

STRESZCZENIE

Oksydazy fenolowe są enzymami z klasy oksydoreduktaz, których główną funkcją jest utlenianie fenoli. Termin oksydaza fenolowa jest często używany zamiennie na określenie trzech różnych enzymów: tyrozynazy (EC 1.14.18.1), oksydazy katecholowej oraz lakazy. Spośród nich, jedynie tyrozynaza wykazuje dwie aktywności: (1) aktywność oksygenazy umożliwiającą hydroksylację monofenoli do *orto*-difenoli oraz (2) aktywność oksydazy odpowiedzialną za dalsze utlenianie *orto*-difenoli do *orto*-chinonów. Tyrozynaza jest kluczowym enzymem procesu melanogenezy, w wyniku którego powstają czarno-brązowa eumelanina i żółto-czerwona feomelanina. Poza rolę pigmentacyjną, melanina u człowieka pełni funkcję ochronną przed szkodliwym promieniowaniem ultrafioletowym, natomiast u zwierząt bezkręgowych zaangażowana jest w procesy twardnienia oskórka, gojenie ran, formowanie skrzepu, utrzymanie homeostazy jelita oraz reakcje obronne. U bezkręgowców tyrozynaza jest syntetyzowana jako proenzym, a jej aktywna forma pojawia się w wyniku uruchomienia kaskady proteaz serynowych nazywanej układem oksydazy fenolowej. Układ ten stanowi jeden z mechanizmów odporności wrodzonej.

WPROWADZENIE

W odpowiedzi na zranienie czy zakażenie organizmy uruchamiają reakcje obronne, których zadaniem jest likwidacja stanu zapalnego lub infekcji. U bezkręgowców do takich reakcji zalicza się m.in. aktywację kaskady enzymów proteolitycznych zaangażowanych w procesy melanizacji, nazywanej układem oksydazy fenolowej. Kluczowym enzymem w tym procesie jest oksydaza fenolowa (PO, ang. *phenoloxidase*), katalizująca utlenianie fenoli do chinonów, które następnie polimeryzują i tworzą melaninę odkładaną w miejscu zranienia lub zakażenia. Oksydaza fenolowa u bezkręgowców, w odróżnieniu od tyrozynazy ludzkiej, wytwarzana jest w formie nieaktywnej (zymogen) określanej jako prooksydaza fenolowa (proPO, PPO, ang. *prophenoloxidase*). W wyniku działania kaskady proteaz serynowych, proPO jest przekształcana w formę aktywną PO na drodze ograniczonej proteolizy. Dokonuje tego ostatni enzym kaskady znany jako proteaza/enzym aktywująca/y prooksydazę fenolową (proPAP/proPAE, PPAP/PPAE, ang. *prophenoloxidase activating protease/enzyme*) lub czynnik aktywujący prooksydazę fenolową (proPAF/PPAF, ang. *prophenoloxidase activating factor*).

CHARAKTERYSTYKA OKSYDAZY FENOLOWEJ

Oksydazy fenolowe są enzymami z klasy oksydoreduktaz, których główną funkcją jest utlenianie fenoli. Jest to grupa enzymów bardzo zróżnicowana pod względem struktury, rozmieszczenia w poszczególnych tkankach i lokalizacji w komórce. Termin oksydaza fenolowa jest często używany zamiennie na określenie trzech różnych enzymów: tyrozynazy (EC 1.14.18.1), oksydazy katecholowej oraz lakazy (Ryc. 1). Spośród nich, jedynie tyrozynaza wykazuje dwie aktywności: (1) aktywność oksygenazy (aktywność krezolazowa), umożliwiającą hydroksylację monofenoli (tyrozyna) do *orto*-difenoli (DOPA) oraz (2) aktywność oksydazy (aktywność katecholazowa), odpowiedzialną za dalsze utlenianie *orto*-difenoli do *orto*-chinonów (Dopachinon). Oksydaza katecholowa ma zdolność do katalizowania reakcji utleniania *o*-difenoli do *o*-chinonów. Natomiast lakaza może bezpośrednio utleniać *o*- i *p*-difenole do odpowiednich chinonów. W odróżnieniu od kręgowców, które wytwarzają jedynie tyrozynazę, u bezkręgowców można odnaleźć wszystkie trzy typy PO, np. tyrozynazę u *Drosophila melanogaster* i innych owadów, katecholazę u kraba *Charybdis japonica*, katecholazę oraz lakazę u raka *Procambrus clarkii*, enzym o aktywności krezolazy i lakazy u małża *Venerupis philippinarum*. Pomimo różnic w sekwencji aminokwasowej, tyrozynazy ssaków i owadów katalizują w procesie melanogenezy trzy typy reakcji: (1) hydroksylację monofenoli do *o*-difenoli, (2) utlenianie *o*-difenoli do *o*-chinonów, (3) dehydrogenację dihydroksyindoli [1,2].

Sylwia Stączek✉

Katarzyna Grygorczuk

Agnieszka Zdybicka-Barabas

Anna Siemińska-Kuczer

Lidia Vertyporokh

Mariola Andrejko

Iwona Wojda

Małgorzata Cytryńska

Zakład Immunobiologii, Instytut Biologii i Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

✉Zakład Immunobiologii, Instytut Biologii i Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin; tel.: (81) 537 50 50, e-mail: s.staczek@poczta.umcs.lublin.pl

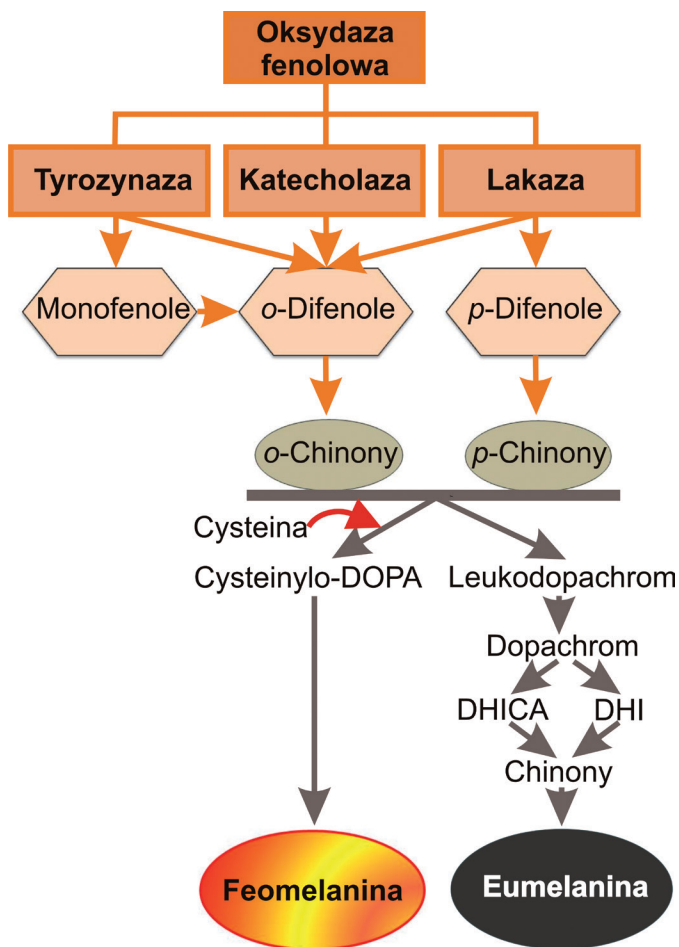
Artykuł otrzymano 31 października 2017 r.

Artykuł zaakceptowano 14 listopada 2017 r.

Słowa kluczowe: odporność wrodzona, oksydaza fenolowa, tyrozynaza, melanizacja, serpiny, pacifastyny

Wykaz skrótów: DHI – 5,6-dihydroksyindol, DHICA – kwas 5,6-dihydroksyindolo-2-karboksyloxy, DOPA – 3,4-dihydroksyfenyloalana, LPS – lipopolisacharyd, PAP – proteaza aktywująca prooksydazę fenolową, PG – peptydoglikan, PO – oksydaza fenolowa, proPO – prooksydaza fenolowa, SP – proteaza serynowa, SPH – homolog proteazy serynowej

Podziękowania: Praca powstała podczas realizacji projektu badawczego nr 2013/09/N/NZ6/00838 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu Preludium.



Rycina 1. Udział oksydazy fenolowej w procesie melanogenezy u zwierząt (szczegółowy opis w tekście).

STRUKTURA CZĄSTECZKI OKSYDAZY FENOLOWEJ

Wielkość i forma cząsteczek PO różnią się u różnych organizmów. Tyrozinaza kręgowców jest dimerem, podczas gdy PO bezkręgowców monomerem lub oligomerem (od dimeru do pentameru). Masa molekularna poszczególnych monomerów wynosi 40-45 kDa, a masa całkowita cząsteczki może osiągać 400 kDa. Owadzia proPO jest homodimerem, np. PPO8 z *Anopheles gambiae* lub heterodimerem, o masie ok. 160 kDa, jak proPO1 i proPO2 z *Manduca sexta* czy *Bombyx mori*. U małyży masa białek o aktywności PO wynosi od 10 do 381 kDa. Niezależnie od pochodzenia, monomer PO jest zbudowany z trzech domen: (1) domeny N-końcowej, (2) centralnej domeny α -helikalnej, zawierającej centrum aktywne wiążące jony miedzi, (3) domeny C-końcowej o strukturze β -kartki. N-końcowy odcinek poprzedza pro-region, będący miejscem cięcia dla trypsynopodobnej proteazy serynowej. Tyrozinazy u ludzi i myszy są białkami błonowymi, zawierającymi peptyd sygnałny i region transbłonowy. Wszystkie zbadane sekwencje PO u stawonogów, z wyjątkiem PO w jadle osy polującej *Pimpla hypochondriaca*, nie zawierają peptydu sygnałnego. Ze względu na brak N-końcowego peptydu sygnałnego, który kierowałby

wydzielaniem białka do hemolimfy, jedyną potwierdzoną drogą uwalniania proPO podczas infekcji jest rozpad hemocytów [3-5].

Cechą wspólną PO ssaków, bezkręgowców, grzybów i bakterii, jest obecność miejsca aktywnego, w skład którego wchodzi dwa regiony, z których każdy zawiera atom miedzi otoczony trzema resztami histydyny. Z tego względu PO można zaklasyfikować do typu III rodziny białek, zawierających jony miedzi w grupie prostetycznej, podobnie jak hemocyjaniny stawonogów i mięczaków oraz oksydoreduktazy kręgowców, roślin czy mikroorganizmów. Budowa ta umożliwia wiązanie tlenu. U stawonogów sekwencja aminokwasowa proPO jest homologiczna do hemocyjaniny, białka o masie ok. 90 kDa, obecnego w hemolimfie, pełniącego funkcję podobną do hemoglobiny krwi kręgowców [1]. Owadzia proPO wykazuje wysoki stopień homologii do hemocyjaniny stawonogów (ok. 40%), podczas gdy tyrozinaza ludzka i roślinna oraz mikroorganizmów, jest bliżej spokrewniona z hemocyjaniną mięczaków [4]. Hemocyjanina u wielu stawonogów (m.in. skrzypłocy) i mięczaków, oprócz roli transportera tlenu, może w pewnych warunkach pełnić rolę PO. Atomy miedzi są jednak w cząsteczce hemocyjaniny niedostępne dla większych substratów ze względu na obecność domeny karboksylowej (u mięczaków) lub aminowej (u stawonogów). Ograniczona proteoliza przeprowadzana przez bakteryjne lub endogenne proteazy prowadzi do zmian konformacyjnych, skutkujących uzyskaniem przez hemocyjaninę aktywności PO. Badania wskazują, że PO wywodząca się z hemocyjaniny, wykazuje jednak zdecydowanie niższą aktywność w porównaniu z PO pochodzącą z hemocytów [6]. ProPO wykazuje również podobieństwo do heksameryn, białek zapasowych owadów, stanowiących rezerwuuar aminokwasów. Sekwencja proPO u różnych gatunków wykazuje podobieństwo na poziomie 60-70% i dotyczy regionu miejsca aktywnego. Innym konserwatywnym motywem jest sekwencja GCGEQNM, która poza proPO występuje w α 2-makroglobulinie kręgowców i bezkręgowców, składnikach C3 i C4 układu dopełniacza kręgowców i w odpowiadających im białkach bezkręgowców [1,3,7].

GENY KODUJĄCE OKSYDAZĘ FENOLOWĄ

U stawonogów oksydaza fenolowa jest prawdopodobnie niezbędna do przeżycia, gdyż genomy wszystkich opisanych pod tym względem gatunków zawierają geny dla PO. Jak ważną rolę odgrywa oksydaza fenolowa w organizmie owadów potwierdza fakt, że mutanty *D. melanogaster* pozbawione aktywności tego enzymu są niezdolne do życia [8].

Liczba genów kodujących proPO różni się w zależności od gatunku, od jednego u pszczoły miodnej *Apis mellifera*, do dziesięciu u komara *Aedes aegypti* [3,9]. Genom *D. melanogaster* zawiera trzy geny kodujące proPO: *proPO1*, *proPO2*, *proPO3*, zlokalizowane na chromosomie 2. Główną rolę w melanogenezy odgrywają *proPO1* oraz *proPO2* ulegające ekspresji w komórkach krystalicznych (opisane poniżej). Natomiast *proPO3* jest wykorzystywana przez owada swoiście do walki z pasożytniczymi osami, np. *Leptopilina boulardii*. Gen dla *proPO3* ulega ekspresji w lamellocytach,

dużych komórkach pojawiających się u muszek zakażonych pasożytami, które uczestniczą w inkapsulacji jaj os [10]. Pro-PO wykazuje często bardzo duże podobieństwo międzygatunkowe, np. *D. melanogaster* oraz *Tribolium castaneum* mają wspólne dwa z trzech genów kodujących proPO. Dla kontrastu, duże zróżnicowanie w rodzinie genów kodujących proPO stwierdzono u komarów. U *A. gambiae* występuje dziewięć, a u *A. aegypti* aż dziesięć genów dla proPO [11]. Wymienia się kilka hipotez tłumaczących występowanie tak dużej liczby genów: (1) może to być wyraz wyspecjalizowania danego gatunku w walce z szerszym repertuarem patogenów, (2) „wyścig zbrojeń” pomiędzy patogenami a ich gospodarzami, który prowadzi do wykształcenia specyficznych mechanizmów, przejawiających się tym, że np. u komarów, te same geny, które odpowiedzialne są za melanizację, jako reakcję obronną przeciwko *Plasmodium berghei*, nie są wykorzystywane do obrony przeciwko *Plasmodium falciparum* [12,13], (3) zaangażowanie poszczególnych genów w te same procesy, ale w różnym stadium rozwoju organizmu [14].

Istnieje ograniczona liczba danych dotycząca genów kodujących PO u mięczaków. U małża, ostryżycy japońskiej *Crassostrea gigas*, zidentyfikowano gen dla lakazy 1 o wysokim stopniu homologii z konserwatywnym regionem PO wiążącym jony miedzi, a także gen dla tyrozynazy 1, który koduje typową domenę z centrum aktywnym oraz peptyd sygnałny. Kilka genów kodujących lakazę i jeden gen dla tyrozynazy zidentyfikowano również u perłoplawa *Pinctada fucata* [5].

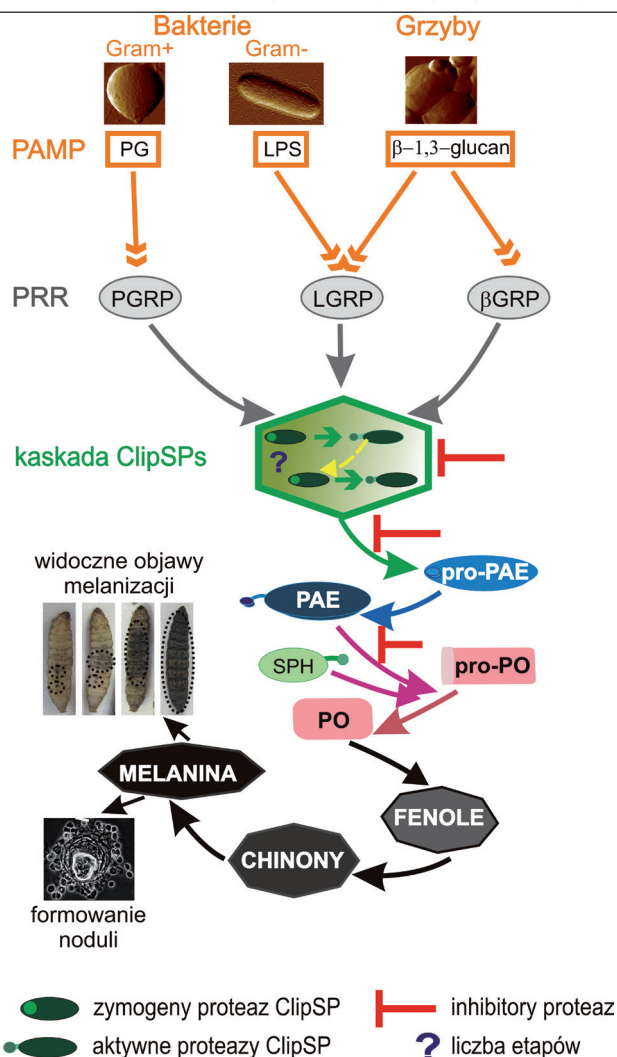
KOMÓRKI WYTWARZAJĄCE OKSYDAZĘ FENOLOWĄ

Synteza proPO u owadów odbywa się przede wszystkim w różnych typach hemocytów. U *D. melanogaster* są to komórki krystaliczne, u innych przedstawicieli Diptera (komary) enocytoidy i granulocyty, a u Lepidoptera enocytoidy (Tab. 1). Komórki krystaliczne (ang. *crystal cells*) stanowią ok. 5% populacji hemocytów *D. melanogaster*. Komórki te zawierają cytoplazmatyczne inkluzje w formie kryształów, w których stwierdzono obecność proPO (pro-PO2) uwalnianej po uszkodzeniu komórki. U *Drosophila* również lamellocyty są odpowiedzialne za wytwarzanie proPO, jednak nie wiadomo czy i w jaki sposób enzym jest z nich uwalniany [3,4]. Enocytoidy (ang. *enocytoids*) Lepidoptera są funkcjonalnymi analogami komórek krystalicznych u *Drosophila*, jednak nie zawierają wewnątrzkomórkowych kryształów. mRNA proPO zidentyfikowano w cytosolu enocytoidów (np. proPO1 *B. mori*). Uważa się, że u Lepidoptera proPO oraz pozostałe składniki kaskady PO są uwalniane z enocytoidów w wyniku ich lizy [4]. W hemolimfie Lepidoptera obserwuje się stały niski poziom proPO, który znacząco wzrasta po zranieniu i/lub zakażeniu wskutek szybkiej lizy enocytoidów. U *A. gambiae* oprócz enocytoidów, w proces melanizacji zaangażowane są granulocyty. W granulocytach ekspresji ulegają między innymi *proPO2* i *proPO4*, ale sposób uwalniania z nich proPO nie jest do końca wyjaśniony. Biorąc pod uwagę fakt, że granulocyty, stanowiące 90% wszystkich hemocytów *A. gambiae*, są komórkami fagocytującymi, ekspresja genów dla proPO może wskazywać na udział melanizacji w procesie fagocytozy u tych owadów [15]. U przedstawicieli mięczaków – małży,

aktywność PO stwierdza się w jajach, hemocytach, plazmie, płatach skrzelowych, gruczołach trawiennych, płaszczu i muszli [5].

UKŁAD OKSYDAZY FENOLOWEJ U BEZKRĘGOWCÓW

Jak wspomniano wcześniej, powstanie aktywnej PO u bezkręgowców wymaga uruchomienia kaskady proteaz serynowych nazywanej układem PO, który najlepiej poznano u owadów. Układ ten ulega aktywacji głównie przez charakterystyczne struktury molekularne obecne w ścianie komórkowej bakterii i grzybów (PAMPs, ang. *pathogen-associated molecular patterns*) (Ryc. 2). Należą do nich lipopolisacharyd (LPS), peptydoglikan (PG) oraz β -1,3-glukan. Rozpoznanie PAMPs przez odpowiednie receptory (PRRs, ang. *pattern recognition receptors*), takie jak β GRP (ang. *β -glucan recognition protein*), LGRP (ang. *LPS and β -1,3-glucan recognition protein*), PGRP (ang. *peptidoglycan recognition protein*), czy lektyny typu C, prowadzi do uruchomienia kaskady proteaz serynowych. Kończącym etapem tej kaskady jest aktywacja proPO do PO przez proteazę aktywującą prooksydazę fenolową. Niekiedy, do aktywacji tej proteazy nie-



Rycina 2. Układ oksydazy fenolowej u owadów oraz efekty jego uruchomienia u *Galleria mellonella* (szczegółowy opis w tekście). Rycina przedstawia różny stopień melanizacji oskórki gąsienicy *G. mellonella* oraz nodule (obraz z mikroskopu świetlnego) powstałą w hemolimfie *G. mellonella* po iniekcji do hemocelu zarodników grzybów nitkowatych. Komórki drobnoustrojów obrazowano przy użyciu mikroskopu sił atomowych (AFM).

Tabela 1. Komórki syntetyzujące oksydazę fenolową u wybranych przedstawicieli zwierząt bezkręgowych.

Organizm	Rodzaj komórek	Lokalizacja komórek	Piśmiennictwo
<i>Drosophila melanogaster</i>	komórki krystaliczne, lamellocyty	hemolimfa	[3,4]
<i>Anopheles gambiae</i>	enocytoidy granulocyty	hemolimfa	[15]
<i>Galleria mellonella</i>	enocytoidy	hemolimfa	[4]
<i>Bombyx mori</i>	enocytoidy komórki epidermalne	hemolimfa jelito tylne	[4] [48]
<i>Locusta migratoria</i>	brak danych	jelito przednie	[49]
<i>Pacifastacus leniusculus</i> <i>Panaeus monodon</i>	hemocyty	hemolimfa	[21]
<i>Gorgonia ventalina</i>	amebocyty granularne	mezoglea	[46]

zbędna jest obecność kofaktorów lub homologów proteaz serynowych (SPHs, ang. *serine protease homologs*). SPHs, w których istotną dla katalizy resztę seryny zastępuje reszta glicyny, zidentyfikowano w genomach m.in. *D. melanogaster*, *A. aegypti*, *A. gambiae* i *A. mellifera* [1,16-18].

Układ PO mogą aktywować również cząsteczki endogenne, takie jak lipidy amfifilowe (lizofosfatydylocholina) oraz ujemnie naładowane fosfolipidy wewnętrznej warstwy błony, pochodzące z apoptotycznych lub uszkodzonych komórek, np. fosfatydyloseryna (PS), fosfatydyloinozytol (PI). Wskazują na to m.in. badania przeprowadzone na *Drosophila*, w których w aktywację proPO po zranieniu zaangażowany był sygnał pochodzący z uszkodzonych hemocytów, w tym komórek krystalicznych [19].

Aktywatorami układu PO mogą być również proteazy egzogenne (trypsyna, chymotrypsyna, proteazy wytwarzane przez patogeny), detergenty (Triton X-100, SDS), a także stres środowiskowy, np. w przypadku małej ekspozycja na powietrze, wysokie ciśnienie wody, niskie zasolenie. Ponadto, w warunkach laboratoryjnych aktywacja proPO była obserwowana w obecności kwasów tłuszczowych i alkoholi, np. izopropanolu [1,5].

PROTEAZY SERYNOWE UKŁADU OKSYDAZY FENOLOWEJ

Proteazy serynowe (SPs, ang. *serine proteases*) zaangażowane w kaskadzie PO, to hydrolazy syntetyzowane w formie nieaktywnych zymogenów, w strukturze których na N-końcu cząsteczki obecne są domeny typu Clip (Clip-SPs, ang. *Clip domain serine proteinases*). Domena Clip zawiera 30-63 reszt aminokwasów, w tym 6 konserwatywnych cystein, które tworzą trzy mostki dwusiarczkowe (C1-C5; C2-C4; C3-C6) nadające domenie strukturę „spinacza” (ang. *a paper clip*). Enzymy te najczęściej zawierają jedną, czasem dwie domeny Clip, podczas gdy homologi proteaz serynowych SPHs mogą zawierać nawet pięć domen typu Clip [18].

Jak wspomniano, proteazy serynowe tworzące kaskadę PO powstają w formie nieaktywnej. Dopiero zranienie lub zakażenie prowadzi do przekształcenia zymogenu proteazy występującej na początku kaskady układu PO w formę aktywną, która drogą ograniczonej proteolizy aktywuje kolejny zymogen w kaskadzie. Końcowym etapem jest aktywacja proteazy bezpośrednio przekształcającej proPO w PO. Liczba enzymów uczestniczących w kaskadzie powyżej

proteazy aktywującej proPO, a także zaangażowanych bezpośrednio w jej aktywację jest różna i zależy od gatunku. Wiadomo, że po rozpoznaniu PAMPs przez PRRs, proteazą inicjującą kaskadę reakcji układu PO u *Drosophila* jest ModSP (ang. *modular serine protease*). ModSP ulega aktywacji w momencie dołączenia do kompleksu utworzonego przez receptory PGRP-SA i GNBPI na powierzchni rozpoznanego patogena [20]. Natomiast proteaza *PmClipSP2* u krewetki *Panaeus monodon* działa z jednej strony jak PRR przyłączając LPS i β -glukan, a z drugiej uruchamia cały system PO pełniąc rolę proteazy, inicjującej kaskadę reakcji proteolitycznych [21]. W aktywacji PAP w hemolimfie u *M. sexta* uczestniczą dwie proteazy; aktywna proteaza HP14 (HP, ang. *hemolymph protease*) przekształca zymogen proHP21 do aktywnej proteazy HP21, która z kolei aktywuje proPAP do formy aktywnej PAP [22]. Proteazę serynową aktywującą proPO po raz pierwszy oczyszczono z kutikuli; wyizolowano je również z hemolimfy *M. sexta* i *B. mori* (Lepidoptera), *Holotrichia diomphalia* (Coleoptera), czy raka *Pacifastacus leniusculus*. ProPAP na N-końcu cząsteczki mają sekwencję o charakterze hydrofobowym, której odcięcie prowadzi do powstania aktywnej proteazy PAP [1,16]. U *M. sexta* zidentyfikowano trzy typy proteaz aktywujących prooksydazę fenolową: PAP-1, PAP-2, PAP-3. PAP-1 ulega ekspresji w ciele tłuszczowym, tchawkach i tkance nerwowej. Poziom jej ekspresji w ciele tłuszczowym jest regulowany w zależności od rodzaju infekcji, natomiast PAP-2 ulega ekspresji w ciele tłuszczowym i hemocytach wyłącznie po zakażeniu bakteriami. Wiadomo także, że PAP-3 obecna jest u *M. sexta* konstytutywnie na niskim poziomie, a jej ekspresja wyraźnie wzrasta w oskórku, ciele tłuszczowym i hemocytach stadium przedpoczwarki oraz po zakażeniu owada [1].

Ograniczona proteoliza proPO przy udziale aktywującej ją proteazy w większości przypadków dotyczy konserwatywnego wiązania między resztą argininy a resztą fenyloalaniny (Arg-Phe), a niekiedy między resztą argininy a resztą waliny (Arg-Val), które znajdują się w N-końcowym fragmencie cząsteczki. Prowadzi to do odcięcia około 50-cio aminokwasowego peptydu, czego konsekwencją jest zmiana konformacji białka tak, aby centrum aktywne enzymu stało się łatwo dostępne dla substratu. Aktywacja proPO może przebiegać różnie w zależności od gatunku. U owadów można wyróżnić trzy mechanizmy aktywacji proPO. (1) U *B. mori* PPAA bezpośrednio przekształca proPO w aktywną PO przez rozerwanie wiązania peptydowego Arg⁵¹-Phe⁵² (*BmPO1* – 72,82kDa, *BmPO2* – 74,25kDa). (2) U *M. sexta* do pełnej ak-

tywacji proPO niezbędne są również inne białka. W wyniku rozcięcia cząsteczki proPO w konserwatywnych miejscach (Arg⁵¹-Phe⁵² w MsPPO1, Arg⁴⁹-Val⁵⁰ w MsPPO2) przez proteazę aktywującą powstaje PO o bardzo niskiej aktywności (MsPPO1 – 72,86 kDa, MsPPO2 – 74,14 kDa). Dlatego niezbędny jest udział homologów proteaz serynowych SPH-1 i SPH-2, które wcześniej asocjują z PAP i proPO tworząc duży kompleks. Przyłączenie SPH do MsPO indukuje zmiany konformacyjne w cząsteczce PO tak, że uzyskuje ona pełną aktywność. (3) U *H. diomphalia* występują trzy proteazy aktywujące proPO, określane PPAF-I, -II, -III. PPAF-I rozcina HdPPO-1 w konserwatywnym miejscu między Arg⁵⁰-Phe⁵¹, w wyniku czego powstaje nieaktywna cząsteczka o masie 76 kDa. Do uzyskania pełnej aktywności wymaga ona rozcięcia wiązania Arg¹⁶²-Ala¹⁶³ przy udziale dwóch kolejnych białek, co powoduje powstanie aktywnej PO o masie cząsteczkowej 60 kDa. Jednym z tych białek jest SHP o masie cząsteczkowej 55 kDa, a drugim jest proteaza serynowa, która przekształca SHP do białka o masie cząsteczkowej 45 kDa [22].

Analiza sekwencji aminokwasów enzymów aktywujących proPO (PPAEs) u kreketek wykazała, że PmPPAE1 i LvPPAE1 mają wysokie podobieństwo (>60%) do PPAE skorupiaków, natomiast PmPPAE2 i LvPPAE2 do PPAE owadów (>50%) [21].

REGULACJA AKTYWNOŚCI UKŁADU OKSYDAZY FENOLOWEJ

Produkty pośrednie szlaku syntezy melaniny wykazują szkodliwe działanie nie tylko wobec patogenów, ale też wobec komórek własnych. Dlatego przebieg tego procesu podlega ścisłej regulacji na każdym etapie, w czym uczestniczą m.in. inhibitory proteaz serynowych tworzących układ PO, inhibitory hamujące aktywność PO, a także białka hamujące melanizację (MIPs, ang. *melanization inhibiting proteins*) działające na produkty powstające podczas reakcji melanizacji (Tab. 2) [22-24].

INHIBITORY PROTEAZ SERYNOWYCH – SERPINY I PACIFASTYNY

Do negatywnych regulatorów kaskady proPO należą serpiny i pacifastyny, które hamują aktywność proteaz se-

rynowych u owadów i skorupiaków. Serpiny (ang. *serine protease inhibitors*), o masach cząsteczkowych od 40 kDa do 60 kDa (350–500 reszt aminokwasów), charakteryzują się tzw. samobójczym mechanizmem hamowania proteaz serynowych [25,26]. Dotychczas opisano ponad 500 serpin, które w większości są białkami wewnątrzkomórkowymi, ale mogą funkcjonować też w środowisku zewnątrzkomórkowym [26]. U ssaków serpiny pełnią ważną rolę w regulacji endopeptydaz uczestniczących w procesach istotnych dla utrzymania homeostazy organizmu, np. krzepnięciu krwi, fibrynolizie, stanach zapalnych oraz aktywacji układu dopełniacza. U stawonogów uczestniczą m.in. w procesach krzepnięcia hemolimfy, regulacji układu oksydazy fenolowej, szlaku Toll, endogennych endopeptydaz, a także chronią przed działaniem endopeptydaz wytwarzanych przez patogeny [27]. Pierwsze scharakteryzowane serpiny owadzie pochodziły z hemolimfy jedwabnika morwowego *B. mori*, a następnie opisano serpiny u *M. sexta*. Sekwencje kodujące serpiny zidentyfikowano u licznych stawonogów na poziomie transkryptomu i genomu, a liczba genów dla tych inhibitorów może liczyć od kilku do 40, np. u *D. melanogaster* zidentyfikowano 29 genów, u *B. mori* 34, u *M. sexta* 32, a u chrząszcza *T. castaneum* 31. Z kolei u komarów liczba genów zależy od gatunku, np. u *A. gambiae* 18, u *A. aegypti* 23, a u *Culex quinquefasciatus* 31. Natomiast znacznie mniejszą liczbę genów serpin zidentyfikowano u pszczoły *A. mellifera* (7 genów) oraz muchy tse-tse *Glossinia morsitans* (10 genów). Dużą zmienność w liczbie genów kodujących serpiny stwierdzono u kleszczy *Ixodes scapularis* (45), *Rhipicephalus microplus* (22) oraz roztoczy *Sarcoptes scabiei* (10). Zróżnicowanie w liczbie genów serpin może być związane z ich duplikacją, a na liczbę produktów białkowych może mieć dodatkowo wpływ alternatywne składanie transkryptów. Po raz pierwszy zaobserwowano ten proces u *M. sexta* dla genu serpiny1. Wiadomo jest, że u *M. sexta* proteaza aktywująca proPO (PAP) jest hamowana przez cztery serpiny, określane jako serpina-1J, -3, -6, -7. Aktywację proPO u innych gatunków regulują ortologi serpiny-3 *M. sexta*, np. Spn27A u *D. melanogaster*, SRPN1, -2, -3 u *A. gambiae* i *A. aegypti*, SP13 u *Ostrinia furnacalis*. Poza proteazą PAP serpiny mogą regulować także inne proteazy typu clip funkcjonujące w kaskadzie PO [27,28].

Tabela 2. Wybrane mechanizmy kontroli aktywności układu oksydazy fenolowej i melanizacji u bezkręgowców.

Mechanizm regulacji	Organizmy, u których stwierdzono dany sposób regulacji	Piśmiennictwo
Synteza proteaz serynowych i oksydazy fenolowej w postaci nieaktywnej	Mechanizm opisany u wielu bezkręgowców	[1,3,16,25,27]
Hamowanie aktywności proteaz serynowych przy udziale serpin	<i>Anopheles gambiae</i> <i>Bombyx mori</i> <i>Drosophila melanogaster</i> <i>Manduca sexta</i> <i>Litopenaeus vannamei</i>	[21,27,28]
Hamowanie aktywności proteaz serynowych przy udziale pacifastyn	<i>Pacifastacus leniusculus</i> <i>Litopenaeus vannamei</i> <i>Panaeus monodon</i>	[21,29]
Kofaktory niezbędne do aktywacji proPO – homologi proteaz serynowych (SPH)	<i>Holotrichia diomphalia</i> <i>Manduca sexta</i>	[22]
Inhibicja kompetycyjna aktywności oksydazy fenolowej przy udziale peptydów o specyficznej sekwencji	<i>Anopheles gambiae</i> <i>Manduca sexta</i> <i>Musca domestica</i>	[24,30]
Białka amyloidowe	<i>Heliothis virescens</i>	[4,36]
Białka hamujące melanizację (MIPs)	<i>Pacifastacus leniusculus</i> <i>Panaeus monodon</i> <i>Tenebrio molitor</i>	[21,24]

Pacifastyny, to rodzina białek należących do grupy inhibitorów proteaz serynowych, które zostały znalezione u skorupiaków oraz u owadów. Nazwa pochodzi od nazwy rodzajowej słodkowodnego raka sygnałowego *P. leniusculus*, u którego po raz pierwszy opisano tego typu inhibitor. Pacifastyna jest heterodimerem zawierającym dwa łańcuchy polipeptydowe pełniące różne funkcje biologiczne. Łańcuch ciężki (105 kDa) wykazuje homologię do transferyny i uczestniczy w wiązaniu żelaza. Natomiast łańcuch lekki (44 kDa) zawiera dziewięć domen PLD (ang. *pacifastin light chain domains*) o aktywności inhibitora proteaz serynowych. Każda domena PLD zawiera konserwatywny wzór 6 cystein tworzących trzy mostki dwusiarczkowe (Cys1–4, Cys2–6, Cys3–5), które umożliwiają utworzenie stabilnej struktury typowej dla tej rodziny białek. Wykazano że u *P. leniusculus* pacifastyna jest zaangażowana w regulację odpowiedzi immunologicznej poprzez hamowanie proteazy aktywującej bezpośrednio proPO. Pacifastyny zidentyfikowano też u owadów należących do kilku rzędów: Orthoptera (*Schistocerca gregaria*, *Locusta migratoria*), Diptera (*A. aegypti*, *A. gambiae*, *C. quinquefasciatus*, *Belgica antarctica*), Hemiptera (*Triatoma infestans*, *Oncopeltus fasciatus*), Hymenoptera (*P. hypochondriaca*). Jednakże, jak dotąd nie ma bezpośrednich dowodów na udział pacifastyn w regulacji układu PO u owadów [29].

INNE MECHANIZMY KONTROLI UKŁADU OKSYDAZY FENOLOWEJ

W kontroli układu PO mogą uczestniczyć też peptydy, które w cząsteczce zawierają substrat dla PO - DOPA. Przykładem jest 38-aminokwasowy peptyd opisany u muchy *Musca domestica*, w którym reszta Tyr³² ulega hydroksylacji do DOPA, czego efektem jest jego działanie jako inhibitor kompetycyjny oksydazy fenolowej [30]. Wykazano również, że w regulacji melanizacji u owadów (np. *A. gambiae*, *Galleria mellonella*, *M. sexta*, *Spodoptera littoralis*) mogą być zaangażowane białka i peptydy o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, takie jak lizozym, defensyna, peptyd bogaty w prolinę 1, peptyd anionowy 2 [22,31]. U *A. aegypti* po infekcji pojawia się białko CLSP2 zbudowane z dwóch domen, z których jedna przypomina lektynę typu C, a druga elastazę (CTL, ang. *C-type lectin*; ESP, ang. *elastase-like SP*). CLSP2 jest negatywnym regulatorem aktywacji proPO i pełni ważną rolę w zapobieganiu spontanicznej melanizacji hemolimfy. Domena CTL tego białka uczestniczy w rozpoznaniu patogenów, natomiast domena ESP reguluje melanizację. Warto tu zaznaczyć, że niektóre patogeny i pasożyty rozwinęły strategie hamujące reakcje odpornościowe gospodarza, w tym melanizację, aby zwiększyć skuteczność zakażenia. I tak np. *Plasmodium gallinaceum* reguluje transkrypcję genu CLSP2, przez co obniża aktywację proPO w odpowiedzi na zakażenie, co sprzyja rozwojowi zarodźca w organizmie komara [32]. Innym przykładem jest wirus MdBV (ang. *Microplitis demoliter* bracovirus) wprowadzany do organizmu owada-żywiciele podczas składania jaj przez pasożytniczą osę *M. demoliter*. Genom wirusa koduje białka Egf1.0 i Egf1.5, które u *M. sexta* hamują melanizację hemolimfy przez przyłączenie się do PAPs, co w efekcie zapobiega aktywacji proPO i pozwala na rozwój pasożyta. Z kolei grzyb entomopatogeny *Metarhizium robertsii* rozwijając się w organizmie porażonego owada wytwarza cykliczne

peptydy, destruksyne DtxS1 i DtxS2, które również hamują melanizację hemolimfy [3,22,33,34]. Odwrotną strategię wykorzystuje entomopatogenna bakteria *Photorhabdus luminescens*. W organizmie zainfekowanego owada wytwarza ona metaloproteazę PrtS, której niekontrolowana aktywność powoduje uruchomienie układu PO i melanizację obejmującą cały organizm gospodarza prowadząc do jego śmierci [35].

Ssaki wykształciły melanosomy - ciała melaninowe, stanowiące unikalne organella melanocytów, w których dochodzi do syntezy melaniny (opisane poniżej). U owadów nie stwierdza się takich struktur. Niemniej jednak zarówno owady jak i ssaki, wykorzystują właściwości białek amyloidowych zdolnych do tworzenia włókien (fibrylli). Białka te, ułatwiając właściwe wiązanie oraz pozycjonowanie cząsteczek chinonów w optymalnej orientacji, przyspieszają ich polimeryzację przez co ograniczają możliwość cytotoksycznego działania tych pośrednich produktów melanogenezy na własne komórki, w tym na melanocyty. U owadów również zidentyfikowano białka amyloidu, m.in. białko P102, wyizolowane z hemocytów gąsienic *Heliothis virescens* zakażonych brakowirusem. Występuje ono w formie fibrylli otaczających jądra głównie sferulocytów i granulocytów tego owada. Wyizolowane z hemolimfy amyloidy zwiększają *in vitro* ilość melaniny wytwarzanej z DOPA, natomiast badania *in vivo* wskazują, że są one wydzielane z hemocytów do hemolimfy, gdzie oplaszczają wstrzyknięte mikrokulki, które następnie pokrywane są melaniną. Wyniki badań wskazują, że u owadów, podobnie jak w melanocytach ssaków, amyloidy wiążą i zagęszczają prekursorzy melaniny, stanowią miejsce zakotwiczenia melanin oraz wiązania hemocytów podczas inkapsulacji. Białka amyloidu ponadto zwiększają „lepkość” kapsuł zawierających drobnoustroje, przez co struktury te mogą być związane do ściany hemo celu [4,36].

MELANOGENEZA

Główną rolą PO w procesie melanogenezy jest przekształcanie fenoli do chinonów, które następnie polimeryzują do formy melaniny. Wyróżnić można dwie klasy związków wykorzystywanych przez PO jako substraty: (1) monofenole takie jak tyrozyna czy tyramina, (2) związki katecholowe: 1,2-dihydroksybenzen (katechol), 4-metylo-katechol, DOPA, dopamina, N-acetyldopamina (NADA), N-β-alanyldopamina (NBAD), N-acetylnonepinefryna (NBANE), kwas 3,4-dihydroksyfenyloctowy (DOPAC), norepinefryna, kwas 3,4-dihydroksymigdałowy oraz kwas 3,4-dihydroksybenzoowy. W hemolimfie różnych gatunków owadów stwierdzono obecność tyrozyny oraz difenoli takich, jak DOPA, NADA i NBAD [2].

Szlak biosyntezy melaniny rozpoczyna się procesem hydroksylacji fenyloalaniny do tyrozyny przez hydroksylazę fenyloalaniny. Tyrozyna (monofenol) jest hydroksylowana przez aktywną PO, w wyniku czego powstaje DOPA (3-(3,4-dihydroksyfenylo)alanina). DOPA (o-difenol) jest następnie utleniana do Dopachinonu (o-chinon), który natomiast jest przekształcany do Dopachromu w nieenzymatycznej reakcji zachodzącej spontanicznie. Związek ten ulega dekarboksylacji, w wyniku czego powstaje 5-6-dihydroksyindol (DHI), utleniany potem do formy 5-6-indolochinonu.

Ostatecznie, indolochinon ulega polimeryzacji do czarno-brązowej eumelaniny lub, w obecności grup tiolowych cysteiny czy glutationu, w zawierające siarkę, żółto-czerwone feomelaniny [1]. Badania wskazują, że 25% melanin u organizmów wielokomórkowych to feomelaniny, jednak ich rola u owadów, poza zabarwieniem kutikuli, m.in. u konika polnego, u wybranych gatunków pasożytniczych os oraz żółtej muszki owocowej *Drosophila*, pozostaje słabo zbadana. U człowieka eumelaniny są zbudowane z kwasu 5,6-dihydroksyindolo-2-karboksyłowego, który do dzisiaj nie został zidentyfikowany u żadnego gatunku owada [4].

DHI może również powstawać na drodze alternatywnej, gdzie DOPA ulega dekarboksylacji do formy dopaminy. W kutikuli tyrozyna jest przekształcana w DOPA oraz dopaminę przez, odpowiednio, hydroksylazę oraz dekarboksylazę. Każda z tych dwóch katecholamin może brać udział w melanogenezie. Dopamina dodatkowo jest metabolizowana niezależnie przez lakazę do bezbarwnego (dehydro-N-acetyldopamina) i brązowego (dehydro-N-β-alanyldopamina) biopolimeru, które działają jako składniki scalające nowoformowaną kutikulę. Jednocześnie, tyrozyna jest przekształcana do Dopachinonu przez zewnątrzkomórkową PO, prowadząc ostatecznie do powstania czarnej melaniny (DHI, 5,6-dihydroksyindol). Grupy chinonowe melaniny formują sieciowanie z białkami obecnymi w kutikuli, np. sklerotylną. W melanogenezie związanej z procesami odpornościowymi w hemolimfie bierze udział PO typu tyrozinazy, natomiast w melanizacji i sklerotyzacji kutikuli także lakaza [4,37].

ROLA UKŁADU OKSYDAZY FENOLOWEJ I MELANINY U BEZKRĘGOWCÓW

Odpowiednie zabarwienie stanowi niezwykle ważny element w funkcjonowaniu różnych organizmów, m.in. owadów, począwszy od przyjmowania barw ochronnych -- zjawisko kamuflażu i mimikry, intensywnych barw ostrzegawczych, udziału w rozpoznawaniu i dobieraniu partnera, a nawet termoregulacji [4]. Zróżnicowanie barw, np. oczu czy skrzydeł owadów, zależne jest od dostępności poszczególnych aminokwasów (np. tyrozyny, asparagianu czy cysteiny) oraz enzymu zaangażowanego w ten proces [38]. Melanina jest również składnikiem czarno-brązowego atramentu wydzielanego z woreczka czernidłowego wielu przedstawicieli głowonogów, który służy jako narzędzie kamuflażu niejednokrotnie umożliwiając ucieczkę. Melanina jest bardzo trwałym związkiem organicznym, o czym świadczy porównanie odnalezionych śladów melaniny głowonoga sprzed 160 mln lat z melaniną obecną w atramencie współczesnej mątwy *Sepia officinalis* [39].

U bezkręgowców, melanina, oprócz funkcji pigmentacyjnej, jest zaangażowana w istotne procesy fizjologiczne, takie jak gojenie ran, tworzenie skrzepu, twardnienie oskórka (sklerotyzacja), utrzymanie homeostazy jelitowej oraz reakcje obronne [4, 40, 41]. Proces melanizacji nierozzerwalnie towarzyszy zjawisku twardnienia oskórka owadów. Wykazano zależność pomiędzy ilością melaniny a twardością oskórka. Nowa kutikula, pierwotnie miękka i bezbarwna, już 1-2 godz. po linieniu twardnieje i ciemnieje. Melanina wraz z innymi metabolitami tworzy sieciowanie dla białek i chityny, sprawiając, że kutikula staje się nieprzepuszczalną,

zewnętrzną barierą organizmu. Badania przeprowadzone na *Periplaneta* i *Pieris* wskazują, że indukcja syntezy melaniny zaangażowanej w proces sklerotyzacji oskórka przebiega pod kontrolą hormonalną. Wydaje się, że hormony są w tym przypadku odpowiedzialne za zwiększenie przepuszczalności hemocytów i komórek epidermy dla tyrozyny oraz dopaminy, których dalsze przekształcanie wpływa na zmianę zabarwienia i twardości kutikuli [1,42].

UDZIAŁ W REAKCJACH ODPORNOŚCIOWYCH

Melanina bierze udział w procesie krzepnięcia hemolimfy, niezbędnego podczas gojenia ran. U *Drosophila*, komórki krystaliczne gromadzące się w miejscu zranienia uwalniają proPO, warunkując tym samym proces melanizacji, a depozycja melaniny w obrębie zranienia zapobiega utracie hemolimfy [43]. Podczas formowania skrzepu u *Drosophila*, do lizy hemocytów, uwalniania proPO i późniejszej melanizacji, wymagana jest aktywacja szlaku JNK (ang. *c-Jun N-terminal kinases*), małych GTPaz oraz czynnika EIGER (ekwiwalent czynnika martwicy nowotworu u *Drosophila*). EIGER, wytwarzany przez komórki krystaliczne oraz plazmatocyty, może również wyzwalać proces melanizacji, niezależnie od obecności PAMPs mikroorganizmów [4,19].

Układ PO i powstająca w wyniku jego aktywności melanina, zaangażowany jest też w procesy nodulacji i inkapsulacji. W odpowiedzi na obecność dużej liczby mikroorganizmów w organizmie owada, dochodzi do gromadzenia się wokół nich hemocytów tworzących wraz z agregatami drobnoustrojów strukturę określaną jako nodula. Końcowym etapem procesu nodulacji jest odkładanie melaniny na powierzchni noduli. Melanina przyczynia się do unieszkodliwienia patogena, hamując jego wzrost i możliwość namnażania, prowadząc ostatecznie do jego śmierci wskutek braku substancji odżywczych [1,44].

Inkapsulacja jest reakcją owada na obecność w hemocelu większych patogenów, takich jak pierwotniaki, nicienie oraz jaja czy larwy pasożytniczych owadów. Pierwszym etapem procesu inkapsulacji u *G. mellonella* (Lepidoptera) jest rozpoznanie ciała obcego w hemocelu przez granulocyty, które reagują degranulacją. Substancje chemiczne zawarte w granulach działają chemotaktycznie na plazmatocyty, które gromadzą się wokół patogena, tworząc wielowarstwową otoczkę. W zależności od rzędu owadów w procesy te zaangażowane są różne hemocyty: u Lepidoptera – granulocyty i plazmatocyty, u *Drosophila* (Diptera) w kapsułach obserwuje się lamellocyty. Podobnie, jak w przypadku nodulacji, melanina odkładana w kapsułach hamuje rozwój patogenów [44].

Rolą PO u małży, przedstawicieli mięczaków, tak jak u innych bezkręgowców, jest udział w reakcjach obronnych, ale również aktywność antyoksydacyjna i detoksyfikacyjna. Rola ta jest uzależniona od tkanki, w której PO występuje. W hemocytach i plazmie PO pełni rolę cząsteczki efektorowej w reakcjach immunologicznych. Enzym ten odpowiada również za wytwarzanie i naprawę muszli oraz przytwierdzenie małży do podłoża. Ostatnie doniesienia naukowe wskazują na rolę PO (lakazy), jako bioindykatora czystości wód (dzięki jej roli antyoksydacyjnej). Ze względu na fakt, że PO wykorzystuje zarówno substraty fenolowe, jak rów-

niez inne związki organiczne w przeprowadzanych przez siebie reakcjach, może być wykorzystywana przez organizm mięczaków do metabolizowania zanieczyszczeń środowiskowych [5].

Oksydaza fenolowa zaangażowana jest w również w procesy odpornościowe u pierścienic (Annelida). Pory grzbietowe, występujące w każdym segmencie ciała dżdżownic, stanowią wrota, przez które do celomy mogą dostać się ze środowiska drobnoustroje. Z tego powodu płyn celomatyczny nie jest jałowy - może zawierać ok. 6×10^5 /ml bakterii. Ilość drobnoustrojów w płynie celomatycznym kontrolowana jest przez komórki o zdolnościach fagocytujących, których liczba ok. 10-krotnie przewyższa liczbę bakterii [45]. Poza dużą liczbą fagocytów, dżdżownice wykorzystują również inne mechanizmy do walki z patogenami. W odpowiedzi na obecność patogenów u dżdżownicy kompostowej (kompostowiec różowy) *Eisenia fetida* (skąposzczety) dochodzi do formowania tzw. ciał brązowych (ang. *brown bodies*), które zawierają bakterie, pasożyty, uszkodzone własne komórki. Podobne struktury zaobserwowano u przedstawiciela wieloszczetów, nereidy różnokolorowej *Nereis diversicolor*. Kolor ciał brązowych związany jest z wytwarzaniem melaniny przy udziale PO pochodzącej z celomocytów [7]. Parzydełkowce (Cnidaria), np. koral *Gorgonia ventalina*, również wykorzystują aktywność oksydazy fenolowej do obrony całych kolonii przed patogenami, np. grzybem *Aspergillus sydowii*. W miejscu infekcji obserwuje się nagromadzenie amebocytów, które odpowiedzialne są za wytwarzanie składników układu oksydazy fenolowej [46].

UDZIAŁ W UTRZYMANIU HOMEOSTAZY JELITA

Badania dotyczące układu oksydazy fenolowej u owadów skupiają się głównie na jego aktywności w hemolimfie i oskórku. Wyniki badań ostatnich lat wskazują jednoznacznie, że proces melanogenezy zachodzi również w jelicie owadów. Jednym z mechanizmów odpornościowych uruchamianych w jelicie w reakcji na obce czynniki biotyczne i abiotyczne dostające się z pokarmem, jest właśnie aktywacja oksydazy fenolowej. Źródłem aktywności PO w jelicie świerszczy *Gryllus bimaculatus* są hemocyty. Zsyntetyzowana w hemocytach proPO jest transportowana przez błonę podstawną do światła jelita środkowego, gdzie ulega aktywacji przez trypsynę jelitową [47]. W trakcie przejścia przez jelito tylne zabarwienie odchodów tego owada ulega zmianie z zielonego na czarne, co tłumaczy się aktywnością PO prowadzącą do powstania melaniny. Działanie to ma na celu zahamowanie nadmiernego namnażania drobnoustrojów, mogącego doprowadzić do szoku septycznego owada. Inną prawdopodobną przyczyną jest ograniczenie ilości patogenów w odchodach, co ma szczególne znaczenie dla owadów narażonych na ryzyko przyjęcia pożywienia zanieczyszczonego własnymi odchodami, np. u gatunków roślinożernych. Melanizację odchodów zaobserwowano również u larw jedwabnika *B. mori*. W tym przypadku geny dla proPO (*proPO1* i *proPO2*) ulegały ekspresji w komórkach epidermalnych jelita tylnego. Podanie gąsienicom fenyloctiomocznika (PTU, ang. *phenylthiourea*), inhibitora procesu melanizacji, powodowało zachowanie zielonego zabarwienia odchodów [48]. W innych badaniach wykazano, że po immunizacji bakteryjnym LPS geny dla proPO ulegają ekspresji we wszystkich odcinkach jelita szarańczy wędrowniej *L. migratoria*, zwłaszcza w jelicie przednim

[49]. U różnych gatunków europejskich pszczoł na granicy jelita środkowego i tylnego zaobserwowano występowanie ciemnej struktury (ang. *scab-like structure*), która pojawia się krótko po wygryzieniu dorosłych osobników i powiększa się z wiekiem. Warto podkreślić, że u pszczoł wygryzionych w sterylnych warunkach takiej struktury nie stwierdzono, a jej powstawanie skorelowane jest z obecnością bakterii symbiotycznej *Frischella perrara*. Autorzy sugerują, że jest to jeden z mechanizmów, który chroni młode pszczoły przed nadmierną kolonizacją ich jelit przez *F. ferrara*. Z kolei zakażenie *D. melanogaster* bakterią *Pseudomonas entomophila* indukowało melanizację na granicy jelita przedniego i środkowego. Melanizacja w jelitach *Drosophila* może być również efektem warunków stresowych, m. in. niewłaściwej diety. Przy równoczesnym braku ochronnych kinaz białkowych aktywowanych warunkami stresowymi, enterocyty jelita tylnego ulegają apoptozie i melanizacji, niezależnej od obecności hemocytów. Melanizacja pełni w tym wypadku prawdopodobnie rolę zbliżoną do gojenia ran, zapobiegając utracie kolejnych enterocytów. Podobna funkcja melaniny obserwowana była w jelicie komarów podczas infekcji *Plasmodium* [4].

Oksydaza fenolowa obecna w jelitach owadów roślinożernych może odgrywać dodatkowo rolę detoksykującą metabolity wtórne roślin. Funkcję tę pełnią często symbiotyczne bakterie bytujące w przewodzie pokarmowym owadów [50]. Wykazano, że *Drosophila*, *B. mori*, czy *Helicoverpa armigera*, karmione roślinami bogatymi w związki fenolowe, wykorzystują PO występującą w jelicie przednim do ich przekształcenia w nietoksyczne metabolity, które następnie w jelicie tylnym ulegają dalszemu utlenieniu [51].

ROLA TYROZYNAZY U CZŁOWIEKA

Tyrozynaza (TYR; EC 1.14.18.1) jest również kluczowym enzymem w procesie melanogenezy u ludzi. Jest to glikoproteina zbudowana z 511 reszt aminokwasów występująca w melanocytach. Za aktywność katalityczną enzymu i syntezę melaniny odpowiedzialna jest domena N-końcowa, która lokalizuje się wewnątrz melanosomu. W centrum aktywnym tej domeny znajdują się dwa koordynacyjnie związane atomy miedzi. Domena C-końcowa, zlokalizowana w cytoplazmie melanocytu, odpowiada za transport wewnątrzkomórkowy tyrozynazy oraz za jej prawidłową lokalizację. Obie domeny połączone są regionem transbłonowym [52].

SYNTEZA MELANINY

Biosynteza melaniny w organizmie ludzkim odbywa się w melanocytach. Melanocyty występują w warstwie podstawnej naskórka, błonie naczyniowej oka, uchu wewnętrznym, ośrodkowym układzie nerwowym, mieszkach włosowych, a także w sercu [53]. Komórki te zaliczane są do komórek immunokompetentnych; wykazują zdolność fagocytozy drobnoustrojów i mogą prezentować antygeny limfocytom T. Stanowią też bardzo istotny składnik układu odpornościowego skóry. Melanina powstaje w otoczonych błoną organellach, melanosomach, które występują w cytoplazmie melanocytów i odpowiadają zarówno za syntezę jak i magazynowanie melaniny. Wyróżniamy dwa rodzaje melanosomów: (1) elipsoidalne eumelanosomy o wymiarach $0,9 \mu\text{m} \times 0,3 \mu\text{m}$, które syntetyzują eumelaninę,

(2) sferyczne feomelanosomy syntetyzujące feomelaninę, których średnica wynosi 0,7 μm [54-56].

Kluczowy etap syntezy melaniny w melanosomach katalizuje tyrozynaza: hydroksyluje tyrozynę do 3,4-dihydroksyfenyloalaniny (DOPA). Tyrozyna powstaje z feniloalaniny w cytoplazmie melanocytów przy udziale hydroksylazy feniloalaninowej, a następnie drogą dyfuzji ułatwionej jest transportowana do melanosomów, gdzie jest utleniana do Dopachinonu [53, 55]. Na tym etapie dochodzi do rozdzielenia szlaku powstawania eu- i feomelaniny. Dopachinon będąc związkiem wysoce reaktywnym, łatwo ulega wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji do leuko-Dopachromu. Następnie, w reakcji katalizowanej przez tautomerazę dopachromową dochodzi do przegrupowania Dopachromu do kwasu 5,6-dihydroksyindolo-2-karboksylowego (DHICA), w wyniku czego powstaje jedna ze składowych eumelaniny. W przypadku braku tautomerazy, Dopachrom ulega procesowi powolnej spontanicznej dekarboksylacji, dzięki czemu powstaje 5,6-dihydroksyindol (DHI), który jest innym komponentem eumelaniny. Powstałe indole zostają utlenione za pośrednictwem tyrozynazy do indolochinonów, które następnie przechodząc proces polimeryzacji tworzą końcowy produkt, czyli brązowo-czarną eumelaninę. Do prawidłowego przebiegu syntezy eumelaniny niezbędne jest m.in. białko TRP1 (ang. *tyrosinase-related protein 1*; białko pokrewne tyrozynazie 1), które moduluje aktywność tyrozynazy. W przypadku niskiego stężenia tyrozyny, przy jednoczesnym wysokim stężeniu cysteiny i glutaminy w melanosomach dochodzi do addycji cysteiny do Dopachinonu. Powstaje wówczas cysteinylo-DOPA, a jej cyklizacja prowadzi do syntezy pochodnych benzotiazyny, które są przekształcane ostatecznie w żółto-czerwoną feomelaninę [55,57] (Ryc. 1).

Wydajność syntezy melaniny zależy w zasadniczym stopniu od wartości pH panującego w melanosomach. W trakcie dojrzewania tych organelli wartość pH w ich wnętrzu ulega zmianie. Początkowo wynosi około 5,0 i jest optymalne dla aktywności izoformy I hydroksylazy tyrozynowej (THI). W tak kwaśnym środowisku aktywność tyrozynazy jest zahamowana. Dzięki białku P, obecnemu w błonie melanosomu, wartość pH wzrasta do 6,8 tworząc tym samym warunki optymalne dla kluczowego enzymu syntezy melaniny. W błonie melanosomu stwierdzono także występowanie białka transportowego MATP (ang. *membrane associated transporter protein*), które odgrywa ważną rolę regulacyjną. Wyniki uzyskane w badaniach z wykorzystaniem hodowli komórkowych ludzkiego czerniaka oraz prawidłowych melanocytów ludzkich wykazały, że zaburzenie ekspresji genu *MATP* prowadzi do obniżenia aktywności tyrozynazy poprzez znaczne obniżenie pH wewnątrz melanocytów. Prawdopodobnie białko MATP bierze udział w regulacji melanogenezy poprzez utrzymywanie wewnątrz melanosomów wartości pH optymalnych dla związania miedzi z miejscem aktywnym tyrozynazy. Potwierdzono to badaniami, w których obserwowano aktywność tyrozynazy po dodaniu jonów miedzi do lizatów komórek z wyciszoną ekspresją *MATP* [53].

ROLA MELANINY I SKUTKI DEFICYTU TYROZYNAZY

Melanina u ludzi odpowiada za najbardziej widoczne cechy fenotypowe: barwę skóry, włosów oraz tęczówki oczu. Pełni funkcję ochronną przed szkodliwym działaniem pro-

mieniowania ultrafioletowego (UV), a także eliminuje wolne rodniki, przede wszystkim reaktywne formy tlenu (RFT). Promieniowanie UV stymuluje syntezę melaniny a także jej eksport do keratynocytów, czego efektem jest brązowienie skóry określane jako opalanie [54]. Z reguły obserwuje się wyraźne powiązanie pomiędzy konstytutywną barwą skóry a jej odpornością na wystąpienie rumienia lub oparzeń słonecznych pod wpływem promieni UV. Ponadto, badania epidemiologiczne wyraźnie wskazują, że w przypadku osób z jasną karnacją, występowanie nowotworów skóry jest o wiele częstsze niż u osób z ciemną karnacją, które opalają się o wiele łatwiej. Bogata w azot eumelanina, będąca dominującym pigmentem w gałce ocznej, pochłania promieniowanie ultrafioletowe, dzięki czemu ma właściwości fotoprotekcyjne [53,57]. Istotną cechą jest również neutralizacja wolnych rodników i reaktywnych form tlenu. Drugi rodzaj melaniny to feomelanina, która pod wpływem UV może stać się źródłem rodników hydroksylowych oraz anionu nadtlennkowego, co może skutkować oksydacyjnym uszkodzeniem kwasów nukleinowych, lipidów i białek. Feomelanina nie przejawia właściwości ochronnych, ma właściwości fotouczulające, a ponadto może przyczyniać się do karcynogenezy. Barwnik ten występuje w wargach, brodawkach sutkowych oraz zewnętrznych narządach płciowych [54,55,57,58]. Rodzaj zabarwienia zależy w głównej mierze od wzajemnego stosunku eu- i feomelaniny, natomiast przyczyniają się do tego także liczba, aktywność oraz zawartość melanosomów; jednak nie stwierdzono bezpośredniego związku między ilością melanocytów a kolorem skóry. Biorąc pod uwagę pigmentację skóry, wyróżniamy trzy główne rasy: celtycką, kaukaską i negroidalną. Przedstawiciele rasy celtyckiej wyróżniają się bardzo jasną karnacją, a przyczynia się do tego mała ilość melanosomów syntetyzujących głównie feomelaninę. Odwrotna sytuacja ma miejsce u osób czarnoskórych (rasa negroidalna), posiadają dużą ilość melanosomów, które wypełnione są tylko eumelaniną. W przypadku rasy kaukaskiej mamy do czynienia z dużą ilością melanosomów, natomiast eumelanina syntetyzowana jest w ilościach śladowych. Wartym podkreślenia jest fakt, że w trakcie życia danego osobnika melanocyty występują w stałej określonej liczbie [54].

Jedną z najczęściej występujących chorób związanych z niedoborem lub brakiem tyrozynazy jest bielactwo wrodzone, albinizm. Jest to grupa genetycznie uwarunkowanych zaburzeń metabolizmu tyrozyny, która charakteryzuje się zmniejszeniem lub całkowitym brakiem produkcji melaniny w komórkach barwnikowych człowieka oraz zwierząt. Brak tyrozynazy uniemożliwia powstawanie melaniny, konsekwencją czego jest brak zabarwienia skóry, włosów oraz oczu. Wyróżniamy 4 typy albinizmu skórno-ocznego (OCA, ang. *oculocutaneous albinism*), z których każdy ma inne podłoże genetyczne. Typ I OCA spowodowany jest obniżeniem lub brakiem aktywności tyrozynazy; zidentyfikowano prawie 80 mutacji w obrębie genu kodującego ten enzym. Typ II OCA charakteryzuje się mutacją w obrębie genu kodującego białko P, które prawdopodobnie odgrywa rolę w regulacji pH melanocytów. Typ III OCA związany jest z mutacją genu dla białka TRP1, które stabilizuje tyrozynazę w procesie syntezy eumelaniny. OCA typu IV związany jest z defektem genu kodującego białko transportowe MATP [59].

PODSUMOWANIE

Zasadniczą rolą oksydazy fenolowej u zwierząt jest katalizowanie kluczowego etapu procesu melanogenezy, dzięki czemu w organizmie pojawia się melanina. Barwniki melaniczne u człowieka odgrywają przede wszystkim istotną rolę fotoprotekcyjną, a u zwierząt bezkręgowych biorą udział w reakcjach odpornościowych, gojeniu ran, krzepnięciu hemolimfy, czy utrzymaniu homeostazy jelita. Produkty pośrednie melanogenezy wykazują szkodliwe działanie nie tylko wobec patogenów, ale również wobec komórek gospodarza, stąd niezbędna jest ścisła kontrola tego procesu. U ludzi najważniejszy enzym w tych reakcjach, tyrozynaza, ukryta jest w specjalnie do tego celu przeznaczonych organellach melanocytów – melanosomach. U bezkręgowców tyrozynaza syntetyzowana jest w postaci proenzymu, a jego aktywacja możliwa jest po uruchomieniu złożonej kaskady proteaz serynowych na skutek rozpoznania wzorców molekularnych drobnoustrojów. O znaczeniu tyrozynazy i syntezy melaniny dla zachowania integralności organizmu u bezkręgowców świadczy fakt wykorzystywania strategii deregulacji układu oksydazy fenolowej przez patogeny i pasożyty.

PIŚMIENNICTWO

- Gonzales-Santoyo I, Cordoba-Aguilar A (2012) Phenoloxidase: a key component of insect immune system. *Entomol Exp Appl* 142:1-16
- Chase MR, Raina K, Bruno J, Sugumaran M (2000) Purification, characterization and molecular cloning of prophenoloxidase from *Sarcophaga bullata*. *Insect Biochem Mol Biol* 30: 953-967
- Cerenius L, Lee BL, Söderhäll K (2008) The proPO-system: Pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol* 29: 263-271
- Whitten M, Coates C (2017) Re-evaluation of insect melanogenesis research: Views from the dark side. *Pigment Cell Mel Res* 30: 386-401
- Luna-Acosta A, Breitwieser M, Renault T, Thomas-Guyon H (2017) Recent findings on phenoloxidases in bivalves. *Mar Pollut Bull* 122: 5-16
- Coates CJ, Nairn J (2014) Diverse immune functions of hemocyanins. *Dev Comp Immunol* 45: 43-55
- Procházková P, Šilerová M, Stijlemans B, Dieu M, Halada P, Josková R, Beschin A, De Baetselier P, Bilej M (2006) Evidence for proteins involved in prophenoloxidase cascade *Eisenia fetida* earthworms. *J Comp Physiol B* 176: 581-587
- Asada N, Kawamoto H, Sezaki H (1999) Deleterious effect of null phenoloxidase mutation on the survival rate in *Drosophila melanogaster*. *Dev Comp Immunol* 23: 535-543
- Evans JD, Aronstein K, Chen YP, Hetru C, Imler JL, Jiang H, Kanost M, Thompson GJ, Zou Z, Hultmark D (2006) Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol* 15: 645-656
- Chen Y, Liu F, Yang B, Lu A, Wang S, Wang J, Ling QZ, Li X, Beerntsen BT, Ling E (2012) Specific amino acids affecting *Drosophila melanogaster* prophenoloxidase activity in vitro. *Dev Comp Immunol* 38: 88-97
- Waterhouse RM, Kriventseva EV, Meister S, Xi Z, Alvarez KS, Bartholomay LC, Barillas-Mury C, Bian G, Blandin S, Christensen BM, Dong Y, Jiang H, Kanost MR, Koutsos AC, Levashina EA, Li J, Ligoxygakis P, MacCallum RM, Mayhew GF, Mendes A, Michel K, Osta MA, Paskewitz S, Shin SW, D Vlachou, Wang L, Wei W, Zheng L, Zou Z, Severson DW, Raikhel AS, Kafatos FC, Dimopoulos G, Zdobnov EM, Christophides GK (2007) Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes. *Science* 316: 1738-1743
- Cohuet A, Osta MA, Morlais I, Awono-Ambene PH, Michel K, Simard F, Christophides GK, Fontenille D, Kafatos FC (2006) *Anopheles* and *Plasmodium*: from laboratory models to natural systems in field. *EMBO Rep* 7: 1285-1289

- Michel K, Suwanchaichinda C, Morlais I, Lambrechts L, Cohuet A, Awono-Ambene PH, Simard F, Fontenille D, Kanost MR, Kafatos FC (2006) Increased melanizing activity in *Anopheles gambiae* does not affect development of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 16858-16863
- Li JS, Ruyl KS, Christensen BM, Li J (2005) Purification and primary structural characterization of prophenoloxidases from *Aedes aegypti* larvae. *Insect Biochem Mol Biol* 35: 1269-1283
- Smith RC, King JG, Tao D, Zeleznik OA, Brando C, Thallinger GG, Dinglasan RR (2016) Molecular profiling of phagocytic immune cells in *Anopheles gambiae* reveals integral roles for hemocytes in mosquito innate immunity. *Mol Cell Proteomics* 15: 3373-3387
- Cerenius L, Söderhäll K (2004) The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev* 198: 116-126
- Wojda I (2017) Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Sci* 24: 342-357
- Veillard F, Troxler L, Reichhart J-M (2016) *Drosophila melanogaster* clip-domain serine proteases: Structure, function and regulation. *Biochimie* 122: 255-269
- Bidla G, Hauling T, Dushay MS, Theopold U (2009) Activation of insect phenoloxidase after injury: Endogenous versus foreign elicitors. *J Innate Immun* 1: 301-308
- Park JW, Kim CH, Kim JH, Je BR, Roh KB, Kim SJ, Lee HH, Ryu JH, Lim JH, Oh BH, Lee WJ, Ha NC, Lee BL (2007) Clustering of peptidoglycan recognition protein-SA is required for sensing lysine-type peptidoglycan in insects. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 6602-6607
- Tassanakajon A, Rimphanitchayakit V, Visetnan S, Amparyup P, Somboonwiwat K, Charoensapsri W, Tang S (2017) Shrimp humoral responses against pathogens: antimicrobial peptides and melanization. *Dev Comp Immunol* : doi.org/10.1016/j.dci.2017.05.009
- Lu A, Zhang Q, Zhang J, Yang B, Wu K, Xie W, Luan Y-X, Ling E (2014) Insect prophenoloxidase: the view beyond immunity. *Front Physiol* 5: 1-15
- Amparyup P, Charoensapsri W, Tassanakajon A (2013) Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune response against major pathogens. *Fish Shellfish Immunol* 34: 990-1001
- Söderhäll I, Wu Ch, Novotny M, Lee BL, Söderhäll K (2009) A novel protein acts as a negative regulator of prophenoloxidase activation and melanization in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J Biol Chem* 284: 6301-6310
- Jiravanichpaisal P, Lee B L, Söderhäll K (2006) Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology* 211: 213-236
- Tirloni L, Seixas A, Mulenga A, da Silva Vaz Jr I, Termignoni C (2014) A family of serine protease inhibitors (serpins) in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Exp Parasitol* 137: 25-34
- Meekins DA, Kanost MR, Michel K (2017) Serpins in arthropod biology. *Semin Cell Dev Biol* 62: 105-119
- An Ch, Kanost MR (2010) *Manduca sexta* serpin-5 regulates prophenoloxidase activation and the Toll signaling pathway by inhibiting hemolymph proteinase HP6. *Insect Biochem Mol Biol* 40: 683-689
- Breugelmans B, Simonet G, van Hoef V, Van Soest Se, Broeck J V (2009) Pacifastin-related peptides: Structural and functional characteristics of a family of serine peptidase inhibitors. *Peptides* 30: 622-632
- Daquinag AC, Nakamura S, Takao T, Shimomishi Y, Tsukamoto T (1995) Primary structure of a potent endogenous dopa-containing inhibitor of phenol oxidase from *Musca domestica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 2964-2968
- Zdybicka-Barabas A, Mak P, Jakubowicz T, Cytryńska M (2014) Lysozyme and defense peptides as suppressors of phenoloxidase activity in *Galleria mellonella*. *Arch Insect Biochem Physiol* 87: 1-12
- Shin SW, Zou Z, Raikhel AS (2011) A new factor in the *Aedes aegypti* immune response: CLSP2 modulates melanization. *EMBO Rep* 12: 938-943
- Lu Z, Beck MH, Wang Y, Jiang H, Strand MR (2008) The viral protein Egf1.0 is a dual activity inhibitor of prophenoloxidase-activating proteinases 1 and 3 from *Manduca sexta*. *J Biol Chem* 283: 21325-21333

34. Lu Z, Beck MH, Strand MR (2010) Egfl.5 is a second phenoloxidase cascade inhibitor encoded by *Microplitis demolitor* bracovirus. *Insect Biochem Mol Biol* 40: 497-505
35. Held KG, LaRock CN, D'Argenio DA, Berg CA, Collins CM (2007) A metalloprotease secreted by the insect pathogen *Photorhabdus luminescens* induces melanization. *Appl Environ Microbiol* 73: 7622-7628
36. Falabella P, Riviello L, Pascale M, Di Lelio I, Tettamanti G, Grimaldi A, Iannone C, Monti M, Pucci P, Tamburro AM, deEguileor M, Gliotti S, Pennacchio F (2012) Functional amyloids in insect immune response. *Insect Biochem Mol Biol* 42: 203-211
37. Arakane Y, Muthukrishnan S, Beeman R, Kanost MR, Kramer KJ (2005) Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 11337-11342
38. Kronforst MR, Barsh GS, Kopp A, Mallet J, Monteiro A, Mullen SP, Protas M, Rosenblum EB, Schneider CJ, Hoekstra, HE (2012) Unraveling the thread of nature's tapestry: The genetics of diversity and convergence in animal pigmentation. *Pigment Cell Res* 25: 411-433
39. Glass K, Ito S, Wilby PR, Sota T, Nakamura A, Bowers CR, Vinther J, Dutta S, Summons R, Briggs DEG, Wakamatsu K, Simon JD (2012) Direct chemical evidence for eumelanin pigment from the Jurassic period. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 10218-10223
40. Sugumaran M (2002) Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Res* 15: 2-9
41. Coates CJ, Decker H (2017) Immunological properties of oxygen-transport proteins: Hemoglobin, hemocyanin and hemerythrin. *Cell Mol Life Sci* 74: 293-317
42. Lupa DA (2000) Znaczenie melanin w życiu owadów. *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych* 49: 246-247
43. Wang L, Kounatidis I, Ligoxygakis P (2014) *Drosophila* as a model to study the role of blood cells in inflammation, innate immunity and cancer. *Front Cell Infect Microbiol* 3: 113
44. Browne N, Heelan M, Kavanagh K (2013) An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence* 4: 597-603
45. Bilej M, Procházková P, Šilerová M, Josková R (2010) Earthworm Immunity, W: Söderhäll K *Invertebrate Immunity. Advances in Experimental Medicine and Biology. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media*, 708: 66-79
46. Mydlarz LD, Holthouse SF, Peters EC, Harvell CD (2008) Cellular responses in sea fan corals: granular amoebocytes react to pathogen and climate stressors. *PLoS One* 3: 1811-1820
47. Joseph W (2014) Origins and activation of prophenoloxidases in the digestive tract of the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Archiv Insect Biochem Physiol* 87: 95-104
48. Shao Q, Yang B, Xu Q, Li X, Lu Z, Wang C, Huang Y, Söderhäll K, Ling E (2012) Hindgut innate immunity and regulation of fecal microbiota through melanization in insect. *J Biol Chem* 287: 14270-14279
49. Pulpitel T, Pernice M, Simpson SJ, Ponton F (2015) Tissue-specific immune gene expression in the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Insects* 6: 368-380
50. Ceja-Navarro JA, Vega FE, Karaoz U, Hao Z, Jenkins S, Lim HC, Kosina P, Infante F, Northen TR, Brodie EL (2015) Gut microbiota mediate caffeine detoxification in the primary insect pest of coffee. *Nat Commun* 6: 7618-7627
51. Wu K, Zhang J, Zhang Q, Zhu S, Shao Q, Clark KD, Liu Y, Ling E (2015) Plant phenolics are detoxified by prophenoloxidase in the insect gut. *Sci Rep* 5: 16823-16838
52. Cwynar A, Olszewska-Słonina D, Pukownik E (2015) The effect of oxidative modifications of amino acid residues in the active center of tyrosinase on the process of graying. *J Educ Health Sport* 5:102-108
53. Rzepka Z, Buszman E, Beberok A, Wrześniok D (2016) Od tyrozyny do melaniny: ścieżki sygnalizacyjne i czynniki regulujące melanogenezę. *Post Hig Med Dosw* 70: 695-708
54. Rok J, Otręba M, Buszman E, Wrześniok D (2012) Melanina - z melanocytu do keratynocytu, czyli jak przebiega transport melaniny w skórze. *Ann Acad Med Siles* 66: 60-66
55. Marczyńska D, Przybyło M (2013) Melanocyty - komórki barwnikowe o wielu obliczach. *Kosmos* 62: 491-499
56. Plonka PM, Passeron T, Brenner M, Tobin DJ, Shibahara S, Thomas A, Slominski A, Kadakara AL, Hershkovitz D, Peters E, Nordlund JJ, Abdel-Malek Z, Takeda K, Paus R, Ortonne JP, Hearing VJ, Schallreuter KU (2009) What are melanocytes really doing all day long...? *Exp Dermatol* 18: 799-819
57. Stępień K (2010) Udział melanocytów w ochronie przed stresem fotooksydacyjnym. *Post Bioch* 56: 290-297
58. Plonka PM, Picardo M, Slominski AT (2017) Does melanin matter in the dark? *Exp Dermatol* 26: 595-597
59. Drukała J, Bobis S, Żabińska-Plazak E, Wojas-Pelc A (2009) Molekularne podłoże zaburzeń pigmentacji w chorobach skóry. *Przeg Lek* 66: 145-149

Different faces of phenoloxidase in animals

Sylwia Stączek✉, Katarzyna Grygorczuk, Agnieszka Zdybicka-Barabas, Anna Siemińska-Kuczer, Lidiia Vertyporokh, Mariola Andrejko, Iwona Wojda, Małgorzata Cytryńska

Department of Immunobiology, Institute of Biology and Biochemistry, Faculty of Biology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University, 19 Akademicka St., 20-033 Lublin, Poland

✉e-mail: s.staczek@poczta.umcs.lublin.pl

Key words: innate immunity, phenoloxidase, tyrosinase, melanization, serpins, pacifastins

ABSTRACT

Phenoloxidases are oxidoreducing enzymes whose main function is the oxidation of phenols. The term phenoloxidase is often used interchangeably to describe three different enzymes: tyrosinase (EC 1.14.18.1), catechol oxidase, and laccase. Of these, only tyrosinase has two activities: (1) oxygenase activity to hydroxylate monophenols to ortho-diphenols and (2) oxidase activity responsible for further oxidation of ortho-diphenols to ortho-quinones. Tyrosinase is a key enzyme involved in the melanogenesis process, resulting in the formation of black-brown eumelanin and yellow-red feomelanin. In addition to the pigmentary role, human melanin protects against harmful ultraviolet radiation, while in invertebrate animals melanin is involved in the process of cuticle hardening, wound healing, clot formation, maintenance of intestinal homeostasis and defense reactions. In invertebrates, the tyrosinase is synthesized as a proenzyme that is activated by a serine proteases' cascade known as the phenoloxidase system. This system is considered as one of the innate immunity mechanisms.