37]. Mimo bezpośredniego sąsiedztwa motywów NF-Y i Sp1 nie stwierdzono tworzenia wspólnego kompleksu białkowego przez polipeptydy rozpoznające oba miejsca regulatorowe [102].

Obszar -102/-72

Inny obszar interakcji czynników *trans* znajduje się między -102 a -72 pz neuronalnej sekwencji promotorowej. W jego obrębie stwierdzono powstawanie pięciu kompleksów białkowych o zróżnicowanej swoistości komórkowej. Obserwowane w czasie doświadczeń EMSA super przesunięcie po użyciu przeciwciał skierowanych przeciwko polipeptydowi Oct-1 z rodziny białek POU wykazało, że buduje on kompleks o największej masie cząsteczkowej [102]. Oct-1 wiąże sekwencję promotora genu *DDC* człowieka w postaci monomeru [14]. W dalszych etapach molekularnej charakterystyki rezydentów poszczególnych kompleksów posłużono się techniką EMSA oraz preparatami białkowymi izolowanymi z nieneuronalnych oraz neuronalnych linii komórkowych,

w tym linii poddanych transfekcji sekwencjami czynników Oct (izoforma 2 i 3) i HNF-3 β . Obecność polipeptydów N-Oct-2 i N-Oct-3 z ewolucyjnie zachowywanej rodziny białek POU potwierdzono w dwóch swoistych komórkowo kompleksach białkowych o pośrednim tempie migracji [95,102]. Białka rozpoznawały motywy 5'AAATAATGC3' znajdujący się w pozycji -86/-78 pz badanego obszaru promotora *DDC* człowieka (ryc. 5) [14,82,102]. Analiza skutku wywieranego przez N-Oct-3 wskazuje, że pełni rolę swoistego komórkowo aktywatora *DDC* [36,37]. W oparciu o metodę spektroskopii masowej oraz modelowania *in silico* ustalono, że N-Oct-3 rozpoznaje docelowy element *cis* w promotorze *DDC* w formie monomerycznej, jako homodimer lub heterodimer z NF-Y [36,37]. Badania funkcji kasety wiązanej przez N-Oct-3 wykazały, że jest odpowiedzialna za podstawowy jak i indukowany swoistym czynnikiem *trans* poziom transkrypcji [37]. Białko N-Oct-3 może aktywować gen *DDC* również pośrednio, bez interakcji z docelowym elementem regulatorowym. Powstaje wówczas kompleks NF-Y/N-Oct-3 stabilizowany związaniem sekwencji promotora *DDC* w miejscu rozpoznawanym przez NF-Y (ryc. 5) [36].

Wyniki badań, w których posłużono się zsyntetyzowanymi *in vitro* polipeptydami HNF-3 α i β wykazały, że białka te są rezydentami dwóch najbardziej ruchliwych kompleksów [102]. Białka HNF należą do rodziny czynników z konserwowanym motywem winged helix/forkhead. Są odpowiedzialne za remodelowanie chromatyny, wczesne etapy rozwoju układu nerwowego (HNF-3 β) oraz funkcjonowanie gruczołu wątrobowego człowieka [39]. Wiązana przez nie sekwencja znajduje się między -94 a -73 nt obszaru promotorowego *DDC* (ryc. 5). Nakładanie się elementów *cis* rozpoznawanych przez opisywane wyżej polipeptydy oraz te z rodziny Oct/N-Oct powoduje formowanie dwóch typów kompleksów białkowych. Pierwszy typ zawiera wyłącznie polipeptydy HNF charakterystyczne dla komórek budujących tkanki obwodowe, drugi jest heteromerycznym kompleksem tworzonym przez białko HNF-3 β oraz N-Oct-3 [14,102]. Wykazano ponadto, że polipeptyd HNF-3 β wiąże sekwencje promotorową z niewielkim powinowactwem i może być wypierany przez czynnik Oct-1 z miejsca swego wiązania (ryc. 5) [14].

Element regulatorowy położony między - 900 a - 872 nt promotora *DDC*

Analiza dalszych odcinków neuronalnego promotora genu *DDC* pozwoliła na identyfikację dodatkowego miejsca wiązania dla Oct-3 – elementu MORE (More Palindrome Oct Factor Recognition Element), położonego między - 900 a - 872 pz powyżej miejsca startu transkrypcji [37]. Białko N-Oct-3 rozpoznawało docelowy element *cis* w formie monomeru lub homodimeru. Stwierdzono, że do osiągnięcia pełnej aktywności *DDC* jest niezbędna obecność wszystkich kaset rozpoznawanych przez monomeryczną N-Oct-3, homodimer, a także heterodimery tworzone z innymi czynnikami białko-

wymi. Prócz sekwencji MORE krytycznym dla tego procesu obszarem jest pierwszy 100 pz neuronalnego promotora genu *DDC* człowieka [37].

Regulacja przez inne czynniki białkowe

Transkrypcja genu *DDC* jest regulowana czynnikami białkowymi kontrolującymi ekspresję pozostałych genów kodujących enzymy szlaku syntezy amin katecholowych. Ustalenia wymaga, czy czynniki te wiążą sekwencję promotorową *DDC* bezpośrednio czy też wpływają na jego aktywność w sposób pośredni. Białko Nurr1 (Nuclear Receptor Related 1) należy do rodziny sierocnych receptorów jądrowych i jest uważane za główny czynnik decydujący o powstawaniu i rozwoju neuronów dopaminergicznych w mózgu. Uczestniczy w regulacji aktywności wielu genów neuronalnych w tym *TH*, transportera dopaminy (*DAT*), *VMAT2* oraz *DDC* [32]. Mimo że nie udało się zidentyfikować miejsca rozpoznawanego przez Nurr1 w obrębie promotora mysiego genu *DDC*, doświadczenia na mysiej neuronalnej linii komórkowej MN9D wykazały wzrost poziomu transkryptu *DDC* po transfekcji wektorem niosącym cDNA *Nurr1* [52]. W przypadku linii nieneuronalnej transfekcja tego typu wektorem nie indukowała ekspresji wymienionych genów neuronalnych. Badania mysich zarodków pozbawionych jednego lub obu alleli genu *Nurr1* wykazały natomiast, że jest to czynnik niezbędny do ekspresji zarówno *DDC*, jak i *VMAT2* już we wczesnych stadiach rozwoju embrionalnego [52].

Regulacja potranskrypcyjna *DDC*

Sekwencja kodująca *DDC* człowieka jest konserwowana ewolucyjnie i niesie pojedynczy ORF oskrzydłony na końcach 5' oraz 3' obszarami UTR o różnej długości [60,61,72] (ryc. 4). Obecność wielu postaci mRNA *DDC*, z których część wykazuje specyfikę tkankową, wiąże się z procesem alternatywnego splicingu zachodzącym w sekwencji obu UTRów i/lub części kodującej składanych cząsteczek [26,61,90,116]. Polimorfizm długości obwodowej oraz neuronalnej postaci mRNA *DDC* człowieka, będących dwoma głównymi typami transkryptu, wynika z obecności w sekwencji 5' UTR jednego z dwóch swoistych tkankowo eksonów – L1 lub N1 [61]. Sekwencja eksonu L1 człowieka wykazuje niski poziom homologii do analogicznego obszaru znajdującego się w 5' UTR mRNA *DDC* innych gatunków [15]. W najdłuższych wariantach obu transkryptów miejsce startu translacji, kodon stop oraz sygnał poliadenylacji zmapowano odpowiednio w proksymalnej części eksonu 2, eksonie 14 oraz 15 [110]. Podobne położenie opisanych elementów stwierdzono również w cząsteczkach transkryptów *DDC* gryzoni [15]. Obecność w eksonie L1 czterech sekwencji ATG niepowiązanych z procesem startu translacji ma przypuszczalny związek z ich udziałem w tworzeniu drugorzędowych struktur w tym obszarze [61]. Powstawanie kolejnych izoform mRNA *DDC* warunkuje alternatywny splicing eksonu 3 lub wycinanie sekwencji eksonów 10-15 [26,90,116] (ryc. 4). Skrócenie sekwencji transkryptu o sześć eksonów położonych dystalnie łączy

się z obecnością alternatywnego eksonu 10 niosącego kodon stop [116] (ryc. 4).

Badanie rozkładu mRNA *DDC* w ośrodkowym układzie nerwowym oraz organach obwodowych człowieka ujawniło istnienie różnic w proporcjach poszczególnych transkryptów [26,90,116]. Obserwowane w danym typie tkanki stężenie mRNA *DDC* może być cechą uniwersalną w świecie zwierząt lub być w pełni swoiste gatunkowo [4,5,15,26,90,116]. Wykazano jednocześnie, że enzym *DDC* człowieka kodowany na matrycy mRNA pozbawionego eksonu 3 nie wykazuje właściwości enzymatycznych, co ma przypuszczalnie związek z delecją reszt aminokwasowych odpowiedzialnych za rozpoznanie substratu lub nadawanie trzeciorzędowej struktury temu białku [90].

W innych grupach ssaków również wykazano obecność dwóch typów mRNA *DDC* kodujących neuronalną i obwodową postać enzymu. Ostatni z wymienionych rodzajów transkryptów charakteryzuje swoista gatunkowo budowa 5' UTR [4,5,15,48,72,113]. Polimorfizm 5'sekwencji mRNA *DDC* wiązał się z wykorzystywaniem w procesie dojrzewania różnych miejsc akceptorowych położonych w proksymalnym regionie eksonu II (szczur) lub obecnością dodatkowego eksonu (świnia), występującego między odpowiednikami eksonów L1 i N1 człowieka [4,5,15,48,72]. U zwierząt, podobnie jak u człowieka, występowanie wielu postaci mRNA *DDC* jest spowodowane alternatywnym składaniem zachodzącym wewnątrz cząsteczki transkryptu. Proces dotyczy wycinania wyłącznie sekwencji eksonu 5 lub w złożeniu z eksonem 6 u świni [15].

REGULACJA EPIGENETYCZNA – PIĘTNOWANIE RODZIELSKIE GENU *DDC*

W czasie badań dotyczących korelacji między mutacjami w obrębie sekwencji genu *DDC* a podatnością na zachorowanie na chorobę afektywną dwubiegunową (BPAD) stwierdzono, że jeden z typów mutacji jest dziedziczony ojcowsko [19]. Podobny związek między typem allelu i sposobem jego przekazywania obserwowano w przypadku innego zaburzenia psychicznego – zespołu nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ADHD) [51]. Ekspresja zmutowanej postaci allelu jest skutkiem mechanizmu piętnowania rodzicielskiego – inaktywacji poprawnego allelu pochodzącego od matki. Tak jak i wiele innych piętnowanych sekwencji, *DDC* znajduje się w bliskim sąsiedztwie innego piętnowanego genu – *Grb10*, kodującego białko adapterowe receptora czynnika wzrostu [19]. Jednak wyniki badań Hitchinsa i wsp. [54], w których posłużono się tkankami ludzkimi oraz pochodzącymi z mysich płodów, nie potwierdziły hipotezy o przynależności *DDC* do grupy genów piętnowanych [54]. Odmienne wnioski dostarczyły doświadczenia Menhenniott i wsp. [81], w których wskazano przejściową, ojcowską ekspresję neuronalnej *DDC* w kardiomiocytach mysich płodów i noworodków [81]. Jak dotąd nie udało się jednoznacznie wyjaśnić przyczyn tego zjawiska oraz jego znaczenia w procesie ontogenezy [99].

ROLA *DDC* W ETIOLOGII PROCESU NOWOTWORZENIA, ZABURZEŃ PSYCHICZNYCH ORAZ DYSFUNKCJI UKŁADU NERWOWEGO

DDC jako potencjalny biomarker procesu nowotworzenia

Molekularna charakterystyka 432 typów nowotworów neuroendokrynnych, endokrynnych i nieendokrynnych wykazała, że *DDC* może być uznawana za biomarker ludzkich nowotworów neuroendokrynnych. Ponad 82% nowotworów tego typu charakteryzuje wzmożona ekspresja tego enzymu [40]. W komórkach rakowiaków płuc z nadmiernym wytwarzaniem serotoniny również obserwuje się wyższe stężenie i zwiększoną aktywność *DDC* w porównaniu do tkanek niezmiennych nowotworowo [43]. Nie potwierdzono, by wraz ze wzrostem zróżnicowania komórek jednego z nowotworów neuroendokrynnych – raka rdzeniastego tarczycy, co sugerują wcześniejsze obserwacje [10], spadał poziom dekarboksylazy [10,40]. Dlatego też enzym *DDC* wydaje się dobrym markerem w diagnostyce nowotworów typu neuroendokrynnego.

Rola *DDC* w nowotworach gruczołu krokowego

Jednym z najczęściej występujących nowotworów u mężczyzn jest gruczolakorak stercza. Badania dotyczące neuroendokrynnej postaci tej zmiany nowotworowej wskazują na znaczny wzrost zarówno poziomu mRNA jak i aktywności enzymatycznej *DDC* [56]. Oba czynniki można uznać za biomarkery obecności samego nowotworu, jak i stopnia jego zróżnicowania. Wysoki poziom ekspresji dekarboksylazy koreluje ze wzmożoną ekspresją dwóch regulatorów transkrypcyjnych genu *DDC* – HNF3β i N-Oct-3. Jednak nie stwierdzono, by duża aktywność *DDC* wiązała się z obecnością końcowych produktów, jakimi są serotonina i DA. Brak DA jest przypuszczalnie wynikiem wyciszenia genu *TH* [56]. Doświadczenia zespołu Wafa wykazały, że *DDC* może pełnić rolę białka korelatorowego dla receptora androgenowego (AR) – czynnika transkrypcyjnego należącego do rodziny jądrowych receptorów hormonów steroidowych, którego aktywność w komórkach raka neuroendokrynego stercza pozostaje na wysokim poziomie [120]. Bezpośrednie oddziaływania między C-kończącą domeną *DDC* a AR są niezależne od ligandów. W obecności ligandów i *DDC* dochodzi do wzmocnienia właściwości AR jako aktywatora transkrypcyjnego [120]. Skutek aktywacji obserwowano także w przypadku receptorów glukokortykoidów i w mniejszym stopniu receptorów estrogenów [120]. Wydaje się więc, że *DDC* poza katalizowaniem reakcji dekarboksylacji może pełnić również inne istotne funkcje związane z przeżywalnością komórek.

ROLA *DDC* W ZABURZENIACH PSYCHICZNYCH

Jedną z przyczyn zaburzeń o podłożu psychotycznym (np. schizofrenia) oraz afektywnym (np. BPAD) jest niepoprawna regulacja mezolimbicznego układu dopaminergicznego [33,85]. Stanom tym towarzyszy nadaktywność neuronów dopaminergicznych powo-

dująca nadmierne wytwarzanie DA i hiperstymulację receptorów D1 [33]. Już w 1994 r. badania Reitha i wsp. wykazały istnienie związku między zwiększonym metabolizmem DA a wzrostem aktywności DDC w prążkowie osób cierpiących na psychozy, w tym na schizofrenię [103]. Børglum i wsp. przeanalizowali polimorfizm sekwencji kodującej oraz promotora neuronalnego DDC z predyspozycją zachorowania na schizofrenię lub BPAD [17,18,19]. Analiza haplotypów wykazała obecność dwóch delecji:

- 1 pz zlokalizowanej w regionie promotorowym, w potencjalnym miejscu wiązania neuronalnych czynników transkrypcyjnych z rodziny NGFI-A oraz
- 4 pz zmapowanej w proksymalnej części powtórzenia (GA)₅ w obrębie sekwencji UTR genu DDC.

Ponieważ ostatni z wymienionych elementów jest przypuszczalnie miejscem wiązania białek rozpoznających powtórzenia GA (GAF), opisana 4 pz mutacja może spowodować zanik interakcji swoistych czynników *trans* z docelową sekwencją *cis* [17]. Wykazano istnienie korelacji w przypadku punktowej delecji a zachorowaniem na BPAD [17]. Badania dotyczące segregacji opisanych wariantów haplotypów z przypadkami schizofrenii dokumentują modulujący wpływ mutacji sekwencji promotorowej DDC na przebieg oraz wystąpienie pierwszych objawów choroby [18]. Stwierdzono, że obecność przynajmniej jednego allelu z 1 pz delecją powoduje późniejsze wystąpienie objawów schizofrenii u mężczyzn [18]. Wciąż jednak brak dowodów potwierdzających istotną rolę DDC w etiologii zaburzeń psychiatrycznych. W dalszych badaniach również nie udało się jednoznacznie skorelować wykrytych delecji z wystąpieniem BPAD [19].

ROLA DDC W CHOROBYCH O PODŁOŻU NEUROLOGICZNYM

Choroba Parkinsona

Choroba Parkinsona (PD) jest przewlekłą, postępującą chorobą neurodegeneracyjną o mało poznanej etiologii. Podczas jej trwania dochodzi do wybiórczego zaniku neuronów o fenotypie dopaminergicznym prowadzącego do powstawania zaburzeń motorycznych, autonomicznych oraz neurobehawioralnych u człowieka. Standardowa terapia PD polega na podawaniu L-DOPA, która po przeniknięciu bariery krew-mózg zostaje przekształcona do DA w neuronach DDC* [100]. Skuteczność terapii opartej na prekursorze DA pozostaje w ścisłym związku z osiągnięciem odpowiedniego stężenia preparatu w neuronach z zaburzoną ekspresją DDC i/lub TH. Dlatego tak ważnym zagadnieniem w czasie terapii jest hamowanie przez swoiste blokery aktywności DDC metabolizującej lek w tkankach obwodowych [33,45]. Podczas leczenia pacjentom podaje się L-DOPA z inhibitorami DDC – karbidopą lub benserazydem, co pozwala na dostarczenie większej dawki prekursora do ludzkiego mózgu [45,100]. Długotrwałe stosowanie L-DOPA

wiąże się z obniżeniem jej skuteczności i pojawianiem się komplikacji motorycznych, spowodowanych efektem wyczerpywania – chory wymaga coraz większych i częściej podawanych dawek leku w celu utrzymania działania terapeutycznego [45,100].

Projektowane lub stosowane blokery muszą spełniać wiele warunków, z których brak toksyczności, stabilność oraz wybiórczość działania wobec oDDC są podstawowymi kryteriami ich wyboru. Doświadczalny przegląd potencjalnych inhibitorów enzymu pozwolił na wyłonienie cząsteczki Amb2470350, będącej swoistym inhibitorem kompetycyjnym DDC. Działanie Amb2470350 jest odwracalne, a sama cząsteczka nie przenika przez barierę krew-mózg, blokując tym samym tylko obwodową postać DDC [12,31]. Do niezwykle obiecujących cząsteczek terapeutycznych należą endogenne blokery hamujące oDDC u ssaków:

- składniki surowicy u małąp [101],
- białka globularne o masie 25,5-32,5 kDa występujące w gruczołach podżuchwowych szczurów [50],
- hydrofobowe białko z ludzkiej surowicy o masie 25 kDa [118],
- 35 kDa białko błonowe oczyszczone z ludzkiego łożyska, zidentyfikowane jako aneksyna V – inhibitor kaskady krzepnięcia krwi [117] oraz
- analogi strukturalne DA wyizolowane z ekstraktów silnie trującej trzmieliny gładkiej (*Euonymus glabra* Roxb), występującej na terenie Chin [104].

NIEDOBÓR DDC

Niedobór DDC jest neurometaboliczną, wrodzoną chorobą genetyczną, dziedziczną autosomalnie recesywnie. W 1990 r. Hyland i Clayton opisali pierwszy przypadek tej choroby u bliźniąt jednojajowych [58]. Objawy, do których należą opóźnienie rozwoju, dystoniczne odchylenie gałek ocznych, hipotonia, zaburzenia snu i funkcji motorycznych, a także dysfunkcje układu autonomicznego, pojawiają się w okresie wczesnego dzieciństwa [114]. Opisane zaburzenia wynikają ze znacznego obniżenia stężenia amin biogennych oraz ich metabolitów spowodowanego niskim stężeniem i poziomem aktywności DDC [114]. Zmiany kinetyki enzymu nie dotyczą w tym samym stopniu wszystkich tkanek DDC* – obserwowanemu spadkowi poziomu metabolitów DA w płynie mózgowo-rdzeniowym i osoczu nie towarzyszyły zmiany stężenia DA w moczu osób chorych, co sugeruje właściwą ekspresję i aktywność dekarboksylazy w nerkach [1,59]. Do 2013 r. opisano prawie 100 przypadków niedoboru DDC na świecie. Większość mutacji pojawia się *de novo*, jednak częstsze zachorowania w południowych Chinach są najprawdopodobniej spowodowane efektem założyciela i przekazywaną mutacją miejsca splicingowego intronu 6 (IVS6+4A>T) [114]. Ana-

liza genotypu 49 pacjentów wykazała istnienie 24 mutacji punktowych dotyczących miejsca splicingowego lub skutkujących zamianą aminokwasu w sekwencji polipeptydu [20]. Porównanie właściwości biochemicznych niezmutowanej postaci DDC z 4 wariantami niosącymi mutacje konserwowanych reszt aa G102S, F309, S147R i A275T, zaangażowanych w wiązanie PLP, wykazało spadek aktywności katalitycznej lub zmniejszenie powinowactwa enzymu do kofaktora czy substratu [83].

Ze względu na duże zróżnicowanie wykrywanych mutacji oraz stosunkowo małą grupę pacjentów nie opracowano dotychczas skutecznej metody leczenia niedoboru DDC. Chorym podaje się witaminę B6, agonistów receptorów dopaminergicznych oraz inhibitory monoaminooksydazy, hamujące rozkład dopaminy [7,97]. Dalsze szczegółowe badania nad molekularnym podłożem niedoboru DDC mogą pozwolić na tworzenie skutecznej terapii dopasowanej do mutacji występującej u chorego. Obecnie trwają doświadczenia mające umożliwić dostarczenie do komórek pacjenta prawidłowej kopii genu DDC i wywołanie stabilnej ekspresji funkcjonalnego enzymu. Podobne prace z wykorzystaniem wektorów wirusowych dotyczą leczenia choroby Parkinsona. Wykazano, że ekspresja ludzkiej DDC miała korzystny wpływ na stan zdrowia zwierząt poddanych terapii [7].

PERSPEKTYWICZNE METODY LECZENIA

Terapia genowa z wykorzystaniem sekwencji genu *DDC*

Ze względu na skuteczność chirurgiczne lub farmakologiczne zwalczanie objawów PD oraz niedoboru DDC jest postrzegane jako niewystarczająca postać terapii. Dlatego też istotnym zagadnieniem stało się znalezienie nowych sposobów leczenia, w tym metod opartych na terapii genowej. W założeniu technika ta polega na wprowadzaniu genów o charakterze terapeutycznym do komórek wykazujących zaburzenia ekspresji danej jednostki transkrypcyjnej lub zdolnych przejąć funkcje komórek ulegających degeneracji. W tym celu stosuje się wektory molekularne wykazujące ograniczony tropizm komórkowy (także wobec komórek postmitotycznych), przenoszące długie sekwencje transgenów, charakteryzujące się niskim poziomem immunogenności oraz niezdolne do replikacji w organizmie pacjenta [121]. Do najczęściej wykorzystywanych typów nośników stosowanych w terapii chorób neurodegeneracyjnych należą lentiwektory lub wektory oparte na wirusach zależnych od adenowirusów (AAV). Pierwsze z wymienionych charakteryzuje naturalna zdolność do czystego wbudowywania się do genomu komórki. Drugi typ wektorów o dużym tropizmie neuronalnym pozostaje w postaci episomów wykazując stabilną ekspresję transgenu [121]. Modyfikacje genomu komórek z użyciem egzogennych sekwencji przeprowadza się *in vivo* lub pozaustrojowo [121]. Ostatni z wymienionych sposobów wymusza ponowne wprowadzenie komórek z transgenem do organizmu pacjenta.

Obecnie testowanych jest kilka sposobów leczenia PD. Polegają na dostarczaniu nowych, prawidłowych kopii genów kodujących mRNA enzymów niezbędnych do:

- konwersji egzogennej L-DOPA w dopaminę,
- ektopowej syntezy dopaminy,
- ektopowej syntezy L-DOPA

oraz genów, których produkty zastąpią nieprawidłowe białka w dziedzicznych postaciach PD [30].

W pierwszym przypadku wektor AAV dostarcza sekwencję genu *DDC* do degenerujących neuronów prądkowia. Synteza dopaminy jest możliwa po podaniu pacjentowi egzogenego prekursora [100]. Doświadczenia z iniekcją takiego konstrukt przeszyły już etap badań przedklinicznych. Wyniki I fazy badań klinicznych wydają się obiecujące ze względu na zwiększoną aktywność DDC w badaniach neuroobrazowych, brak poważnych działań niepożądanych i umiarkowaną poprawę stanu pacjentów [30,84]. Druga strategia wykorzystuje lentiwektor niosący sekwencję trzech genów – *DDC*, skróconej postaci *TH* oraz genu *cyklohydrolazy-GTP (GCH1)* biorącej udział w syntezie kofaktora enzymu TH, jakim jest tetrahydrobiopteryna. Opracowany przez OxfordBioMedica preparat, znany jako ProSavin, przeszedł pomyślnie fazę badań przedklinicznych, a obecnie publikowane są prace opisujące pierwsze skutki podawania leku osobom chorym na PD w I/II fazie klinicznej [30,92]. W ciągu roku od podania leku odnotowano poprawę funkcji motorycznych przy obniżonych dawkach podawanej L-DOPA i stosunkowo łagodnych działaniach niepożądanych (dyskinezy i efekt on-off). Ze względu na poziom działania terapeutycznego oraz nieliczną grupę pacjentów poddanych zabiegowi badania te wymagają kontynuacji [92]. Trzeci rodzaj terapii opiera się na aktywności endogennej *DDC* w średnich neuronach kolczastych (Medium Spiny Neurons, MSN), do których wprowadza się konstrukty z egzogennymi kopiami genów *TH* i *GCH1* [30]. Jak dotąd, badania nie weszły w fazę kliniczną. Ostatni sposób terapii genowej PD dotyczy wprowadzania do neuronów sekwencji genów innych niż *DDC*, np. *BDNF*, *SNCA* czy *parkiny* [30]. Niestety, wciąż poważnym problemem jest ustalenie skutecznej dawki preparatu, szeroki zakres komórek infekowanych przez wektory wirusowe oraz brak precyzyjnej kontroli poziomu ekspresji transgenów. Ostatnie z wymienionych zagadnień jest niezwykle istotnym ze względu na hamowanie zwrotne enzymu TH przez dopaminę czy toksyczny wpływ nadmiaru cząsteczek DA na wytwarzające ją neurony.

Mimo znaczących postępów w poznaniu biologii genu *DDC* wciąż nie udaje się rozwiązać wszystkich problemów związanych z dysfunkcją tej jednostki transkrypcyjnej w chorobie związanej z niedoborem DDC. Wynika to m.in. z powodu:

- braku dogodnych modeli zwierzęcych tej choroby z powodu letalności mutacji typu knock-out genu *DDC*,

- nie w pełni scharakteryzowanego tropizmu wektorów wirusowych dostarczających prawidłową kopię genu *DDC*,
- obszaru działania preparatu terapeutycznego ograniczonego do miejsca jego podania oraz
- nieprzewidywalnej reakcji organizmu na nagłe przywrócenie funkcjonalnego stężenia monoamin [7].

Podobnie jak w PD, terapia genowa osób cierpiących na niedobór *DDC* polega na dostarczeniu do ich komórek prawidłowej kopii genu *DDC* i wywołaniu stabilnej ekspresji funkcjonalnego enzymu. Wyniki Hwu i wsp. [57] z I fazy badań klinicznych u czworga pacjentów wskazują, że iniekcja wektora AAV zawierającego ludzką sekwencję *DDC* do skorupy, mimo przejściowych dyskinezji występujących miesiąc po podaniu leku, znacznie poprawia funkcje ruchowe [57]. Jest to pierwsze tak zaawansowane badanie z wykorzystaniem terapii genowej w leczeniu niedoboru *DDC*. Potwierdza też bezpieczeństwo śródmózgowych iniekcji wektorów wirusowych, co budzi nadzieje związane z procesem efektywnego leczenia tej i innych chorób za pomocą opisanej techniki.

Terapia z wykorzystaniem komórek macierzystych

Terapia z użyciem komórek macierzystych może się stać sposobem leczenia chorych z dysfunkcją *DDC*. Wykorzystanie w medycynie regeneracyjnej komórek zdolnych do różnicowania w wiele różnych typów, pozwoliłoby na odbudowanie populacji neuronów ulegających neurodegeneracji lub wprowadzenie ich do tkanek wykazujących nieprawidłowy wzorzec ekspresji [7,49,76,88,105,109]. W związku z tym niezwykle ważna jest możliwość pozyskania indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPS) o cechach pierwotnych komórek zarodkowych za pomocą związków drobnocząsteczkowych [69]. iPS wyprowadzone ze zdrowych komórek tkanki pacjenta pozwalają na ominięcie problemów związanych z niezgodnością tkankową oraz stosowaniem wektorów wirusowych jako nośników prawidłowych kopii genów [111]. Jak dotąd, skuteczność tego typu terapii udokumentowano na przykładzie zwierzęcych modeli, w tym szczerzego modelu PD [6,49,76,105,123].

PODSUMOWANIE

Omówiony przegląd doniesień dotyczących regulacji aktywności genu *DDC* oraz jego produktu wskazuje na istnienie wielu mechanizmów determinujących ten proces. Wykazano, że za odpowiedni wzorzec transkrypcji odpowiadają sekwencje promotora obwodowego lub neuronalnego aktywowanego w komórkach o fenotypie DA. Mimo znacznych wysiłków wielu grup badawczych, ujawnienia wymagają kolejne czynniki *trans* oraz związane przez nie elementy *cis* odpowiadające za swoją istną rozwojowo/tkankowo/komórkowo ekspresję *DDC*. Ważnym zagadnieniem jest epigenetyczna regulacja

DDC i powiązanie niektórych procesów chorobowych z mechanizmem piętnowania rodzicielskiego. Uzupełnienie wiedzy w tym zakresie może pozwolić na usprawnienie procesu projektowania wektorów o znaczeniu terapeutycznym, co umożliwi opracowanie leków aktywujących odpowiednie szlaki przesyłania sygnałów wpływających na transkrypcję *DDC*. Proces poznawczy nie pozostanie bez wpływu na dalszy rozwój terapii, w tym wykorzystujących właściwości komórek iPS.

Analiza oddziaływań *DDC* z innymi polipeptydami wskazuje na zdolność tego enzymu do tworzenia wieloskładnikowego kompleksu białkowego. Jak wykazano, białko to pozostając w interakcjach z TH i VMAT₂, w zależności od stanu fizjologicznego neuronów *DDC*, kotwiczy polipeptydy o charakterze regulatorowym – ASN oraz DJ-1. Na tej podstawie można spekulować, że rekrutacja ASN do kompleksu może wpływać hamująco na aktywność enzymatyczną TH i/lub *DDC*. Zmiana partnera białkowego z ASN na DJ-1 spowodowałaby zapewne zwiększenie stężenia produktów syntetyzowanych przez wymienione enzymy. Jednocześnie ilość DOPA zsyntetyzowanej przez TH determinowałby stężenie substratu dostępnego dla *DDC*. Wiadomo natomiast, że produkt *DDC* jakim jest dopamina, hamuje enzym TH tworząc pętlę sprzężenia zwrotnego ujemnego. W funkcjonalnym kompleksie zachodziłaby więc ścisła kontrola poszczególnych etapów procesu syntezy neuroprzekazników oraz ich skoordynowany transport do wnętrza pęcherzyków synaptycznych. Zdolność DJ-1 do regulowania właściwości ASN oraz pośredni wpływ na poziom ekspresji genów włączonych w syntezę amin katecholowych, tworzy dodatkowy poziom kontroli aktywności całego kompleksu. Przedstawiony pogląd wymaga jednak dalszych badań.

Pełne zrozumienie biologii *DDC* wymaga wciąż znalezienia odpowiedzi na wiele pytań. Ważnym zagadnieniem jest potencjalna obecność w kompleksie innych niż wymienione białek o charakterze regulatorowym, np. 14-3-3 i PP2A. Czy wiążą one wybiórczo poszczególnych partnerów białkowych, czy też są zdolne do regulacji obu enzymów jednocześnie? Jaki wpływ na poziom aktywności *DDC* ma mechanizm fosforylacji tego białka? Czy dysfunkcja jednego z białek regulatorowych wpływa na interakcje poszczególnych rezydentów kompleksu? Czy obserwowany mechanizm regulacji jest uniwersalny dla wszystkich kręgowców? W jaki sposób projektować terapię poszczególnych chorób neurodegeneracyjnych, w których dochodzi do dysfunkcji TH jak i *DDC*, mając do czynienia z wieloskładnikowym kompleksem o właściwościach enzymatycznych? Jaką rolę pełnią poszczególne izoformy *DDC*, w tym te niewykazujące aktywności enzymatycznej?

PISMIENICTWO

- [1] Abeling N.G., Bräutigam C., Hoffmann G.F., Barth P.G., Wevers R.A., Jaeken J., Fiumara A., Knust A., van Gennip A.H.: Pathobiochemical implications of hyperdopaminuria in patients with aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 2000; 23: 325-328
- [2] Aguanno A., Afar R., Albert V.R.: Tissue-specific expression of the nonneuronal promoter of the aromatic L-amino acid decarboxylase gene is regulated by hepatocyte nuclear factor 1. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 4528-4538
- [3] Aguanno A., Lee M.R., Marden C.M., Rattray M., Gault A., Albert V.R.: Analysis of the neuronal promoter of the rat aromatic L-amino acid decarboxylase gene. *J. Neurochem.*, 1995; 65: 1944-1954
- [4] Albert V.R., Allen J.M., Joh T.H.: A single gene codes for aromatic L-amino acid decarboxylase in both neuronal and non-neuronal tissues. *J. Biol. Chem.*, 1987; 262: 9404-9411
- [5] Albert V.R., Lee M.R., Bolden A.H., Wurzbürger R.J., Aguanno A.: Distinct promoters direct neuronal and nonneuronal expression of rat aromatic L-amino acid decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992; 89: 12053-12057
- [6] Ali F., Stott S.R., Barker R.A.: Stem cells and the treatment of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.*, 2014; 260: 3-11
- [7] Allen G.F., Neergheen V., Oppenheim M., Fitzgerald J.C., Footitt E., Hyland K., Clayton P.T., Land J.M., Heales S.J.: Pyridoxal 5'-phosphate deficiency causes a loss of aromatic L-amino acid decarboxylase in patients and human neuroblastoma cells, implications for aromatic L-amino acid decarboxylase and vitamin B₆ deficiency states. *J. Neurochem.*, 2010; 114: 87-96
- [8] Ariga H., Takahashi-Niki K., Kato I., Maita H., Niki T., Iguchi-Ariga S.M.: Neuroprotective function of DJ-1 in Parkinson's disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2013; 2013: 683920
- [9] Baptista M.J., O'Farrell C., Daya S., Ahmad R., Miller D.W., Hardy J., Farrer M.J., Cookson M.R.: Co-ordinate transcriptional regulation of dopamine synthesis genes by α -synuclein in human neuroblastoma cell lines. *J. Neurochem.*, 2003; 85: 957-968
- [10] Baylin S. B., Mendelsohn G.: Medullary thyroid carcinoma – a model for the study of human tumor progression and cell heterogeneity. New York, Acad. Press, 1984; 4: 9-27
- [11] Berry M.D., Juorio A.V., Li X.M., Boulton A.A.: Aromatic L-amino acid decarboxylase: a neglected and misunderstood enzyme. *Neurochem. Res.*, 1996; 21: 1075-1087
- [12] Bertoldi M.: Mammalian Dopa decarboxylase: structure, catalytic activity and inhibition. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2014; 546: 1-7
- [13] Bertoldi M., Voltattorni C.B.: Multiple roles of the active site lysine of Dopa decarboxylase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2009; 488: 130-139
- [14] Blaud M., Vossen C., Joseph G., Alazard R., Erard M., Nieto L.: Characteristic patterns of N Oct-3 binding to a set of neuronal promoters. *J. Mol. Biol.*, 2004; 339: 1049-1058
- [15] Blechinger J., Holm I.E., Johansen M.G., Børglum A.D., Nielsen A.L.: Aromatic L-amino acid decarboxylase expression profiling and isoform detection in the developing porcine brain. *Brain Res.*, 2010; 1308: 1-13
- [16] Bonifati V., Rizzu P., van Baren M.J., Schaap O., Breedveld G.J., Krieger E., Dekker M.C., Squitieri F., Ibanez P., Joosse M., van Dongen J.W., Vanacore N., van Swieten J.C., Brice A., Meco G. i wsp.: Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*, 2003; 299: 256-259
- [17] Børglum A.D., Bruun T.G., Kjeldsen T.E., Ewald H., Mors O., Kirov G., Russ C., Freeman B., Collier D.A., Kruse T.A.: Two novel variants in the DOPA decarboxylase gene: association with bipolar affective disorder. *Mol. Psychiatry*, 1999; 4: 545-551
- [18] Børglum A.D., Hampson M., Kjeldsen T.E., Muir W., Murray V., Ewald H., Mors O., Blackwood D., Kruse T.A.: Dopa decarboxylase genotypes may influence age at onset of schizophrenia. *Mol. Psychiatry*, 2001; 6: 712-717
- [19] Børglum A.D., Kirov G., Craddock N., Mors O., Muir W., Murray V., McKee I., Collier D.A., Owen M.J., Blackwood D., Kruse T.A.: Possible parent-of-origin effect of Dopa decarboxylase in susceptibility to bipolar affective disorder. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.*, 2003; 117B: 18-22
- [20] Brun L., Ngu L.H., Keng W.T., Ch'ng G.S., Choy Y.S., Hwu W.L., Lee W.T., Willemsen M.A., Verbeek M.M., Wassenberg T., Régal L., Orcesi S., Tonduti D., Accorsi P., Testard H. i wsp.: Clinical and biochemical features of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Neurology*, 2010; 75: 64-71
- [21] Bruneau G., Thibault J., Gros F., Mattei M.G.: Mapping of the dopa decarboxylase gene to the 11A band of the murine genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992; 186: 926-930
- [22] Buckland P.R., O'Donovan M.C., McGuffin P.: Changes in dopa decarboxylase mRNA but not tyrosine hydroxylase mRNA levels in rat brain following antipsychotic treatment. *Psychopharmacology*, 1992; 108: 98-102
- [23] Burkhard P., Dominici P., Borri-Voltattorni C., Jansonius J.N., Malashkevich V.N.: Structural insight into Parkinson's disease treatment from drug-inhibited DOPA decarboxylase. *Nat. Struct. Biol.*, 2001; 8: 963-967
- [24] Cartier E.A., Parra L.A., Baust T.B., Quiroz M., Salazar G., Faundez V., Egaña L., Torres G.E.: A biochemical and functional protein complex involving dopamine synthesis and transport into synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 1957-1966
- [25] Chalatsa I., Fragoulis E.G., Vassiliacopoulou D.: Release of membrane-associated L-dopa decarboxylase from human cells. *Neurochem. Res.*, 2011; 36: 1426-1434
- [26] Chang Y.T., Mues G., Hyland K.: Alternative splicing in the coding region of human aromatic L-amino acid decarboxylase mRNA. *Neurosci. Lett.*, 1996; 202: 157-160
- [27] Cho S., Neff N.H., Hadjiconstantinou M.: Regulation of tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase by dopaminergic drugs. *Eur. J. Pharmacol.*, 1997; 323: 149-157
- [28] Cho S., Duchemin A.M., Neff N.H., Hadjiconstantinou M.: Tyrosine hydroxylase, aromatic L-amino acid decarboxylase and dopamine metabolism after chronic treatment with dopaminergic drugs. *Brain Res.*, 1999; 830: 237-245
- [29] Christenson J.G., Dairman W., Udenfriend S.: Preparation and properties of a homogeneous aromatic L-amino acid decarboxylase from hog kidney. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1970; 141: 356-367
- [30] Coune P.G., Schneider B.L., Aebischer P.: Parkinson's disease: gene therapies. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2012; 2: a009431
- [31] Daidone F., Montioli R., Paiardini A., Cellini B., Macchiarulo A., Giardina G., Bossa F., Borri Voltattorni C.: Identification by virtual screening and *in vitro* testing of human DOPA decarboxylase inhibitors. *PLoS One*, 2012; 7: e31610
- [32] Doucet-Beaupré H., Lévesque M.: The role of developmental transcription factors in adult midbrain dopaminergic neurons. *OA. Neurosci.*, 2013; 1: 3
- [33] Drożak J., Bryła J.: Dopamine: not just a neurotransmitter. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2005; 59: 405-420
- [34] Duchemin A.M., Berry M.D., Neff N.H., Hadjiconstantinou M.: Phosphorylation and activation of brain aromatic L-amino acid decarboxylase by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Neurochem.*, 2000; 75: 725-731

- [35] Duchemin A.M., Neff N.H., Hadjiconstantinou M.: Aromatic L-amino acid decarboxylase phosphorylation and activation by PKG1 α *in vitro*. *J. Neurochem.*, 2010; 114: 542-552
- [36] Dugast C., Weber M.J.: NF-Y binding is required for transactivation of neuronal aromatic L-amino acid decarboxylase gene promoter by the POU-domain protein Brn-2. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 2001; 89: 58-70
- [37] Dugast-Darzacq C., Eglöf S., Weber M.J.: Cooperative dimerization of the POU domain protein Brn-2 on a new motif activates the neuronal promoter of the human aromatic L-amino acid decarboxylase gene. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 2004; 120: 151-163
- [38] Facchini P.J., Huber-Allanach K.L., Tari L.W.: Plant aromatic L-amino acid decarboxylases: evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering applications. *Phytochemistry*, 2000; 54: 121-138
- [39] Friedman J.R., Kaestner K.H.: The Foxa family of transcription factors in development and metabolism. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2006; 63: 2317-2328
- [40] Gazdar A.F., Helman L.J., Israel M.A., Russell E.K., Linnoila R.I., Mulshine J.L., Schuller H.M., Park J.G.: Expression of neuroendocrine cell markers L-dopa decarboxylase, chromogranin A, and dense core granules in human tumors of endocrine and nonendocrine origin. *Cancer Res.*, 1988; 48: 4078-4082
- [41] GeneCards. Human Gene Database. DDC Gene (Protein coding) <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DDC&ortholog=all#orthologs> (16.07.2015)
- [42] Giardina G., Montioli R., Gianni S., Cellini B., Paiardini A., Voltattorni C.B., Cutruzzolà F.: Open conformation of human DOPA decarboxylase reveals the mechanism of PLP addition to Group II decarboxylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 20514-20519
- [43] Gilbert J.A., Bates L.A., Ames M.M.: Elevated aromatic-L-amino acid decarboxylase in human carcinoid tumors. *Biochem. Pharmacol.*, 1995; 50: 845-850
- [44] Hadjiconstantinou M., Duchemin A.M., Azad A., Neff N.H.: Aromatic L-amino acid decarboxylase. W: Biogenic Amines. Pharmacological, neurochemical and molecular aspects in the CNS. Red.: T. Farooqui, A.A. Farooqui. Nova Biomedica Books, New York, 2010, 25-45
- [45] Hadjiconstantinou M., Neff N.H.: Enhancing aromatic L-amino acid decarboxylase activity: implications for L-DOPA treatment in Parkinson's disease. *CNS Neurosci. Ther.*, 2008; 14: 340-351
- [46] Hadjiconstantinou M., Rossetti Z.L., Wemlinger T.A., Neff N.H.: Dizocilpine enhances striatal tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase activity. *Eur. J. Pharmacol.*, 1995; 289: 97-101
- [47] Hadjiconstantinou M., Wemlinger T.A., Sylvia C.P., Hubble J.P., Neff N.H.: Aromatic L-amino acid decarboxylase activity of mouse striatum is modulated via dopamine receptors. *J. Neurochem.*, 1993; 60: 2175-2180
- [48] Hahn S.L., Hahn M., Joh T.H.: Genomic organization of the rat aromatic L-amino acid decarboxylase (ADC) locus: partial analysis reveals divergence from the *Drosophila* dopa decarboxylase (DDC) gene structure. *Mamm. Genome*, 1991; 1: 145-151
- [49] Han F., Wang W., Chen B., Chen C., Li S., Lu X., Duan J., Zhang Y., Zhang Y.A., Guo W., Li G.: Human induced pluripotent stem cell-derived neurons improve motor asymmetry in a 6-hydroxydopamine-induced rat model of Parkinson's disease. *Cytotherapy*, 2015; 17: 665-679
- [50] Hashimoto S., Ikeno T., Hasegawa J., Nagatsu T., Kuzuya H.: Endogenous inhibitors of DOPA decarboxylase in rat submandibular gland. *Arch. Oral Biol.*, 1980; 25: 195-199
- [51] Hawi Z., Foley D., Kirley A., McCarron M., Fitzgerald M., Gill M.: Dopa decarboxylase gene polymorphisms and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): no evidence for association in the Irish population. *Mol. Psychiatry*, 2001; 6: 420-424
- [52] Hermanson E., Joseph B., Castro D., Lindqvist E., Aarnisalo P., Wallén A., Benoit G., Hengerer B., Olson L., Perlmann T.: Nurr1 regulates dopamine synthesis and storage in MN9D dopamine cells. *Exp. Cell Res.*, 2003; 288: 324-334
- [53] Hirsh J., Davidson N.: Isolation and characterization of the dopa decarboxylase gene of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.*, 1981; 1: 475-485
- [54] Hitchins M.P., Bentley L., Monk D., Beechey C., Peters J., Kelsey G., Ishino F., Preece M.A., Stanier P., Moore G.E.: DDC and COBL, flanking the imprinted GRB10 gene on 7p12, are biallelically expressed. *Mamm. Genome*, 2002; 13: 686-691
- [55] Hodgetts R.B., O'Keefe S.L.: Dopa decarboxylase: a model gene-enzyme system for studying development, behavior, and systematics. *Annu. Rev. Entomol.*, 2006; 51: 259-284
- [56] Hu Y., Ippolito J.E., Garabedian E.M., Humphrey P.A., Gordon J.I.: Molecular characterization of a metastatic neuroendocrine cell cancer arising in the prostates of transgenic mice. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 44462-44474
- [57] Hwu W.L., Muramatsu S., Tseng S.H., Tzen K.Y., Lee N.C., Chien Y.H., Snyder R.O., Byrne B.J., Tai C.H., Wu R.M.: Gene therapy for aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Sci. Transl. Med.*, 2012; 4: 134ra61
- [58] Hyland K., Clayton P.T.: Aromatic amino acid decarboxylase deficiency in twins. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 1990; 13: 301-304
- [59] Hyland K., Clayton P.T.: Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: diagnostic methodology. *Clin. Chem.*, 1992; 38: 2405-2410
- [60] Ichinose H., Kurosawa Y., Titani K., Fujita K., Nagatsu T.: Isolation and characterization of a cDNA clone encoding human aromatic L-amino acid decarboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989; 164: 1024-1030
- [61] Ichinose H., Sumi-Ichinose C., Ohye T., Hagino Y., Fujita K., Nagatsu T.: Tissue-specific alternative splicing of the first exon generates two types of mRNAs in human aromatic L-amino acid decarboxylase. *Biochemistry*, 1992; 31: 11546-11550
- [62] Isaac J., Berndt T.J., Chinnow S.L., Tyce G.M., Dousa T.P., Knox F.G.: Dopamine enhances the phosphaturic response to parathyroid hormone in phosphate-deprived rats. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 1992; 2: 1423-1429
- [63] Ishikawa S., Taira T., Niki T., Takahashi-Niki K., Maita C., Maita H., Ariga H., Iguchi-Arigo S.M.: Oxidative status of DJ-1-dependent activation of dopamine synthesis through interaction of tyrosine hydroxylase and 4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) decarboxylase with DJ-1. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 28832-28844
- [64] Iwata A., Miura S., Kanazawa I., Sawada M., Nukina N.: α -Synuclein forms a complex with transcription factor Elk-1. *J. Neurochem.*, 2001; 77: 239-252
- [65] Johnson W.A., McCormick C.A., Bray S.J., Hirsh J.: A neuron-specific enhancer of the *Drosophila* dopa decarboxylase gene. *Genes Dev.*, 1989; 3: 676-686
- [66] Juorio A. V., Li X.M., Walz W., Paterson I.A.: Decarboxylation of L-dopa by cultured mouse astrocytes. *Brain Res.*, 1993; 626: 306-309
- [67] Kang U.J., Joh T.H.: Deduced amino acid sequence of bovine aromatic L-amino acid decarboxylase: homology to other decarboxylases. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 1990; 8: 83-87
- [68] Kaźmierczak A., Adamczyk A., Strosznajder J.B.: Udział α -synukleiny w funkcji układu dopaminergicznego. *Postępy Biol. Kom.*, 2007; 34: 377-390
- [69] Kim D., Kim C.H., Moon J.I., Chung Y.G., Chang M.Y., Han B.S., Ko S., Yang E., Cha K.Y., Lanza R., Kim K.S.: Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*, 2009; 4: 472-476
- [70] Kokkinou I., Fragoulis E.G., Vassilacopoulou D.: The U937 macro-

- phage cell line expresses enzymatically active L-Dopa decarboxylase. *J. Neuroimmunol.*, 2009; 216: 51-58
- [71] Kokkinou I., Nikolouzou E., Hatzimanolis A., Fragoulis E.G., Vassilacopoulou D.: Expression of enzymatically active L-DOPA decarboxylase in human peripheral leukocytes. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2009; 42: 92-98
- [72] Krieger M., Coge F., Gros F., Thibault J.: Different mRNAs code for dopa decarboxylase in tissues of neuronal and nonneuronal origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; 88: 2161-2165
- [73] Laakso A., Pohjalainen T., Bergman J., Kajander J., Haaparanta M., Solin O., Syvälahti E., Hietala J.: The A1 allele of the human D2 dopamine receptor gene is associated with increased activity of striatal L-amino acid decarboxylase in healthy subjects. *Pharmacogenet. Genomics*, 2005; 15: 387-391
- [74] Le Van Thai A., Coste E., Allen J.M., Palmiter R.D., Weber M.J.: Identification of a neuron-specific promoter of human aromatic L-amino acid decarboxylase gene. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 1993; 17: 227-238
- [75] Li X.M., Juorio A.V., Paterson I.A., Walz W., Zhu M.Y., Boulton A.A.: Gene expression of aromatic L-amino acid decarboxylase in cultured rat glial cells. *J. Neurochem.*, 1992; 59: 1172-1175
- [76] Lim M.S., Chang M.Y., Kim S.M., Yi S.H., Suh-Kim H., Jung S.J., Kim M.J., Kim J.H., Lee Y.S., Lee S.Y., Kim D.W., Lee S.H., Park C.H.: Generation of dopamine neurons from rodent fibroblasts through the expandable neural precursor cell stage. *J. Biol. Chem.*, 2015; 290: 17401-17414
- [77] Maneckjee R., Baylin S.B.: Use of radiolabeled monofluoromethyl-Dopa to define the subunit structure of human L-Dopa decarboxylase. *Biochemistry*, 1983; 22: 6058-6063
- [78] Mappouras D.G., Stiakakis J., Fragoulis E.G.: Purification and characterization of L-dopa decarboxylase from human kidney. *Mol. Cell. Biochem.*, 1990; 94: 147-156
- [79] Maras B., Dominici P., Barra D., Bossa F., Voltattorni C.B.: Pig kidney 3,4-dihydroxyphenylalanine (dopa) decarboxylase. Primary structure and relationships to other amino acid decarboxylases. *Eur. J. Biochem.*, 1991; 201: 385-391
- [80] Matsuda N., Hayashi H., Miyatake S., Kuroiwa T., Kagamiyama H.: Instability of the apo form of aromatic L-amino acid decarboxylase *in vivo* and *in vitro*: implications for the involvement of the flexible loop that covers the active site. *J. Biochem.*, 2004; 135: 33-42
- [81] Menhenniott T.R., Woodfine K., Schulz R., Wood A.J., Monk D., Giraud A.S., Baldwin H.S., Moore G.E., Oakey R.J.: Genomic imprinting of Dopa decarboxylase in heart and reciprocal allelic expression with neighboring *Grb10*. *Mol. Cell. Biol.*, 2008; 28: 386-396
- [82] Millevoi S., Thion L., Joseph G., Vossen C., Ghisolfi-Nieto L., Erard M.: Atypical binding of the neuronal POU protein N-Oct3 to noncanonical DNA targets. Implications for heterodimerization with HNF-3 β . *Eur. J. Biochem.*, 2001; 268: 781-791
- [83] Montioli R., Cellini B., Borri Voltattorni C.: Molecular insights into the pathogenicity of variants associated with the aromatic amino acid decarboxylase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 2011; 34: 1213-1224
- [84] Muramatsu S., Fujimoto K., Kato S., Mizukami H., Asari S., Ikeguchi K., Kawakami T., Urabe M., Kume A., Sato T., Watanabe E., Ozawa K., Nakano I.: A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. *Mol. Ther.*, 2010; 18: 1731-1735
- [85] Murawiec S.: Some questions about the essence of delusions in the light of recent neurobiological findings. *Psychiatr. Pol.*, 2009; 43: 403-410
- [86] NCBI. DDC dopa decarboxylase [Homo sapiens (human)]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1644> (16.07.2015)
- [87] Neff N.H., Wemlinger T.A., Duchemin A.M., Hadjiconstantinou M.: Clozapine modulates aromatic L-amino acid decarboxylase activity in mouse striatum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2006; 317: 480-487
- [88] Newman M.B., Bakay R.A.: Therapeutic potentials of human embryonic stem cells in Parkinson's disease. *Neurotherapeutics*, 2008; 5: 237-251
- [89] Nishigaki I., Ichinose H., Tamai K., Nagatsu T.: Purification of aromatic L-amino acid decarboxylase from bovine brain with a monoclonal antibody. *Biochem. J.*, 1988; 252: 331-335
- [90] O'Malley K.L., Harmon S., Moffat M., Uhland-Smith A., Wong S.: The human aromatic L-amino acid decarboxylase gene can be alternatively spliced to generate unique protein isoforms. *J. Neurochem.*, 1995; 65: 2409-2416
- [91] Osterova-Golts N., Petrucelli L., Hardy J., Lee J.M., Farer M., Wo-lozin B.: The A53T α -synuclein mutation increases iron-dependent aggregation and toxicity. *J. Neurosci.*, 2000; 20: 6048-6054
- [92] Palfi S., Gurruchaga J.M., Ralph G.S., Lepetit H., Lavisie S., Buttery P.C., Watts C., Miskin J., Kelleher M., Deeley S., Iwamuro H., Le-faucher J.P., Thiriez C., Fenelon G., Lucas C. i wsp.: Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet*, 2014; 383: 1138-1146
- [93] Peng X., Tehrani R., Dietrich P., Stefanis L., Perez R.G.: Alpha-synuclein activation of protein phosphatase 2A reduces tyrosine hydroxylase phosphorylation in dopaminergic cells. *J. Cell Sci.*, 2005; 118: 3523-3530
- [94] Perez R.G., Waymire J.C., Lin E., Liu J.J., Guo F., Zigmund M.J.: A role for α -synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J. Neurosci.*, 2002; 22: 3090-3099
- [95] Phillips K., Luisi B.: The virtuoso of versatility: POU proteins that flex to fit. *J. Mol. Biol.*, 2000; 302: 1023-1039
- [96] Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E., Ide S.E., Dehejia A., Dutra A., Pike B., Root H., Rubenstein J., Boyer R., Stenroos E.S., Chandrasekharappa S., Athanassiadou A., Papapetropoulos T., Johnson W.G. i wsp.: Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 1997; 276: 2045-2047
- [97] Pons R., Ford B., Chiriboga C.A., Clayton P.T., Hinton V., Hyland K., Sharma R., De Vivo D.C.: Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: clinical features, treatment, and prognosis. *Neurology*, 2004; 62: 1058-1065
- [98] Poulidakos P., Vassilacopoulou D., Fragoulis E.G.: L-DOPA decarboxylase association with membranes in mouse brain. *Neurochem. Res.*, 2001; 26: 479-485
- [99] Prickett A.R., Oakey R.J.: A survey of tissue-specific genomic imprinting in mammals. *Mol. Genet. Genomics*, 2012; 287: 621-630
- [100] Pytka K., Zygmunt M., Filipek B.: Pharmacotherapy of Parkinson's disease: progress or regress? *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2013; 67: 700-708
- [101] Rahman M.K., Togari A., Kojima K., Takahashi K., Nagatsu T.: Presence of endogenous inhibitor of aromatic L-amino acid decarboxylase in monkey serum. *Mol. Cell. Biochem.*, 1984; 63: 53-58
- [102] Raynal J.F., Dugast C., Le Van Thai A., Weber M.J.: Winged helix hepatocyte nuclear factor 3 and POU-domain protein brn-2/N-Oct-3 bind overlapping sites on the neuronal promoter of human aromatic L-amino acid decarboxylase gene. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 1998; 56: 227-237
- [103] Reith J., Benkelfat C., Sherwin A., Yasuhara Y., Kuwabara H., Andermann F., Bachneff S., Cumming P., Diksic M., Dyve S.E., Etienne P., Evans A.C., Lal S., Shevell M., Savard G., Wong D.F., Chouinard G., Gjedde A.: Elevated dopa decarboxylase activity in living brain of patients with psychosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994; 91: 11651-11654
- [104] Ren J., Zhang Y., Jin H., Yu J., Zhou Y., Wu F., Zhang W.: Novel inhibitors of human DOPA decarboxylase extracted from *Euonymus glabra* Roxb. *ACS Chem. Biol.*, 2014; 9: 897-903

- [105] Rhee Y.H., Ko J.Y., Chang M.Y., Yi S.H., Kim D., Kim C.H., Shim J.W., Jo A.Y., Kim B.W., Lee H., Lee S.H., Suh W., Park C.H., Koh H.C., Lee Y.S., Lanza R., Kim K.S., Lee S.H.: Protein-based human iPS cells efficiently generate functional dopamine neurons and can treat a rat model of Parkinson disease. *J. Clin. Invest.*, 2011; 121: 2326-2335
- [106] Saracchi E., Fermi S., Brighina L.: Emerging candidate biomarkers for Parkinson's disease: a review. *Aging Dis.*, 2013; 5: 27-34
- [107] Shin S.Y., Fauman E.B., Petersen A.K., Krumsiek J., Santos R., Huang J., Arnold M., Erte I., Forgetta V., Yang T.P., Walter K., Menni C., Chen L., Vasquez L., Valdes A.M. i wsp.: An atlas of genetic influences on human blood metabolites. *Nat. Genet.*, 2014; 46: 543-550
- [108] Shirota K., Fujisawa H.: Purification and characterization of aromatic L-amino acid decarboxylase from rat kidney and monoclonal antibody to the enzyme. *J. Neurochem.*, 1988; 51: 426-434
- [109] Soldner F., Hockemeyer D., Beard C., Gao Q., Bell G.W., Cook E.G., Hargus G., Blak A., Cooper O., Mitalipova M., Isacson O., Jaenisch R.: Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*, 2009; 136: 964-977
- [110] Sumi-Ichinose C., Ichinose H., Takahashi E., Hori T., Nagatsu T.: Molecular cloning of genomic DNA and chromosomal assignment of the gene for human aromatic L-amino acid decarboxylase, the enzyme for catecholamine and serotonin biosynthesis. *Biochemistry*, 1992; 31: 2229-2238
- [111] Takahashi K., Yamanaka S.: Induced pluripotent stem cells in medicine and biology. *Development*, 2013; 140: 2457-2461
- [112] Taketoshi M., Horio Y., Imamura I., Tanaka T., Fukui H., Wada H.: Molecular cloning of guinea-pig aromatic-L-amino acid decarboxylase cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990; 170: 1229-1235
- [113] Tanaka T., Horio Y., Taketoshi M., Imamura I., Ando-Yamamoto M., Kangawa K., Matsuo H., Kuroda M., Wada H.: Molecular cloning and sequencing of a cDNA of rat dopa decarboxylase: partial amino acid homologies with other enzymes synthesizing catecholamines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989; 86: 8142-8146
- [114] Tay S.K., Wang F.S., Lin J.B.: Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: perspectives on diagnosis and management. *Pediatr. Health Med. Ther.*, 2013; 4: 89-99
- [115] Tehranian R., Montoya S.E., Van Laar A.D., Hastings T.G., Perez R.G.: Alpha-synuclein inhibits aromatic amino acid decarboxylase activity in dopaminergic cells. *J. Neurochem.*, 2006; 99: 1188-1196
- [116] Vassilacopoulou D., Sideris D.C., Vassiliou A.G., Fragoulis E.G.: Identification and characterization of a novel form of the human L-dopa decarboxylase mRNA. *Neurochem. Res.*, 2004; 29: 1817-1823
- [117] Vassiliou A.G., Fragoulis E.G., Vassilacopoulou D.: Detection, purification and identification of an endogenous inhibitor of L-Dopa decarboxylase activity from human placenta. *Neurochem. Res.*, 2009; 34: 1089-1100
- [118] Vassiliou A.G., Vassilacopoulou D., Fragoulis E.G.: Purification of an endogenous inhibitor of L-Dopa decarboxylase activity from human serum. *Neurochem. Res.*, 2005; 30: 641-649
- [119] Vassort C., Rivière M., Bruneau G., Gros F., Thibault J., Levan G., Szpirer J., Szpirer C.: Assignment of the rat genes coding for dopa decarboxylase (DDC) and glutamic acid decarboxylases (GAD1 and GAD2). *Mamm. Genome*, 1993; 4: 202-206
- [120] Wafa L.A., Cheng H., Rao M.A., Nelson C.C., Cox M., Hirst M., Sadowski I., Rennie P.S.: Isolation and identification of L-dopa decarboxylase as a protein that binds to and enhances transcriptional activity of the androgen receptor using the repressed transactivator yeast two-hybrid system. *Biochem. J.*, 2003; 375: 373-383
- [121] Wang D., Gao G.: State-of-the-art human gene therapy: part II. Gene therapy strategies and clinical applications. *Discov. Med.*, 2014; 18: 151-161
- [122] Waymire J.C., Haycock J.W.: Lack of regulation of aromatic L-amino acid decarboxylase in intact bovine chromaffin cells. *J. Neurochem.*, 2002; 81: 589-593
- [123] Wernig M., Zhao J.P., Pruszak J., Hedlund E., Fu D., Soldner F., Broccoli V., Constantine-Paton M., Isacson O., Jaenisch R.: Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 5856-5861
- [124] Woźniak M., Koziolkiewicz M.: Enzymy zależne od fosforanu pirydoksalu – charakterystyka i zastosowanie w biotechnologii. *Biotechnologia*, 2005; 4: 63-81
- [125] Young E.A., Duchemin A.M., Neff N.H., Hadjiconstantinou M.: Parallel modulation of striatal dopamine synthetic enzymes by second messenger pathways. *Eur. J. Pharmacol.*, 1998; 357: 15-23
- [126] Young E.A., Neff N.H., Hadjiconstantinou M.: Evidence for cyclic AMP-mediated increase of aromatic L-amino acid decarboxylase activity in the striatum and midbrain. *J. Neurochem.*, 1993; 60: 2331-2333
- [127] Zhong N., Kim C.Y., Rizzu P., Geula C., Porter D.R., Pothos E.N., Squitieri F., Heutink P., Xu J.: DJ-1 transcriptionally up-regulates the human tyrosine hydroxylase by inhibiting the sumoylation of pyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 20940-20948
- [128] Zhu M.Y., Juorio A.V.: Aromatic L-amino acid decarboxylase: biological characterization and functional role. *Gen. Pharmacol.*, 1995; 26: 681-696
- [129] Zhu M.Y., Juorio A.V., Paterson I.A., Boulton A.A.: Regulation of striatal aromatic L-amino acid decarboxylase: effects of blockade or activation of dopamine receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 1993; 238: 157-164
- [130] Zhu M.Y., Juorio A.V., Paterson I.A., Boulton A.A.: Regulation of aromatic L-amino acid decarboxylase in rat striatal synaptosomes: effects of dopamine receptor agonists and antagonists. *Br. J. Pharmacol.*, 1994; 112: 23-30

Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.